

Tesis de Posgrado

Influencia de opioides exógenos y endógenos sobre diferentes parámetros fisiológicos del útero de rata

Faletti, Alicia Graciela

1991

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

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

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

Cita tipo APA:

Faletti, Alicia Graciela. (1991). Influencia de opioides exógenos y endógenos sobre diferentes parámetros fisiológicos del útero de rata. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2426_Faletti.pdf

Cita tipo Chicago:

Faletti, Alicia Graciela. "Influencia de opioides exógenos y endógenos sobre diferentes parámetros fisiológicos del útero de rata". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1991. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2426_Faletti.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

2426
1

UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS Y NATURALES

**"INFLUENCIA DE OPIOIDES EXOGENOS Y ENDOGENOS SOBRE DIFERENTES
PARAMETROS FISIOLÓGICOS DEL ÚTERO DE RATA"**

Autor : Lic. ALICIA GRACIELA FALETTI

Director de Tesis : Dra. MARTHA FERNANDEZ de GIMENO

**Lugar de Trabajo : Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos
(CEFyBO)**

**TESIS PRESENTADA PARA OPTAR AL TÍTULO
DE DOCTOR EN CIENCIAS QUÍMICAS**

- 1991 -

Tesis.
2426
y 2

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y al Centro de Estudios Farmacológicos y Botánicos (CEFyBO) por proporcionarme los medios y permitirme realizar el presente trabajo de investigación.

A la Dra. MARTHA FERNANDEZ de GIMENO por la dirección de esta tesis y su confianza.

Al Dr. CARLOS LANTOS por su calidez y amistad.

A mis compañeras y amigas: ANA MARIA FRANCHI, MARCELA CHAUD, ALICIA MOTTA y RAMONA MORALES por su colaboración y paciencia.

***A LAS INOCENTES COLABORADORAS QUE DIERON SUS VIDAS PARA LA
REALIZACION DE ESTE TRABAJO: LAS RATAS***

CAPITULO I : INTRODUCCION

I. 1. UTERO

<i>I. 1. 1. Anatomía, Histología y Fisiología</i>	<i>1</i>
<i>I. 1. 2. Motilidad uterina</i>	<i>5</i>
<i>I. 1. 3. Castración e influencia hormonal</i>	<i>12</i>

I. 2. OPIOIDES

<i>I. 2. 1. Conceptos generales</i>	<i>16</i>
<i>I. 2. 2. Péptidos opioides endógenos</i>	<i>18</i>
<i>I. 2. 3. Receptores opioides</i>	<i>22</i>
<i>I. 2. 4. Morfina y β-endorfina</i>	<i>29</i>

I. 3. PROSTAGLANDINAS

<i>I. 3. 1. Introducción</i>	<i>37</i>
<i>I. 3. 2. Biosíntesis y Metabolismo</i>	<i>40</i>
<i>I. 3. 3. Inhibidores</i>	<i>52</i>
<i>I. 3. 4. Receptores</i>	<i>55</i>
<i>I. 3. 5. Mecanismo de acción</i>	<i>56</i>
<i>I. 3. 6. Efectos fisiológicos y farmacológicos. Aplicaciones y usos clínicos</i>	<i>58</i>
<i>I. 3. 7. Acción de prostaglandinas en el aparato reproductor femenino</i>	<i>61</i>

I. 4.	<u>CALCIO COMO MENSAJERO</u>	
I. 4. 1.	Generalidades	66
I. 4. 2.	Entrada de Ca ⁺⁺ a la célula	68
I. 4. 3.	Liberación de Ca ⁺⁺ de organelas celulares ..	72
I. 4. 4.	Salida de Ca ⁺⁺ de la célula	73
I. 4. 5.	Receptores de Ca ⁺⁺ intracelular	76
I. 4. 6.	Farmacología de los sistemas de transpor- te de Ca ⁺⁺	84
I. 5.	<u>OBJETIVOS</u>	87

CAPITULO II : MATERIALES Y METODOS

II. 1.	<u>MATERIALES</u>	
II. 1. 1.	Animales utilizados	88
II. 1. 2.	Drogas utilizadas	89
II. 2.	<u>METODOS</u>	
II. 2. 1.	Determinación de motilidad uterina	91
II. 2. 2.	Producción y cuantificación de prosta- glandinas	95
II. 2. 3.	Determinación de AMPc	101
II. 2. 4.	Metabolismo del ácido ¹⁴ C-araquidónico ...	103
II. 2. 5.	Captación de ⁴⁵ Ca ⁺⁺ extracelular	105

II. 2. 6. Músculo despolarizado	108
II. 2. 7. Eflujo de $^{45}\text{Ca}^{++}$	108

CAPITULO III ; RESULTADOS

III. 1. Efecto de morfina sobre la motilidad espontánea uterina	110
III. 2. Efecto de morfina sobre la síntesis y liberación de prostaglandinas	112
III. 3. Efecto de distintos opioides sobre la contracti- lidad uterina	114
III. 4. Efecto de β -endorfina sobre la síntesis y libera- ción de prostaglandinas	116
III. 5. Determinación de los niveles de AMPc	118
III. 6. Metabolismo del ácido ^{14}C -araquidónico	124
III. 7. Entrada de $^{45}\text{Ca}^{++}$ extracelular	124
III. 7. 1. Cinética de entrada	126
III. 7. 2. Efecto de opioides	126
III. 7. 3. Acción de activadores	129
III. 7. 4. Acción de bloqueantes	131
III. 7. 5. Músculo despolarizado	133

III. 7. 6. Análisis de resultados anteriores	135
III. 8. Liberación de $^{45}\text{Ca}^{++}$ por el tejido	137
<u>CAPITULO IV</u> : <u>DISCUSION</u>	140
<u>CAPITULO V</u> : <u>CONCLUSIONES</u>	159
<u>CAPITULO VI</u> : <u>REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS</u>	161

INTRODUCCION

I. 1. UTERO

I. 1. 1. ANATOMIA, HISTOLOGIA Y FISIOLOGIA

El útero de los euterios puede presentarse de distintos tipos: simple, bicorne, bipartito o doble. El útero de rata ha sido clasificado como doble o bicorne. Ambos cuernos uterinos desembocan en el extremo superior de la vagina y se relacionan con los ovarios mediante sendas trompas de Fallopio u oviductos (220) (Figura I.1).

El útero de rata está constituido por tres capas de tejido diferentes: una externa, cubierta peritoneal del órgano o serosa; una capa intermedia de músculo liso o miometrio, que constituye la mayor parte del espesor del útero y la interna, endometrio o mucosa glandular (106).

La capa externa está constituida por células mesoteliales sostenidas por tejido conectivo que se continúa con el peritoneo (106).

Las células del miometrio se denominan fibras, son alargadas de extremos afilados y en su citoplasma se encuentran dos componentes fundamentales: el sarcoplasma y las miofibrillas (106). Estas células están dispuestas en paquetes rodeadas por fibras de colágeno.

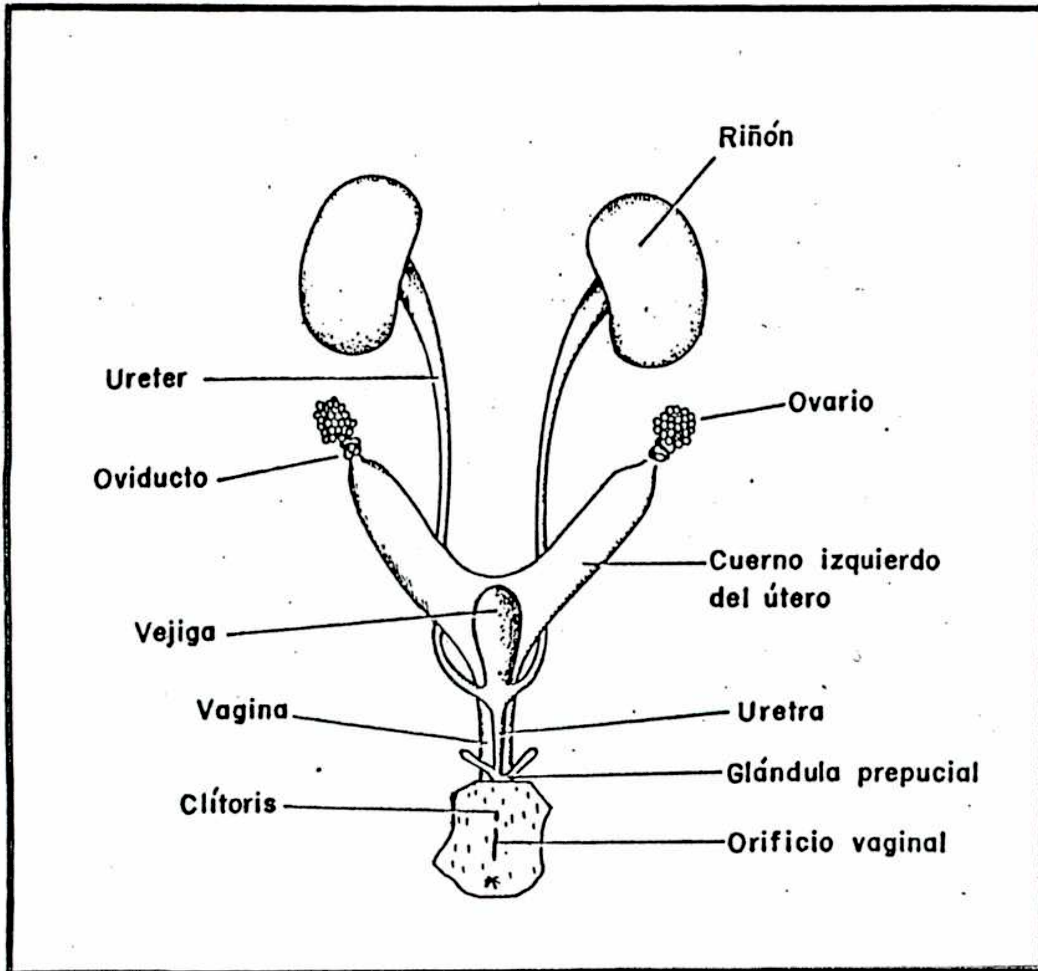


Figura I.1: Sistema urogenital de la rata.

El endometrio está formado por epitelio cilíndrico simple que sufre invaginaciones, originando numerosas glándulas uterinas tubulares que se prolongan hacia una lámina propia muy gruesa llamada estroma (27).

Las ratas y los ratones presentan un ciclo estral de 4 o 5 días. En su transcurso el útero y la vagina sufren modificaciones morfológicas y funcionales. Long y Evans (155) idearon un método para diagnosticar rápidamente las fases del ciclo estral sobre la base de los diferentes tipos celulares presentes en los frotis vaginales de la rata.

Durante el estro o periodo 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 pseudoestratificado, disminuye la vascularización y la actividad de las glándulas uterinas. Los extendidos vaginales presentan leucocitos junto con células escamosas y epiteliales indicando delgadez de la mucosa y la migración de leucocitos a través de ella.

El espesor epitelial se reduce considerablemente durante el diestro y los extendidos vaginales contienen solamente leucocitos.

En el 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 aparecer aisladamente o en bandas (114).

Existen dos tipos de fibras nerviosas en el útero: las colinérgicas y las adrenérgicas (5). Ambas se hallan alrededor de los vasos sanguíneos y en el miometrio. Las colinérgicas son más abundantes en el cervix que en el cuerpo uterino y las adrenérgicas se encuentran en los plexos nerviosos perivasculares.

Los músculos lisos viscerales se dividen en dos grupos, según sus características electrofisiológicas. Aquellos que poseen actividad espontánea se denominan "unitarios" y esta actividad se inicia en una zona específica del tejido llamado "marcapaso". Los que carecen de esta actividad son los llamados "multiunitarios" (32).

El miometrio es un tejido del tipo unitario (32). Las contracciones de estos músculos no son necesariamente iniciadas por el impulso nervioso; pueden ser coordinadas y reguladas por mediación nerviosa.

Si se inserta un microelectrodo dentro de una célula muscular uterina de la rata, la diferencia de potencial existente con referencia a un electrodo externo es de 55 a 60 mV. Al llegar esta diferencia de potencial a un nivel crítico se producen descargas espontáneas. Este valor de potencial es conocido como umbral de potencial de acción que al descargarse autosostenidamente determina la iniciación de las contracciones rítmicas del músculo uterino (161).

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

El marcapaso uterino se distribuye en todo el tejido, a diferencia del músculo cardíaco que está restringido a una zona específica (161). Todas las células del útero pueden ser marcapaso, pero sólo las que poseen excitabilidad elevada pueden generar potenciales de acción.

I. 1. 2. MOTILIDAD UTERINA

En todas las células musculares la contracción es iniciada por incremento de la concentración citosólica de Ca^{++} libre, pero el mecanismo de activación por el Ca^{++} varía de acuerdo con el tipo muscular (4).

La contracción en músculo cardíaco y esquelético involucra excitación y despolarización seguida de liberación de iones Ca^{++} al citoplasma. Este ión luego se une a la tropina y se inicia entonces la contracción muscular. No se encontró tropina en músculo liso y no es un requisito imprescindible la despolarización de membrana para aumentar la concentración de Ca^{++} en citosol. Hay neurotransmisores y drogas que pueden provocar contracción del músculo liso en ausencia de cambios en el potencial de membrana (115).

Las proteínas contráctiles, miosina y actina en músculo liso difieren de las de músculo estriado. El mejor receptor intracelular de Ca^{++} en músculo liso es calmodulina que activa una proteína quinasa específica que produce la fosforilación de la miosina. Se cree que esta fosforilación es necesaria para la activación de la actomiosin ATPasa y la consecuente iniciación de la contracción (115).

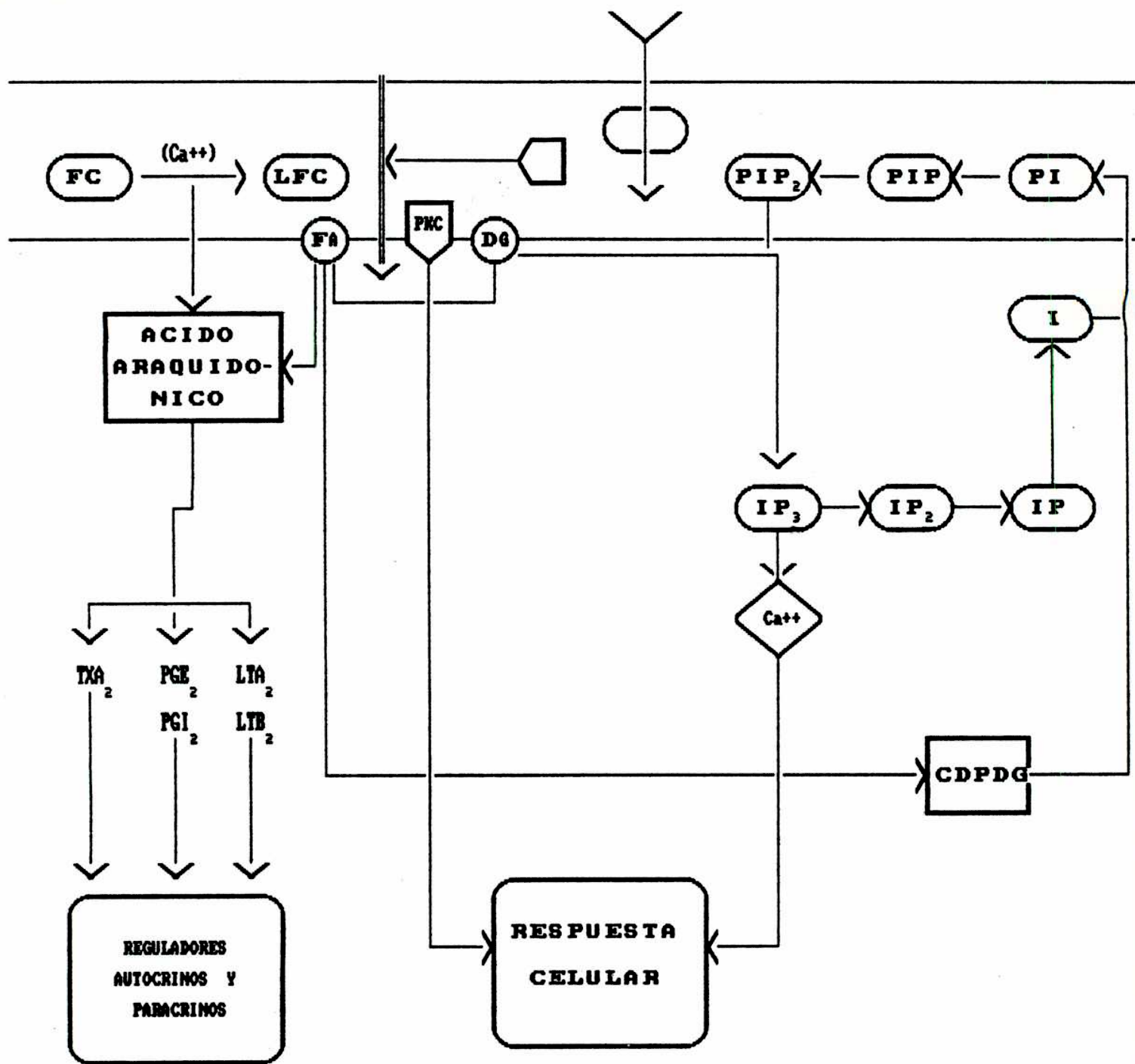
La contracción del músculo liso es producida por muchos factores farmacológicos o eléctricos (aumento de K^+ extracelular), despolarización de la membrana, hormonas y otros. Estos factores generan una señal común intracelular, Ca^{++} , pero usa diferentes caminos de transducción.

Uno de estos mecanismos es a través de la despolarización de membrana por el cual se abren canales de Ca^{++} dependiente de voltaje que permiten el influjo pasivo de iones Ca^{++} del ex-

terior de la célula al citosol (115).

Otro mecanismo es a través de la estimulación del metabolismo de los fosfatidilinositoles de membrana (Figura I.2) (22). La ocupación de los α_1 -adrenoreceptores estimulan la hidrólisis de fosfatidilinositoles bifosfatos (PIP_2) a diacilglicerol (DG) y a inositol trifosfato (IP_3) por activación de una enzima específica denominada fosfolipasa C (FLC). Ambos productos actúan como mensajeros intracelulares. El IP_3 es un activador (soluble en agua) de la liberación de Ca^{++} del retículo endoplásmico. El DG es un activador de la protein quinasa C (PKC) asociada a membrana. La función de la protein quinasa C en músculo liso no se conoce aún. Estos dos resultados (aumento de concentración de Ca^{++} en citosol y activación de la PKC) son los que median la respuesta celular. El IP_3 se convierte en inositol bifosfato (IP_2); en inositol fosfato (IP) y luego en inositol libre, el cual puede convertirse nuevamente en PIP_2 . El DG puede ser transformado en ácido fosfatídico (FA) que a su vez puede seguir dos caminos: transformarse en citidil-difosfato-diacilglicerol (CDFDG) para pasar nuevamente a PIP_2 o ser hidrolizado a ácido lisofosfático y ácido araquidónico (AA) con sus correspondientes metabolitos (eicosanoides) (200).

Otra ruta de formación de estos eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos y leucotrienos) es a través de la activación de la enzima fosfolipasa A_2 (FLA_2) dependiente de iones Ca^{++} pero a partir de otros fosfolípidos como fosfatidilcolina (FC) que



**Figura 1.2: Ciclo de los fosfatidilinositoles
Cascada del Acido Araquidónico y
participación del Ca⁺⁺. Tomado de
Rasmussen, H. (200).**

se convierte en lisofosfatidilcolina (LFC) y ácido araquidónico (AA). Estos eicosanoides sirven a su vez como moduladores de la respuesta celular (Figura I.2) (200).

El aumento de la concentración de Ca^{++} en citosol producido por cualquiera de los mecanismos ya mencionados es el responsable de la iniciación de la contracción muscular. La calmodulina sería el sensor inmediato de este aumento de Ca^{++} citosólico y su asociación con él activaría una protein quinasa específica que fosforila la cadena liviana de la miosina (10). Una vez fosforilada la miosina, se incrementa su afinidad por la actina y sobreviene la contracción (Figura I.3).

Las catecolaminas β -adrenérgicas activan la adenilato ciclasa, incrementando los niveles citosólicos de adenosin-monofosfato cíclico (AMPC) y disminuyen el tono muscular. Estos neurotransmisores intercambian guanosin-difosfato (GDP) por guanosin-trifosfato (GTP) en proteínas específicas (G_α y N_α) que luego se disocian en dos subunidades α y β . La subunidad α de G_α activa luego la adenilato ciclasa y como consecuencia el AMPC disminuye el tono muscular ya sea por un posible incremento de la captación de Ca^{++} por las organelas que lo almacenan o por disminuir la sensibilidad al Ca^{++} del aparato contráctil (Figura I.3) (10, 170).

El segundo factor intracelular de la relajación en músculo liso, sobre todo vascular, es el GMPc. Este es generado por la guanilato ciclasa que se encuentra en dos formas diferen-

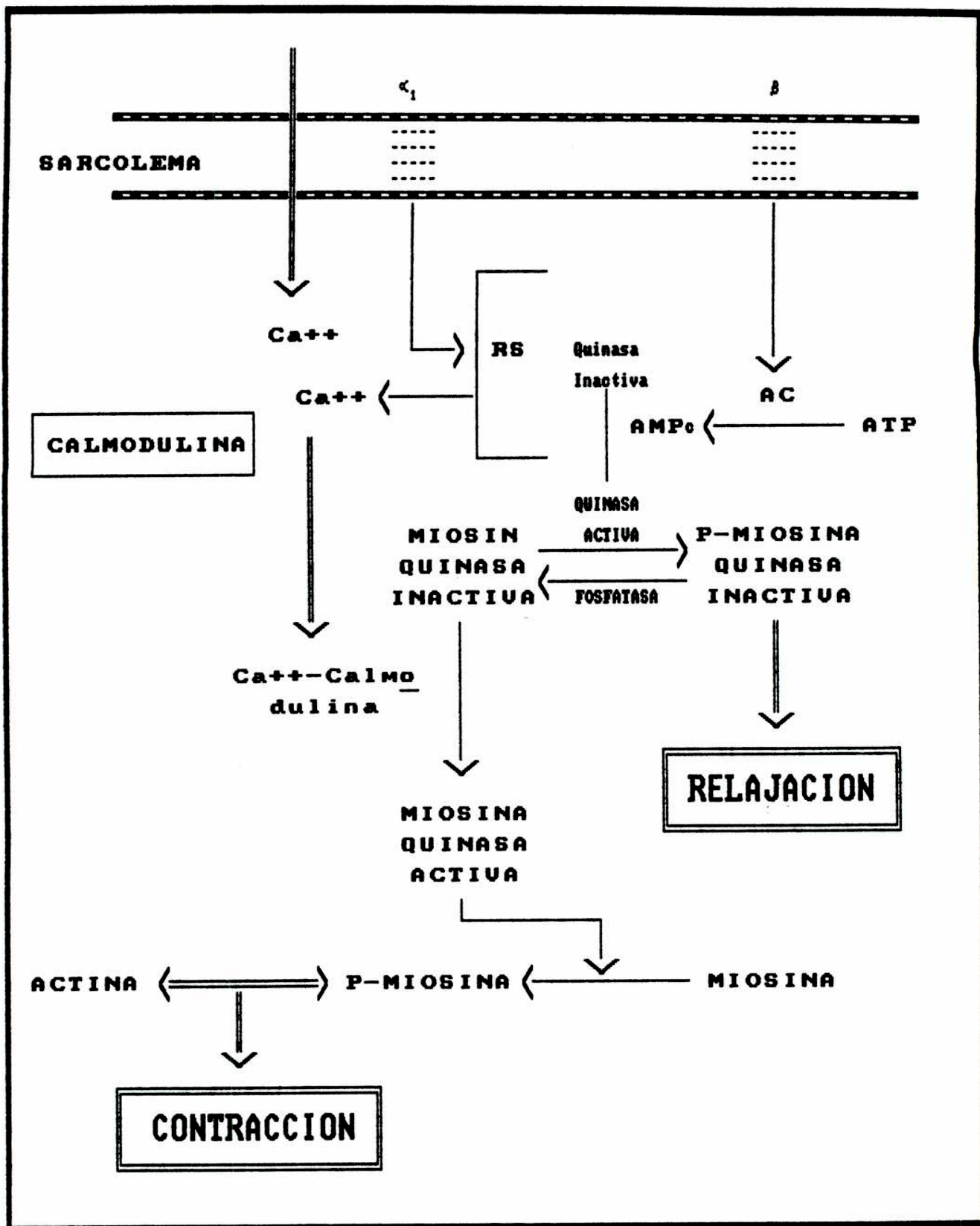


Figura 1.3: Aspectos moleculares de la contracción del músculo liso.

tes; soluble y unida a membrana. La formación de GMPc es estimulada por un factor endotelial (EDRF) que a su vez es estimulado por muchos neurotransmisores siendo entonces un potente vasodilatador. No se conoce en detalle todos estos mecanismos y menos aún todos los factores que intervienen (115, 199).

Los receptores intracelulares para AMPc y GMPc son la subunidad regulatoria de la protein quinasa dependiente de AMPc y el dominio regulatorio de la protein quinasa dependiente de GMPc respectivamente. Cada una de estas proteínas regula la actividad de una protein quinasa específica cuyos nombres derivan de las anteriores (115).

La fosforilación dependiente de AMPc de proteínas específicas no alteran la concentración de Ca⁺⁺ citosólico, sino que afectan la sensibilidad del Ca⁺⁺ al aparato contráctil (175). Las drogas que aumentan los niveles de GMPc (nitroderivados, factor EDRF) sí disminuyen los niveles de Ca⁺⁺ citosólico sugiriendo entonces que la protein quinasa dependiente de GMPc altera los mecanismos de transporte de Ca⁺⁺ disminuyendo su concentración en citosol. Esta protein quinasa se encuentra en alta concentración en músculo liso y fosforila específicamente a péptidos de membrana (43).

En resumen, los dos mecanismos de señales, positivas (Ca⁺⁺ y diacilglicerol) y negativas (AMPc y GMPc) regulan la contractilidad del músculo liso por fosforilación de distintas cla

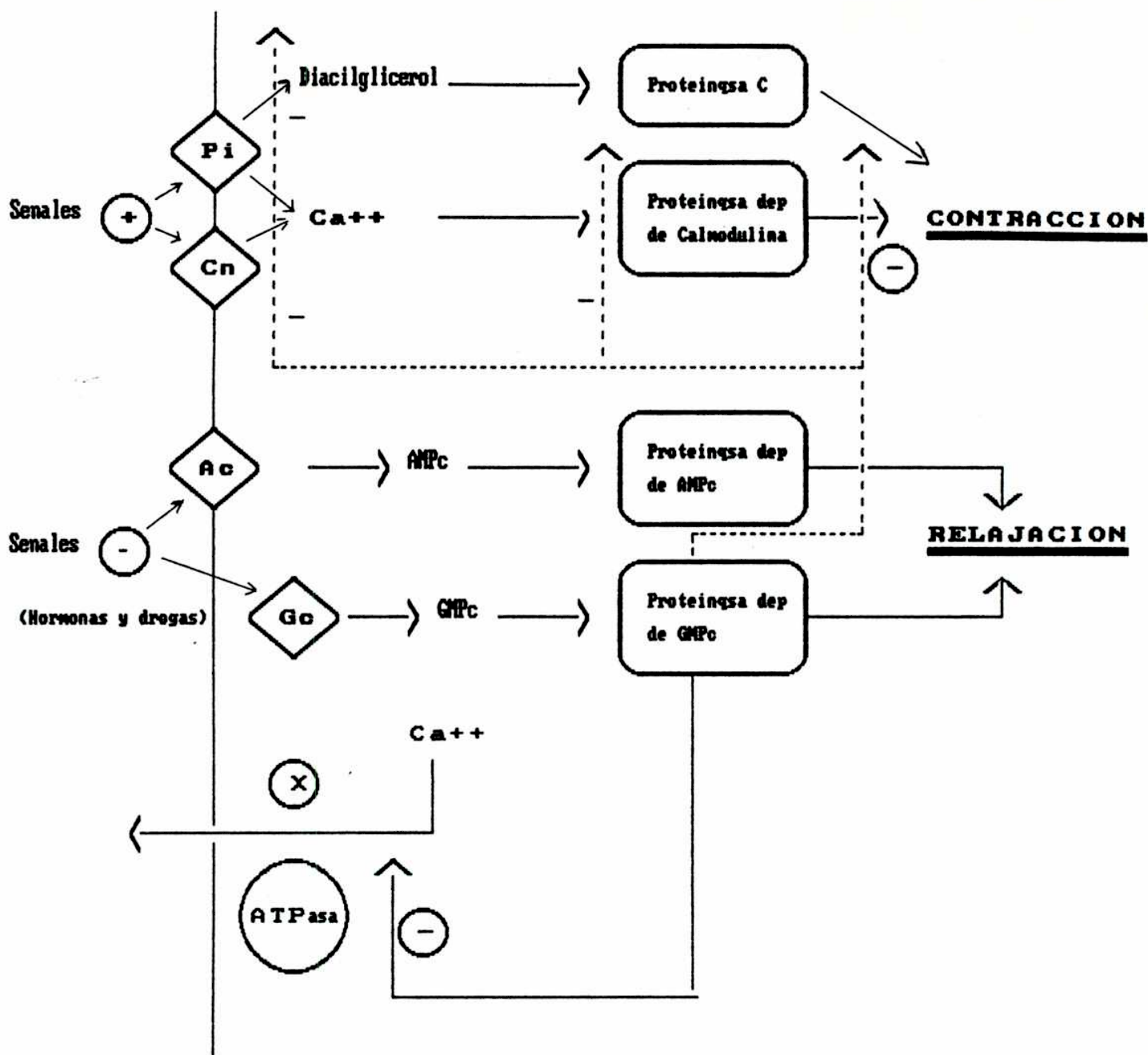
ses de proteínas. La identidad de estas proteínas no se conocen pero se cree que están localizadas en el aparato contráctil y en las membranas que involucran el secuestro de iones Ca^{++} (Figura I.4) (115).

I. 1. 3. CASTRACION E INFLUENCIA HORMONAL

La mayoría de los músculos lisos tienen una función específica que es llevada a cabo intermitente o continuamente a través de la vida. La función del útero sin embargo, varía de acuerdo con el estado reproductivo del animal. Sufre cambios cíclicos en preparación para una posible implantación del blastocito y si esto ocurre, crece con el embrión en desarrollo.

El estado hormonal ejerce una notable influencia sobre el miometrio y operan en él numerosas modificaciones: morfológicas, eléctricas y contráctiles, que se repetirán cíclicamente a través de los ciclos sexuales.

Los esteroides sexuales que circulan en plasma, luego de ser secretados por el ovario, varían marcadamente a lo largo del ciclo estral. Los niveles plasmáticos de estradiol comienzan a elevarse progresivamente a partir de las 17.00 horas del diestro y llegan a un máximo a la mañana del proestro, luego del cual descienden para alcanzar los niveles basales en el estro después de la ovulación (179).



Pi = Fosfatidilinositol
Cn = Canal de Ca⁺⁺
Ac = Adenilato Ciclasa

Gc = Guanilato Ciclasa

X = Sistema no identificado para eliminar el Ca⁺⁺ tal como el intercambio Na⁺/Ca⁺⁺

Figura I.4: Tomado de Hofmann, F (115)

En cuanto a la progesterona se observa que sus niveles aumentan rápidamente a partir de las 13.00 horas del proestro hasta alcanzar el máximo a las 17.00 horas 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 funcionando, aunque de vida fugaz en la rata, secreta progesterona, por lo tanto durante este periodo los niveles plasmáticos de la hormona también están algo elevados (Figura I.5) (179).

Los estrógenos además de promover los efectos del crecimiento uterino, que parecen estar mediados por receptores estrogénicos intracelulares, ejercen una gran influencia sobre la motilidad uterina. Esta es probablemente independiente de aquellas mediadas por un receptor clásico y parece ser el resultado de la influencia de los esteroides sobre la permeabilidad de la membrana a iones tales como el Ca^{++} (15).

En la rata ovariectomizada la ausencia de hormonas sexuales (estrógenos y progesterona) produce diversos cambios en el útero. El miometrio aislado de rata ovariectomizada exhibe una definida actividad espontánea y contracciones más regulares que las preparaciones de animales en estro. Se demostró que el $17-\beta$ -estradiol era inhibidor de las contracciones espontáneas del músculo uterino (96).

La ovariectomía produce una marcada disminución en los receptores para estrógenos y progesterona y los valores norma-

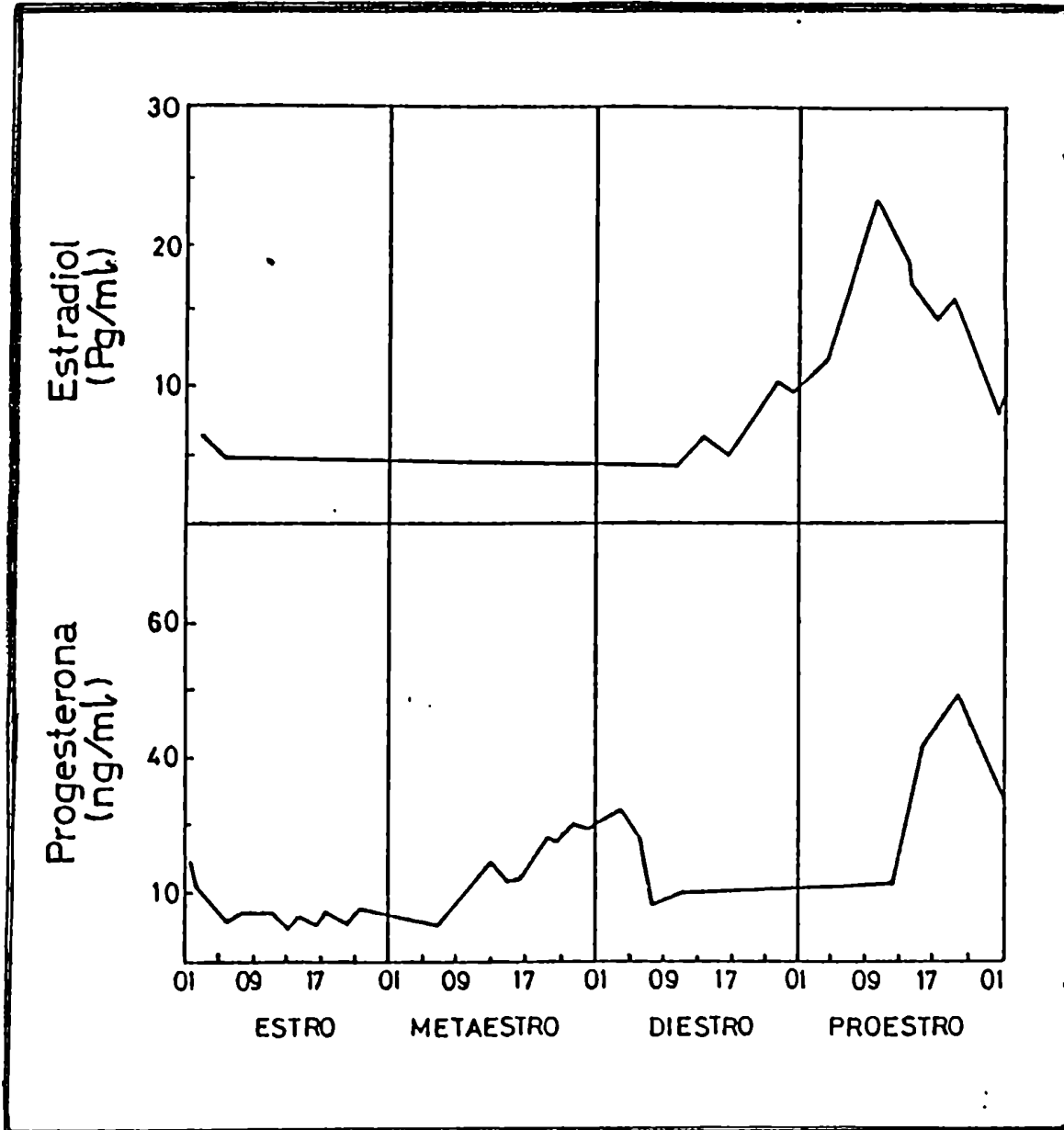


Figura I.5: Niveles plasmáticos de estradiol y progesterona a través del ciclo sexual de la rata.

les son restituidos mediante tratamientos estrogénicos (159).

I. 2. OPIOIDES

I. 2. 1. CONCEPTOS GENERALES

El término opiáceo se ha usado para designar a drogas derivadas del opio, tales como morfina, codeína e incluso análogos semisintéticos derivados de la morfina.

Los opiáceos se empleaban principalmente como analgésicos aunque poseen muchos otros efectos farmacológicos. Interactúan con distintos receptores celulares y comparten algunas propiedades de ciertos péptidos endógenos.

Con el desarrollo posterior de sustancias totalmente sintéticas se utilizó la palabra "opioide" para designar en sentido genérico todas las drogas naturales y sintéticas de acción semejante a la morfina.

El término narcótico, deriva del griego "estupor", era aplicable a cualquier sustancia capaz de producir sueño y se la utilizó para designar analgésicos fuertes del tipo de la morfina. Hoy, este término, ya no tiene utilidad farmacológica.

La palabra opio deriva del nombre griego "jugo" pues se obtiene del jugo de la amapola por incisión de las cápsu-

las (frutos) crudo del "Papaver Somniferum", originaria del Asia Menor. Los médicos árabes, quienes ya en la antigüedad conocían bien los usos del opio, la introdujeron en Oriente donde se empleó principalmente para combatir ciertas enfermedades como la disentería.

El opio actualmente se emplea como medicamento, pero ha dado lugar a usos extramedicinales de marcado carácter pernicioso: el opio se fuma, se come y se masca.

Contiene más de 30 alcaloides diferentes. En 1806 Sertürner aisló y describió uno de ellos al que llamó morfina, por Morfeo, el dios griego del sueño. Luego se describieron otros alcaloides como codeína en 1832, papaverina en 1848, etc (124).

En Europa la disponibilidad del opio produjo cierto grado de abuso pero la invención de la jeringa hipodérmica y el uso parenteral de la morfina dieron origen a una variedad más grave de adicción.

Los alcaloides del opio se dividen en dos grupos; los derivados del grupo fenantrénico (morfina, codeína, tebaina) y los derivados del grupo bencil-isoquinolínico (papaverina, narcotina, narceína). Estos dos grupos tienen acciones muy diferentes pero el efecto predominante del opio es su potente acción depresora del sistema nervioso central debido a su contenido en morfina.

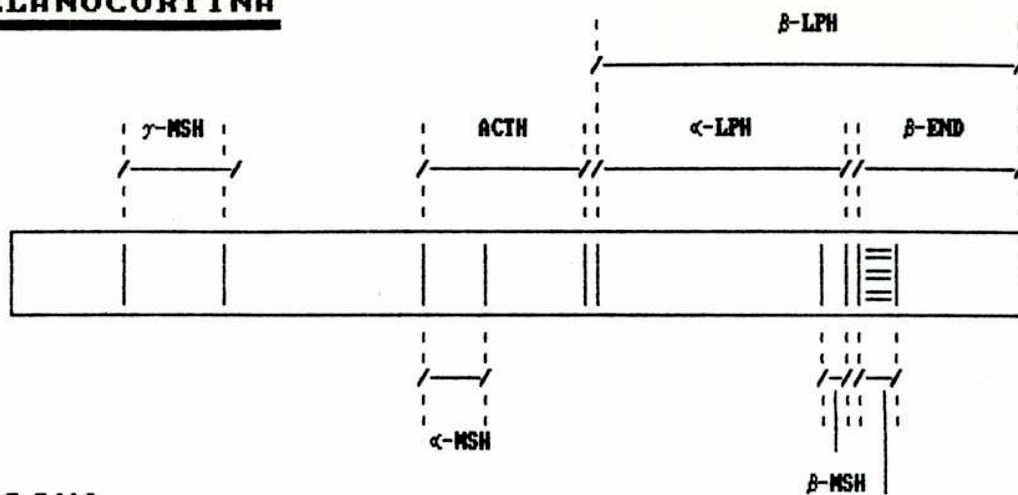
El problema de la adicción a los opiáceos estimuló la búsqueda de analgésicos potentes que no produjeran dependencia. En 1951 (124) se comprobó que un compuesto, la nalorfina, antagonizaba los efectos de la morfina por lo que se la utilizaba como antídoto en caso de intoxicaciones severas. Más tarde se demostraron graves efectos colaterales producidos por este antagonista. Esto condujo al descubrimiento de drogas nuevas como el antagonista "naloxona" y otros compuestos con acciones mixtas (pentazocina, butorfanol, etc.).

Estos agentes no sólo han ampliado los límites de entidades terapéuticas disponibles, sino que junto con el descubrimiento de los receptores para los opiáceos y los péptidos endógenos, que se unen a estas estructuras, han ayudado a conocer más sobre las acciones de los opioides.

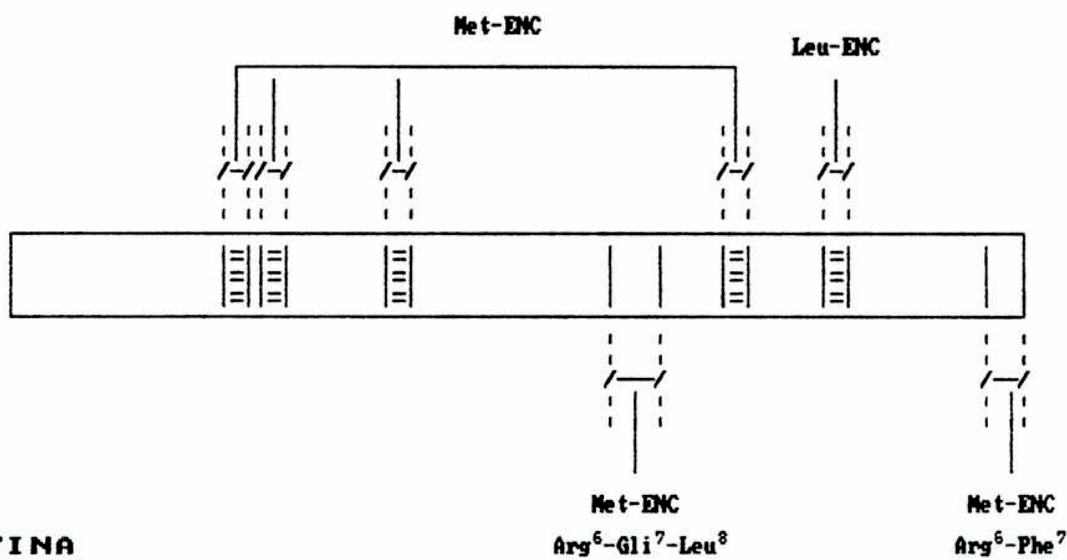
I. 2. 2. PEPTIDOS OPIOIDES ENDOGENOS

Hasta ahora se identificaron tres familias de péptidos opioides: encefalinas, endorfinas y dinorfinas. Cada una deriva de un polipéptido precursor genéticamente distinto llamado prohormona. Estos precursores son: proencefalina (o proencefalina A), proopiomelanocortina (POMC) y prodinorfina (o proencefalina B). Como se observa en la Figura I.6 cada uno de estos precursores contienen varios péptidos biológicamente activos, opioides y no opioides, que se detectan en sangre y diversos tejidos (124).

PROPIOMELANOCORTINA



PROENCEFALINA



PRODINORFINA

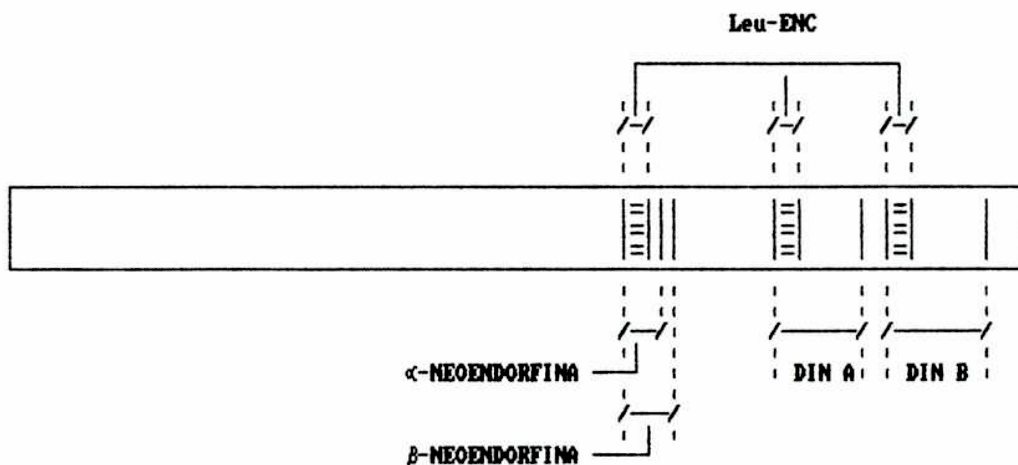


FIGURA I.6

La proencefalina A es precursora de Met y Leu-encefalina, péptido F, péptido E, adenorquina, BAM-12P, BAM-20P y BAM-22P (BAM = médula adrenal bovina) (197, 246).

La POMC contiene la secuencia de aminoácidos de la hormona citoestimulante (τ -MSH), adrenocorticotrofina (ACTH) y β -lipotrofina (β -LPH). Dentro de la secuencia de 91 aminoácidos de la β -LPH están la β -endorfina y la β -MSH. Aunque la β -endorfina contiene la secuencia para la Met-encefalina en su extremo amino, no se convierte en este péptido sino que esta encefalina deriva del procesamiento de la proencefalina (Figura I.6).

La prodinorfina da origen a cinco péptidos: dinorfina A (1-17) que puede a su vez clivarse a dinorfina A (1-8), dinorfina B (1-13) y neoendorfina α y β , rinorfina y leunorfina.

Estos péptidos opioides comparten la misma secuencia N-terminal: Tir-Gli-Gli-Fen-X donde X = Leu o Met. Es la mínima secuencia para tener actividad opioide independientemente de la cadena C-terminal. A pesar de sus semejanzas interactúan con diferentes subtipos de receptores (246).

Las moléculas precursoras y los péptidos derivados de ellas no se confinan al sistema nervioso central, sino que se hallan distribuidos de manera específica y su concentración depende de cada tejido. La distribución de los péptidos de la POMC es limitada. Se encuentran en el encéfalo, en el núcleo arqueado, que

envían sus fibras a las áreas límbicas. La hipófisis es un sitio importante para estos péptidos, aunque también se los encuentran en cantidades apreciables en las células de los islotes pancreáticos.

Los péptidos originados a partir de la prodinorfina y de la proencefalina se hallan muy difundidos por todo el sistema nervioso central. Los provenientes de esta última, se encuentran en áreas que se relacionan con la percepción del dolor, con la modulación del comportamiento afectivo y con la regulación del sistema nervioso autónomo y funciones neuroendócrinas. (9, 26, 261, 267).

Muchos de estos péptidos opioides se los han hallado en otros tejidos como médula suprarrenal, en estómago e intestino de diferentes especies (9, 26), en cuerpo lúteo y células foliculares (152, 154, 254), en vejiga humana (221), fluido uterino humano y de vaca (193), en endometrio humano (257), en células de Leydig fetales (72), en placenta humana (18, 141, 160), en plasma y cordón umbilical (188).

No todas las células que elaboran un precursor dado almacenan y liberan la misma mezcla de péptidos opioides activos. Por ejemplo en la hipófisis se almacena más β -LPH que β -endorfina en el lóbulo anterior, mientras que en el lóbulo intermedio sucede lo contrario (9). Estas diferencias se originan en variaciones de contenido de peptidasas que producen fragmentos opioides activos y

los degradan.

Aunque estos péptidos funcionarían como neurotransmisores o neurohormonas, no se ha elucidado del todo su papel fisiológico, sobre todo porque coexisten con otros neurotransmisores en una misma neurona. Se conocen por ejemplo que las encefalinas son neurotransmisores involucrados en un sistema natural de supresión del dolor y probablemente también en otras funciones endócrinas y de comportamiento (225).

I. 2. 3. RECEPTORES OPIOIDES

Los receptores opioides, ubicados sobre las membranas de células nerviosas, son la clave para que los opioides desde afuera de la célula modifiquen los procesos intracelulares y alteren la función celular. Median los efectos de opioides endógenos y drogas opioides (226).

En el sistema nervioso central existen evidencias de cuatro categorías principales de receptores que se designan como mu (μ), Kappa (K), delta (δ) y sigma (σ) (Figura I.7) (118). También se conocen subtipos de algunos de estos receptores.

Los diversos tipos de receptores son identificados utilizando drogas o ligandos endógenos específicos para cada uno de ellos (98, 118).

Debido a que las sustancias opioides mimetizan a

TIPO	SUB TIPO	ACCION FARMACOLOGICA	UBICACION	AGONISTAS	OBSERVACIONES
μ	μ_1, μ_2	<ul style="list-style-type: none"> - Analgesia - Euforia - Adicción - Depresión respiratoria 	<ul style="list-style-type: none"> - Regiones cerebrales moduladoras del dolor, hipotálamo, tálamo. - Ileo de cobayo 	<ul style="list-style-type: none"> - Morfina - β-Endorfina - Algunas encefalinas - BAM-22P - BAM-12P - Péptido E 	<ul style="list-style-type: none"> - μ_1 = Alta afinidad. Produce analgesia - μ_2 = Baja afinidad. Involucrado en depresión respiratoria. <p>Antagonista: Maloxona (mayor afinidad)</p>
δ	?	<ul style="list-style-type: none"> - Alteraciones en el comportamiento afectivo. - Taquipnea - Euforia 	<ul style="list-style-type: none"> - Regiones límbicas cerebrales - Vaso deferente de ratón 	<ul style="list-style-type: none"> - Encefalinas - β-Endorfina (menor afinidad) 	
κ	?	<ul style="list-style-type: none"> - Analgesia (sin adicción) - Sedación 	<ul style="list-style-type: none"> - Capas profundas de corteza cerebral - Vaso deferente de conejo - Hipotálamo, tálamo 	<ul style="list-style-type: none"> - Dinorfinas - κ-Neoendorfinas - Rinorfina - BAM-22P - BAM-12P - Péptido E - Cetociclazocina - Etilcetociclazocina - Bremazocina 	<p>Antagonista: Maloxona (baja afinidad)</p> <p>No produce síndrome de abstinencia</p>
σ	σ_1, σ_2	<ul style="list-style-type: none"> - Efectos psicotomiméticos - Disforia (σ_1) - Alucinaciones (σ_1) - Estimulación respiratoria y vasomotora - Dilatación pupilar - Adicción (con síndrome de abstinencia) 	<ul style="list-style-type: none"> - Hipocampo 	<ul style="list-style-type: none"> - Alilnorretazocina (SKF 10047) - Fenciclidina - Ciclazocina 	<p>σ_2 = No es antagonizado por Maloxona (receptor de baja afinidad)</p> <p>Produce midriasis y delirio en perros</p>
ϵ	?	<ul style="list-style-type: none"> - Media contracciones musculares 	<ul style="list-style-type: none"> - Conducto deferente de rata 	<ul style="list-style-type: none"> - β-Endorfina 	

Figura I.7; Receptores opioides

los endógenos en distinto grado y muchos agonistas no están restringidos a un único receptor, se nombró a estos receptores en relación a sustancias exógenas, a las cuales responden específicamente (receptor para dinorfina, para β -endorfina, para encefalinas).

Estos receptores también fueron encontrados en otros tejidos. Ejemplo de ellos son receptores δ y μ en vaso deferente de ratón (156), receptores μ en intestino de cobayo (156), receptores K en conducto deferente de conejo (242) y en placenta humana (18), receptores δ en conducto deferente de hamster (219), etc.

Si bien existe una variación considerable en las características de fijación y en la distribución en las diferentes especies, se relacionaron los efectos farmacológicos con las interacciones y con un determinado tipo de receptor (48, 162, 231).

Algunos autores sostienen que los receptores μ y K son los mediadores de la analgesia, mientras que la disforia y los efectos psicotomiméticos se atribuyen a los receptores σ . En las regiones límbicas del encéfalo se cree que los receptores δ intervienen en las alteraciones afectivas (162, 231).

El antagonista naloxona se fija con gran afinidad a varios receptores, pero por lo general su afinidad por los receptores μ es más de 10 veces mayor que para los K o δ (Figura I.7). Incluso no afecta o fracasa en antagonizar algún subtipo de estos re

ceptores (σ_2) (48).

El receptor μ media la dependencia física, analgesia supraespinal, miosis, euforia y depresión respiratoria, producida por drogas del tipo morfinico.

El receptor K produce analgesia espinal, sedación y miosis, con agonistas como cetociclazocina.

La N-allylnormetazocina, a través de receptores σ produce dilatación de pupila, taquipnea y síntomas de manía (163).

La activación de receptores σ produce por ejemplo disforia, alucinaciones y estimulación respiratoria y vasomotora. Martin y colaboradores (162) sugiere la existencia de dos receptores σ , σ_1 y σ_2 . A bajas dosis sus agonistas (SKF 10047, ciclazocina) producen estos síntomas antagonizados por naloxona. Estos efectos se cree mediados por los subtipos σ_1 de alta afinidad. A altas dosis estas mismas drogas producen midriasis y delirio en perros, efectos no antagonizados por naloxona. Se sugirió que esta actividad está mediada por σ_2 de baja afinidad (259).

Otros estudios a su vez aportaron evidencias de la existencia de dos tipos de receptores μ : μ_1 y μ_2 , para quienes la naloxona tiene la misma afinidad (48, 162, 231). El subtipo μ_1 parece mediar la analgesia y el μ_2 la disminución de la frecuencia respiratoria.

La β -endorfina se fija con gran afinidad a receptores μ y δ del sistema nervioso central y del sistema nervioso periférico, pero también interactúa con otros sitios más especializados. Schultz y Wüster (212, 272) encontraron un quinto tipo distinto de receptor al demostrar que el conducto deferente de la rata tenía un receptor sensible a β -endorfina y mucho menos sensible a morfina. A estos receptores se los denominó epsilon (ϵ) (9, 122) (Figura I.7).

Aunque hasta el momento no se ha realizado una clasificación de los opioides del todo satisfactoria, algunos autores dividen a estas sustancias en tres grupos:

- a) Agonistas opioides del tipo morfínico. Se refieren a los agentes que actúan como agonistas de receptores μ , κ y a veces δ .*
- b) Antagonistas opioides como naloxona que prácticamente carecen de actividad agonista en cualquier receptor.*
- c) Opioides de acción mixta. Corresponden a dos subgrupos:
= Agonistas-antagonistas (nalorfina, pentazocina) que parecen ser agonistas en algunos receptores y antagonistas en otros
y
= Agonistas parciales como el butorfanol.*

Los péptidos opioides endógenos despliegan una gran variedad de afinidades relativas por los diferentes tipos de recep

tores. Los derivados de la proencefalina exhiben una gran preferencia por los sitios δ . Todos los péptidos provenientes de la prodinorfina se fijan en su mayoría en los sitios K (Figura I.8).

La unión a los receptores es saturable; ambos, agonistas y antagonistas se unen con gran afinidad. El agregado de distintas sales al medio de incubación disminuyen la unión de los mismos. El ión Na^+ es una excepción (225). Los estudios sobre fijación de opioides revelaron que este catión y ciertos nucleótidos de guanina reducen la afinidad de los agonistas. En cambio la afinidad de los antagonistas "puros" no se altera y la de los agonistas-antagonistas es influida en menor grado (231). Este comportamiento se relacionaría con el sitio de unión de estos agentes ya que se producen cambios conformacionales en el receptor por la presencia del Na^+ favoreciendo la exposición del sitio de unión del antagonista e impidiendo la unión del agonista (192, 225, 231).

Este efecto del sodio no es compartido por otras cationes monovalentes (231).

Algunos nucleótidos de guanina inhiben la unión de los agonistas opioides en presencia de Na^+ . La unión de los antagonistas parece no ser afectada por estos nucleótidos (226). Parece haber una relación antagónica entre la unión de los agonistas a su receptor y la unión de los nucleótidos de guanina a una proteína reguladora de estos nucleótidos (Proteína G).

PEPTIDOS OPIOIDES	PRECURSOR	μ	κ	δ	σ	ϵ
- <u>ENCEFALINAS</u> (5 aa) (Met, Leu, Pep E, Pep F, etc.)	PROENCEFALINA A	+	+	+++	-	-
- <u>BETA-ENDORFINA</u> (27 aa)	PROOPIOMELANOCORTINA	++	+	+	-	+++
- <u>DINORFINAS</u> (18-25 aa) (alfa-neoendorfina, leumorfina, etc.)	PROENCEFALINA B o PRODINORFINA	+	+++	+	+	-
- <u>MORFINA</u>	OPIO	+	+	+	-	?

Figura I.8: Cuadro comparativo de las afinidades relativas por los receptores opioides

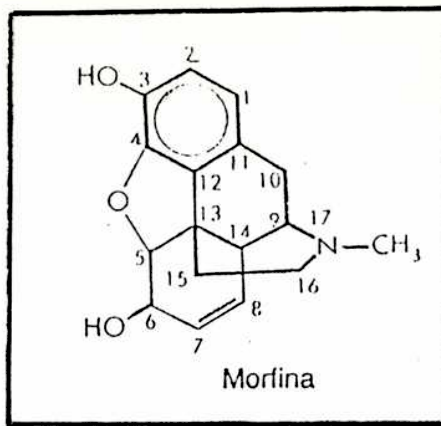
Hoy se sabe que las proteínas G están involucradas en la traducción de señales de una variedad de sistemas incluyendo adenilato ciclasa, fosfolipasa C y los canales de iones celulares (91, 234).

I. 2. 4. MORFINA Y β -ENDORFINA

Los alcaloides que contiene el opio constituyen el 25% de su peso y la morfina es el componente más abundante, esto es el 10% del mismo. Su estructura fue propuesta originalmente por Gulland y Robinson en 1925 y es una sustancia sólida, poco soluble en cloroformo y benceno, lo que permite aislarla del resto (Figura I.9).

Otros derivados del opio como la codeína, es la metilmorfina, con sustitución metílica en el grupo -OH fenólico y se usa principalmente para calmar la tos. La tebaina sólo difiere de la morfina en que ambos grupos -OH están metilados y en que hay dos dobles enlaces en el anillo ($\delta^{6,7}$; $\delta^{8,14}$). Esta tiene poca acción analgésica pero es un importante precursor de varios compuestos 14-OH como la naloxona (Figura I.9).

Muchos derivados semisintéticos se obtienen mediante modificaciones simples de su molécula (Figura I.9). La diacetilmorfina o heroína se prepara a partir de la morfina por acetilación en las posiciones 3 y 6. La etorfina es un derivado de la tebaina y tiene una potencia de 1000 veces mayor que la morfina. La



NOMBRE NO COMERCIAL	RADICALES QUIMICOS Y POSICIONES			OTROS CAMBIOS
	3	6	17	
Morfina	-OH	-OH	-CH ³	-
Heroína	-OCOCH ³	-OCOCH ³	-CH ³	-
Hidromorfina	-OH	=O	-CH ³	(1)
Oximorfina	-OH	=O	-CH ³	(1), (2)
Levorfanol	-OH	-H	-CH ³	(1), (3)
Levalorfan	-OH	-H	-CH ³ CH=CH ²	(1), (3)
Codeína	-OCH ³	-OH	-CH ²	-
Hidrocodona	-OCH ³	=O	-CH ³	(1)
Oxicodona	-OCH ³	=O	-CH ³	(1), (2)
Nalorfina	-OH ³	-OH	-CH ³ CH=CH ²	-
Naloxona	-OH	=O	-CH ² CH=CH ²	(1), (2)
Naltrexona	-OH	=O	-CH ₂	(1), (2)
Buprenorfina	-OH	-OCH ₂	-CH ₂	(1), (2), (4)
Butorfanol	-OH	-H	-CH ₂	(2), (3)
Nalbufina	-OH	-OH	-CH ₂	(1), (2)

(1) Unión única en lugar de doble enlace C7 y C8.

(2) OH añadido a C14.

(3) Sin oxígeno entre C4 y C5

(4) Puente endoeteno entre C6 y C14; 1-hidroxi-1,2,2-trimetilpropil sustitución en C7.

Figura I.9 : Estructura de los opioides

apomorfina, que también puede prepararse a partir de la morfina, es un potente emético y agonista dopaminérgico.

La práctica de las inyecciones de morfina con una finalidad estrictamente terapéutica ha sido el punto de partida de una nueva toxicomanía, que se ha sumado al alcoholismo, la cocaíno manía, opiomanía y otras, es la "morfiomanía". El morfiómano, además de las consecuencias a que se expone, suele sustituir la morfina por otro alcaloide derivado de ésta: la heroína.

Los opioides, sobre todo la morfina, actúan como agonistas, interactuando con receptores estereoespecíficos y saturables en sistema nervioso central y otros tejidos donde también actúan varios péptidos endógenos. La morfina actúa de manera preferencial sobre los receptores μ , pero asimismo posee afinidad apreciable por los otros tipos de receptores opioides (Figura I.8). Su acción (a través de receptores μ y δ) es naloxona sensible, sobre todo en sistema nervioso central, en intestino y en vejiga (156, 221, 248).

Estos opioides inhiben selectivamente la liberación de transmisores excitatorios a partir de terminales nerviosas. Además intervienen en los efectos electrofisiológicos celulares pero no se conoce totalmente su mecanismo.

Para un gran número de analgésicos como morfina, el enantiómero levógiro es siempre el agente activo, mientras que el

dextrógiro tiene poco o nada de actividad analgésica o de adicción (225). Pequeños cambios en su estructura frecuentemente producen cambios en su potencia farmacológica. Una de las variaciones más estudiadas es la sustitución del grupo N-metil por un grupo alquilo más grande tal como alilo o ciclopropilmetilo. Esta sustitución forma una molécula con actividad antagonista por competición por los receptores para morfina.

La morfina y opioides relacionados fueron consideradas sustancias con acción preferencial sobre el sistema nervioso central. Su principal uso farmacológico fue como analgésico pero posee otros efectos no deseados, como somnolencia, euforia (acción por la cual los adictos recurren a ella), depresión respiratoria, a veces náuseas y vómitos, adicción, alteraciones anímicas y alteraciones en muchos otros sistemas del organismo (65, 124).

Uno de los efectos más estudiados de los opioides es sobre el sistema gastrointestinal. Se ha descrito intensamente que la morfina inhibe la producción de úlcera inducida por stress y la secreción gástrica. La naloxona no sólo revierte este efecto, sino que administrada sólo favorece la formación de daños ulcerosos en esas condiciones. Existen algunos datos muy contradictorios en este tema, pero muchos autores coinciden en proponer que los receptores opioides periféricos y/o centrales modulan la función gástrica basal y la alterada por stress (97). Incluso se han descrito relaciones entre los opioides y la concentración de pro-

taglandinas en este sistema (233).

Asimismo, se han publicado diversas acciones sobre intestino. La morfina inhibe la motilidad intestinal en distintas especies, efectos también antagonizados por naloxona (238, 271). Se cree que estas acciones son mediadas periféricamente aunque no descartan algún componente central (271).

Son muchos los trabajos sobre los efectos de la morfina y opioides endógenos sobre el sistema cardiovascular. Se conoce su acción depresora sobre la presión arterial y frecuencia cardíaca pero parece que algunos opioides como las encefalinas tienen acción bifásica (90). También en este caso se propuso que algunos opioides endógenos intervienen en la regulación cardiovascular (215, 242).

Ya se ha demostrado en muchos trabajos que el tracto genital femenino contiene encefalinas (158). La morfina y otros opioides producen una acción inhibitoria sobre el músculo uterino (3, 223). Ya en 1961, Campbell y colaboradores publicaron que el uso de dosis terapéuticas de morfina durante el trabajo de parto produce una prolongación del mismo. Posteriormente se observó que también altera el grado de colaboración por parte de la parturienta (38, 124). El mecanismo de estas acciones aún no se conoce y es parte del objeto de esta tesis contribuir a su conocimiento. Estos efectos fueron observados en numerosas especies como en humano, gato, rata, ratón, etc. Muchas de las acciones producidas por los o-

pioides en distintas partes del sistema reproductor no son antagonizadas por naloxona, por lo que algunos autores sugieren que no son mediadas por receptores opioides clásicos, sino por otros mecanismos celulares aún no descritos (184).

Por otro lado, es conocido que los péptidos opioides juegan algún rol importante en la regulación hormonal del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas (75, 202). Inhiben la secreción de gonadotrofina en roedores y en humanos por inhibir la liberación de GnRH y por su efecto depresor sobre hipófisis (71).

Una de las acciones más conocidas de la morfina y otros opioides endógenos es la inhibición de la liberación de LH por actuar directamente sobre hipotálamo (71) y el consecuente bloqueo de la ovulación (144). Estos péptidos endógenos pueden sintetizarse en testículo (71), ovario (60), células luteales y foliculares (60), placenta (7, 46, 141), fluido uterino (193) y otras zonas del tracto reproductor femenino y masculino. Pero su rol fisiológico no se conoce aún (254).

Los péptidos opioides endógenos deben controlar la función reproductora en múltiples sitios, operando como un sistema multimensajero donde los niveles centrales y periféricos se suman por una misma naturaleza química e inhibitoria del mensaje.

El parto se produce cuando la sensibilidad uterina a la ocitocina es máxima. El parto, por lo tanto, se puede inducir

por administración de esta hormona o por estimulación de la neurohipófisis para liberar ocitocina endógena y aumentar los niveles plasmáticos de la misma (150). Por un lado los opioides inhiben la liberación de ocitocina a nivel neurohipófisis, pero por otro lado la administración de morfina produce retraso del parto y aumento del intervalo de tiempo entre cada nacimiento en la rata (70). Estos resultados estaban de acuerdo con experimentos realizados donde la administración de naloxona sólo produce aumento de concentración de ocitocina plasmática con la consecuente aceleración del parto y reducción del intervalo de tiempo entre los nacimientos (148).

¿Cuál es el sitio de acción de estos opioides? Todavía no se conoce, pero uno de ellos probablemente sea a nivel de neurohipófisis aunque no puede descartarse su acción sobre útero. Esto concuerda con el rápido aumento producido de β -endorfina en plasma durante la segunda etapa del parto que no está relacionada con el dolor. Por lo tanto se sospecha una acción fisiológica regulatoria por parte de estos opioides durante la gestación, el parto y los niveles hormonales (146, 147).

En muchas de las regulaciones endócrinas o en los eventos fisiológicos mencionados del sistema reproductor femenino intervienen las prostaglandinas. Tal es el caso del parto, en el ciclo menstrual, motilidad uterina, etc. Existen muy pocos estudios sobre interacciones entre opioides y prostaglandinas en el ú-

tero, a pesar de la reciente y amplia bibliografía sobre la presencia de opioides en este sistema. En el laboratorio se ha demostrado que la motilidad espontánea del útero aislado de rata en ciclos, ovariectomizadas o prepúberes está relacionada con la liberación de prostaglandinas del tipo E al medio de incubación (30, 81, 237). Por lo tanto nos pareció interesante estudiar los efectos de los opioides (exógenos y endógenos) tanto sobre la síntesis y liberación de prostaglandinas, como sobre otros parámetros fisiológicos en el útero de rata.

El propósito de este trabajo es también investigar si este tejido posee receptores para opioides, y si es posible conocer a qué tipo pertenecen.

Debido a que se han descrito recientemente receptores en útero durante la preñez (13) y que secreciones uterinas contienen péptidos opioides (193) es posible que éstos jueguen un rol fisiológico en la función uterina en el ciclo estral y en preñez principalmente. Es nuestro interés entonces estudiar el posible mecanismo de acción de estos opioides en útero de rata y poder acercarnos a conocer el papel que cumplen en este sistema.

I. 3. PROSTAGLANDINAS

I. 3. 1. INTRODUCCION

Prostaglandinas es el nombre genérico de una familia de lípidos con actividad biológica. La distribución de las prostaglandinas en el reino animal es amplia y se las pueden hallar en casi todos los tejidos de mamíferos, en vertebrados inferiores y aún en invertebrados. También se hallan en vegetales e inclusive en corales y algas.

Las prostaglandinas son ciclopentanos derivados, formados a partir de ácidos grasos poliinsaturados. Todas las prostaglandinas contienen 20 átomos de carbono y poseen el esqueleto común del hipotético "ácido prostanoico" (Figura I.10). Cada prostaglandina contiene un anillo ciclopentano en C₅-12 en el cual distintos constituyentes permiten clasificarlas en los seis grupos clásicos: A, B, C, D, E y F (Figura I.11).

Las prostaglandinas E y F conocidas como "primarias" poseen ambos grupos α -OH en posición 11 y 15 y un doble enlace trans entre los C₁₃ y C₁₄. Difieren entre sí en el C₉, las de tipo E presentan un grupo ceto (C=O) mientras que las del tipo F un oxhidrilo (-OH).

Además de esta clasificación las prostaglandinas se dividen en tres series dependiendo del número de insaturaciones de

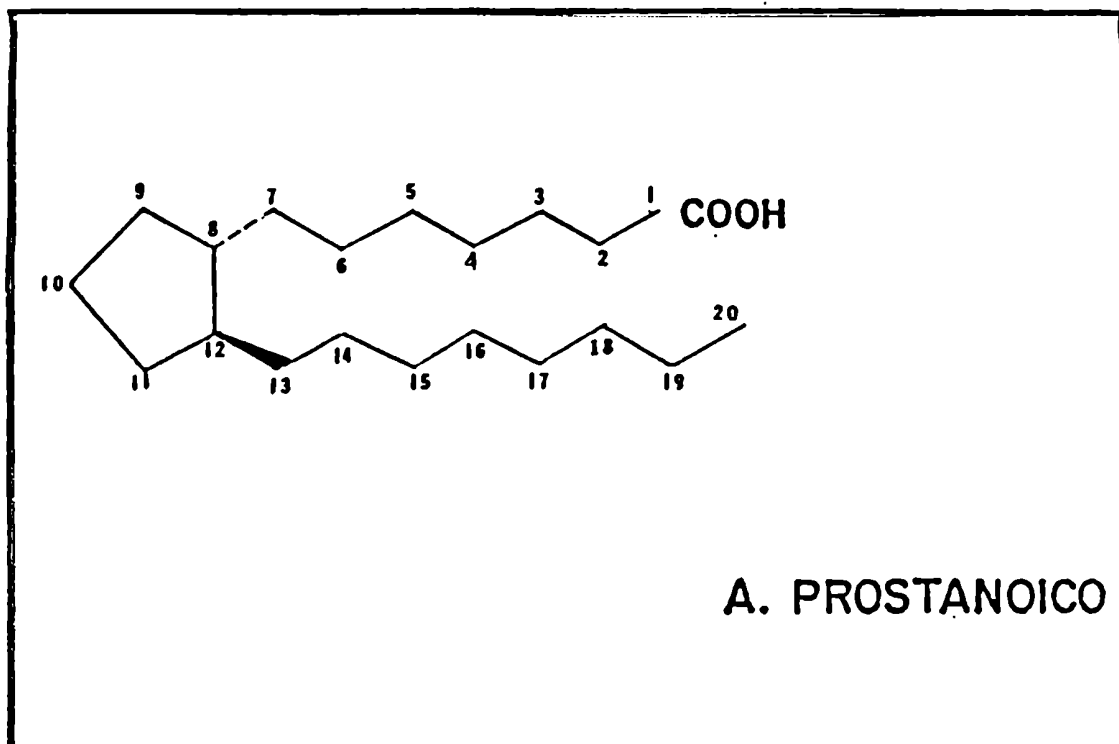


Figura I.10: Acido Prostanico

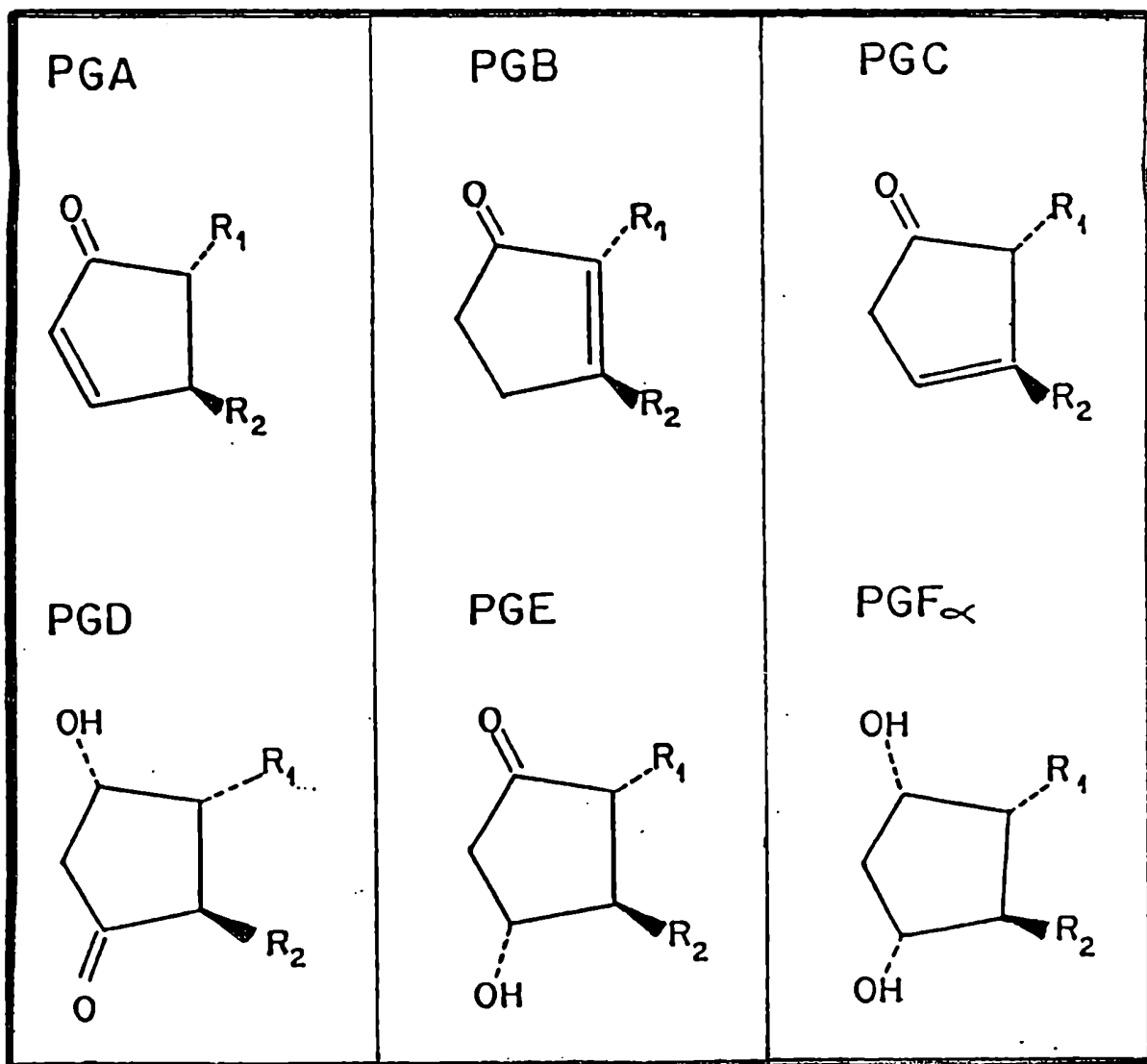


Figura I.11: Ciclopentano de las distintas Prostaglandinas

las cadenas laterales.

Las prostaglandinas de la serie I presentan un doble enlace entre los C₁₃ y C₁₄, las de la serie II tienen otra insaturación entre C₅ y C₆ y finalmente las pertenecientes a la serie III tienen una tercera doble ligadura entre C₁₇ y C₁₈ (Figura I.12).

Samuelsson (207) encontró que los oxígenos del anillo pentano de las prostaglandinas provenían de la misma molécula de oxígeno y por lo tanto propuso un intermediario endoperóxido simbolizado PGH. En 1973 se descubrió que este intermediario tenía actividad biológica (107). Más tarde se hallaron otros endoperóxidos denominados PGG₂ con un grupo hidropéroxido en C₁₅ (Figura I.13).

Hamberg y colaboradores (108) descubrieron luego un compuesto inestable que favorecía la formación de trombos llamado tromboxano A₂ (TxA₂) (Figura I.14). Su derivado estable es el tromboxano B₂ (TxB₂). En los vasos sanguíneos se producía un compuesto con propiedades antagónicas a las del TxA₂ que luego se los llamó prostaciclina o PGI₂ (Figura I.14) (130, 174).

I. 3. 2. BIOSINTESIS Y METABOLISMO

Las prostaglandinas derivan de ácidos grasos poliinsaturados (Figura I.15). En el caso de la serie I su precursor es

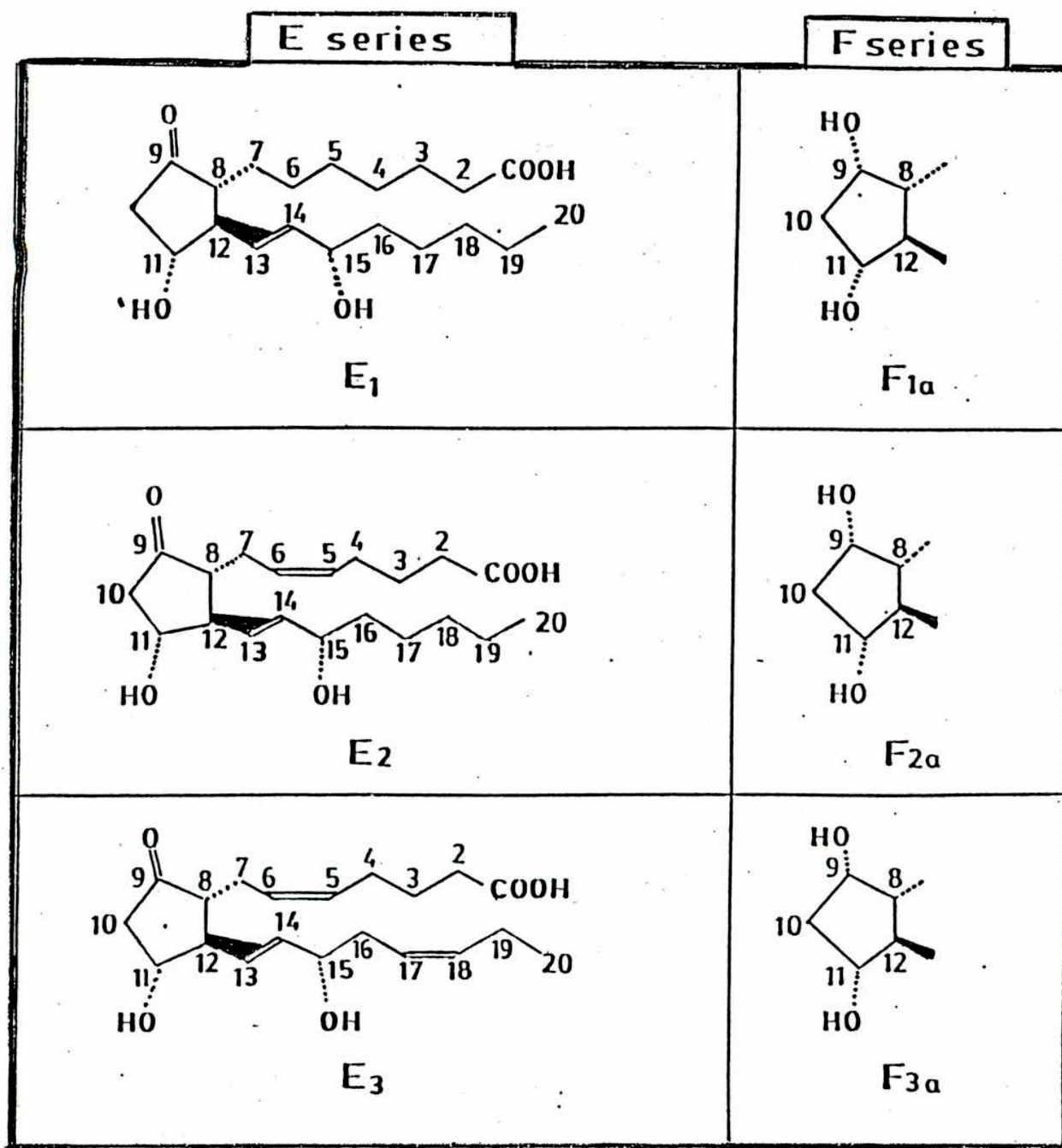


Figura I.12: Clasificación de las Prostaglandinas

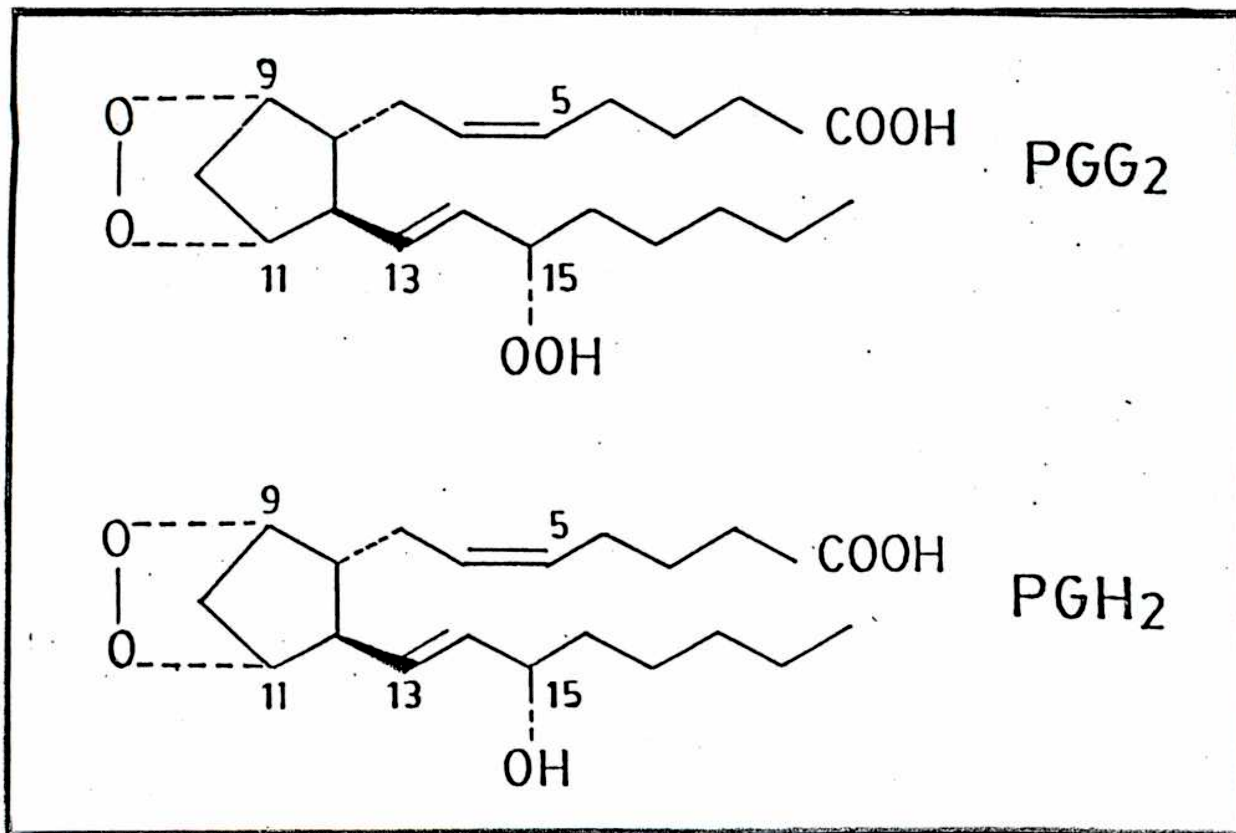


Figura I.13: Endoperóxidos

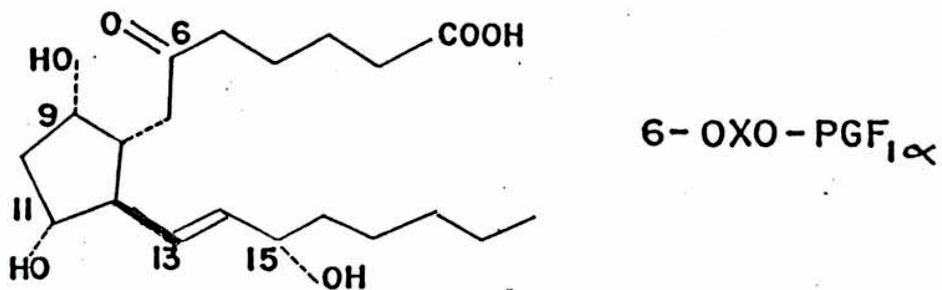
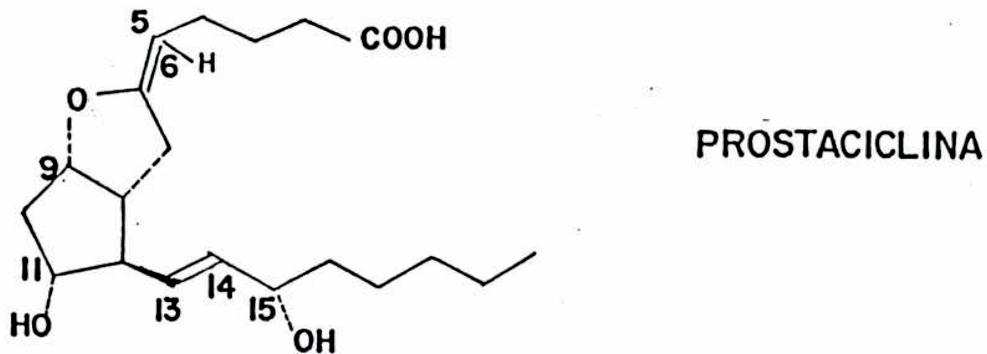
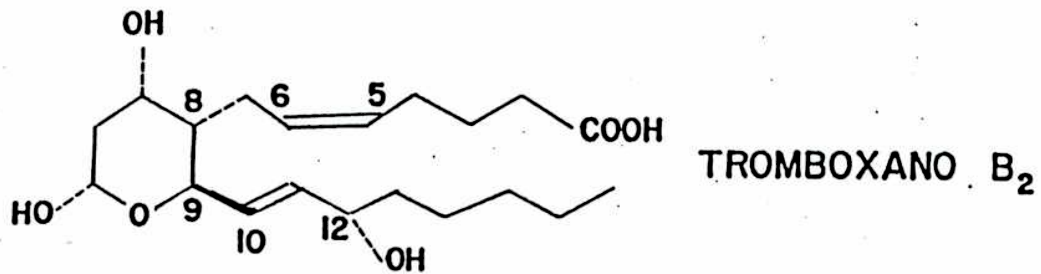
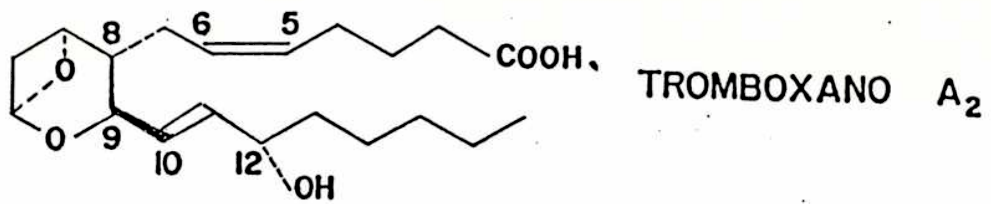
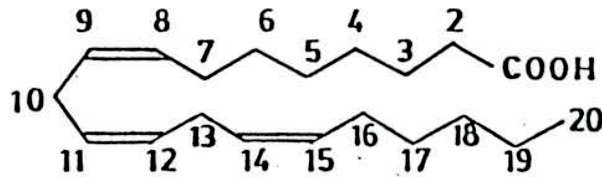
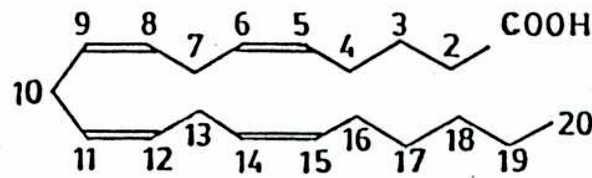


Figura 1.14: Prostaciclina y Tromboxano

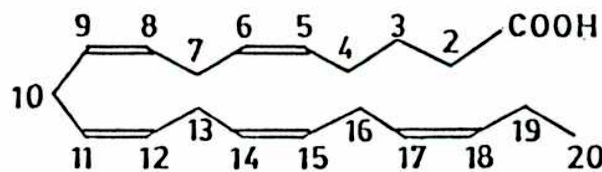
PRECURSOR



Dihomo - 7 - linolenico
8,11,14 C₂₀:3



Arachidónico
5,8,11,14 C₂₀:4



Eicosapentaenoico
5,8,11,14,17 C₂₀:5

Figura I.15: Ácidos grasos precursores

el ácido dihomo- γ -linolénico (ácido 8, 11, 14-eicosatrienoico). El ácido araquidónico (ácido 5, 8, 11, 14-eicosatetranoico) da origen a la serie II y por último el ácido 5, 8, 11, 14, 17-eicosapentanoico a la serie III. Estos ácidos (γ -linolénico, linoleico y araquidónico) son esenciales, o sea deben suministrarse en la dieta para evitar trastornos funcionales (33).

El ácido linoleico puede sufrir desaturación a γ -linolénico y éste a su vez elongación a dihomo- γ -linolénico. Este a su vez se puede convertir en ácido araquidónico por una delta 5-6 desaturación mediante un proceso unidireccional (Figura I.16) (198).

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 (76). Por lo tanto para que suceda la síntesis de prostaglandinas es necesario liberar el sustrato, reacción que es catalizada por un grupo de enzimas, acilhidrolasas, como la fosfolipasa A₂ y la triglicérido lipasa (140). Diversos estímulos hormonales, la injuria tisular y varias drogas que inducen la síntesis de prostaglandinas, pueden liberar los ácidos grasos de sus depósitos por estimulación de las acilhidrolasas (Figura I.17).

La fosfolipasa A₂ tiene un papel preponderante en la síntesis de prostaglandinas porque los fosfolípidos son la fuente

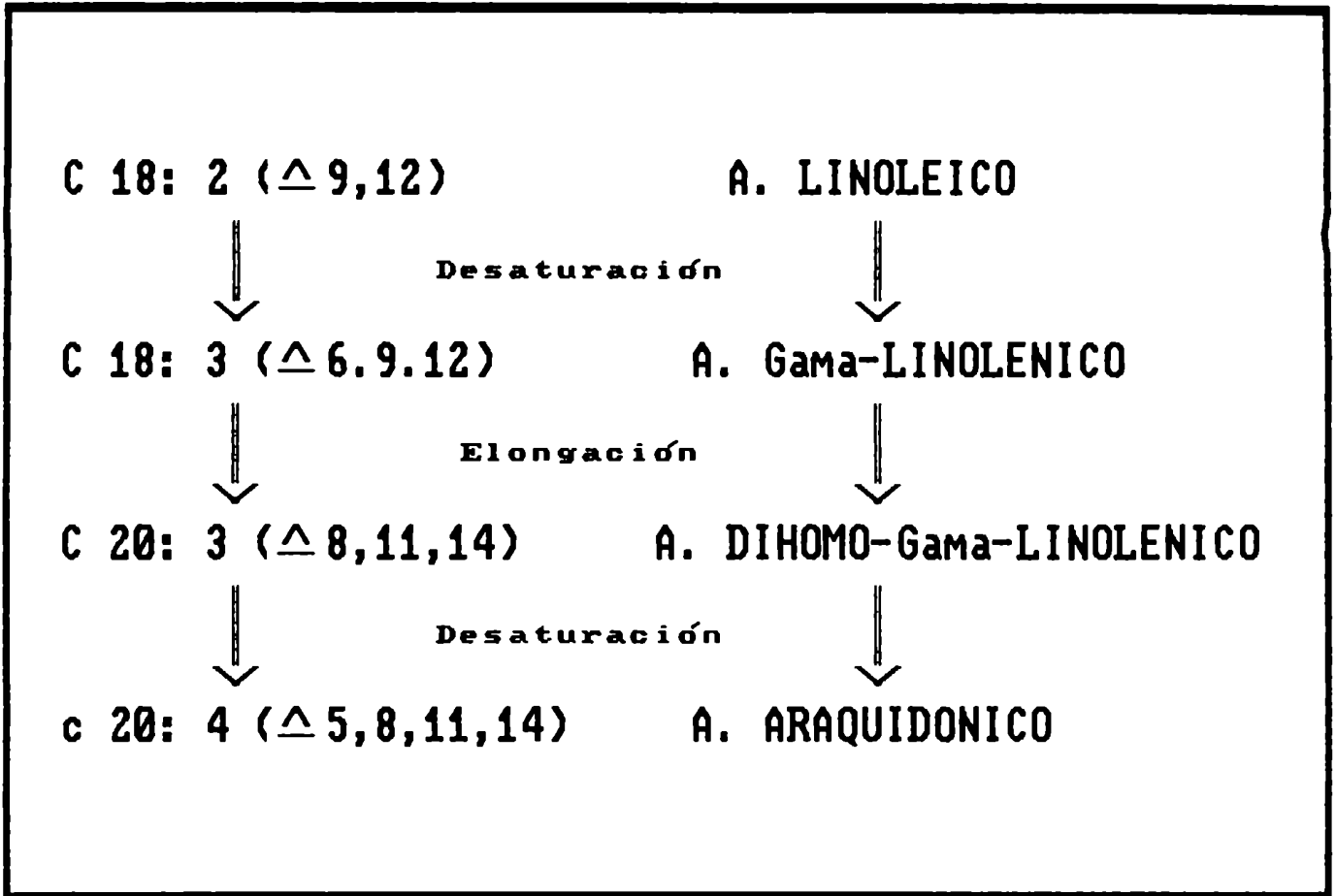


Figura I.16: Transformaciones de los ácidos grasos

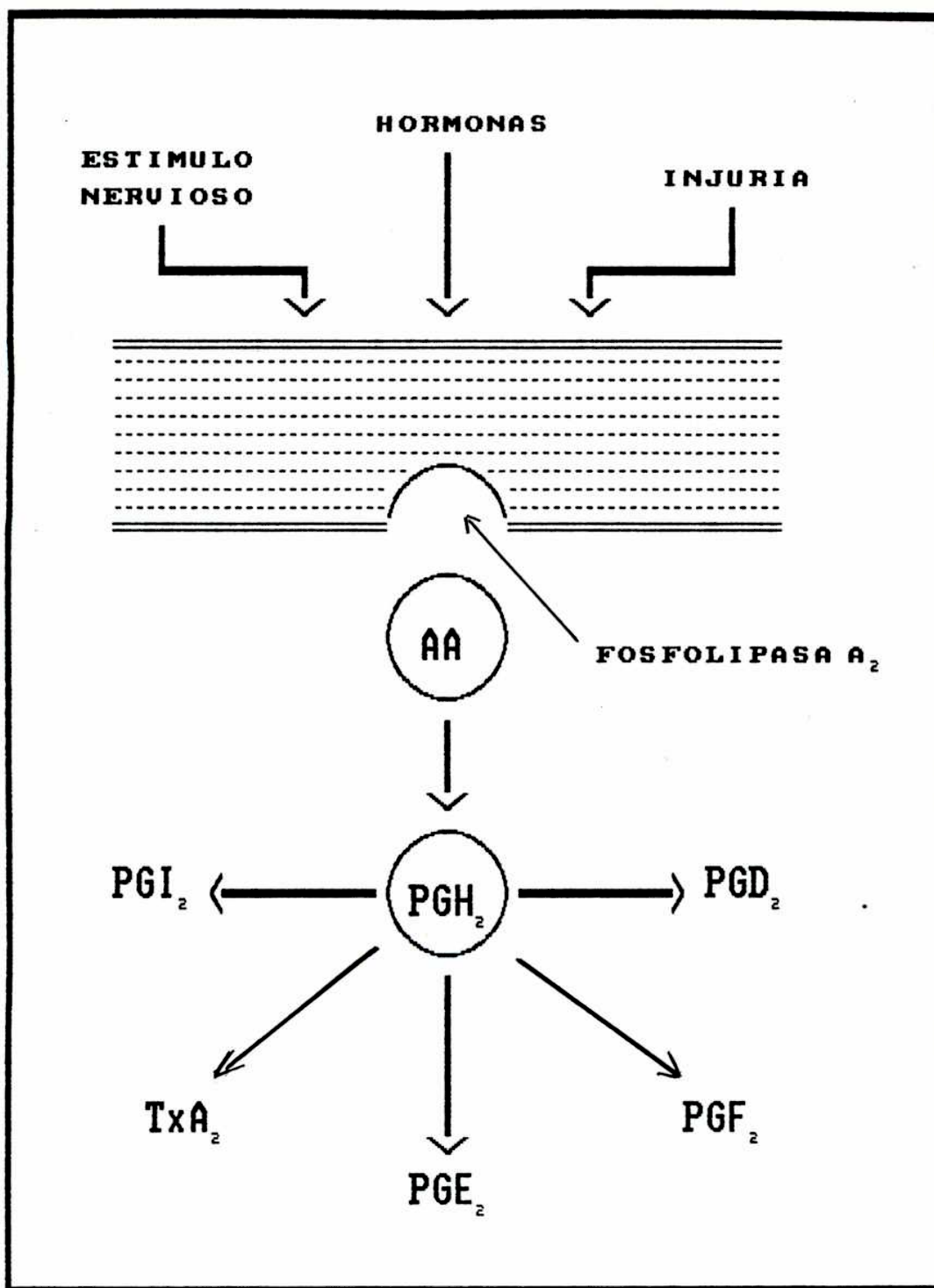


Figura I.17: Liberación del ácido araquidónico

te más importante de ácido araquidónico. Pero no sólo la fosfolipasa A₂ libera ácido araquidónico. En ovario, por ejemplo, existe alta concentración de ácido araquidónico de colesterol debido a una colesterol esterasa (estimulada por LH) que libera araquidonato (138).

Una vez liberados los ácidos grasos pueden sufrir diversos procesos: auto-oxidaciones, elongación de sus cadenas, reincorporación a los fosfolípidos por ciclasas, etc. Para que ocurra la síntesis de prostaglandinas el ácido liberado debe ser tomado por la enzima que inicia lo que se conoce como "la cascada del ácido araquidónico" (225). Pueden existir altas concentraciones de sustrato libre pero es muy poco el disponible para la producción de prostaglandinas.

Una vez liberado el araquidonato, la síntesis de prostaglandinas y tromboxanos ocurren en dos pasos principales (Figura I.18). El primero está catalizado por la ciclooxigenasa (encontrada en casi todas las células del organismo) y da como resultado la oxigenación y ciclación del ácido graso para formar los endoperóxidos (intermediarios inestables) (Figura I.19). El segundo paso incluye enzimas específicas de cada tejido y lleva a la formación de los productos característicos de cada uno de ellos; por ejemplo el tromboxano en las plaquetas.

Todo este sistema, llamado prostaglandina sintetasa fue aislado por primera vez de vesícula seminal bovina (173) y

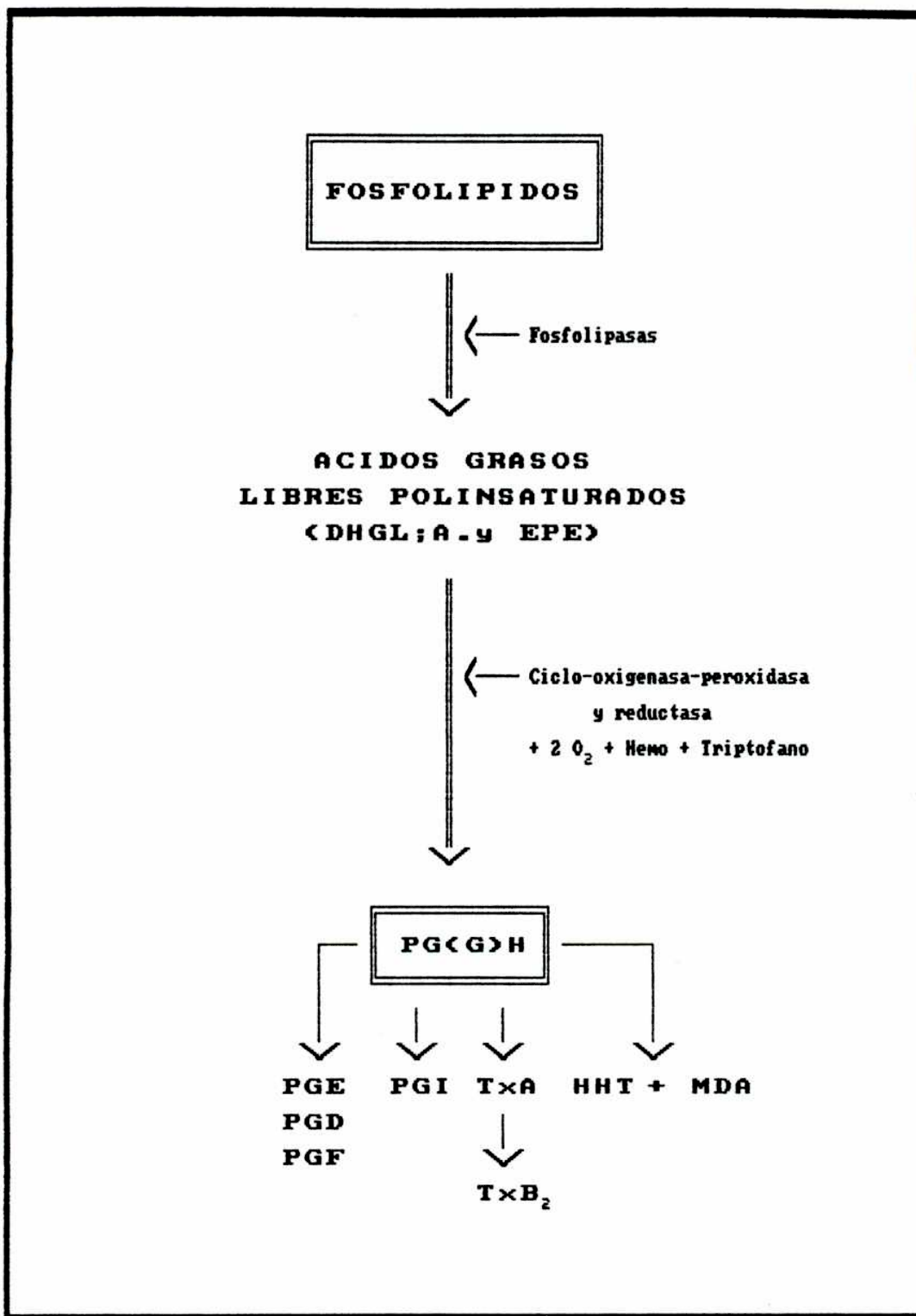


Figura I.18: Liberación y metabolismo de los ácidos grasos

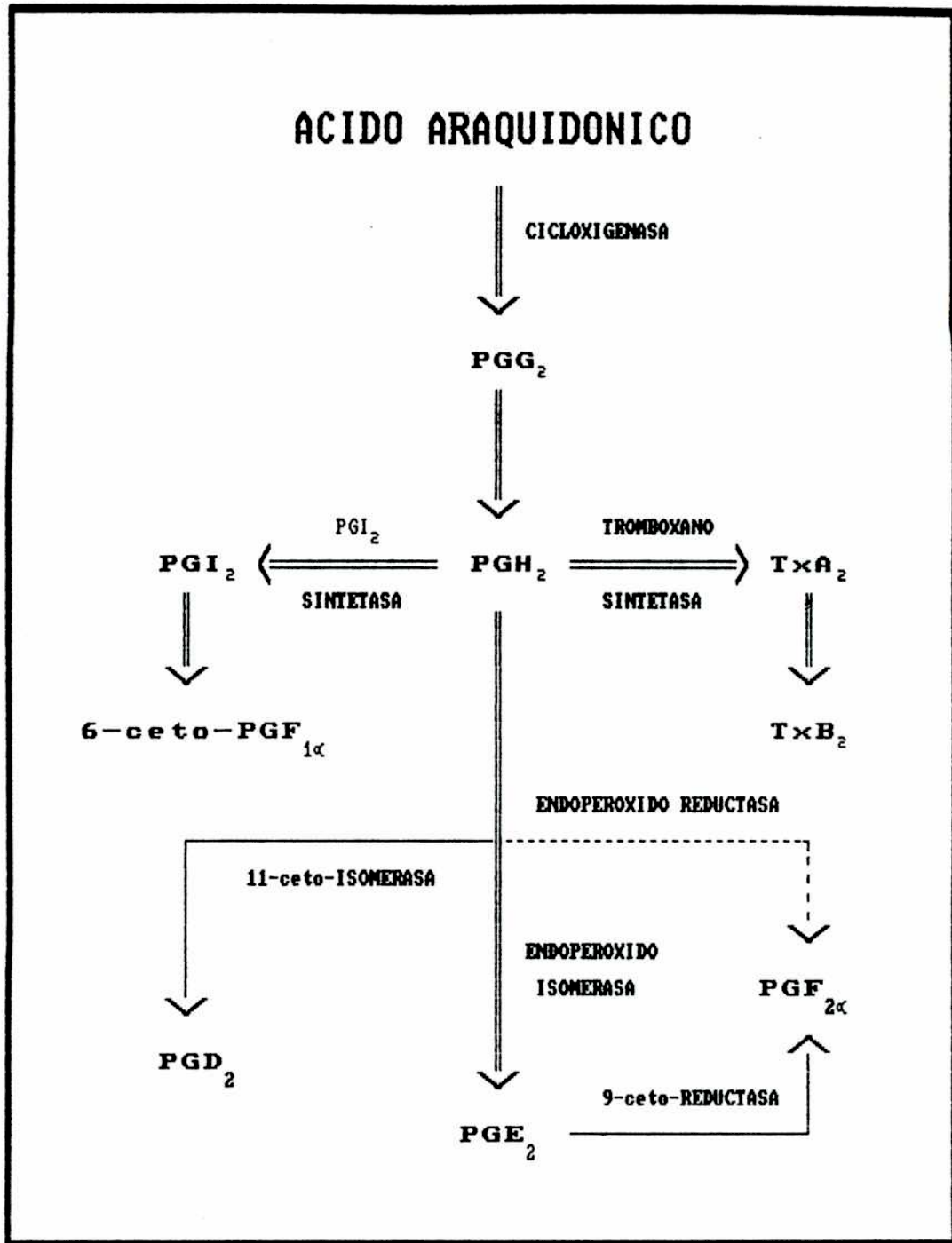


Figura I.19: Cascada del ácido araquidónico

consistía en la ciclooxigenasa (o prostaglandina endoperóxido sintetasa) y la prostaglandina endoperóxido isomerasa, que convierte el PGH en PGE.

La ciclooxigenasa cataliza la conversión a PGG. Se requiere para ello oxígeno molecular y es dependiente de un grupo hemo.

La endoperóxido E isomerasa es una enzima microsomal (172) que requiere glutatión para la isomerización de PGH a PGE.

La tromboxano sintetasa fue descubierta en plaquetas humana y de varias especies. El TxA₂ se hidroliza espontáneamente a TxB₂ (241).

La 11-ceto-isomerasa en presencia de glutatión forma PGD, principal prostaglandina de cerebro (1) y plaquetas (183). La endoperóxido reductasa se encontró en útero de cobayo y forma PGF a partir de PGH (270).

La prostaciclina sintetasa es una enzima microsomal que convierte PGH en PHI₂ muy inestable. Esta se hidroliza espontáneamente a 6-ceto-PGF_{1α} y se forma en casi todos los tejidos vasculares (66).

El ácido arquidónico es metabolizado por β-oxidación de la misma forma en que lo hacen todos los ácidos grasos, e-

longación de cadena y autooxidación, lo que implica un proceso de formación de hidroperóxidos por un mecanismo de radicales libres.

Las prostaglandinas sufren una rápida pérdida de su actividad biológica asociada a la oxidación enzimática del grupo alcohol del C₁₅ por una 15-hidroxi-prostaglandina-deshidrogenasa (11, 178, 222) formándose un grupo cetona. Esta enzima está ampliamente distribuida en los tejidos de mamíferos (11, 187). No existe especificidad de sustrato con respecto a las distintas prostaglandinas y usa como cofactor NAD⁺ Y NADP⁺ (Figura I.20).

La oxidación está seguida por una reducción del doble enlace 13-14 trans, dando los dihidrocetoderivados, metabolitos persistentes en circulación periférica (208). Esta reacción es catalizada por una 13-reductasa y necesita NADH y NADPH y requiere para su acción un carbonilo en posición 15. Luego puede ocurrir una β -oxidación de la cadena lateral o bien ω -oxidación fundamentalmente en hígado (88).

Un porcentaje elevado de prostaglandinas ocurre en el pulmón. Allí se remueve la mayoría de la PGE₂ y PGF_{2 α} en circulación. Además parte de la PGE₂ es metabolizada por el hígado y riñón.

I. 3. 3. INHIBIDORES

Por su importancia clínica y farmacológica se ha

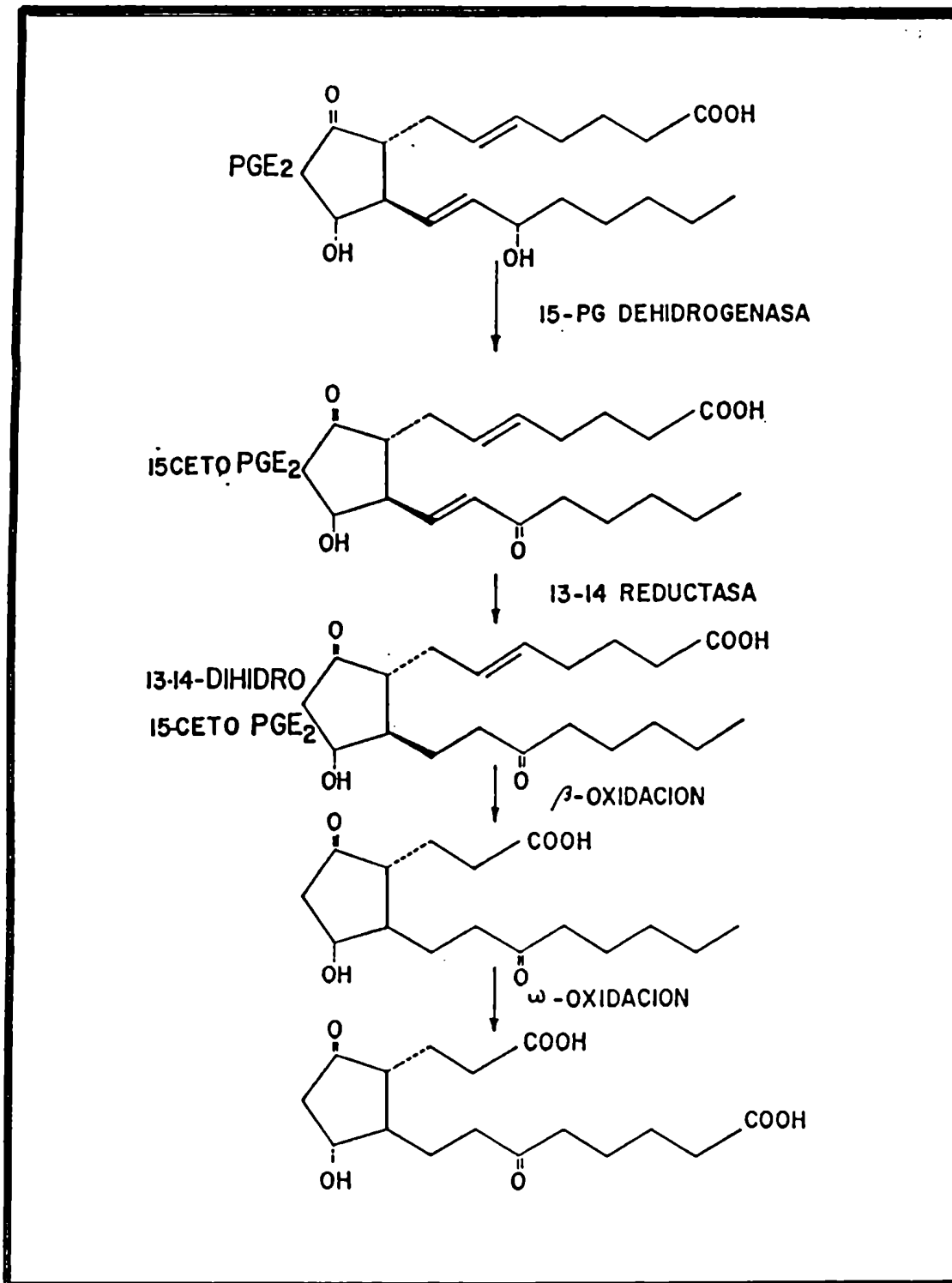


Figura 1.20: Metabolismo de PGE₂

trabajado mucho en el hallazgo de inhibidores de la síntesis de prostaglandinas. Se conocen varios tipos de inhibidores:

a) Análogos de sustratos naturales de la ciclooxigenasa: Ahern y Downing (6) demostraron que un análogo acetilénico del ácido araquidónico, el ácido eicosa-5, 8, 11, 14-tetraenoico (TYA), inhibe en forma irreversible la síntesis de prostaglandinas. Estos derivados acetilénicos, así como otros ácidos grasos naturales inhiben la síntesis de prostaglandinas por destrucción del sitio catalítico (142, 182, 251).

b) Drogas antiinflamatorias no esteroideas tipo "aspirina": Presentan estructuras variadas pero todas comparten con la aspirina su acción antipirética, analgésica y antiinflamatoria. En este rubro se incluyen el paracetamol (78), la indometacina (61), la quinidina (119). El mecanismo de acción de la mayoría de estas drogas es la inhibición competitiva irreversible de la ciclooxigenasa. La aspirina (ácido acetilsalicílico) actuaría como un agente acetilante del sitio activo de la ciclooxigenasa (201). La inhibición de la síntesis de prostaglandinas por estos agentes se demostró en más de 30 sistemas como útero de cobayo y rata (99), cerebro de ratón (149), vesículas seminales de carnero (230), etc.

c) Esteroides antiinflamatorios: Estos compuestos también inhiben la síntesis de prostaglandinas pero no a través de la prostaglandina sintetasa. Los esteroides antiinflamatorios como los

glucocorticoides inducen la liberación de inhibidores proteicos de la enzima fosfolipasa A₂ de macrófagos y linfocitos (42, 77). Se aislaron estas sustancias de distintos tejidos y se las denominaron de la siguiente forma: de leucocitos de pulmón de cobayo (macrófagos), "macrocortina"; de células renales, "renocortina"; de neutrófilos de peritoneo de cobayo, "lipomodulina" (23). Estas sustancias son proteínas relacionadas tanto inmunológica como bioquímicamente pero no son idénticas. Se las agrupa bajo el nombre genérico de "Lipocortina" cuyas masas moleculares relativas están entre 15.000 y 40.000 (105).

Estos esteroides inhiben la actividad de la fosfolipasa A₂ y por lo tanto inhiben la síntesis de un número de mediadores proinflamatorios como prostaglandinas, tromboxanos, y leucotrienos (23, 24).

Existen otros grupos de drogas que inhiben directa o indirectamente la actividad de la fosfolipasa A₂. Como esta enzima requiere del ión Ca⁺⁺ como cofactor, los compuestos quelantes de este catión inhiben también su actividad (249).

I. 3. 4. RECEPTORES

Las acciones biológicas de las prostaglandinas están precedidas por su unión con sitios específicos o receptores celulares, algo bien claro en células y tejidos como adipocitos, hígado, cuerpo lúteo, útero y arterias (41, 258). También han apare-

cido evidencias documentando receptores para TxA_2 en plaquetas y vasos (143).

El tejido uterino parece presentar dos receptores de membrana diferentes para prostaglandinas, uno para PGE_2 y otro para $PGF_{2\alpha}$ aunque ambos son capaces de unir a PGE con apreciable afinidad (93).

Los estudios de radioligando han permitido la identificación de sitios específicos para cinco de los prostanoïdes naturales. La clasificación utilizada es la propuesta por Coleman y colaboradores según criterios farmacológicos (55).

I. 3. 5. MECANISMO DE ACCION

Las prostaglandinas participan en múltiples y diversas acciones biológicas. Silver y colaboradores (224) las clasificaron según sus funciones en:

a) Hormonas clásicas: La infusión intravenosa de PGA_1 y PGA_2 disminuyen la presión sanguínea. Se propuso que estas prostaglandinas podrían ser liberadas por el riñón y actuar como hormonas clásicas regulando la presión sanguínea (112). Pero más tarde se comprobó que son productos de degradación de la PGE_1 y PGE_2 respectivamente.

En 1978 (102) se sugirió que la PGI_2 era una hormona circulante liberada continuamente por el pulmón y producía

la inhibición de la agregación plaquetaria. No obstante, estudios posteriores, sugirieron que la PGI_2 debía considerarse como una hormona local que inhibe la agregación plaquetaria sólo en lugares cercanos a su formación (53, 110).

- b) Prostaglandinas como hormonas locales: Numerosos son los ejemplos de las acciones de las prostaglandinas como hormonas locales. La PGE en médula renal va a corteza donde disminuye la resistencia preglomerular y de esta forma se obtiene una autoregulación del flujo sanguíneo renal (112). La $PGF_{2\alpha}$ producida en el útero de la oveja es transferida de la vena uterina a la arteria ovárica y en este órgano causa luteólisis (164).

Por otro lado la $PGF_{2\alpha}$ presente en exudados inflamatorios aumenta la permeabilidad vascular (269).

- c) Prostaglandinas como mensajeros intracelulares: Las prostaglandinas sintetizadas por una célula podrían actuar en la misma antes de su liberación comportándose como mensajeros intracelulares. Estas prostaglandinas pueden regular los niveles de otras sustancias biologicamente activas o modular algunas actividades enzimáticas.

Las PGE_1 y PGE_2 modifican la actividad de la Na/K $ATPasa$ Mg^{++} dependiente y la adenilato quinasa en eritrocitos y plaquetas humanas, en mitocondrias de hígado de rata y en el músculo esquelético del conejo (129).

En piel de rana (126) y en fondo de estómago de rata (54) la estimulación del influjo de Na⁺ por PGE₁ es precedida por una remoción del Ca⁺⁺ de membrana.

Las prostaglandinas del tipo E aumentan o disminuyen el AMPc intracelular mientras que la PGF_{2α} es capaz de aumentar hasta cuatro veces los niveles de GMPc del útero de rata (139). La relación GMPc/AMPc se incrementa con PGF_{2α} y disminuye con PGE₂ (139). El primer efecto de la PGE sería aumentar la actividad de la adenilato ciclasa. La PGI₂ y PGE₂ elevan el AMPc intracelular del útero de rata (255).

I. 3. 6. EFECTOS FISIOLÓGICOS Y FARMACOLÓGICOS. APLICACIONES Y USOS CLÍNICOS

La Figura I.21 muestra los principales efectos de prostanoïdes y leucotrienos. Hasta el presente sólo unas pocas prostaglandinas se encuentran en el mercado de un número muy limitado de países, aunque muchas están siendo investigadas en cuanto a sus aplicaciones potenciales para el tratamiento de problemas en el área de la reproducción y fertilidad, terapéutica cardiovascular, problemas de hematología y padecimientos gastrointestinales.

Una de las primeras aplicaciones clínicas de las prostaglandinas fue el uso de PGF_{2α} como inductor del parto al término del embarazo humano. Hoy se utilizan agentes análogos, más potentes y con más larga acción que los productos naturales.

ESTIMULO

COLAGENO
NE, Ca⁺⁺, IONOFOROS DE Ca⁺⁺
HIPOXIA
PEPTIDOS, HISTAMINA

FOSFOLIPIDOS

FOSFOLIPIDOS

(CITOSOL)

ACIDO
ARAQUIDONICO

(5-Lipoxigenasa)

(Ciclo-oxigenasa-Peroxidasa)

5-HETE
(HIDROPEROXIDO)

PGH₂
ENDOPEROXIDO

LTA₄
(EPOXIDO)

PROSTANOIDES

LTB₄

LTC₄ LTD₄ LTE₄

PGS

TXA₂

AGREGACION PLAQUETARIA
DEGRANULACION LEUCOCITOS
QUIMIOTAXIS
MOVILIZACION DE Ca⁺⁺
FORMACION DE SUPEROXIDOS
DIPEDESIS LEUCOCITARIA

BRONCOCONSTRICION
VASOCONSTRICION
CONTRACCION UTERINA
EN COBAYO
LIBERACION DE LH
CONTRACCION VESICAL

ANTIAGREGACION PLAQUETARIA
VASODILACION, FIEBRE
LUTEOLISIS
CONTRACCION UTERINA
CONTRACCION VESICULAR
NATRIURESIS
CITOPROTECCION GASTROINTESTINAL
BRONCODILACION
BRONCOCONSTRICION
DILACION CERVICAL UTERINA

AGREGACION PLAQUETARIA
VASOCONSTRICION
BRONCOCONSTRICION
TRANSPORTE DE AGUA

Figura 1.21: Acciones principales de los leucotrienos y prostanoides.

Uno de los usos más difundidos de las prostaglandinas reside en la medicina veterinaria, particularmente para la cría de ganado vacuno, ovino, equino y porcino. Grandes beneficios económicos se pueden lograr mediante el control del celo de grandes grupos de animales. Muchos análogos de prostaglandinas (fluprostenol, clorprotenol, etc.) se encuentran en el mercado y son capaces de sincronizar los estros del ganado y con todos ellos se aprovecha la capacidad luteolítica que posee la PGF y sus análogos, facilitante de la implantación y mejoradora del desarrollo del huevo fecundado en yeguas y en vacas.

Numerosos estudios clínicos evidenciaron que las prostaglandinas de la serie E promueven la cicatrización de úlceras gastroduodenales o previenen su desarrollo. Esto se debe a su propiedad citoprotectora.

Un efecto adverso y no deseado, típico de muchas prostaglandinas como la PGF_{2α} y PGE₂ (pero no de prostaciclina) es el aumento de la motilidad intestinal asociada con diarrea.

El asma bronquial representa otro sector prometedor para la terapéutica con prostaglandinas. Aerosoles de PGE₁ y PGE₂, con evidente capacidad broncodilatadora brindan alivio en los ataques asmáticos (93, 206).

Son numerosas las acciones y utilidades de estos compuestos, que resultaría difícil de mencionar brevemente. Sólo

se resumirá una somera introducción sobre sus acciones en los principales procesos relacionados al objetivo de este trabajo.

I. 3. 7. ACCION DE LAS PGS EN EL APARATO REPRODUCTOR FEMENINO

A) Ovulación

La posible participación de las prostaglandinas en el proceso de ovulación ha sido largamente estudiado. La administración de inhibidores de prostaglandinas tales como ácido acetil-salicílico o indometacina inhiben la ovulación en distintas especies tales como ratas (12), conejo (100), peces (240), etc. Esta respuesta fue revertida por prostaglandinas exógenas (186, 210). Como el tratamiento con indometacina no afecta la producción de esteroides foliculares o la maduración del oocito, indica que las prostaglandinas están relacionadas principalmente con la ruptura del folículo y no en otros procesos preovulatorios (desarrollo folicular preovulatorio) (12, 100). Las células de la granulosa tienen capacidad de producir prostaglandinas y la mayor prostaglandina producida es la PGI₂ (136).

La PGF_{2α} es la prostaglandina principalmente involucrada en la ruptura folicular, más que la PGE₂. El sitio de acción de esta prostaglandina es aún desconocido. El mecanismo de acción puede involucrar uno o más de los siguientes procesos:

1) disminución de la síntesis de colágeno (69),

- ii) aumento de la actividad del músculo liso, contractilidad (260)
- iii) liberación de activadores de plasminógeno (240),
- iv) liberación de enzimas lisosomales que pueden iniciar la ruptura de la pared folicular (36).

B) Luteólisis

Las prostaglandinas especialmente aquellas del tipo E pueden tener un papel fisiológico en la luteinización y mantenimiento del cuerpo lúteo pero no son intermediarios obligatorios en las acciones de las gonadotrofinas (62). Las concentraciones de PGE y PGF pueden actuar para modular el efecto de las gonadotrofinas y posiblemente también las de otros factores luteotróficos.

Ahora bien, la regresión normal del cuerpo lúteo comienza con la desaparición de receptores de LH, disminución de formación de AMPc y progesterona y en algunas especies con un incremento de la síntesis de 20 α -OH-progesterona (luteólisis funcional). Estos eventos metabólicos son luego seguidos por la degeneración morfológica (luteólisis estructural) (62).

En estudios realizados en varias especies, la PGF_{2 α} antagonizaba el efecto estimulante de la LH o de la hCG sobre la formación de AMPc y la síntesis de progesterona (247). Además la inhibición de PGF_{2 α} por indometacina prolonga la vida del cuerpo lúteo y la administración directa de PGF_{2 α} induce luteólisis (117).

El cuerpo lúteo humano tiene receptores para $PGF_{2\alpha}$ y tiene la capacidad de sintetizar esa prostaglandina in vitro. La acción de la $PGF_{2\alpha}$ es importante sólo a partir de cierto tiempo de vida del cuerpo lúteo. En el humano es de 7 - 11 días post ovulación. El mecanismo todavía es desconocido pero se ha propuesto que la $PGF_{2\alpha}$ causa un bloqueo de la captación de gonadotrofina en el tejido luteal in vivo y que inhibe además la activación de la adenilato ciclasa producida por LH en el cuerpo lúteo en distintas especies (16, 62, 247).

Se conoce muy poco sobre las otras prostaglandinas en regresión luteal pero a pesar de su alto contenido en PGE_2 no parece tener un efecto luteolítico.

C) Motilidad uterina

El descubrimiento de las prostaglandinas se derivó del hallazgo del efecto del semen sobre las contracciones uterinas (141). Por otro lado, se demostró que las prostaglandinas exógenas (particularmente las del tipo E y F) inducían contracciones uterinas en varias especies de animales (21). Utilizando inhibidores de la síntesis de prostaglandinas redujeron la actividad espontánea del útero aislado de rata (252). Posteriormente al emplear útero aislado de ratas preñadas (de 17 a 22 días) se observó que el mismo exhibía contracciones espontáneas al mismo tiempo que se liberaban sustancias del tipo prostaglandinas (principalmente similar a

PGF_{2α}) al medio. Mediante el uso de inhibidores de síntesis de prostaglandinas (indometacina o ácido acetilsalicílico) lograron abolir tanto la liberación de prostaglandinas como la actividad uterina, restaurándose la actividad contráctil con el agregado de estos agentes exógenos (253).

Si bien todas estas evidencias sugerían una participación de las prostaglandinas en la motilidad uterina no se descartaba la posibilidad de que la liberación de prostaglandinas fuera la consecuencia y no la causa de la actividad mecánica. Posteriormente fue deshechada esta hipótesis ya que se demostró que la producción de prostaglandinas ocurría aún cuando las contracciones uterinas eran abolidas por un relajante muscular como papaverina (8).

Se ha observado que los fragmentos aislados de úteros de ratas ovariectomizadas exhibían una motilidad uterina más constante en el tiempo que las provenientes de ratas en estro natural (94) y ello coincidía con una mayor producción de prostaglandinas tipo E por los úteros de ratas ovariectomizadas (95). De todos estos encuentros se sugirió que las prostaglandinas producidas localmente estaban involucradas en la actividad funcional del útero aislado de rata ovariectomizada.

El estradiol se considera como el esteroide ovárico predominante en la regulación de la síntesis de prostaglandinas por el útero de rata (44) pero en algunas especies parece neces-

rio la influencia de progesterona previamente. El control de las contracciones uterinas por estradiol está más relacionado con las variaciones producidas a PGE₂ que a PGF_{2α} (237).

Al determinarse las contracciones espontáneas y los niveles de prostaglandinas (E₂ y F_{2α}) del útero aislado de ratas durante los distintos estadios del ciclo sexual, se demostró una correlación positiva entre la motilidad y la liberación de prostaglandinas (81). Pero los mecanismos por los cuales los estrógenos regulan la producción de prostaglandinas no se conocen todavía.

I. 4. CALCIO COMO MENSAJERO

I. 4. 1. GENERALIDADES

Los iones Ca^{++} son uno de los más importantes mensajeros intracelulares. Para el funcionamiento celular coordinado éstas se comunican entre sí a través de contactos directos o a través de señales producidas por impulsos eléctricos o mensajeros químicos. Dentro de la misma célula también la comunicación entre las distintas organelas se establece a través de mensajeros químicos.

Cualquiera sea la señal producida debe haber un receptor de esa señal. Para un mensajero químico el receptor en general es una proteína que recibe la señal e interpreta el mensaje regulando la actividad apropiada.

Quizás el más versátil mensajero intracelular sea el ión Ca^{++} . Muchas de las acciones del Ca^{++} se producen por su unión a calmodulina, su mejor receptor, proteína presente en células eucariotes cuyas propiedades son bastante bien conocidas (117).

Una segunda proteína intracelular receptora del calcio es una proteína quinasa dependiente de Ca^{++} y fosfolípidos (proteína quinasa C) regulada también por diacilglicerol, proteína también altamente distribuida en el organismo.

El ión Ca^{++} afecta casi todos los aspectos fisioló-

gicos de la célula. Las funciones más comunmente reguladas por este ión son: contracción muscular, endocitosis y exocitosis, motilidad celular, división celular, metabolismo de glucógeno, síntesis y liberación de neurotransmisores, etc. El mecanismo de todas estas acciones aún no se conocen totalmente (52).

La concentración de Ca⁺⁺ intracelular es regulada por distintos mecanismos que incluyen sistemas de membrana celular y sistemas de membrana de diferentes organelas celulares como retículo endoplasmático y microsomas.

Cuando las células del músculo liso están en reposo la concentración del ión Ca⁺⁺ intracelular es aproximadamente $1 \times 10^{-7} M$ mientras que la concentración extracelular es 10.000 veces mayor. El Ca⁺⁺ intracelular proviene de distintas vías (128):

- Influjo a través de la membrana plasmática por los denominados canales de calcio.*
- Liberación de las organelas que retienen Ca⁺⁺ (retículo sarcoplasmático, mitocondrias, etc.)*
- Influjo de pequeñas cantidades de Ca⁺⁺ a través de poros en la membrana sarcoplasmática cuando el músculo se encuentra en reposo.*

Cualquiera de estos procesos están provocados, estimulados, inhibidos y regulados por diferentes efectores celulares

como: estímulos fisiológicos, transmisores químicos, hormonas, mensajeros extracelulares e intracelulares, estímulos eléctricos, iones y otros.

I. 4. 2. MECANISMOS DE ENTRADA DE Ca^{++} A LA CELULA

Los canales de Ca^{++} de membrana celular de eucariotes consisten en estructuras macromoleculares generalmente glicoproteínas. Su configuración es cilíndrica con un poro acuoso en su centro. El pasaje a través de esos poros sigue varios pasos en los que se establece una interacción reversible entre el Ca^{++} y los sitios de unión de membrana. Se asemeja a la cinética enzimática (saturabilidad, reversibilidad, constante de disociación) y la relación entre la concentración de Ca^{++} extracelular y la entrada de Ca^{++} a la célula describe una curva de saturación hiperbólica (120).

Estos canales tienen gran selectividad por los iones que la atraviesan, o sea que resultan un verdadero filtro además de ser capaces de regular la velocidad de atravesar estos poros.

Iones como Ca^{++} , Ba^{++} , Sr^{++} la atraviesan rápidamente, pero otros como Zn^{++} , Mn^{++} y Cd^{++} lo hacen muy lentamente.

Estos canales tienen distintas conformaciones o estados:

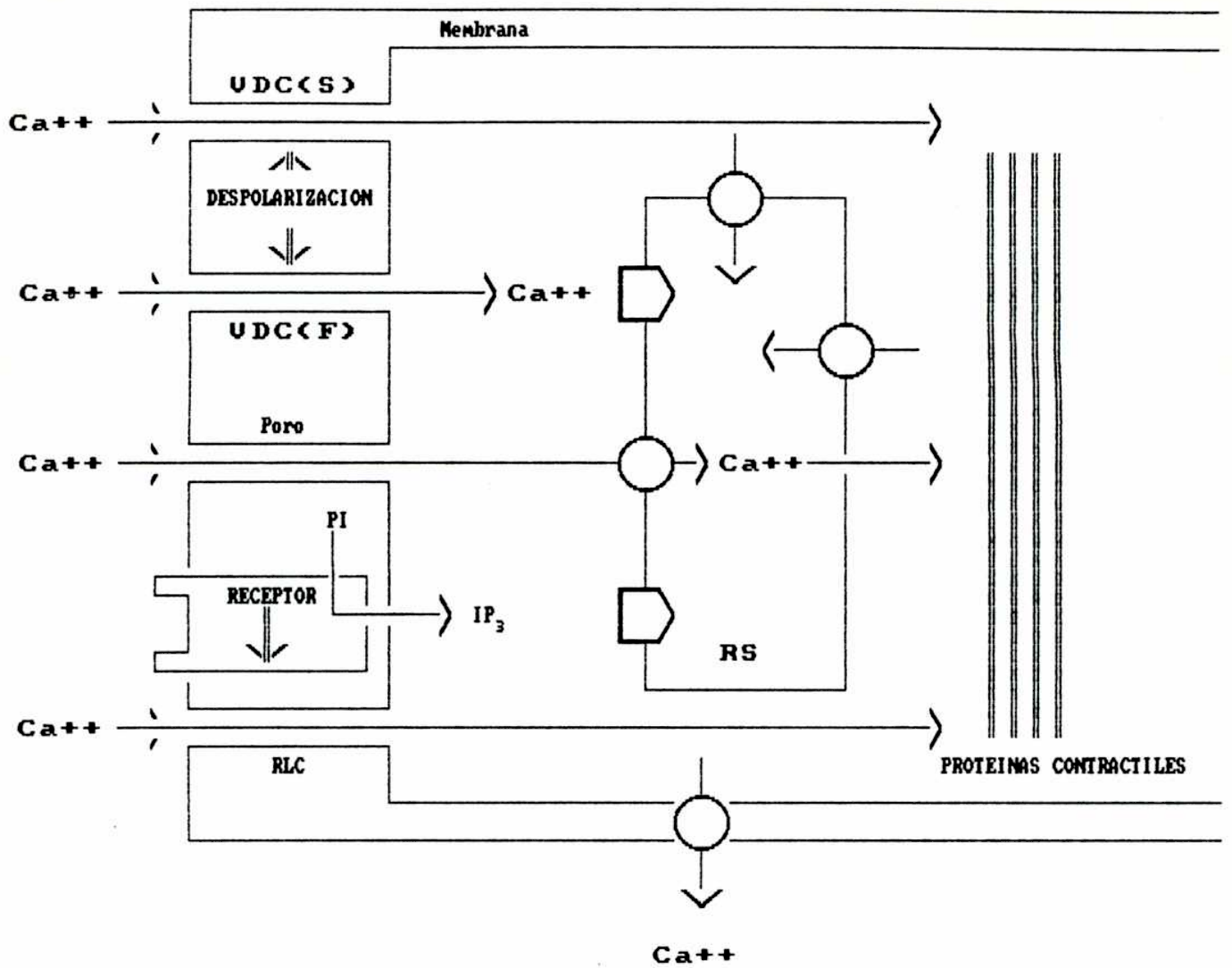
- Abierto, llamado estado activado
- Cerrado, constituido por:
 - Estado desactivado o
 - Estado inactivado

Los iones atraviesan estos canales en el estado abierto, o sea en el estado activado. Según el estímulo necesario para activar los canales, esto es, obtener el estado abierto, los canales se clasifican en dos grupos:

- a) *Canales sensibles a cambios de voltaje. Estos canales responden cuando el potencial de membrana disminuye hasta un cierto nivel.*
- b) *Canales relacionados a receptores específicos de membrana plasmática. Estos canales pueden ser activados cuando se produce interacción entre neurotransmisores u hormonas y receptores moleculares (Figura I.22) (120, 133).*

Un determinado agente puede producir una serie de respuestas celulares afectando más de un tipo de canal de Ca^{++} . Existen además distintos sitios de unión para estos agentes e incluso algunos parecen tener mayor afinidad por los canales no activados y otros en cambio por los canales activados (abiertos).

Se conoce muy poco a cerca de los canales operados por receptores en músculo liso, o sobre la forma en que se relacionan con la membrana celular. Se cree que el proceso de degradación



⇒ Canales de Calcio

◡ Iniciación de la salida de Calcio

○ Bombas de Calcio

- PI = Fosfatidilinositol

- IP₃ = Inositol-1,4,5-trifosfato

- UDC(F) = Canales de Calcio dependiente de voltaje de inactivación rápida.

- UDC(S) = Canales de Calcio dependiente de voltaje de inactivación lenta.

- RLC = Canales de Calcio ligados a receptor

- SR = Retículo sarcoplásmico

Figura I.22: Movimientos del Ca⁺⁺ en músculo liso. Modificado de Karaki y Weiss (133).

de fosfoinositoles inducida por receptores es el responsable o la señal de apertura de estos canales de Ca^{++} . Pero en realidad el rol de estos fosfolípidos en el influjo de iones Ca^{++} es muy discutido y no se conoce aún.

Por otro lado la interacción agonista-receptor que lleva a un aumento de nucleótidos cíclicos también influyen sobre el influjo de Ca^{++} en músculo liso. El AMPc sobre todo, parece regular la función de los canales de Ca^{++} dependiente de voltaje (45).

En músculo liso existen dos tipos de canales dependiente de voltaje:

- Canales de rápida inactivación [VDC(F)]*
- Canales de lenta inactivación [VDC(S)]*

Distintos autores sugieren que el influjo de iones Ca^{++} a través de los canales del tipo VDC(S) producen entrada del catión al retículo sarcoplasmático y estimulación de las proteínas contráctiles en el citosol (Figura I.22).

En cambio el influjo a través de los canales del tipo VDC(F) producen liberación del catión del retículo por activación del sistema CCR (ver más adelante) (Figura I.22).

Por otro lado el influjo de Ca^{++} a través de los poros de membrana cuando la célula está en reposo no aumenta la con-

centración de Ca^{++} en citosol sino que son tomados directamente por estas organelas (RS).

El influjo de iones Ca^{++} producido por los canales dependiente de receptores, en cambio, no son acumulados en retículo sino que activarán directamente las proteínas contráctiles en citosol (Figura I,22).

I. 4. 3. LIBERACION DE Ca^{++} DE ORGANELAS CELULARES

Las organelas más importantes que intervienen en el mantenimiento de la homeostasis del Ca^{++} son el retículo sarcoplasmático, mitocondrias y otros lisosomas. Estas organelas tienen una eficiente bomba de Ca^{++} que almacenan estos iones en forma de fosfatos. Estos iones pueden ser liberados al medio (citosol) cuando la célula lo requiere.

Estos sistemas de acumulación de iones Ca^{++} tienen fundamentalmente dos funciones (200):

- El intercambio de los iones entre el citosol y las organelas para mantener la concentración basal en ambos (en citosol es 10.000 veces menor que en retículo) durante los periodos de relativa inactividad.
- En periodos de gran requerimiento de Ca^{++} (células activadas por estímulos nerviosos, drogas u hormonas) la velocidad de entrada del ión a retículo es mayor que la velocidad de eflujo celular

con lo que estas organelas producen una neta acumulación de iones Ca^{++} que protege a la célula de una sobrecarga o intoxicación por exceso del mismo.

Según el estímulo recibido por la célula uno de los mecanismos a que recurre para aumentar la concentración de iones Ca^{++} en el citosol es a través de la liberación de estos iones por las organelas (principalmente retículo) que lo contienen. La liberación de estos iones al citosol se puede producir por distintos mecanismos o efectores. Uno de ellos es el mismo ión Ca^{++} a través del llamado sistema de liberación de Ca^{++} inducido por calcio (CCR) aunque su rol fisiológico está en discusión (239).

Otra forma es a través de algunos compuestos como cafeína cuyo mecanismo se desconoce aún (123) a pesar de que se lo relaciona con el anterior.

El mecanismo más conocido y estudiado es a través de la hidrólisis de los fosfoinosítidos de membrana celular ya mencionado anteriormente (Figura I.2 y I.22) (39, 80, 109, 200).

I. 4. 4. SALIDA DE Ca^{++} DE LA CELULA

Ya se mencionó anteriormente que las células de músculo liso tienen concentración de iones Ca^{++} citosólica aproximadamente 10.000 veces menor que la concentración extracelular. Por lo tanto es lógico pensar que para mantener esta diferencia de concen

tración todo influjo de Ca^{++} debe ser compensado por un eflujo neto, ya que la capacidad de las organelas en acumular iones de Ca^{++} es limitado. Se conocen dos mecanismos para la liberación de calcio celular (Figura I.23):

- Una bomba de intercambio entre el Na^+ y el Ca^{++}*
- Una bomba de Ca^{++} dependiente de ATP ($Ca^{++}/ATPasa$)*

Esta última parece ser el proceso más importante de salida del ión de la célula. Se cree que este sistema de transporte depende de calmodulina y fue identificado en más de 20 tipos distintos de células (191) incluso en miometrio de rata y otras especies (232).

La bomba de extrusión de Ca^{++} podría ser la clave para regular la concentración de Ca^{++} intracelular y por lo tanto la actividad contráctil (Figura I.23) (194).

Los inhibidores de esta bomba producen contracciones y los activadores relajación del músculo. Un ejemplo es la hormona ocitocina que inhibe la bomba de $Ca^{++}/ATPasa$ sarcolemal del miometrio humano. Esta hormona es el agente más potente que produce contracciones uterinas.

Muchos antagonistas de Ca^{++} no sólo tienen efecto sobre los canales de entrada del catión, sino además tienen acción sobre estas bombas de salida de Ca^{++} (45).

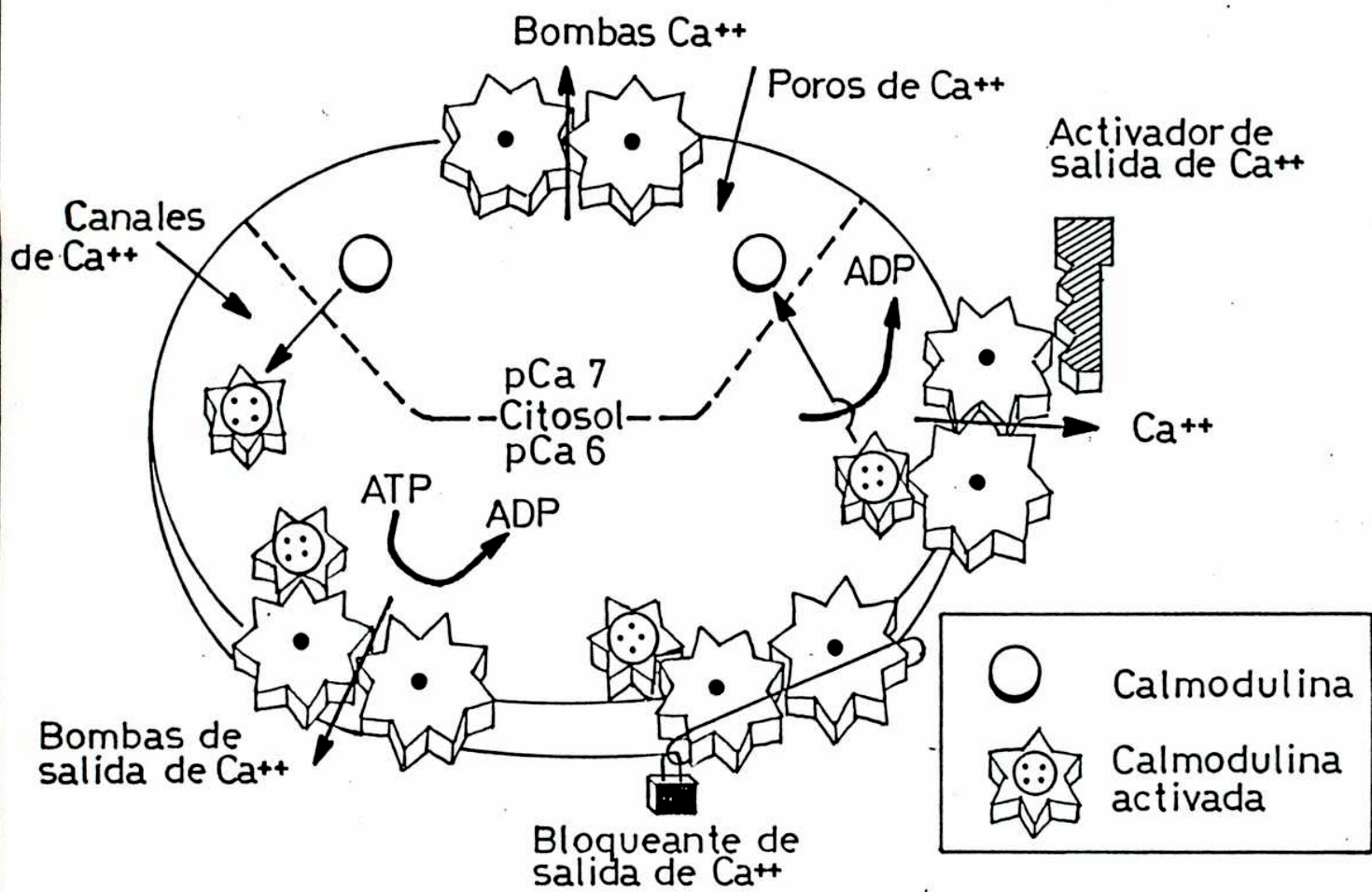


Figura I.23: Bombas de Ca^{++} (extraído de Popescu, L. M. cita 194)

I. 4. 5. RECEPTORES DE Ca⁺⁺ INTRACELULAR

Para que un segundo mensajero produzca una respuesta a una estimulación debe haber un receptor intracelular que se una al mensajero resultando algún cambio después de su interacción. Normalmente estos mensajeros tienen efecto sobre gran cantidad de sistemas celulares pero en general son pocas las proteínas capaces de unirse a ellos, con lo que estos pocos receptores de estas señales tienen capacidad de interactuar con gran cantidad de sistemas celulares controlados por ese mensajero.

Un ejemplo de ello es AMPc (adenosín monofosfato cíclico). Se conoce sólo una proteína capaz de interactuar con él, la "proteína quinasa dependiente de AMPc". Es probable que todas las acciones del AMPc sean mediadas a través de esta proteína. Con el ión Ca⁺⁺ la situación es más compleja.

Para ser receptor intracelular, estas proteínas tienen que tener ciertas propiedades como alta afinidad por su mensajero, poseer sitios de unión específicos, el valor de su constante de disociación estar en el rango de concentración del segundo mensajero en la célula en condiciones normales. Además, la unión del mensajero debe producir un cambio conformacional que altere su interacción con otras proteínas o afecte la actividad catalítica si es una enzima.

Con el ión calcio la situación es más compleja:

A) Muchas de las acciones intracelulares del ión Ca^{++} ocurren por su unión a calmodulina, proteína presente en todas las células eucariotes, muy estudiada y su secuencia ha sido mantenida a través de la evolución (Figura I.24) (68). La mayoría de los procesos dependientes de calcio son mediados por su unión a calmodulina, a excepción de contracción del músculo estriado y fosforilación catalizada por protein quinasa C.

Calmodulina es una proteína ácida, con gran contenido de residuos glutamato y aspartato, de $\text{pI} = 4,2$ y masa molar 16.680 D. Es una cadena simple y la gran cantidad de cargas negativas por los grupos carboxilos de esos residuos forman cuatro dominios donde se unen los iones Ca^{++} (Figura I.25). Los cuatro iones Ca^{++} se unen con igual afinidad, o sea en forma no cooperativa. Cuando los cationes Ca^{++} se unen a esta proteína se producen cambios conformacionales (aumento de porcentaje de α -hélice, disminución en la susceptibilidad de la digestión proteolítica, etc.) (52, 68).

En ausencia de esos cationes la calmodulina existe en forma libre en el citoplasma, en membrana celular o en distintas organelas pero al aumentar la concentración de iones Ca^{++} en el citosol la proteína ya se asocia formando el complejo $(\text{Ca})_4$ -calmodulina. Este complejo luego se une a las proteínas blanco para su actividad.

En general no hay interacción entre calmodulina y

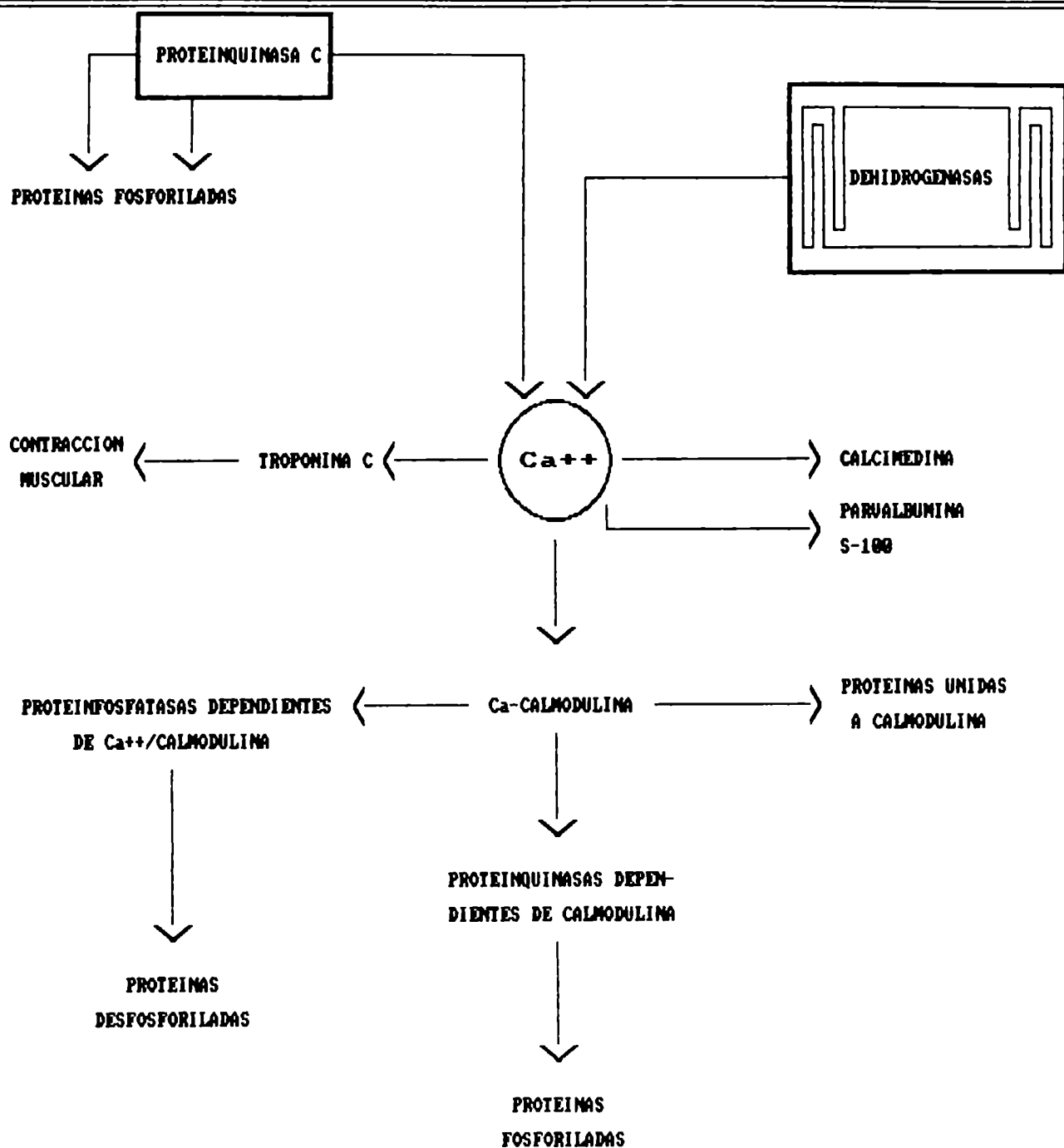


Figura I.24: Interacción del Ca⁺⁺ con proteínas intracelulares. Tomado de England, P. J. (68).

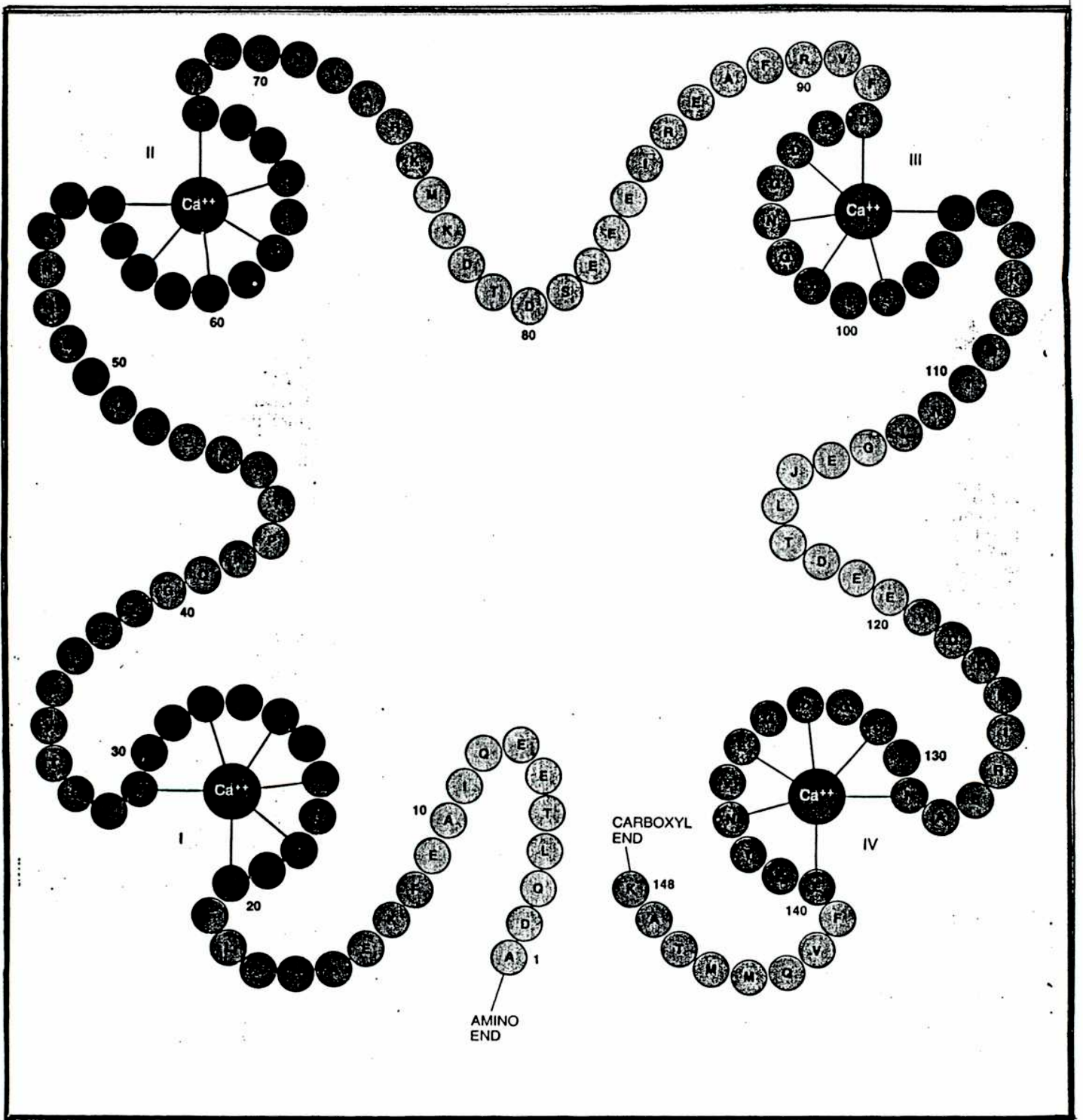


Figura I.25: Calmodulina (Tomado de Cheung, W. Y., cita 52)

proteínas blanco sin iones Ca^{++} . La única excepción conocida hasta ahora es la fosforilasa quinasa que permanece unida aún en ausencia de Ca^{++} .

B) Una segunda proteína intracelular dependiente de calcio de gran distribución es la proteína quinasa dependiente de calcio y fosfolípidos (PKC) que también es regulada por diacilglicerol (proceso mencionado anteriormente, Figura I.2) (134). Esta enzima fosforila los residuos de serina y treonina. Está presente en citoplasma (es soluble) en forma inactiva y se cree que el diacilglicerol hace que la enzima se pegue a membrana y se active (131, 177).

C) Algunas otras proteínas conocidas que interactúan con calcio, pero de restringida distribución tisular son (Figura I.24):

- Parvalbúmina en músculo estriado*
- Troponina (que tiene un alto grado de homología en la secuencia con calmodulina), también de músculo estriado*
- Calcimedina en músculo liso (68).*

El complejo $(Ca)_4$ -calmodulina activa o interviene en numerosos procesos celulares pero no todos son claramente conocidos. Sólo se hará una breve mención de estos procesos o de las proteínas intervinientes ya que su extensión escapa al objetivo de este trabajo (Figura I.26).

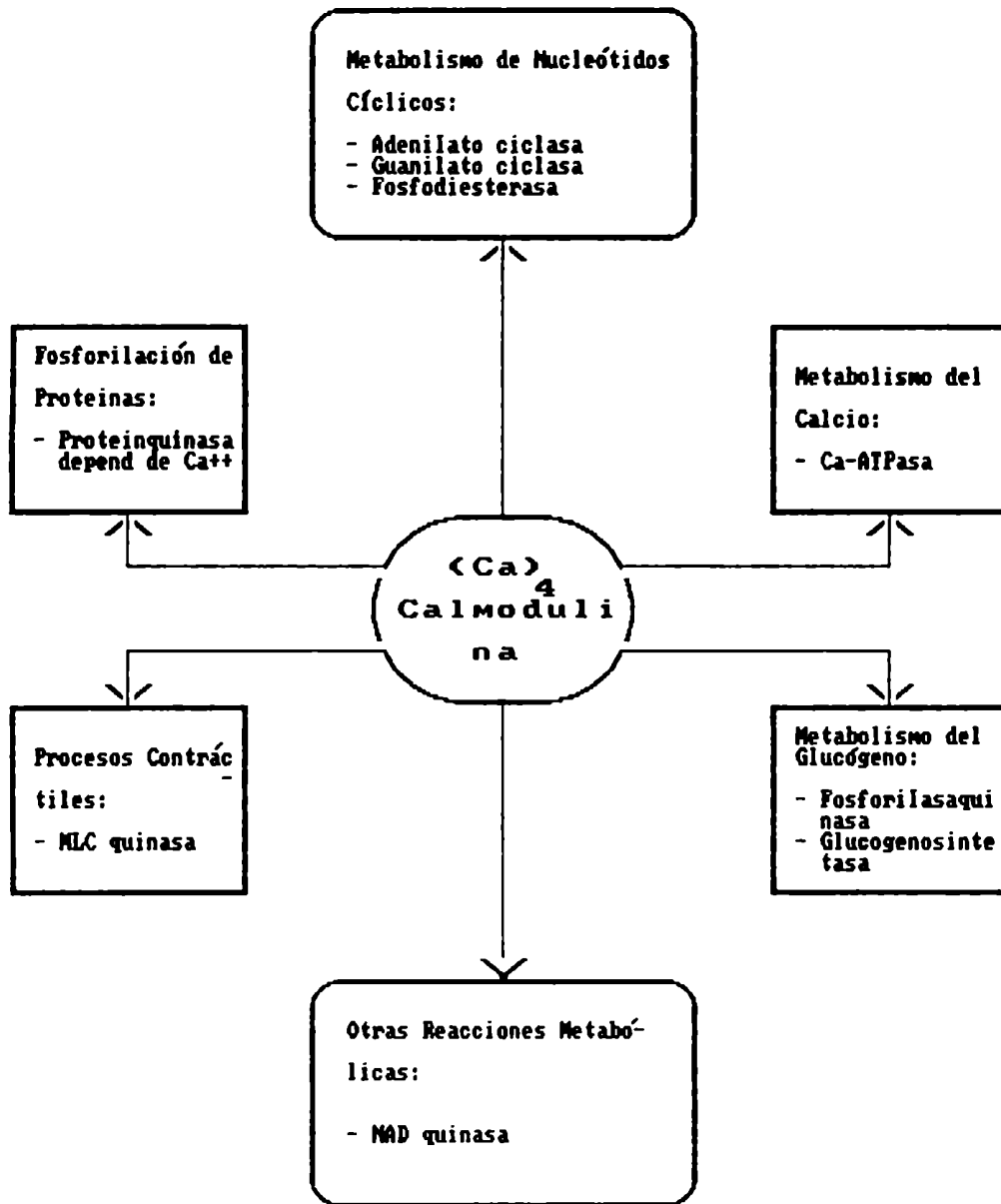


Figura I.26: Esquema resumido de Cheung, W. Y. (52).

La fosforilación de proteínas es a menudo el punto clave en estos procesos de regulación.

- a) Una de las enzimas activadas por este complejo en ciertos músculos lisos vasculares es la fosfodiesterasa de nucleótidos cíclicos. Se cree que activa más a la enzima que cataliza al GMPc (guanosin monofosfato cíclico) que a la del AMPc; de esa manera produce una mayor o más prolongada respuesta del Ca⁺⁺ por una mayor hidrólisis del GMPc (176).*
- b) En otros tejidos (sistema nervioso) este complejo activa a la adenilato ciclasa (64). Se desconoce su función sobre todo que muchos tejidos carecen de esta activación.*
- c) Los tejidos contienen una o más protein quinasas reguladas por calmodulina que catalizan la fosforilación de muchas proteínas. Se identificaron esas enzimas como "protein quinasa multifuncional dependiente de calmodulina" (177) y se conocen dos:
 - Quinasa I (cuyos sustratos mejor caracterizados son Sinapsin I y proteina II)*
 - Quinasa II (que tiene varios sustratos como glucógeno sintetasa, MLC, tirosin hidrolasa, triptofan hidrolasa, etc.).**
- d) Otra enzima regulada por este complejo es la fosforilasa quinasa que cataliza la conversión del glucógeno fosforilasa inactiva a la forma activa (68).*

e) Una de la más conocida enzima activada por el $(Ca)_4$ -calmodulina es la "cadena liviana de la miosina quinasa" (MLCqsa). Esta enzima está presente en muchas células de mamíferos y en altas concentraciones en los tejidos como músculo liso y estriado.

La fosforilación de una de las cadenas livianas de la miosina es catalizada por esta enzima. En músculo liso y otros tipos de células este paso es esencial para la iniciación de la contracción y es fundamental en el control de motilidad por el ión calcio. Esta activación afecta la cinética de la interacción entre miosina y actina. Esta enzima es altamente específica y difiere de las de músculo cardíaco y esquelético (63, 132).

f) El complejo $(Ca)_4$ -calmodulina activa también enzimas como fosfo protein fosfatasa (tipo 2B) que desfosforila a la subunidad β de la fosforilasa quinasa, a la MLC y otros sustratos de la protein quinasa dependiente de AMPc (68).

g) Otra enzima activada por este complejo es la NAD quinasa que interviene en varias reacciones metabólicas (68).

h) Por último una enzima muy importante regulada por el complejo $(Ca)_4$ -calmodulina es la que actúa sobre la bomba de salida de calcio de la célula, la bomba $Ca/ATPasa$ dependiente de adenosín trifosfato (68).

I. 4. 6. FARMACOLOGIA DE LOS SISTEMAS DE TRANSPORTE DE Ca⁺⁺

Diversas sustancias químicas afectan la entrada de Ca⁺⁺ a la célula, ya sea aumentando o disminuyendo su concentración. Algunas estimulan el influjo de Ca⁺⁺, otros lo inhiben, antagonizando al Ca⁺⁺ o bloqueando sus canales. Algunas sustancias afectan los canales indirectamente variando las condiciones que regulan su función. Los mecanismos por los cuales afectan alguna acción del Ca⁺⁺ son muy diversos y se pueden resumir en:

- *Drogas que inducen o previenen cambios en el potencial de membrana (altas concentraciones de K⁺, etc.)*
- *Drogas que alteran la concentración de Ca⁺⁺ intracelular o extracelular*
- *Drogas que modifican reacciones bioquímicas involucradas en la acción de estos canales (como fosforilación o desfosforilación)*
- *Drogas que inhiben o estimulan la actividad de los receptores de membrana ligada a estos canales.*

Los agentes que tienen acción sobre los canales de Ca⁺⁺ se los clasifican en distintos grupos incluyendo a activadores y a inhibidores; esto es según su mecanismo de acción y especificidad de tejido.

En el grupo I por ejemplo se encuentran aquellos agentes que son selectivos sobre los canales en músculo liso. Entre ellos se encuentran: nifedipina, los derivados de dihidropiridinas

(inhibidores y activadores).

En el grupo II se encuentran aquellos agentes que son más selectivos de músculo cardíaco como verapamil, diltiazem, D600, etc.

En el grupo III están aquellas sustancias que son menos selectivos y específicos que los anteriores pero que causan inhibición de la actividad de los canales de Ca^{++} y de Na^{+} (compuestos de difenilalquilaminas) (120, 196).

Algunos de estos mismos inhibidores de Ca^{++} también resultan inhibidores de calmodulina u otras proteínas contráctiles. Estos mismos agentes, como sus acciones dependen del tejido del que se trate, ya que si bien los sistemas contráctiles de todas las células musculares son reguladas por iones Ca^{++} , los mecanismos regulatorios son diferentes en los distintos tejidos.

La denominación de antagonistas de Ca^{++} es general y abarca a todo agente que disminuye la disponibilidad de calcio citosólico, con la consecuente acción relajante del músculo, sin importar su mecanismo de acción. Entre ellos podemos distinguir cuatro grandes grupos:

- 1) Inhibición del influjo de Ca^{++} : algunos autores prefieren denominarlos bloqueantes de la entrada de calcio (45, 189). Este grupo está integrado por muchos agentes como D600, dihidropiridinas, etc. Estos, en general bloquean la entrada de cationes*

calcio a través de canales estimulados o activados fisiológicamente o farmacológicamente, pero no afectan el influjo de Ca^{++} en la célula en reposo. Dentro de este grupo algunos autores incluyen a iones inorgánicos como el La^{+++} , Ba^{++} , Sr^{++} , Cd^{++} , etc. Pero se debe aclarar que el La^{+++} bloquea todo tipo de entrada de Ca^{++} incluso la que se produce a través de los poros de la membrana en reposo.

- 2) Inhibición de la liberación de Ca^{++} de retículo sarcoplasmático. Este mecanismo no está claro aunque algunos autores sugieren que no tiene importancia farmacológica (45).
- 3) Estimulación de la liberación de Ca^{++} de la célula: se conoce muy pocos agentes que estimulan la salida de iones Ca^{++} . Algunos autores demostraron que entre los inhibidores del primer grupo, que tienen acción sobre la salida del catión se encuentra la nifedipina.
- 4) Efecto sobre calmodulina: algunos agentes como verapamil y diltiazem fueron propuestos como inhibidores de esta proteína pero existe mucha discusión al respecto (45).

I. 5. OBJETIVOS

El presente trabajo de tesis examina algunos aspectos del efecto de los opioides endógenos y exógenos en el útero de rata ovariectomizada para dilucidar:

- *El papel de la morfina en la motilidad espontánea del útero aig lado de rata, receptores involucrados en estos efectos y posible mecanismo de acción.*
- *El papel de los opioides endógenos (β -endorfina, encefalinas, dinorfinas) en los mismo parámetros de la función uterina.*
- *El posible mecanismo de acción de estos opioides en el útero de rata como modelo experimental para el conocimiento de su rol fisiológico en la función reproductiva.*

MATERIALES Y METODOS

II. 1. MATERIALES

II. 1. 1. ANIMALES UTILIZADOS

Se utilizaron ratas hembras vírgenes de la variedad Wistar, cuyo peso oscilaban entre 180 y 200 g mantenidas con alimento "Purina" y agua "ad libitum". Fueron sometidas a un ritmo de bioterio 14:10 horas (de 7.00 a 21.00) de luz:oscuridad respectivamente, a temperatura y humedad constante (22 ± 2) C.

Todos los animales utilizados fueron ovariectomizados en forma bilateral 21 días antes del sacrificio. La intervención quirúrgica se realizó bajo anestesia con éter sulfúrico técnico. Se les practicó una incisión longitudinal medio-lateral, de aproximadamente 1 cm, desde la base de las costillas hacia abajo. Separadas la piel y el músculo se ubicó el ovario y el extremo del útero proximal a éste. Se ligó con hilo de cirugía a unos 5 mm de este punto cortándose junto a la ligadura para extraer de esta forma el ovario y el oviducto. Luego se suturó el músculo y la piel. Esta misma operación se practicó en el flanco opuesto del animal.

Los animales fueron sacrificados mediante un golpe en la cabeza y posterior dislocación cervical.

II. 1. 2. DROGAS UTILIZADAS

A) Sigma Chemical Co:

- PGE₁, PGE₂, PGF_{2α}, 6-ceto-PGF_{1α}
- Adenosina-3', 5'-Monofostato cíclico (AMPc)
- Folin-Ciocalteu
- Albúmina Bovina, Fracción V
- PPO
- POPOP
- Teofilina
- 2-Mercaptoetanol
- Acido Tricloroetanoico
- Atropina
- Propanolol
- Indometacina
- TRIZMA base
- Regitina
- Naloxona
- Nifedipina
- Verapamil
- EGTA
- EDTA
- Dextrano

B) New England Nuclear

- *Protocol*
- ^3H -AMPc (AE = 40 Ci/mmol)
- Acido ^{14}C -Araquidónico (AE = 56 mCi/mmol)

C) Amersham

- $^{45}\text{CaCl}_2$ (AE = 10-40 mCi/mmol)

D) Merck Co

- *Cicloheptadina*

E) Baker

- *Placas cromatográficas flexibles silica gel IB2-F, Baker-Flex*

E) Fisher Scientific Co

- *Carbón Activado*

F) Verardo y Cia

- *Morfina (Clorhidrato de)*

Las sales y solventes utilizados fueron de grado analítico (Carlo Erba, Mallincrodt y Merck). La solución centelleadora utilizada estaba constituida por: Tolueno:Tritón X-100:Tolueno Pc (4% m/m PPO y 0,05% m/m POPOP) en relación 630:300:70 (v:v:v).

II. 2. METODOS

II. 2. 1. DETERMINACION DE LA MOTILIDAD UTERINA

Los estudios se realizaron empleando in vitro cuernos uterinos de ratas adultas ovariectomizadas. Para su obtención se efectuó una incisión longitudinal medio-ventral. Luego de separar los cuernos se les colocó en una cápsula de Petri conteniendo solución de Krebs Ringer bicarbonato (KRB) modificado y se los disecó a temperatura ambiente.

Se abrieron los cuernos longitudinalmente siguiendo la línea del mesometrio y posteriormente se cosieron por los extremos con hilo y aguja. El tejido se sujetó por el hilo de uno de sus extremos a un soporte de vidrio en forma de J, el cual estaba contenido en una cámara tisular de vidrio de doble pared cerrado en su base, entre las cuales circulaba agua termostaticada a 37° C impulsada por una bomba Edmund Büler UKT 2 (Figura II.1). El hilo del otro extremo tisular se conectó a un transductor Statham ó TMI BHL, capaz de transformar la actividad mecánica del tejido en una señal eléctrica. Esta señal era magnificada con un amplificador SAN-EI acoplado a un polígrafo con plumas inscriptoras de tinta Rectigraph 3S encargadas de registrar en forma inmediata y continua las curvas producidas por la actividad mecánica del tejido (Figura II.2) (25).

El medio tisular, como ya se mencionó, consistía en

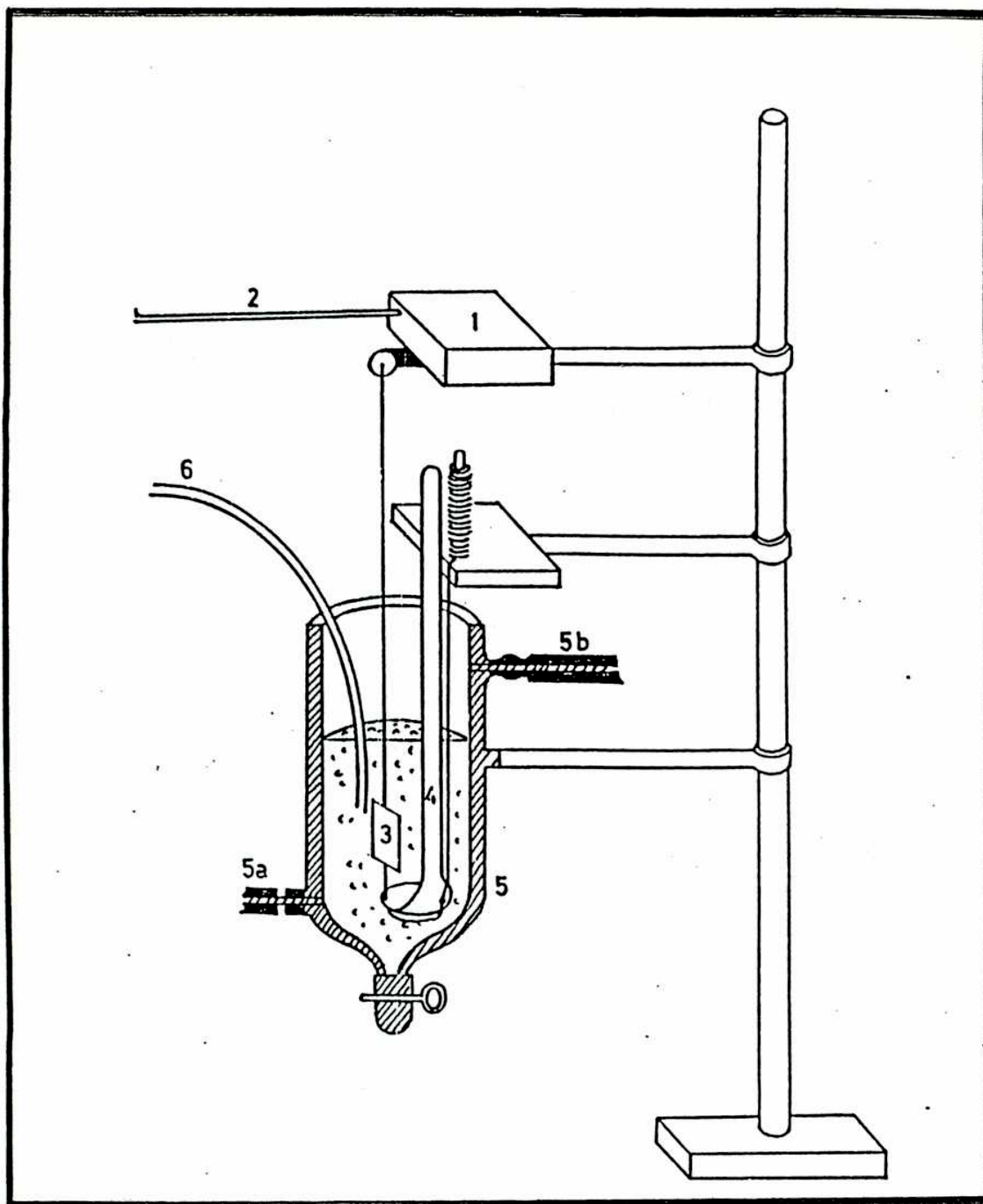


Figura II.1: 1=Transductor
 2=Conector del transductor con el sistema amplificador-registrador
 3=Tejido
 4=Soporte tisular
 5=Cámara tisular: 5a=boca de entrada de agua circulante externa; 5b=boca de salida
 6=Burbujeador

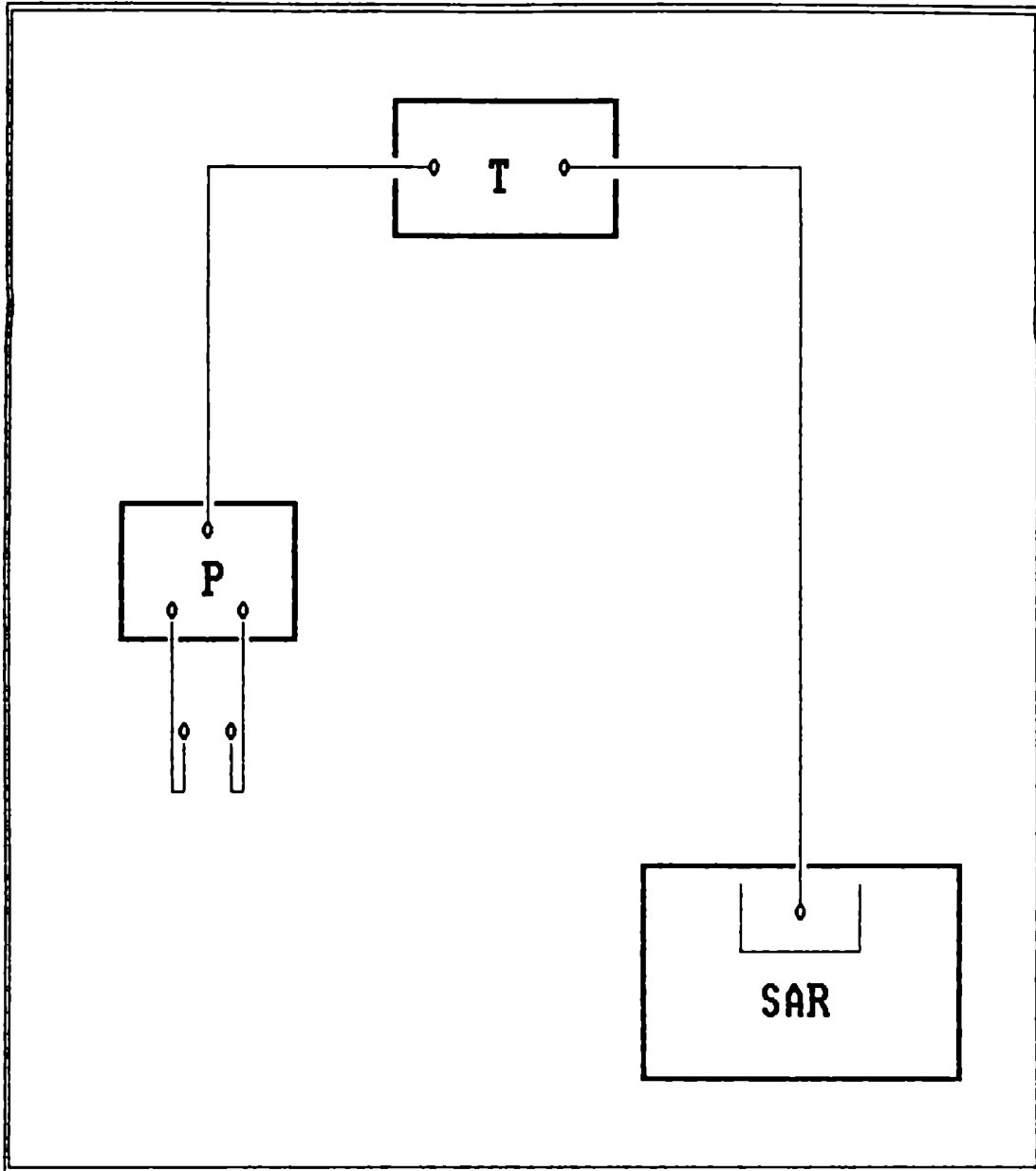


Figura II.2: Equipo para registrar motilidad uterina

T = Transductor

P = Preparación muscular

SAR = Sistema de amplificación y registro

una solución buffer KRB a pH = 7,4 y que contenía glucosa como sustrato metabólico. Esta solución tenía la siguiente composición:

$[Na^+] = 145 \text{ mM}$

$[Cl^-] = 127 \text{ mM}$

$[K^+] = 5.9 \text{ mM}$

$[HCO_3^-] = 2,5 \text{ mM}$

$[Ca^{++}] = 2,2 \text{ mM}$

$[SO_4^{=}] = 1.2 \text{ mM}$

$[Mg^{++}] = 1,2 \text{ mM}$

$[PO_4^{3-}] = 1,2 \text{ mM}$

El pH se mantuvo ajustado con gas carbónico (95 % de O_2 y 5 % de CO_2) a flujo constante. En todos los experimentos la temperatura del medio nutriente fue estabilizada a 37 °C.

Una vez montado el tejido se le aplicó una tensión basal de 500 mg mediante un estiramiento producido por un dispositivo micrométrico, luego de lo cual se registró su actividad contráctil espontánea por un período de 60 minutos. Se consideró como control de dicha actividad el promedio de las contracciones producidas durante los primeros 10 minutos post-aislamiento.

Las variaciones observadas durante la hora de experimentación se cuantificaron en períodos de 10 minutos y se expresaron como porcentaje de cambio con respecto a controles internos

registrados durante los primeros 10 minutos después del aislamiento y a los que se consideraban como el 100 % de actividad contráctil.

La valoración de la actividad contráctil uterina se realizó teniendo en cuenta la llamada "Tensión contráctil isométrica" (TCI) siendo ésta la tensión desarrollada por el músculo uterino desde el nivel de tensión de reposo hasta el punto de mayor desarrollo de tensión (tensión pico) isométrica (Figura II.3).

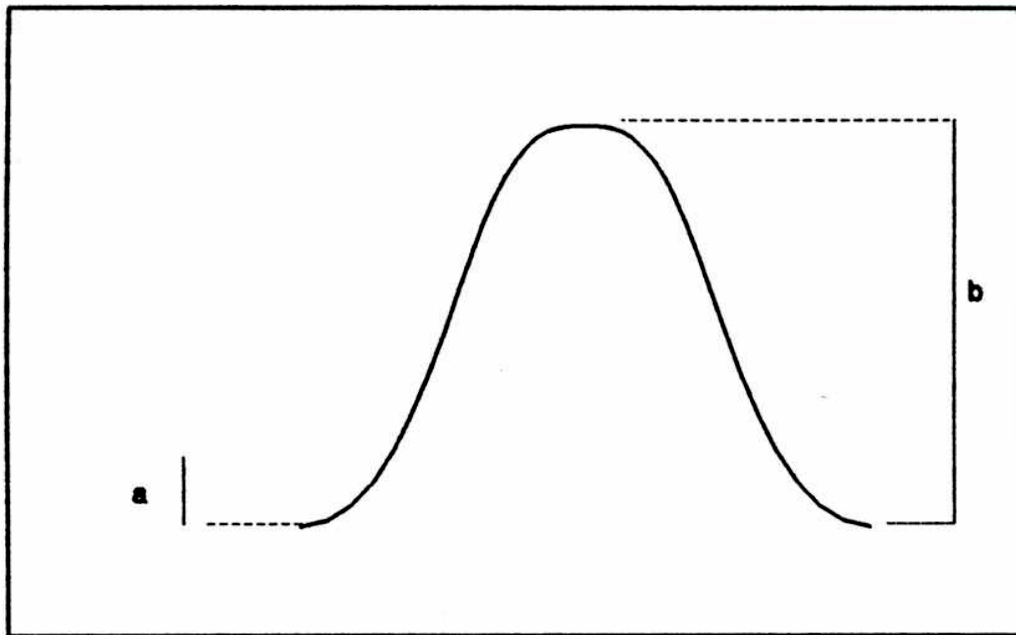
Los valores de TCI fueron el promedio de las contracciones individuales registradas en períodos de 10 minutos. Su valor fue expresado en mg tensión/mg peso seco del tejido.

En los casos en que se estudiaron efectos de antagonistas éstos fueron agregados al baño 30 minutos antes que los agonistas.

Una vez finalizado los experimentos, los segmentos uterinos fueron secados durante 48 horas en estufa a 60 °C y posteriormente pesados.

II. 2. 2. PRODUCCION Y CUANTIFICACION DE PGS

Uno de los propósitos de este trabajo fue estudiar el efecto de los opioides sobre la producción y liberación al medio de prostaglandinas del tipo E y F por el útero de rata ovariectomizada.



**Figura II.3: Parámetros para medir tensión
contráctil isométrica del tejido**
a = Trazado de calibración en mg
**b = Tensión contráctil isométrica
en mg**

Para ello se extrajeron los tejidos como se mencionó anteriormente, se los separó de todo material extraño, se los abrió longitudinalmente y se los dividió en cuartos. Cada uno de ellos fue preincubado en solución KRB burbujeada con carbógeno a 37 °C en un agitador Dubnoff. Luego de 30 minutos se los pasó a tubos conteniendo medio fresco en ausencia (controles) y presencia de distintos opioides y se los incubó durante 60 minutos en iguales condiciones que antes. Al cabo de 60 minutos de incubación el medio tisular fue retirado y guardado a -20 °C para posterior cuantificación de las prostaglandinas. Por otro lado los tejidos fueron secados a 60 °C durante 48 horas y subsecuentemente pesados.

La determinación de prostaglandinas en el medio de incubación consta de tres pasos principales:

- A) Extracción*
- B) Separación por cromatografía en placa delgada*
- C) Cuantificación por bioensayo*

A) Extracción

Las prostaglandinas como ácidos débiles tienen la propiedad de ser fácilmente extraíbles en solventes orgánicos cuando se encuentran en forma protonada. Esta es la base del procedimiento de extracción utilizado.

Las muestras a extraer, luego de descongelarse, fue

ron llevadas a pH = 3-3,5 con solución de cloruro de hidrógeno 1N, lo que convierte a las prostaglandinas y a los ácidos grasos en su forma no disociada, insoluble en agua.

Se realizaron tres extracciones con etanoato de etilo utilizando igual volumen al de la solución acuosa cada vez. Se reunieron los extractos y evaporados bajo presión reducida en un evaporador rotatorio a 40 °C.

B) Cromatografía en placa delgada

El procedimiento llevado a cabo extrae eficientemente las prostaglandinas, los ácidos grasos y los hidroxiácidos, pero se hace necesario separar los distintos componentes para su posterior cuantificación.

La mayor parte de las prostaglandinas y el TxB₂ pueden separarse como ácidos libres en sílica gel G utilizando varios sistemas de solventes (150).

Las placas cromatográficas utilizadas fueron TLC flexibles sílica gel G IB2-F, Baker-Flex, Baker, que fueron activadas antes de usarse, en estufa a 110 °C durante 30 minutos.

Antes de realizar la corrida cromatográfica, estas placas fueron embebidas en una solución de nitrato (V) de plata al 5 % en metanol:agua (95:5) (v:v) de acuerdo a la única metodología descrita para separar las PGE₁ y PGE₂ (268) y posteriormente acti

vadas en estufa a 110 °C durante 30 minutos.

Los residuos de las muestras provenientes de la extracción fueron eluidos con metanol y sembrados mediante tubos capilares. Se corrieron en paralelo testigos de las tres prostaglandinas que se estudiaron: PGE₁, PGE₂ y PGF_{2α}. La corrida se realizó en cubas cromatográficas en forma ascendente. El solvente de elución era la fase orgánica de una mezcla de cloroformo:metanol:agua (80:20:50) (v:v:v). Los testigos fueron revelados con una solución de ácido fosfomolibdico al 10% en etanol, seguido de calentamiento a 110 °C durante 5 minutos.

Los R_r obtenidos fueron 0.79; 0,54; y 0,26 para PGE₁, PGE₂ y PGF_{2α} respectivamente. De acuerdo a los correspondientes R_r se cortaron las zonas de cada muestra y se eluyeron tres veces con 5 ml de una mezcla de cloroformo:metanol (4:1) (v:v). Los eluidos luego fueron llevados a sequedad en estufa a presión reducida.

C) Bioensayo

Este método se basa en la capacidad que tienen las prostaglandinas para contraer todos los músculos lisos del tracto digestivo. El estómago de rata es un tejido muy sensible a estos eicosanoides, de allí su elección en este ensayo (173).

El estómago de rata aislado fue superfundido en se-

rie con solución buffer KRB en un dispositivo semejante al de la Figura II.1 con la diferencia que el tejido no estaba sumergido en el medio, sino perfundido por el mismo. El medio contenía antagonistas capaces de bloquear la acción de otras sustancias que pueden interferir en el ensayo. Los efectos de histamina, adrenalina, noradrenalina y acetilcolina pueden anularse mediante el uso de una mezcla de un antihistamínico y antiserotoninérgico (ciproheptadina 10^{-8} g/ml); un bloqueante de adrenoreceptores α (fentolamina 2×10^{-6} g/ml), β (propranolol 3×10^{-6} g/ml) y un agente anticolinérgico (atropina 10^{-7} g/ml) (92). Se empleó además un inhibidor de la síntesis de prostaglandinas, indometacina (1 μ g/ml) para prevenir la generación de prostaglandinas por el tejido aislado (67). El buffer fue mantenido a 37 °C mediante un refrigerante y burbujeado con carbógeno. La velocidad del goteo fue de 5-20 ml/minuto.

El tejido se colocó en la cámara tisular, fijando uno de sus extremos a un soporte de vidrio y conectando el otro a un transductor que transforma la actividad mecánica en señal eléctrica. El sistema utilizado para traducir, amplificar y registrar las señales era idéntico al descrito para los estudios de las contracciones, esto es un transductor de fuerza contráctil isométrica, un amplificador de las señales eléctricas y un polígrafo inscriptor (Figura II.2).

Las muestras provenientes de la cromatografía se inyectaban disueltas en 0,2 ml de solución KRB y las respuestas que

inducían se comparaban con las de distintas concentraciones de prostaglandinas testigos inyectadas en las mismas condiciones.

Los resultados obtenidos se expresaron en ng de PGS/mg de peso seco del tejido y fueron corregidos por ensayos de recuperación realizados con cada grupo de 6 muestras. Los porcentajes de recuperación oscilaron entre el 50 y el 70 %.

II. 2. 3. DETERMINACION DE AMPc

Se determinó el efecto de distintos agentes sobre los niveles uterinos de AMPc. Se utilizaron en estos experimentos cuernos uterinos aislados de ratas ovariectomizadas. Los segmentos (medio cuerno uterino), libres de todo material graso, se preincubaron en solución KRB a 37 °C, durante 30 minutos en un agitador Dubnoff bajo atmósfera de carbógeno (95% de O₂ y 5% de CO₂). Posteriormente se incubaron los segmentos en idénticas condiciones en ausencia (control) y presencia de las drogas estudiadas (agonistas y antagonistas opioides, prostaglandinas y combinaciones entre ellas).

Se determinaron los niveles de AMPc en tres tiempos diferentes de incubación: 1 minuto, 5 minutos y 20 minutos. Cumplido este periodo, se homogenizaron los segmentos uterinos en 0,5 ml de ácido tricloroetanoico al 10% (v/v). Estos homogenatos se centrifugaron a 2000 x g durante 20 minutos a 0 °C. Se separó el precipitado para la determinación de proteínas y el sobrenadante se

lavó cuatro veces con 5 ml de dietileter saturado en agua con el fin de eliminar el ácido tricloroetanoico.

Los niveles de AMPc se estimaron en el residuo (obtenido una vez evaporado al vacío la fase acuosa) por triplicado según la técnica de Brown y colaboradores (34).

El precipitado de la centrifugación se solubilizó con 1 ml de NaOH 1N calentado a ebullición durante 30 minutos, para la posterior cuantificación de proteínas por el método de Lowry (157).

La protein quinasa, necesaria para la cuantificación del AMPc, fue aislada de glándulas adrenales bovinas. Luego de la separación de la médula, las cortezas adrenales sin cápsula se homogenizaron en Politron (Beckman) a 0 °C con 1,5 volúmenes de buffer TRIS-HCl 50 mM de pH = 7,4 (0,25 M de sacarosa, 25 mM de KCl, 5 mM de MgCl₂). Se centrifugó este homogenato a 17000 x g durante 30 minutos y el sobrenadante obtenido se fraccionó en alícuotas de 0,5 ml y se guardó a -70 °C.

En el momento de la determinación se descongeló el preparado enzimático y se lo diluyó adecuadamente (según el título buscado) con el buffer de ensayo TMT a pH = 7,4 (TRIS-base 50 mM, teofilina 8 mM y 2-mercaptoetanol 6 mM). Este mismo buffer se utilizó en todos los pasos posteriores de la determinación.

Los ensayos se llevaron a cabo en un volumen total

de 200 μ l. Cada tubo contenía 50 μ l de la dilución apropiada de la enzima (1:8 generalmente), 100 μ l de concentración conocida de AMPc (curva: 0,078 - 20,0 pmoles) o de homogenato de tejido y 50 μ l de ^3H -AMPc (aproximadamente 5000 cpm por tubo) de AE = 40 Ci/ μ mol. La cantidad de enzima era tal que unía aproximadamente el 40% del AMPc marcado (uniones totales o máximas). La incubación se realizó a 4 °C durante 90 minutos. Cumplido este periodo de tiempo se separó el AMPc libre del unido con el agregado de 200 μ l de una suspensión de carbón-albúmina (0,5 g de carbón y 100 mg de suero de albúmina bovina en 10 ml de buffer) mantenida en agitación constante a 4 °C. Se dejó esta suspensión en contacto durante 10 minutos a 4 °C luego de lo cual se centrifugó en frío (4 °C) a 2000 x g durante 20 minutos.

El sobrenadante de esta centrifugación se volcó en viales conteniendo una solución centelladora de tolueno-tritón X-100 para la determinación de la radioactividad por espectrometría en un contador de centelleo líquido (Beckman LS 100 C).

Los resultados se expresaron en ng de AMPc/mg de proteínas.

II. 2. 4. METABOLISMO DEL ACIDO ^{14}C -ARAQUIDONICO

Esta técnica permite estudiar la capacidad de síntesis de prostaglandinas por un tejido aislado desarrollada en el laboratorio en 1986 (83).

Los úteros extraídos de ratas ovariectomizadas fueron colocados en buffer KRB a 0 °C tras eliminarles todo material graso y extraño. Luego fueron pesados utilizando aproximadamente 200 mg de tejido, los que fueron cortados en segmentos de alrededor de 2 mm.

La mezcla de incubación consistió en 0,25 µg de ácido ¹⁴C-araquidónico (AE = 56 mCi/mmol) en 1 ml de solución buffer KRB (relación buffer a tejido: 1 ml/200 mg de tejido húmedo). Se incubó durante 3 horas con agitación constante a 37 °C en un baño termostatzado modelo Dubnoff bajo atmósfera de carbógeno (95% de O₂ y 5% de CO₂).

Se detuvo la reacción por el agregado de solución de ácido cítrico 1M hasta obtenerse un pH = 3-3,5. Se agregaron dos volúmenes de etanoato de etilo y se lo dejó en contacto durante 16 horas. Cumplido este periodo de tiempo se extrajo el solvente y se realizaron dos extracciones más con iguales volúmenes que el anterior. Los extractos combinados se llevaron a sequedad en estufa bajo presión reducida a 40 °C.

Luego de estas extracciones se realizó una cromatografía en placa delgada para separar los metabolitos del ácido araquidónico formados durante la incubación. Las placas utilizadas son las mismas que las mencionadas para prostaglandinas y fueron activadas por calentamiento a 110 °C durante 30 minutos antes de usar.

Se sembraron los residuos de las muestras provenientes de la extracción con una mezcla de cloroformo:metanol, 4:1 (v:v) mediante tubos capilares. Paralelamente se sembraron testigos de PGE₂, PGF_{2α} y 6-ceto-PGF_{1α}.

La corrida se realizó en cubas cromatográficas utilizando la mezcla de solventes benceno:dioxano:ácido etanoico, 60:30:3 (v:v:v).

Una vez corrida la placa y evaporado el solvente, se revelaron los testigos con ácido fosfomolibdico al 10% en etanol seguido de calentamiento a 110 °C durante 5 minutos. Los R_f obtenidos fueron 0,17; 0,28 y 0,42 para 6-ceto-PGF_{1α}, PGF_{2α} y PGE₂ respectivamente.

Las placas se cortaron en segmentos de 1 cm, se colocaron en viales y se les agregó 10 ml de líquido de centelleo. La radioactividad presente se determinó 24 horas después en un contador de centelleo líquido Beckman LS 100 C.

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

II. 2. 5. CAPTACION DE ⁴⁵Ca++ EXTRACELULAR

Se midió la entrada del ión Ca⁺⁺ extracelular usando ⁴⁵CaCl₂ in vitro en tejido uterino bajo condiciones normales y frente a distintos agentes.

Para ello se extrajeron úteros de ratas ovariectomizadas en las mismas condiciones que para las otras técnicas y se los colocó en cápsulas de Petri con el buffer del ensayo. Se les extrajo todo material graso, se los abrió longitudinalmente como ya se explicó y se los cortó en segmentos de aproximadamente 15-20 mg de peso húmedo. Se preincubaron estos segmentos durante 30 minutos a 32 °C en buffer HEPES/Ca burbujeado con 100% de O₂.

<i>SALES</i>	<i>HEPES/Ca (mM)</i>	<i>HEPES/EGTA (mM)</i>
- <i>NaCl</i>	140	140
- <i>KCl</i>	5	5
- <i>MgCl₂</i>	1	1
- <i>CaCl₂</i>	1,8	---
- <i>HEPES</i>	5	5
- <i>Glucosa</i>	10	10
- <i>EGTA</i>	---	2

Luego se los trasvasa a medio fresco (buffer HEPES/Ca nuevamente) y se los incuba durante distintos periodos de tiempo.

po (2, 5, 15 y 30 minutos) en presencia de $^{45}\text{CaCl}_2$ (0,1 $\mu\text{Ci/ml}$) en ausencia (controles) y presencia de distintos agentes estudiados.

Finalizado este periodo de incubación, los tejidos son sometidos a varios lavados en serie a 0 °C con buffer HEPES/EGTA descrito en el cuadro anterior (libre de iones Ca^{++} y en presencia de 2 mM de EGTA): tres lavados de 15 segundos, 1 lavado de 15 minutos y 1 último lavado de 30 minutos, todos con medio fresco y agitación por burbujeo con O_2 100% (169).

Una vez eliminada toda unión inespecífica de los segmentos, se colocaron los tejidos en papel de filtro Whatman nro. 1 y luego de 2 minutos se pesaron, colocaron en tubos conteniendo 300 μl de protosol y se dejaron a 40-45 °C en estufa toda la noche (18 horas) para su completa disgregación.

Cumplido ese periodo de tiempo, cada muestra fue trasvasada en forma completa a viales conteniendo 10 ml de líquido de centelleo con Tolueno-Tritón X-100.

Paralelamente, mientras se lavaron los tejidos se tomaban 100 μl de cada medio de incubación y se los agregaba también a viales conteniendo líquido de centelleo para poder expresar luego los resultados en función de la radioactividad total expuesta.

Se midió la radioactividad de ambas serie de viales en un contador de centelleo líquido Beckman LS 100 C.

Los resultados fueron expresados como la relación entre el contenido de $^{45}\text{Ca}^{++}$ del tejido y del medio de incubación:

$$T/M = \text{cpm} \times \text{g}^{-1} \text{ tejido} / \text{cpm} \times \text{ml}^{-1} \text{ medio.}$$

II. 2. 6. MUSCULO DESPOLARIZADO

Para obtener el músculo despolarizado se incubó el tejido en un medio que contenía $[\text{K}^+] = 60 \text{ mM}$ y $[\text{Na}^+] = 80 \text{ mM}$ de forma de mantener la osmolaridad del medio utilizado en los otros ensayos. La concentración del resto de los iones es la misma que en el buffer tradicional ya descrito (ver cuadro).

II. 2. 7. EFLUJO DE Ca^{++}

Se determinó la liberación de iones $^{45}\text{Ca}^{++}$ por segmentos de útero de rata ovariectomizada de aproximadamente 10 mg de peso húmedo.

En una primera etapa se procedió de la misma forma que la mencionada en el ensayo de captación de iones calcio. Los tejidos cortados, libres de todo material graso y extraño, se los preincuba durante 30 minutos en buffer HEPES/Ca a $32 \text{ }^\circ\text{C}$ con agitación por burbujeo con 100% de O_2 . Luego se los incuba por 30 minutos en medio fresco conteniendo $^{45}\text{CaCl}_2$ ($0,1 \text{ } \mu\text{Ci/ml}$) en las mismas condiciones.

En la segunda etapa se sigue la técnica de Sakai y

colaboradores con algunas modificaciones (205). Se lavan las muestras en serie por pasaje de cada una de ellas a intervalos de 2 minutos a través de tubos conteniendo 0,5 ml de buffer HEPES/Ca a 32 °C y con agitación por burbujeo con 100% de O₂ en ausencia (controles) y presencia de las drogas estudiadas.

Una vez liberada toda la radioactividad del tejido (aproximadamente 30 minutos después), cada muestra fue colocada en papel de filtro Whatman nro. 1, pesada y disgregado el tejido con protocolo de la misma forma que la realizada en el ensayo de captación de iones ⁴⁵Ca⁺⁺ al tejido.

Se cuantifica la radioactividad de cada tejido y de los 0,5 ml de cada tubo de lavado de cada muestra en un contador de centelleo líquido Beckman LS 100 C de la misma forma que la descrita anteriormente.

Se expresan los resultados como una relación entre las cuentas del medio de lavado y las del tejido:

$$(T/M)' = \text{cpm} \times \text{ml}^{-1} \text{ medio} / \text{cpm} \times \text{g}^{-1} \text{ tejido.}$$

RESULTADOS

Es conocido que la morfina a dosis terapéuticas prolonga el trabajo de parto y que en la motilidad espontánea del útero intervienen las prostaglandinas, sobre todo del tipo E. Por lo tanto se realizaron estudios para conocer las interacciones que existen entre los opioides, principalmente la morfina, y las prostaglandinas y sus efectos sobre el útero de rata. Para ello se estudió primeramente el efecto que producía la morfina en la motilidad espontánea del útero de rata ovariectomizada.

III. 1. EFFECTO DE LA MORFINA SOBRE LA MOTILIDAD ESPONTANEA UTERINA

En estos experimentos se observó el efecto que producía la morfina y su principal antagonista, naloxona, sobre la contractilidad uterina luego de 60 minutos de actividad.

La Figura III.1 muestra claramente que la morfina en concentración de 10^{-8} M disminuye significativamente el inotropismo espontáneo. También se puede observar que no sólo la naloxona (10^{-8} M) no antagoniza este efecto, sino que produce por sí sola una acción similar al opioide.

Se utilizaron distintas concentraciones de morfina (desde 10^{-5} M hasta 10^{-8} M) y todas tuvieron el mismo efecto, esto es, no se observó un efecto dosis dependiente. En cuanto a la naloxona también se probaron varias concentraciones y en ningún caso se observó efecto antagonista.

CONTRACTILIDAD UTERINA

Morfina y Naloxona

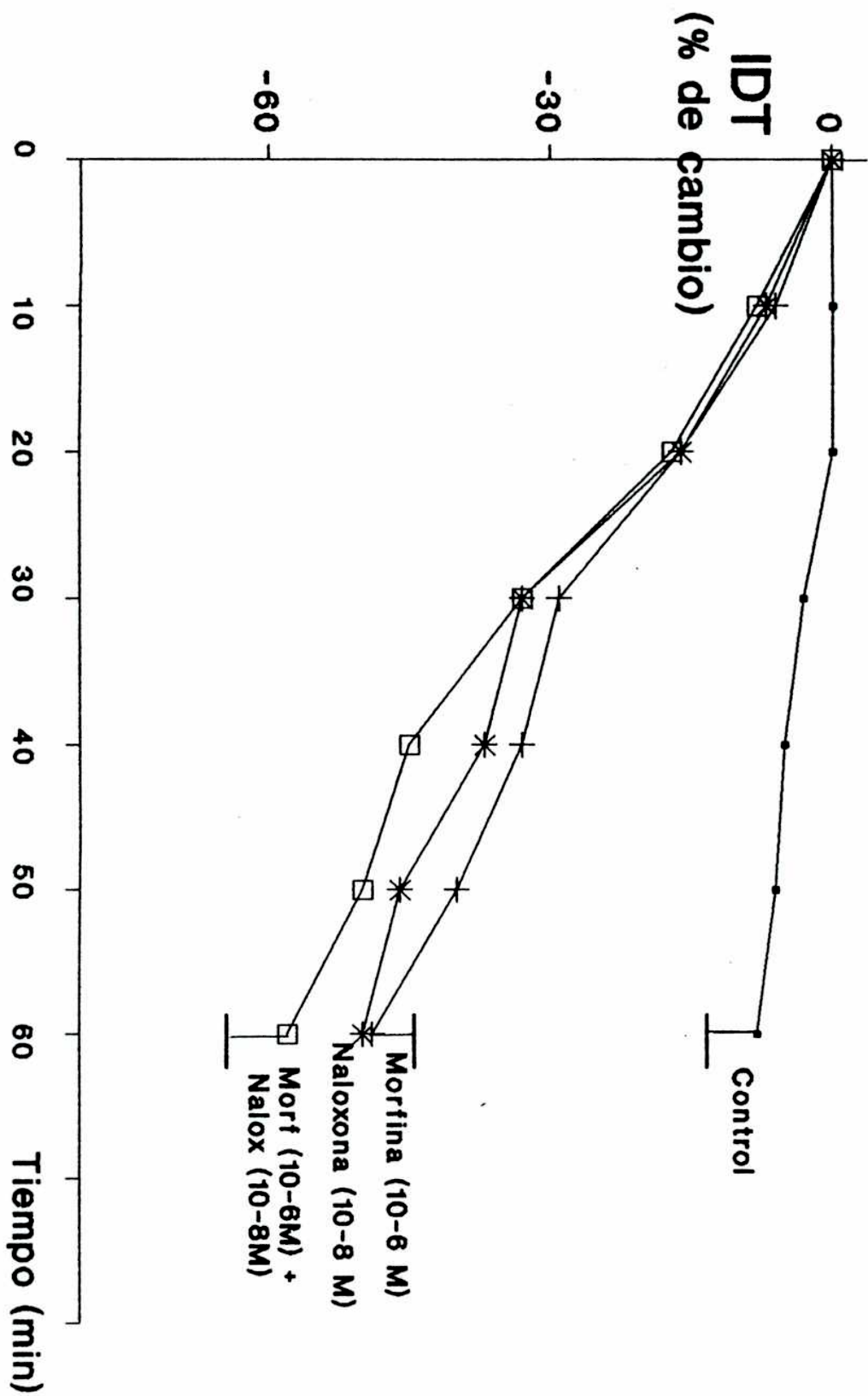


Figura III.1

La inhibición producida por la morfina (10^{-8} M) fue del (58 ± 8) % con $p < 0.01$, valor máximo alcanzado con esa concentración en ese período de tiempo.

Debido a estas observaciones se estudió posteriormente si la morfina y/o naloxona ejercían alguna modificación en la síntesis y liberación de prostaglandinas (PGS).

III. 2. EFECTO DE LA MORFINA SOBRE LA SINTESIS Y LIBERACION DE PGS

En estos estudios se dosaron los niveles de prostaglandinas generados in vitro por el útero de rata luego de 60 minutos de incubación en presencia de morfina, naloxona y ambas. Las concentraciones utilizadas fueron 10^{-8} M para morfina y 10^{-8} M para naloxona.

La Figura III.2 muestra que tanto la morfina como la naloxona deprimen significativamente la síntesis y liberación de PGS de tipo E y F. En este caso la naloxona tampoco fue capaz de antagonizar el efecto de morfina y cuando se las incubaron juntas la inhibición fue del mismo orden que cuando se las ensayaron por separado.

Con el objeto de comparar el efecto de la morfina, cuya acción principal es a través de receptores del tipo μ , se repitieron los ensayos sobre la motilidad espontánea del útero frente a otros agonistas opioides con mayor afinidad por otro tipo de

SINTESIS DE PROSTAGLANDINAS

Morfina y Naloxona

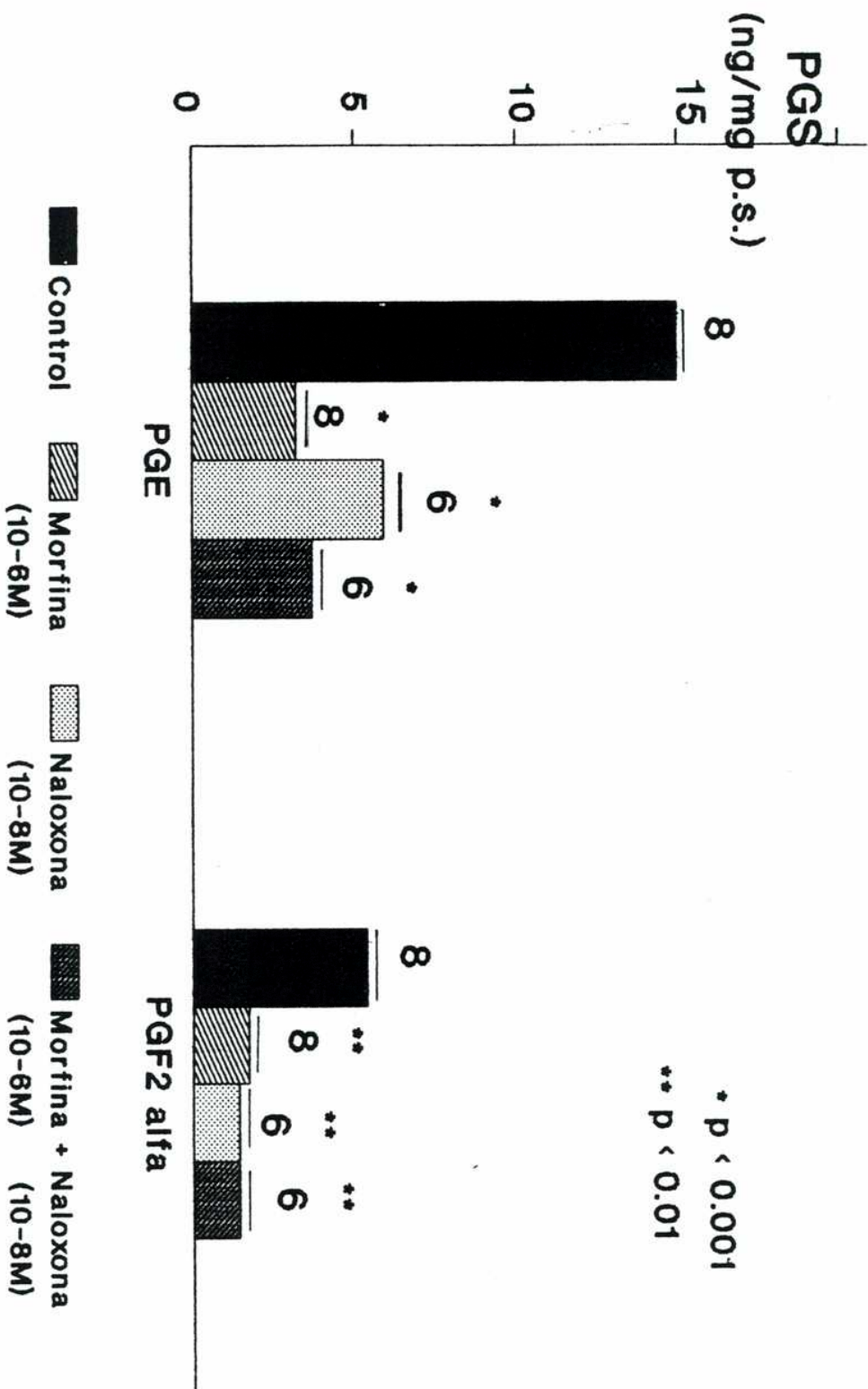


Figura III.2

receptores.

III. 3. EFECTO DE DISTINTOS OPIOIDES SOBRE LA CONTRACTILIDAD UTERINA

Para ello se trabajó con encefalinas (agonista δ), dinorfina (agonista K), SKF 10047 (allylnormetazocina) (agonista σ) y con β -endorfina (agonista μ y β). Las condiciones del ensayo fueron las mismas que para morfina y las concentraciones utilizadas fueron 10^{-6} M para cada una de ellas.

En la Figura III.3 podemos observar que ni las encefalinas, ni la dinorfina ni el SKF 10047 afectaron significativamente la motilidad espontánea del útero de rata ovariectomizada durante los 60 minutos del ensayo. La β -endorfina, agonista μ y β , en cambio, fue el único opioide entre ellos capaz de inhibir la contractilidad del útero en forma significativa ($p < 0.001$). Esto está de acuerdo con el efecto inhibitorio observado con morfina, ambos son agonistas μ y la β -endorfina, además, puede ejercer su acción a través de otro receptor llamado epsilon (ϵ) encontrado en algunos tejidos.

Se probaron otras concentraciones con los opioides cuyos resultados fueron negativos, como 10^{-5} M y 10^{-8} M, pero no hubo variación en sus respuestas.

No se conocen antagonistas específicos de recepto-

CONTRACTILIDAD UTERINA

Opioides

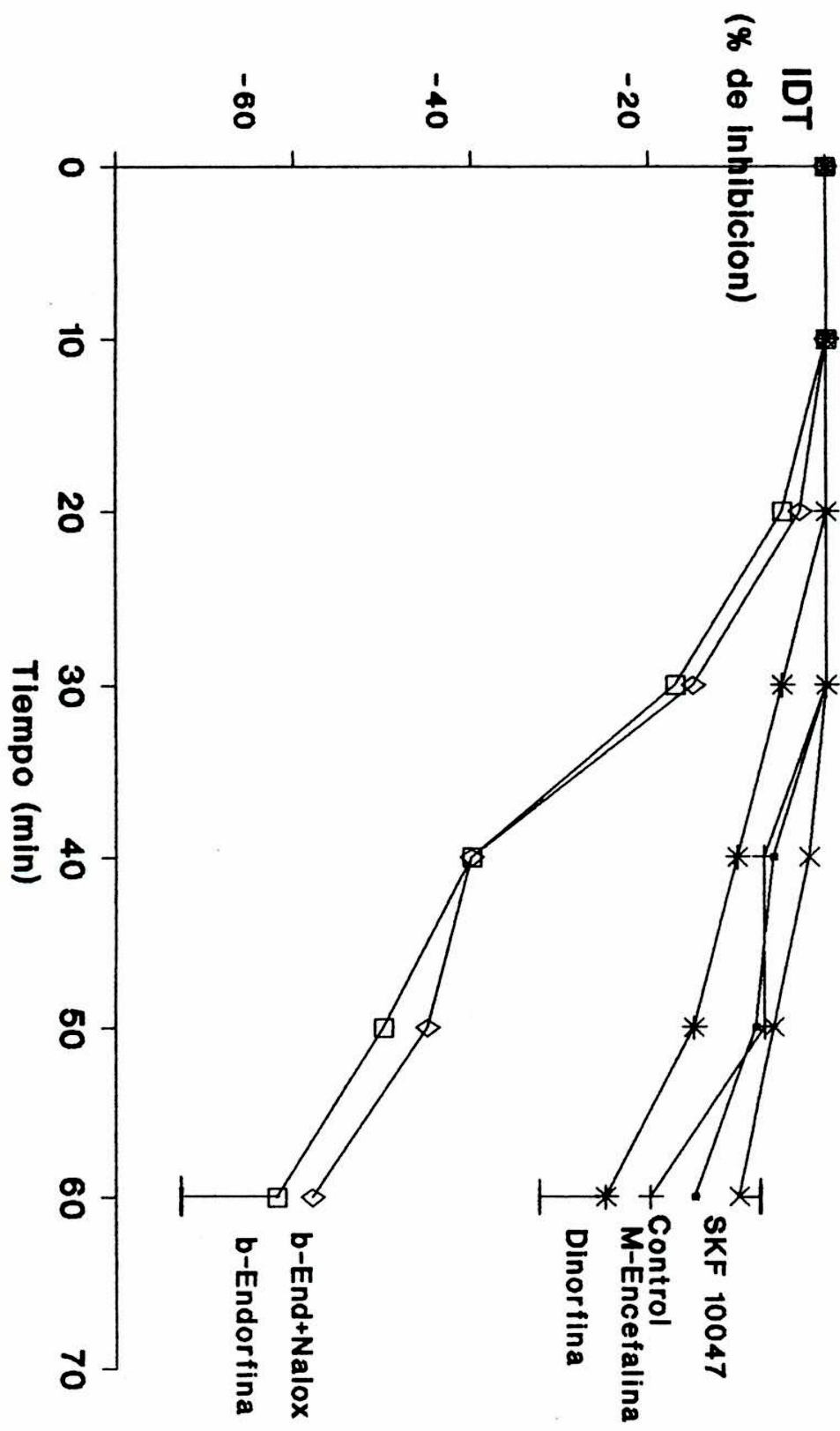


Figura III.3

res opioides del tipo ϵ , de ahí que solo nos limitamos a utilizar naloxona como antagonista. Según podemos observar la naloxona tampoco antagonizó a este opioide.

Dado que la β -endorfina fue el único opioide capaz de ejercer algún efecto sobre la motilidad uterina, se probó su acción sobre la síntesis y liberación de prostaglandinas de la misma forma que con la morfina.

III. 4. EFECTO DE β -ENDORFINA SOBRE LA SÍNTESIS Y LIBERACIÓN DE PGS

En estos experimentos se obtuvieron resultados similares a los encontrados con morfina. Las concentraciones utilizadas fueron 10^{-8} M y 10^{-9} M (Figura III.4). En ambos casos se observaron los mismos resultados.

La β -endorfina inhibe significativamente la síntesis de prostaglandinas E_1 , E_2 y $F_{2\alpha}$. Los resultados son similares para las tres prostaglandinas ensayadas y para la acción del antagonista.

Dada la íntima relación existente entre la contractilidad muscular, las prostaglandinas y el segundo mensajero adenosin-monofosfato cíclico (AMPC) (explicado en el capítulo I), se pensó que la acción de estos opioides podría deberse a una modificación en los niveles de AMPC celular. Para ello se recurrió a su

SINTESIS DE PROSTAGLANDINAS β-Endorfina

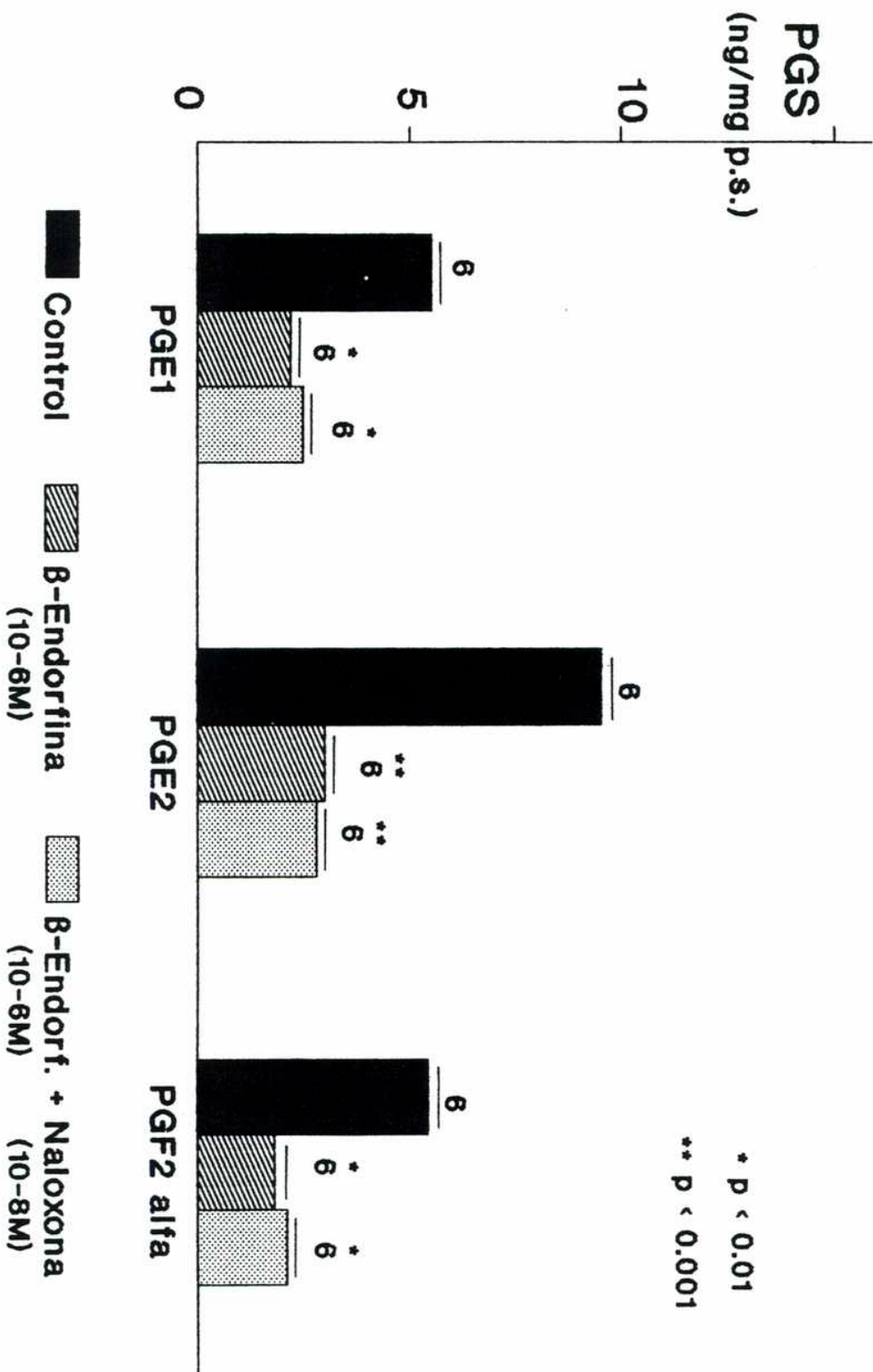


Figura III.4

determinación en este modelo biológico.

III. 5. DETERMINACION DE NIVELES DE AMPc

Según la bibliografía existente algunas prostaglandinas del tipo E aumentan el nivel de AMPc en miometrio y endometrio aislado de rata (256). Asimismo se ha descrito que la morfina interfiere con la acción de prostaglandinas sobre el sistema nervioso central a través de la inhibición de AMPc (56).

a) Efecto de las PGS

En la primera serie de experimentos se estudió el efecto producido por las PGS sobre los niveles de AMPc a distintos tiempos.

En la Figura III.5 se puede observar que las PGS de la serie E aumentan significativamente los niveles del nucleótido cíclico sobre todo con PGE₁. Las concentraciones utilizadas son 10⁻⁸ M para las 3 PGS. El aumento producido es rápido, ya al minuto se observa un gran incremento con respecto al control ($p < 0.01$) y se alcanza un valor máximo a los 5 minutos mantenido incluso hasta los 20 minutos ($p < 0.001$).

Como era de esperar según la bibliografía, la PGF_{2α} no produce alteración alguna de los niveles de AMPc en las condiciones ensayadas.

SINTESIS DE AMPc

Efecto de las PGS

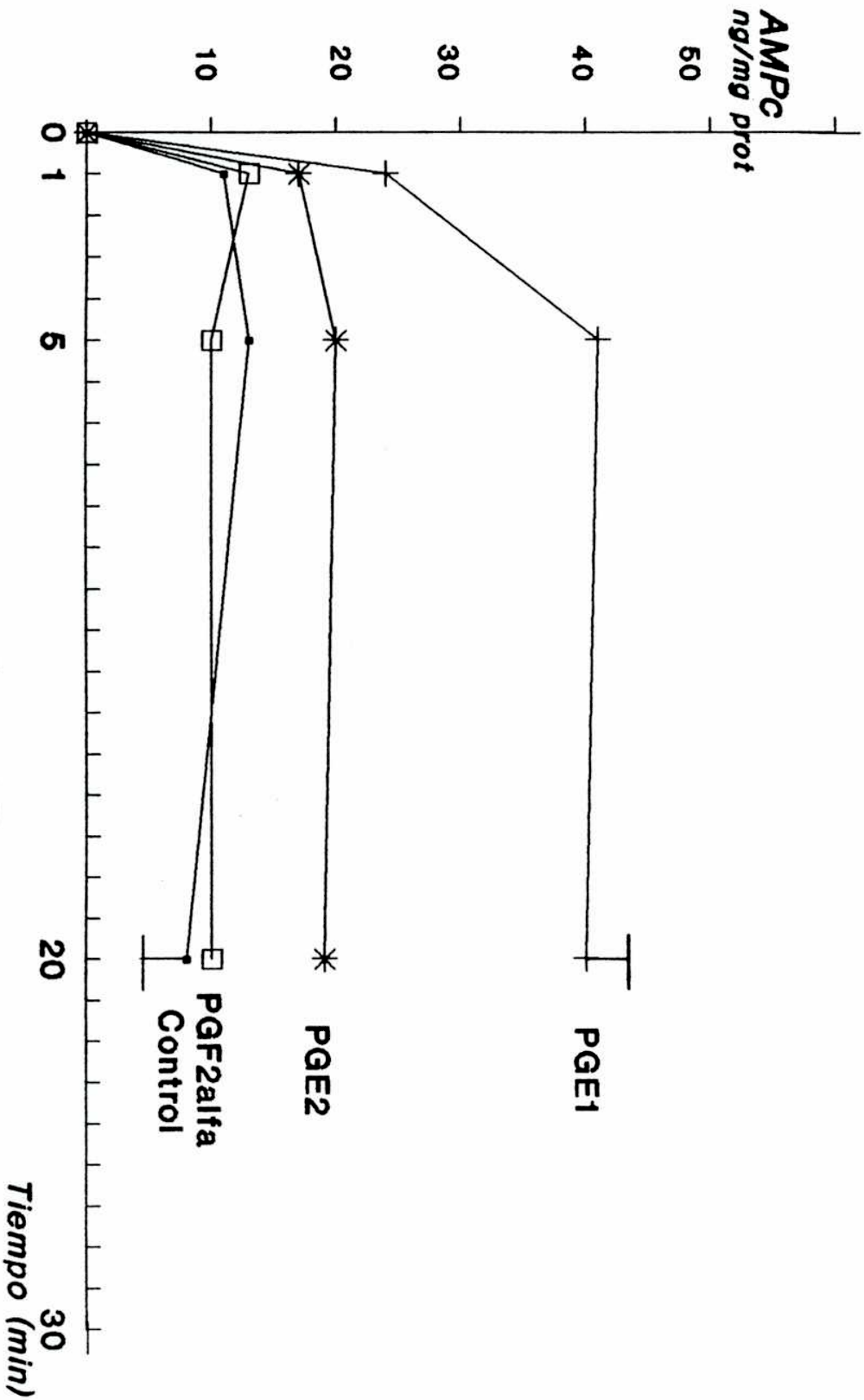


Figura III.6

b) Efecto de la morfina y su antagonista

En otra serie de experimentos se determinaron los niveles de AMPc en presencia de morfina, naloxona y ambas en las mismas concentraciones utilizadas para síntesis de PGS. Como se observa en la Figura III.6 en ningún caso se modificaron los niveles del nucleótido en los tiempos ensayados.

Para asegurarnos que el efecto de este opioide no es a través de AMPc se repitieron estos estudios con PGS y morfina.

c) Efecto de Morfina sobre el aumento producido por PGS

En la Figura III.7 se muestran los niveles de AMPc producido por la incubación de PGE₁ junto con morfina y sus respectivos controles. Se puede observar que ni la morfina ni la naloxona modifican el aumento producido por esta prostaglandina sobre la formación del nucleótido cíclico.

El mismo resultado se obtuvo cuando se repitieron los ensayos con PGE₂ (Figura III.8), con los que podemos concluir que la acción de este opioide no se produce a través de alteraciones en los niveles de AMPc celular.

SINTESIS DE AMPc Efecto de la Morfina

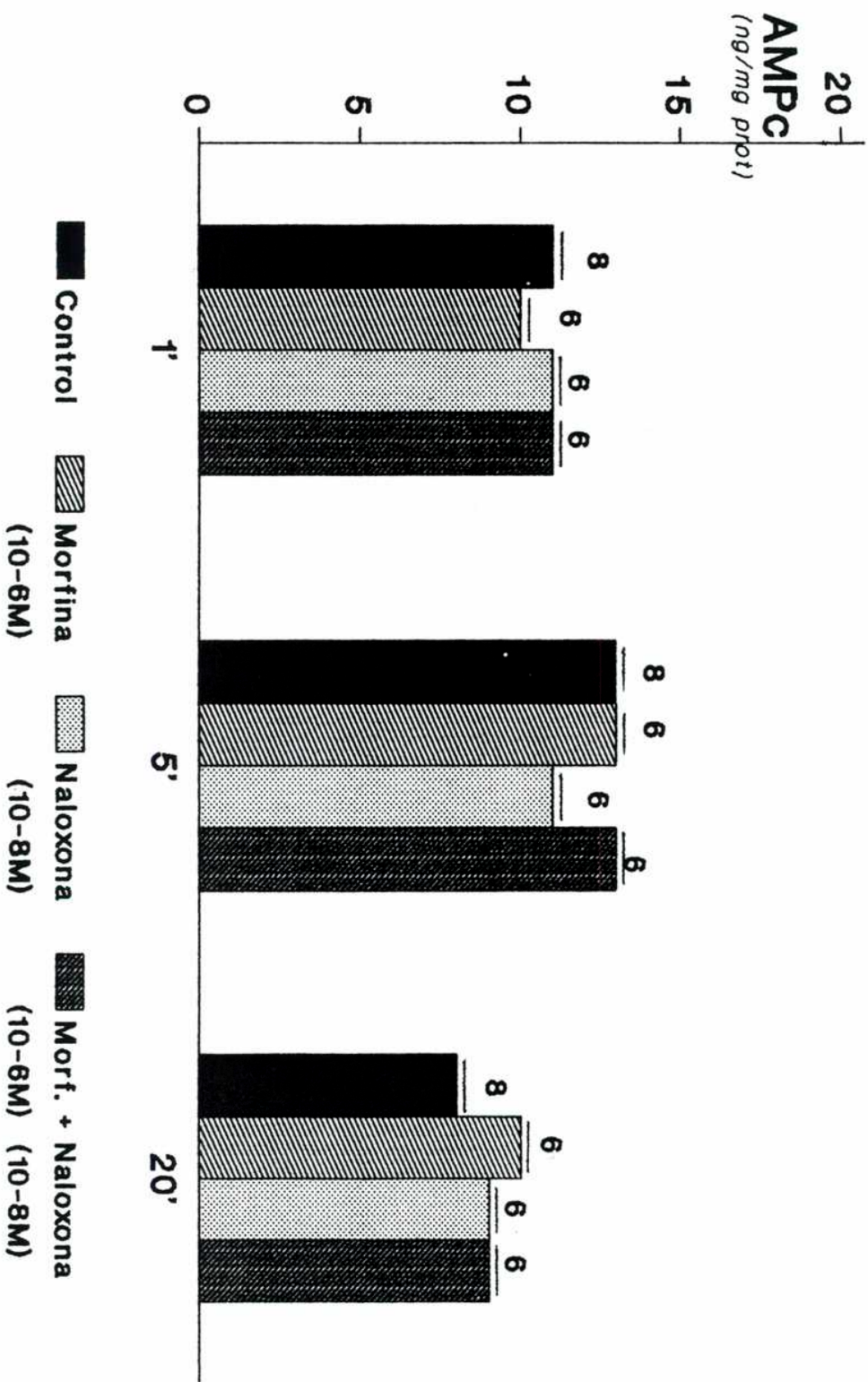


Figura III.6

SINTESIS DE AMPc Morfina + PGE1

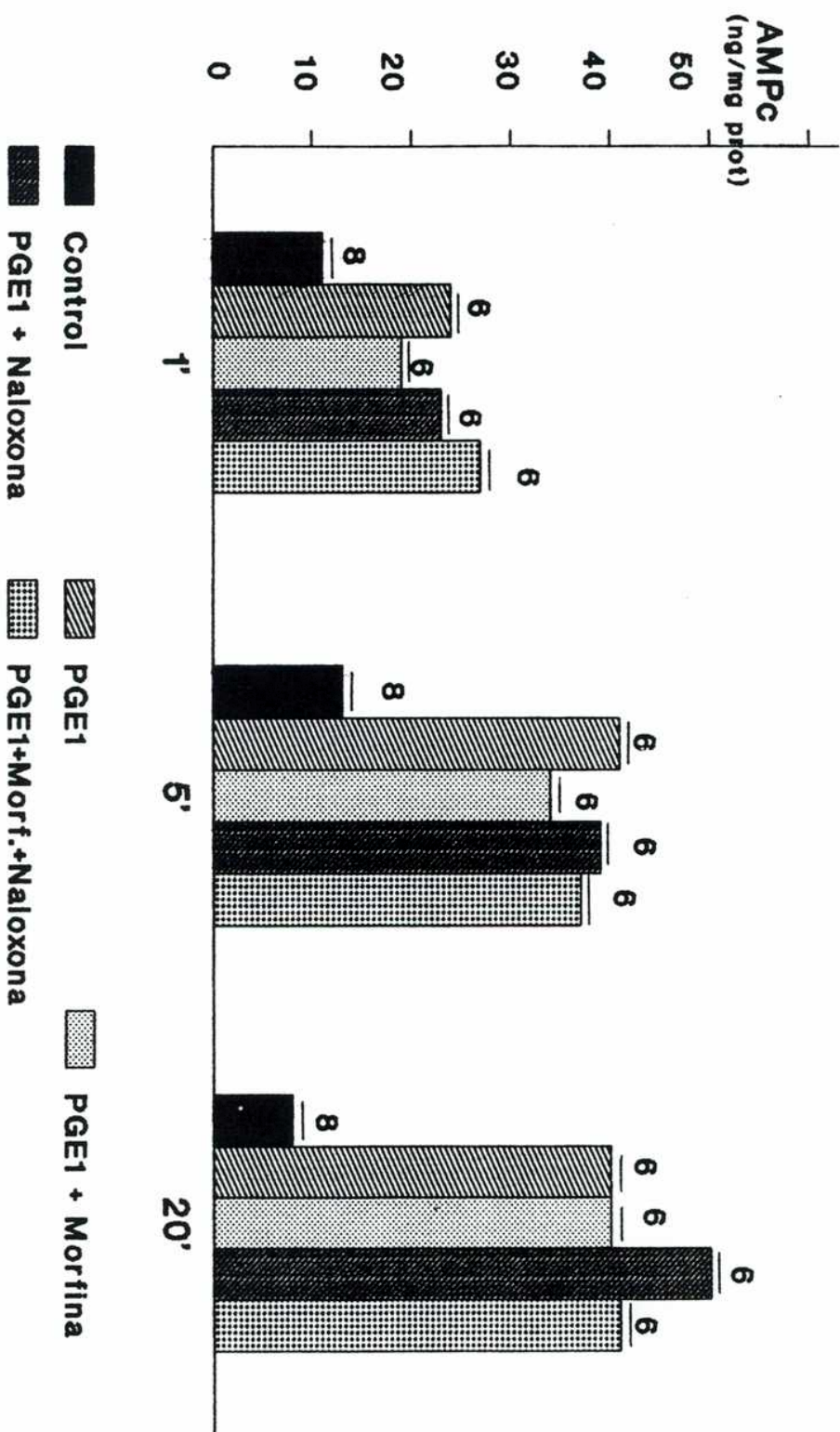


Figura III.7

SINTESIS DE AMPc Morfina + PGE2

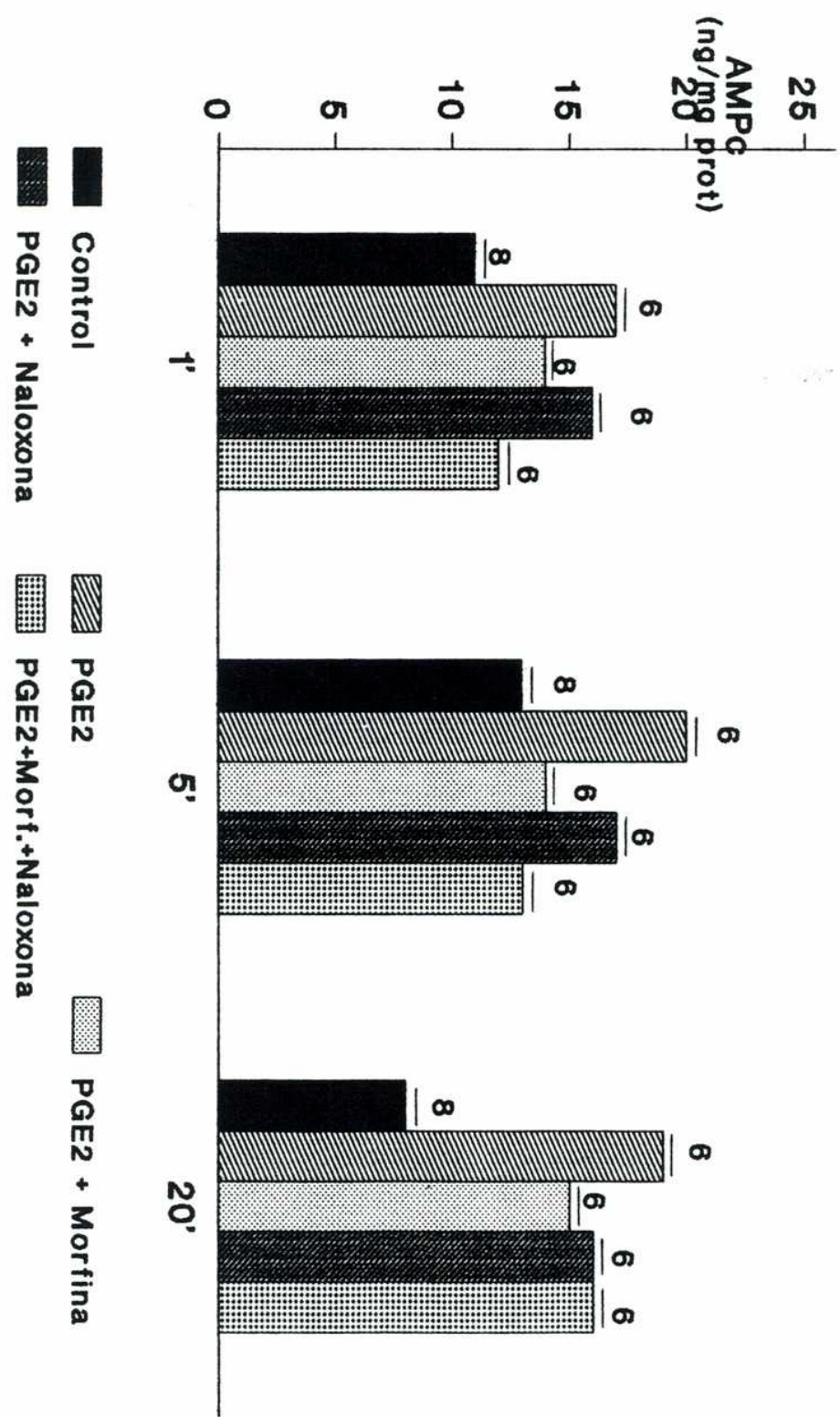


Figura III.8

III. 6. METABOLISMO DEL ACIDO ^{14}C -ARAQUIDONICO

Con el objeto de conocer el posible mecanismo por el cual la morfina ejerce un efecto inhibitorio sobre la síntesis de PGS se estudió la influencia de este opioide sobre el metabolismo del ácido araquidónico marcado.

Para ello se determinó la formación de distintos prostanoides por acción de la ciclooxigenasa a partir del ácido ^{14}C -araquidónico.

En la Figura III.9 se observan los valores obtenidos de 6-ceto-PGF $_{1\alpha}$ (como indicador de la generación de prostaciclina), PGE $_2$ y PGF $_{2\alpha}$. Se deduce de su análisis que la presencia de morfina (a la misma concentración en que inhibe la síntesis y liberación de PGS, 10^{-6} M) no altera significativamente los valores controles. Esto sugiere por lo tanto que la acción de la morfina sobre la síntesis de PGS no se ejerce a través de modificaciones en los niveles de ciclooxigenasa.

III. 7. ENTRADA DE $^{45}\text{Ca}^{++}$ EXTRACELULAR

Dada la estrecha relación entre la concentración de iones Ca^{++} intracelular y la motilidad uterina y a su vez con la síntesis de prostaglandinas, se estudió la captación de $^{45}\text{Ca}^{++}$ por el tejido frente a distintas drogas relacionadas con este fenómeno.

METABOLISMO DEL ACIDO 14C-ARAQUIDONICO

	CONTROL (%)	MORFINA (%)	NALOXONA (%)
PGF1 alfa	2.9 + 0.4	3.4 + 0.4	3.0 + 0.4
PGE2	4.2 + 0.4	4.9 + 0.5	5.2 + 0.5
PGF2 alfa	4.5 + 0.4	5.2 + 0.5	4.7 + 0.5

(% = % con respecto a la radioactividad total)

Figura III.9

III. 7. 1. Cinética de Entrada

En estos primeros experimentos se estudió la entrada de $^{45}\text{Ca}^{++}$ al tejido durante distintos tiempos de incubación para conocer su cinético de entrada y determinar en qué periodo se alcanzaba el equilibrio. Al observar la Figura III.10 encontramos que el máximo T/M se produce después de 30 minutos de incubación manteniéndose constante a tiempos superiores. A partir de estos datos, los experimentos futuros se realizaron con un periodo de incubación de 30 minutos.

III. 7. 2. Efecto de opioides

Se determinó la captación de $^{45}\text{Ca}^{++}$ por el tejido uterino en ausencia y presencia de morfina (10^{-6} M y 10^{-8} M), de naloxona (10^{-8} M) y de β -endorfina (10^{-5} M, 10^{-6} M y 10^{-8} M). La Figura III.11 resume los resultados obtenidos, observándose que tanto la morfina como la β -endorfina disminuyen significativamente la entrada del ión al tejido. Esto ocurre con todas las concentraciones utilizadas y no se observan diferencias significativas entre ellas. Con la naloxona en cambio no se detecta diferencia con respecto al control.

A pesar de resultar significativa la disminución de la entrada de $^{45}\text{Ca}^{++}$ al tejido nos pareció más importante estudiar la influencia de estos opioides en condiciones en las que la captación del Ca^{++} se encontraba estimulada. Para ello se probaron dis-

CAPTACION DE 45 Ca⁺⁺ POR EL TEJIDO

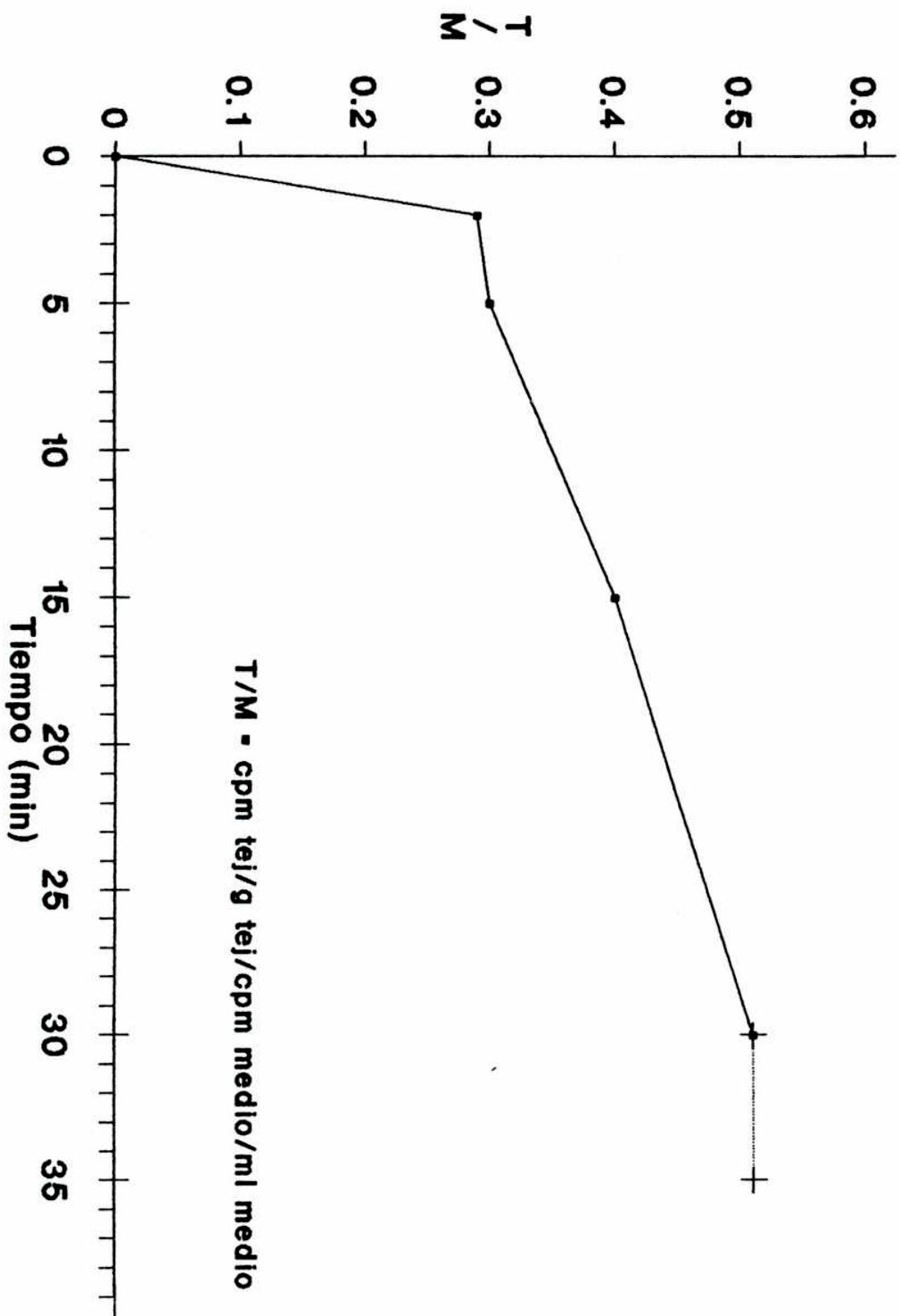


Figura III.10

CAPTACION DE $^{45}\text{Ca}^{++}$ POR EL TEJIDO

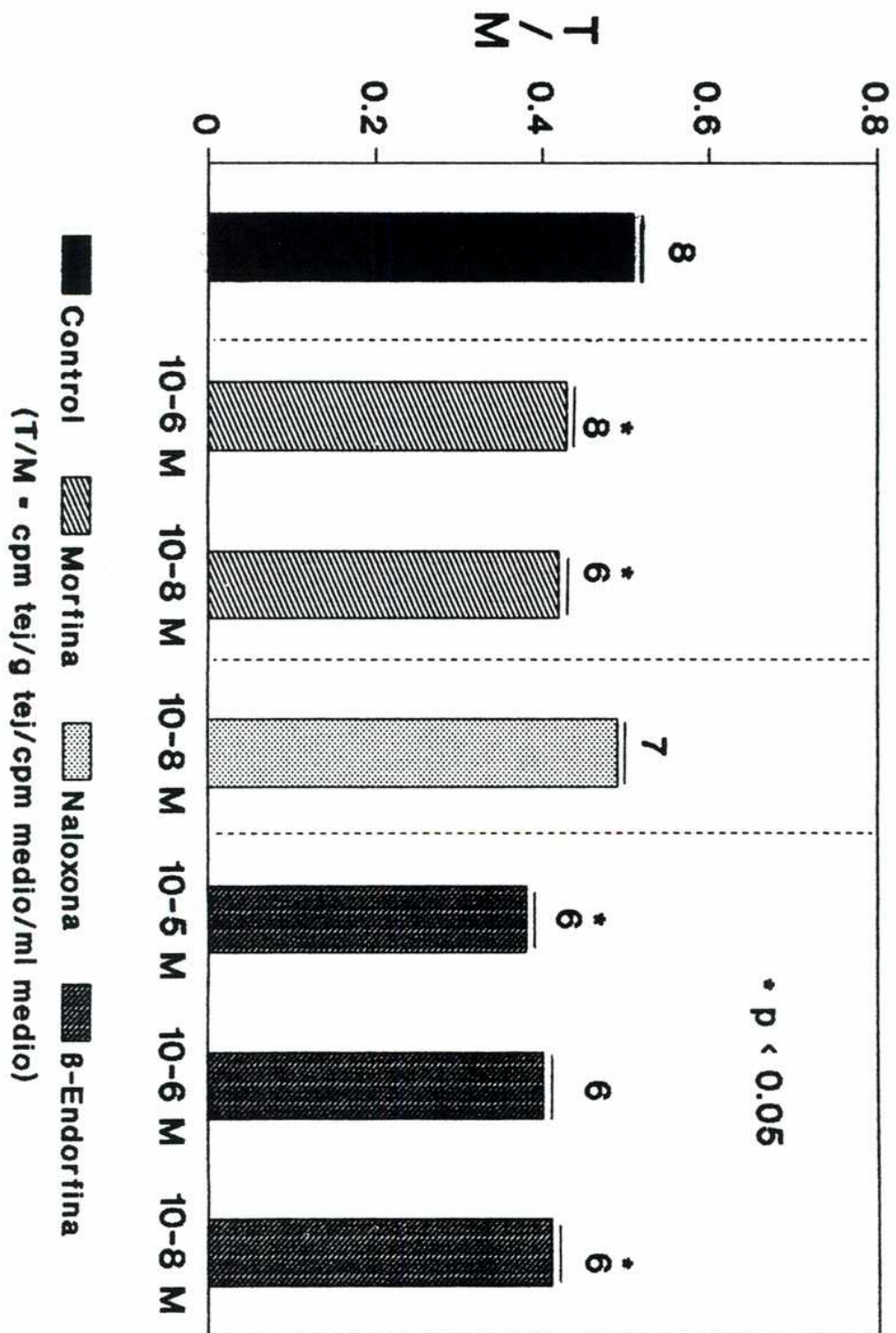


Figura III.11

tintos sistemas de activación e inhibición de entrada de calcio al tejido.

III. 7. 3. Acción de activadores

La ocitocina, hormona cuya acción fuertemente contráctil es bien conocida, fue uno de los agentes elegidos para estudiar su efecto sobre la entrada del ión calcio al tejido. La Figura III.12 muestra que esta hormona en concentración de 5 mU/ml ejerce un claro efecto estimulante (50 %) de la captación del $^{45}\text{Ca}^{++}$ extracelular con respecto al control ($p < 0.01$). Cuando se incubaron ocitocina (5 mU/ml) con morfina (10^{-6} M) juntas se obtuvieron los valores del control. Esto significa que la morfina revierte la acción producida por la mencionada hormona. Asimismo cuando se probó con el opioide endógeno, β -endorfina, se obtuvieron los mismos resultados.

Por otro lado, se repitieron las mismas determinaciones con el agente sintético A 23187, conocido ionóforo de calcio. Se observa que esta sustancia produce un aumento de la entrada del ión en aproximadamente 45 % a una concentración de 10^{-6} M ($p < 0.01$). Cuando se la incubó junto con morfina (10^{-6} M) se obtuvo nuevamente los valores del control. Resultados similares se observaron con β -endorfina (10^{-6} M).

Con estos resultados podemos concluir hasta ahora que tanto la morfina (opioide exógeno) como la β -endorfina (opioi-

ENTRADA DE 45 Ca ++ Efecto de activadores

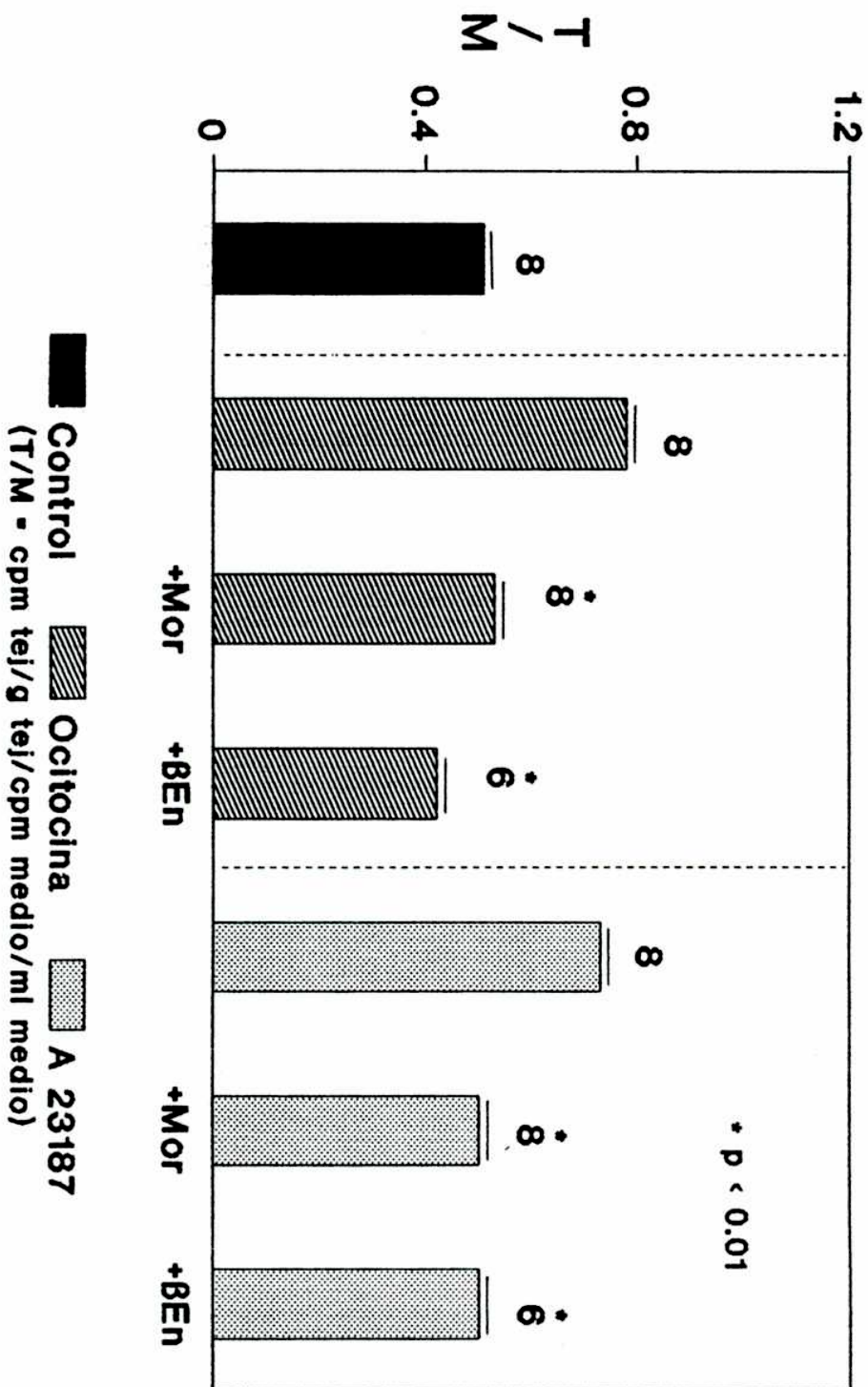


Figura III.12

de endógeno) inhibe la captación del calcio extracelular. Pero además, estos agentes son capaces de revertir el aumento de la entrada del ión producida por ocitocina y el clásico ionóforo de calcio.

III. 7. 4. Acción de bloqueantes de calcio

Dada las acciones inhibitorias ejercidas por estos opioides, se intentó en estos experimentos compararlos con los efectos producidos por verapamil y nifedipina, clásicos antagonistas o inhibidores de canales de calcio celulares.

Las concentraciones subagudas utilizadas de ambos fueron 10^{-8} M al igual que la concentración utilizada para morfina.

Se puede observar en la Figura III.13 que tanto verapamil como nifedipina producen inhibición significativa de la entrada de Ca^{++} . Cuando se ensayaron cada una de ellas en presencia de morfina no se observaron diferencias con los resultados anteriores. Esto significa que los efectos de estos inhibidores y el de la morfina no son aditivos. Se repitieron estos experimentos con concentraciones mayores (10^{-6} M para ambos tipos de agentes) pero tampoco en estos casos los efectos fueron aditivos.

ENTRADA DE 45 Ca ++

Efecto de inhibidores

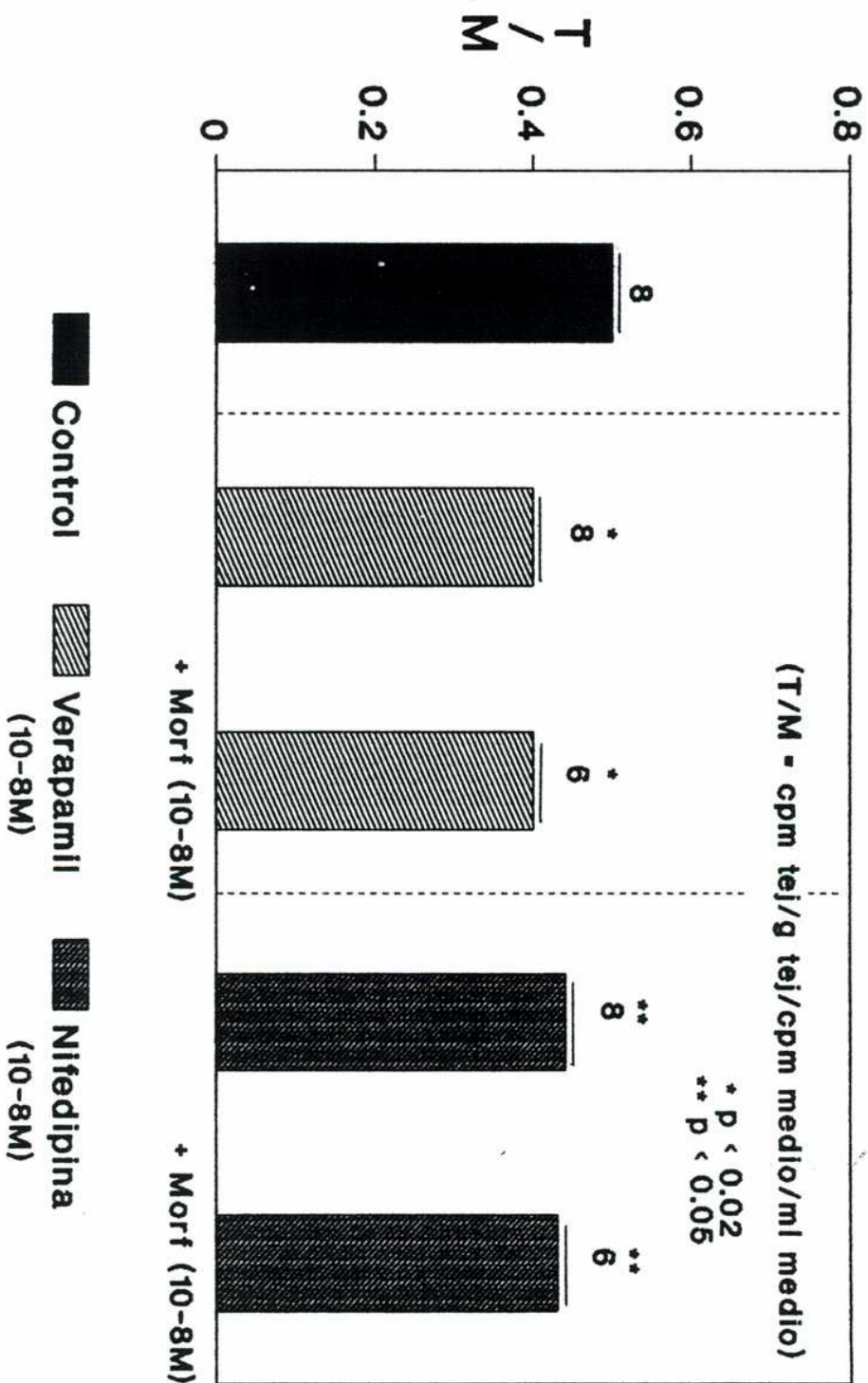


Figura III.13

III. 7. 5. Músculo despolarizado

Con el propósito de conocer el mecanismo por el cual la morfina inhibe la entrada de iones calcio, se estudió su acción con el tejido despolarizado.

Como ya se indicó en la Introducción, una de las formas de activar el músculo liso es a través de la despolarización de membrana. Esto se puede lograr exponiendo el tejido a altas concentraciones de iones potasio que producen la apertura de canales de calcio dependiente de voltaje, permitiendo así un gran influjo de iones calcio dando como respuesta una gran contracción muscular.

En estos experimentos se midió la entrada de $^{45}\text{Ca}^{++}$ al tejido en presencia de 60 mM de iones K^+ y 80 mM de iones Na^+ para mantener la osmolaridad del medio de incubación. El resto de las soluciones constituyentes del buffer de ensayo se mantuvieron idénticas. Los controles fueron realizados en el mismo buffer HEPES/ Ca^{++} utilizado en los experimentos anteriores.

La Figura III.14 resume los resultados obtenidos de estos ensayos. Se puede observar que la entrada de calcio en el tejido despolarizado es significativamente mayor que los controles. Pero, no se observaron diferencias cuando el tejido con altas concentraciones de K^+ se encontraba en presencia de morfina o β -endorfina en ninguna de las dosis utilizadas.

CAPTACION DE 45 Ca⁺⁺ POR EL TEJIDO DESPOLARIZADO

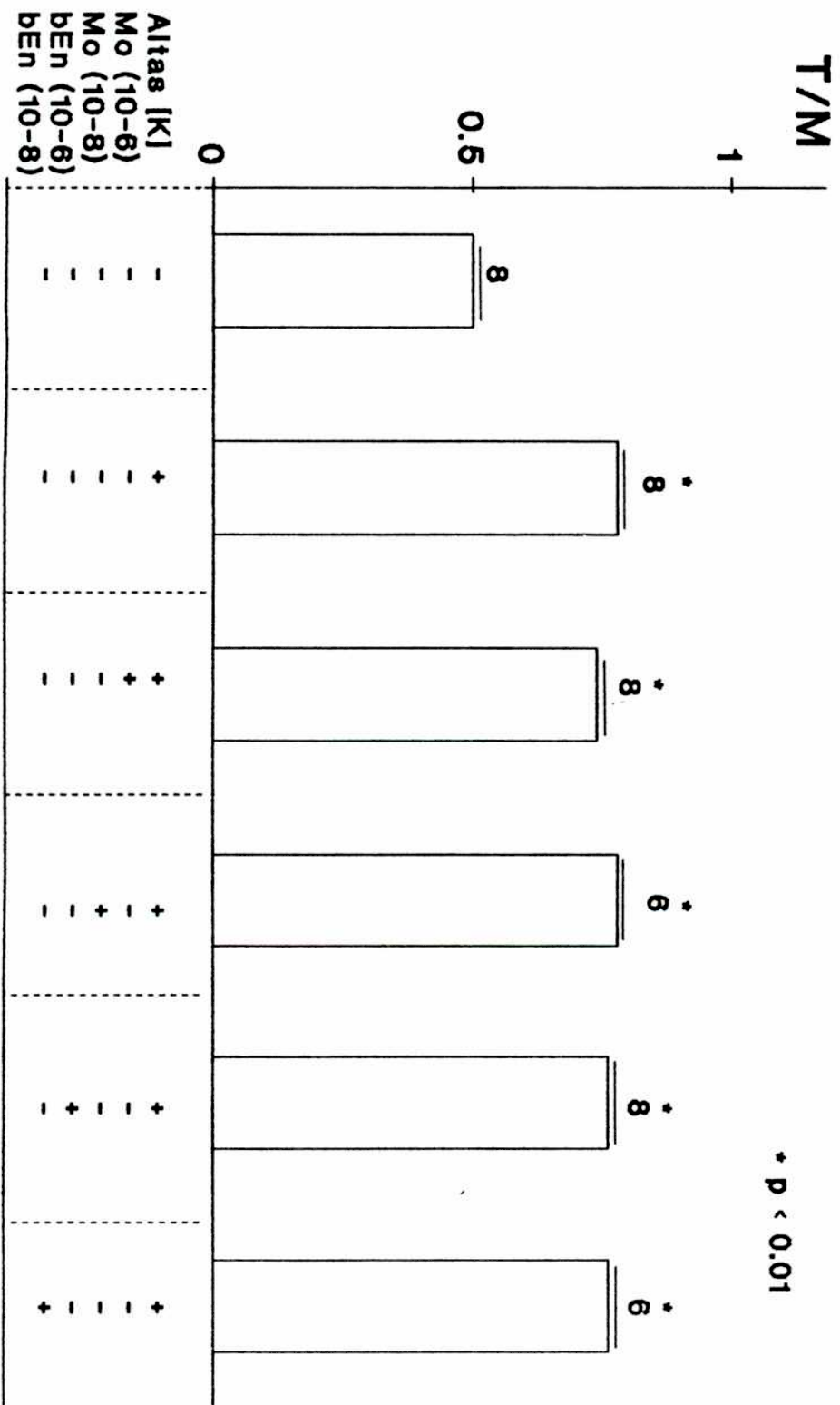


Figura III.14

Estos experimentos revelan que estos opioides no fueron capaces de revertir el efecto estimulante del músculo despolarizado.

III. 7. 6. Análisis de los resultados anteriores

Con el objeto de comparar el efecto inhibitorio que producen los opioides ensayados sobre el influjo de $^{45}\text{Ca}^{++}$ en el tejido uterino, se analizaron en paralelo los resultados anteriores con los efectos producidos por los clásicos bloqueantes de canales de calcio frente a los mismos agentes o condiciones ensayadas en los experimentos anteriores.

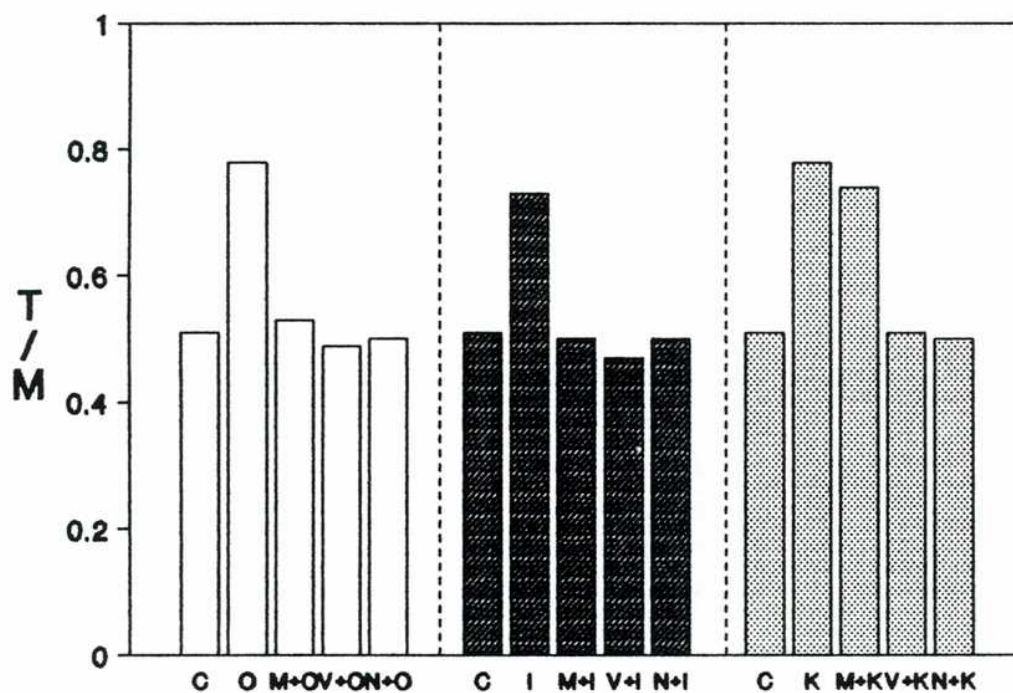
Es decir, se determinó la acción de verapamil y nifedipina sobre el influjo de calcio con ocitocina, ionóforo A 23187 y en músculo despolarizado.

La Figura III.15 resume los resultados obtenidos. En ella se puede observar que los tres sistemas activadores del tejido muscular aumentan significativamente la entrada de calcio extracelular y que tanto morfina como los dos bloqueantes elegidos disminuyen la misma.

Cuando el tejido se encontraba en presencia de ocitocina o del ionóforo junto con alguno de los inhibidores, en todos los casos revirtieron el efecto anterior.

Cuando se repitieron estos ensayos con músculo des-

CAPTACION DE 45 Ca⁺⁺ POR EL TEJIDO



C = Control

O = Ocitocina (5 uU/ml)

M = Morfina (10^{-6} M)

V = Verapamil (10^{-6} M)

N = Nifedipina (10^{-6} M)

I = A 23187 (10^{-6} M)

K = altas [K⁺] (60 mM)

T/M = cpm tej/g tej/cpm medio/ml medio

Figura III.15

polarizado, verapamil y nifedipina fueron capaces de bloquear el aumento del influjo de $^{45}\text{Ca}^{++}$ producido por altas concentraciones de potasio. En cambio la morfina no modificó el incremento ejercido por el tejido en esas condiciones.

Estos resultados nos indica que la morfina no actúa a nivel de canales de calcio dependiente de voltaje como en el caso de los otros inhibidores, ya que fueron incapaces de revertir los efectos producidos por su apertura.

En ningún caso, la inhibición producida por morfina fue aditiva a las ejercidas por los otros bloqueantes, pues no se observa mayor disminución en presencia de ambos depresores (morfina + verapamil o morfina + nifedipina).

III. 8. LIBERACION DE $^{45}\text{Ca}^{++}$ POR EL TEJIDO UTERINO

Muchos agentes estimulan la contracción muscular por dos vías: aumentan los niveles de calcio intracelular por incrementar el influjo del mismo y/o inhiben los sistemas celulares de su salida. Un ejemplo de ellos es la ocitocina.

Nos pareció interesante entonces estudiar si la morfina tenía alguna acción sobre estos sistemas de liberación de calcio celular.

Para ello se determinó el eflujo de $^{45}\text{Ca}^{++}$ del tejido uterino en ausencia y presencia de ocitocina y morfina. El grá-

fico de la Figura III.16 nos muestra los valores medidos para los distintos tratamientos. En estas curvas se graficaron los resultados obtenidos en forma acumulativa de los tiempos ensayados.

Se observa que la ocitocina inhibe significativamente la salida del ión del tejido con respecto al control. En cambio en presencia de morfina (10^{-6} M) hay mayor liberación del $^{45}\text{Ca}^{++}$ al medio de incubación. Este aumento también resultó significativo.

Podemos concluir entonces que estos opioides producen relajación muscular por dos vías diferentes e independientes. Una de ellas inhibiendo la entrada de calcio al tejido y la otra incrementando la liberación del mismo al medio de incubación.

LIBERACION DEL 45 Ca⁺⁺ DEL TEJIDO

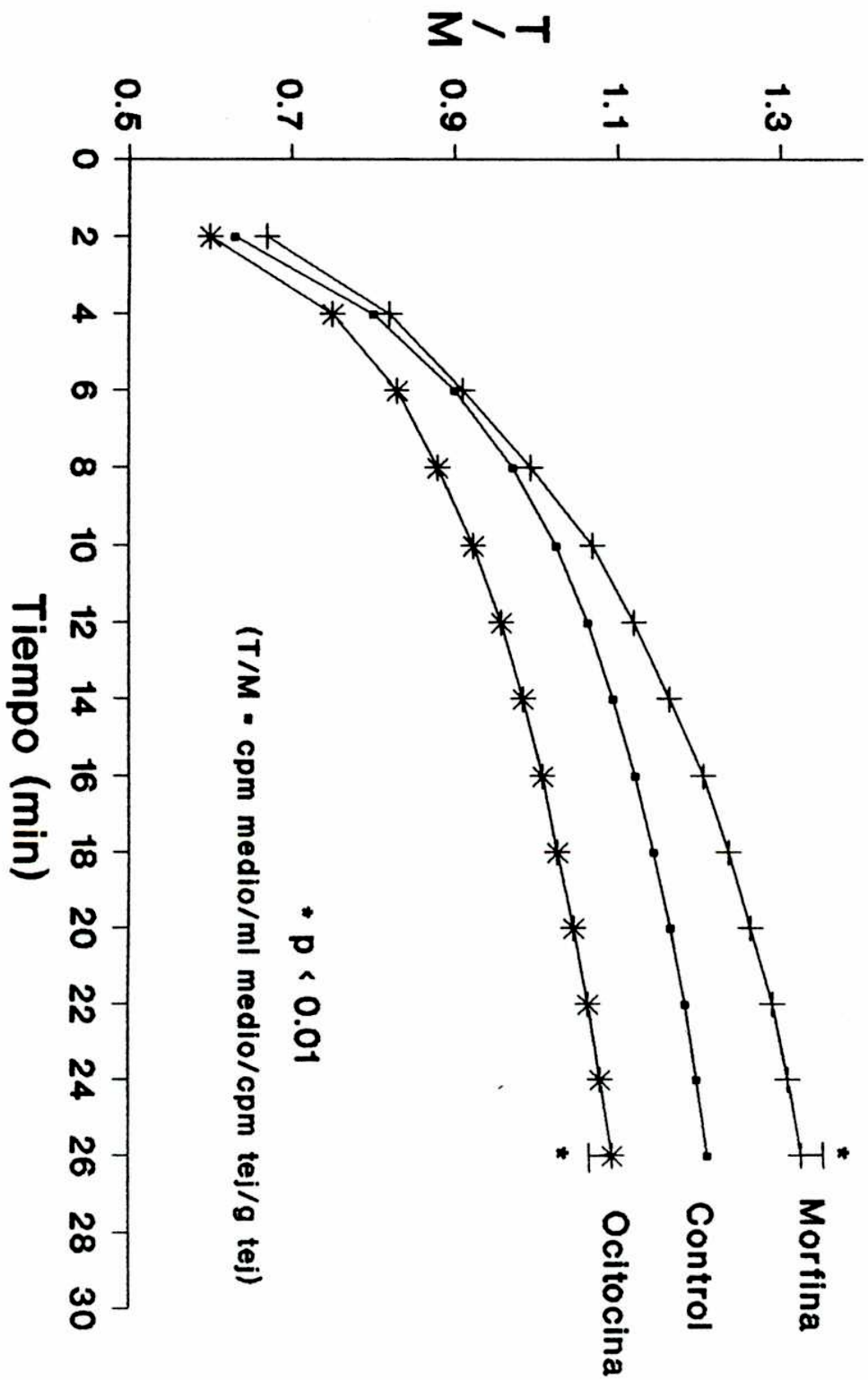


Figura III.16

DISCUSSION

Son pocos los estudios realizados sobre interacciones entre opioides y prostaglandinas en útero de rata. Por un lado se observó que los opioides incrementan la biosíntesis de prostaglandinas en homogenato de médula renal de conejo y en vescícula seminal de oveja (17, 57). Por otro lado se observó que la morfina actúa como un poderoso antagonista de PGE₁ en algunos tejidos tales como intestino de cobayo (125, 209), útero de ratón (59) y vejiga de gato (127). Asimismo se observó que la morfina actuaba como antagonista de PGE₂ en útero de rata (266).

En el laboratorio se demostró que la motilidad espontánea del útero aislado de rata en ciclo y ovariectomizada está íntimamente relacionada con la síntesis y liberación de prostaglandinas al medio de incubación (30, 50, 81, 237).

El modelo experimental utilizado en este trabajo es rata ovariectomizada por su manifiesta y estable motilidad espontánea, su gran capacidad de sintetizar prostaglandinas y su casi nula influencia de hormonas sexuales (96, 153).

En los primeros pasos de este trabajo observamos que la morfina disminuye significativamente la motilidad espontánea del útero aislado de rata ovariectomizada. En estos experimentos se utilizaron varias concentraciones del opioide y con todas ellas se observaron el mismo efecto. Cuando quisimos bloquear la acción inhibitoria de la morfina con el clásico antagonista, naloxona, nos encontramos con la sorpresa que no sólo no era capaz

de revertir su efecto, sino que la naloxona por sí sólo también producía efecto inhibitorio sobre la motilidad uterina.

Hasta no hace muchos años se consideraba que los efectos producidos por naloxona eran debido exclusivamente al bloqueo de receptores opioides, asumiendo que no tenía ninguna acción farmacológica más que la mencionada. Incluso en numerosos estudios se usaba al antagonismo ejercido por naloxona como criterio para certificar que en un determinado proceso están implicados opioides endógenos y sus receptores (211). Hoy en cambio, existen numerosos estudios que indican que la naloxona tiene diversas acciones farmacológicas no relacionadas con el bloqueo de receptores opioides (49). El antagonismo ejercido por este agente es necesario pero no suficiente como para concluir que un opioide media un determinado sistema.

La concentración elegida de naloxona para estos estudios fue 10^{-8} M dado que en las condiciones experimentales tenemos una concentración de Na^+ de 145 mM. Estos iones inhiben la unión de los agonistas opioides a sus receptores y por el contrario favorecen la unión de los antagonistas como naloxona (49, 51, 137, 225).

Dada la relación existente entre la motilidad uterina y las prostaglandinas, estos resultados nos llevaron a explorar la acción de la morfina sobre la síntesis y liberación de estos prostanoideos al medio de incubación.

Se encontró que la morfina inhibió significativamente la formación de prostaglandinas del tipo E y F. No hay demasiados estudios realizados sobre el efecto de este opioide sobre la síntesis de prostaglandinas uterinas, pero algunos autores observaron que la Met-enkefalina reduce la liberación de PGE₂ en aorta de rata (2). Mas aún, se observó que en algunos tejidos como intestino de cobayo (125, 209), en útero de rata y ratón (59, 266), vejiga de gato (127), plaquetas humanas (103), la morfina antagoniza la acción de PGE₂ o de PGE₁. Junto a estos datos, en el laboratorio se demostró que la morfina desplaza hacia la derecha la curva dosis-respuesta inotrópica positiva para PGE₂ exógena (74). Estos hallazgos están de acuerdo con resultados de Widy-Tyszkiewicz y colaboradores quienes trabajaron también en útero de rata (266).

Con estos resultados podemos postular que la acción inhibitoria de la morfina sobre la motilidad uterina de rata ovariectomizada puede ser por dos razones: un efecto antagónico sobre los receptores de PGE₂ y una acción inhibitoria sobre la síntesis de algunas prostaglandinas uterinas que regulan las contracciones del tejido.

Es interesante observar que la naloxona no sólo no antagonizó los efectos de la morfina sobre la motilidad uterina, sino que tampoco revirtió la inhibición ejercida sobre la síntesis de prostaglandinas.

La naloxona, como ya se mencionó en la introducción

es un clásico antagonista de receptores opioides del tipo μ . Hay muchos trabajos realizados con opioides donde este agente no es capaz de antagonizar la acción de opioides, como en vejiga de gato (127) y útero de ratón (59). Al parecer estos tejidos no poseen receptores del tipo μ bloqueables por naloxona y es posible que la morfina en nuestro sistema esté actuando en otro tipo de receptores opioides no sensibles a este compuesto.

De acuerdo con estos resultados y con el objeto de conocer qué tipo de receptores posee este tejido, se estudió nuevamente la motilidad espontánea del útero de rata ovariectomizada frente a agonistas específicos de diferentes tipos de receptores opioides.

Numerosos artículos confirmaron la presencia de distintas poblaciones de receptores opioides en órganos aislados. Algunos tejidos, incluso, poseen un sólo subtipo de receptor. Como ejemplo se pueden citar:

- El íleo de cobayo fue uno de los primeros tejidos donde se estudió la acción de opioides y ya en 1975, Hutchinson y colaboradores describieron la existencia de dos tipos diferentes de receptores: μ y k (121).
- En íleo de ratón, en cambio, recientemente describieron la presencia de receptores k y δ (229).

- *En recto de rata se describió la existencia de receptores del tipo μ y δ (218).*
- *En conducto deferente de ratón varios grupos de investigadores describieron dos tipos de receptores opioides: μ y δ (156, 272).*
- *En conducto deferente de conejo encontraron sólo receptores k (167, 185, 219).*
- *En conducto deferente de hamster sólo se describieron receptores del tipo δ (167, 219).*
- *En conducto deferente de rata primeramente muchos autores coincidieron en describir un sólo tipo de receptor diferente a los demás, de características especiales al que denominaron epsilon (ϵ) cuyo agonista principal es la β -endorfina (145, 212). Pero más tarde se describieron en este tejido dos tipos de receptores más: μ y δ (227, 228).*
- *En la arteria de la cola de la rata recientemente también encontraron receptores del tipo ϵ (35).*

En nuestro modelo biológico, el único agonista que fue capaz de alterar la motilidad espontánea del útero fue el péptido β -endorfina, incluso la inhibición producida fue mayor que la obtenida con morfina. Ambos, morfina y β -endorfina son agonistas de receptores μ , pero el último tiene mayor afinidad por otro receptor encontrado en varios tejidos, llamado epsilon (ϵ). Es muy

probable que el útero aislado de rata posea receptores opioides del tipo ϵ ya que ninguno de los otros agentes produjo respuesta alguna.

Otro de los factores que nos indica la existencia de este tipo de receptor es que la naloxona es un antagonista específico de receptores μ y en este sistema no revirtió ninguna de estas acciones. Estos resultados están de acuerdo con los obtenidos por Ohia y colaboradores que observaron que la naloxona no alteró los efectos inhibitorios producidos por morfina en útero aislado de rata durante las distintas fases del ciclo estral (184).

Dada la similitud de comportamiento entre la morfina y la β -endorfina (opioide endógeno) sobre la motilidad uterina, se estudió la acción del péptido sobre la síntesis y liberación de prostaglandinas al medio de incubación.

Los resultados obtenidos también fueron similares a la morfina. Este péptido inhibió la síntesis y liberación de las tres prostaglandinas estudiadas, E_1 , E_2 y $F_{2\alpha}$.

Todas estas observaciones son coincidentes con recientes publicaciones donde comprobaron la presencia de receptores opioides en membranas de útero de rata (13) y que las secreciones uterinas de endometrio contienen péptidos opioides endógenos (193, 257), sobre todo β -endorfina o su precursor (151), aunque su función aún se desconoce.

Se ha encontrado β -endorfina también en ovario y aún hoy se discute si su origen es local (ovárico, uterino, miometrial, etc.) o central; pero en recientes encuentros donde se observó que la concentración de este opioide en fluido folicular es diez a quince veces mayor que en plasma y que la LH estimula el RNAm para β -endorfina en ovario, sugiere que el ovario, como otros sitios periféricos deben contribuir al pool de la concentración de este péptido plasmática circulante (58).

Por otro lado, nuestras observaciones previas corroboran la propuesta que la motilidad espontánea de segmentos uterinos aislados de ratas ovariectomizadas está íntimamente relacionada con la síntesis y liberación de prostaglandinas por el tejido al medio de incubación (30,50). Dada las acciones inhibitorias de la morfina y β -endorfina en la síntesis de prostaglandinas uterinas, ésta podría ser otra causa por la que dichos opioides disminuyen la motilidad espontánea del útero.

Según la bibliografía muchas acciones de los opioides sobre el sistema nervioso central son ejercidas aparentemente a través de modificaciones en los niveles de nucleótidos cíclicos. Se ha descrito, por ejemplo, que la morfina inhibe el aumento de AMPc inducido por PGE₂ en homogenato de cerebro de rata (56) y que las prostaglandinas del tipo E aumentan el AMPc en miometrio aislado de rata (256). Por otro lado, sin embargo se demostró que la morfina fracasó en modificar los niveles de AMPc aumentados por

PGE en ganglio de cobayo, conejo y rata (31).

Tomando en cuenta estas discrepancias se trató de explorar el posible mecanismo de acción de estos opioides en útero de rata y dada la relación entre los nucleótidos cíclicos y los efectos contráctiles del músculo liso (ver introducción) se estudió la acción de la morfina y las prostaglandinas sobre la producción de AMPc en este sistema.

Encontramos que PGE₁ y PGE₂ aumentan significativamente los niveles de AMPc siendo más efectiva la primera, resultados concordantes con los obtenidos por Harbon y Clauser (203). La morfina sólo no modificó los niveles basales del nucleótido ni tampoco alteró la acción estimulante de las prostaglandinas sobre el AMPc.

Podemos concluir hasta acá, que la acción inhibitoria de los opioides sobre la contractilidad uterina no es ejercida a través de modificaciones de este segundo mensajero.

Dado los resultados negativos obtenidos anteriormente, se investigó sobre el mecanismo de acción por el cual la morfina inhibe la síntesis y liberación de prostaglandinas.

La formación de estos eicosanoides del tipo E y F dependen principalmente de dos enzimas, la ciclooxigenasa y la fosfolipasa A₂. Se estudió entonces la acción de la morfina sobre el metabolismo el ácido araquidónico marcado, índice de la actividad ci

clooxigenásicoa. Se observó en este caso que la misma concentración del opioide utilizada para inhibir la liberación de prostaglandinas al medio, no alteró la producción de los metabolitos del ácido araquidónico. Esto nos indica que la acción de los opioides no se ejerce a nivel de la ciclooxigenasa. Sus efectos deben ser entonces en alguna enzima anterior de la cascada del ácido araquidónico como la fosfolipasa A₂ (Figura I.19).

Muchos investigadores sugirieron un rol al ión calcio en el mecanismo de acción de las drogas opioides en el sistema nervioso central. Algunos de ellos demostraron relación entre el transporte de iones Ca⁺⁺ a través de membranas y la acción de estas sustancias en sistema nervioso central. Por ejemplo se puede mencionar que los opioides del tipo μ disminuyen el contenido de calcio en sinaptosomas e inhiben la entrada del mismo (49,203). Recientemente se observó que los agonistas κ también inhiben la entrada de iones Ca⁺⁺ en sinaptosomas de cerebro de rata (248).

Por otro lado, los antagonistas de canales de calcio pueden actuar en sitios intra y extracelulares para bloquear el movimiento del ión a través de canales de calcio dependiente de voltaje (214). Estos antagonistas (nifedipina, diltiazem, verapamil) que bloquean el influjo de estos iones, clínicamente se utilizan para tratar anginas, arritmias e hipertensión (47, 111, 274). Estos agentes potencian el efecto analgésico (19,135) y el efecto termorregulador de los opioides (20), con lo que algunos autores

postularon que las sustancias como morfina ejercen su acción en forma similar a aquellos bloqueantes.

Asimismo, se observó que inyecciones intracerebro ventricular de calcio antagonizaban los efectos de morfina, encefalinas y de β -endorfina (104) y que los quelantes de iones calcio facilitan la analgesia producida por morfina en roedores (49).

Otros autores encontraron acciones aparentemente también a través de iones calcio pero de resultados opuestos, como Szikszay y colaboradores que observaron que algunos bloqueantes de canales de calcio antagonizaban el efecto producido por morfina a ciertos parámetros fisiológicos en rata (244). Estos autores proponen que las distintas acciones de la morfina, mediadas por diferentes subtipos de receptores, que no siempre son revertidos por sus clásicos antagonistas (190), interaccionan en forma diferente con los iones calcio (243, 244).

Para averiguar si los efectos descritos de la morfina están relacionados con los iones calcio, se estudió su acción sobre la captación del ión en el tejido aislado. Para ello primeramente se determinó la cinética de entrada de $^{45}\text{Ca}^{++}$ al tejido en las condiciones descritas en materiales y métodos. Como se puede observar en la Figura III.10, a los 30 minutos se llega al equilibrio después de lo cual ya no se observa mayor influjo del ión marcado. Se tomó este tiempo y esas condiciones para los experimentos siguientes dada la reproducibilidad y estabilidad del sistema.

A continuación se estudió el efecto de los opioides morfina y β -endorfina (Figura III.11); de ocitocina y el ionóforo de calcio A 23187 (clásicos activadores de entrada de calcio a la célula) (Figura III.12) y de verapamil y nifedipina (clásicos bloqueantes de canales de calcio) (Figura III.13). Se puede observar que tanto la morfina como el péptido opioide endógeno inhiben la captación del ión en forma significativa y similar al verapamil y nifedipina. Con el objeto de determinar si los efectos de ambos tipos de drogas eran por distintas vías se los ensayó juntos pero en ningún caso se observaron diferencias (Figura III.13). Estos resultados podrían indicar que estos agentes estarían utilizando la misma vía de acción.

Cuando se estudió la entrada de $^{45}\text{Ca}^{++}$ en presencia de naloxona, que en nuestro sistema se comporta similarmente a morfina, no se observaron diferencias con respecto al control. Esto nos indica que la acción de este antagonista no es ejercida o mediada por cambios en la entrada de calcio al tejido.

La ocitocina es una hormona (péptido de 9 aminoácidos) producida por el hipotálamo y liberada desde la hipófisis posterior. Tiene efectos estimulantes sobre el músculo uterino y sobre las glándulas mamarias. Es conocido su importante papel durante el trabajo de parto y en la excreción de leche. Es ocasionalmente empleada para favorecer la secreción de leche y frecuentemente utilizada para la inducción y aceleración del parto por su conoci-

da y alta actividad contráctil. Asimismo se cree que es un importante regulador del ciclo estral, sobre todo en el proceso de luteólisis (62, 250).

Varios autores e incluso trabajos previos en nuestro laboratorio encontraron que la ocitocina actúa estimulando la producción de prostaglandinas por el útero en numerosas especies (40, 82, 86, 87, 165).

Batra demostró que el inotropismo uterino producido por ocitocina es el resultado de una pequeña liberación de Ca^{++} intracelular en miometrio de rata (14). En otros sistemas, como células renales, la ocitocina también induce aumento de concentración de iones calcio intracelular por incremento del influjo principalmente a través de canales dependientes de receptores (37) y movilización del ión de los sitios de almacenamiento intracelulares (236).

Asimismo el ionóforo A 23187 fue muy usado en estudios sobre el rol de flujos de Ca^{++} por su conocida acción de incrementar el transporte del ión a través de membranas biológicas (195).

En nuestro sistema comprobamos que tanto la ocitocina como el A 23187 aumentaron significativamente la entrada de $^{45}Ca^{++}$ (Figura III.12). Pero cuando estudiamos el efecto de los opioides sobre estos agentes observamos que inhiben la entrada del

ión incrementada por ellos, obteniéndose valores semejantes a los controles.

Tanto nifedipina como verapamil son bloqueantes de canales de entrada de calcio. Algunos autores clasificaron a estos agentes como inhibidores de calcio a través de canales dependiente de voltaje (29, 45) pero hoy se discute su mecanismo de acción ya que ninguno de los dos tienen acción específica sobre un único canal de membrana. Incluso en algunos sistemas biológicos parecen bloquear más los canales dependientes de receptores que los dependientes de voltaje (168, 213).

Con el objeto de investigar que tipos de canales de calcio posee el útero de rata, se midió la entrada del ión frente a todos estos agentes y se comprobó que claramente este tejido dispone de canales de calcio que responden a ocitocina y que tanto verapamil como nifedipina inhiben, en forma similar a los opioides, el aumento de entrada del ión producido por ocitocina y A 23187 (Figura III.15). Con estos resultados podemos concluir que la acción de estos bloqueantes no es específica sobre canales de calcio dependiente de voltaje en útero de rata. Este efecto también fue observado por Calixto quien publicó que la nifedipina antagonizaba la acción de la ocitocina y de la acetilcolina sobre útero aislado de rata (37).

Asimismo podemos concluir con estos resultados que los opioides inhiben la entrada de iones calcio al tejido, en par-

te, alterando o ejerciendo su acción a nivel de los canales operados por receptores.

En algunos casos clínicos se justifica el uso de agentes que inhiben la actividad uterina produciendo acción relajante sin cuasar otros efectos colaterales (por ejemplo en partos prematuros). Algunos autores han propuesto el uso de inhibidores de síntesis de prostaglandinas, agonistas β o incluso inhibidores del influjo de calcio como nifedipina. En nuestros experimentos este compuesto revirtió efectivamente la acción de la ocitocina, resultado coincidente con experimentos realizados por Forman y colaboradores quienes observaron que la nifedipina inhibe o anula casi totalmente la actividad miometrial inducida por ocitocina como también inhibe las contracciones estimuladas por $PGF_{2\alpha}$ post parto (79). Cabe recordar que la Ocitocina y la $PGF_{2\alpha}$ son usadas para la inducción del parto y el desarrollo de las contracciones uterinas.

Para estudiar si la acción de estos opioides es semejante a los bloqueantes clásicos de canales de calcio utilizados (verapamil y nifedipina) se determinó la entrada del ión en presencia de altas concentraciones de K^+ . En estas condiciones el músculo se encuentra despolarizado y esto hace que aumente el influjo de iones calcio del medio extracelular a través de canales dependiente de voltaje (29, 37, 171). Efectivamente cuando se midió la captación del ión por el tejido frente a verapamil o nifedipina se

observó inhibición total de esta estimulación (Figura III.15). Es decir que en útero de rata estos bloqueantes inhiben ambos tipos de estimulación, la mediada por canales dependiente de voltaje y por canales dependiente de receptores. En cambio cuando se estudió la acción de morfina y β -endorfina en músculo despolarizado ninguno de los opioides fueron capaces de bloquear el estímulo producido por altas concentraciones de iones K^+ (Figura III.15). Podemos concluir que los opioides a diferencia del verapamil o nifedipina no ejercen la acción inhibitoria de entrada de calcio a través de canales dependientes de voltaje.

Hay muchos trabajos realizados sobre contracciones inducidas por elevadas concentraciones de potasio, tanto en músculo esquelético como en músculo liso. Estas contracciones se producen por un gran influjo de iones calcio del espacio extracelular a través de canales lentos dependientes de voltaje bloqueables por numerosos agentes orgánicos (28, 84, 85, 273). Se observó que en muchos de estos sistemas los agonistas opioides son capaces de bloquear los canales de calcio dependientes de voltaje (101, 113, 262, 263, 264, 265).

Kokate y colaboradores observaron que algunos opioides inhibieron las contracciones estimuladas por potasio en músculo esquelético por bloquear estos canales pero propusieron que este efecto no era estereoespecífico además de no ser antagonizado por naloxona (134). Otros autores encontraron que ciertos opioides

a excepción de la morfina en concentraciones entre 10^{-5} M y 10^{-6} M inhibieron las contracciones inducidas por K^+ en músculo liso (íleo de cobayo) (217).

Por los resultados obtenidos la acción de la morfina y β -endorfina en nuestro sistema no son capaces de bloquear los canales sensibles a altas concentraciones de K^+ y sólo intervienen o alteran el influjo de calcio extracelular a través de canales sensibles a receptores.

Es poca la bibliografía concluyente que podemos encontrar sobre la interacción de drogas opioides y mecanismos iónicos celulares. En el sistema nervioso central se describió que los receptores μ activan la conductancia del ión potasio posiblemente a través de la adenilato ciclasa. Esto aumenta la permeabilidad del ión y una inhibición directa de la entrada de iones calcio. En cambio los opioides afines a receptores κ parecen inhibir solamente la entrada de calcio a través de canales dependientes de voltaje. Con respecto a los agonistas δ se cree que tienen una acción similar a los μ pero parecen activar también sobre la corriente de calcio dependiente de voltaje (166). No se ha descrito nada sobre la relación de los otros receptores con la corriente de calcio en sistema nervioso central y menos aún en sistema nervioso periférico. En nuestro tejido evidentemente es posible la existencia de receptores del tipo ϵ y ellos alterarían la corriente de los iones calcio a través de sus canales no dependientes de voltaje, sino de

receptores.

Uno de los puntos más interesantes de este trabajo son los resultados encontrados con β -endorfina. Este péptido se encuentra en gran concentración en las mismas células que la hormona adrenocorticotrofina (ACTH) y es secretada en paralelo con esta hormona en respuesta al stress. Además se la puede hallar en concentraciones apreciables en otros sistemas según el momento y estado fisiológico del organismo. Este péptido altera y/o interviene en muchos procesos como percepción del dolor, termorregulación, alimentación, aprendizaje, regulación cardiovascular y respiratoria y en numerosos eventos de la maduración y desarrollo sexual del organismo. Ejemplo de ellos son su posible intervención en el progreso de la pubertad, el paralelismo encontrado entre las concentraciones de β -endorfina y el ciclo menstrual, su influencia sobre la secreción de prolactina, ocitocina y LH (144, 216).

Asimismo, parece estar involucrada en el desarrollo de ciertas disfunciones reproductivas como el síndrome premenstrual (73), amenorrea (116, 181) y menopausia precoz (89, 216, 245). Pero es indudable que uno de los principales roles de la β -endorfina parece ser durante la gestación y el parto. Hoy numerosos grupos de investigadores tratan de dilucidar su función y aunque aún no se ha llegado a una conclusión, coinciden en postular que la síntesis de este péptido aumenta durante la última etapa de la gestación y durante el trabajo de parto para ejercer un impor-

tante control endócrino como regulación sobre la secreción de ocitocina, LH, LHRH, prolactina (PRL), hPRL, etc. (18, 70, 71, 146, 160, 204).

De acuerdo a lo descrito entonces, es probable que la β -endorfina de origen periférico (uterino u ovárico) esté regulando la síntesis y/o acción de estas hormonas en numerosos procesos fisiológicos como embarazo, luteólisis, ciclo sexual, madurez sexual, etc., en forma directa o lo que es más probable, por inhibición de la síntesis de prostaglandinas; hecho demostrado en este trabajo de tesis no descrito previamente en la bibliografía.

Finalmente la acción de estos opioides no se limita en disminuir la disponibilidad de iones calcio por reducir el influjo, sino que tienen también acción sobre los mecanismos de salida del ión calcio, acelerando su liberación. Esta acción es opuesta a la observada con la ocitocina quien inhibe la salida del mismo. Estos resultados coinciden con anteriores hallazgos sobre la acción de agentes como la ocitocina que tiene efecto sobre varios mecanismos de movilización de iones calcio en células de músculo liso (194).

Aunque muchas preguntas aún permanecen sin responder sobre estos opioides endógenos, tales como su mecanismo de acción o si sus variaciones son causa o efecto de algún desorden en particular; el conocimiento de sus funciones en procesos fisiológicos o patológicos pueden permitir el desarrollo de tratamientos

específicos pertinentes a la reproducción.

Así como tomó casi 40 años desde que las prostaglandinas fueran descubiertas hasta su aplicación clínica tomará algún tiempo hasta que la historia de la β -endorfina, sus funciones fisiológicas y sus aplicaciones clínicas se complete.

CONCLUSIONES

- 1) *La morfina y β -endorfina ejercen efecto relajante del músculo uterino de rata ovariectomizada por dos vías:*
 - *Inhibición de la síntesis y liberación de prostaglandinas endógenas.*
 - *Inhibición de la captación basal de iones calcio.*
- 2) *La acción por el cual estos agentes alteran la estabilidad de la motilidad uterina no sería a través de variaciones en los niveles de nucleótidos cíclicos.*
- 3) *Un mecanismo que proponemos para la acción de estos opioides es a través de modificaciones en la disponibilidad de iones calcio por el tejido uterino. Por un lado inhiben claramente el influjo de estos iones a través de canales dependientes de receptores y no de voltaje. Por otro lado aceleran la salida de Ca^{++} del tejido.*

Concluimos entonces que morfina y β -endorfina (opioide endógeno) ejercen una potente acción relajante sobre el músculo uterino disminuyendo la concentración de iones calcio en el tejido.

- 4) *La alteración ejercida sobre la síntesis y liberación de prostaglandinas por el tejido uterino resultaría también una conse*

cuencia de la disminución de la entrada de Ca^{++} , hecho que afectaría la acción de la fosfolipasa A_2 , enzima calcio dependiente.

- 5) El antagonista clásico de receptores opioides del tipo μ , naloxona, fue incapaz de revertir las acciones ejercidas por aquellos opioides, con lo que podríamos concluir que el tejido carece de receptores del tipo μ .

- 6) La morfina y la β -endorfina son los únicos opioides de todos los utilizados, capaces de producir efecto sobre el útero de rata ovariectomizada, por lo tanto podemos concluir que este tejido no posee receptores del tipo σ , δ o K . Sí podemos esperar la presencia de receptores del tipo ϵ no sensibles a naloxona.

A handwritten signature in blue ink, appearing to read "García Alvarado".A handwritten signature in blue ink, appearing to read "Muller".

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Abdel-Halim, M. S.; Hamberg, M.; Sjöquist, B. and Angard, E.
Prostaglandins, 14:633 (1977)
2. Abraham, G. J. S.; Dhume, V. G.; Diniz, R. S. and Pereira, J. S.
Pharm. Res. Comm., 12:131 (1980)
3. Acevedo, C. G. and Contreras, E.
Cell. Mol. Biol., 30:239 (1984)
4. Adelstein, R. S. and Eisenberg, E.
Ann. Rev. Biochem., 49:921 (1980)
5. Adham, N. and Schenk, E.
Am. J. Obstet. Gynecol., 104:508 (1969)
6. Ahern, D. G. and Downing, D. T.
Biochim. Biophys. Acts., 210:456 (1970)
7. Ahmed, M.; Randall, L.; Cavinato, A. G.; Desiderio, D. M.; Fridland, G. and Sibai, B.
American Journal of Obstetrics and Gynecology, 155 (4):
703 (1986)
8. Aiken, J. W.
En: Prostaglandin Synthetase Inhibitors, editado por H. Robinson and J. R. Vane, Raven Press, N. Y. pp 289 (1974)
9. Akil, H.; Watson, S. J.; Young, E.; Lewis, M! E.; Khachaturian, H. and Walker, J. M.
Ann. Rev. Neurosci., 7:223 (1984)

10. Aksoy, M. D.; Mras, S.; Kamm, K. E. and Murphy, A.
Am. J. Physiol., 245:255 (1983)

11. Anggard, E.; Larsson, C. and Samuelsson, B.
Acta Physiol. Scand., 81:396 (1970)

12. Armströng, D. T. and Grinwich, D. L.
Prostaglandins, 1:21 (1972)

13. Baraldi, M.; Giarre', G.; Santi, M.; Facchinetti, F.;
Petraglia, F. and Genazzani, A. R.
Peptides, 6:971 (1985)

14. Batra, S.
Eur. J. Pharmacol., 120:57 (1985)

15. Batra, S. and Sjögren, C.
Life Science, 32:315 (1983)

16. Behrman, H. R. and Hichens, M.
Prostaglandins, 12:83 (1976)

17. Bekemeier, H.; Giessler, A. J. and Vogel, E.
Pharmacological Research Communications, 9 (6):587 (1977)

18. Belisle, S.; Petit, A.; Gallo-Payet, N.; Bellabarba, D.;
Lehoux, J-G. and Lemaire, S.
Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 66 (2):
283 (1988)

19. Ben-Sreti, M. M.; Gonzalez, J. P. and Sewell, R. D.
Eur. J. Pharmacol., 90:385 (1983)

20. Benedek, G. and Szikszay, M.
Pharmacol. Res. Commun., 16:1009 (1984)

21. Bergström, S.; Carlson, L. and Weeks, J.
Pharmac. Rev., 20:1 (1968)

22. Berridge, J. M. and Irvine, R. F.
Nature, 312:315 (1984)

23. Blackwell, G. J.; Carnuccio, R.; Di Rosa, M.; Flower, R. J.;
Ivanyi, J.; Langham, C. S. J.; Parente, L; Persico, P. and
Wood, J.
Adv. Prostaglandin, Thromboxane, Leukotrienes Res., 11:65
(1983)

24. Blackwell, G. J.; Carnuccio, R.; Di Rosa, M.; Flower, R. J.;
Parente, L. and Persico, P.
Nature, 287:147 (1980)

25. Blattner, R.; Classen, M. G.; Dehnert, H. and Döring, H. J.
Experiments on isolated smooth muscle preparations
HSE Biological Measuring Techniques III (1978)

26. Bloom, F. E.
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 23:151 (1983)

27. Bloom, W. and Fawcett, D. W.
Tratado de Histología (Editorial Labor), 6ta. ed. (1973)

28. Bolger, G. T.; Gengo, P. J.; Klockowski, R.; Luchowski, E.; Siegel, H.; Janis, R. A.; Triggle, A. M. and Triggle, D. J.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 225:291 (1983)

29. Bolton, T. B.
Physiol. Rev., 59:606 (1979)

30. Bonacossa, A.; Sterin-Speziale, N.; Gimeno, M. F. de, and Gimeno, A. L.
Prostaglandins, 23:213 (1982)

31. Borasio, P. G.; Biondi, C.; Capuzzo, A. and Ferretti, M. A.
Neuroscience Letters, 66:7 (1986)

32. Bozler, E.
Biol. Symposia, 3:95 (1941)

33. Brenner, R. R.
Acta Physiol. Latinoam., 26:453 (1976)

34. Brown, P. A.; Albano, J.; Elkins, R.; Sgherzi, S and Tampion, W.
Biochem., J., 121:561 (1971)

35. Bucher, B.; Stoclet, J-C. and Illes, P.
Eur. J. of Pharmacology, 147:305 (1988)

36. Cajander, S. and Bjersing, L.
Cell. Tiss. Res., 164:279 (1975)

37. Calixto, J. B.
Gen. Pharmacol., 18 (3):237 (1987)

38. Campbell, C.; Phillips, O. C. and Frazier, T. M.
Obstet. Gynecol., 17:714 (1961)

39. Campbell, M. D.; Deth, R. C.; Payne, R. A. and Honeyman,
T. W.
Eur. J. Pharmacol., 116:129 (1985)

40. Campos, G. A.; Liggins, G. C. and Seamark, R. F.
Prostaglandins, 20:297 (1980)

41. Cardinali, D. P.; Ritta, M. N.; Speziale, N. S. and Gimeno,
M. F. de
Prostaglandins, 18:577 (1979)

42. Carnuccio, R.; Di Rosa, M. and Persico, P.
Br. J. Pharmacol., 68:14 (1980)

43. Casnelli, J. E.; Ives, H. E.; Jommieson, J. D. and
Greengard, P.
J. Biol. Chem., 255:3770 (1980)

44. Castracane, V. D. and Jordan, V. C.
Biol. Reprod., 13:587 (1975)

45. Cauvin, C.; Loutzenhiser, R. and Van Breemen, C.
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 23:373 (1983)

46. Cemerikid, B.; Genbacev, O.; Sulovid, V. and Bezconsfield, R.
Life Science, 42:1773 (1988)
47. Chaffman, M. and Brogden, R. N.
Drugs, 29:387 (1985)
48. Chang, K. J. and Cuatrecasas, P.
Fed. Proc., 40:2729 (1981)
49. Chapman, D. B. and Way, E. L.
Ann. Rev. Phamacol. Toxicol., 20:553 (1980)
50. Chaud, M.; Gonzalez, E.; Franchi, A.; Gimeno, M. F. and Gimeno, A. L.
Prost., Leuk. and Medicine, 15:35 (1984)
51. Cheney, B. V. and Lahti, R. A.
Life Science, 40:1071 (1987)
52. Cheung, W. Y.
Scientific Amer., 246 (6):48 (1982)
53. Christ-Hazelhof, E. and Nugteren, D. H.
Prostaglandins, 22:739 (1961)
54. Cocceani, F.; Dreifuss, J. J.; Puglisi, L. and Wolfe, L. S.
En: Prostaglandins, Peptides and Amines, editado por P. Mantegazza and E. W. Horton, London Academic., pp 73 (1973)

55. Coleman, R. A.; Humphrey, P. P. A.; Kennedy, I. and Lumley, P.
Trends. Pharmacol. Sci., 5:303 (1984)
56. Collier, H. O. J. and Roy, A. C.
Nature, 248:24 (1974)
57. Collier, H. O. J.; Mc Donald-Gibson, W. J. and Saeed, S. A.
Br. J. Pharmacol., 58:193 (1976)
58. Comitini, G.; Monaco, M.; Petraglia, F.; Volpe, A.;
Facchinetti, F. and Genazzani, A. R.
Fertility and Sterility, 51 (1):46 (1989)
59. Contreras, E.; Tamayo, L. and Juica, S.
Arch. Int. Pharmacodyn., 255:39 (1982)
60. Cupo, A.; Menezo, Y. and Bueno, A. L.
Acta Neurológica Scandinave, 75:237 (1987)
61. Dembinska-Kiec, A.; Grodzinska, L. and Piotrowicz, J.
Pol. J. Pharm. Pharmacol., 16:79 (1974)
62. Dennefors, B.; Hamberger, L.; Hillensjö, T.; Holmes, P.;
Janson, P. O.; Magnusson, C. and Nilsson, L.
Acta Obstet. Gynecol. Scand. Suppl., 113:31 (1983)
63. Dokhac, L.; Albis, A. D.; Janmot, C. and Harbon, S.
Journal of Muscle Research and Cell Motility, 7:259 (1986)

64. Drummond, G. I.
Adv. Cyclic Nucleotide Res., 15:373 (1983)

65. Duggan, A. W. and North, R. A.
Pharmacol. Rev., 35:219 (1983)

66. Dusting, G. J.; Moncada, S. and Vane, J. R.
Prostaglandins, 13:3 (1977)

67. Eckenfels, A. and Vane, J. R.
Br. J. Pharmacol., 45:451 (1972)

68. England, P. J.
British Medical Bulletin, 42 (4):375 (1986)

69. Espey, L. L.
Biol. Reprod., 10:216 (1974)

70. Evans, R. G.; Olley, J. E.; Rice, G. E. and Abrahams, J. M.
Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 16:
169 (1989)

71. Fabri, A.; Jannini, E. A.; Gnessi, L.; Ulisse, S.;
Moretti, C. and Isidori, A.
J. Steroid Biochem., 32 (18):145 (1989)

72. Fabri, A.; Knox, G.; Buczko, E. and Dufau, M.
Endocrinology, 122 (2):749 (1988)

73. Facchinetti, F.; Martignoni, E.; Sola, D.; Petraglia, F.; Nappi, G.; Genazzani, A. R.
J. Reprod. Med., 33:633 (1988)
74. Faletti, A.; Chaud, M.; Gimeno, M. and Gimeno A.
Prost., Leuk. and Ess. Fatty Acids, 34:147 (1988)
75. Ferin, M.; Vanvugt, D. and Wardlaw, S.
Recent. Prog. Horm. Res., 40:441 (1984)
76. Flower, R. J. and Blackwell, G. J.
Biochem. Pharmacol., 25:285 (1976)
77. Flower, R. J. and Blackwell, G. J.
Nature, 278:456 (1979)
78. Flower, R. J. and Vane, J. R.
Nature, 240:410 (1972)
79. Forman, A.; Grandrup, F.; Andersson, K. E. and Ulmsten, U.
Am. J. Obstet. Gynecol., 144 (6):665 (1982)
80. Fox, A. W.; Abel, P. W. and Minneman, K. P.
Eur. J. Pharmacol., 116:145 (1985)
81. Franchi, A. M.; Chaud, M.; Borda, E. S.; Gimeno, M. F. de;
Lazzari, M. A. and Gimeno, A. L.
Prostaglandins, 22:637 (1981)

82. Franchi, A. M.; Chaud, M.; Faletti, A.; Bassi, D.; Gimeno, M. F. and Gimeno, A. L.
Prost., Leuk. and Ess. Fatty Acids, 40:203 (1990)
83. Franchi, A. M.; Gimeno, M.; Cardinali, D. and Vacca, I.
Brain Research, 405:384 (1987)
84. Frank, G. B.
Can. J. Physiol. Pharmacol., 62:374 (1984)
85. Frank, G. B.
Pharmacol. Exp. Ther., 236:505 (1986)
86. Fuchs, A. R.; Fuchs, F.; Husslein, P. and Soloff, M. S.
En: Scientific Abstracts, 28 Annual Meeting of the Society
for Gynecologic Investigation, St. Louis, Missouri, March,
18-21, pp 136 (Abst. 231) (1981)
87. Fuchs, A. R.; Husslein, P. and Fuchs, F.
Am. J. of Obstetrics and Gynecology, 141 (6):694 (1981)
88. Ganström, E. and Samuelsson, B.
J. Biol. Chem., 246:5254 (1971)
89. Genazzani, A. R.; Petraglia, F.; Facchinetti, F.; Facchini,
V.; Volpe, A. and Alessandrini, G.
Am. J. Obstet. Gynecol., 149:775 (1984)
90. Giles, T. D.; Sander, G. E.; Rice, J. C.; Quiroz, A. C.
Peptides, 8:609 (1987)

91. Gilman, A. G.
Ann. Rev. Biochem., 56:615 (1987)

92. Gilmore, M. F.; Vane, J. R. and Willie, J. M.
Nature (London), 218:1135 (1968)

93. Gimeno, A. L.
En: Prostaglandinas y Compuestos relacionados, editado por
El Ateneo, Buenos Aires (1989)

94. Gimeno, A. L.; Gimeno, M. F. de; Goldraij, A. and Sterin-
Speziale, N.
Reproducción, 3:235 (1976)

95. Gimeno, M. F. de; Sterin-Speziale, N.; Landa, A. L.;
Bonacossa, A. and Gimeno, A. L.
Prostaglandins, 17:673 (1979)

96. Gimeno, M.; Bedners, A. S.; Goldraij, A. and Gimeno, A. L.
Acta Physiol. Latinoam., 20:275 (1970)

97. Glavin, G. B.; Kiernan, K.; Hnatowich, M. R. and Labelle,
F. S.
European J. of Pharmacology, 124:121 (1986)

98. Goldstein, A. and James, I. F.
TIPS Reviews, 5:503 (1984)

99. Greaves, M. W. and Mc. Donald-Gibson, W. J.
Brit. Med. J., 3:527 (1972)

100. Grinwich, D. L.; Kennedy, T. G. and Armstrong, D. T.
Prostaglandins, 1:89 (1972)

101. Gross, R. A. and Mac Donald, R. L.
Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 84:5469 (1987)

102. Gryglewski, R. J.; Korbut, R. and Ocetkiewicz, A.
Nature, 273:765 (1978)

103. Gryglewski, R. J.; Szczeklik, A. and Bleron, K.
Nature, 256:56 (1975)

104. Guerrero-Muñoz, F.; Adames, C.; Fearon, Z. and Way, E. L.
Eur. J. Pharmacol., 76:417 (1981)

105. Gurbide, E.; Markiewicz, L.; Schatz, F. and Hirata, F.
J. of Clinical Endocrinology and Metabol., 63:162 (1986)

106. Ham, A. W.
Tratado de Histologia (Editorial Interamericana) México
(1970)

107. Hamberg, M. and Samuelsson, B.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 70:899 (1973)

108. Hamberg, M.; Svensson, J. and Samuelsson, B.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71:3400 (1974)

109. Hashimoto, T.; Mirata, M.; Itoh, T.; Kanmura, Y. and Kuriyama, H.
J. Physiol. (London), 370:605 (1986)
110. Haslam, R. and Mc. Clenaghan, M. D.
Proc. VII Int. Cong. Thromb. Hem. pp 117 (1979)
111. Henry, P. D.
Am. J. Cardiol., 46:1047 (1980)
112. Herbaczynska-Cedro, K. and Vane, J. R.
Circ. Res., 33:428 (1973)
113. Heschler, J.; Rosenthal, W.; Trautwein, W. and Schultz, G.
Nature, (London), 325:445 (1987)
114. Hoar, W. S.
Fisiología General y Comparada, ed. Omega S. A., España
(1978)
115. Hofmann, F.
J. of Hypertension, 3:53 (1985)
116. Hohtari, H.; Elovainio, R.; Salminen, K. and Laatikainen, T.
Fertil. Steril., 50:233 (1988)
117. Horton, E. and Poyser, N. L.
Physiol. Rev., 56:595 (1976)

118. Hruby, V. and Gehrig, C. A.
Medicinal Research Reviews, 9 (3):343 (1989)
119. Hsin-Hsiung, T. and Hollander, C. S.
En: Supplementum to Advances in the Biosciences, ed. por S
Bergstöm and S. Bernhard, v 9 pp 5, Intern Confer on PGS,
Vienna, Pergamon Press, Vieweg, Braunschweig (1973)
120. Hurwitz, L.
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 26:225 (1986)
121. Hutchinson, M. and Kosterlitz, H. W.
Brit. J. Pharmacol., 55:541 (1975)
122. Illes, P.; Bettermann, R.; Brod, I. and Bucher, B.
Naunyn-Schmiedeberg's Arch. Pharmacol., 335:420 (1987)
123. Itoh, T.; Kuriyama, H. and Suzuri, T.
J. Physiol. (London), 321:513 (1981)
124. Jaffe, J. H. and Martins, W. R.
En: The Pharmacological Basis of Therapeutics, 7th, edn,
editado por A. G. Gilman; L. S. Goodman; T. W. Rall and F.
Murad, Macmillan, New York, pp 491 (1985)
125. Jaques, R.
S. Experientia, 25:1059 (1969)
126. Jessup., S. J.; Mc Donald-Gibson, W. J.; Ramwell, P. W.
and Shaw, J. E.
Fed. Proc., 29:387 (Abstract) (1970)

127. Jivegard, L. and Svanvik, J.
Acta Physiol. Scand., 127:275 (1986)
128. Jmari, K.; Mironneau, C. and Mironneau, J.
J. Physiol., Paris, 81:168 (1986)
129. Johnson, M. and Ramwell, P. W.
Prostaglandins, 3:703 (1973)
130. Johnson, R. A.; Morton, D. R.; Kinner, J. H.; Gorman, R.;
Mc Guire, J. C.; Sun, F. F.; Whittaker, N.; Bunting, S.;
Salmon, J.; Moncada, S. and Vane, J.R.
Prostaglandins, 12:915 (1976)
131. Kaibuchi, K.; Kikkawa, U.; Takai, Y. and Nishizuka, Y.
En: Enzyme regulation by reversible phosphorylation
further advances, editado por P. Cohen, Amsterdam, Elsevier
pp 81 (1984)
132. Kamm, K. E. and Stull, J. T.
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 25:593 (1985)
133. Karaki, H. and Weiss, G. B.
Life Science, 42:111 (1988)
134. Kokate, T. G. and Frank, G.
Can. J. Physiol. Pharmacol., 67:435 (1989)
135. Konno, F. and Takayanagi, L.
J. Pharmacol., 33:619 (1983)

136. Koos, F. D. and Clark, M. R.
Endocrinology, 111:1513 (1982)
137. Kosterlitz, H. W.; Paterson, S. J. and Robson, L. E.
Journal of Receptor Research, 8 (1-4):363 (1988)
138. Kuehl Jr., F. A.
Prostaglandins, 5:325 (1974)
139. Kuehl, R. A.; Cirillo, V. J.; Ham, E. A. and Humes, J. L.
En: Advances in Biosciences, v 9, Intern. Conference on
PGS, editado por S. Bergström and S. Bernhard, Pergamon
Press, Vieweg, Braunschweig., pp 155 (1973)
140. Kurzrok, R. and Lieb, C. C.
Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 26:268 (1930)
141. Laatikainen, T.; Saijonmaa, O.; Salminen, K. and
Wahlström, T.
Placenta, 8:381 (1987)
142. Lands, W. E. M., Le Tellier, P. R.; Rome, L. H. and
Vanderhoek, J. Y.
Fed. Proc., 31:476 A (1972)
143. Le Duc, L. E.; Wyche, A. A.; Sprecher, H.; Sankareppe, S. K.
and Needleman, P.
Mol. Pharmacol., 19:242 (1981)
144. Leadem, C. A. and Kalra, S. P.
Endocrinology, 117 (2):684 (1985)

145. Lemaire, S.; Magnan, J. and Regoli, D.
Brit. J. Pharmacol., 64:327 (1978)
146. Leng, G.; Mansfield, S.; Bicknell, R. J.; Blackburn, R. E.;
Brown, D.; Chapman, C.; Dyer, R. G.; Hollingsworth, S.;
Shibuki, K.; Yates, J. O. and Way, S.
J. Reprod. Fert., 84:345 (1988)
147. Leng, G.; Mansfield, S.; Bicknell, R. J.; Brown, D.;
Chapman, C.; Hellingsworth, S.; Ingram, C. D.; Marsh, M.
I. C.; Yates, J. O. and Dyer, R. G.
J. Endocrinol., 114:247 (1987)
148. Leng, G.; Mansfield, S.; Bicknell, R. J.; Dean, D. P.;
Ingram, C. D.; Marsh, M. I. C.; Yates, J. O. and Dyer, R.
J. Endocrinol., 106:219 (1985)
149. Levine, L.
Biochem. Biophys. Res. Comm., 47:888 (1972)
150. Levine, L. and Gutierrez-Cernosek, R. M.
Prostaglandins, 3:785 (1973)
151. Li, W. I.; Chen, C. L.; Hansen, P. J. and Bazer, F. W.
Endocrinology, 121 (3):1111 (1987)
152. Lim, A. T.; Lolait, S.; Barlow, J. W.; Wai Sum, O.; Zois,
I.; Toh, B. H. and Funder, J. W.
Nature (London), 303:709 (1983)
153. Lima, F.; Gimeno, M.; Goldraij, A.; Bedners, A. and Gimeno,
A. L.
Life Science, 10:999 (parte I) (1971)

154. Lolait, S. J.; Autelifano, D. J.; Lim, A. T.; Smith, A. I.;
Toh, B. H. and Funder, J. W.
Endocrinology, 117:161 (1985)
155. Long, J. A. and Evans, H. W.
En: The rat in laboratory investigation, pp 52 (1949)
156. Lord, J.; Waterfield, A. A.; Hughes, J. and Kosterlitz,
H. W.
Nature, 267:495 (1977)
157. Lowry, O. H.; Rosebrough, J. N.; Ferr, A. L. and Randall.
R. J.
J. Biol. Chem., 193:265 (1951)
158. Lundberg, J. M.; Hokfelt, T.; Anggard, A.; Uvnas-
Wallensten, K.; Brimijoin, S.; Brodin, E. and Fahrenkrug, J.
En: Neural Peptides and Neuronal Communication, editado
por E. Costo and M. Trabucchi, Raven Press, New York, pp
25 (1980)
159. Manni, A., Baker, R.; Arafah, B. M. and Pearson, O. M.
J. Endocr., 91:281 (1981)
160. Margioris, A. N.; Grino, M.; Protos, P.; Gold, P. W. and
Chrousos, G. P.
J. of Clinical Endocrinology and Metabolism, 66 (5):922
(1988)
161. Marshall, J. M.
Am. J. Physiol., 197:935 (1959)
162. Martin, W. R.
Pharmacology of opioids. Ibid., 35:283 (1983)

163. Martin, W. R.; Eades, C. G.; Thompson, J. A.; Huppler, R. E. and Gilbert, P. E.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 197:517 (1976)
164. Mc Cracken, J. A.; Carbon, J. C.; Glew, M. E.; Goding, J. R. Baird, D. T.; Green, K. and Samuelsson, B.
Nature (New Biol.), 238:129 (1972)
165. Mc Craken, J. A.
Adv. Prostaglandin Thromb. Res., 8:1329 (1980)
166. Mc Fadzean, I.
Neuropeptides, 11:173 (1988)
167. Mc Knight, A. T.; Corbett, A. D.; Marcoli, M. and Kosterlitz, H. W.
Neuropharmacology, 24 (11):1011 (1985)
168. Meisneri, K. D.; Hwang, O. and Van Breemen, C.
J. Membr. Biol., 59:19 (1981)
169. Meisneri, K.; Palmer, R. F. and Van Breemen, L.
Eur. J. Pharmacol., 61:159 (1980)
170. Miller, J. R.; Silver, P. J. and Stull, J. T.
Mol. Pharmacol., 24:235 (1983)
171. Minneman, K. P.
Pharmacological Reviews, 40 (2):87 (1988)

172. Miyamoto, T.; Yamamoto, S. and Hayaishi, O.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 71:3645 (1974)
173. Moncada, S.; Ferreira, H. and Vane, J. R.
En: *Advances in Prostaglandins and Thromboxane Research*,
5:211, editado por J. C. Frölich Raven Press, N. Y.
(1978)
174. Moncada, S.; Gryglewski, R. J.; Bunting, S. and Vane, J. R.
Nature (London), 263:663 (1976)
175. Morgan, J. P. and Morgan, K. G.
J. Physiol., 357:539 (1984)
176. Murad, F.; Rapoport, R. M. and Ficus, R. R.
J. Cardiovascular Pharmacol., 7 (3):S111 (1985)
177. Nairn, A. C.; Hemmings, H. C. Jr. and Greengard, P.
Ann. Rev. Biochem., 54:931 (1985)
178. Nakano, J.; Anggard, E. and Samuelsson, B.
Eur. J. Biochem., 11:386 (1969)
179. Neill, J. D. and Smith, M. S.
En: *Current topics in experimental endocrinology*, editado
por James y Martini, Academic Press Inc., pp 73 (1974)
180. Nishizuka, Y.
Philos. Trans. R. Soc. Lond (Biol.), 302:101 (1983)

181. Noskes, T. D. and Van Gend, M.
S. Afr. Med. J., 73:350 (1988)
182. Nugteren, D. H.
Biochim. Biophys. Acts, 210:171 (1970)
183. Oelz, O.; Oelz, R.; Knapp, H. R.; Sweetman, B. J. and
Oates, J. A.
Prostaglandins, 13:225 (1977)
184. Ohia, S. E. and Laniyonu, A. A.
J. Pharm. Pharmacol., 41:168 (1989)
185. Oka, T.; Negishi, K.; Suda, M.; Matsumiya, T.; Inazu, T.
and Veki, M.
Eur. J. Pharmacol., 73:235 (1980)
186. Orczyk, G. P. and Behrman, H. R.
Prostaglandins, 1:3 (1972)
187. Pace-Asciak, C. R. and Rangaraz, G.
Biochim. Biophys. Acts., 218:288 (1970)
188. Padbury, J. F.; Agata, Y.; Polk, D. H.; Wang, D. L.; Lam,
R. W. and Callegari, C. C.
Developmental Pharmacology and Therapeutics, 11:44 (1988)
189. Paoletti, R. and Govoni, S.
Pharmacological Research Communications, 19 (3):195 (1987)

190. Pasternak, G. W.; Gintzler, A. R.; Houghten, R. A.; Ling, G. S. F.; Goodman, R. R.; Spiegel, K.; Nishimura, S. L.; Johnson, N. and Recht, L. D.
Life Science, 33 (supl I):167 (1983)
191. Penniston, J. T.
En: Calcium and Cell Function, editado por W. Y. Cheung, vol. IV, pp 99, Academic Press, New York (1983)
192. Pert, C. B. and Snyder, S. H.
Mol. Pharmacol., 10:868 (1979)
193. Petraglia, F.; Facchinetti, F.; M'Futa, K.; Ruspa, M.; Bonavera, J. J.; Gandolfi, F. and Genazzani, A.
Fertility and Sterility, 46 (2):247 (1986)
194. Popescu, L. M.; Panoiu, C.; Foril, C. P.; Hinescu, M. and Nutu, O.
INSERM, 124:273 (1984)
195. Poyser, N. L.
Prost., Leuk. and Medicine, 11:345 (1983)
196. Preuss, K. C.; Gross, G. J.; Brooks, H. L. and Warltier, D. C.
Life Science, 17:1271 (1986)
197. Przewlocki, R.
Pol. J. Pharmacol. Pharm., 36:137 (1984)
198. Ramwell, P. W.; Leovey, E. M. K. and Sintetos, A. L.
Biology of Reprod., 16:70 (1977)

199. Rapoport, R. M. and Murad, F.
J. Cyclic Nucleotide Protein Phosphor. Res., 9:281 (1983)

200. Rasmussen, H.
The New England J. of Medicine, 314:1094 (1986)

201. Rome, L. H. and Lands, W. E. M.
Prostaglandins, 11:23 (1976)

202. Ropert, J. F.; Quigley, M. E. and Yen, S. S. C.
J. Clin. Endocrinol. Metab., 52:583 (1981)

203. Ross, D. H. and Cardenas, H. L.
Adv. Biochem. Psychopharmacol., 20:301 (1979)

204. Russell, J. A.; Gosden, R. G.; Humphreys, E. M.; Cutting, R.; Fitzsimons, N.; Johnston, V.; Liddle, S.; Scott, S. and Stirland, J. A.
Journal of Endocrinology, 121:521 (1989)

205. Sakai, Y.; Aihara, K.; Honda, H. and Inazu, M.
Eur. J. of Pharmacol., 162:475 (1989)

206. Samuelsson, B.
En: The Harvey Lectures, serie 75, Academic Press, 99, 1-40
New York (1981)

207. Samuelsson, B.
J. Am. Chem. Soc., 87:3011 (1965)

208. Samuelsson, B.; Ganström, E.; Green, K. and Hamberg, M.
Ann. N. Y. Acad. Sci., 180:138 (1971)
209. Sanner, J.
Ann. New York Acad. Sci., 180:396 (1971)
210. Sato, E.; Iritani, A. and Nishikawa, Y.
Jap. J. Fertil. Steril., 25:229 (1980)
211. Sawynok, J.; Pinsky, C. and La Bella, F. S.
Life Science, 25:1621 (1979)
212. Schultz, R.; Taase, E.; Wüster, M. and Hertz, A.
Life Science, 24:843 (1979)
213. Schumann, H. J.; Gorlitz, B. D. and Wagner, J.
Naunyn-Schmiedeberg Arch. Pharmacol., 289:409 (1975)
214. Schwartz, A. and Triggle, D. J.
Ann. Rev. Med., 35:325 (1984)
215. Schwarz, K. S.; Peris, J. and Cunningham, C. L.
Alcohol and Drug Research, 7:327 (1987)
216. Seifer, D. B. and Collins, R. L.
Fertility and Sterility, 54 (5):757 (1990)

217. Seyler, D. E.; Borowitz, J. L. and Maickel, R. P.
Fundam. App. Toxicol., 3:536 (1983)
218. Shaw, J. S.
Brit. J. Pharmacol., 67:428 (1979)
219. Sheehan, M. J.; Hayes, A. G. and Tyers, M. B.
European Journal of Pharmacology, 130:57 (1986)
220. Sheldon Bivin, W.; Grawford, M. P. and Brewer, N. R.
En: The Laboratory rat, vol 1, editado por H. J. Bakers;
J. Russell Zindsey and S. M. Weisbroth, Academic. Press,
pp 92 (1979)
221. Shimizu, I.; Matsumura, M.; Hirota, M.; Fujii, T. and
Shima, K.
Regulatory Peptides, 16:331 (1986)
222. Shio, H.; Ramwell, P. W.; Andersen, N. H. and Corey,
E. J.
Experientia, 26:355 (1970)
223. Silvalingham, T. and Pleuvry, B. J.
Br. J. Anaesth., 57:430 (1985)
224. Silver, M. J. and Smith, J. B.
Life Science, 16:1635 (1975)
225. Simon, E. J. and Hiller, J. M.
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 18:371 (1978)

226. Simonds, W.
Endocrine Reviews, 9 (2):200 (1988)
227. Smith, C. F. C. and Carter, A.
Arch. Int. Pharmacodyn. 284:181 (1986)
228. Smith, C. F. C. and Rance, M. J.
Life Science, 33:327 (1983)
229. Smith, C. F. C.; Waldron, C. and Brook, N. A.
Arch. Inter. de Pharmacodynamie et. de Therapie, 291:122
(1988)
230. Smith, W. L. and Lands, W. E. M.
J. Biol. Chem., 21:6700 (1971)
231. Snyder, S. H.
Science, 224:22 (1984)
232. Soloff, M. S. and Sweet, P.
J. Biol. Chem. 257:10687 (1982)
233. Spadaro, C.; Arrigo-Reina, R. and Scoto, G. M.
Pharmacological Research Communications, 19 (2):223 (1987)
234. Spiegel, A. M.
Mol. Cell. Endocrinol., 49:1 (1987)

235. St. Muijck, C. B.; Beerthius, R. K.; Pabon, H. J. J. and
Dorp, D. A.
Rec. Trav. Chim., 85:1233 (1966)
236. Stassen, F. L.; Heckman, G.; Schmidt, D.; Papadopoulus, M.
T.; Nambi, P.; Sarav, H.; Aiyar, N.; Gellac, M. and Kinter,
L.
Molecular Pharmacology, 33:218 (1988)
237. Sterin-Speziale, N.; Gimeno, M. F.; Bonacossa, A. and
Gimeno, A. L.
Prostaglandins, 20:233 (1980)
238. Steward, J. J.; Weisbrodt, N. W. and Burks, T. F.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 205:547 (1987)
239. Stout, M. A. and Diecke, F. P. J.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 225:102 (1983)
240. Strickland, S. and Deers, W. H.
J. Biol. Chem., 251:5694 (1976)
241. Sun, F. F.
Biochem. Biophys. Res. Commun., 74:1432 (1977)
242. Szabo, B.; Wichmann, T. and Starke, K.
European Journal of Pharmacology, 139:103 (1987)
243. Szikszay, M.; Snyder, F. R. and London, E. D.
J. Pharm. Pharmacol., 38:625 (1986)

244. Szikszay, M.; Snyder, F. R. and London, E. D.
The Journal of Pharmacology and Exp. Therapeutics, 238 (1):
192 (1986)
245. Tepper, R.; Neri, A.; Kaufman, H.; Schoenfeld, A. and
Ovadia, J.
Obstet. Gynecol., 70:150 (1987)
246. Terenius, L. and Nyberg, F.
Life Science, 41:805 (1987)
247. Thomas, J. P.; Dorflinger, L. J. and Behrman, H. R.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 75:1344 (1978)
248. Toru, T.; Konno, F.; Takayanagi, I. and Hirobe, M.
Gen. Pharmac., 20 (2):249 (1989)
249. Tykka, H.; Mahlberg, K.; Pantzar, P. and Tallberg, T.
J. Gastroent., 15:519 (1980)
250. Van Rossum, J. M.
Arch. Int. Pharmacodyn. Ther., 134:299 (1963)
251. Vanderhoek, J. V. and Lands, W. E. M.
Biochim. Biophys. Acts, 296:382 (1973)
252. Vane, J. R. and Williams, K.
Br. J. Pharmacol., 45:146 (1972)

253. Vane, J. R. and Williams, K.
Br. J. Pharmacol., 48:629 (1973)
254. Varsano, J. S.; Izhar, M.; Perk, K. and Shemesh, M.
Reprod. Fertil. Dev., 2:337 (1990)
255. Vesin, M. F.; Dokhoc, L. D. and Harbon, S.
Molecular Pharmacol., 16:823 (1979)
256. Vesin, M. F.; Khac, L. D. and Harbon, S.
Molecular Pharmacology, 14:24 (1977)
257. Wahlström, T.; Laatikainen, T.; Salminen, K. and
Leppälwoto, J.
Life Science, 36:987 (1985)
258. Wakeling, A. E.; Kirton, K. T. and Wyngarden, L. J.
Prostaglandins, 4:1 (1973)
259. Walker, J. M.; Bowen, W. D.; Walker, F. O.; Matsumoto, R.
R.; De Costa, B. and Rice, K. C.
Pharmacological Reviews, 42 (4): 355 (1990)
260. Walles, B.; Edvinsson, L.; Nybell, G.; Owman, C. and
Sjoberg, N. O.
Fertil. Steril., 25:602 (1974)
261. Watkins, W. B.; Yen, S. S. C. and Moore, R. Y.
Cell. Tissue Res., 215:577 (1981)

262. Werz, A. and Mac Donald, R. L.
Brain Research, 239:315 (1982)
263. Werz, A. and Mac Donald, R. L.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 234:49 (1985)
264. Werz, A. and Mac Donald, R. L.
Neuroscience Letters, 42:173 (1983)
265. Werz, A. and Mac Donald, R. L.
J. Pharmacol. Exp. Ther., 227:394 (1983)
266. Widy-Tyszkiewicz, E.; Luczak, A. and Gumulka, W.
Arch. Int. Pharmacodyn., 232:53 (1978)
267. Wilkes, M. M.; Watkins, W. B.; Stewart, R. D. and Yen, S. S.
Neuroendocrinology, 30:113 (1980)
268. Willis, A. L.
Br. J. Pharmacol., 40:583 (1970)
269. Willis, A. L.; Davison, P.; Ramwell, P. W.; Bracklehurst,
W. E. and Smith, J. B.
En: Prostaglandins, en Cellular Biology, editado por P. W.
Ramwell and B. B. Pharris, Pleumann Press, N. Y. (1971)
270. Wlodawer, P.; Kindahl, H. and Hamberg, M.
Biochim. Biophys. Acts, 431:603 (1976)

271. Wong, C-L.
Meth. and Find. Exptl. Clin. Pharmacol., 8 (8):479 (1986)
272. Wüster, M.; Schultz, R. and Hertz, A.
Life Science, 27:163 (1980)
273. Yousif, F. B. and Triggle, D. J.
Can. J. Physiol. Pharmacol., 64:273 (1986)
274. Zsoter, T. T. and Church, J. G.
Drugs, 25:93 (1983)