



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**Descripción Farmacológica de los Efectos del 17-
beta-estradiol sobre los canales de potasio en
células de músculo liso vascular.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A :

HÉCTOR SUCILLA PÉREZ



MÉXICO, D. F.



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUÍMICA**

2004



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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:

Presidente ELIA BROSLA NARANJO RODRÍGUEZ

Vocal MARÍA ELENA IBARRA RUBIO

Secretario VÍCTOR MENDOZA FERNÁNDEZ

1^{er} Suplente GUILLERMO CELESTINO CARDOZO SALDAÑA

2^{do} Suplente JOSÉ LUIS BUSTO SÁNCHEZ

Departamento de Farmacología, Edificio de Investigación, 6to. Piso,
Facultad de Medicina, UNAM.

Asesor:



Dr. VÍCTOR MENDOZA FERNÁNDEZ

Sustentante:



HÉCTOR SUCILLA PÉREZ

"Lo mismo es nuestra vida que una comedia; no se atiende a si es larga, sino a si la han representado bien. Concluye donde quieras, con tal de que pongas buen final".

Lucio Anneo Séneca

"La vida es muy peligrosa. No por las personas que hacen el mal, sino por las que se sientan a ver lo que pasa".

Albert Einstein

"La grandeza del ser humano no se encuentra en su sabiduría, ni en los actos buenos y trascendentales que éste ha realizado; ésta se encuentra en conocer lo que ignora, y en reconocer y corregir sus errores".

Héctor Sucilla Pérez

Dedicatorias

A mi madre **María Eugenia** y a su esposo **Juan Carlos**, por ser el mejor y más digno ejemplo de vida; por todo el amor, el cariño, la comprensión y el apoyo que me han brindado día a día; por haberme enseñado a disfrutar mis éxitos con humildad, a levantarme de mis fracasos con la frente en alto cuantas veces sea necesario, a no desistir en el afán por conseguir mis metas y a ser generoso con los demás.

A mi padre **Héctor**, por compartir conmigo su amor y cariño; por exigirme y enseñarme a dar más del 100% en cualquier actividad que desempeñe; por haber forjado en mi persona el carácter de un hombre responsable, dedicado y trabajador; porque él me enseñó que no basta con alcanzar el éxito, sino que hay que mantenerse exitoso por siempre.

A mis hermanas **Stephanie, Karla, María Fernanda** y a mi sobrino **Diego** por brindarme todos esos besos, abrazos y risas que han alimentado y fortalecido mi alma desde su nacimiento; y para que este trabajo les sirva de ejemplo para que culminen todos sus sueños, incluyendo una carrera profesional.

A **Sandra**, por alimentar mi corazón con ese amor que nutrió mi alma de alegría e ilusiones durante los últimos tres años de mi carrera; por haberme enseñado a reconocer mis errores; y por devolverme la confianza en mí mismo que desde hace mucho tiempo había perdido.

A mis amigos entrañables **Xavier, José Manuel, Pedro, Roberto, Ricardo, Jonathan y Carlos**, por su apoyo incondicional y por esas largas noches de juerga, charlas, discusiones y pleitos en las que aprendí algo mucho más valioso que el conocimiento de los libros, gracias a ellos aprendí a vivir y a disfrutar intensamente cada segundo de mi existencia.

Con todo mi amor y cariño, Héctor.

Agradecimientos

A mis amigos y compañeros de la UNAM: Víctor, Tibisai, Sebastián, Roberto ("Güero"), Víctor Manuel ("Brócoli"), Jarek, Diego, Marcela ("Marge"), Arturo ("Jerk"), Pablo ("Chuparebel"), Juan, Alfonso, Joanna, Magali, Omar, Odin, Josué, Alejandra, Mario ("Borrego"), Sofía, Felipe y Cristina; por haber convertido una institución académica en un segundo hogar donde se olvidaban las penas y las tristezas y se transformaban en risas y bromas, que le levantan el ánimo a cualquiera.

Al Dr. Víctor Mendoza Fernández, por el tiempo, los conocimientos y el entusiasmo brindados para la culminación de este proyecto.

A mis familias materna y paterna, por el inmenso cariño que me ha brindado durante tantos años y por estar siempre pendiente de mis estudios.

A las familias Hernández-Venegas, Arriaga, Cacho, Piñera-Contreras, Venegas-Santos, Zepeda y Mollinedo, por abrirme sus puertas desde hace algunos años y darme la oportunidad de convivir y aprender de ellos.

A mis profesores de los colegios maristas y de la UNAM, porque sus enseñanzas me han permitido llegar a ser una persona con valores y vocación de servicio.

A tod@s aquell@s que me abandonaron en los momentos que más l@s necesité, porque gracias a ell@s aprendí a disfrutar la soledad y comprendí que yo soy el único dueño de mis triunfos y de mis fracasos.

¡Mil gracias!

Abreviaturas.

AC	adenilato ciclasa
ACh	acetilcolina
ADN	ácido desoxiribonucleico
AMPc	adenosinmonofosfato ciclico
ARN	ácido ribonucleico
ATP	adenosintrifosfato
4-AP	4-aminopiridina
BK	maxicanal de alta conductancia
Ca ²⁺	calcio
[Ca ²⁺] _i	concentración de calcio intracelular
[Ca ²⁺] _{ex}	concentración de calcio extracelular
CaCl ₂	cloruro de calcio
CCLMDC	enzima cinasa de la cadena ligera de la miosina dependiente de calmodulina
CMLV	células de músculo liso vascular
CO ₂	dióxido de carbono
DAG	diacilglicerol
DNAsa	DNA pilimerasa
E ₁	estrone
E ₂	estradiol
E ₃	estriol

EGTA	etilenglicol-bis (beta-amino etilen éter)-N,N,N',N'-tetracético
ER α	receptor alfa para estrógenos
ER β	receptor beta para estrógenos
GC	guanilato ciclasa
GMPC	guanosínmonofosfato cíclico
Gli	glibenclamida
HDL	lipoproteínas de alta densidad
HEPES	N-2 hidroxietilpeperacina-N-2 ácido etanosulfónico
IbTX	iberiotoxina
i.p.	Intraperitoneal
IP ₃	inositol trifosfato
K ⁺	potasio
K _{ATP}	canal de potasio sensible a ATP
K _{Ca} ²⁺	canal de potasio dependiente de calcio
K _{IR}	canal de potasio de rectificación de entrada
K _V	canal de potasio dependiente de voltaje
KCl	cloruro de potasio
KDa	kilodaltones
KH ₂ PO ₄	fosfato ácido de potasio
KOH	hidróxido de potasio
LDL	lipoproteínas de baja densidad
MAP	proteín cinasa activada por mitógeno

MgSO ₄	sulfato de magnesio
MLV	músculo liso vascular
mM	milimolar
ms	milisegundos
mV	milivolts
μM	micromolar
NA	noradrenalina
Na ⁺	sodio
NaCl	cloruro de sodio
NADPH	fosfato de dihidronicotinamida adenindinucleótido
NaHCO ₃	bicarbonato de sodio
nM	nanomolar
NO	óxido nítrico
NOS	óxido nítrico sintasa
O ₂	oxígeno
PA	potencial de acción
PDE	fosfodiesterasa
pF	picofaradios
PGI ₂	prostaglandina
PI	fosfatidilinositol
PKA	proteín cinasa A
PKG	proteín cinasa G

Abreviaturas

PLC	fosfolipasa C
RE	retículo endoplásmico
SK	canales de baja conductancia
SR	retículo sarcoplásmico
TEA	tetraetilamonio
TGI	tracto gastrointestinal

Índice.

	Páginas
1.- Resumen.	1-2
2.- Introducción.	3
2.1. Músculo liso vascular.	3
2.1.1. Descripción anatómica del músculo liso vascular.	3-4
2.1.2. Mecanismo de contracción y relajación del músculo liso vascular.	4-5
2.1.3. Modulación de la contracción y relajación del músculo liso vascular.	6-8
2.2. Canales iónicos. (Generalidades)	8-10
2.2.1. Canales iónicos en células de músculo liso vascular.	10-11
2.2.2. Canales de potasio presentes en músculo liso vascular.	12-13
2.2.2.1. Canales de potasio dependientes de voltaje (K_V).	13
2.2.2.2. Canales de potasio de rectificación de entrada (K_{IR}).	13-14
2.2.2.3. Canales de potasio activados por calcio ($K_{Ca^{2+}}$).	14-15
2.2.2.4. Canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}).	15-16
2.3. Estrógenos.	17
2.3.1. Estructura química de los estrógenos y biosíntesis.	17-19
2.3.2. Fisiología de los estrógenos.	20-21
2.3.3. Mecanismo de acción clásico o genómico de los estrógenos en músculo liso vascular.	21-22
2.3.4. Mecanismos de acción no genómicos de los estrógenos en músculo liso vascular.	23-24
3.- Justificación.	25-26
4.- Planteamiento del problema.	27
5.- Hipótesis y Objetivos.	28
5.1. Hipótesis general.	28
5.2. Objetivos generales.	28
5.3. Hipótesis particulares.	28-29
5.4. Objetivos particulares.	29

6.- Fundamentos teóricos de la técnica.	30
6.1. Bloqueadores de canales de K ⁺ .	30
6.2. Técnica de patch-clamp.	31-33
7.- Materiales y Métodos.	34
7.1. Reactivos.	34
7.2. Estudios Isométricos.	34-35
7.3. Obtención de las células de músculo liso vascular.	36-37
7.4. Equipo de registro electrofisiológico.	38-39
7.5. Protocolo farmacológico.	40
7.6. Análisis estadístico.	41
8.- Resultados.	42
8.1. Efecto relajante del 17-beta-estradiol sobre anillos de aorta y su dependencia con la concentración de K ⁺ extracelular.	42-43
8.2. Caracterización de las propiedades eléctricas y de los canales iónicos presentes en las células de músculo liso vascular.	44-46
8.3. Efectos del 17-beta-estradiol y algunos análogos sobre las corrientes de potasio presentes en CMLV.	47-48
8.4. Efecto del tamoxifen e ICI-182, 780 y cicloheximida sobre la acción del 17-beta-estradiol en las corrientes de potasio.	49-53
9.- Discusión de Resultados.	54-57
10.- Conclusiones.	58
11.- Bibliografía.	59-64

1.- Resumen.

Evidencias clínicas y experimentales proponen al 17β -estradiol como una hormona con acciones protectoras sobre el sistema cardiovascular. Los mecanismos por los cuales, esta hormona y sus análogos sintéticos generan esta protección aún no están completamente dilucidados. En este trabajo se describen los efectos directos del 17β -estradiol y dos de sus análogos sintéticos sobre las propiedades eléctricas y las corrientes de potasio de células de músculo liso vascular (CMLV) obtenidas de aortas de ratas macho. Proponiendo a los canales de potasio como elementos fisiológicos involucrados en los efectos protectores del 17β -estradiol en el sistema cardiovascular. El 17β -estradiol, es capaz de inducir relajación en anillos de aorta de rata previamente contraídos con potasio. Sin embargo, esta capacidad relajante disminuye conforme la concentración extracelular de potasio se iguala a su concentración intracelular (145 mM); lo que pone de manifiesto la importancia del flujo de potasio a través de la membrana celular para los efectos relajantes del 17β -estradiol. Por otra parte, el 17β -estradiol, el etinilestradiol (0.3-3 μ M) y el dietilestilbestrol (0.1-1 μ M) inducen un incremento dependiente de la concentración, en las corrientes de potasio sensibles a voltaje registradas en CMLV ($34.5\pm 2\%$; $33.2\pm 3\%$ y $42.4\pm 3\%$, respectivamente con la concentración más alta). Estos efectos se observaron a partir de los 2 min de aplicación de los estrógenos a las células; no obstante, la presencia de las diferentes concentraciones de las hormonas no provocó cambios significativos en el potencial de membrana (-46 ± 4 mV) ni en la capacitancia de la membrana celular (42.5 ± 3.6 pF). Los

efectos del 17β -estradiol y el dietilestilbestrol sobre las corrientes de potasio fueron bloqueados de manera competitiva por tamoxifen (30-300 nM) e ICI-182, 780 (1-30 nM) dos antagonistas específicos de los receptores α para los estrógenos ($ER\alpha$); según el análisis de Schild. Además, los efectos de ambas hormonas no fueron bloqueados por la presencia de cicloheximida (1 μ M), un inhibidor de la síntesis de proteínas. Estos resultados sugieren fuertemente que el 17β -estradiol y el dietilestilbestrol inducen sus efectos relajantes en el músculo liso vascular por medio de una interacción con su receptor ($ER\alpha$) y la modulación de los canales de potasio presentes en la membrana celular. Generando así un incremento en la actividad de los canales de potasio induciendo la salida de este ión, lo que propicia una hiperpolarización que impide la activación de los canales de calcio y por ende la entrada de este ión que es importante para la contracción del MLV. Finalmente, podemos concluir que los efectos protectores de esta hormona en parte pueden ser debidos a una acción directa sobre el músculo liso vascular a través de la modulación de los canales de potasio, acción que no involucra efectos genómicos.

2.- Introducción.

2.1. Músculo liso vascular.

2.1.1. Descripción anatómica del músculo liso vascular.

El músculo liso vascular (MLV) es un tipo de músculo liso multiunitario, constituido por unidades celulares individuales, alargadas, ahusadas y con extremos afilados, carentes de puentes de interconexión. Se ha descrito la presencia de un retículo sarcoplásmico que se encuentra poco desarrollado, escasas mitocondrias, aparato de Golgi, retículo endoplásmico y pocos ribosomas libres; así como pequeños depósitos de lípidos y glucógeno. Las proteínas actina y miosina-II se encuentran presentes en grandes cantidades formando filamentos intracelulares. Los filamentos de actina son finos, tienen aproximadamente un diámetro de 7 nm y los de miosina son gruesos, aproximadamente de 16 nm de diámetro. Cada filamento grueso de miosina está rodeado por al menos 7 filamentos de actina, ordenados de manera irregular (Geneser, 1996; Ganong, 2000). Existen cuerpos densos adheridos a la membrana celular que están enlazados mediante la α -actinina a los filamentos de actina. Gracias a esta interacción, el deslizamiento entre la actina y la miosina provoca una contracción de la musculatura vascular (Ganong, 2000). El MLV contiene también tropomiosina, proteína de aproximadamente 40 nm de longitud que se encuentra enlazada a la actina. Otros componentes son la calmodulina, que se localiza enlazada en cada extremo de la

tropomiosina y la troponina, proteína a la cual se une el calcio (Ca^{2+}) (Geneser, 1996; Ganong, 2000).

2.1.2. Mecanismo de contracción y relajación del músculo liso vascular.

El proceso de contracción y relajación en el músculo liso vascular está estrechamente relacionado con el valor del potencial de membrana en las células del MLV (CMLV). El valor del potencial de membrana de las CMLV en registros controles, se encuentra en un rango que va de los -45 mV a los -60 mV, dependiendo del tipo de tejido que se estudie (Nelson and Quayle, 1995). El MLV presenta contracciones continuas e irregulares asociadas a cambios en el potencial de membrana, las cuales son totalmente independientes de la inervación, este estado de contracción parcial sostenida es comúnmente denominado como tono muscular. Se estima que el lapso entre la despolarización inicial y la contracción máxima es de aproximadamente 500 ms, por lo que podemos decir que el acoplamiento entre la excitación y la contracción del MLV es lento, al compararlo con los del músculo esquelético y cardíaco donde ocurre en aproximadamente 10 ms (Guyton, 1995; Ganong, 2000).

Por otra parte, la concentración intracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) necesaria para que se inicie la contracción depende en gran medida de la concentración extracelular de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_{ex}$) que ingresa a la célula, vía canales de Ca^{2+} tipo L dependientes de voltaje. Éstos se abren cuando censan una despolarización en el potencial de membrana, por lo que cambios en el valor del potencial de membrana, también pueden modular el proceso de contracción y relajación en las CMLV (Ganong, 2000).

Para que se pueda llevar a cabo la contracción en el MLV, el Ca^{2+} intracelular debe unirse a la calmodulina y el complejo resultante se encarga de activar a su vez, a la enzima cinasa de la cadena ligera de la miosina dependiente de calmodulina (CCLMDC). Esta enzima cataliza la fosforilación de la cadena ligera de la miosina en un residuo de serina (serina cinasa). Con esta fosforilación se activa la enzima miosina ATPasa; con lo que, la actina se desliza sobre la miosina, dando origen a la contracción. Finalmente, la miosina se desfosforila por la miosina fosfatasa, llevando a las fibras de MLV a un estado de relajación (Ganong, 2000; Rang, 2000) (Figura 1).

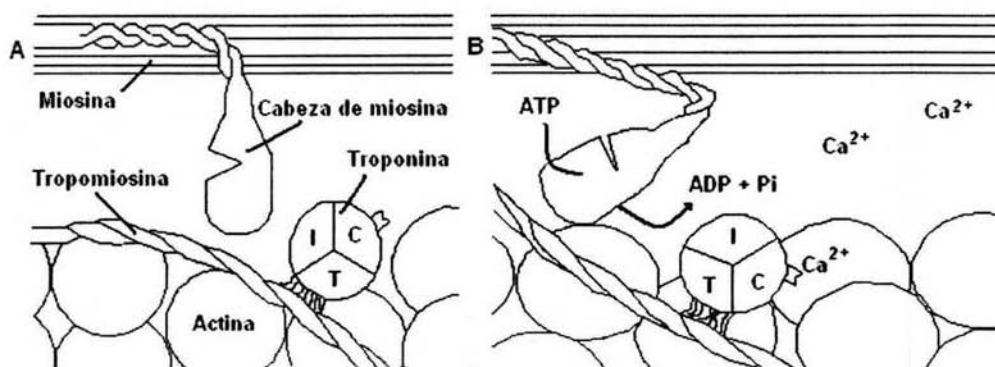


Figura 1. Muestra la interacción entre los componentes de la maquinaria contráctil en CMLV. **A)** Elementos que participan en la contracción del músculo liso, **B)** El calcio (Ca^{2+}) desencadena la contracción al unirse a la troponina C, lo que genera su desplazamiento y expone el sitio de enlace entre la miosina y la actina. Posteriormente la hidrólisis de ATP cambia la conformación de la cabeza de miosina e induce la unión entre la miosina y la actina. (Figura modificada de Ganong 2000, por Sucilla 2004).

2.1.3. Modulación de la contracción y de la relajación del MLV.

La contracción del MLV puede ser modulada por diferentes agentes químicos como las sustancias vasoactivas provenientes del endotelio (endotelinas y prostaciclinas), agentes α -agonistas, angiotensina II y bloqueadores de canales de Ca^{2+} . Los cuales intervienen de diversas formas, ya sea, incrementando la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ o bien, aumentando la afinidad de las miofibrillas al Ca^{2+} (Ganong, 2000; Rang, 2000). La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ puede aumentar debido a los siguientes mecanismos:

I) Receptores acoplados estrechamente a la fosfolipasa C (PLC), como es el caso de los receptores para la endotelina y a la angiotensina, que al interactuar con estos agentes, producen inositol trifosfato (IP_3), el cual se acopla a un receptor de rianodina presente en la membrana del retículo sarcoplásmico, propiciando la salida del Ca^{2+} contenido en éste y aumentando su concentración en el citosol.

II) La activación de los canales de Ca^{2+} tipo L, dependientes de voltaje en respuesta a una despolarización previa, permitiendo el paso a través de ellos de Ca^{2+} al interior de la célula. Se ha descrito, también, la presencia de otros canales catiónicos, que permiten el paso de Na^+ y de Ca^{2+} simultáneamente, provocando una despolarización.

La relajación del MLV es generada por ciertos agentes químicos que intervienen disminuyendo la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, o bien, actuando de manera directa sobre la maquinaria contráctil por medio de segundos mensajeros (Ganong, 2000; Rang, 2000). Los principales procesos de modulación de la relajación del MLV, se describen a continuación:

I) La activación de los canales de K^+ por fármacos (agentes exógenos) como: el pinacidil y el diazóxido, aumenta la permeabilidad de la membrana celular a este ión, permitiendo su salida; lo cual, produce una hiperpolarización de la membrana celular, que genera la inactivación de los canales de Ca^{2+} tipo L dependientes de voltaje.

II) La activación de receptores a nivel de membrana para PGI_2 , fármacos β -adrenérgicos, adenosina, los cuales, están acoplados a la adenilato ciclasa (AC), activándola y generando AMPc. El AMPc por su parte, activa a la proteína cinasa A (PKA), ésta ejerce un efecto de inhibición sobre la CCLMDC, propiciando así, la relajación.

III) Otro agente importante, que interviene en el fenómeno de la relajación del MLV, es el óxido nítrico (NO), el cuál difunde a través de la membrana y activa a la guanilato ciclasa (GC) para producir GMPc intracelular. El GMPc produce relajación activando a la PKG o disminuyendo la $[Ca^{2+}]_i$.

IV) Los compuestos como las metilxantinas, inhiben la contracción del MLV debido a la inhibición de la fosfodiesterasa (PDE), protegiendo así al GMPc y al AMPc de una posible degradación (Figura 2) (Rang, 2000).

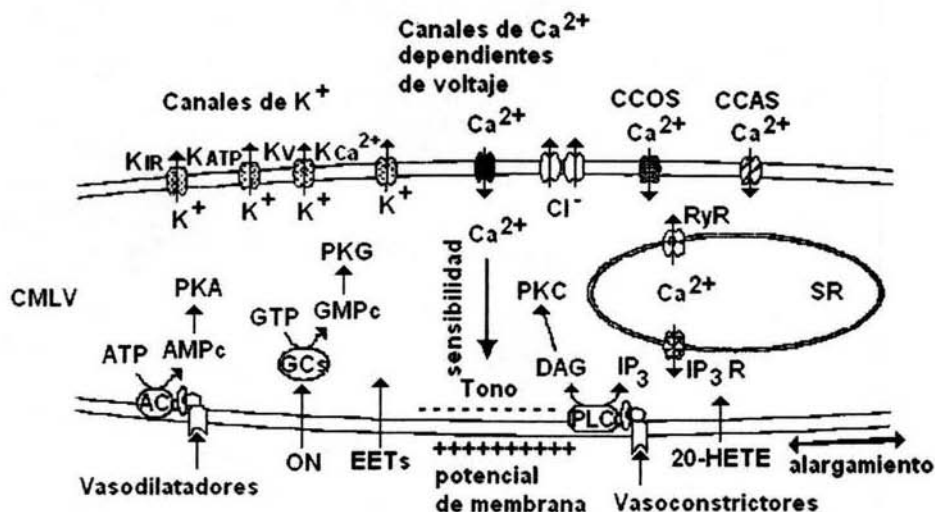


Figura 2. Procesos de modulación de la contracción involucrados en las CMLV. El proceso de contracción-relajación, esta fuertemente regulado por el valor del potencial de membrana, el cual está estrechamente relacionado con el flujo de iones a través de canales específicos, cuyo fin último es generar un incremento en la concentración de Ca²⁺ intracelular. Los receptores de agentes vasoconstrictores y relajantes se encuentran acoplados a cascadas de segunda mensajería que permiten aumentar o disminuir, respectivamente la afinidad de las enzimas contráctiles al Ca²⁺, o bien, generar mensajeros como el inositol trifosfato (IP₃) capaz de sacar Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico (RS) por medio de un receptor canal. Los canales de K⁺ y los canales de Ca²⁺ juegan un papel importante en la regulación del potencial de membrana y del tónus vascular. CCOS, canales de calcio operados por almagre de Ca²⁺; CCAS, canales catiónicos activados por almagre. (Figura elaborada por Mendoza y Sucilla, 2003).

2.2. Canales iónicos (Generalidades).

Las células tienen una estructura fundamental llamada membrana plasmática o membrana celular que separa el medio extracelular del medio intracelular, y que se encarga de regular el ingreso y la salida de ciertas sustancias en la célula; por eso se dice que tiene una permeabilidad selectiva. Esta membrana contiene aproximadamente

un 25 a 40% de lípidos dispuestos en una bicapa, y un 60 a 75% de proteínas que se suelen clasificar en dos grandes grupos: I) Proteínas integrales: que son aquellas que atraviesan toda la membrana, y II) proteínas periféricas: que se encuentra unidas a la membrana exclusivamente en las partes exteriores de la bicapa lipídica. Los canales iónicos son proteínas de transporte que se encuentran clasificados dentro de las proteínas integrales que permiten el flujo de agua y de diversos iones a través de la membrana. Los canales iónicos son proteínas que permiten el paso específico de ciertos iones (Ca^{2+} , K^+ , Na^+), mientras que los canales catiónicos permiten el paso de iones positivos sin mostrar especificidad alguna (Avers, 1991; Junqueira, 1997).

La permeabilidad de la membrana celular a diferentes iones permite que las células se polaricen eléctricamente, es decir, que exista una diferencia en el valor del potencial eléctrico entre el interior con respecto al exterior de la célula; este valor es conocido como potencial de membrana, el cual, es diferente para cada célula. Cabe resaltar, que por convención internacional, el interior de la célula se considera eléctricamente negativo con respecto del exterior. Se ha descrito que en el caso de las CMLV el potencial de membrana se encuentra en un rango que va de los -45 mV a los -60 mV, dependiendo del tipo de tejido vascular estudiado (Guyton, 1995).

Las células responden a estímulos eléctricos, químicos o mecánicos que producen cambios en el valor del potencial de membrana. A estos cambios se les conoce como potenciales de acción (PA) (Guyton, 1995; Ganong, 2000). En el MLV se han descrito PA dependientes del ingreso de Ca^{2+} a la célula, como los que ocurren en las células de

las arterias mesentérica y renal (Tare *et al.*, 2002), sin embargo, en las CMLV provenientes de aorta no se han descrito PA (Hirst *et al.*, 1989).

2.2.1. Canales iónicos en células de músculo liso vascular.

Estudios previos, han mostrado la presencia de una amplia variedad de canales iónicos en la membrana de CMLV, esta diversidad de canales, obedece a la gran cantidad de procesos fisiológicos que tiene que realizar la célula para poder satisfacer sus necesidades biológicas (Latorre and López, 1996).

En las CMLV existen canales iónicos que son activados por agonistas extracelulares. La gran mayoría de estos canales son proteínas, formadas por 5 subunidades polipeptídicas y cada una de estas subunidades consta de 4 regiones transmembranales. Un ejemplo de estos canales corresponde a aquéllos cuyos agonistas son algunos neurotransmisores como la acetilcolina (ACh) y la endotelina (Latorre and López, 1996; Rang, 2000).

Otros canales presentes en las CMLV son aquellos activados por la interacción de agonistas intracelulares, cuya estructura es similar a los canales anteriormente descritos (Latorre and López, 1996; Rang, 2000).

Por último, se ha comprobado la existencia de canales catiónicos, principalmente permeables a Ca^{2+} y a Na^{+} ; y de canales iónicos como los de K^{+} que tienen una estructura cuaternaria tetramérica de aproximadamente de 260 KDa, cada uno de los 4 dominios presenta de 2 a 6 regiones transmembranales unidas entre sí por conectores protéicos (Figura 3) (Ganong, 2000).

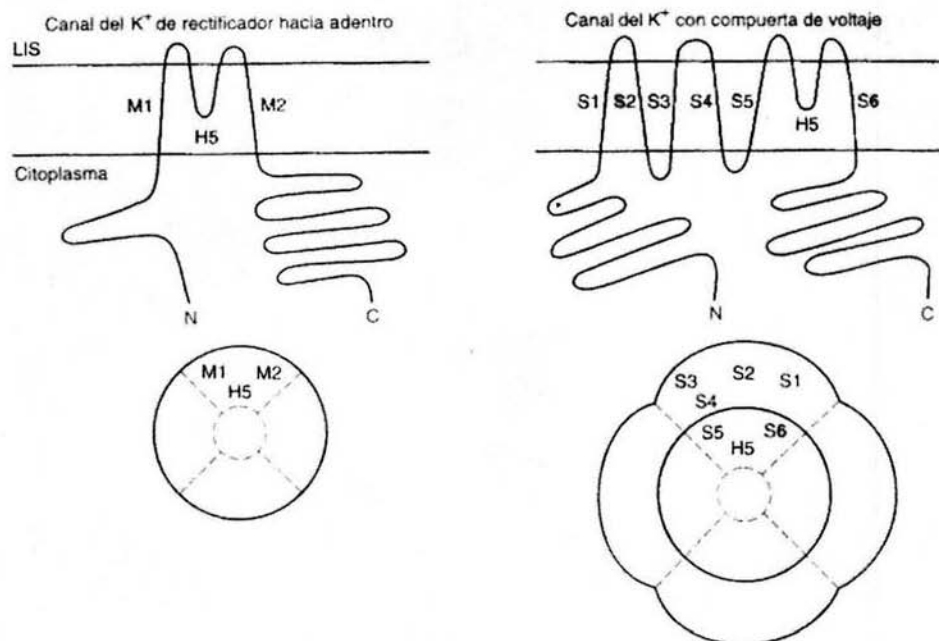


Figura 3. Dos familias de canales de K⁺. **IZQUIERDA:** K_{IR}. **Arriba:** Subunidad con 2 dominios transmembranales. **Abajo:** Formación del canal por cuatro subunidades. **DERECHA:** K_V. **Arriba:** Subunidad del canal con 6 dominios transmembranales. **Abajo:** Formación del canal mediante 4 subunidades.

Es preciso mencionar que el funcionamiento de todos estos canales puede ser activado y/o modulado por diversos mensajeros químicos intracelulares como los nucleótidos cíclicos o las hormonas, así como por la diferencia de voltaje presente en la membrana celular. Debido a las extensas propiedades moleculares, farmacológicas y fisiológicas que presenta cada canal es muy difícil establecer una clasificación (Latorre and López, 1996; Rang, 2000).

2.2.2. Canales de potasio presentes en músculo liso vascular.

Los canales iónicos de K^+ son los más abundantes, se pueden encontrar en cualquier célula eucariótica o en aquellas células cuyos potenciales de acción sean mediados por corrientes de Na^+ , Ca^{2+} o ambas (Hille *et al.*, 1992). Hoy en día se tienen identificados cerca de 100 genes diferentes que codifican para canales de K^+ en diversos organismos (Wein *et al.*, 1996). Debido a lo anterior existe una amplia gama de canales de K^+ , cuyas corrientes eléctricas difieren ampliamente en sus propiedades cinéticas, dependencia del voltaje y propiedades farmacológicas (Rudy, 1988; Hille, 1992).

Estos canales desempeñan papeles importantes como la regulación de la excitabilidad celular. Los canales de K^+ regulan la función y el tono del MLV controlando el potencial de membrana, interviniendo así, en el fenómeno de la hiperpolarización y disminuyendo la excitabilidad cuando se encuentran abiertos (Nelson and Quayle, 1995; Ganong, 2000).

Debido a la distinta funcionalidad de los canales de K^+ se ha establecido un criterio de clasificación basado en las características del canal de K^+ , empleando la técnica de registro conocida como actividad de canal unitario, donde se establecen, los mecanismos de apertura y cierre, la dependencia del voltaje, la cinética y la farmacología del canal. Como resultado de esta clasificación tenemos 5 grandes grupos de canales de K^+ : I) Canales de K^+ dependientes de voltaje; II) canales de K^+ activados por Ca^{2+} ; III) canales de K^+ acoplados a receptores; IV) canales de K^+ modulados metabólicamente; y V) canales de K^+ activados por Na^+ (Rudy, 1988).

En las CMLV se han descrito principalmente 4 tipos de canales de K^+ los cuales son: canales de K^+ dependientes de voltaje (K_V), canales de K^+ activados por Ca^{2+} ($K_{Ca^{2+}}$), canales de K^+ de rectificación de entrada (K_{IR}), y canales de K^+ sensibles a ATP (K_{ATP}) (Hille, 1992; Nelson and Quayle, 1995).

2.2.2.1. Canales de potasio dependientes de voltaje (K_V).

En todas las CMLV se ha reportado la existencia de al menos, una corriente de K^+ que se activa mediante la depolarización de la membrana (Beech and Bolton 1989). Los canales K_V se abren al existir una depolarización del potencial de membrana, por lo que incrementa el flujo de K^+ a través de ellos; efecto importante para el fenómeno de repolarización. Se han identificado canales K_V en CML coronario, cerebral, renal, mesentérico y pulmonar (Volk *et al.*, 1991); también en nervios mielínicos (Dubois, 1983), axones de calamar (Shrager *et al* 1974), neuronas de moluscos (Adams *et al.*, 1980), músculo esquelético (Beam and Donaldson, 1983a) y músculo cardíaco (Noble and Tsien, 1968).

2.2.2.2. Canales de potasio de rectificación de entrada (K_{IR}).

El nombre de estos canales se debe a que se observó en registros de fijación de voltaje que las corrientes de entrada de K^+ , son mayores que las corrientes de salida registradas (Nelson and Quayle, 1995). Esta propiedad se llamó rectificación anómala por ir en sentido contrario a la dirección predicha por la teoría del campo constante (Goldman 1943; Hodgkin and Katz, 1949). La rectificación es importante para que las

CMLV se repolaricen rápidamente, para minimizar la pérdida de K^+ intracelular y para poder mantener el potencial de membrana (Ibarra *et al.*, 1991). El movimiento y la entrada del K^+ extracelular a la célula a través del canal K_{IR} están limitados por el cierre de canales dependientes de voltaje cuando ocurre la depolarización de la membrana, y también por un posible bloqueo de las corrientes salientes, ejercido por el Mg^{2+} intracelular (Nelson and Quayle, 1995). Evidencias experimentales demuestran la presencia corrientes de canales K_{IR} en aorta, en arteriolas cerebrales y mesentéricas, en arterias coronarias y cerebrales (Edwards and Hirst, 1988), en músculo esquelético (Adrian *et al.*, 1970b), en ovocitos de estrella de mar (Hagiwara and Yoshii, 1979), en neuronas de invertebrados (Kandel and Tauc, 1966), en neuronas de mamífero (Nelson and Frank, 1967) y en fibras de Purkinje (Ibarra *et al.*, 1991).

2.2.2.3. Canales de potasio activados por calcio ($K_{Ca^{2+}}$).

Existen canales de K^+ de larga conductancia, que son activados durante la vasoconstricción por los incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ y por la depolarización de la membrana. En CMLV estos canales permiten que el K^+ pase fácilmente a través de ellos (Nelson *et al.*, 1993). La frecuencia y el tiempo de apertura de los canales $K_{Ca^{2+}}$ se controla de manera reversible por la $[Ca^{2+}]_i$ y se modulan por el potencial de membrana en presencia de Ca^{2+} (McManus and Magleby, 1991). La importancia de estos canales radica en su papel en el metabolismo celular. Estos canales suelen clasificarse según la conductancia en maxicanales o canales de alta conductancia (BK), canales de conductancia intermedia y canales de baja conductancia (SK) (Romey and Lazdunzky,

1984). Recientemente se han identificado canales K_{Ca}^{2+} en MLV, músculo esquelético y cerebro de ratón (Adelman *et al.*, 1992)

2.2.2.4. Canales de potasio sensibles a ATP (K_{ATP}).

Los canales de K^+ que pueden cerrarse por efecto del ATP intracelular (K_{ATP}) fueron identificados primero en músculo cardiaco (Noma, 1983). Se ha descrito la presencia de estos canales en: músculo esquelético, en células β pancreáticas, en algunas neuronas (Ascroft and Ascroft, 1990) y recientemente en MLV (Nelson *et al.*, 1993). Los canales K_{ATP} responden a cambios en el estado metabólico celular y a un gran número de agentes vasodilatadores, pero no son dependientes de voltaje, es decir, son insensibles a los cambios del potencial de membrana (Nelson and Quayle, 1995). Estos canales están totalmente abiertos en ausencia de ATP y casi todos se cierran cuando existen concentraciones intracelulares de ATP cercanas a 1 nM (Cook y Hales, 1984; Trube *et al.*, 1986). Estos canales están involucrados en la regulación de fenómenos fisiológicos de la sangre, activándose en situaciones que exigen una alta demanda de flujo sanguíneo, por ejemplo, en casos de hipoxia (Nelson and Quayle, 1995). En la figura 4 se muestran los cuatro principales canales de K^+ , así como los agentes que abren o cierran cada tipo de canal.

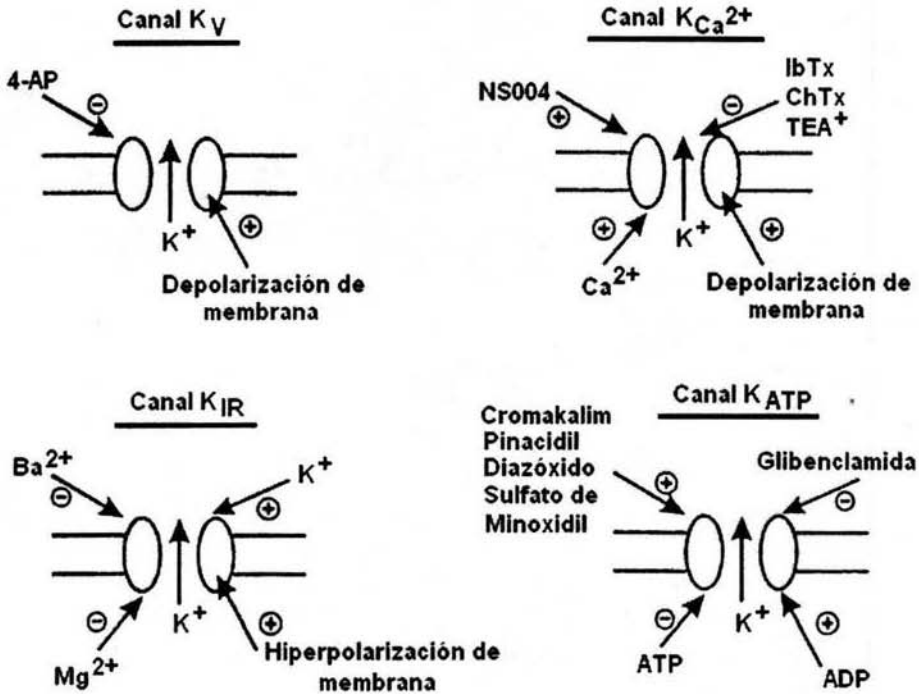


Figura 4. Canales de K^+ presentes en CMLV. Los signos positivos (+) representan la activación o inducción de la apertura del canal y los signos negativos (-) representan la inactivación, bloqueo o cierre del canal. Cada canal presenta diferencias farmacológicas y de dependencia de voltaje, que los caracteriza y permite su identificación. (Figura elaborada por Mendoza y Sucilla, 2003).

2.3. Estrógenos.

Los estrógenos, al igual que los progestágenos, son hormonas sexuales secretadas por los testículos, por las células de la granulosa de los folículos ováricos, por el cuerpo lúteo y por la placenta. Estas hormonas se encargan de estimular la proliferación y el crecimiento celular y de controlar el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios de la mujer (Fritsch and Murdoch, 1994; Ganong, 2000). Estos compuestos desarrollan también, un papel importante en el control del ciclo menstrual, en el mantenimiento del embarazo, así como, en la modulación de diversos procesos metabólicos (Fritsch and Murdoch, 1994). Los estrógenos de mayor importancia en el humano son: el 17 β -estradiol (E_2) que se sintetiza y se secreta en los ovarios; la estrona (E_1) que se forma en tejidos periféricos, a partir de andrógenos secretados en la corteza suprarrenal y en células de la teca del ovario y el estriol (E_3), derivado de la E_1 (Williams and Stancel, 1996; Ganong, 2000).

2.3.1. Estructura química de los estrógenos y biosíntesis.

Los estrógenos son compuestos esteroides C_{18} , que presentan, un grupo 17-hidroxilo ó 17-ceto y un grupo metilo angular unido a la posición 10 (Figura 5) (Ganong, 2000).

La vía biosintética (Figura 5) incluye su formación a partir de los andrógenos. Comienza cuando el colesterol se transforma en pregnenolona, agente precursor de las hormonas sexuales. El proceso de biosíntesis incluye la formación de compuestos precursores, como es el caso de la androstendiona y la testosterona que conducen a la

formación de E_1 , E_2 y E_3 (Figura 5) debido a la aromatización del anillo "A" de la molécula, proceso en el que intervienen el complejo enzimático monooxigenasa (P_{450} aromatasas) utilizando NADPH y O_2 como co-sustratos, este complejo enzimático se encuentra localizado en el RE de las células de la granulosa del ovario, en las células testiculares de Sertoli y Leydig, en células estrómicas del tejido adiposo, sinciotrofoblastos de placenta e hipotálamo (Williams and Stancel, 1996; Nebert and González, 1987).

Para que dicha aromatización se lleve a cabo, el metilo angular en el C-19 del precursor androgénico debe hidroxilarse, posteriormente, ocurre una segunda hidroxilación en el mismo átomo, propiciando así, la eliminación del hidroximetilo en el C-19; por último, se realiza una hidroxilación en el C-2, lo que produce un intermediario inestable que se reordena y forma el anillo fenólico "A" (Miller, 1988).

También se sabe que el E_2 secretado se puede oxidar mediante un mecanismo reversible a E_1 mediante la acción de la 17-hidroxiesteroide deshidrogenasa y que ambos pueden convertirse en E_3 . Dicha transformación ocurre principalmente en el hígado, aunque podemos encontrar éste y otros metabolitos en el TGI, cerebro y piel (Williams and Stancel, 1996; Ganong, 2000).

2.3.2. Fisiología de los estrógenos.

Los estrógenos son los compuestos responsables de las transformaciones que sufren las mujeres en la pubertad y explican los atributos fenotípicos femeninos. Se involucran directamente en el crecimiento y desarrollo de la vagina, el útero y las trompas de Falopio, además de inducir el aumento de tamaño de las mamas, promover el crecimiento ductal y el desarrollo del estroma (Channing *et al.*, 1980).

Estas hormonas están involucradas también, en la inducción de la proliferación del revestimiento mucoso de las trompas de Falopio y del endometrio uterino. Gracias a los estrógenos, proliferan las células glandulares y se incrementa el número de células epiteliales ciliadas que revisten las trompas de Falopio facilitando así el transporte del cigoto fecundado hacia la matriz del útero (Lein, 1979).

Cuando una mujer entra en su periodo de fertilidad durante la pubertad podemos ver aumentos en la actividad osteoblástica debidos a los estrógenos que aceleran el crecimiento durante los años siguientes. Otro efecto de los estrógenos sobre el esqueleto es el cierre de la epífisis con la diáfisis de los huesos largos, por lo que el crecimiento de la mujer cesa antes que el del varón (Guyton, 1995).

Cabe mencionar que los estrógenos elevan la tasa metabólica de las grasas, provocando la formación de depósitos de grasa en el tejido subcutáneo, también, alteran la composición de líquidos plasmáticos, induciendo un aumento en las lipoproteínas de alta densidad (HDL), así como, una reducción en la concentración de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y en la concentración plasmática del colesterol,

que aminore el riesgo a desarrollar enfermedades coronarias en mujeres premenopáusicas (Bush *et al.*, 1985; Crook *et al.*, 1988; Sullivan *et al.*, 1988).

Otros efectos importantes de los estrógenos son la disminución de la motilidad intestinal, y su contribución a la generación de edemas, y a la retención de sales y agua en los riñones (Channing *et al.*, 1980).

Por último, es importante resaltar que una deficiencia de estrógenos puede provocar la disminución de la actividad osteoblástica, una disminución en la matriz ósea y menor depósito de calcio y fosfato en el hueso, procesos que podrían desencadenar una osteoporosis (Guyton, 1995; Ganong, 2000).

2.3.3. Mecanismo de acción clásico o genómico de los estrógenos en músculo liso vascular.

Otro tejido que se ha considerado como blanco del efecto de las hormonas sexuales es el tejido cardiovascular. Observaciones clínicas mostraron que la presencia de concentraciones fisiológicas de estrógenos en la sangre de mujeres en edad fértil, ejercen un efecto "protector" en el sistema cardiovascular que propicia un menor número de muertes debidas a problemas cardiovasculares en una relación de 3:1 en comparación con los hombres de la misma edad (Kalin and Zumoff, 1990). Además, cuando el cese de la producción de hormonas inicia en la mujer (menopausia), el riesgo de las mujeres a sufrir enfermedades cardiovasculares es similar al de los hombres, riesgo que disminuye cuando se emplean terapias de reemplazo hormonal (Bush, *et al.*, 1987). Finalmente, los estrógenos tienen la capacidad de inducir relajación del MLV y

cardíaco, además de disminuir la respuesta de contracción a diferentes agentes contráctiles en varios tejidos de MLV (Martínez, *et al.*, 2001). Sin embargo, el mecanismo por el cual los estrógenos tienen la capacidad de modificar la respuesta contráctil a diversos agentes y el tono vascular del músculo liso aún no está bien determinado y en la actualidad son diversos los mecanismos propuestos para describir las acciones de los estrógenos sobre el SCVSC (Franco, *et al.*, 2003).

En las CMLV existen los receptores para estrógenos α (ER α) y los receptores para estrógenos β (ER β) siendo los primeros, los más abundantes. El mecanismo de acción clásico o genómico de los estrógenos comienza cuando estas hormonas entran en su célula blanco mediante difusión pasiva y se unen a sus receptores intracelulares de alta afinidad. Los ER α y los ER β son factores de transcripción que sufren cambios conformacionales después de unirse a su ligando. Los complejos estrógeno-ER se dimerizan y se unen a sitios específicos en las regiones de control de sus genes blanco, llamados elementos de respuesta a estrógenos. Dichos complejos se asocian con una gran cantidad de proteínas capaces de activar la transcripción, el complejo multiprotéico contiene a la RNA polimerasa que transcribe ADN a ARN. Dentro de las proteínas asociadas a los ER se encuentran proteínas coactivadoras e integradoras de la transcripción (Mendelsohn and Karas, 1999).

2.3.4. Mecanismos de acción no genómicos de los estrógenos en músculo liso vascular.

Se han propuesto algunos mecanismos que sostienen la idea de que los estrógenos pueden incrementar la viabilidad del óxido nítrico (NO) proveniente del endotelio (Mendelsohn and Karas, 1999). Al administrar E_2 directamente en arteria coronaria provoca una vasodilatación rápida al activar la producción de NO endotelial. Se tiene la hipótesis de que el E_2 produce dicho efecto incrementando el flujo de Ca^{2+} hacia el interior de la célula (Lantin-Hermoso *et al.*, 1997). Otros estudios sugieren que los factores de transcripción activados por ligando, deben tener una segunda función que es la activación de los eventos de transducción, lo cuál podría culminar en una rápida activación de la óxido nítrico sintasa (iNOS) (Lantin-Hermoso *et al.*, 1997).

Se ha demostrado experimentalmente que el E_2 causa la activación de la proteína cinasa activada por mitógeno (MAP), la cual, induce la acción de la iNOS. Estos hallazgos demuestran que la activación de la iNOS es mediada por el $ER\alpha$ de forma no genómica (Chen *et al.*, 1999).

Otros laboratorios han mostrado evidencia de otra vía involucrada en la transducción de señales para la activación de la iNOS que es la vía de la fosfatidilinositol (PI) 3-cinasa – Akt (proteín B cinasa). La PI 3-cinasa activa a la Akt, la cual, puede fosforilar y activar directamente a la iNOS (Simoncini *et al.*, 2000).

Además, recientemente se ha presentado a los canales de K^+ como un posible sitio de acción de los estrógenos para modular la actividad contráctil y de tono vascular del músculo liso. El grupo de White en 1995, mostró que los estrógenos podían generar relajación de las arterias coronarias mediante la interacción de las hormonas con K_{Ca}^{2+} .

Mecanismos que posiblemente involucran la síntesis de AMP_C y NO (White, *et al.*, 1995; Wellman, *et al.*, 1996).

El dietilestilbestrol un agonista sintético del estradiol que se emplea en la terapia de reemplazo hormonal, induce relajación de la aorta de rata previamente contraída con noradrenalina (NA) de manera independiente del endotelio. Este efecto fue inhibido con un bloqueador específico de canales de K⁺ dependiente de ATP (K_{ATP}), como la glibenclamida y por el tetraetilamonio (TEA), un bloqueador específico de canales de K⁺ dependientes de Ca²⁺, lo que sugiere que el dietilestilbestrol requiere del funcionamiento de los canales K_{ATP} en el músculo liso de la aorta de rata (Martínez, *et al.*, 2001). Finalmente, el grupo de Valverde, fue el primero en mostrar que el E₂ es capaz de modificar la corriente en los K_{Ca}²⁺ expresados en ovocitos de una manera directa sobre la subunidad β del canal, ésto se demostró porque al añadir en el medio extracelular un antagonista del E₂ afin a la subunidad β las corrientes eléctricas de los K_{Ca}²⁺ se vieron disminuidas significativamente; evento que se observó a los 5 min después de haber aplicado el estrógeno y sin dependencia del núcleo o de la síntesis de proteínas, ya que en otro experimento se añadió al medio con E₂ un bloqueador de la síntesis de proteínas y los registros de las corrientes eléctricas de los K_{Ca}²⁺ no sufrieron alteración alguna (Valverde, *et al.*, 1999).

3.- Justificación

Las enfermedades cardiovasculares representan una de las principales causas de muerte e incapacidad, tanto en países desarrollados como subdesarrollados. Estudios clínicos han mostrado que los hombres son más susceptibles a padecer de estas enfermedades en comparación con las mujeres de la misma edad. Incluso, en las mujeres durante la menopausia (etapa en la cual dejan de producir hormonas sexuales), se ha observado un incremento en la incidencia a sufrir enfermedades cardiovasculares. Además cuando se emplean terapias de reemplazo hormonal, se genera una "cardioprotección" en las mujeres que reciben la terapia en comparación con aquellas que no la reciben. Todo esto nos presenta a las hormonas sexuales femeninas como elementos fisiológicos que de alguna manera protegen la respuesta del sistema cardiovascular a los agentes contráctiles y relajantes endógenos y mantienen un tono vascular adecuado para generar la contracción. Por otra parte, los canales de K^+ presentes en la membrana celular de las CMLV, representan elementos importantes para el control del valor del potencial de membrana y de la excitabilidad celular. La actividad de los canales de K^+ , controlan el proceso de relajación y contracción, mediante la hiperpolarización o despolarización de la membrana celular respectivamente, acciones que tienen efecto directo sobre la $[Ca^{2+}]_i$.

Por este motivo, se consideró importante analizar farmacológicamente los efectos del E_2 y algunos de sus análogos sobre los canales de K^+ presentes en CMLV,

considerando que los canales de K^+ son fundamentales para el mantenimiento de la excitabilidad celular del MLV, de la que depende la repuesta de contracción de las CMLV. Los resultados de este estudio nos permitirán esclarecer el mecanismo de acción que los estrógenos usan para relajar al MLV, además del descrito sobre los canales de Ca^{2+} ; así como, nos ayudaran a proponer terapias cardiovasculares alternativas a las ya existentes.

4.- Planteamiento del problema

Al E_2 y sus análogos sintéticos se les ha descrito la propiedad de ser sustancias relajantes en tejidos obtenidos de diferentes áreas del músculo liso vascular. Este efecto es independiente del endotelio vascular (Andersen *et al.*, 1999), inmediato y no genómico (Haynes, *et al.*, 2002); lo que sugiere que los estrógenos tienen la capacidad de interactuar directamente con el MLV para generar vasodilatación e incluso modular la respuesta del músculo a diferentes agentes contráctiles.

Una hipótesis que se ha utilizando constantemente y está ampliamente documentada, señala que estas hormonas tienen la capacidad de inhibir la actividad de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L, principal fuente de Ca^{2+} para la generación de la contracción (Nakajima *et al.*, 1995; Kitazawa *et al.*, 1997). Por otro lado, los canales de K^+ son importantes para la modulación del potencial de membrana de las CMLV y del tono muscular, lo que ha permitido describir la interacción de los estrógenos y los canales de K^+ en neuronas (Kelly *et al.*, 2002) y en varios tejidos vasculares (Valverde *et al.*, 1999; Martínez *et al.*, 2001; Benkusky *et al.*, 2002). Sin embargo, los mecanismos iónicos involucrados en este proceso se conocen de manera poco clara.

Por tal motivo en este trabajo, analizamos los efectos directos, no genómicos del E_2 sobre los canales de K^+ presentes en las CMLV, proponiendo a éstos como un mecanismo de modulación del proceso de contracción, en el cual se involucra la regulación del potencial de membrana y del tono muscular.

5.- Hipótesis y Objetivos.

5.1. Hipótesis general.

El E_2 activa las corrientes de K^+ presentes en CMLV, a través de su unión a receptores estrogénicos a nivel de membrana celular, mecanismo que no involucra la síntesis de proteínas.

5.2. Objetivos generales.

a) Describir farmacológicamente los efectos del E_2 , etinilestradiol, dietilestilbestrol y progesterona sobre las corrientes de K^+ en CMLV.

b) Analizar si los efectos del E_2 están mediados por su unión a receptores estrogénicos a nivel de membrana.

c) Estudiar el papel de la síntesis de proteínas en los efectos del E_2 sobre las corrientes de K^+ en CMLV.

5.3. Hipótesis particulares.

El K_{IR} es el principal componente de la corriente de K^+ saliente en las CMLV de rata.

El E_2 induce un incremento en la amplitud de las corrientes de K^+ mediadas por el K_{IR} en CMLV.

Los efectos del E_2 sobre las corrientes de K^+ son antagonizados de manera competitiva por tamoxifen e ICI-128, 780.

Un inhibidor de la síntesis de proteínas (cicloheximida) no bloqueará los efectos del E_2 sobre los K_{IR} en CMLV.

5.4. Objetivos particulares.

a) Disgregar enzimáticamente CMLV provenientes de aortas de ratas macho wistar.

b) Realizar registro de fijación de voltaje utilizando la técnica de patch clamp para registrar las corrientes presentes en las CMLV.

c) Caracterizar farmacológicamente los canales de K^+ en las CMLV utilizando bloqueadores específicos.

d) Analizar los efectos del E_2 sobre las corrientes de K^+ mediadas por el K_{IR} , realizando curvas concentración respuesta.

e) Mediante un análisis estadístico de Schild analizar si los efectos del E_2 son mediados por receptores estrogénicos a nivel de membrana, empleando antagonistas específicos como tamoxifen e ICI-182, 780.

f) Mostrar que el efecto no genómico del E_2 sobre las corrientes de K^+ no depende de la síntesis de proteínas.

6.- Fundamentos teóricos de la técnica.

6.1. Bloqueadores de canales de K^+ .

Los canales de K^+ dependientes de voltaje (K_V), sensibles a ATP (K_{ATP}), dependientes de Ca^{2+} ($K_{Ca^{2+}}$), y de rectificación de entrada (K_{IR}) se caracterizaron farmacológicamente mediante el uso de bloqueadores específicos. Dichos bloqueadores son sustancias (sales orgánicas o proteínas) que se unen al canal de K^+ con cierta especificidad, que depende la concentración utilizada de dicho agente químico y del tipo de tejido en que se estén caracterizando los canales. A continuación se muestra una tabla donde se señalan las concentraciones usualmente empleadas de los principales bloqueadores sobre las corrientes de K^+ :

BLOQUEADOR	CONCENTRACIÓN	SITIO DE APLICACIÓN	CORRIENTE QUE AFECTA
4-Aminopiridina (4AP)	10 μ M - 1 mM	extracelular	K_V
Tetraetilamonio (TEA)	10- 100 μ M	extracelular	$K_{Ca^{2+}}$
BaCl ₂	10-100 μ M	extracelular	K_{IR}
Glibenclamida	1 - 10 μ M	extracelular	K_{ATP}
Iberotoxina (IbTX)	10- 100nM	extracelular	$K_{Ca^{2+}}$

Tabla 1: Bloqueadores específicos de los canales de K^+ . (Lancaster, 1999)

6.2. Técnica de patch-clamp.

La técnica de patch-clamp es una metodología que se creó para estudiar las propiedades electrofisiológicas de las membranas biológicas. Mediante el uso de esta técnica podemos registrar las corrientes de la célula completa (macroscópicas), o las corrientes de canal único (microscópicas) que fluyen a través de las membranas por medio de canales iónicos. Con la ayuda de esta técnica, podemos controlar nuestro experimento y manipular a nuestra conveniencia el voltaje de membrana celular, por lo que podemos seguir minuciosamente los cambios en las corrientes que fluyen a través de los canales iónicos que se dan en respuesta a pulsos de voltaje que modifican el valor del potencial de membrana. La capacitancia de la membrana celular que es indicativa del área superficial de la membrana y de su resistencia, también pueden ser monitoreadas con ayuda de esta técnica (Hille, 1992; Sakmann and Neher, 1995).

Para obtener buenos registros electrofisiológicos con ayuda de esta técnica, la membrana de la célula en estudio debe estar libre de restos celulares, tejido conjuntivo, etc. La punta de una micropipeta de vidrio que tiene un orificio de aproximadamente $1\mu\text{m}$ de diámetro, se acerca a la superficie de la célula y después de hacer contacto con ella; se aplica una ligera presión negativa al interior de la pipeta, por lo que parte de la membrana celular se invagina en la punta de la pipeta, formando así un "parche" que no es más que la unión o un sello hermético entre la membrana celular y la superficie del vidrio. Por medio de este procedimiento se aísla la región de la membrana circunscrita

por la pipeta del resto de la membrana, esta configuración es la que se conoce como "célula ligada" (Sakmann and Neher, 1995).

Ya que se obtiene la configuración de célula ligada, se rompe el parche que queda dentro de la punta de la micropipeta mediante la aplicación de un pulso o succión a través de la misma; para crear así, un pequeño agujero en la membrana que tiene acceso eléctrico al interior de la célula, cabe resaltar, que dicha maniobra experimental no tiene efecto alguno sobre el sello existente entre la micropipeta y la membrana plasmática, por lo que se previene el flujo de corrientes de fuga y se evita que se inunde la célula con la solución del baño y por lo tanto la muerte celular. Al llegar a esta configuración, tenemos una baja resistencia al tener acceso al interior de la célula a través de la punta de la pipeta y nos permite fijar el voltaje en la célula íntegra (Figura 5).

La configuración descrita anteriormente (célula íntegra) se emplea para registrar las corrientes iónicas de una célula entera, confiriéndonos la ventaja de registrar el promedio de la respuesta de todos los canales existentes en la membrana celular (Hille, 1992; Sakmann and Neher, 1995).

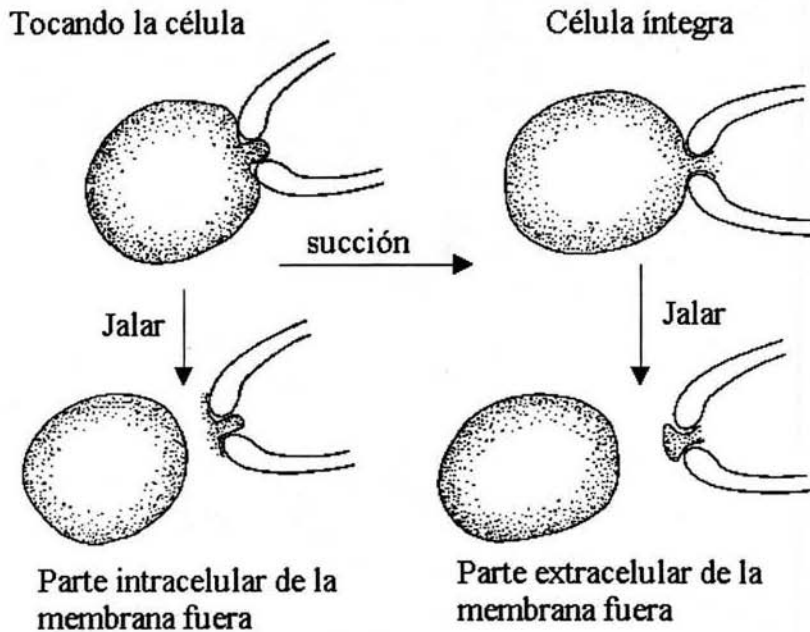


Figura 5. Muestra las configuraciones eléctricas de la técnica de patch-clamp. El dibujo de la izquierda superior ejemplifica la configuración de "célula ligada". El de la derecha superior muestra la configuración de célula íntegra. Los dos dibujos inferiores muestran configuraciones especiales "inside out" e "outside out" respectivamente, donde se trabaja exclusivamente con un pedazo de la membrana celular. (Sakmann and Neher, 1995)

7.- Materiales y Métodos.

7.1. Reactivos.

Todas las sales empleadas (NaCl, KCl, MgSO₄, KH₂PO₄, NaHCO₃, CaCl₂, gluconato de potasio, y glucosa) para la preparación de las soluciones fueron obtenidas de J.T. Baker, Mallinckrodt, México. Los reactivos (acetilcolina, noradrenalina, HEPES, Trisma base, EGTA, colagenasa, DNAsa, papaína, albúmina sérica bovina, inhibidor de tripsina, E₂, etinilestradiol, dietilestilbestrol, cicloheximida, tamoxifen, iberiotoxina, 4-AP e ICI-182,780) provienen de SIGMA CHEMICAL CO, St. Louis, MO USA.

7.2. Estudios Isométricos.

Ratas wistar macho de 280 a 300g de peso fueron sacrificadas por dislocación cervical bajo anestesia con pentobarbital sódico (Sedal-vet [6g/ml]), a una dosis de 15.75g/kg de peso vía i.p. La aorta torácica descendente fue extraída y limpiada del tejido conectivo y grasa en una solución Krebs-Henseleit con la siguiente composición (en mM): NaCl 120, KCl 4.7, MgSO₄ 1.25, KH₂PO₄ 1.18, NaHCO₃ 25, CaCl₂ 2.5 y glucosa 11, burbujeada con gas carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂), para obtener un pH de 7.4 a 37°C. El endotelio fue eliminado mediante el paso de solución Krebs-Henseleit a presión a

través de la luz de la aorta, con ayuda de una jeringa por diez veces. Las aortas fueron cortadas en anillos de aproximadamente 4 mm de longitud.

Cada anillo fue atado horizontalmente con ganchos de acero inoxidable en cámaras de tejido aislado de 15 ml, las cuales, contenían solución Krebs-Henseleit (pH de 7.4, 37°C) y burbujeada continuamente con una mezcla de gas carbógeno. Cada anillo fue sujetado a un transductor de desplazamiento de fuerza isométrico (FT03C, GRASS Instruments, USA) acoplado a un adaptador de transductor GRASS (AI 411, Axon Instruments, Inc. USA). El adaptador se conectó a un amplificador (Cyberamp 380, Axon Instruments, Inc. USA) que mandaba la señal a un convertidor analógico/digital (A/D) (Digidata, Axon Instruments, Inc. USA). El convertidor A/D mandó continuamente los cambios en la tensión del tejido a una computadora personal, donde éstos fueron registrados y almacenados usando un software de análisis electrofisiológico (Axoscope 7, Axon Instruments, Inc. USA). Se mantuvo una tensión basal pasiva de 2g sobre los anillos durante los experimentos. Durante el periodo de estabilización de 60 min, la solución Krebs-Henseleit se cambió cada 20 min y reajustando continuamente la tensión a 2g. Los anillos de la aorta fueron contracturados utilizando KCl (30 mM) a intervalos de 30 min hasta que la respuesta fuera reproducible. La integridad funcional del endotelio fue probada en vasos sanguíneos precontractados con noradrenalina (NA 3×10^{-8} M) en respuesta a la aplicación de acetilcolina (ACh 1 μ M). La relajación estuvo ausente en anillos que no contaban con endotelio.

7.3. Obtención de las células de músculo liso vascular

En otro grupo de ratas wistar macho de 280 a 300g de peso la aorta torácica descendente se disecó por medio de una incisión en tórax bajo anestesia utilizando una solución de pentobarbital sódico (Sedal-vet [6g/ml]), a una dosis de 15.75g/kg de peso vía i.p. en condiciones asépticas. La arteria se colocó en una solución Krebs-Ringer con la siguiente composición (mM): 120.7 NaCl, 5.9 KCl, 15.5 NaHCO₃, 1.2 MgCl₂, 2.5 CaCl₂ y 11.5 glucosa, a un pH de 7.4 ajustado con NaOH y oxigenada con una mezcla de gas carbógeno.

Posteriormente, la aorta se limpió cuidadosamente para eliminar la grasa y el tejido conectivo bajo observación estereoscópica, cambiando la solución Krebs-Ringer las veces que fuera necesario; ya que la aorta se encontró perfectamente limpia, ésta se transfirió a una solución libre de Ca²⁺ (Soln. I) con la siguiente composición (mM): 140 NaCl, 6.0 KCl, 10 glucosa, 10 HEPES (N-2-hidroxietilpeperacina-N-2 ácido etanesulfónico), la cual, se ajustó a un pH de 7.3 con tris hidroximetil aminometano (Trisma base). Con la solución libre de Ca²⁺ se lavó cuidadosamente el lumen para eliminar células endoteliales y las células sanguíneas que hubieran quedado atrapadas durante el proceso de disección. Por último la aorta se cortó en forma longitudinal para obtener dos partes de tejido, las cuales, se cortaron en rectángulos de aproximadamente 1 a 2 mm de ancho para someterlos a agitación durante 15 minutos a 37°C en la misma solución.

Al término de la incubación, la solución libre de Ca^{2+} se cambió por la solución de disociación que contiene los siguientes componentes (en porcentajes y diluidos en Soln. I): 0.25% colagenasa, 0.05% papaína, 0.05% inhibidor de tripsina, 0.20% DNAsa y 0.03% de albúmina sérica bovina, en esta solución los fragmentos de aorta se incubaron por un periodo de 45 minutos a 36°C .

La solución de disociación se sustituyó por Soln. I fresca y se dispersaron las células mecánicamente haciendo tantos cortes como fuera necesario con la ayuda de unas tijeras de disección; finalmente, se liberaron las células del tejido con una pipeta Pasteur de punta corta, hasta observar células únicas en solución. La suspensión resultante se filtró a través de una malla de nylon con poros finos para eliminar los fragmentos de tejido conectivo.

Las células se colocaron en una solución de almacenamiento con la siguiente composición (en mM): 137 NaCl, 6.0 KCl, 0.5 MgCl_2 , 0.5 CaCl_2 , 10 glucosa, 10 HEPES, 0.2% inhibidor de tripsina, 0.3% albúmina sérica bovina, ajustándose con Trisma base a un pH de 7.3. Esta suspensión se mantuvo en un baño de hielo para evitar el deterioro de las células y posteriormente realizar los registros electrofisiológicos.

7.4. Equipo de registro electrofisiológico.

Los registros de fijación de voltaje con la configuración de célula íntegra se realizaron utilizando un preamplificador de patch-clamp (AxoClamp 2B; Axon Instruments). Todos los experimentos se llevaron a cabo a temperatura ambiente (20-22°C). Las pipetas de registro se fabricaron a partir de capilares de borosilicato de vidrio (World Precision Instruments) con una resistencia entre 2 y 5 M Ω , utilizando un programa de estiramiento en dos etapas con un estirador de pipetas (P-97; Sutter Instruments Corp.). Las pipetas se llenaron con una solución interna con la siguiente composición (mM): 110 gluconato de potasio, 30 KCl, 0.5 MgCl₂, 5 HEPES, 5 K₂ATP y 0.05 etilenglicol-bis(beta-aminoetilen éter)-N,N,N',N'-tetra acético (EGTA), ajustada a pH de 7.2 con KOH.

Las células se colocaron en una cámara de registro con capacidad de 1ml, durante 20 min permitiendo así que se adhirieran a la superficie de vidrio de la cámara. Después se bañaron con una solución externa con la siguiente composición (mM): 120 NaCl, 3 NHCO₃, 4.2 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 0.5 MgCl₂, 10 glucosa, 1.8 CaCl₂, 10 ácido N-2-hidroxietilpiperazina-N'-etanosulfónico (HEPES); ajustada a un pH de 7.4 con una solución de NaOH 3 M (a una velocidad de flujo de 0.5 a 1 ml/min) durante aproximadamente 10 min.

Una vez transcurrido ese tiempo, se realizaron registros celulares bajo inspección microscópica por medio de la aproximación de la pipeta de patch a la célula, para tocar su membrana y realizar un sello de alta resistencia (>10 G Ω), mediante la aplicación de

una presión negativa a través de la misma. Posterior a su obtención, la membrana celular dentro de la pipeta de patch se rompió por la aplicación de un segundo pulso de presión negativa a través de la pipeta, lo que nos permitió obtener la configuración de célula íntegra para realizar el registro de las corrientes totales de K^+ .

La señal registrada a través de la pipeta fue enviada a un preamplificador y a un osciloscopio (Tektronix) para amplificar y visualizar la señal respectivamente. Del primero se envió la señal a un convertidor analógico digital (Digidata 1200A) que mandó a su vez la señal a una computadora personal (Hewlett Packard; PC) para su almacenamiento y posterior análisis, el cual se realizó con la ayuda de los programas pClamp (Axon Instruments) y Origin (Origin Microcal) previamente instalados.

Las corrientes totales de potasio se registraron mediante su activación con varios protocolos de estimulación que se encontraban previamente cargados en el programa de pClamp, éstos consistían en protocolos de pasos.

El protocolo de pasos consistió en fijar el potencial de membrana en -70 mV y a partir de éste dar 16 pulsos con intensidad creciente de 10 mV cada 10 seg., para evaluar la activación de canales de K^+ en un rango de potenciales que va de -120 y $+30$ mV.

Es importante mencionar que el criterio de viabilidad celular que seguimos para realizar los registros de las células analizadas fueron los siguientes: 1) la magnitud y estabilidad del potencial de membrana y 2) el umbral y amplitud de las corrientes de potasio registradas.

7.5. Protocolo farmacológico.

Para el análisis isométrico de la contracción de anillos de aorta se permitió la estabilización de éstos y se realizaron las curvas de concentración respuesta empleando cinco diferentes concentraciones de KCl. Los anillos en los que se probó el E₂, fueron incubados durante 5 min con esta sustancia. La "n" para cada experimento fue de 10 anillos. El efecto del E₂ sobre la reactividad vascular fue comparado con los controles, usando un análisis de varianza de dos vías y un valor de $p < 0.01$ para considerar las diferencias estadísticamente significativas.

Para realizar los registros electrofisiológicos, las sustancias analizadas fueron aplicadas a las CMLV por medio de un sistema de perfusión de ocho tubos, el cual se acerca a las células justo antes de empezar a realizar el estudio. La solución que contiene el estrógeno toca a la célula e inmediatamente se registran los cambios generados en las corrientes de K⁺. Inmediatamente después de esta aplicación, se realiza la eliminación del estrógeno por medio de la perfusión de la solución extracelular; con este tipo de aplicación aseguramos que el efecto de los estrógenos sea exclusivamente en la célula que estamos registrando y evitamos contaminación de toda la preparación. El número de experimentos realizados en cada maniobra se indica en los resultados y se realizaron siguiendo los criterios generalmente usados en investigación.

7.6. Análisis estadístico.

Cada maniobra experimental fue repetida en 5 a 20 células (n). Para disminuir la variabilidad de nuestros resultados experimentales, siempre que fue posible las respuestas controles y experimentales se realizaron en la misma célula. Las observaciones que presentaron una mayor variabilidad se repitieron en un número mayor de células.

Se utilizó la prueba de *t* de Student no pareada para evaluar las diferencias entre los valores promedio obtenidos de dos grupos diferentes de células. Por otra parte, utilizamos también la *t* de Student pareada para evaluar las diferencias de los valores promedio obtenidos de las mismas células. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando se obtuvo una $p < 0.01$ utilizando una curva gaussiana de doble cola (Daniel, 2002).

8.- Resultados.

8.1. Efecto relajante del 17-beta-estradiol sobre anillos de aorta y su dependencia con la concentración de K^+ extracelular.

La incubación en presencia de E_2 (3 y 10 μM ; $n=10$) por 30 min en las cámaras de tejido aislado produjo una relajación en los anillos de aorta de rata dependiente de la concentración de E_2 , al ser contraídos por la aplicación de K^+ extracelular. El efecto de relajación se observó al inicio de la inducción de la contracción como en la fase de mantenimiento de la misma. En la figura 6A, se muestra una serie de registros representativos de la contracción generada por la aplicación de 5 concentraciones diferentes de KCl (1 a 100 mM). El E_2 generó una relajación significativa en los anillos previamente contraídos con KCl hasta la concentración de 30 mM. Cuando se usó una concentración de 100 mM, el E_2 no generó una relajación significativa en el anillo de tejido.

En la figura 6B, se muestran las curvas concentración respuesta en condiciones control (ausencia de E_2 ; $n=10$), y en presencia de E_2 (3 y 10 mM; $n=10$). La presencia del estrógeno desplazó la curva control hacia la derecha y hacia abajo. La figura 6C, muestra una gráfica de barras donde se observa claramente que, el efecto de relajación inducido por E_2 depende del gradiente de concentración de K^+ .

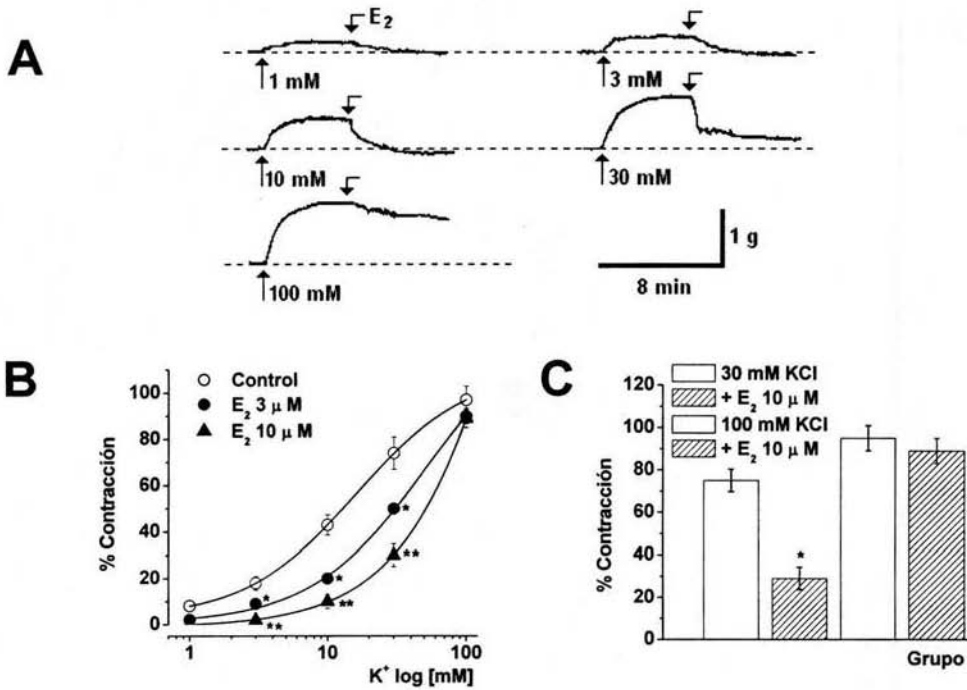


Figura 6. Efectos de relajación del E_2 sobre anillos de aortas de rata. **A)** Muestra registros representativos de la contracción inducida por diferentes concentraciones de KCl. **B)** Curvas de contracción respuesta en ausencia y presencia de dos diferentes concentraciones de E_2 . **C)** Gráfica de barras que muestra la dependencia del gradiente de concentración de K^+ en los efectos relajantes del E_2 .

8.2. Caracterización de las propiedades eléctricas y de los canales iónicos presentes en las células de músculo liso vascular.

Las CMLV obtenidas por el proceso de disgregación que fueron empleadas para los registros electrofisiológicos, presentaron un valor promedio del potencial de membrana de -46 ± 4 mV ($n=58$) y una capacitancia promedio de la membrana celular de 42.5 ± 3.6 pF, resultados que coinciden con los reportados por otros autores (Tang and Wang, 2001). En los registros de fijación de voltaje se observó que estas células presentan una corriente saliente de K^+ (~ 370 pA; $n=46$), con una cinética semejante a la corriente mediada por los canales K_V de rectificación tardía, que se ha descrito previamente. Esta corriente crece exponencialmente de una forma dependiente del voltaje a partir de los -60 mV. En voltajes menores de -60 mV la corriente saliente es nula.

En la figura 7A, se muestra la relación corriente-voltaje (I-V) de la corriente saliente registrada en las CMLV, la cual fue generada por el protocolo de pasos que se muestra en el recuadro de la figura 7A. La corriente registrada fue bloqueada de manera dependiente de la concentración por 4-AP (bloqueador específico de K_V ; 30, 100, 300 μ M; $n=20$ cada concentración) en los siguientes porcentajes: 60, 75 y 85% respectivamente.

La corriente resistente a los efectos de 4-AP 300 μ M ($\sim 15\%$ del total), fue analizada en presencia de Iberiotoxina (IbTX; bloqueador específico de K_{Ca}^{2+} ; 100 nM; $n=15$), encontrándose que esta corriente disminuyó significativamente (57%; $p < 0.1$). La

corriente resistente a 4-AP 300 μ M más IbTX 100 nM, fue bloqueada en su totalidad por glibenclamida (Gli; bloqueador específico de K_{ATP} ; 100 nM; n=22) (Figura 7B).

La figura 7C, muestra una gráfica de barras compuesta por los porcentajes de las tres principales corrientes de K^+ presentes en las CMLV frescas, donde se observa que el K_V representa el 85% de la corriente saliente total de K^+ , el $K_{Ca^{2+}}$, representa el 8.5% y el K_{ATP} representa sólo el 7.5%. En la figura 7D, se muestran los registros electrofisiológicos representativos de las corrientes generadas por un protocolo de pasos en una CMLV, en ausencia (control) y en presencia de los bloqueadores antes mencionados.

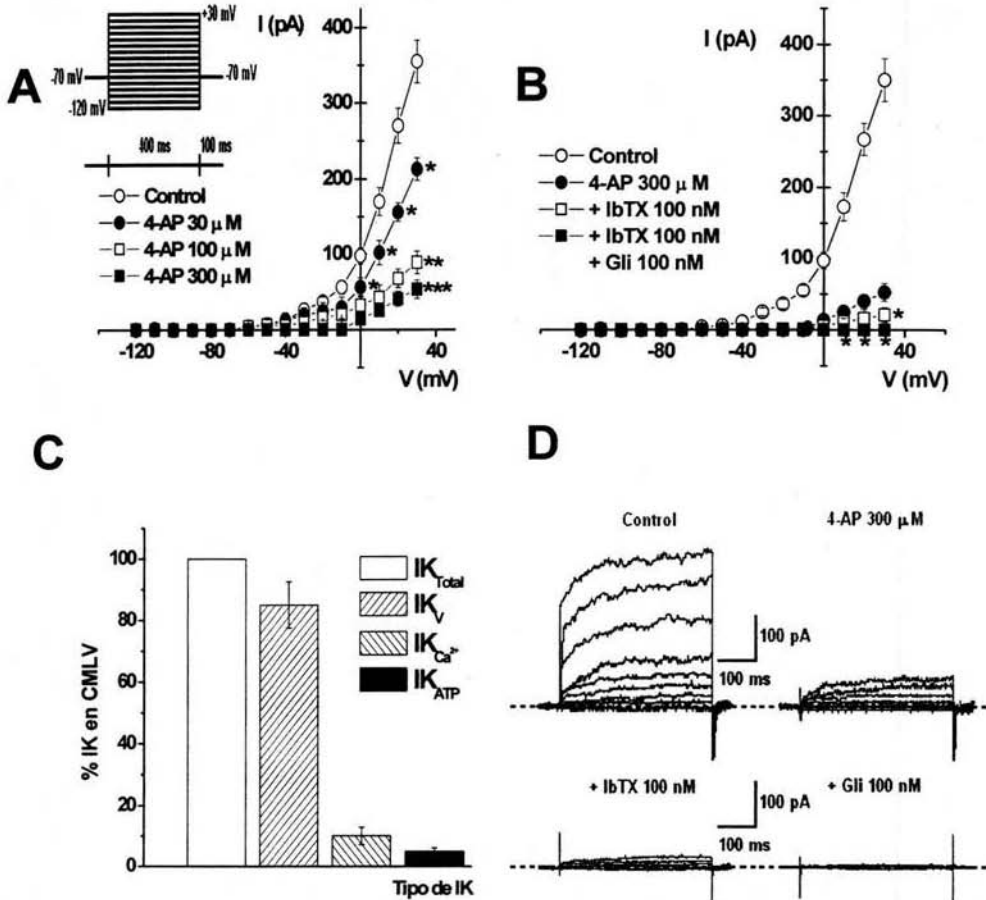


Figura 7. Caracterización de las corrientes de K^+ en CMLV. **A)** En la parte superior izquierda se muestra el protocolo de pasos empleado para evaluar las corrientes de K^+ . La gráfica muestra la relación corriente-voltaje (I-V) de la corriente saliente registrada en las CMLV. **B)** Gráfica que muestra la corriente resistente a los efectos de 4-AP analizada en presencia de IbTX y Gli. **C)** Gráfica de barras, compuesta por los porcentajes de las tres principales corrientes de K^+ presentes en las CMLV frescas. **D)** Muestra los registros electrofisiológicos representativos de las corrientes generadas por un protocolo de pasos en una CMLV, en ausencia y presencia de bloqueadores de canales de K^+ .

8.3. Efectos del 17-beta-estradiol y algunos análogos sobre las corrientes de potasio presentes en CMLV.

La aplicación de E_2 (0.3, 1, 3 μM ; $n=12$ cada concentración) por perfusión a las CMLV, provocó un incremento en la magnitud de las corrientes salientes de K^+ , en forma dependiente de la concentración. El incremento a la concentración más alta (3 μM), fue del $34.5 \pm 2.4\%$ ($p < 0.1$). La latencia del efecto máximo con cada concentración de E_2 fue de 3 min. En la figura 8A, se muestra la relación I-V para las corrientes salientes totales de K^+ en ausencia (control; $n=12$) y presencia de E_2 . El recuadro muestra el registro representativo de la corriente en una CMLV inducida por el protocolo de pasos que se señala. Cuando se analizaron los efectos del etinilestradiol (0.3, 1, 3 μM ; $n=14$) y del dietilestilbestrol (0.1, 0.3 y 1 μM ; $n=10$), se observó un incremento en las corrientes salientes totales de K^+ . El etinilestradiol, incrementó en un $33.2 \pm 3.1\%$ ($p < 0.1$) y el dietilestilbestrol en un $42.4 \pm 3.4\%$ ($p < 0.1$) las corrientes salientes de K^+ a las concentraciones más elevadas (3 y 1 μM , respectivamente), y presentó la misma potencia que el E_2 al compararlos con sus respectivos controles. El dietilestilbestrol fue el estrógeno más potente en nuestras condiciones experimentales (Figura 8B, C). La progesterona ($n=8$) produjo un incremento no significativo en las corrientes salientes de K^+ , incluso a la concentración de 10 μM ($n=12$) (Figura 8D). La latencia de los efectos de estas hormonas fue similar a las observadas para E_2 . Los efectos fueron totalmente reversibles en todos los casos al eliminar las hormonas de la cámara de registro.

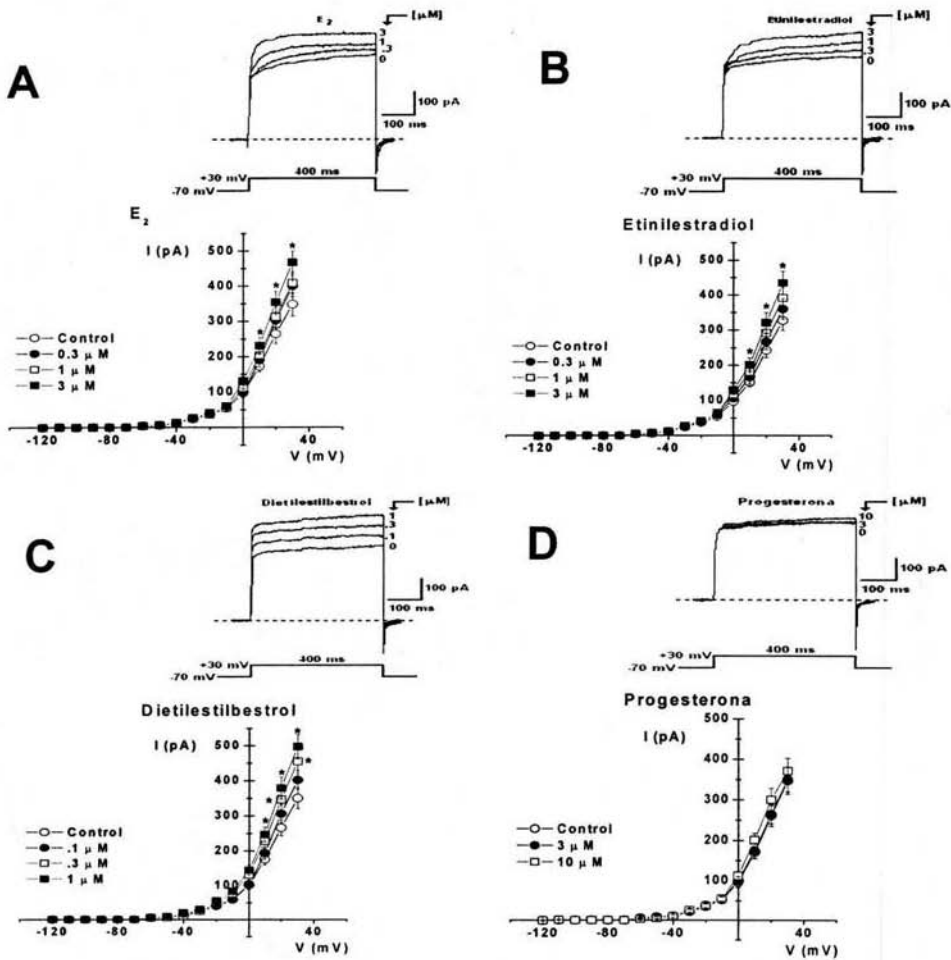


Figura 8. Efectos del E₂ y sus análogos sobre las corrientes de K⁺ en CMLV. En la parte superior derecha se muestran registros representativos de la corriente en una CMLV inducida por el protocolo de pasos indicado. En las gráficas de la parte inferior izquierda se muestra la relación corriente-voltaje (I-V) para las corrientes salientes totales de K⁺ en ausencia y presencia de E₂, etinilestradiol, dietilestilbestrol y progesterona, respectivamente.

8.4. Efecto de Tamoxifen e ICI-182, 780 y cicloheximida sobre la acción del 17-beta-estradiol en las corrientes de potasio.

Para evaluar si los efectos del E_2 y del dietilestilbestrol sobre las corrientes de K^+ están mediados por su unión al receptor $ER\alpha$, se decidió evaluar el efecto de estas hormonas en presencia de tamoxifen (30 a 300 nM; n=18) e ICI-182, 780 (1 a 10 nM; n=20); dos antagonistas específicos de los estrógenos que se unen al receptor $ER\alpha$.

En la figura 9, se muestran curvas concentración-respuesta a E_2 y dietilestilbestrol en presencia de los antagonistas antes mencionados. Se observa que en ambos casos conforme se aumenta la concentración de los antagonistas, requerimos más concentración de las hormonas para ejercer el efecto máximo. También observamos que las curvas control para las hormonas se desplazan hacia la derecha y abajo.

En la figura 9A y 9B se muestran las curvas concentración respuesta para E_2 en presencia de diferentes concentraciones de antagonista. Las curvas en la figura 9C y 9D muestran el antagonismo ejercido para dietilestilbestrol.

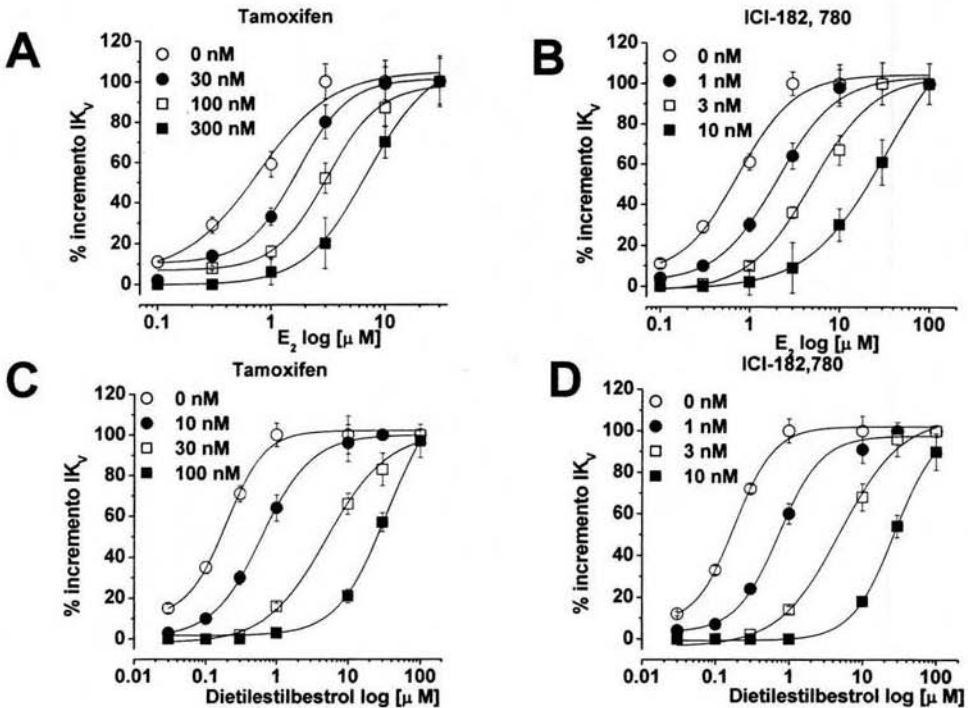


Figura 9. Curvas concentración respuesta de los efectos de las hormonas en presencia de antagonistas específicos a receptores de estrógenos. **A)** y **B)** Gráficas de las curvas concentración respuesta a E_2 en presencia de tamoxifen e ICI-182,780 respectivamente. **C)** y **D)** Gráficas de las curvas concentración respuesta a dietilestilbestrol en presencia de tamoxifen e ICI-182,780 respectivamente.

Con el análisis de Schild, en el que se grafica el logaritmo de la relación de concentración del agonista menos uno ($\log [\text{concentración}-1]$) contra el logaritmo de la concentración molar del antagonista, se obtuvieron líneas rectas con regresiones lineales muy cercanas a la unidad, lo que indica que las hormonas están interactuando

con receptores específicos $ER\alpha$, para generar el incremento en las corrientes totales de K^+ .

En la figura 10 se muestran el análisis de Schild para cada hormona en presencia de tamoxifen e ICI-182,780.

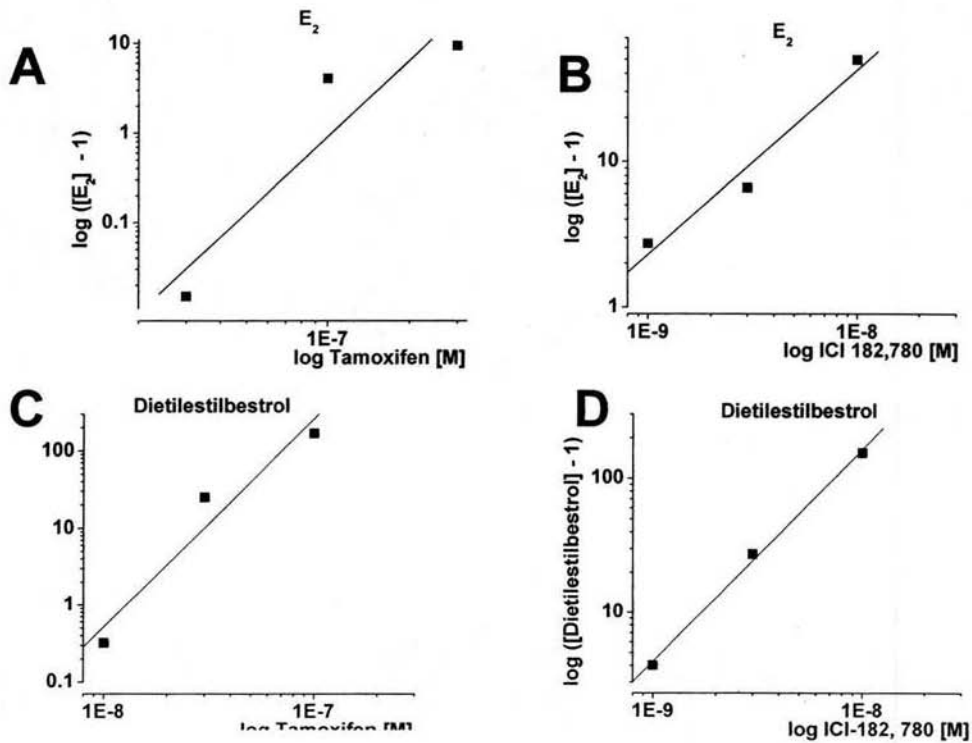


Figura 10. Análisis de Schild para el antagonismo de los efectos de las hormonas sobre los canales de K^+ . **A)** y **B)** Gráficas de Schild para E_2 . **C)** y **D)** Gráficas de Schild para dietilestilbestrol.

Los efectos de las hormonas estudiadas son específicos, porque se observan exclusivamente en las corrientes mediadas por el canal K_V . En la figura 11, se muestra que los efectos del E_2 ($n=10$; Figura 11A) y del dietilestilbestrol ($n=10$; Figura 11B) sobre las corrientes de K^+ , son inhibidos en presencia de 4-AP. Ambas hormonas no tienen efectos significativos sobre las corrientes mediadas por K_{Ca}^{2+} y K_{ATP} , en las CMLV disgregadas de la aorta de rata.

Para analizar si los efectos de ambas hormonas, se deben a una activación de tipo genómico que involucre la síntesis de proteínas, evaluamos los efectos del E_2 ($n=14$) y del dietilestilbestrol ($n=14$) en presencia de cicloheximida (un inhibidor de la síntesis de proteínas; $1 \mu M$). La cicloheximida no bloqueó los efectos de ambas hormonas (Figura 11C y 11D), lo que muestra que no se requiere la síntesis de proteínas para incrementar la corriente de K^+ en las CMLV frescas.

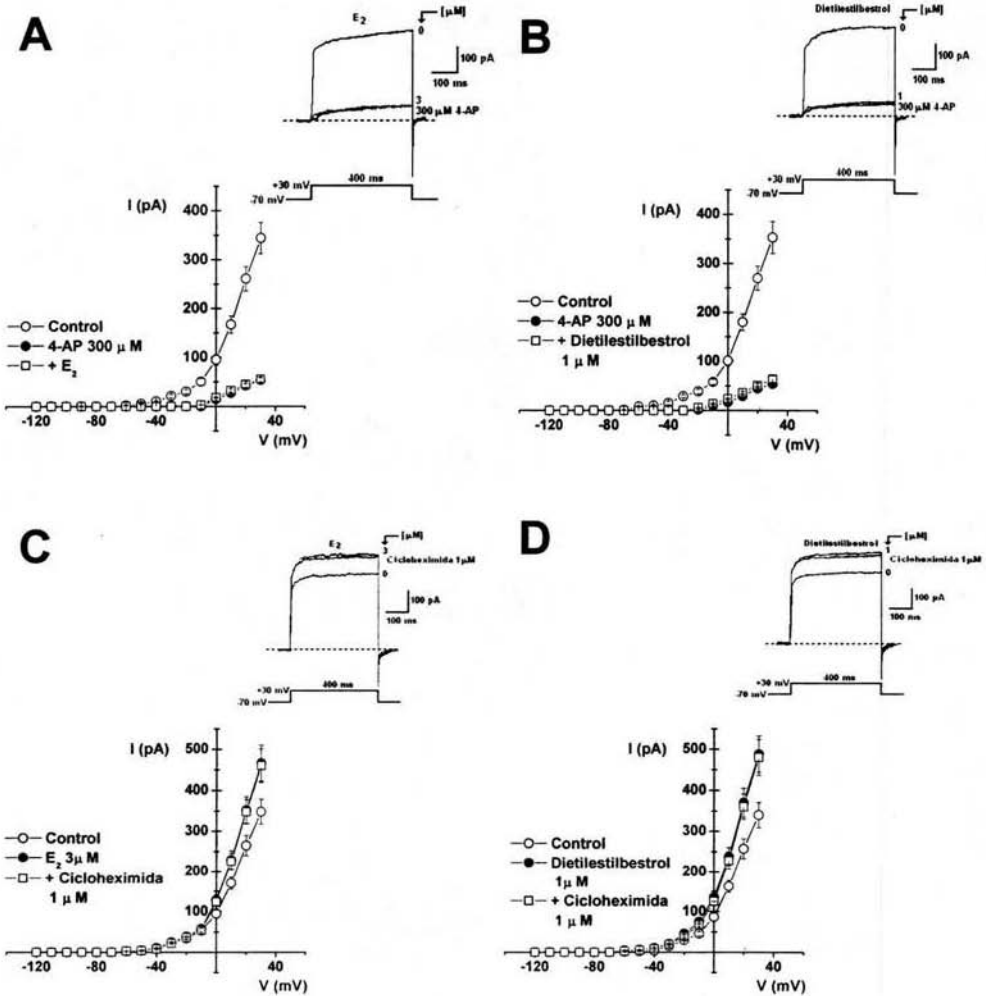


Figura 11. El efecto de las hormonas estudiadas es específico sobre los canales K_V y no depende de la síntesis de proteínas. **A)** y **B)** E_2 y dietilestilbestrol no tienen efecto sobre los canales $K_{Ca^{2+}}$ ni K_{ATP} . **C)** y **D)** Muestran que cicloheximida ($1 \mu M$) no bloqueó los efectos sobre las corrientes de K^+ mediadas por K_V .

9.- Discusión de Resultados.

Los efectos relajantes de los estrógenos y hormonas sexuales relacionadas han sido motivo de diversos análisis y se han propuesto diferentes hipótesis que tratan de explicar el mecanismo por el cual las hormonas tienen la capacidad de modificar la respuesta contráctil del tejido cardiovascular a un gran número de agentes contráctiles y relajantes. Una de las hipótesis principales es la que señala que los estrógenos tienen la capacidad de bloquear los canales e inhibir las corrientes de Ca^{2+} mediadas por los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje presentes en las CMLV y cardíacas (Nakajima, *et al.*, 1995). Mecanismo, que evidentemente, propiciaría una relajación y una menor respuesta de contracción hacia agentes contráctiles, debidas a una disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ y del tono vascular.

En el presente trabajo, el E_2 fue capaz de inducir una relajación en anillos de aorta de rata y de inhibir la respuesta contráctil generada por la aplicación de K^+ de forma dependiente de la concentración de E_2 . Efectos que coinciden con los reportados por otros autores (Kitazawa, *et al.*, 1997). El efecto de inhibición de la respuesta de contracción por el E_2 , mostró una clara dependencia del gradiente de concentración de K^+ , debido a que la relajación inducida por E_2 es estadísticamente significativa cuando se utilizan concentraciones extracelulares de K^+ por debajo de 30 mM; por otro lado cuando se emplean concentraciones extracelulares de K^+ mayores o iguales a 100 mM

(muy cercanas a la concentración intracelular de K^+ en estas células; ~ 140 mM), el E_2 es incapaz de generar una relajación significativa en estos anillos. Esta evidencia experimental se puede explicar diciendo que E_2 requiere de un gradiente de K^+ para generar el efecto vasodilatador. Este hecho nos sugiere fuertemente la participación de los canales de K^+ presentes en la membrana celular de las CMLV, en los efectos relajantes de esta hormona. Por tal motivo, analizamos el efecto del E_2 , etinilestradiol, dietilestilbestrol y progesterona sobre la actividad de los canales de K^+ .

Las CMLV frescas obtenidas de aortas de rata presentan una población heterogénea de canales de K^+ . Esta población se compone de un 85% de canales K_v , un 8,5% de canales K_{Ca}^{2+} y un 7.5% de canales K_{ATP} . Estos resultados concuerdan con los descritos por varios autores en células del sistema cardiovascular (Tang and Wang, 2001). El E_2 (0.3 a 3 μ M) fue capaz de inducir un aumento en las corrientes salientes totales de K^+ de estas células. Este efecto fue dependiente de la concentración de estrógeno utilizada con una latencia de 3 min y también reversible. La concentración de 3 mM indujo un incremento de la corriente de K^+ estadísticamente significativo con respecto a su control ($34.5 \pm 2.4\%$; $p < 0.1$). El etinilestradiol provocó un incremento similar en las corrientes de K^+ ($33.2 \pm 3.1\%$; $p < 0.1$), con la misma cinética y reversibilidad del efecto. El dietilestilbestrol fue la hormona más potente en nuestras condiciones experimentales al generar un incremento del mismo parámetro del $42.4 \pm 3.4\%$. Sin embargo, la progesterona, hormona que se ha descrito como inductora de la relajación

vascular no presentó efectos significativos sobre las corrientes de K^+ . De tal forma que, la potencia de estas hormona sobre las corrientes de K^+ en CMLV puede resumirse: dietilestilbestrol > E_2 = etinilestradiol > progesterona.

Estos resultados podrían explicarse con relación a las diferencias de los grupos funcionales presentes en las moléculas base de los estrógenos. Lo que generaría, diferentes afinidades, actividades intrínsecas y respuestas específicas al unirse a sus receptores.

Para determinar si el E_2 y el dietilestilbestrol están actuando mediante la interacción con el receptor específico $ER\alpha$, decidimos emplear el análisis de Schild que consistió en evaluar los efectos de cada hormona en presencia de concentraciones crecientes de un antagonista (tamoxifen e ICI-182, 780) para evaluar el desplazamiento del efecto del agonista por el antagonista y determinar si existe un antagonismo competitivo que involucre a dicho receptor. Nuestros resultados muestran que ambas hormonas se unen a su receptor de manera específica, dependiente de la concentración y puede ser desplazado del receptor de manera competitiva por sus antagonistas. Esto sugiere fuertemente, que los estrógenos aumentan la corriente de K^+ en CMLV por su interacción con receptores $ER\alpha$.

Los efectos de ambos estrógenos son específicos, ya que no se observan sobre los canales K_{Ca}^{2+} y K_{ATP} . Lo que señala que el receptor $ER\alpha$ podría estar acoplado intracelularmente estructuralmente o mediante un sistema de mensajería a los canales

K_v . Esto indicaría que el E_2 genera cambios en la respuesta de contracción mediante la modulación de uno de los elementos importantes en la excitabilidad celular como lo son los canales de K^+ .

Finalmente, para descartar un efecto a nivel genómico, decidimos inhibir la síntesis de proteínas con cicloheximida ($1 \mu\text{M}$). Tanto el E_2 como el dietilestilbestrol, fueron capaces de generar un incremento en las corrientes totales de salida de K^+ , en presencia de cicloheximida, mostrando con esto claramente que los efectos de los estrógenos sobre los canales de K^+ en CMLV no dependen de un mecanismo genómico.

Con estos resultados, proponemos evaluar: I) La segunda mensajería intracelular involucrada en la interacción del receptor $ER\alpha$ con los canales K_v en estas células. II) Realizar estudios de estereoespecificidad de las hormonas estrogénicas sobre los efectos de incremento de las corrientes de K^+ . III) Modificar la estructura química de los estrógenos para obtener sus efectos "cardioprotectores" y eliminar sus efectos estrogénicos. Todo lo anterior con la finalidad de establecer terapias más específicas y razonadas en el tratamiento y prevención de enfermedades cardiovasculares.

10.- Conclusiones.

- 1) El E_2 tiene efectos vasodilatadores sobre el tejido de aorta de rata, dependientes de su concentración y del gradiente de concentración de K^+ .
- 2) Los estrógenos generan un incremento en las corrientes totales de salida de K^+ , de manera dependiente de la concentración y con la siguiente potencia: dietilestilbestrol > E_2 = einilestradiol > progesterona.
- 3) El efecto de estas hormonas sobre los canales de K^+ ; es específico debido a que en presencia de un inhibidor de canales K_V (4-AP), el E_2 y el dietilestilbestrol no tienen efecto. Además, los canales K_V son la principal población de canales de K^+ presente en estas células (85%).
- 4) Se utilizó el análisis de Schild para determinar que el efecto sobre las corrientes de K^+ está mediado por la interacción de los estrógenos con el receptor $ER\alpha$.
- 5) Los efectos analizados en este estudio no dependen de mecanismos genómicos, debido a que un bloqueador de la síntesis de proteínas no modificó el efecto de estas hormonas sobre las corrientes de K^+ .

11. - Bibliografía.

- ❖ Adams, D.J. S. J. Smith and S. H. Thompson. 1980. Ionic currents in molluscan soma. *Ann. Rev. Neurosci.* 3: 141-167.
- ❖ Adelman, J. P., K.-Z. Shen, M. P. Kavanaugh, R. A. Warren, Y.-N. Wu, A. Lagrutta, C. T. Bond, and R. A. North. 1992. Calcium-activated potassium channels expressed from cloned complementary DNAs. *Neuron* 9: 209-216.
- ❖ Adrian, R. H., W. K. Chandler, and A. L. Hodgkin. 1970a. Voltage clamp experiments in striated muscle fibres. *J. Physiol. (Lond.)*. 208: 607-644.
- ❖ Adrian, R. H., W. K. Chandler, and A. L. Hodgkin. 1970b. Slow changes in potassium permeability in skeletal muscle. *J. Physiol. (Lond.)*. 208: 645-668.
- ❖ Ashcroft, S. J. H., and F. M. Ashcroft. 1990. Properties and functions of ATP-sensitive K-channels. *Cell Signaling* 2: 197-214.
- ❖ Andersen, H. L., Weis, J.U., Fjalland, B. and Korsgaard N. 1999. Effects of acute and long-term treatment with 17 β -estradiol on the vasomotor responses in the rat aorta. *British J. Pharmacol.*, 126: 159-168.
- ❖ Avers, Carlote J. *Biología Celular*. 1991. 2^a ed. México, Grupo editorial Iberoamericana., 532 pp.
- ❖ Beam, K. G. and L. Donaldson. 1983a. A quantitative study of potassium channels kinetics in rat skeletal muscle from 1 to 37°C. *J. Gen. Physiol.* 81: 485-512.
- ❖ Beech, D. J., and T. B. Bolton. 1989. A voltage-dependent outward current with fast kinetics in single smooth muscle cells isolated from rabbit portal vein. *J. Physiol. Lond.* 412: 397-414.
- ❖ Benkusky, N.A., Korovkina, V.P., Brainard, A.M. and England S.K. 2002. Myometrial maxi-K channel β 1 subunit modulation during pregnancy and after 17 β -estradiol stimulation. *FEBS Letters*. 524:97-102.
- ❖ Bush T. L., Barret-Connor E. and Cowan L. D. 1985. Noncontraceptive estrogen use and cardiovascular disease. *Epidemiol. Rev.* 7:89-104.
- ❖ Bush, T.L., Barret-Connor, E. Cowan, L.D., Criqui, M.H., Wallace, R.B., Suchindran, C.M., Tyroler, H.A., Rifkind, B.M. 1987. Cardiovascular mortality and

non contraceptive use of estrogen in women: Results from the lipid research clinics program follow-up study. *Circulation*. 75(6): 1102-1106.

- ❖ Channing C. P., et al.: 1980. Ovarian follicular and luteal physiology. En Greep, RO. (ed): *International review of physiology: reproductive physiology III*. Vol. 22. Baltimore, University Park press. 117 pp.
- ❖ Chen Z., Yuhanna I. S., Galcheva-Gargova Z., Karas R. H., Mendelsohn M. E. and Shaul P. W. 1999. Estrogen receptor α mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J. Clin. Invest.* 103: 401-406.
- ❖ Cook, D. L., and N. Hales. 1984. Intracellular ATP directly blocks K^+ channels in pancreatic β -cell. *Nature (Lond.)*. 311: 271-273.
- ❖ Crook D., Goldsland I. F., and Wynn V. 1988. Oral contraceptives and coronary heart disease: modulation of glucose tolerance and plasma lipid risk factors by progestins. *A. J. obstet. Gynecol.* 158: 1612-1620.
- ❖ Daniel, W. W., 2002. *Bioestadística*. 4a edición. Ed. Limusa Wiley., 755 pp.
- ❖ Dubois, J. M. 1983. Potassium currents in the frog node of Ranvier. *Prog. Biophy. Molec. Biol.* 42: 1-20.
- ❖ Edwards, F. R., and G. D. S. Hirst. 1988. Inward rectification in submucosal arterioles of guinea pig ileum. *J. Physiol. Lond.* 404: 437-454.
- ❖ Franco, Y, Mendoza-Fernández, V., Lemini, C. 2003. Mecanismos de acción de los estrógenos sobre el sistema cardiovascular. *Rev. Fac. Med., UNAM.* 46(3): 101-108.
- ❖ Fritsch M. K., and Murdoch F. E. 1994. *Human Pharmacology molecular to clinical*. 2nd ed., Brody T. M., Larner J., Minneman K., Neu H. C. . New York, NY. pp 482-500.
- ❖ Ganong, W. F. *Fisiología médica*. 17^a edición. México, Manual Moderno, 2000. 944 pp.
- ❖ Geneser, Finn. *Histología*. 2^a ed. México, Panamericana, 1996. 768 pp.
- ❖ Goldman, D. E., 1943. Potencial, impedance and rectification in membranas. *J. Gen. Physiol.* 27: 37-60.
- ❖ Guyton, A. C., *Tratado de fisiología médica*. 7^a ed. México, Interamericana-McGraw-Hill, 1995. pp. 959-971

- ❖ Hagiwara, S., and M. Yoshii. 1979. Effects of internal potassium and sodium on the anomalous rectification of the starfish egg examined by internal perfusion. *J. Physiol. Lond.* 292: 251-265.
- ❖ Haynes, M.P., Li, L., Russell, K.S. and Bender, J.R. 2002. Rapid vascular cell responses to estrogen and membrane receptors. *Vascular Pharmacol.* 38:99-108.
- ❖ Hille, B., 1992. *Ionic Channel of Excitable Membranes*. 2nd ed. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, MA. 607 pp.
- ❖ Hirst, G. D. S., and F. R. Edwards. 1989. Sympathetic neuroeffector transmission in arteries and arterioles. *Physiol. Rev.* 69: 546-604.
- ❖ Hodgkin, A. L., and B. Katz. 1949. The effect of the sodium ions on the electrical activity of the giant axon of the squid. *J. Physiol. Lond.* 108: 37-77.
- ❖ Ibarra, J., G. E. Morley, and M. Delmar. 1991. Dynamics of the inward rectifier K^+ current during the action potential of guinea pig ventricular myocytes. *Biophys. J.* 60: 1534-1539
- ❖ Junqueira, L. C., 1997. *Biología celular*. 1^a ed. La Prensa Médica Mexicana. México D.F., pp. 82-104.
- ❖ Kalin, M.F., Zumoff, B. 1990. Sex hormones and coronary disease: a review of the clinical studies. *Steroids.* 55: 330-351.
- ❖ Kelly, M.J., Ronnekleiv, O.K., Ibrahim, N., Lagrange, A.H. and Wagner, E.J. 2002. Estrogen modulation of K^+ channel activity in hypothalamic neurons involved in the control of the reproductive axis. *Steroids.* 67:447-456.
- ❖ Kitazawa, T., Hamada, E., Kitazawa, K., and Gaznabi, M. 1997. Non-genomic mechanism of 17- β -oestradiol-induced inhibition of contraction in mammalian vascular smooth muscle. *Journal of Physiology*, 492.2: 497-511.
- ❖ Lancaster, B. 1999. Isolation of potassium currents. *Cellular Neurobiology. A practical approach*. Chad, J. and Whwal, H. (eds), Irl Press, Oxford, UK. 97-117.
- ❖ Lantin-Hermoso R. L., Rosenfeld C. R., Yuhanna I. S., German Z., Chen Z., and Shaul P. W. 1997. Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium. *Am. J. Physiol*; 273:L129-L126.
- ❖ Latorre, R. y López-Borneo. 1996. *Biofísica y fisiología celular*. España. Secretariado de publicaciones. 708 pp.

- ❖ Lein A., 1979. *The Cycling Female: her Menstrual Rhythm*. San Francisco. W. H. Freeman.
- ❖ Martínez, C., Sánchez, M., Hidalgo, A., García de Boto, M.J. 2001. Involvement of K ATP channels in diethylstilbestrol-induced relaxation in rat aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 413: 109-116.
- ❖ McManus, O. B., and K. L. Magleby. 1991. Accounting for the Ca²⁺ dependent kinetics of single large-conductance Ca²⁺ activated K⁺ channels in rat skeletal muscle. *J. Physiol. Lond.* 443: 739-777.
- ❖ Mendelsohn, M. E., 2002. Genomic and Nongenomic Effects of estrogen in the Vasculature. *Am. J. Cardiol*; 90(suppl): 3F-6F.
- ❖ Mendelsohn, M.E., and Karas R. H. 1999. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N. Engl. J. Med*; 340: 1801-1811.
- ❖ Miller E. 1988. Molecular biology of steroid hormone synthesis, *Endocr. Rev.*, 9: 295-318.
- ❖ Nakajima, T., Kitazawa, T., Hamada, E., Hazaña, H., Omata, M., and Karachi, Y., 1995. 17 β -estradiol inhibits the voltaje-dependent L-type Ca²⁺ currents in aortic smooth muscle cells. *European Journal of Pharmacology.*, 294: 625-635.
- ❖ Nebert D. W, and González F. J. 1987. P₄₅₀ genes: structure, evolution, and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 56: 945-993.
- ❖ Nelson, M.T., J.B. Patlak, J.F. Worley and N.B. Standen, 1990, Calcium channels, potassium channels, and voltage dependence of arterial smooth muscle tone., *Am. J. Physiol.* 259, C3.
- ❖ Nelson, M. T., and Quayle, J. M; 1995. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am. J. Physiol.* 268 (Cell Physiol. 37): c799-c822.
- ❖ Nelson, P. G., and K. Frank; 1967. Anomalous rectification in cat spinal motoneurons and effect of polarizing currents on excitatory postsynaptic potential. *J. neurophysiol.* 30: 1097-1113.
- ❖ Nelson, M.T. and J.M. Quayle, 1995, Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle., *Am. J. Physiol.* 268, C799.
- ❖ Noble, D., and R. W. Tsien; 1968. The kinetics and rectifier properties of the slow potassium current in cardiac Purkinje fibres. *J. Physiol. Lond.* 195: 185-214.

- ❖ Noma, A. 1983. ATP-regulated K^+ channels in cardiac muscle. *Nature* lond. 305: 147-148.
- ❖ Rang, H. P., 2000. *Pharmacology*. 4th ed. Churchill Livingstone, Edinburgh. pp 278-299.
- ❖ Romey, G., and M. Lazdunski; 1984. The coexistence in rat muscle cells of two distinct classes of Ca^{2+} -dependent K^+ channels with different pharmacological properties and different physiological function. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 188: 669-674.
- ❖ Rudy, B. 1988. Diversity and ubiquity of K^+ channels. *Neuroscience*. 25: 729-749.
- ❖ Sakman, B., and Neher, E. 1995. *Single Channel Recording*. 2a. ed. USA., Plenum Press., 700 pp.
- ❖ Shrager, P., 1974. Ionic conductance changes in voltage clamped crayfish axons at low pH. *J. Gen. Physiol.* 64: 666-690.
- ❖ Simoncini T., hafezi-Moghadam A., Brazil D. P., Ley K., Chin W. W., and Liao J. K., 2000. Interaction of estrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase. *Nature*; 407:583-541.
- ❖ Sullivan J. M., Vander Zwaag R., Lemp G. F. Hughes J. P., Maddock V., Kroetz F. W., Ramanathan K. B., and Marvis D. M. 1988. Postmenopausal estrogen use and coronary atherosclerosis. *Ann. Intern. Med.* 108: 358-363.
- ❖ Tang, G., Wang, R., 2001. Differential expression of K_V and K_{Ca} channels in vascular smooth muscle cells during 1-day culture. *Eur J Physiol.*, 442: 124-135.
- ❖ Tare M, Coleman HA, Parkington HC. 2002 Glycyrrhetic derivatives inhibit hyperpolarization in endothelial cells of guinea pig and rat arteries. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* Jan;282(1):H335-41
- ❖ Trube, G., P. Rorsman., and T. Ohno-Shosaku; 1986. Opposite effects of tolbutamide and diaxoxide on the ATP- dependent K^+ channel in mouse pancreatic cell. *Pfluegers Arch.* 407: 493-499.
- ❖ Valverde, M.A., Rojas, P., Amigo, J., Cosmelli, D., Orio, P., Bahamonde, M.I., Mann, G.E., Vergara, C., and Latorre R., 1999. Acute activation of Maxi-K channels (*hSlo*) by estradiol binding to the β subunit. *Science*. September., Vol. 285: 1929-1931.

- ❖ Volk, K. A., J. J. Matsuda, and E. F. Shibata. 1991. A voltage-dependent potassium current in rabbit coronary artery smooth muscle cells. *J. Physiol. Lond.* 439: 751-768.
- ❖ William, C. L. and Stancel G. M. 1996. *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. 9ª ed. Hardman J. G., Limbird L. E., Molinoff P. B., Ruddon R. W., Goodman and Gilman A. México.
- ❖ Wein, A., Jengla, T., and Salkoff, L. 1996. Eight potassium channels families revealed by *C. elegans* genome Project. *Neuropharmacol.* 35(7): 805-829.
- ❖ Wellman, G.C., Bonev, A.D., Nelson, M.T., and Brayden J.E., 1996. Gender differences in coronary artery diameter involve estrogen, nitric oxide, and Ca^{2+} -dependent K^+ channels. *Circulation Research*; ProQuest Medical Library., Nov, 79,5: 1024-1030.
- ❖ White, R.E., Darkow, D.J., and Falvo Lang Jessica L., 1995. Estrogen relaxes coronary arteries by opening BK_{Ca} channels through a cGMP-dependent mechanism. *Circulation Research*; ProQuest Medical Library., Nov, 77,5: 936-942.