

31960

2^{da}.



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

**ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
"IZTACALA"**

DIVISION DE ESTUDIOS POSTGRADO

MAESTRIA BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION

**"ESTUDIO DE LA ACCION
GENOMICA Y NO GENOMICA
DE 17 α Y 17 β ESTRADIOL
EN EL UTERO DE RATA"**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

M A E S T R I A E N

BIOLOGIA DE LA REPRODUCCION

P R E S E N T A:

M. C. JAIME JASSO KAMEL

269369

LOS REYES IZTACALA EDO. DE MEXICO

1998

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

JURADO ASIGNADO.

Dr. Roberto Domínguez Casalá.

Dr. Carlos Kubli Gárfias.

Dra. Mercedes Perusquía Nava.

Dra. Cristina Revilla Monsalve.

Dr. Javier Valencia Méndez.

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Endocrinología de la Reproducción del Departamento de Biología Celular, perteneciente al Instituto de Investigaciones Biomédicas, U.N.A.M., bajo la dirección de la Dra. María Mercedes Perusquía Nava. Desarrollado con financiamiento de la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), proyecto No. IN211597.

AGRADECIMIENTOS.



Al Dr. Bert W. O'Malley por sus valiosos comentarios y sugerencias para el enriquecimiento de este proyecto.

“MUY POCOS POSEEN VALOR PARA SER JUICIOSOS, PUES SERLO IMPLICA OLVIDARSE DE LA SEGURIDAD PERSONAL Y ENTREGARSE AL RIESGO DE VIVIR; ACEPTAR EL DOLOR COMO CONDICIÓN DE LA EXISTENCIA, CORTEJAR LA DUDA Y LA OBSCURIDAD, ARMARSE DE TENACIDAD EN EL CONFLICTO Y ACEPTAR SIEMPRE LAS CONSECUENCIAS DE VIVIR Y DE MORIR”

MORRIS WEST.

“LOS HOMBRES SIN IDEALES SON CUANTITATIVOS, PUEDEN APRECIAR EL MÁS Y EL MENOS, PERO NUNCA DISTINGUEN LO MEJOR DE LO PEOR”

JOSÉ INGENIEROS.

DEDICATORIAS.

A mi mejor amigo, mi padre, tu recuerdo sigue siendo compañía.

A mi madre, amoroso remanso de mis momentos tormentosos.

A Laura, en la senda de nuestro andar, has significado el alimento de mis más profundos sentimientos.

A mis pequeños hijos, Jaimito y Laurita, por ser la fuente inagotable de mis afectos.

Mi más profundo y sincero agradecimiento a la Dra. María Mercedes Perusquía Nava, por su firme disciplina que obliga a llegar a buen puerto, con admiración y cariño.

Al Dr. Carlos Kubli Gárfias, ejemplo de dirección, talento y amistad, con respeto y afecto.

A mi maestro y amigo, el Dr. Javier Valencia Méndez.

A la Dra. Nieves Pedrón N. Por su apoyo durante la maestría y en el Instituto Mexicano Del Seguro Social.

Al M. en C. Ricardo Hernández Ávila y demás integrantes del laboratorio de Endocrinología de la Reproducción.

A las piedras en el camino, que también enseñan a no volver a tropezar.

Asimismo, con particular gratitud:

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas U.N.A.M., por las facilidades que me brindo en el uso de sus instalaciones e infraestructura.

A la coordinación de postgrado de la E.N.E.P. Iztacala, U.N.A.M., por la oportunidad que me ha dado para mi superación académica.

En general:

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por lo mucho que me ha dado en la vida.

Los datos de esta tesis fueron parcialmente presentados en:

XXXIV Reunión Anual de la Asociación Mexicana de Medicina de la Reproducción y de la XV Reunión Anual de la Asociación Mexicana de Endoscopia Ginecológica y Microcirugía. Efectuada del 18 al 21 de junio de 1997 en la Ciudad de México.

Jasso, J., Hernández, R., Juárez, A., Rodríguez, M. y Perusquía, M. 17 α -ESTRADIOL: UNA HORMONA CON PROPIEDADES UTERO RELAJANTES.

INDICE

	PAG.
I. INTRODUCCIÓN.	2
a) Generalidades.	2
b) Efectos biológicos.	8
i) Mecanismo genómico de la acción de esteroides.	9
ii) Mecanismo no-genómico de la acción de esteroides.	13
iii) Acción de 17α -estradiol.	19
c) Estructura y mecanismo contráctil del músculo liso uterino.	21
i) Estructura.	21
ii) Mecanismo de contracción.	23
II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	26
III. HIPÓTESIS.	27
IV. OBJETIVOS.	28
a) General.	28
b) Particulares.	28
V. MATERIALES Y MÉTODOS.	29
Compuestos.	29
a) Registro de la contractilidad uterina.	30
b) Evaluación de la actividad uterotrónica y antiuterotrónica.	33
c) Cálculos y estadística.	35
VI. RESULTADOS.	37
a) Efectividad relajante de los estrógenos sobre la contractilidad uterina <i>in vitro</i> .	37
b) Actividad uterotrónica y antiuterotrónica <i>in vivo</i> .	41
VII. DISCUSIÓN.	45
VIII. CONCLUSIONES.	52
IX. REFERENCIAS.	53

I INTRODUCCIÓN

a) Generalidades.

Los esteroides son lípidos que derivan de un esqueleto común de cuatro anillos fusionados, conocido como ciclopentanoperhidrofenantreno. Esta relación estructural del grupo de los esteroides aunque común, cumple funciones de gran diversidad en los seres vivos, interviniendo en procesos trascendentes como la reproducción.

De manera general, se ha sabe que las hormonas esteroides no se metabolizan totalmente en los órganos blanco donde ejercen sus acciones biológicas, sino también en otros órganos que a su vez tienen actividad esteroideogénica como el cerebro, los testículos, la corteza suprarrenal, el tejido adiposo, la piel y la placenta.

En todas las especies animales estudiadas, el folículo ovárico es el sustrato anatómico más importante para la síntesis de 17β -estradiol.

La biosíntesis de las hormonas esteroides en el ámbito ovárico inicia a partir del colesterol, el cual puede ser sintetizado *de novo* a partir del acetato; pero la principal fuente de colesterol para la esteroideogénesis en el ovario proviene de las lipoproteínas circulantes, en el humano, predominantemente de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), en la rata, de las lipoproteínas de

alta densidad (HDL), que se unen a receptores específicos de las células de la teca interna, al penetrar al citoplasma se unen a los lisosomas, cuyas proteasas y esterases las desdoblan dejando en libertad a los aminoácidos y al colesterol no esterificado. (Gore-Langton et al, 1994)

Al entrar el colesterol en contacto con las mitocondrias es transformado en pregnenolona mediante la acción del citocromo P450_{scc} ("side-chain cleavage enzyme"), reacción que también se ha encontrado en tejidos periféricos y en el cerebro (Brown et al., 1989). La pregnenolona es el precursor común a todas las hormonas esteroideas del ovario, su producción está regulada por hormonas tróficas de naturaleza peptídica como son: la hormona luteinizante (LH) en el ovario y testículo, la gonadotropina coriónica (GCH) en la placenta y la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) en la corteza suprarrenal. A partir de la pregnenolona, se derivan las hormonas sexuales, los glucocorticoides y mineralocorticoides (Fig. 1). Así, la pregnenolona puede convertirse directamente a progesterona y posteriormente a aldosterona (ruta A, Fig. 1), o convertirse a 17 α -OH-pregnenolona, la cual es el precursor de la formación de cortisol (ruta B, Fig. 1), o metabolizarse a los esteroides sexuales (ruta C, Fig. 1). Como se muestra en la figura 1, la ruta A puede contribuir con la ruta B y ésta a su vez con la ruta C. La dehidroepiandrosterona (DHEA), el primer producto de la ruta C, puede

inhibir la cascada metabólica a través de la ruta B y C, por inhibir la conversión de pregnenolona a 17α -OH-pregnenolona. Las diferentes vías metabólicas que puede seguir la pregnenolona revelan su importancia en la biosíntesis de esteroides al producir mineralocorticoides, andrógenos a estrógenos y glucocorticoides (Roberts, 1995).

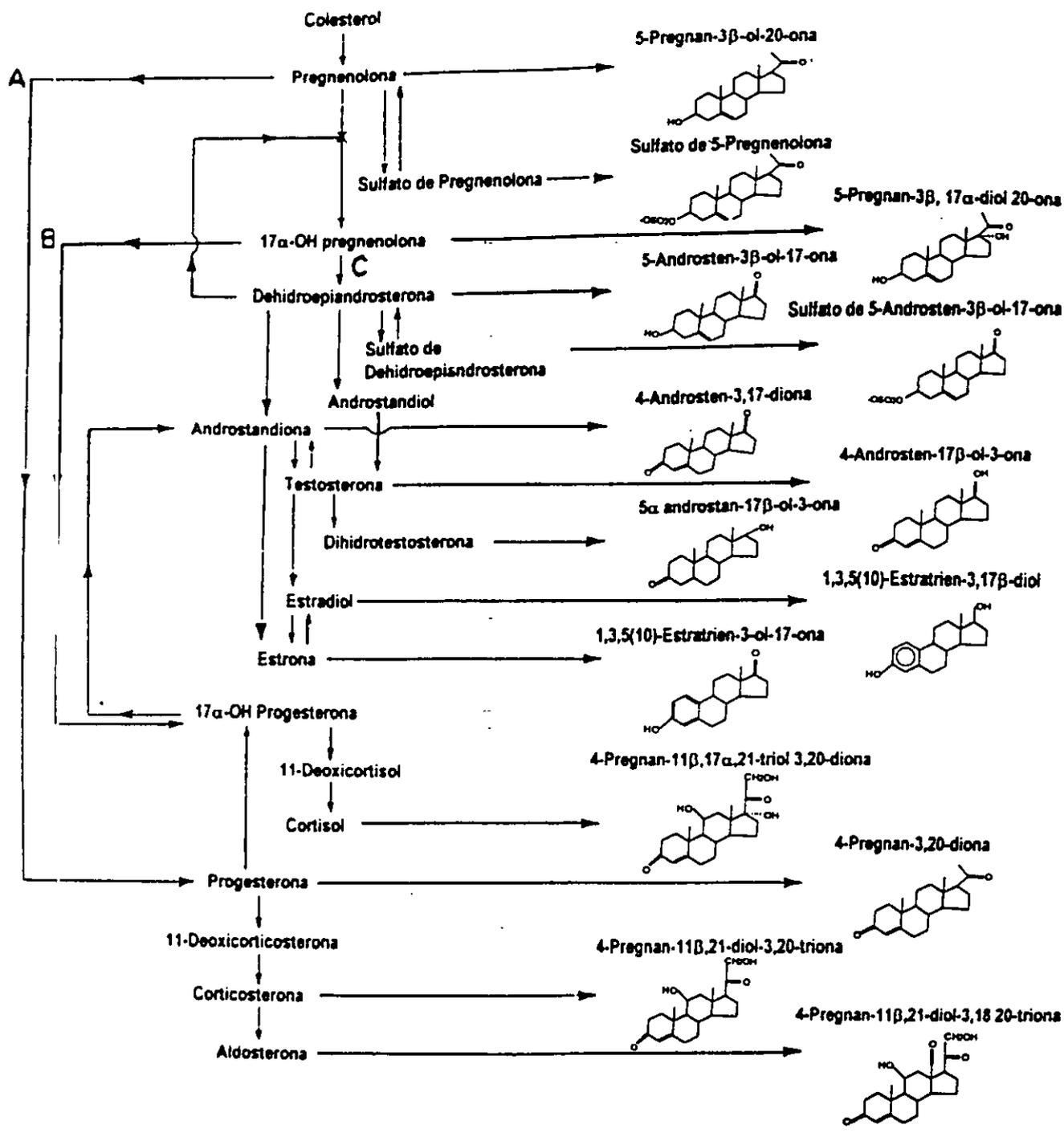


Figura 1. Ruta del metabolismo de los esteroides, algunas referencias que pueden ser consultadas con relación al metabolismo de los esteroides son: Burstein y Gut, 1971; Prasad y Lieberman, 1990; Lieberman et al., 1984; Leszczynski y Shafer, 1991; Provencher et al., 1992; Mathur et al., 1993; Castagnetta et al., 1990; Frainia et al., 1988. Esquema modificado de Roberts, 1995.

Los estrógenos, que son producidos fundamentalmente en el ovario, presentan la estructura química básica del hidrocarburo estrano, constituido por 18 átomos de carbono con sustituciones específicas.

Los principales estrógenos naturales son: la estrona, el estradiol y el estriol. El estradiol, derivado de la estrona es el producto más abundante en el ovario.

La figura 2 muestra la biosíntesis y metabolismo parcial de los estrógenos, donde se observa la ruta hacia la estrona y la ruta principal a partir de 4-androsten-19-ol-3,17-diona, representada por la vía 1,4-androstandien-19-ol-3,17-diona, es decir, que la acción de la Δ^1 -reductasa se lleva a cabo antes de que actúe la 10,19-desmolasa. Sin embargo, la 19-nor-4-androsten-3,17-diona permanece como una ruta alternativa para la estrona y el estradiol. El metabolismo en el hígado se lleva a cabo principalmente por hidroxilación de C₂, C₆ y C₁₆, siendo la estrona el sustrato principal. La reducción del anillo aromático no parece llevarse a cabo (Briggs y Brotherton, 1970).

b) Efectos Biológicos:

Las hormonas esteroides ejercen su acción sobre una gran variedad de procesos biológicos. En forma particular, los estrógenos regulan diferentes acciones en el útero. Los primeros trabajos sobre dichas acciones están relacionados con la retención de agua en el espacio intersticial (Astwood, 1938; Cole, 1950; Hisaw, 1959); hiperemia (Loeb y Kounts, 1928; Markee, 1932; Macleod y Reynolds, 1938; Holden, 1939; Reynolds, 1949; Szego y Roberts, 1953); y transporte de iones (Talbot et al. , 1940; Cole, 1950).

Los estudios sobre la hiperemia uterina revelaron que aproximadamente 30 minutos después de la administración subcutánea del estrógeno en ratas se detecta un incremento del volumen uterino por retención de agua (Markee, 1932). La respuesta de distensión y crecimiento uterino fue originalmente estudiada en conejas tratadas con estrógenos. Este efecto contrastó marcadamente con el descrito en conejas ovariectomizadas sin tratamiento (Reynolds y Kaminester, 1937; Reynolds, 1937). Posteriormente se reportó que en ratas ovariectomizadas hay un aumento en el peso uterino entre las 8 y 54 horas posteriores a la administración subcutánea de 1 μ g de 17 β -estradiol (Cole, 1950).

El incremento del peso uterino en roedores ha sido empleado como un indicador biológico de la presencia de estrógenos, bien sea administrados o

secretados, en respuesta a la estimulación gonadotrópica de los ovarios. El edema; la hipertrofia y la hiperplasia del endometrio (tanto en el estroma como en la mucosa) y la hipertrofia del miometrio se dan como resultado de los efectos uterotrópicos de los estrógenos.

A fines de los años 50 y durante los 60 los estudios realizados principalmente por Mueller (Mueller et al., 1958; Mueller; 1965) en el útero de rata y por O'Malley (1969) en el oviducto de pollo, muestran el efecto temprano de las hormonas sexuales en tejidos reproductivos, por lo que esta acción fue relacionada con la síntesis de RNAm de ciertas proteínas celulares, indicando un efecto de estos agentes en los procesos de transcripción.

En las tres últimas décadas, después del descubrimiento de los receptores intracelulares de hormonas esteroideas, una gran cantidad de evidencias experimentales han mostrado los mecanismos mediante los cuales estas hormonas ejercen sus efectos reguladores en tejidos blanco como el útero.

i) Mecanismo genómico de la acción de esteroideas.

El modelo original y todavía actual, que se ilustra en la figura 3, explica el mecanismo general de la acción de hormonas esteroideas. Este modelo no difiere en gran medida del propuesto originalmente por Jensen (1968) y

Gorski (1968). Las descripciones de estos procesos y las moléculas involucradas en cada paso de esta vía han sido descritos en detalle (Rories y Spelsberg, 1989; Spelsberg et al.,1989; Landers y Spelsberg, 1992; Truss y Beato, 1992; y Tsai et al., 1991).

El modelo de la acción genómica de hormonas esteroides según Robinson y Spelsberg (1997) puede ser explicado en la siguiente forma: los esteroides libres difunden pasivamente al interior de las células, debido a que no existe una evidencia sólida de un “transporte activo” de estas moléculas. Los esteroides son retenidos preferencialmente en las células blanco como complejos estables, con receptores proteicos intracelulares, los cuales son específicos para el tejido y el esteroide, formando el complejo esteroide-receptor (ER). Las concentraciones de los receptores de esteroides fluctúan entre las 10000 a 100000 moléculas por célula en varios tejidos reproductivos, pero pueden ser mucho menores en algunas células no reproductivas (menos de 2000 por célula). Cada receptor se fija reversiblemente a su respectivo esteroide (de alta afinidad) y con constantes de disociación de equilibrio (Kd) típicamente entre 10^{-8} y 10^{-10} M.

La fijación del esteroide al receptor resulta en una “activación” de la molécula receptora. Esta activación actualmente comienza a ser entendida y parece involucrar interacciones terciarias y cuaternarias (asociación con otras

proteínas), cambios en la conformación y orientación de la misma molécula receptora. El proceso de activación finalmente permite que el receptor se fije con alta afinidad a sitios específicos de la cromatina, denominados sitios aceptores nucleares. Una vez unidos a estos sitios se especula que la activación del complejo ER actúa como un elemento que contribuye a modular la transcripción de genes que responden a los esteroides, o alteran pasos postranscripcionales, a menudo por procesos desconocidos, que resultan de un cambio en los niveles del estado de equilibrio de las proteínas y de RNAm específicos. El resultado final de la acción del esteroide es la alteración de los patrones de la expresión de los genes en una célula. El entendimiento del orden cronológico de estos procesos (figura 3) es importante tanto para los aspectos fisiológicos como mecánicos. En general, el transporte de los esteroides al interior de la célula y la fijación nuclear ER es rápido, sucediendo en minutos después de la inyección o de la exposición de las células al esteroide.

Los siguientes pasos ocurren después de la formación del complejo ER (1-4 minutos después de tratamiento):

1. El ER se fija a los sitios aceptores nucleares (2-5 minutos)
2. La fijación nuclear afecta la síntesis y las concentraciones del RNAm (varias horas para los genes “tardíos”) y

3. Finalmente, el perfil de proteínas cambia debido a modificaciones en la síntesis de proteínas y a su intercambio (de 12 a 24 horas después del tratamiento).

En resumen, el efecto de los esteroides en las células se observa de 12 a 36 horas después del tratamiento. Los antiesteroides como los antiestrógenos pueden actuar de varias maneras; la mayoría de los componentes antiestrogénicos se fijan al ER o bien, son incapaces de activar el receptor, o activan al receptor que se fija a los sitios aceptores, pero fallan para regular completamente la transcripción genética o su expresión.

De alguna manera hay una paradoja mecánica referente al período de 2 a 4 horas que hay entre la fijación del ER a los sitios aceptores nucleares y la respuesta tardía de los genes transcripcionales. Esto ha sido denominado *fase o período de retardo*, durante este tiempo se piensa que ocurren varios eventos moleculares aún no definidos (Robinson y Spelsberg, 1997).

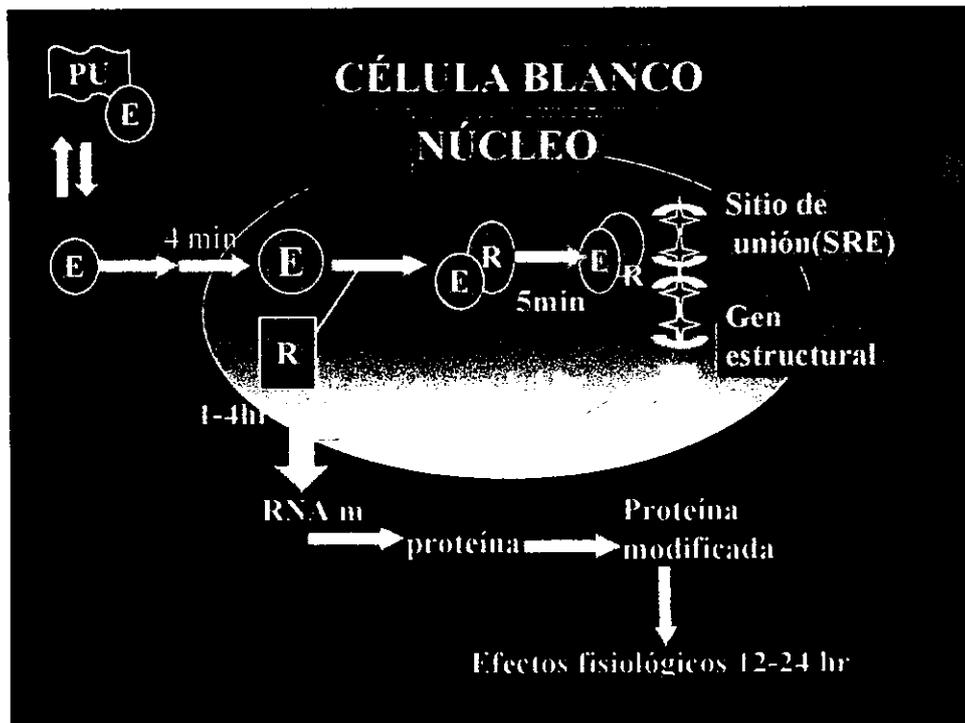


Figura 3. Mecanismo general de la acción de las hormonas esteroides. Entrada pasiva del esteroide al núcleo, donde se une a la proteína receptora de esteroide (R). El complejo esteroide-receptor (ER) “transforma” el sitio de unión en el DNA e interactúa con secuencias genómicas específicas (elementos reguladores). Resultando la modificación de la transcripción de varios genes blancos. La transcripción del RNAm es trasladada al citosol, induciendo la síntesis de varias proteínas que resultan en una multitud de respuestas biológicas. Los tiempos representan el intervalo entre la exposición de la célula al esteroide y los cambios detectables. PU= proteína de unión en suero; R= receptor; E= esteroide; ER= receptor activado; SRE= elemento regulador del esteroide. (Esquema modificado de Robinson y Spelsberg, 1997)

ii) Mecanismo no-genómico de la acción de esteroides.

De manera colateral, se ha reportado una acción inmediata de los estrógenos en el Sistema Nervioso Central (S.N.C.), la cual no es mediada genómicamente, caracterizando a estas respuestas como efectos de tipo no genómico (McEwen., 1991), los cuales no pueden ser explicados por el modelo clásico de la acción de hormonas esteroides para la operación de los procesos de transcripción.

Los efectos no genómicos, los cuales son tan rápidos (de segundos a minutos después del tratamiento con esteroides) (Landers y Spelberg, 1992), tienen además, la característica de que el efecto desaparece cuando el esteroide se retira del tejido. Un ejemplo de esto es el efecto de la progesterona, que ha mostrado tener una importante influencia en procesos de neurosecreción en tejidos excitables (McEwen, 1991). Los efectos no-genómicos de los esteroides fueron descritos por primera vez en el Sistema Nervioso para sus acciones anestésicas, sedativa/hipnótica y anticonvulsiva, que producen algunos neuroesteroides y esteroides neuroactivos (Baulieu et al., 1978; Schumacher, 1990; McEwen, 1991), como resultado de una disminución de la excitabilidad del Sistema Nervioso. Además, la progesterona tiene también influencia en la maduración de espermatozoides y ovocitos como resultado de su acción en la superficie de estas células (Tesarik et al., 1993).

La información que se tiene sobre la acción de los estrógenos y andrógenos sobre la superficie de células diferenciadas es menos clara. Existen reportes recientes de cambios rápidos en los niveles de segundos mensajeros (*i.e.*, calcio citosólico, AMPc, GMPc y fosfatidilinositol) en respuesta al tratamiento con estrógenos y andrógenos (Lieberherr y Grosse, 1994). El interés en los efectos no genómicos de los esteroides en la función

cerebral ha aumentado desde el descubrimiento de un mecanismo molecular que regula los efectos rápidos de ciertos esteroides. Estudios sobre la acción de los esteroides anestésicos revelan que pueden modular alostéricamente a los receptores del ácido γ -aminobutírico (GABA) (Harrison y Simmonds, 1984) aumentando la conductancia al Cl^- . Numerosos reportes posteriores han mostrado una alta afinidad de los 3α -hidroxiesteroides por los receptores GABA_A (Majewska et al., 1986; Harrison et al., 1987; Morrow et al., 1987; Gee et al., 1987; Gee et al., 1988; Peters et al., 1988; Turner et al., 1989; Morrow et al., 1990), lo que permite proponer la existencia de sitios de unión del esteroide con el receptor GABA_A (Morrow et al., 1990; Lan et al., 1990) con múltiples sitios de reconocimiento en las subunidades de este receptor GABA_A (Rommerts y Vander Molen, 1971; Robinson y Karabolis, 1973; Jung-Testas et al., 1989; Krieger y Scott, 1984; Barnea et al., 1990; Melcangi et al., 1990). Estos estudios han promovido la especulación de que algunos de los 3α -hidroxiesteroides son moduladores endógenos de los receptores GABA_A , facilitando la respuesta de GABA (potenciación) la cual aumenta la entrada de Cl^- disminuyendo la excitabilidad celular.

Sin embargo, se ha propuesto que los neuroesteroides y esteroides neuroactivos pueden también modular canales iónicos operados por otros ligandos. Tal es el caso para el receptor de glicina sensible a estriquina y el

receptor de N-metil-D-aspartato (NMDA), donde algunos esteroides inhiben las corrientes de Cl^- inducidas por glicina y otros potencian la despolarización inducida por la misma (Prince y Simmonds, 1992). Asimismo se ha propuesto que algunos esteroides pueden ser inhibidores competitivos de la unión de ligandos al receptor μ de opioides (Su et al., 1988).

Algunas evidencias han permitido sugerir que los esteroides neuroactivos pueden interactuar con la proteína G acoplada a receptores o sistemas efectores en membranas de neuronas (Joëls 1997). Varios estudios han confirmado que el esteroide puede estar involucrado con la inhibición de la actividad de la adenilciclase y la activación de la fosfolipasa C (Finnidori-Lepicard et al., 1981; Sadler y Maller, 1981, 1982; Blondeau y Baulieu, 1984; Smith, 1989; Chien et al., 1991). Además, se ha reportado que los esteroides pueden estar regulando su respuesta mediante el AMPc (Minami et al., 1990; Broski et al., 1991; Petitti, 1992) y estimular la actividad de la GTPasa (Ravindra y Aronstam, 1992).

También se ha propuesto un mecanismo adicional para algunos esteroides activos sobre el GABA_A , en el que pueden suprimir las corrientes de Ca^{2+} dependientes de voltaje en forma rápida y reversible de neuronas (French-Mullen y Spence, 1991).

Además, se ha reportado que los estrógenos y otros esteroides sexuales

inducen un efecto rápido y reversible (no-genómico) sobre la actividad contráctil espontánea del útero con lo que se produce relajación. En 1925, los estudios pioneros del grupo de Frank mostraron que en un grupo de ratas previamente ovariectomizadas (donde el útero es extraordinariamente inactivo), después de la administración subcutánea de estrógenos se pudo observar una actividad uterina rítmica espontánea. Más tarde, Reynolds (1931) observó en estudios *in vivo* en conejas, un incremento de la actividad uterina varias horas después de la administración de estrógenos. Posteriormente, estudios más refinados de Csapo y Corner (1952) *in vitro* y de Schofield (1955) también *in vivo* en conejas, reportaron que la actividad contráctil del útero es regulada por los estrógenos.

Los primeros estudios en tiras de miometrio humano *in vitro* revelaron que el estradiol reduce la frecuencia de la contracción sin cambios de la amplitud (Kumar et al., 1964). Posteriormente, numerosos trabajos determinaron que los esteroides sexuales, entre los que se encuentran los estrógenos, pueden afectar la contractilidad uterina de diferentes especies de mamíferos. Estudios *in vitro* han mostrado una respuesta relajante ejercida por andrógenos, progestinas (Kubli-Garfias et al., 1980; Perusquía et al., 1990; Perusquía y Villalón, 1996) y estrógenos (De la Peña et al., 1991) sobre la contracción uterina espontánea de la rata en diestro. La acción relajante

incucida por los esteroides fue observada de 1 a 2 minutos después de su adición, lo que induce a pensar también en una acción no-genómica de los esteroides sobre la actividad uterina (Perusquía et al., 1990).

Se ha postulado que en el mecanismo de acción de los esteroides para inducir relajación uterina se encuentran involucrados algunos iones. Así, Batra en 1973 estudió la captación de calcio por las mitocondrias del miometrio humano que había sido tratado con estrógenos y observó que éstos inhiben la captura del calcio mitocondrial dependiente de ATP, en tanto que la progesterona no la afecta. Posteriormente se mostró que esta hormona disminuye la fijación de calcio por el miometrio (Batra y Bengtsoon, 1978).

En los últimos años se ha descrito que las progestinas y los andrógenos producen un efecto calcio-antagónico con lo que inhiben la contracción inducida por calcio en el útero despolarizado de la rata, encontrándose también que dicho efecto es revertido por la adición de ionóforos de calcio, lo que permite sugerir que la relajación producida por los esteroides se debe a la disminución de la entrada de calcio extracelular, probablemente por bloqueo de los canales de calcio operados por voltaje (Perusquía et al., 1990). Por otro lado, otros resultados experimentales indican que los andrógenos y las progestinas son capaces de inhibir las contracciones inducidas por la oxitocina (Perusquía y Campos. 1991), serotonina (Perusquía et al., 1991) y acetilcolina

(Perusquía et al., 1991), además de poseer la capacidad de prevenir las contracciones mediadas por las prostaglandinas E_2 y $F_{2\alpha}$ (Perusquía et al., 1992). Estos datos muestran que en el efecto relajante uterino producido por las hormonas esteroideas están también involucrados los canales de calcio operados por receptor. En la actualidad en el tejido uterino no se ha caracterizado un receptor membranal específico a hormonas esteroideas. La información con la que se cuenta para explicar el mecanismo de acción de los esteroideas sobre la contractilidad uterina son escasos y contradictorios, habiendo sido estudiado particularmente en la rata.

iii) Acción del 17α -estradiol.

Se ha considerado que el 17α -estradiol es el isómero hormonalmente inactivo del 17β -estradiol (Girasole et al., 1992; Vargas et al., 1989), por lo que se ha utilizado para determinar la especificidad hormonal de la respuesta de 17β -estradiol. Numerosos datos experimentales han mostrado que el 17α -estradiol carece de efectos genómicos (Merrlam et al., 1980; Schwartz et al., 1991; Nasatzky et al., 1993). Sin embargo, en los últimos años a este estrógeno se le ha atribuido un efecto relajante sobre el músculo liso vascular (Salas et al., 1994; Rodríguez et al., 1996). Respecto al mecanismo de acción del efecto vasodilatador del 17α -estradiol, se ha propuesto que podría actuar

como antagonista de los canales de calcio (Collins et al., 1993). Otros estudios han demostrado que esta hormona, con propiedades vasoactivas, produce una disminución de las corrientes de calcio dependientes de voltaje en la célula vascular (Jiang et al., 1991; Zhang, et al., 1994). Estos estudios también mostraron que la relajación vascular inducida por el 17α -estradiol es prácticamente inmediata, por manifestarse a los pocos minutos (2-4) después de su administración, haciendo pensar así en una acción de tipo no genómico.

Por otra parte, se ha demostrado que la acción biológica de algunas hormonas puede ser bloqueada por sus isómeros, actuando como antihormonas. De este modo, se ha reportado que la epitestosterona, isómero de la testosterona, es un antiandrógeno que antagoniza la acción de la testosterona por ocupar su receptor intracelular (Nuck y Lucky, 1987; Stárka et al., 1989; Bicíková et al., 1992).

En complemento a esta importante actividad encontrada entre hormona e isómero, recientemente se demostró que la epitestosterona induce también un efecto no genómico, ya que induce la disminución de la actividad contráctil uterina, de manera semejante a la testosterona (Perusquía et al., 1996).

c) Estructura y mecanismo contráctil del músculo liso uterino.

i) Estructura:

El miometrio está compuesto por dos capas distintas de músculo liso, una externa longitudinal y una interna gruesa circular, entre las que se encuentra una capa vascular con vasos linfáticos, nervios y tejido conectivo. La capa muscular longitudinal externa se limita en su cara interna por células de músculo liso que se encuentran orientadas a lo largo del eje uterino, mientras que en su cara externa se relacionan con la capa serosa que recubre y sostiene al útero. Las células de la capa circular interna, se encuentran entre la capa muscular longitudinal y el endometrio, distribuidas concéntricamente alrededor del eje longitudinal del útero.

La contracción del miometrio da como resultado el acortamiento del útero, disminuyendo el diámetro de la luz uterina de manera similar como el músculo liso vascular contrae a los vasos sanguíneos.

El músculo liso uterino se encuentra rodeado de tejido conectivo; las células de músculo liso han mostrado la capacidad de sintetizar colágeno (Ross y Klebanoff, 1971), elastina (Ross, 1971), glicoproteínas (Ross, 1971) y proteoglicanos (Wight y Ross, 1975). Estas capacidades del tejido conectivo y su distribución, son responsables de la fuerza que se desarrolla durante la

contracción. El espacio extracelular del músculo liso es relativamente grande y se calcula que ocupa entre el 37 y el 57% del volumen total del miometrio (Law, 1982). Los espacios extracelulares no varían entre úteros gestantes y no-gestantes, ni en úteros estimulados con estrógenos y progesterona (Jones, 1968).

A nivel del citoplasma perinuclear de las células del músculo liso, sobre todo en las regiones adyacentes a los dos polos del núcleo, se observa una distribución extensa de filamentos delgados (7nm) y gruesos (15nm) entretelados. Los filamentos delgados están compuestos por **actina** en tanto que los filamentos gruesos están compuestos por **miosina** (Gabella, 1984; Shoenberg y Stewart, 1980).

La vaina elástica que contiene un fascículo muscular elemental, se conoce como sarcolema. Con las técnicas de microscopía electrónica se ha mostrado la distribución de los filamentos de actina y miosina en el músculo liso. Los filamentos de actina se enlazan a pequeñas estructuras que actúan como puntos de anclaje llamados *cuerpos electrodensos*, algunos de estos cuerpos están unidos a la membrana celular, otros están dispersos en el interior de la célula y son mantenidos en su posición por un armazón de proteínas estructurales que unen a estos cuerpos electrodensos entre sí. Entre los numerosos filamentos de actina se intercalan en menor número los

filamentos de miosina (en proporción de 15 a 1). Algunos cuerpos electrodensos de la membrana plasmática de células contiguas también están unidos entre sí por puentes intercelulares de proteína. Básicamente, la fuerza de contracción se transmite de una célula a la siguiente a través de estos enlaces. Otras características particulares del miocito liso en el ámbito de su membrana plasmática son: la presencia de numerosas invaginaciones vesiculares de la membrana basal conocidas como *cavéolas*. Estas vesículas pueden funcionar en la descarga y en el secuestro de iones de calcio. Las membranas celulares de los miocitos lisos están intercomunicadas por numerosas uniones intercelulares laxas tipo nexos (*gap junctions*), que permiten el flujo libre de iones de una célula a la otra, de tal forma que los potenciales de acción o los iones simples pueden viajar de una fibra muscular a la siguiente favoreciendo así que las fibras musculares se contraigan juntas.

ii) Mecanismo de contracción:

Como sucede en el músculo estriado, el acontecimiento que inicia la contracción en el músculo liso es un aumento de los iones de calcio intracelulares. Este aumento de calcio puede estar causado por estimulación nerviosa de la fibra lisa, estimulación hormonal, distensión de la fibra o incluso cambios en el ambiente químico de la misma fibra. A falta de

troponina, las células musculares lisas contienen una gran cantidad de otra proteína reguladora llamada **calmodulina**. La calmodulina activa los puentes transversales de miosina. Esta activación y la contracción subsiguiente, se producen según la siguiente secuencia:

- 1) Los iones de calcio se ligan a la calmodulina.
- 2) La combinación de calmodulina y calcio se une y activa la miosina cinasa que es una enzima fosforiladora.
- 3) Una de las cadenas ligeras de cada cabeza de miosina, denominada cadena reguladora, se fosforila por acción de la miosina cinasa. Cuando esta cadena no está fosforilada no se produce el ciclo de enlace-separación de la cabeza con el filamento de actina. Cuando la cadena reguladora está fosforilada, la cabeza tiene capacidad de unirse al filamento de actina y seguir todo el proceso de ciclos, de la misma manera como sucede con el músculo esquelético, causando así la contracción muscular.
- 4) Cuando la concentración de calcio iónico disminuye a un nivel crítico, el proceso mencionado se revierte automáticamente, a excepción de la fosforilación de la cabeza de miosina. El deshacerla requiere de la intervención de otra enzima, la miosina fosfatasa, misma que se localiza en el citoplasma de la célula muscular lisa y que separa el fosfato de la cadena ligera reguladora. El tiempo necesario para la relajación está

determinado en gran medida por la cantidad de fosfatasa de miosina existente en la célula (Guyton y Hall, 1997).

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Se ha propuesto que el 17α -estradiol es un compuesto inactivo sin atributos fisiológicos, sin embargo, la transformación en el organismo de estrona a 17α - y 17β -estradiol plantea la posibilidad de que el isómero 17α - también pudiera intervenir en alguna acción biológica. Por lo anterior, el presente estudio pretende investigar las posibles acciones biológicas de este compuesto en el útero de rata, ya que éste es un órgano blanco de la acción de los estrógenos. Se espera distinguir la acción no genómica y genómica del 17α -estradiol. Basado en los antecedentes sobre la acción membranal y en la respuesta que como antihormona presentan algunas hormonas y sus isómeros, se plantea que el isómero del 17β -estradiol presente el mismo comportamiento.

Los datos obtenidos en este proyecto contribuirán al conocimiento de la acción de hormonas y podrían descartar la idea de que el 17α -estradiol es un metabolito inactivo.

III. HIPÓTESIS.

Con base en la acción relajante (no genómica) y antiandrogénica (genómica) producida por la similitud estructural y propiedades físico químicas que presentan las moléculas de testosterona y epitestosterona, se postula que el 17α -estradiol, isómero del 17β -estradiol, induce un efecto antiestrogénico (genómico) y como el 17α -estradiol relaja al músculo liso vascular, se postula que esta hormona también induce un efecto relajante (no genómico) en el útero de rata.

IV. OBJETIVOS.

a) General:

Estudiar la posible acción biológica (genómica y no genómica) del 17α -estradiol en el útero de rata.

b) Particulares:

- 1) Comparar la acción del 17α -estradiol y del 17β -estradiol sobre la contractilidad espontánea del útero aislado de rata.
- 2) Estudiar si el 17α -estradiol tiene efectos antiestrogénicos sobre el efecto uterotrófico producido por el 17β -estradiol en la rata *in vivo*.
- 3) Con base en los resultados obtenidos, proponer cual es la parte funcional de la molécula de estradiol responsable de sus acciones genómica y extragenómica.

V. MATERIALES Y METODOS.

Se utilizaron 98 ratas hembras adultas de la cepa Wistar (180-220 g de peso corporal), mantenidas en condiciones de bioterio con un ciclo de 12h luz/12h oscuridad, a temperatura de 21°C y con suministro de agua y alimento *ad libitum*. El presente proyecto fue aprobado por el comité para el cuidado de animales del Instituto de Investigaciones Biomédicas. U.N.A.M. Los animales fueron tratados y manipulados según los lineamientos de la *American guide for care and use of laboratory animals*, aprobado por *The American Physiological Society*.

Las 98 ratas fueron divididas en dos grupos: Un primer grupo (A) de 56 ratas con las que se realizaron los experimentos de registro de la contractilidad uterina, y un segundo grupo (B) de 42 ratas con el que se evaluó la actividad uterotrónica y antiuterotrónica.

Compuestos: Las hormonas: 1,3,5(10)-Estratrien-3,17 β -diol (17 β -estradiol) y 1,3,5, (10)-Estratrien-3,17 α -diol (17 α -estradiol) fueron obtenidas de Sigma Chemical Co. (St. Louis MO, USA). Alcohol etílico (etanol absoluto) de Merck-México, S.A., éter anhidro de Baker, México. Aceite de maíz comestible Mazola_{MR}

a) Registro de la Contractilidad Uterina.

Para los experimentos del grupo A se le realizó diariamente un frotis vaginal con la finalidad de determinar, por citología, la fase del ciclo estral en la que se encontraban. Con el propósito de usar todos los especímenes en el mismo estado endocrino y de acuerdo a las necesidades experimentales *i.e.*, con concentraciones plasmáticas bajas de estrógenos y progesterona y con alta actividad contráctil, se eligieron solamente ratas en fase de diestro y que hubieran presentado dos ciclos estrales consecutivos de cuatro días.

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical e inmediatamente se les realizó la histerectomía. Los cuernos uterinos fueron disecados del tejido graso y conectivo circundante y colocados en solución Krebs-Bicarbonato, oxigenado (O_2/CO_2 95:5) y precalentado ($37^\circ C$), con la siguiente composición (mM): $NaHCO_3$ (25), $NaCl$ (120), KCl (4.7), KH_2PO_4 (1.2), $MgSO_4$ (1.2), $CaCl_2$ (1.5) y glucosa (11), con un pH de 7.4 ajustado por burbujeo constante de la mezcla gaseosa. Posteriormente, cada cuerno uterino fue cortado transversalmente en dos cilindros de aproximadamente 1 cm de longitud. Cada cilindro se colocó verticalmente en cámaras de incubación que contenían 10 ml de solución Krebs-Bicarbonato. Los tejidos fueron sometidos a una fuerza de 10 mN (1 g de tensión) durante 30 minutos. Inmediatamente después se registró la respuesta contráctil isométrica de cada tejido (Figura 4)

usando un transductor (Grass FTO3 Michigan, U.S.A) conectado a un polígrafo (Grass 79. Michigan, U.S.A.).

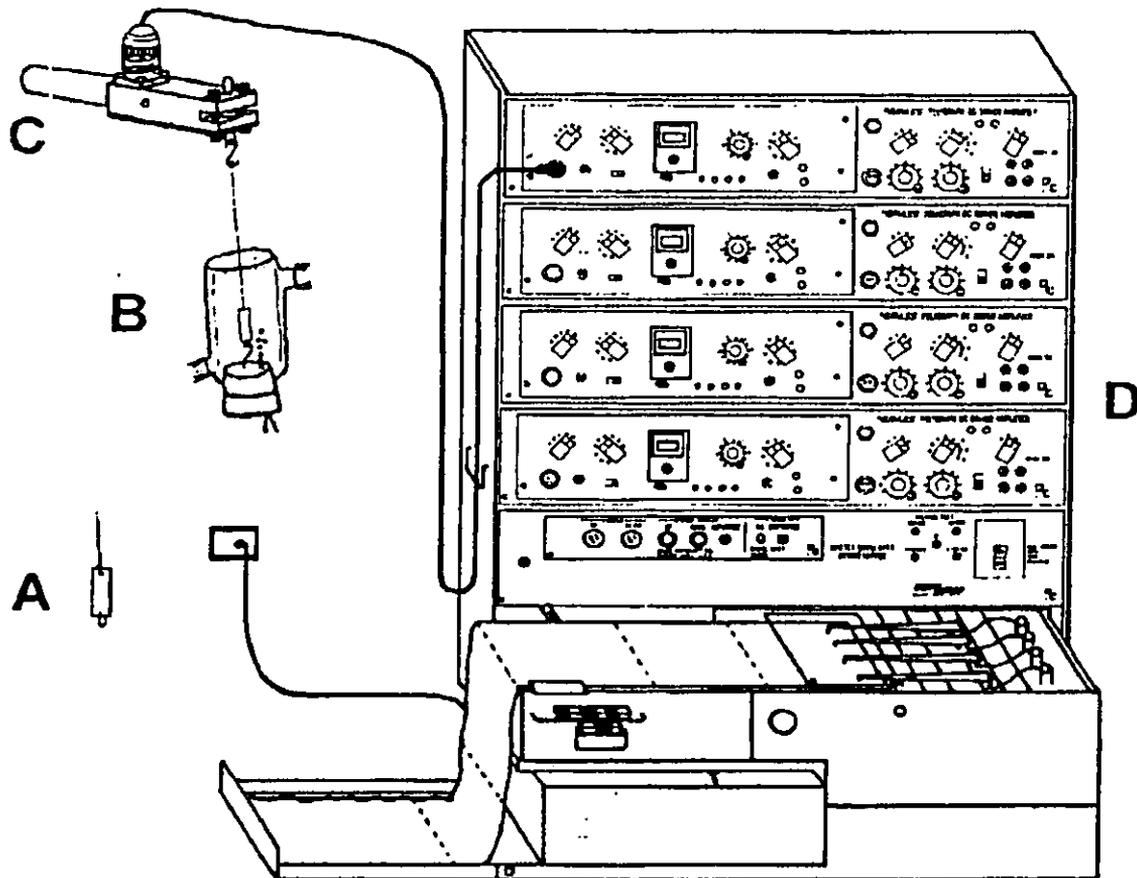


Figura 4. Sistema de registro isométrico convencional para tejido aislado. A) Cilindro uterino, B) Cámara de incubación (con sistema recirculador de agua a 37°C y burbujeo constante de 5% de CO₂ en O₂), C) Transductor, D) Polígrafo.

Para su estabilización los cilindros uterinos se mantuvieron en las condiciones mencionadas durante una hora. Los siguientes 10 minutos fueron tomados como el testigo de la actividad uterina espontánea, inmediatamente se adicionó 0.1% de volumen final de etanol (ETOH $1.7 \times 10^{-2}M$) vehículo usado para disolver los esteroides y adicionarlos al mismo volumen, registrando la actividad también por 10 minutos. Después de observar que el vehículo no causó cambios relevantes sobre la contractilidad uterina, en los otros tejidos se procedió en la misma forma para probar las hormonas. Después de 10 minutos de registro de la actividad espontánea se adicionó directamente al baño de la cámara, de manera independiente, 17β -estradiol (usado como testigo positivo) o 17α -estradiol. Cada estrógeno fue disuelto en 10 μ l de etanol (0.1% del volumen de la cámara), se probaron concentraciones ascendentes de manera no acumulativas en un rango de 0.2 a 200 μ M. Solamente una concentración de cada estrógeno fue adicionada a cada cilindro uterino. El efecto de las diferentes concentraciones de los estrógenos fue registrado también durante 10 minutos y comparado con el testigo de la actividad contráctil, tomado 10 minutos antes de adicionar la hormona.

Después de realizar el procedimiento descrito en algunos casos se observó la respuesta del esteroide durante dos horas y, en otros, los tejidos

fueron lavados mediante recambio de la solución Krebs-Bicarbonato (3 veces) con la finalidad de retirar al esteroide del medio y así observar la actividad contráctil.

b) Evaluación de la Actividad Uterotrófica y Antiuterotrófica.

Las ratas del grupo B fueron ovariectomizadas bajo anestesia con éter. Quince días después, el grupo fue dividido en siete subgrupos de seis ratas cada uno. En el grupo I, se inyectó subcutáneamente a cada animal con aceite de maíz, una dosis diaria de 0.4 ml/Kg de peso corporal durante 3 días. (testigo de vehículo). En el grupo II, cada rata fue tratada con 0.3 μ moles/Kg/día, durante 3 días de 17 β -estradiol. Cada dosis fue administrada por vía subcutánea en 0.4 ml/Kg de peso corporal de aceite de maíz. Los animales del grupo III fueron inyectados con 17 α -estradiol a la misma dosis y vía que el 17 β -estradiol (0.3 μ moles/Kg/día, durante 3 días). Los animales de los grupos IV a VII se trataron con combinaciones de 17 β - y 17 α -estradiol en diferentes proporciones de dosis durante 3 días (en μ moles/Kg/día): grupo IV, 1:1 (0.3:0.3), grupo V, 1:3 (0.3:0.9), grupo VI, 1: 5 (0.3:1.5) y grupo VII, 1:10 (0.3:3.0). Todos los rangos de dosis/día fueron disueltos y administrados por vía subcutánea en 0.4 ml/Kg del vehículo.

Las ratas se pesaron 24 horas después de la última administración, se tomó el frotis vaginal y se le examinó con un microscopio de luz (Zeiss), para determinar el grado de la cornificación vaginal.

Inmediatamente después, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, practicando la autopsia para disecar el útero y cuantificar el peso húmedo del órgano.

El aumento del peso uterino de cada grupo fue calculado en mg de peso uterino húmedo/100 g de peso corporal. El grupo I (vehículo) se comparó con el grupo II (17β -estradiol) y grupo III (17α -estradiol). Los grupos tratados a diferentes proporciones de dosis de $17\beta:17\alpha$ (grupos: IV, V, VI y VII) fueron comparados con el efecto uterotrófico del grupo II (17β -estradiol), *i.e.*, crecimiento uterino inducido por $0.3 \mu\text{mol/día/Kg}$ de peso corporal = 100%.

c) Cálculos y estadística.

El total de la actividad contráctil uterina (el área bajo la curva inscrita por la frecuencia y amplitud de la contracción) fue medida en intervalos de 10 minutos, usando un planímetro digital (Tamaya, planix 7). Los datos de la acción de cada compuesto sobre la contractilidad uterina fueron calculados como el valor promedio de $n \geq 6$ determinaciones independientes, cada uno de diferentes experimentos y expresado como porcentaje \pm Error Estándar de la Media (E.E.M). Las curvas concentración-respuesta del efecto de cada estrógeno fueron graficadas y, para cada compuesto se obtuvo la concentración inhibitoria media (CI_{50} = valor de la concentración de estrógenos a la cual se produce el 50% de la inhibición de la contracción uterina espontánea) mediante el método de Litchfield y Wilcoxon (1949). Con el propósito de evaluar la respuesta inhibitoria de 17α -estradiol, su potencia fue comparada con el efecto relajante ejercido por 17β -estradiol sobre la contracción del útero aislado de rata. La prueba de "t" de *Student* fue aplicada para comparar la diferencia entre el testigo y el efecto de cada estrógeno (Cosset, 1908).

La respuesta de los estrógenos sobre el crecimiento uterino fue calculada en mg de peso uterino húmedo/100 g de peso corporal, reportando el valor de la media de $n = 6 \pm$ E.E.M. El análisis estadístico para examinar la

respuesta de crecimiento uterino fue realizado aplicando el método de Bonferroni para comparar las diferencias.

VII. RESULTADOS.

a) Efectividad relajante de los estrógenos sobre la contracción uterina *in vitro*.

El vehículo utilizado para disolver los esteroides (etanol), no modificó la contracción uterina espontánea (Fig. 5). Mientras que, el 17α - y el 17β -estradiol causaron un efecto lineal relajante sobre la contractilidad del útero dependiente de la concentración (Fig. 8). El efecto relajante de ambos estrógenos fue casi inmediato, aproximadamente 1 minuto después de su adición al tejido. La respuesta fue observada como una disminución en la amplitud y frecuencia de la contracción, presentándose por lo menos durante 50 minutos (Fig. 6). Los resultados mostraron un evidente efecto relajante de ambas hormonas sobre la actividad espontánea del miometrio.

La CI_{50} del 17α -estradiol fue significativamente mayor que la CI_{50} de su isómero 17β , lo que representa que el 17α -estradiol es 10 veces menos potente para inducir relajación uterina. En la Tabla I, se muestran los valores encontrados.

La actividad contráctil uterina se recuperó cuando el estrógeno fue retirado del tejido mediante recambio de la solución Krebs-Bicarbonato (Fig. 7).

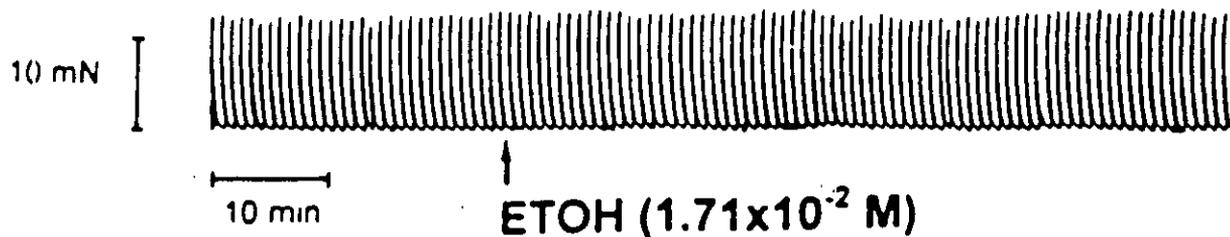


Figura 5. Registro de la actividad contráctil uterina de la rata en diestro. Nótese, que el vehículo (etanol, ETOH) en el cual se disolvieron los estrógenos no modifica el patrón de la contractilidad.

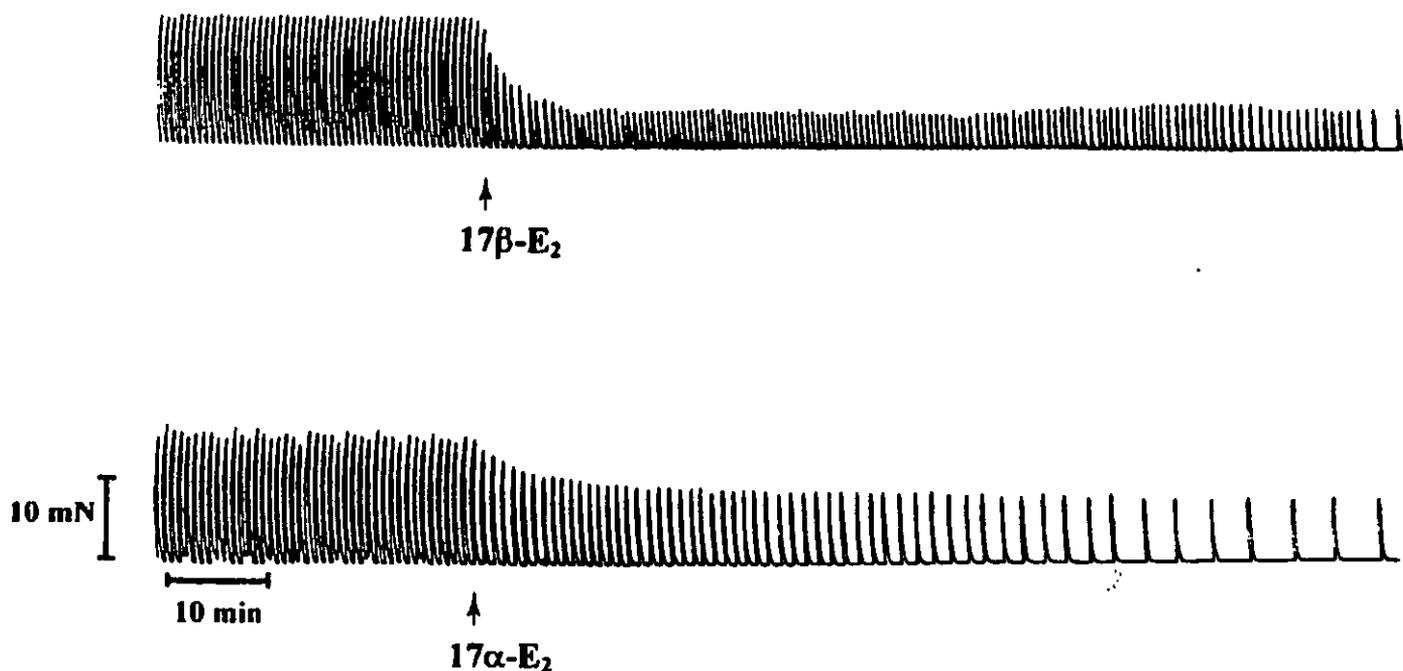


Figura 6. Registros típicos que muestran el efecto del 17β -estradiol (17β -E₂) y el 17α -estradiol (17α -E₂) a la concentración equimolecular de $20 \mu\text{M}$ sobre la contractilidad uterina espontánea de la rata en diestro.



Figura 7. Efecto relajante inmediato inducido por el 17α-estradiol (17α-E₂) sobre la contractilidad del útero de rata en diestro. Obsérvese la recuperación de la contracción después de lavar (L) al tejido.

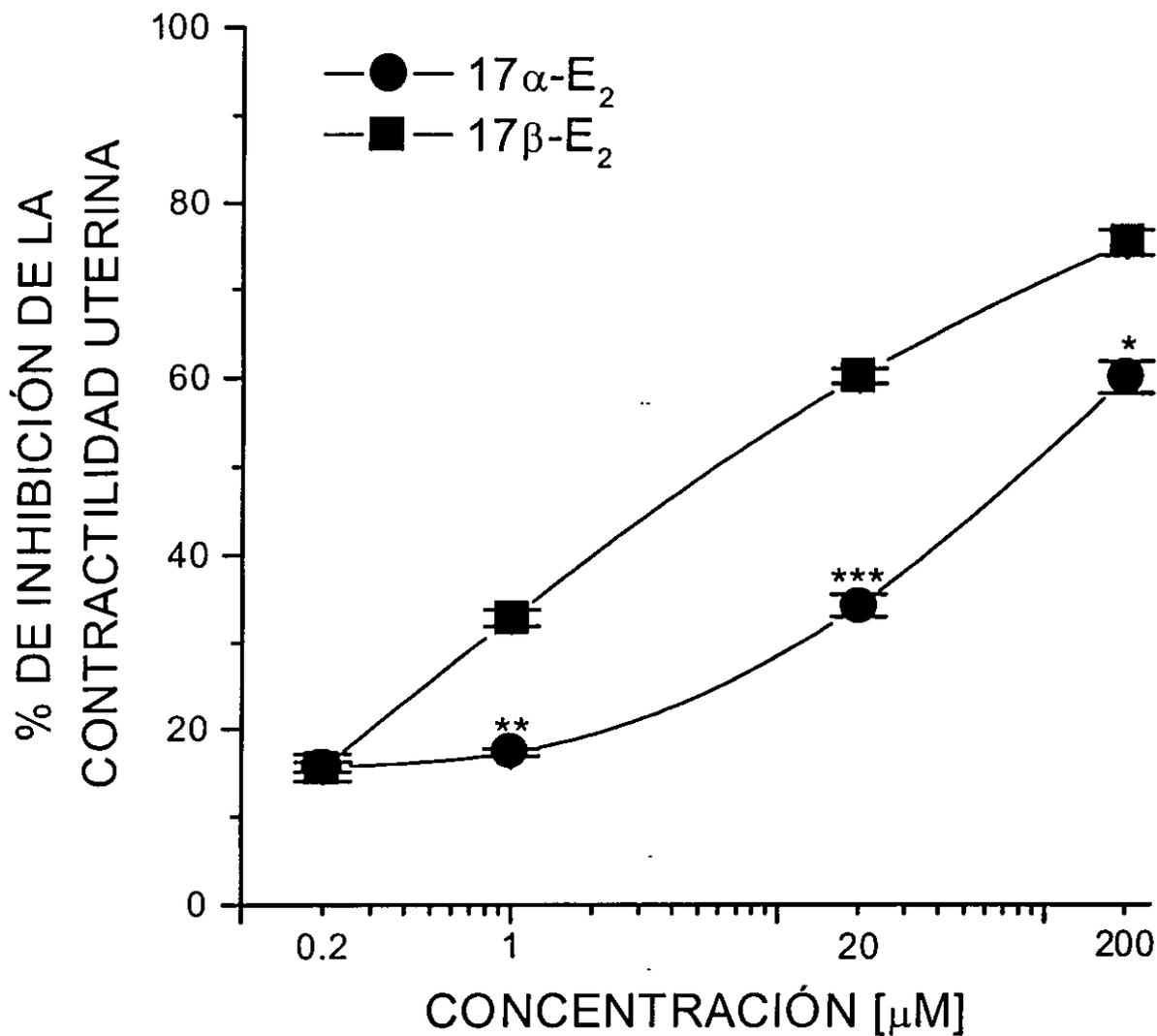


Figura 8. Curva concentración-respuesta del efecto inhibitorio del 17 α -estradiol (17 α -E₂) y el 17 β -estradiol (17 β -E₂) sobre la contracción espontánea del útero aislado de la rata en diest.o. Los símbolos son las medias de $n=7 \pm \text{E.E.M.}$, diferencia significativa * $p < 0.02$, ** $p < 0.002$, *** $p < 0.0005$ comparando el efecto que produce cada concentración de las hormonas.

TABLA I. Concentración inhibitoria media (CI₅₀) de la relajación uterina inducida por 17 α - y 17 β -estradiol en la rata en diestro.

HORMONA	CI ₅₀ (μ M)	LÍMITES INFERIOR-SUPERIOR	PENDIENTE	POTENCIA*
17 α -ESTRADIOL	89.39	6.35-1246	21.06	0.09
17 β -ESTRADIOL	8.42	1.18-59.6	31.47	1.00

Los datos fueron calculados según el método de Lichfield y Wilcoxon (1949).
 *No. de veces menos potente, obtenido por la fórmula: CI₅₀ 17 β -estradiol / CI₅₀ 17 α -estradiol asumiendo valor de 1 para el 17 β -estradiol.

b) Actividad Uterotrófica y Antiuterotrófica *in vivo*:

El efecto del grupo I testigo (vehículo aceite de maíz) mostró una tenue respuesta en su actividad uterotrófica. El grupo II (17 β -estradiol), produjo su potente acción uterotrófica. El grupo III (17 α -estradiol) mostró una ligera acción uterotrófica significativamente mayor al grupo I testigo. El 17 α -estradiol antagonizó el efecto estrogénico (uterotrófico) de 17 β -estradiol en todos los rangos de proporciones ensayadas, (fig. 9). Los valores de los diferentes tratamientos son mostrados en la tabla II.

Paralelamente se constató, por citología, que el grado de cornificación vaginal disminuyó conforme se aumentaba la dosis de 17 α -estradiol en las diferentes concentraciones administradas.

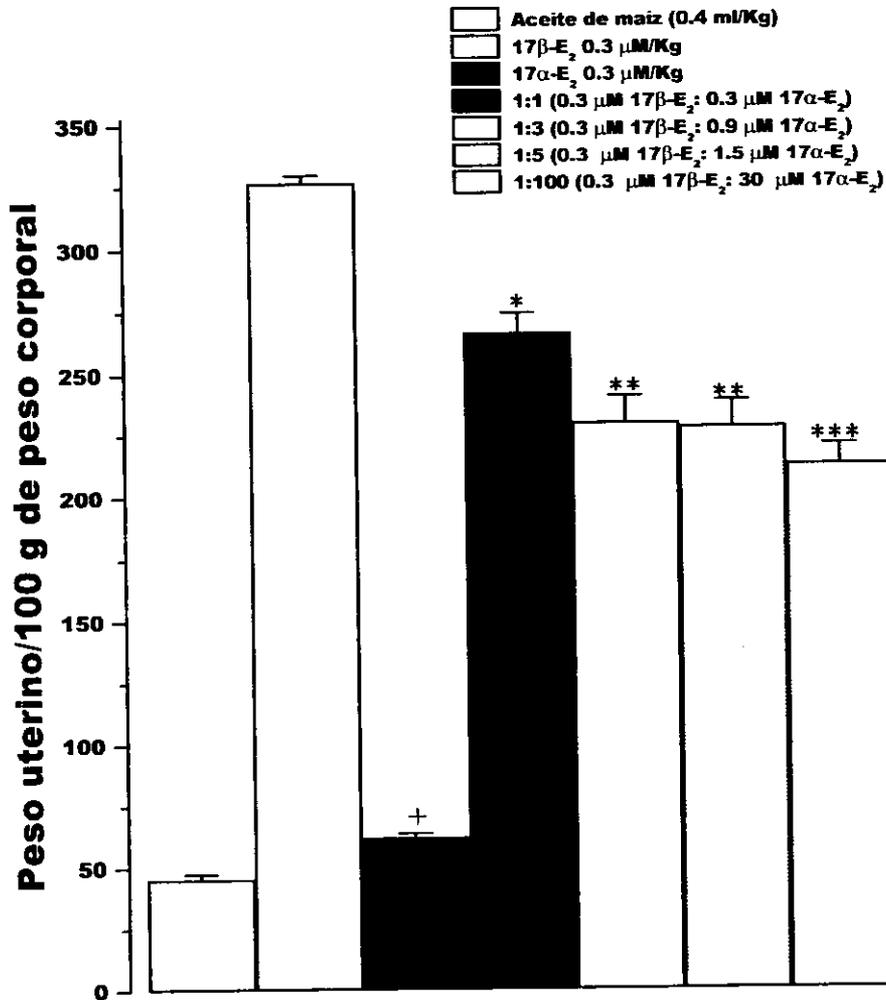


Figura 9. Efecto de 17α- y 17β-estradiol, solos y en combinación sobre el aumento de peso uterino en ratas maduras ovariectomizadas. El tenue efecto uterotrófico que induce el 17α-estradiol resultó ser significativo (+p < 0.01) con respecto al control (aceite de maíz). Valores significativos de la inhibición del efecto estrogénico que induce el 17β-estradiol (* p < 0.002, **p < 0.001, ***p < 0.0001) τ Diferencia significativa (P < 0.002) entre las proporciones de dosis 1:1 y 1:100.

Tabla II. Actividad antiuterotrófica de 17 α -estradiol en ratas maduras.

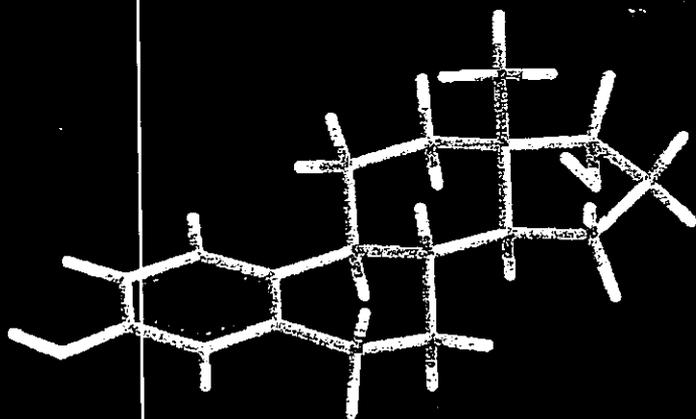
DOSIS DE 17 α -E ₂ (μ moles/día/Kg de peso corporal)	RADIO ^a 17 β -E ₂ :17 α -E ₂	PESO UTERINO HÚMEDOmg/100 g ^b	% DE INHIBICIÓN ^c
0.3	1:1	266.1 \pm 8.2	18.55
0.9	1:3	229.9 \pm 10.7	29.63
1.5	1:5	228.3 \pm 10.4	30.00
30.0	1:100	213.1 \pm 7.8	34.77

^aDosis fija usada de 17 β -E₂ = 0.3 μ moles/día/Kg de peso corporal.

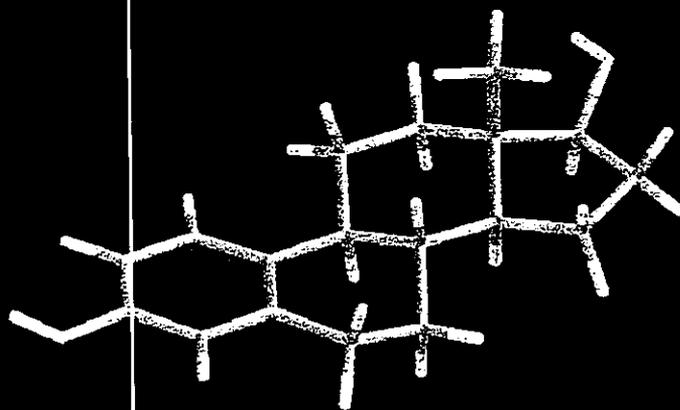
^bDatos de seis experimentos independientes \pm E.E.M. (6 ratas por grupo).

^cEn relación al efecto uterotrófico de 17 β -E₂.

Los datos mostraron que la molécula de estradiol con configuración α /*trans* ó β /*cis* en C₁₇ manifiesta la misma acción no genómica (relajación uterina). Sin embargo, este cambio parece ser el responsable de su diferente acción genómica sobre la ganancia del peso uterino (figura 10).



Estradiol-17 α



Estradiol-17 β

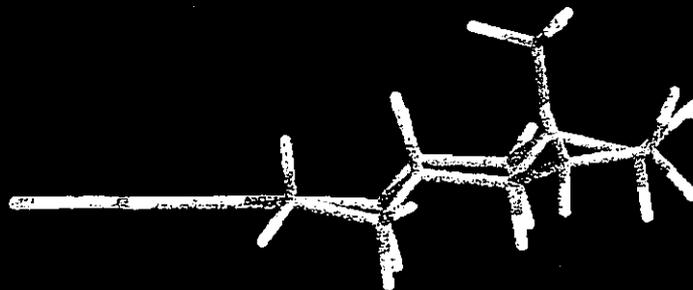


Figura 10. Representación estereoquímica de las moléculas estudiadas.

VIII. DISCUSION.

El presente estudio mostró dos aspectos interesantes de la acción fisiológica del 17α -estradiol, la primera es que en la rata produce disminución de la contractilidad uterina espontánea, la segunda que produce también inhibición parcial de la acción uterotrópica del 17β -estradiol.

Debido al corto tiempo de latencia observado en su efecto relajante (~ 1 minuto), éste podría ser categorizado como una acción de tipo **no genómico** (membranal) ya que esta rápida respuesta hace improbable un efecto que involucre la transcripción génica. El hecho de que el efecto relajante fue revertido cuando el esteroide se retiró del tejido apoya esta interpretación. También se ha descrito que el 17α -estradiol tiene una acción no genómica, al producir relajación en el músculo liso vascular (Salas et al., 1994; Rodríguez et al., 1996).

Así, el efecto relajante que induce el 17α -estradiol en el músculo liso vascular y uterino evidencian claramente que es una hormona biológicamente activa, con potencial vasodilatador y antiuterotónico.

Por otro lado, los resultados de este trabajo muestran que el 17α -estradiol también produce una respuesta uterotrófica significativa en ratas

castradas y que esta acción estrogénica fue 10 veces menor que la de su isómero 17β .

La observación de mayor relevancia fue que la respuesta uterotrónica del 17β -estradiol fue antagonizada por el 17α -estradiol en todos los rangos de dosis probadas, lo que permite sugerir que esta hormona produce una acción antiestrogénica que se lleva a cabo mediante el clásico efecto genómico de los estrógenos, que involucra la unión al receptor proteico nuclear/citosólico, formando el complejo hormona receptor, el cual, por activación interactúa con los elementos sensibles a la hormona en el DNA (Davison et al, 1989).

La potencia antiuterotrónica del 17α -estradiol para antagonizar la respuesta uterotrónica del 17β -estradiol concuerda con la que produce el tamoxifen, en los mismos rangos de dosificación con respecto a su isómero 17β (1:2 a 1:10) bajo las mismas condiciones experimentales (Agarwal y Bincal, 1991).

Las evidencias experimentales obtenidas corroboran la hipótesis propuesta, que en forma resumida dice: “se espera por una parte, que el isómero de 17β -estradiol, el 17α -estradiol, induzca un efecto antiestrogénico (genómico) y por otra se espera un efecto relajante (no genómico) en el útero de rata.”

Con estas evidencias el presente estudio describe por primera vez la acción biológica, no genómica y genómica, del 17α -estradiol en el útero de rata.

Con respecto al efecto relajante (no genómico) del 17α -estradiol su acción podría estar determinada por una disminución de la permeabilidad de la membrana de la célula muscular al ion Ca^{2+} , como ha sido reportado para su efecto relajante en el músculo liso vascular (Collins et al., 1993; Jiang et al., 1991; Zhang et al., 1994) y para la relajación que inducen otros esteroides sexuales (progestinas y andrógenos) sobre la contracción uterina (Perusquía et al. 1990, Perusquía y Villalón, 1996) y el músculo liso traqueal (Perusquía et al., 1997).

Referente al mecanismo de acción del efecto antiestrogénico (genómico) del 17α -estradiol, se conoce que la estructura que adopta el receptor de estrógenos es debida a la interacción con ligandos de diferentes dimensiones o distribución de funcionalidad, permitiendo la sensibilidad de la acción de diferentes hormonas (Katzenellenbogen et al., 1996; y Katzenellenbogen y Katzenellenbogen, 1996).

La afinidad del 17α -estradiol por el receptor de estrógenos ha sido medida en la rata, coneja, oveja y en el humano (Anstead et al., 1997). En

estudios realizados en rata en 1980, el grupo de Merriam reportó una afinidad entre el receptor de estrógenos y el 17α -estradiol del 11%. El presente trabajo se basa en un modelo fisiológico de antagonismo directo entre 17α - y 17β -estradiol con respecto al receptor, con un resultado de afinidad 10 veces menor, lo que concuerda con la afinidad descrita del 11 % por Merriam. Sin embargo, queda aún la posibilidad de que el antagonismo pueda ser mayor o menor dependiendo del tejido y de la función estrogénica estudiada.

Para analizar la importancia del anillo aromático en la afinidad de unión que presentan los estrógenos al receptor de estrógenos se han sintetizado muchos compuestos. Así, los compuestos no aromáticos en el anillo A muestran, menor afinidad de unión al receptor (RBA) (Zeelen y Bergink, 1980), lo que haría posible que el 17α -estradiol tenga una alta afinidad de unión al receptor de estrógenos.

En virtud de que el anillo A de ambos estrógenos 17α y 17β es aromático, poseen un gran potencial electrostático gracias a su propiedad resonante. Por lo tanto, es muy probable que sea una zona importante de interacción intermolecular no covalente con el receptor estrogénico (Kubli-Garfias, 1998).

Es necesario realizar estudios complementarios para correlacionar la estructura y la afinidad de unión del 17α -estradiol con el receptor de estrógenos, aunado al estudio del posible desplazamiento del 17β -estradiol por el 17α -estradiol en el receptor de estrógenos.

También serán necesarios estudios sobre aspectos más complejos de las interacciones subsecuentes del complejo E_2 -ER con los múltiples elementos del aparato regulador de transcripción para expresar la respuesta fisiológica.

Punto central de la presente tesis según los datos obtenidos, es que el 17α -estradiol no es una molécula inactiva como se había pensado, sino que presenta efectos no genómicos (relajantes) y genómicos (antiestrogénico) en el útero. Esto último muestra al 17α -estradiol como una antihormona capaz de antagonizar a su epímero el 17β -estradiol. El hecho de que el 17α -estradiol muestre la misma acción no genómica del 17β -estradiol pero contraria a la acción genómica de este isómero, concuerda con lo observado para la acción biológica de otro par de isómeros como son la testosterona y la epitestosterona, donde la epitestosterona, aparentemente sin función biológica, ejerce una acción antiandrogénica bloqueando el efecto genómico de la testosterona (Nuck y Lucky, 1987; Starka et al., 1989; Bicíková et al., 1992), y que ambos esteroides, testosterona y epitestosterona, producen una acción no genómica i.e., relajación uterina (Perusquía et al., 1996). Estas evidencias

muestran una similitud que se ha asociado al farmacóforo localizado en el anillo A de los dos compuestos.

La diferencia química entre 17α - y 17β -estradiol es la configuración $\alpha/trans$ o β/cis en el carbono 17, lo que obliga al grupo funcional hidroxilo a adoptar una posición hacia arriba de la molécula (17β) o hacia abajo (17α), ver fig. 10.

Así, la alta actividad antiestrogénica del 17α -estradiol podría ser explicada primero por que el sistema de anillos A, B y C del esteroide es reconocido por el receptor, lo que garantiza el antagonismo del 17β -estradiol y segundo, por que la configuración $\alpha/trans$ en el anillo D, es incapaz de promover la transcripción génica que permita a su vez desplegar el efecto estrogénico genómico. Asimismo, el efecto no genómico de ambos isómeros (17α - y 17β -estradiol) podría ser explicado por su similitud en el sistema de anillos A, B y C del esteroide.

Desde el punto de vista fisiológico, es difícil explicar la acción antagonista de una hormona, pero de manera especulativa dicha acción podría actuar regulando, la respuesta del 17β -estradiol por competencia con el receptor a estrogénos. Por ello, estudios posteriores podrían proporcionar mayor información sobre los mecanismos de regulación e inhibición de los efectos biológicos del 17β -estradiol sobre el ciclo vaginal, el endometrio,

miometrio, las trompas uterinas, mamas o el metabolismo del hueso, además de la conducta sexual en la hembra y los procesos de implantación, entre muchos otros que tienen que ver directamente con los eventos estrogénicos normales.

La acción antiestrogénica del 17α -estradiol podría representar una novedosa aplicación clínica en el tratamiento del cáncer mamario, pulmonar, algunos de ovario, el adenocarcinoma de endometrio, la hiperplasia endometrial y todos aquellos padecimientos estrógeno dependientes.

VIII. CONCLUSIONES.

- 1) El 17α -estradiol es una hormona con acción biológica, no genómica y genómica.
- 2) El 17α -estradiol es un relajante del útero al igual que el 17β -estradiol, por ejercer sus efectos sobre la membrana de la célula muscular lisa.
- 3) El 17α -estradiol actúa como antihormona por antagonizar la acción estrogénica del 17β -estradiol.
- 4) La diferencia estructural entre ambas moléculas hace pensar que el anillo A de la molécula de estradiol es la parte responsable de la acción no genómica, mientras que los anillos B, C y D de la acción genómica. Asimismo, el cambio de posición del grupo hidroxilo en C_{17} podría estar provocando los efectos genómicos opuestos.

IX. REFERENCIAS.

Agarwal, A.K. and Bindal, R.D. Estrogen receptor-binding affinity of tamoxifen analogs with various side chain and their biologic profile in immature rat uterus. *Steroids* 56: 486-489, 1991.

Anstead, G.M., Carlson, K.E. and Katzenellenbogen, J.A. The estradiol pharmacophore: Ligand structure-estrogen receptor binding affinity relationships and a model for the receptor binding site. *Steroids*. 62: 268-303, 1997.

Astwood, E.B. A six hour assay for the quantitative determination of estrogen. *Endocrinology*. 23: 25-31, 1938.

Barnea, A., Hajibeigi, A., Trant, J.M. and Mason, J.L. Expression of steroid metabolizing enzymes by aggregating fetal brain cells in culture: a model for developmental regulation of the progesterone 5 α -reductase pathway. *Endocrinology*. 127, 500-502, 1990.

Batra, S. Effects of some estrogens and progesterone on calcium uptake calcium release by myometrial mitochondria. *Biochem Pharmacol*. 22:803-9, 1973.

Batra, S., Bengtsoon, B. Effect of diethylstilboestrol and ovarian steroid on the contractile responses and calcium movements in rat uterine smooth muscle. *J. Physiol*. 276:329-42, 1978.

Bicíková, M., Hampl, R., and Stárka, L. Epitestosterone a potent competitive inhibitor of C21-steroid side chain cleavage in testis. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol*. 43 (7):721-724, 1992.

Blondeau, J.P., Baulieu, E.E. Progesterone receptor characterized by photoaffinity labelling in the plasma membrane of *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem. J*. 219, 785-792, 1984.

Borski, R.J., Helms, L.M.H., Richman, N.H., III. and Grau, E.G. Cortisol rapidly reduces prolactin release and cAMP and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ accumulation in the cichlid fish pituitary in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 2758-2762, 1991.

Briggs, M.H. and Brotherton, J.B. Pathways of Biosynthesis and Metabolism of Steroids In: Steroid, Biochemistry and Pharmacology. Academic Press London and New York. pp 59-79, 1970.

Brown, T.J., Maclusky, N.J., Toran-Allerand, C.D., Zielinski, J.E. and Hochberg, R.B. Characterization of 11 β -methoxy-16 α [125I]iodoestradiol binding: neuronal localization of estrogen binding sites in the developing rat brain. *Endocrinology.* 124: 2074-2088, 1989.

Burstein, S. and Gut, M. Biosynthesis of pregnenolone. *Rescent Prog. Horm. Res.* 27: 303-349, 1971.

Castagnetta, L., D'Aquino, S., Labrie, F., and Bradlow, H.L. (Eds.), Steroid formation, degradation, and action in peripheral tissues. *Ann. NY. Acad. Sci.* 595: 1-489, 1990.

Cole, D.F. The effects of oestradiol on the rat uterus. *J. Endocr.,* 7: 12-23, 1950.

Chien, E.J., Morrill, G.A. and Kostellow, A.B. Progesterone induce second messengers at the onset of meiotic maturation in the amphibian oocyte: Interrelationships between phospholipid N-methylation, calcium and diacylglycerol release, and inositol phospholipid turnover. *Mol. Cell Endocrinol.* 81, 53-67, 1991.

Collins, P., Rosano, G.M.C., Jiang, C., Lindsay, D., Sarrel, P.M. and Poole-Wilson, P.A. Cardiovascular protection by oestrogen a calcium antagonist effect? *Lancet* 341:1264-1269, 1993.

Csapo, A. and Corner, G.W. The antagonistic effect of estrogen and progesterone on the staircase phenomenon in uterine muscle. *Endocrinology.* 51: 378-385, 1952.

Davidson, N.E. and Lippman, M.E. The role of estrogens in growth regulation of breast cancer. *Cit. Rev. Oncol.* 1:89-91, 1989.

De la Peña, A., López y López, L., Ibañez, R., Rubio-Póo, C. and Perusquía, M. Comparative effect of prolame, a synthetic amino-estrogen, with estradiol and estrone on the contractility of the isolated rat myometrium. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 34: 85-87, 1991.

Frairia, R., Bradlow, H.L., and Gaidano, G. (Eds.), Steroid-protein interactions: Basic and clinical aspects. *Ann. NY. Acad. Sci.* 538: 1-326, 1988.

Frank, R. T., Bonham, C.D. and Gustavson, R.G. A new method of assaying the potency of the female sex hormone based upon its effect on the spontaneous contraction of the uterus of white rat. *Amer. J. Physiol.*, 74: 395-399, 1925.

French-Mullen, J.M.H. and Spence, K.T. Neurosteroids block Ca^{2+} channel current in freshly isolated hippocampal CA1 neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 202, 269-272, 1991.

Finidori-Lepicard, J., Schorderet-Slatkine, S., Hanoune, J. and Baulieu, E.E. Progesterone inhibits membrane bound adenylate cyclase in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature.* 292, 255-257, 1981.

Gabella, G. Structural apparatus for force transmission in smooth muscle. *Physiol. Rev.* 64: 455-477, 1984.

Gee, K.W., Bolger, M.B., Brinton, R.E., Coirini, H. and Mcewen, B.S. Steroid modulation of chloride ionophore in the rat brain: structure-activity requirements, regional dependence and mechanism of action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246, 803-812, 1982.

Gee, K.W., Chang, W-C., Brinton, R.E. and Mcewen, B.S. GABA-dependent modulation of the Cl^- ionophore by steroids in the rat brain. *Eur J. Pharmacol.* 136, 419-423, 1987.

Girasole, G., Jilka, R.L., Passeri, G., Boswell, S., Boder, G., Williams, D.C. and Manolagas, S.C. 17β -estradiol inhibits interleukin-G production by bone marrow-derived stromal cells and osteoblasts in vitro: a potential mechanism for the antiosteoporotic effect of estrogens. *J. Clin. Invest.* 89: 883-891, 1992.

Gore-Langton, R.E., and Armstrong, D.T. in: *Follicular steroidogenesis and its control*. Knobil, E., and Neill, J.D. (EDS) *The physiology of reproduction*, 2^o ed Raven Press, New York, 1994.

Gorski, J., Toft, D.O., Shyamala, G., Smith, D. and Notides, A. **Hormone receptor: Studies on the interaction of estrogens with the uterus.** *Recent Prog. Horm. Res.* 24: 45-80, 1968.

Gosset, W.S. "Student" **The probable error of a mean.** *Biometrika.* 6: 1-25, 1908.

Guyton. A.C. y Hall. J.E. **Tratado de fisiología Médica.** En: *Contracción y excitación del músculo liso.* Ed: Interamericana-McGraw-Hill. novena edición. pp106-107, 1997.

Harrison. N.L. and Simmonds, M.A. **Modulation of the GABA receptor complex by a steroid anaesthetic.** *Brain Res.* 323, 287-292,1984.

Harrison, N.L., Majewska, M.D., Harrington, J.W. and Barker, J.L. **Structure-activity relationships for steroid interaction with the γ -aminobutyric acid_A receptor complex.** *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 241, 346-353, 1987.

Hisaw, F.L. **Comparative effectiveness on fluid inhibition and growth of the rat's uterus.** *Endocrinology.* 64: 276-289, 1959.

Holden, R.B. **Vascular reactions of the uterus of the immature rat.** *Endocrinology.* 25: 593-596. 1939.

Jensen, E.V. and Jacobsen, H.I. **Basic guides to the mechanism of estrogen action.** *Recent Prog. Horm. Res.* 18: 387-414, 1962.

Jensen, EV., Suzuki, T. and Kawashima, T. A. **Two step mechanism for the interaction of estradiol with rat uterus.** *Proc. Natl. Acad. Sci.* 59:632-638.1968.

Jiang, C., Sarrel, P.M., Linsay, D.C., Poole-Wilson, P.A. and Collins, P. **Endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery by 17 β -oestradiol in vitro.** *Br. J. Pharmacol.* 104: 1033-1037, 1991.

Jones, A.W. Influence of oestrogen and progesterone on electrolyte accumulation in the rabbit myometrium. *J. Physiol. (London)* 197: 19-20, 1968.

Jung-Testa, I., HU, Z.Y., Baulieu, E.E. and Robel, P. Neurosteroids: biosynthesis of pregnenolone and progesterone in primary cultures of rat glial cells. *Endocrinology*. 125, 2083-2091, 1989.

Katzenellenbogen, J.A., O'Malley, B.W. and Katzenellenbogen B.S. Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: interaction with multiple effector sites a basis for the cell- and promoter-specific action of these hormones. *MolEndocrinol*. 10: 119-131, 1996.

Katzenellenbogen, J.A., and Katzenellenbogen, B.S. Nuclear hormone receptors: Ligand-activated regulators of transcription and diverse cell responses. *Chem Biol*. 3:529-536, 1996.

Krieger, N.R. and Scott, R.G. 3α -Hidroxiesteroxireductase in rat brain. *J. Neurochem*. 42: 1866-1870, 1984.

Kubli-Garfias, C. Comparative study of the electronic structure of estradiol, epiestradiol and estrone by ab initio theory. *Theochem*. 452(1-3) 175-183, 1998.

Kubli-Garfias, C., López-Fiesco, A., Pacheco-Cano, M.T., Ponce-Monter, H. and Bondani, A. In vitro effects of androgens upon the spontaneous rat uterine contractility. *Steroids*. 35: 633-641, 1980.

Kumar, D., Wagatsuma, T., Sullivan, W. J. and Barnes, A.C. Studies on the mechanism of action of progesterone on the human myometrium. *Amer. J. Obstet: Gynec*. 90: 1355-1359, 1964.

Lan, N.C., Chen, J-S., Belelli, D., Pritchett, D.B., Seeburg, P.H. and Gee, K.W. A steroid recognition site is functionally coupled to an expressed GABA_A-benzodiazepine receptor. *Eur. J. Pharmacol. (Mol. Pharmacol. Sect.)*. 188, 403-406, 1990.

Landers, J.P. and Spelsberg, T.C. New concepts in steroid hormone action: Transcription factors, proto-oncogenes and the cascade model for steroid regulation of gene expression In: *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*. Stein G, Stein, J. Lian, L (eds.) Boca Raton, FL: CRC Press. pp 2:19-63, 1992.

Law, R.O. Techniques and application of extracellular space determination in mammalian tissues. *Experimentia*. 38: 411-420, 1982.

Litchfield, J.T. and Wilcoxon, F.A. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96, 99-113, 1949.

Lieberherr, M. and Grosse, B. Androgens increase intracellular calcium concentration and inositol 1,4,5-triphosphate and diacylglycerol formation via pertussis toxin-sensitive G-protein. *J. Biol Chem.* 269: 7217-7223, 1994.

Lieberman, S., Greenfield, N.J. and Wolfson, A. A heuristic proposal for understanding steroidogenic processes *Endocr. Rev.* 5: 128-148, 1984.

Leszczynski, D.E. and Schafer, R.M. Metabolic conversion of six steroid hormones by human plasma high-density lipoprotein. *Biochim. Biophys. Acta* 1083: 18-28, 1991.

Loeb, L. and Kountz, C. The effect of injection of follicular extract on the sex organs in the guinea pig and interaction between the follicular substances and substances given of the corpus luteum. *Amer. J. Physiol.* 84: 283-306, 1928.

Macleod, J. and Reynolds, S.R.M. Vascular metabolic and motility responses of uterine tissue following administration of oestrin. *Proc. Soc. Exp Biol. Med.* 37: 666-668, 1938.

Majewska, M.D., Harrison, N.L., Schwartz, R.D., Barker, J.L. and Paul, S.M. Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor, *Science*. 232, 1004-1007, 1986.

Markee, L.E. Rhythmic vascular uterine changes. *Amer. J. Physiol.* 100: 32-39, 1932.

Mathur, C., Prasad, V.V.K., Raju, V.S., Welch, M., and Lieberman, S. Steroids and their conjugates in the mammalian brain *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 85-88, 1993.

McEwen, B.S. Non-Genomic and Genomic effects of steroids on Neuronal Activity. *Trens. Pharmac. Sci.* 12: 141-147, 1991.

Melcangi, R.C., Celotti, F., Ballabio, M., Castano, P., Massarelli, A., Poletti, A. and Martini, L. 5α -Reductase activity in isolated and cultured neuronal and glial cells of the rat. *Brain Res.* 516, 229-236, 1990.

Merriam, G.R., Maclusky, N.J., Johnson, L.A. and Naftolin, F. 2-Hydroxyestradiol- 17α and 4-Hydroxyestradiol- 17α , catechol estrogen analogs with reduced estrogen receptor affinity. *Steroids* 36:13-, 1980.

Minami, T., Oomura, Y., Nabekura, J. and Fukuda, A. 17β -Estradiol depolarization of hypothalamic neurons is mediated by cyclic AMP. *Brain Res.* 519, 301-307, 1990.

Morrow, A.L., Suzdak, P.D. and Paul, S.M. Steroid hormone metabolites potentiated GABA receptor-mediated chloride ion flux nanomolar potency. *Eur. J. Pharmacol.* 142, 483-485, 1987.

Morrow, A.L., Pace, J.R., Purdy, R.H. and Paul, S.M. Characterization of steroid interactions with γ -aminobutyric acid receptor-gated chloride ion channels: evidence for multiple steroid recognition sites. *Mol. Pharmacol.* 37, 263-270, 1990.

Mueller, G.C., Herranen, A.M. and Jervell, K.J. Studies on the Mechanism of action of estrogens, *Recent. Prog. Horm. Res.* 14: 95-129, 1958.

Mueller, G.C. Role of RNA and Protein synthesis in estrogen action, in Mechanisms of hormonal action (P. Karlson, eds.), *Academic Press, New York.* pp 228-245, 1965.

Nasatzky, E., Schwartz, Z., Boyan, B.D., Soskolne, W.A. and Ornoy, A. Sex dependent effects of 17-beta-estradiol on chondrocyte differentiation in culture. *J. Cell. Physiol.* 154(2):359-366, 1993.

Nuck, B.A. and Lucky, A.W. Epitestosterone: a potential new antiandrogen. *J. Invest. Dermatol.* 89: 209-211, 1987.

O'Malley, B.W., McGuire, W.L., Kobler, P.O. and Korenman, S.G. Studies on the Mechanism of steroids hormone regulation of synthesis of specific proteins. *Recent. Prog. Horm. Res.* 25: 105-160, 1969.

Perusquía, M., Campos, G. Inhibitory effect of androgens and progestins on the contraction induced by oxytocin in the myometrium. *Med Sci Res.* 19: 177-9, 1991.

Perusquía, M., Campos, G, Corona, J, Kubli-Garfias, C. Antagonism by 5-reduced steroids of the tonic and phasic contractions induced by serotonin in the isolated rat uterus. *Proc West Pharmacol Soc.* 34:395-8, 1991.

Perusquía, M., Corona, M, Kubli-Garfias, C. Inhibitory effect of 5-reduced androgens and progestins on the uterine contraction induced by acetylcholine. *Proc West Pharmacol Soc.* 34:89-92, 1991.

Perusquía, M and Kubli-Garfias, C. External calcium dependence of the uterine contraction induced by prostaglandins E_2 and $F_{2\alpha}$ and its antagonism with natural progestins. *Prostaglandins.* 43:445-55, 1992.

Perusquía, M., García-Yañez, E., Ibañez, R. and Kubli-Garfias, C. Non-genomic mechanism of action delta-4 and 5-reduced androgens and progestins on the contractility of the isolated rat myometrium. *Life Sci.* 47(17): 1547-1553, 1990.

Perusquía, M., Hernández, R. and Kubli-Garfias, C. Epitestosterone induces testosterone-like uterine relaxation. *10th International Congress of Endocrinology*, San Francisco CA., June 12-14, 1996.

Perusquía, M. and Villalón, C.M. The relaxant effect of sex steroids in the rat myometrium is independent of the gamma-amino butyric acid system. *Life Sci.* 58, 913-926, 1996.

Peters, J.A., Kirkness, E.F., Callachan, H., Lambert, J.J. and Turner, A.J. Modulation of the GABA_A receptor by depressant barbiturates and pregnane steroids. *Br. J. Pharmacol.* 94, 1257-1269, 1988.

Petitti, N. and Etgen, A.M. (1992). Progesterone promotes rapid desensitization of alpha 1-adrenergic receptor augmentation of cAMP formation in rat hypothalamic slices. *Neuroendocrinology*. 55, 1-8, 1992.

Prasad, V.V.K. and Lieberman, S. Reconsidering some of the biosynthetic pathways leading to formation of C19 Steroids. *Ann. NY. Acad. Sci.* 595: 1-16, 1990.

Prince, R.J. and Simmonds, M.A. Steroid modulation of the strychnine-sensitive glycine receptor. *Neuropharmacology*. 31, 201-205, 1992.

Provencher, P.H., Roy, R. and Belanger, A. Pregnenolone Fatty acid esters incorporated into lipoproteins: Substrates in adrenal steroidogenesis. *Endocrinology*. 130: 2717-2724, 1992.

Ravindra, R. and Aronstam, R.S. Progesterone, testosterone and estradiol-17beta inhibit gonadotropin-releasing hormone stimulation of G protein GTPase activity in plasma membranes from rat anterior pituitary lobe. *Acta Endocrinol.* 126, 345-349, 1992.

Reynolds, S. R. M. Studies on uterus : The influence of the ovary on the motility of the non-gravid uterus of the unanesthetized rabbit. *J.Physiol.* 97: 706-721, 1931.

Reynolds, S. R. M. "Physiology of the Uterus", 2nd ed (2nd printing, 1965). *Harper (Hoeber)*, New York. 1949.

Reynolds, S. R. M. The distention-growth response in oestrin-treated rabbits. *Proc. Soc. Exper. Biol & Med*: 36: 453-456, 1937.

Reynolds, S.R.M. and Kaminester, S. Failure to obtain in immature rabbits uterine growth by chronic distention *Proc. Soc. Exper. Biol & Med* 36: 457-461, 1937.

Roberts, E. Pregnenolone -from Selye to Alzheimer and a model of the pregnenolone sulfate binding site on the GABA_A receptor. *Biochemical Pharmacology*. 49(1): 1-16, 1995.

Robinson, J.A. and Karabolos, H.J. Conversion of progesterone by rat anterior pituitary tissue to 5 α -pregnane-3,20-dione and 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one. *Endocrinology*. 93, 430-435, 1973.

Robinson, J.A. and Spelsberg, T.C. Mode of action at the cellular level with specific reference to bone cells. In: "*Estrogens and Antiestrogens: basic and clinical aspects*". R. Lindsay, D.W. Dempster & V.C. Jordan Ed: Lippincott-Raven, Philadelphia, PA. pp 43-62, 1997.

Rodríguez, J., García de Boto, M.J. and Hidalgo, A. Mechanism involved in the relaxant effect of estrogens on rat aorta strips. *Life Sci*. 58(7):607-615, 1996.

Rommerts, F.F.G. and Van der Molen, H.J. Occurrence and localization of 5 α -steroid reductase, 3 α - and 17 β -hydroxysteroid dehydrogenase in hypothalamus and ather brain tissues of the male rat. *Biochem. Biophys. Acta*. 248, 489-502, 1971.

Rories, C. and Spelsberg, T.C. Ovarian steroid action on gene expression: Mechanisms and models. *Ann. Rev. Physiol*. 51: 653-681, 1989.

Ross, R. and Klebanoff, S.J. The smooth muscle cell. I. In vivo synthesis of connective tissue proteins, *J. Cell Biol*. 50: 159-171, 1971.

Ross, R. The smooth muscle cell. II. Growth of smooth muscle and formation of elastic fibers, *J. Cell: Biol*. 50: 172-186, 1971.

Sadler, S.E. and Maller, J.L. Identification of a steroid receptor on the surface of *Xenopus* oocyte by photoaffinity labeling. *J. Biol. Chem*. 257, 355-361, 1982.

Salas, E., López, M.G., Villarroya, S., Sánchez-García, P., De Pascua, R., Dixon, W.R. and García, A.G. Endothelium-independent relaxation by 17 α -estradiol of pig coronary arteries. *Eur. J. Pharmacol*. 258:47-55, 1994.

Schwartz, Z., Srkoine, W.A., Neubauer, T., Goldstein, M., Adi, S., And Ornoy, A. Direct and sex-specific enhancement of bone formation and calcification by sex-steroids in fetal mice long bone in vitro. *Endocrinology* 129(3):1167-1172, 1991.

Schofield, B. The influence of the ovarian hormone on myometrial behaviour in the intact rabbit. *J. Physiol. (London)*, 129: 289-304, 1955

Shoenberg, C.F. and Stewart, M.J. Filament formation in muscle homogenates. *J. Muscle. Res. Cell. Motil.* 1: 117-126, 1980.

Singer, S.J. and Nicolson, G.L. The fluid mosaic model of the structure of cell membranes. *Science*. 175: 720-723, 1972.

Smith, L.D. The induction of oocyte maturation: transmembrane signaling events and regulation of the cell cycle. *Development*. 107, 685-689, 1989.

Spelsberg, T.C., Rories, C. and Regman, J. Steroid action on gene expression: Possible roles of regulatory genes and nuclear acceptor sites. *Biol. Reprod* 40: 54-69, 1989.

Stárka, I., Biciková, M. and Hampi, R. Epitestosterone -an endogenous antiandrogen? *J. Steroid Biochem.* 33(5): 1019-1021, 1989.

SU, T-P., London, E.D. and Jaffe, J.H. Steroid binding at σ receptors suggests a link between endocrine, nervous and immune system. *Science*. 240, 219-221, 1988.

Szego, C.M. and Roberts, S. Steroid action and interaction in uterine metabolism. *Recent. Prog. Horm. Res.* 8: 419-468, 1953.

Talbot, N.B., Lowry, O.H. and Astwood, E.B. Influence of estrogen on the electrolyte pattern of the immature rat uterus. *J. Biol Chem.* 132: 1-9, 1940.

Tesarik, J., Moss, J. and Mendoza, C. Stimulation of protein tyrosine phosphorylation by a progesterone receptor on the cell surface of human sperm. *Endocrinology*. 133: 3328-3335, 1993.

Truss, M. and Beato, M. Steroid hormone receptors: Interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocr Rev.* 14: 459-479, 1992.

Tsai, S.Y., Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. The steroid receptor superfamily: Transactivators of gene expression. In: Parker MG, (eds.) *Nuclear Hormone Receptors*. New York: Academic Press 103-124, 1991.

Turner, D.M., Ramson, R.W., Yang, JS-J. and Olsen, R.W. Steroid anesthetics and naturally occurring analog modulate the γ -aminobutyric acid receptor complex at a site distinct from barbiturates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 248, 960-966, 1989.

Vargas, R., Tomas, G., Wroblewska, B. and Ramwell, P.W. Differential effects of 17α and 17β -estradiol on $\text{PGF}_2\alpha$ mediated contraction of the porcine coronary artery. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leucotriene Res* 19:227-280, 1989.

Wight, T.N. and Ross, R. Glycosaminoglycans in primate arteries II. Synthesis and secretion by arterial smooth muscle cell in culture. *J. Cell Biol.* 67: 675-686, 1975.

Zeelen, F.S. and Bergink, E.W. In: Raus J. Martens H. LeClercq G. (eds). *Cytotoxic Estrogens in Hormone Receptive Tumors*. Academic. London. pp 39-48, 1980.

Zhang, F., Ram, J.L., Standley, P.R. and Sower, J.R. 17β -estradiol attenuates voltage-dependent Ca^{2+} currents in A7r5 vascular smooth muscle cell line. *Am. J. Physiol.* 226 (Cell Physiol. 35): C975-C980, 1994.