



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

ACCIONES PROTECTORAS DE LOS ESTROGENOS SOBRE MUSCULO LISO VASCULAR

TRABAJO MONOGRAFICO DE ACTUALIZACION QUE PARA OBTENER EL TITULO DE: QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA PRESENTA: YANIRA FRANCO MURILLO



MEXICO, D.F.



291065

2001

EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUIMICA



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

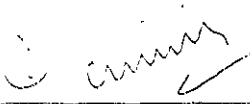
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

Jurado Asignado:

Presidente	QFB Rosa María E Páez Aguirre
Vocal	Dra. Elia Brosla Naranjo Rodríguez
Secretario	M en C Cristina Lemini Guzmán
1er. Suplente	QFB Eva Eloína Hernández Avitia
2° Suplente	MVZ Eduardo Cumming González

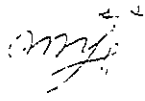
Facultad de Medicina
Departamento de Farmacología, Laboratorio de Farmacología Endócrina. Edificio "A" 6°
piso

Asesor



M en C Cristina Lemini Guzmán

Sustentante.



Yanira Franco Murillo

Generalmente, la soledad nos parece un enemigo.

El dolor de corazón no es algo queelijamos invitar a nuestra vida. Es algo inquieto que nos quema y que está preñado del deseo de escapar y encontrar algo o a alguien que nos haga compañía. Cuando podemos descansar en el punto medio, empezamos a tener una relación serena con la soledad, una soledad relajante y refrescante que pone nuestros temores totalmente del revés.

Pema Chödrön

AGRADECIMIENTOS

A mis padres Humberto y María de Jesús por todo su amor, paciencia y comprensión y en especial a ti mamá por todo tu valor y coraje para salir siempre adelante

A la M en C Crsituna Lemini Guzmán por todo su aprecio y apoyo.

A la QFB Griselda Silva Leal por sus consejos y orientación.

Al Dr. Victor Mendoza Fernandez por todo su tiempo y dedicación al desarrollo de este trabajo y en especial por su inigualable y valiosa amistad

A la Dra. Ruth Jaimez Meigoza por esa maravillosa amistad que nos permite seguir creciendo juntas y sobre todo por tu enorme cariño

A mis hermanas Caro y Susi y a la familia Murillo que han estado ahí apoyándonos.

A mis amigos Montserrat, Angeles, Lety, Xochitl, Juanita, Nelhy, JJ, Adriana, por todos esos días juntos, compartiendo nuestras ganas de vivir y en particular a ti Ray por lo sorprendente y singular de nuestra amistad

A los amigos de la Sangha por todas sus ganas de seguir adelante en el “camino del guerrero” y practicar el Dharma y en especial a ti Tony por todos tus sabios consejos.

DEDICATORIA

A la memoria de *mi Padre*, por todo su esfuerzo y dedicación en los últimos y mas duros años de tu vida, por dejar tu mayor legado de responsabilidad y amor.

Y a mi madre *María de Jesús* por su integridad, entereza e inquebrantable amor

Con todo mi respeto y admiración, Yani

INDICE

1	RESUMEN	1
2	INTRODUCCION	1
2.1	Estrógenos	1
2.2	Biosíntesis	2
2.3	Acciones fisiológicas	6
2.4	Mecanismo de acción de las hormonas esteroides	9
3	ANTECEDENTES	12
3.1	Fisiología del músculo liso vascular	12
3.1.1	Control nervioso y hormonal de la contracción del músculo liso	16
3.2	Músculo liso vascular como tejido no blanco para estrógenos	18
4	JUSTIFICACION	21
5.	OBJETIVO	23
6.	EFECTOS DE LOS ESTRÓGENOS SOBRE EL MLV	24
6.1	Efectos moduladores de los estrógenos sobre la excitabilidad y tono vascular	24
6.2	Evidencias de la interacción entre estrógenos y MLV	28
6.3	Determinación de receptores de estrógenos (RE) en MLV	30
6.4	Sitios de unión para estrógenos en la membrana	32
6.5	Mecanismos involucrados en las acciones protectoras de los estrógenos sobre músculo liso vascular	35
6.5.1	Oxido Nítrico	35
6.5.2	Endotelina	41
6.5.3	Eicosanoides	44
6.5.4	Respuestas adrenérgicas	47
6.5.5	Homeostasis del calcio	49

6 6	Influencia de los estrógenos sobre el metabolismo de lipoproteínas	53
7	CONCLUSIONES	58
8	REFERENCIAS	59

ABREVIATURAS

Ach	Acetilcolina
ADP	Adenosina-5'-difosfato
AMPc	Adenosina-3',5'-monofosfato ciclica
ATP	Adenosina-5'-trifosfato
DES	Diétilstilbestrol
DG	Diácilglicerol
DNA	Acido desoxirribonucleico
DNA _{sa} I	DNA polimerasa I
E ₁	Estrona
E ₂	17β-estradiol
E ₃	Estriol
ECE	Enzima concertadora de endotelina
EDRF	Factor relajante de endotelio
EPB	Elemento promotor basal
ERE	Elemento de respuesta a estrógenos
E _m	Potencial de membrana
ET-1	Endotelina
Flα	6-ceto-prostaglandina
GABA _A	Receptor "A" del ácido γ-aminobutírico
GMPc	Guanosina monofosfato ciclica
HDL	Lipoproteína de alta densidad
5-HT	5-hidroxi-triptamina
IP ₃ (InSP _{1,4,5})	Inositol trifosfato
LDL	Lipoproteína de baja densidad
ML	Músculo liso
MLCK	Cinasa de la cadena ligera de la miosina
MLV	Músculo liso vascular
NA	Noradrenalina

NO	Oxido nítrico
PIP ₂	Fosfatidil-inositol-4,5-bisfosfato
PKC	Proteína cinasa C
PLC	Fosfolipasa C
RE	Receptor de estrógeno
SNC	Sistema nervioso central
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, transcriptasa reversa
TEA	Tetraetil amonio
TRH	Terapia de reemplazo hormonal
VLDL	Lipoproteína de muy baja densidad

1. RESUMEN

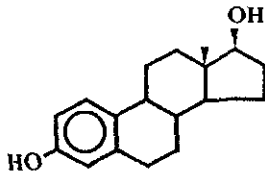
Los estrógenos son hormonas esteroides que se producen principalmente en el ovario, con la finalidad de estimular la proliferación y el crecimiento de las células encargadas del desarrollo y mantenimiento de los caracteres sexuales secundarios de la mujer. Sin embargo, existen evidencias que muestran a los estrógenos como sustancias capaces de actuar modulando funciones sobre otros tejidos considerados como no blanco. Los principales efectos de los estrógenos sobre tejidos no blanco han sido reportados sobre el sistema cardiovascular. Se ha observado que la mujer en edad fértil está protegida de infarto al miocardio y que esta protección disminuye después de la menopausia. En terapia substitutiva de estrógenos se han reportado efectos protectores y efectos no protectores de estas sustancias que señalan un incremento en el riesgo de sufrir infartos, hipertensión y el inicio de procesos ateroscleróticos. Esta controversia aún no ha sido aclarada, se ha señalado la dosis como un factor que modifica la respuesta de los estrógenos. También se ha postulado un aumento en la reactividad del músculo liso vascular lo que puede dar lugar a eventos directamente involucrados en los procesos clínicos de desarrollo de enfermedades cardiovasculares. En el presente trabajo monográfico, revisamos y analizamos, la información reportada a la fecha en revistas científicas de carácter internacional, que relacionan el mecanismo de acción de los estrógenos sobre la actividad fisiológica del músculo liso vascular. Esto contribuirá al entendimiento del efecto protector que ejercen los estrógenos y al desarrollo de una serie de estrategias de investigación que permitan establecer los mecanismos celulares por los cuales estas sustancias modulan el tono y la actividad de contracción del músculo liso vascular.

2. INTRODUCCIÓN

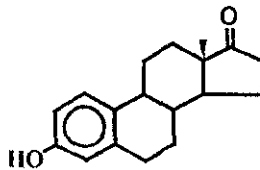
2.1 Estrógenos

Las hormonas sexuales femeninas estrógenos y progestágenos estimulan la proliferación y el crecimiento de células específicas, así como el desarrollo de las características sexuales secundarias de la mujer. Estas sustancias participan en el mantenimiento del embarazo, el control del ciclo menstrual/ovulatorio y en la modulación de ciertos procesos metabólicos (Fritsch MK y Murdoch FE, 1994)

El más importante y potente estrógeno en humanos es el 17 β -estradiol (E₂) el cual es sintetizado y secretado por los ovarios, seguido por la estrona (E₁), cuya formación se lleva a cabo en los tejidos periféricos a partir de los andrógenos secretados en la corteza suprarrenal y células de la teca del ovario (figura 1, Williams CL y Stancel GM, 1996).



Estradiol



Estrona

Figura 1. Estructura química de los estrógenos

2.2 Biosíntesis

La biosíntesis de los estrógenos se lleva a cabo a partir del colesterol que conduce a la pregnenolona que es el precursor de las hormonas sexuales. Durante la biosíntesis de los estrógenos se forman compuestos intermediarios como la androstendiona y testosterona que conducen a la formación de E_1 y E_2 (figura 2). Esta conversión final involucra la aromatización del anillo "A", y se lleva a cabo en tres pasos en los que interviene el complejo enzimático monooxigenasa (aromatasa) que utiliza la forma reducida NADPH y oxígeno molecular como co-sustratos (Miller E, 1988). En el primer paso de esta reacción, el metilo angular en C-19 de los precursores androgénicos es hidroxilado, posteriormente una segunda hidroxilación en el mismo átomo produce la eliminación del grupo hidroximetilo del C-19 y finalmente la hidroxilación del C-2 conduce a la formación de un intermediario inestable que se reordena para formar el anillo fenólico "A".

La actividad de la aromatasa reside dentro de una glucoproteína transmembranal (P_{450} aromatasa) que es homóloga con la familia de monooxigenasas del citocromo P_{450} (Nebert F y Gonzalez C, 1987, Corbin W, *et al.*, 1988), también es esencial una flavoproteína y NADPH-citocromo P_{450} reductasa. Ambas proteínas están localizadas en el retículo endoplásmico de las células de la granulosa del ovario y en las células testiculares de Sertoli y Leydig. También se encuentran en células estromales del tejido adiposo, sinciotrofoblastos de placenta, blastocitos de preimplantación y diversas regiones del cerebro, incluyendo el hipotálamo (Williams CL y Stancel GM., 1996).

Los ovarios constituyen la principal fuente de estrógenos circulantes de las mujeres premenopausicas cuyo principal producto de secreción es el estradiol (E_2), que es

sintetizado por las células de la granulosa a partir de precursores androgénicos proporcionados por las células de la teca. Aquí, como en otros tejidos, la actividad aromatasas es inducida por las hormonas gonadotróficas, que actúan vía receptor en la membrana plasmática elevando la concentración de adenosina 3'-5' monofosfato (AMPc)

Las gonadotropinas y el AMP cíclico también aumentan la actividad de la enzima que produce la ruptura de la cadena lateral del colesterol facilitando el transporte del colesterol a las mitocondrias de las células donde se sintetizan estos esteroides. El E₂ secretado es oxidado reversiblemente a estrona (E₁) por la enzima 17-hidroxiesteroide deshidrogenasa y ambos estrógenos pueden ser convertidos a estriol (E₃). Esta transformación tiene lugar principalmente en el hígado, aunque de igual forma éste y otros metabolitos se encuentran en tracto gastrointestinal, cerebro, piel y otros tejidos blanco (Williams CL y Stancel GM, 1996). También el E₂ puede producirse desde andrógenos vía aromatasas presentes en el sistema nervioso central (SNC) provocando efectos locales cerca del sitio de su producción que se han establecido como efectos parácrinos no genómicos (Revelli A, *et.al.*, 1998)

Los estrógenos y las progestinas son metabolizados, permitiendo la producción de compuestos menos activos y también más hidrosolubles que la hormona original, lo que permite que sean excretados fácilmente en la orina. Una pequeña fracción de los metabolitos estrogénicos entran a la bilis, de donde pueden pasar a circulación enterohepática antes de su eliminación. La producción local de los estrógenos por esta vía, se cree que juega un papel de importancia como inductor del desarrollo de ciertas enfermedades, como el cáncer de mama. Normalmente 10% o menos de los metabolitos de estrógenos y progestinas son excretados en las heces. Las principales rutas de metabolismo

de estrógenos y progestinas son la hidroxilación, O-metilación y la formación de conjugados con ácido glucurónico y sulfatos. De esta forma E_1 , E_2 , 2-metoxiestrona y sus correspondientes conjugados glucurónicos y sulfatos son los metabolitos urinarios más abundantes (Strobl J y Thomas JA., 1991).

En mujeres postmenopáusicas y en hombres de la misma edad, la principal fuente de estrógenos es el tejido adiposo donde E_1 , es sintetizada a partir de dehidroepiandrosterona, secretada por la corteza suprarrenal. Así la contribución del tejido adiposo a la reserva de estrógenos es regulada en parte por la disponibilidad de los precursores androgénicos (Mendelson y Simpson, 1987). También, grandes cantidades de estrógenos son biosintetizadas por la placenta, la cual utiliza dehidroepiandrosterona fetal y su derivado 16α -hidroxilado para producir E_1 y E_2 respectivamente, por lo que la orina de mujeres embarazadas es una fuente natural y abundante de estrógenos (Williams CL y Stancel GM, 1996).

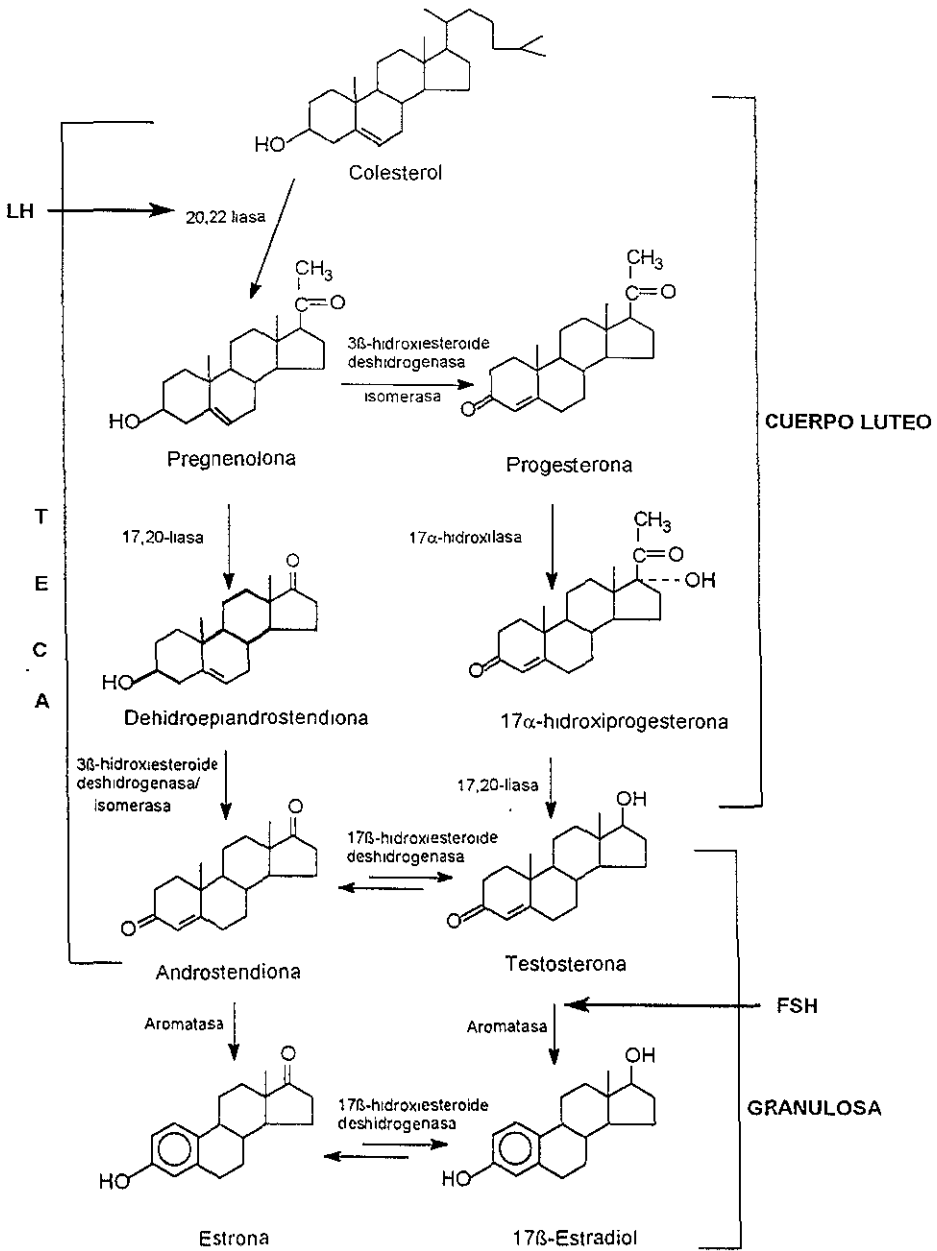


Figura 2. Biosíntesis de hormonas sexuales

2.3 Acciones fisiológicas de los estrógenos

Los estrógenos son responsables en gran medida de los cambios que tienen lugar en las niñas durante la pubertad y explican los atributos del fenotipo femenino. Mediante una acción directa, causan el crecimiento y el desarrollo de la vagina, el útero y las trompas de Falopio. Inducen el aumento de tamaño de las mamas promueven el crecimiento ductal, el desarrollo del estroma y la acumulación de grasa, efectos en los cuales también intervienen las hormonas hipofisiarias. Además contribuyen en forma no bien conocida a moldear el contorno corporal, dando forma al esqueleto y produciendo cambios en las epífisis de los huesos largos que condicionan el brote puberal en crecimiento y su culminación por fusión de las epífisis (Channing CP, *et al.*, 1980).

Las hormonas estrogénicas naturales también inducen la proliferación del revestimiento mucoso de las trompas de Falopio efecto similar al que ejercen sobre el endometrio uterino. Las células glandulares proliferan y el número de células epiteliales ciliadas que revisten las trompas de Falopio aumenta, estimulándose considerablemente la actividad de los cilios, que siempre laten en dirección del útero, facilitando el transporte del huevo fecundado hacia la matriz (Lein A, 1979).

Estas sustancias ejercen efectos importantes sobre el esqueleto, debido a que aumentan la actividad osteoblástica. Por tanto, al llegar la pubertad, cuando la niña entra en su periodo de fertilidad, el crecimiento se acelera durante los años siguientes. Sin embargo los estrógenos tienen otro efecto sobre el crecimiento esquelético; provocan el cierre de la epífisis con las diáfisis de los huesos largos. Este efecto es mucho más intenso en la mujer

que el de la testosterona en el varón. En consecuencia, el crecimiento de la mujer suele cesar unos años antes que el del varón. Después de la menopausia los ovarios casi no secretan estrógenos. Esta deficiencia de estrógenos conduce a 1) disminución de la actividad osteoblástica de los huesos, 2) disminución de la matriz ósea, y 3) menor depósito de calcio y fosfato en el hueso. En algunas mujeres este efecto es extremadamente grave, y el trastorno resultante se llama osteoporosis. Como este fenómeno puede debilitar en gran medida los huesos y producir fracturas, en especial de las vértebras, para evitarlo gran cantidad de mujeres post-menopáusicas son tratadas de manera crónica con estrógenos sustitutivos (Guyton AC, 1995).

Por otro lado, los estrógenos aumentan la tasa metabólica de las grasas, provocando el depósito de grandes cantidades de grasa en el tejido subcutáneo. Disminuyen la velocidad de resorción ósea al antagonizar el efecto de la hormona paratiroidea (PTH) en el hueso, aunque no estimulan la formación de éste. Estas sustancias intervienen parcialmente en la conservación de la estructura normal de la piel y los vasos sanguíneos en la mujer. También ejercen efectos importantes en la absorción por el intestino, porque disminuyen su motilidad. Facilitan la pérdida de líquido intravascular y su paso al espacio extracelular, con lo que generan edema. La disminución del volumen plásmico hace que se retenga sodio y agua por los riñones como mecanismo compensador. Además de estimular la síntesis de enzimas que permiten el crecimiento del útero y modifican la producción y actividad de otras enzimas, en el hígado, producen aumento de la síntesis de proteínas de fijación o transporte, incluyendo las de estrógeno, testosterona y tiroxina (Channing C.P, *et al*, 1980).

Por otra parte, los estrógenos afectan el proceso de coagulación de la sangre. En animales de laboratorio producen cambios bifásicos de la coagulación sanguínea posiblemente mediante la inducción de cambios en los factores que influyen en la coagulación, como son el factor II, VII, IX y X. Efectos que también se han correlacionado con cambios en las concentraciones de plasminógeno y en la adhesividad plaquetaria (Hedlin AM, 1975, Koh KK, *et al.*, 1999)

Un efecto importante de los estrógenos es la alteración que producen en la composición de los líquidos plasmáticos, induciendo un aumento en la concentración de las lipoproteínas de alta densidad (HDL, high density lipoprotein); así como, una reducción en la concentración de las lipoproteínas de baja densidad (LDL, low density lipoprotein), al mismo tiempo reducen la concentración plasmática de colesterol y aumentan la concentración de triacilglicerolos (Burkman 1988; Crook y col., 1988). Estos efectos pueden disminuir el riesgo de enfermedad coronaria y contribuir a una incidencia menor de infarto de miocardio en las mujeres premenopáusicas. El uso de estrógenos en las mujeres posmenopáusicas también ha sido asociado con una incidencia menor de enfermedad coronaria (Bush y Barret-Connor, 1985, Gruchow *et al.*, 1988, Sullivan, *et al.*, 1988).

2.4 Mecanismo de acción de las hormonas esteroides

Los estrógenos al igual que otras hormonas esteroides, actúan principalmente por medio de la regulación de la expresión de genes. Una vez que las hormonas esteroides se han transportado desde su sitio de biosíntesis a sus células efectoras se inicia el mecanismo de acción hormonal. El primer hecho lo constituye el paso del esteroide en su forma libre (desprovisto de su proteína transportadora) al interior de la célula. Estas hormonas lipofílicas difunden de forma pasiva a través de la membrana plasmática y se distribuyen de acuerdo con su especificidad y su alta afinidad por el receptor que está presente en el núcleo y citoplasma de las células blanco. Las hormonas se unen a un receptor específico que se encuentra en el interior de la célula, formando un complejo hormona-receptor. El complejo hormona-receptor se activa en la célula, lo que se acompaña de una translocación al interior del núcleo y fijación a la cromatina. Posteriormente se une a una región específica en el DNA mediante elementos de respuesta específicos de estrógenos (EREs), los cuales están fuertemente implicados en la modulación de la frecuencia y el inicio de la transcripción, donde estimulan la actividad de la polimerasa del RNA y la síntesis de RNA. De esta forma, inicia la activación e inactivación de genes específicos que afectan selectivamente la transcripción genética y la producción del mRNA, produciendo proteínas específicas (enzimas, factores reguladores y proteínas estructurales) y ejerciendo influencia sobre los procesos metabólicos, los cuales representan la respuesta característica de los estrógenos en los tejidos blanco. (figura 3; Granner DK, 1995).

Experimentalmente se ha calculado que la constante de disociación del receptor de estradiol en el citosol es de aproximadamente 1×10^{-10} M, lo que indica la alta afinidad y especificidad de unión de las hormonas estrogénicas por su sitio receptor (Williams CL, y Stancel GM, 1996)

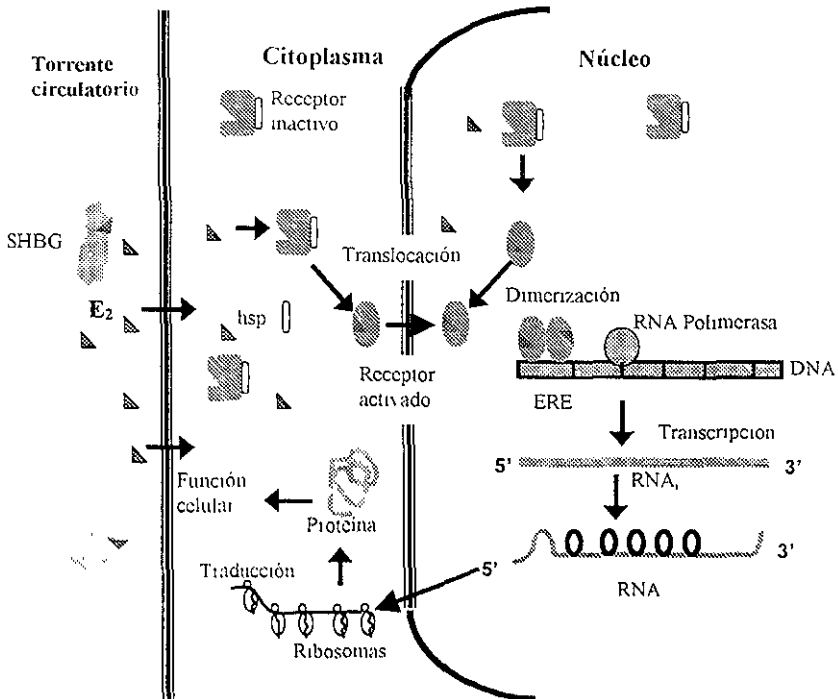


Figura 3. Mecanismo de acción de las hormonas esteroides

La regulación esterooidal de genes está en las regiones "abiertas" o en la cromatina transcripcionalmente activa, así definida por su susceptibilidad para la digestión por la enzima DNAsa I. Estos genes tienen por lo menos dos regiones reguladoras separadas, en el sitio inicial de transcripción 5' de la secuencia del DNA (Tsai MJ, *et al.*, 1995)

La principal región reguladora es el elemento promotor basal (EPB), también conocida como "caja TATA" y la otra región es la caja CAAT, (figura 4) (Granner DK, 1995)

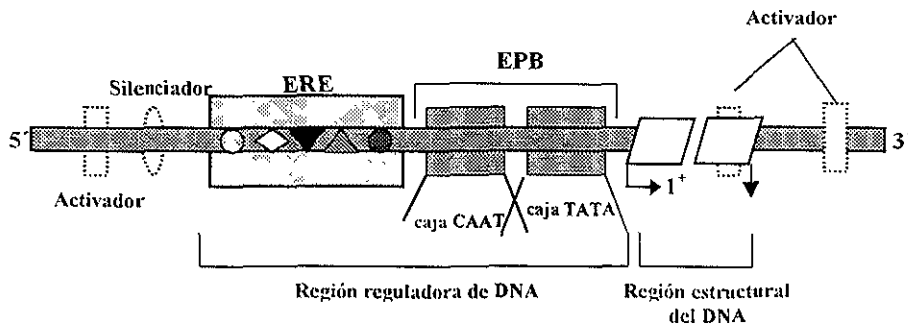


Figura 4. Requisitos estructurales para la regulación hormonal en la transcripción de genes. La transcripción inicia en la flecha, en donde 1+ significa el primer nucleótido del gene que es copiado. Inmediatamente a un lado, sobre el sitio 5', está el elemento promotor basal, el cual consiste de la caja TATA y otros componentes como la caja CAAT. Los elementos de respuesta a estrógenos pueden ubicarse en la región 5' o en el gen mismo. Las regiones estructurales que activan o silencian la transcripción pueden también estar localizadas en varios sitios dentro o alrededor del gene (Tomado de: Granner DK, 1995).

3. ANTECEDENTES

3.1 Fisiología del músculo liso vascular

El músculo liso (ML) forma parte de la porción contráctil del estómago, intestino, utero, de la pared arterial, de los conductos de las glándulas secretoras y muchas otras regiones en las cuales se requiere de contracciones lentas y constantes. Esta formado de capas celulares elongadas, delgadas y espigadas, cada una con un solo núcleo (figura 5) Las cuales presentan filamentos delgados y gruesos, que no están dispuestas en un orden estricto, sin la formación de miofibrillas, como en la disposición que se ve en el músculo esquelético y cardiaco. En su lugar, dichos filamentos forman un aparato contráctil estrecho, que esta burdamente alineado con los ejes largos de las células, pero ligadas de manera oblicua a la membrana plasmática, por medio de uniones semejantes a discos que mantienen juntas a las células, con un mayor grado de contracción produciendo movimientos más amplios (Alberts B, *et al*, 1989)

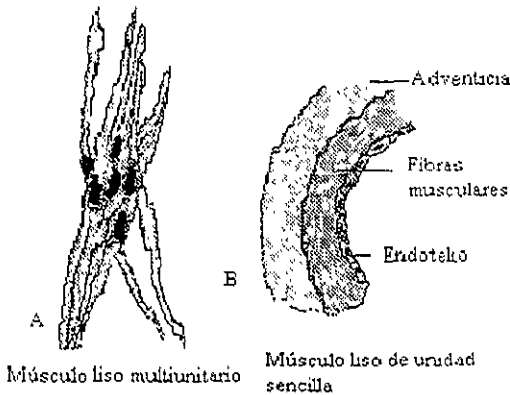


Figura 5. Tipos de músculo liso. A) muestra la disposición de las fibras musculares encontradas en algunos órganos B) esquematiza la relación estructural de los diferentes componentes en una arteria vascular (Tomada de Guyton AC, 1995)

La contracción del músculo liso igual que en el músculo esquelético se genera por la misma fuerza de atracción entre filamentos de actina y de miosina. El proceso contráctil también se activa por iones calcio y adenosina-5'-trifosfato (ATP) que se desdobla a adenosina-5'-difosfato (ADP) para suministrar la energía en el inicio de la contracción. El músculo liso generalmente se divide en dos tipos principales (figura 3), músculo liso de unidad sencilla, que forma la pared contráctil del intestino, conductos biliares, útero, vasos sanguíneos y el músculo liso multiunitario, el cual encontramos en las fibras lisas del músculo ciliar del ojo, iris, arterias, conductos seminales y esfínteres (Guyton AC, 1995).

La contracción del músculo liso vascular (MLV) se encuentra regulada por la concentración de calcio intracelular $[Ca^{2+}]_i$; El acoplamiento entre los eventos de excitación y contracción ocurre por diversos mecanismos. 1) la depolarización de la membrana celular del MLV permite la entrada de iones Ca^{2+} a través de los canales operados por cambios en el potencial de membrana (canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje). La apertura de estos canales provoca que se genere un flujo de Ca^{2+} hacia el interior de la célula, permitiendo un aumento en la concentración de $[Ca^{2+}]_i$; 2) la activación de los receptores de membrana por algunas sustancias vasoconstrictoras pueden inducir la apertura de los canales de calcio, con la consecuente elevación en la $[Ca^{2+}]_i$; y 3) la activación del receptor también puede aumentar dicha concentración al activar a la fosfolipasa C (PLC), la cual hidroliza al fosfatidil-inositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) para dar diacilglicerol (DG) e inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃). Ambas sustancias están involucradas en el proceso de contracción, el IP₃ por medio de una acción directa sobre el retículo sarcoplásmico, induce la liberación de Ca^{2+} al citoplasma celular, mientras que el DG activa a la proteína cinasa C (PKC), eventos importantes para la regulación de la $[Ca^{2+}]_i$. (Westfall D y Gerthoffer WT, 1994)

Cuando las $[Ca^{2+}]_i$ aumentan, éste se une a la calmodulina, enzima importante en los procesos de segunda mensajería en los que interviene el Ca^{2+} . Una vez formado el complejo calmodulina- Ca^{2+} , éste activa a la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK), la cual promueve la interacción entre la miosina y la actina formando un puente cruzado y permitiendo la contracción del MLV (figura 6)

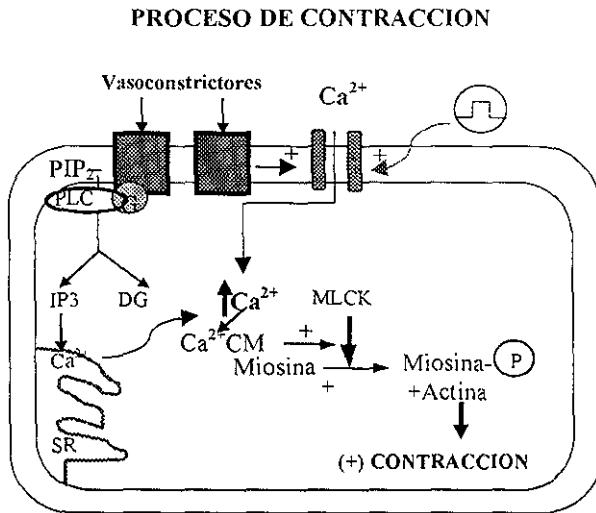


Figura 6. Mecanismo de contracción del músculo liso vascular. El esquema representa las diferentes vías por las cuales se puede inducir la contracción del músculo. La apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, la activación de cierto tipo de receptores por agonistas vasoconstrictores endógenos y la interacción directa del IP_3 sobre el retículo sarcoplásmico (SR) convergen en la misma vía intracelular que induce la contracción del MLV (Tomado de Westfall D y Gerthoffer WT, 1994)

Los bloqueadores de los canales de Ca^{2+} como la nifedipina y el verapamil, así como, la entrada limitada del ión a través de éstos, provocara una disminución en la probabilidad de interacción del Ca^{2+} con las proteínas contráctiles, por lo que, la contracción no se lleva a cabo. De esta forma, estos agentes se conocen con el nombre de vasodilatadores, los que dilatan a los vasos sanguíneos que exhiben cierto grado de vasoconstricción y modulan la vasoconstricción provocada por agonistas endógenos o exógenos (Vaghy PI, 1994)

Otro mecanismo por el cual se puede regular la contracción en el MLV, es a través de los canales de potasio (K^+) que estas células expresan. De tal forma que, el incremento de la conductancia del ión K^+ genera la hiperpolarización de la membrana celular, la que se asocia con una relajación del músculo liso. Este efecto hiperpolarizante también compensa la influencia de los agentes endógenos que actúan depolarizando la membrana y promoviendo la entrada de calcio. Por ejemplo, el minoxidil, un agente activador de los canales de K^+ dependientes de ATP induce una vasodilatación en el MLV (Westfall D y Gerthoffer WT, 1994)

Otro tipo de agentes que se encuentran relacionados con la vasodilatación del MLV son los nitrovasodilatadores (p.ej. nitroglicerina y eritritil-tetranitrato) que incrementan los niveles intracelulares de la guanosina monofosfato cíclica (GMPc) para desencadenar la cascada de eventos relacionados con la vasodilatación. Otros agentes involucrados en este proceso, son el factor relajante derivado del endotelio (EDRF) y el óxido nítrico (NO). Además, se ha mostrado que el incremento del AMPc está asociado a la relajación del ML, por medio de la activación de las cinasas de las proteínas dependientes de AMPc, enzima que fosforila a la MLCK, lo que se traduce a su vez en la inhibición de la contracción. Finalmente la activación de receptores asociados a la adenilato ciclasa, como los receptores β -adrenérgicos inducen una relajación por medio de la formación de AMPc, cuando se estimulan con isoproterenol (Westfall D y Gerthoffer WT, 1994)

3.1.1 Control nervioso y hormonal de la contracción del músculo liso

La contracción en el músculo liso se encuentra regulada por diversos estímulos de origen nervioso y hormonal. Con lo que respecta al control nervioso, existen sustancias transmisoras que inhiben o estimulan la contracción, dependiendo del tipo de receptor al cual se unen en la membrana de las células musculares. Esta comunicación se realiza a través de la innervación del ML por medio de los nervios autónomos, los cuales liberan sustancias como la acetilcolina (ACh) y la noradrenalina (NA). La ACh se une a receptores de tipo muscarínico principalmente; lo cual induce una serie de eventos intracelulares, como la apertura de canales de potasio o el incremento en la síntesis de DG e IP_3 , lo que genera una respuesta en el tono vascular (figura 7). Por otro lado, la NA se une a receptores de tipo adrenérgicos α y β , lo que induce un aumento en la formación de DG e IP_3 , inhibición y excitación de la adenilato ciclasa, dependiendo del subtipo de receptor activado ($\alpha_1, \alpha_2, \beta_1, \beta_2$, principalmente). Ambas sustancias, actúan fisiológicamente para mantener el tono vascular de manera antagónica, lo que permite un control fino del proceso de contracción (Katzung, BG, 1992, Peper K, *et al.*, 1982).

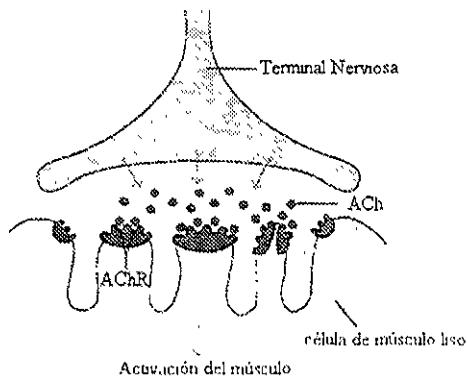


Figura 7. Interacción de ACh con sus receptores en la membrana de músculo liso. El esquema muestra el proceso de comunicación entre las terminales nerviosas y el ML.V, para modular la actividad contractil (AChR = receptor de ACh)

Por otro lado, las hormonas ejercen un papel importante en la actividad contráctil del MLV. La angiotensina, hormona secretada por las glándulas suprarrenales, así como, la vasopresina y la oxitocina secretadas por la glándula hipófisis anterior, inducen la contracción del músculo liso de varios tejidos, por medio de la unión a receptores específicos para cada sustancia. Por ejemplo, la angiotensina II se une a receptores específicos denominados AT_1 y AT_2 , los cuales al ser activados inducen la activación de la fosfolipasa C (PKC) lo que genera un aumento en la producción de DG y IP_3 , por lo tanto produce una movilización de $[Ca^{2+}]_i$, que culmina en una contracción suave del MLV (Watts S, *et al*, 1998).

Finalmente, tanto el control nervioso como el control hormonal en la regulación de la contracción, interactúan para dar a los órganos la capacidad de mostrar una actividad rítmica, tal es el caso de las oscilaciones contráctiles armoniosas que se observan en varios tejidos, como el músculo liso de intestino y de vías aéreas (Janssen L *et al*, 1998). Por tanto, son también susceptibles de ser modulados por sustancias presentes en condiciones fisiológicas en el medio extracelular.

3.2 Músculo liso vascular como tejido *no* blanco para estrógenos

Las diferencias de género en la morbilidad y mortalidad provocadas por enfermedades cardiovasculares, han sido atribuidas a las diferencias hormonales que existen entre la mujer y el hombre. Las mujeres están protegidas de padecer enfermedades cardiovasculares hasta el inicio de la menopausia, cuando los ovarios dejan de producir hormonas, hecho que se acompaña de un incremento considerable en la incidencia de problemas vasculares (Ruehlmann DO y Mann GE, 1996). Por otra parte, los efectos benéficos de los estrógenos exógenos, usados durante la terapia de reemplazo hormonal (TRH) (Stampfer MJ, *et al.*, 1991) son ampliamente conocidos; sin embargo, el mecanismo mediante el cual los estrógenos ejercen estos efectos sobre el tejido vascular permanece desconocido.

Tradicionalmente, las hormonas esteroideas han sido consideradas como moduladoras de la transcripción nuclear, iniciando una serie de eventos genómicos que son los responsables de sus efectos fisiológicos en los tejidos blanco. En la tabla 1a se presentan los tejidos considerados como órganos blanco que generan respuestas fisiológicas perceptibles después de la estimulación hormonal y en la tabla 1b se presentan los efectos observados en tejidos cuyos niveles de receptor de estrógeno (RE) son bajos. Estos datos están basados en el hecho de que los estrógenos marcados con tritio radiactivo, se unen y se retienen selectivamente en ellos.

Este concepto es claro en algunos aspectos, sin embargo en otros no, por ejemplo: algunas áreas del cerebro como el hipocampo, se han considerado como tejido blanco para los estrógenos, sin embargo el número de receptores (es decir, la cantidad de estrógeno tritiado que se une al hipocampo) es muy pequeña si se compara con el expresado en el tracto

genital femenino En trabajos recientes se han definido a los tejidos no blancos como aquellos que modifican su respuesta fisiológica en presencia de diferentes concentraciones de estrógenos, sin considerar la cantidad de receptores presentes en dicho tejido (Jensen EV, *et al.*, 1982)

Tabla 1a Respuesta fisiológica de tejido blanco ante la estimulación hormonal

TEJIDO BLANCO	EFEECTO
UTERO	Recep. Progesterona, ↑Oxitocina, ↑IGF-I, ↑hsp27, ↑Enolasa, ↑Glucosa-6-fosfato deshidrogenasa
MAMA	↑ Recep. Progesterona, ↑IGF-I, ↑IGFBP-2, ↑EGF, ↑TGF-α, TGF-β, ↑hsp27
HIPOFISIS	↑IGF-I, IGFBP-2, ↑PRL, ↑IGF-I, ↑↓RE, ↑↓LH, FSH
VAGINA	↑hsp 90

IGF. Factor de crecimiento unido a insulina; TGF. Factor de crecimiento transformante; IGFBP. Proteína de unión del factor de crecimiento ligado a insulina; EFG. Factor de crecimiento epidérmico; hsp, proteína de choque térmico. PRL, prolactina (Modificada de: Ciocca DR y Vargas-Roig LM, 1995)

Numerosas observaciones experimentales, describen efectos de los estrógenos de tipo no genómico, que se producen en periodos muy cortos (del orden de 20 minutos), en tejidos que son considerados como no blanco por ejemplo: linfocitos, espermatozoides, neuronas, células musculares cardíacas y células del músculo liso vascular. Estos efectos, se caracterizan por que se producen probablemente a nivel de la membrana celular a diferencia de los efectos clásicos genómicos que pueden observarse en un mayor tiempo e involucran receptores nucleares (Wehling M, 1997).

Los efectos de los estrógenos sobre el músculo liso vascular, se pueden agrupar en función de su nivel de acción en: *a) Directos* sobre los mecanismos involucrados en el proceso de contracción-relajación de las células de músculo liso vascular (Jiang C, *et al*, 1992) y *b) Indirectos*: a nivel del metabolismo de lípidos, en la proliferación de células vasculares, en la adhesión celular (Ronnemaa T, *et al*, 1987) y en la síntesis de sustancias involucradas con la comunicación celular como óxido nítrico (NO) y eicosanoides (White MM, *et al*, 1995)

Tabla 1b. Respuestas fisiológicas mediadas a través del receptor de estrógeno (RE), en tejidos con bajos niveles del RE

TEJIDO	EFEECTO
CEREBRO	↑Proteínas de unión en membrana para progesterona.
HIGADO	↑PRL-GH, RE, ApoVLDL-II, bFGF, Angiotensina, c-fos, c-jun, Globulina de transporte de las hormonas sexuales (SHBG)
HIPOTALAMO	↑Progesterona, Oxitocina
HUESO	↑FGF-β, c-fos, c-jun ↓Lisosima, Proteína de membrana lisosomal
PLACENTA	↑↓GnRH
PROSTATA	↓PRL
TESTICULOS	↑Mr 34 000, Transferina

bFGF, Factor de crecimiento fibroblástico. Los niveles bajos del RE se consideraron arbitrariamente con valores < 100 fmol/mg de proteína (Estudios de unión al ligando, autoradiografía o inmunocitoquímica) (Modificada de Crocca DR y Vargas-Roig LM, 1995).

4. JUSTIFICACION

Durante la etapa reproductiva, las mujeres presentan una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares comparada con los hombres de edad similar. El resultado de diferentes estadísticas realizadas en 27 países, han mostrado que el porcentaje de mortalidad debida a enfermedades coronarias es seis veces más alta en hombres que en mujeres a la edad de 40 años. Sin embargo, con el inicio de la menopausia, las mujeres presentan un incremento dramático en la incidencia de enfermedades coronarias. Estudios epidemiológicos, apoyan la idea de que el incremento en enfermedades cardiovasculares se debe a la disminución de los niveles de estrógenos circulantes sanguíneos. Las mujeres postmenopáusicas sin terapia sustitutiva de estrógenos, son de dos a tres veces más susceptibles a desarrollar enfermedades cardíacas (Ross RK *et al.*, 1989). Frecuentemente se ha señalado en estudios epidemiológicos que la protección que ejercen los estrógenos esta relacionada con los niveles de estrógenos plasmáticos que a su vez están asociados con el metabolismo de las lipoproteínas, induciendo un incremento en las HDL y una reducción en las LDL, lo que conlleva a una disminución en la incidencia de aterosclerosis. Sin embargo, recientemente se ha descrito la disminución en la reactividad vascular, como un factor de gran importancia mediante el cual los estrógenos ejercen sus efectos protectores (Bush TL, *et al.*, 1987, Barret-Connor y Bush TL, 1991).

La administración aguda de estrógenos relaja la musculatura lisa vascular causando una reducción en la resistencia vascular y un aumento en el flujo sanguíneo. Los mecanismos involucrados en estos procesos han sido considerados no-genómicos sin embargo aún no se han dilucidado completamente. El primero de ellos implica, el efecto directo de los estrógenos sobre el tono vascular que se ha observado frecuentemente en preparaciones vasculares *in vitro* (Andersen HL *et al.*, 1999) cuando se utiliza 17 β -estradiol en altas

concentraciones (del orden de μM), este efecto parece no estar mediado por el receptor de estrógenos y se ha postulado que posiblemente se deba a un efecto de antagonismo sobre los canales de calcio dependientes de voltaje y los canales de potasio localizados en la membrana de las células de la musculatura lisa vascular (Harder DR y Coulson PB, 1979) Sin embargo, también se relaciona a los estrógenos con efectos directos sobre los canales dependientes de voltaje presentes en las células vasculares, los cuales regulan el potencial de membrana y por ende la excitabilidad del músculo liso vascular (Valverde MA *et al*, 1999)

Los niveles plasmáticos circulantes de 17β -estradiol en mujeres durante su ciclo menstrual, varían entre 100 pmol/L y 1 nmol/L (Genuth SM, 1986). Al final del embarazo, estos niveles llegan a aumentar hasta 10 nmol/L, mientras que durante la menopausia estos caen hasta 30 pmol/L (Lonning PE, *et.al* 1989) En función de estos datos; se ha propuesto, que la producción de sustancias vasodilatadoras puede asociarse con los cambios fisiológicos que provocan las diferentes concentraciones de estrógenos en plasma. Estudios *in vitro*, han descrito que la producción de prostaciclina es menor en arterias uterinas provenientes de mujeres postmenopáusicas comparadas con las de mujeres premenopáusicas (Steinleiter A, *et al*, 1989).

Para tratar de explicar el mecanismo por el cual los estrógenos ejercen sus efectos protectores sobre el músculo liso vascular, se han utilizado diferentes técnicas que señalan la participación de diferentes sustancias conocidas como segundos mensajeros, como el óxido nítrico (NO), eicosanoides y el calcio (Ca^{2+}). En la actualidad, aún no se ha dilucidado el mecanismo protector de los estrógenos sobre el sistema cardiovascular, por lo que el objetivo de este trabajo ha sido el llevar a cabo una revisión de los artículos mas

proteger a las mujeres de sufrir enfermedades cardiovasculares. La información recopilada, nos permitirá conocer las teorías más aceptadas para describir la forma en que estas sustancias protegen al músculo liso vascular. También será útil para interpretar y relacionar observaciones que estamos llevando a cabo en el laboratorio, encaminadas a elucidar la forma en que los estrógenos modulan la excitabilidad del músculo liso vascular que permitirán la implementación de metodologías para la evaluación de sustancias endógenas y la proposición del desarrollo de fármacos análogos a los estrógenos que puedan ser útiles en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, tanto en mujeres como en hombres.

5. OBJETIVO

Realizar una revisión actualizada en revistas de divulgación científica sobre los efectos de los estrógenos en músculo liso vascular, que contribuya al conocimiento de la información básica de este tema para:

- *Conocer los mecanismos de acción propuestos actualmente en estos eventos y,
- *Posteriormente desarrollar estrategias que permitan la elucidación del o los mecanismos involucrados principalmente en respuestas de tipo no genómico

proteger a las mujeres de sufrir enfermedades cardiovasculares. La información recopilada, nos permitirá conocer las teorías más aceptadas para describir la forma en que estas sustancias protegen al músculo liso vascular. También será útil para interpretar y relacionar observaciones que estamos llevando a cabo en el laboratorio, encaminadas a elucidar la forma en que los estrógenos modulan la excitabilidad del músculo liso vascular que permitirán la implementación de metodologías para la evaluación de sustancias endógenas y la proposición del desarrollo de fármacos análogos a los estrógenos que puedan ser útiles en el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, tanto en mujeres como en hombres.

5. OBJETIVO

Realizar una revisión actualizada en revistas de divulgación científica sobre los efectos de los estrógenos en músculo liso vascular, que contribuya al conocimiento de la información básica de este tema para:

- *Conocer los mecanismos de acción propuestos actualmente en estos eventos y;
- *Posteriormente desarrollar estrategias que permitan la elucidación del o los mecanismos involucrados principalmente en respuestas de tipo no genómico.

6. EFECTOS DE LOS ESTROGENOS SOBRE EL MLV

6.1 Efectos moduladores de los estrógenos sobre la excitabilidad y tono vascular

En las células musculares, como en todas las células excitables, el potencial de membrana (E_m) regula el tono vascular de las arterias, por un control directo de la actividad de los canales iónicos presentes en la membrana plasmática. En la actualidad, se conoce perfectamente, que cuando los valores de E_m se encuentran en estado basal, la membrana es principalmente permeable a K^+ ; por lo que E_m es controlado por la permeabilidad de K^+ a través de sus canales específicos

La actividad eléctrica del ML, provee a las células la capacidad de propagación de los estímulos, así como, la inducción del proceso de relajación-contracción del MLV. El mecanismo por el cual el E_m regula el proceso contráctil, involucra la actividad de los diferentes canales de K^+ , [canales de K^+ dependientes del E_m (K_v), canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} ($K_{Ca^{2+}}$) y de canales de K^+ dependientes de ATP (K_{ATP})], los cuales controlan el E_m a través de su apertura o cierre, provocando una hiperpolarización y una depolarización de la membrana respectivamente. Estos cambios en la polaridad de la membrana, tienen un efecto directo sobre la $[Ca^{2+}]_i$, ya que regulan la entrada de Ca^{2+} al interior de la célula a través de la membrana plasmática usando canales específicos de Ca^{2+} , evento que contribuye fuertemente al aumento de la $[Ca^{2+}]_i$, y que junto con la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico, constituyen los elementos principales que disparan el proceso de contracción (Xiao-Jian Y, 1995).

En base a estos antecedentes, resulta interesante evaluar el papel de los estrógenos sobre la actividad eléctrica del MLV, así como, los elementos reguladores de la fisiología cardiovascular. Las primeras evidencias del papel modulador de los estrógenos sobre la fisiología cardiovascular, provienen de reportes realizados desde la década de los 70's, en

los que se muestran los efectos provocados por la administración de infusiones de éstos en humanos, ovejas y ratas. Los principales efectos observados fueron, un incremento en el flujo sanguíneo, disminución en la resistencia vascular, disminución e inhibición de la respuesta contráctil inducida por agentes vasoconstrictores como la acetilcolina y el nitroprusiato de sodio (Altura BT y Altura BM, 1977). Estos estudios daban una idea vaga del efecto de los estrógenos sobre las propiedades eléctricas que regula el tono vascular y en general sobre las propiedades que regulan el proceso de contracción.

Una de las primeras aproximaciones que se realizaron para analizar estas propiedades, las reportó el grupo de Harder en 1979, en este trabajo se evaluaron *in vitro* los efectos del estrógeno sintético, dietilestilbestrol (DES). En estos estudios se realizaron registros intracelulares de la actividad eléctrica de las células de la arteria coronaria, para evaluar el E_m y los potenciales de acción espontáneos e inducidos por diversos agentes (Harder DR y Coulson PB, 1979). La concentración de DES 5×10^{-6} M provocó una hiperpolarización de aproximadamente 20 mV en las células de ML de aorta. Este efecto se observó después de la incubación de las células durante 15 a 20 min con DES y permaneció durante todo el tiempo que la sustancia estuvo presente e incluso después de haberla eliminado del baño de registro. El efecto se inhibió en presencia de un bloqueador de los canales de K^+ , como el tetractilamonio (TEA, 10 mM). También la hiperpolarización se inhibió al aumentar la concentración extracelular de K^+ en el medio de incubación de la arteria coronaria.

Por otra parte, el DES también inhibió el potencial de acción provocado por la estimulación eléctrica de la aorta, así como, los potenciales espontáneos observados en este tejido cuando se induce una depolarización con TEA. Los resultados señalaron claramente que

DES provocó la hiperpolarización de las células de la arteria coronaria a través de la modulación de los canales de K^+ , facilitando su salida, esto explica de alguna manera sus efectos relajantes sobre el músculo liso vascular

Resultados de estudios realizados recientemente (Wehling M, 1997, Andersen HL, *et al*, 1999) en segmentos de arterias, apoyan la idea de los efectos no-genómicos de los estrógenos sobre el tono vascular y su implicación en los efectos protectores de estas sustancias sobre el MLV

Andersen y cols. en 1999 analizaron el efecto fisiológico y farmacológico de dos concentraciones diferentes de E_2 (5 y 10 μM) sobre la respuesta de contracción de la aorta de rata inducida por varios agonistas. En este trabajo, se analizó la contracción *in vitro* de anillos de aorta provenientes de ratas hembra ovariectomizadas, a las cuales se les mantuvieron sus concentraciones sanguíneas de estrógenos, por medio de la administración de E_2 durante 7 días (100 $\mu g/Kg$). Después de este tiempo, los anillos de aorta fueron colocados en cámaras de tejido aislado para realizar el análisis vasomotor, el cual consistió básicamente en la inducción de la contracción del tejido usando diferentes concentraciones de fenilefrina, 5-HT (5-Hidróxi-triptamina), Ca^{2+} y K^+ . Las respuestas de contracción control fueron tomadas en ausencia de E_2 , mientras que el efecto del estrógeno se analizó cuando se adicionó la sustancia en la cámara de tejido

Los resultados de estos experimentos mostraron un efecto modulador del E_2 sobre la contracción inducida por los agonistas empleados. La contracción de la aorta se vio disminuida en todos los casos en presencia de E_2 . Este efecto, se observó después de la incubación del tejido durante 30 minutos, siendo reversible y reproducible en el mismo

tejido, lo que demostró que no hay un proceso de des-sensibilización. Por otro lado, es importante hacer notar que la latencia del efecto es mucho menor en comparación con los efectos genómicos que los estrógenos inducen.

El efecto del E_2 fue analizado en presencia y ausencia de endotelio, para evaluar la participación de éste como un mediador de los efectos que la hormona induce en el MLV. En los resultados mostrados anteriormente, en ambos modelos experimentales, el E_2 disminuye la contracción inducida, lo que indica claramente que esta hormona puede llevar a cabo sus efectos moduladores sin inducir la liberación de sustancias relajantes derivadas del endotelio, como es el caso del óxido nítrico (NO). Esto también apoya fuertemente la idea de que los estrógenos tienen la capacidad de modificar la actividad contráctil del ML por interacción directa sobre las células musculares sin estimular la síntesis de nuevas proteínas (Andersen HL, *et al.*, 1999).

Tratando de determinar el mecanismo involucrado en los efectos de los estrógenos sobre el MLV, se han realizado trabajos en los cuales se analiza el efecto de estas sustancias sobre elementos directamente involucrados en las propiedades eléctricas de las células. Por ejemplo Nakajima y cols. en 1995; mostraron mediante el uso de una técnica electrofisiológica, que el E_2 y DES 10 y 30 μM respectivamente tienen la capacidad de inhibir las corrientes de Ca^{2+} tipo L registradas en células de aorta de rata. Los efectos de estas sustancias sobre los canales catiónicos inespecíficos acoplados a receptores, tales como los activados por endotelina-I y vasopresina muestran que estas sustancias estrogénicas no tienen efecto alguno sobre estos canales, lo que sugiere que el E_2 juega un papel importante en la modulación del tono vascular, mediante un mecanismo de acción

específico, produciendo la inhibición de los canales de Ca^{2+} tipo L dependientes de voltaje (Nakajima, T, *et al*, 1995)

Finalmente, partiendo de estas evidencias, podemos señalar que los estrógenos son capaces de inducir acciones protectoras en el MLV por medio de una acción directa sobre el ML modulando las principales funciones de este tejido y por consiguiente afectan las propiedades fisiológicas del sistema cardiovascular.

Recientemente se han reportado estudios clínicos donde se ha mostrado el efecto benéfico que tiene la administración aguda de estrógenos sobre el sistema cardiovascular, por ejemplo se ha observado que el principal efecto de la TRH es una reducción en el riesgo de sufrir enfermedades del sistema cardiovascular, al reducir un 50% el riesgo en las enfermedades coronarias e infartos cardiacos (Wren BG, 1992)

6.2 Evidencias de la interacción entre estrógenos y músculo liso vascular

En la actualidad se concibe la idea de que los estrógenos actúan a través de mecanismos genómicos y no-genómicos para ejercer sus efectos. El modelo clásico de acción de los estrógenos se revisó con detalle anteriormente, y básicamente incluye la unión de la hormona a un receptor citoplasmático o nuclear, que induce al complejo hormona-receptor a unirse con una secuencia específica del DNA lo que finalmente culmina con la síntesis de proteínas y un cambio en la fisiología de la célula blanco (Williams CL y Stancel GM, 1996). La mayoría de los efectos genómicos se aprecian en cuestión de horas. Sin embargo, se han observado un gran número de respuestas no-genómicas en el orden de segundos. Las principales evidencias de los efectos no-genómicos provienen de diferentes fuentes como el sistema nervioso central (SNC), células de músculo liso vascular, células

de útero, células umbilicales y células MCF-7 de cáncer de mama. La importancia fisiológica de los efectos que los estrógenos inducen sobre la membrana y su relación con la función vascular se suman a los que ejercen a través de la activación del metabolismo de lipoproteínas a nivel hepático, sobre la pared de los vasos sanguíneos y los efectos sobre la inhibición de la proliferación de las células de músculo liso vascular para modificar en su conjunto la motilidad y resistencia vascular. Mecanismos que involucran la dependencia de síntesis de proteínas y que sugieren eventos nucleares, mediados por mecanismos genómicos.

Ejemplos de respuestas hormonales no genómicas son las producidas por los derivados 3α -hidroxilados de la progesterona, que han sido descritos como compuestos que ejercen efectos rápidos y significativos sobre la excitabilidad del cerebro mediados por el receptor "A" del ácido γ -aminobutírico (GABA_A) (Lan NC, *et al*, 1990). En humanos, la progesterona induce en cuestión de segundos un incremento en las $[Ca^{2+}]_i$, lo que provoca la reacción acrosomal (Blackmore PF, *et al*, 1990). La aldosterona, en células de músculo liso vascular induce incrementos de la entrada de Na^+ y de la concentración intracelular de IP_3 en 30 segundos (Wheling M, *et al*, 1997). En osteoblastos de rata, la testosterona produce aumentos en la concentración intracelular de Ca^{2+} , IP_1 y DG en cuestión de segundos (Lieberher M y Grosee B, 1994). La naturaleza rápida y las características farmacológicas de estos efectos son incompatibles con el mecanismo genómico clásico de los esteroides, que termina con la síntesis de proteínas.

6.3 Determinación de receptores de estrógenos (RE) en MLV

La presencia de RE en el MLV en un principio fue establecida por estudios de competencia de ligando, donde se emplearon estrógenos radioactivos en diferentes tejidos como la aorta, arteria coronaria, vena safena y arteria mamaria de humano; así como, en células únicas provenientes de aorta. Estos estudios apoyaron la idea de que los estrógenos podían ejercer efectos fisiológicos directos sobre el tejido vascular involucrando un receptor específico. Posteriormente, además de analizar la presencia de RE, se consideró necesario evaluar la funcionalidad de estos receptores una vez unidos a su agonista utilizando diferentes modelos experimentales. (Karas RH y Paterson BL, 1994, Farhat MY, *et al.*, 1996).

En 1993 Orimo y cols demostraron la presencia del mRNA de los REs en las células de MLV de aorta torácica de ratas jóvenes, mediante la técnica de Northern Blot. Este hecho fue confirmado por la amplificación del mRNA usando la técnica de RT-PCR y también por métodos inmunocitoquímicos en células de MLV utilizando anticuerpos anti-RE monoclonales los cuales reconocen el dominio de unión al DNA del RE. En éstos últimos experimentos encontraron inmunoreactividad tanto en el citoplasma como en el núcleo y por otra parte, demostraron que la incubación durante 30 minutos con 17β -estradiol indujo la expresión del mRNA del gen c-fos en estas células. Este resultado concuerda con la actividad mostrada por el mismo estrógeno en útero de ratas ovariectomizadas (Weisz A y Bresciani F, 1988) indicando claramente que los REs en un tejido no blanco pueden generar una respuesta similar a la observada en tejidos blancos, ejerciendo efectos reguladores sobre el crecimiento, la diferenciación y función de las células vasculares a través de sus propios receptores (Orimo A, *et al.*, 1993).

Bayard y cols, (1995) demostraron que células en cultivo del músculo liso de arteria de rata, presentan una alta actividad de las enzimas involucradas en el metabolismo y en la síntesis de los estrógenos (aromatasa, deshidrogenasa del estradiol-17 β -hidroxiesteroide y 17-cetoreductasa) Esto demostró que los estrógenos pueden ser sintetizados en el músculo liso vascular, desde androstendiona, reacción que está mediada por el complejo enzimático de la aromatasa. En éstas mismas células se mostró la existencia de receptores funcionales, que se encuentran principalmente localizados en el citoplasma. Estos receptores generaron una respuesta similar a la observada en tejidos blancos que consiste en la inducción de síntesis de proteínas posterior a la activación nuclear (Bayard F, *et al.*, 1995).

En 1979 el grupo de Harder, analizó los efectos del estrógeno sintético DES sobre las propiedades eléctricas de la membrana del músculo liso vascular. En este trabajo se mostró en primera instancia, la presencia de REs específicos presentes en las arterias coronarias, aorta, corazón y útero de perro y ganado bovino, empleando un análisis de desplazamiento de estradiol tritiado. Los resultados de este trabajo presentan diferencias significativas en la concentración de RE en la arteria aorta, dependientes de la edad del animal (Tabla 2). Por otro lado, al hacer una correlación entre las concentraciones de RE y el sexo del animal, observaron que no hay variaciones significativas en la cantidad de RE en arterias coronarias de perros hembras con respecto a la de los machos. La presencia de RE en células únicas aisladas de aorta, sugirió una influencia directa de los estrógenos sobre las propiedades eléctricas del músculo liso vascular y por ende sobre las propiedades contráctiles de las arterias, que no involucra por lo menos al inicio del efecto, la activación nuclear clásica de los estrógenos

Tabla 2 Concentración de receptor específico a estrógeno en diferentes tejidos musculares

	10^{-15} moles/mg de proteína soluble	
	\bar{x} (\pm sem)	n
Arteria coronaria, perro adulto	20.96 (\pm 4.32)	9
Arteria coronaria, hembra adulta	21.02 (\pm 6.74)	3
Arteria coronaria, macho adulto	22.10 (\pm 8.32)	5
Utero, bovino adulto	230.97 (\pm 10.05)	4
Corazón canino	3.13 (\pm 0.67)	4
Aorta fetal bovina	147.40 (\pm 12.20)	4
Aorta, bovino adulto	37.70 (\pm 4.15)	4

n = número de determinaciones por tejido. (Harder DR y Coulson PB, 1979).

6.4 Sitios de unión para estrógenos en la membrana

Demostrar la presencia de RE funcionales en células no blanco en citoplasma y núcleo, no es suficiente para apoyar los efectos no-genómicos que los estrógenos inducen en varios tipos de tejido incluyendo al músculo liso vascular. Por otro lado, la membrana celular representa el principal sitio potencial para las acciones no-genómicas de los estrógenos observadas en varios tejidos.

Aunque no existen evidencias directas de la identificación del RE en la membrana del tejido vascular, se han determinado la presencia del RE en la membrana de otros tejidos. Mediante el uso de técnicas de unión a receptores con ligandos marcados y derivados de conjugados de estrógenos, Pietras y Szengo demostraron la existencia de un sitio de unión específico al 17β -estradiol localizado sobre la membrana de células aisladas de hígado de ratas ovariectomizadas, la unión del 17β -estradiol a su posible receptor membranar es dependiente de la temperatura (Pietras RJ y Zsengo, 1980). Otros grupos de investigadores, han caracterizado sitios de unión específicos para el E_2 ; en la membrana plasmática de

neuronas de ratas macho (Towle A y Sze P, 1983), en células de la hipófisis provenientes de ratas hembra (Bression D, *et al.*, 1986) y en células cancerígenas de tejido mamario humano (Nenci I, *et al.*, 1981) Así mismo Pappas demostró la presencia del RE en la membrana de la línea celular GH3/B6 proveniente de tumor de hipófisis, demostrando la posibilidad de encontrar RE sobre la membrana celular, con características funcionales similares a los receptores presentes en citoplasma y núcleo (Pappas TC, *et al.*, 1994). Aunado a estos hallazgos, en 1995 se demostró la existencia de proteínas capaces de unir a estrógenos con una masa específica de 23 a 33 kDa. Estas proteínas fueron localizadas exclusivamente en la fracción correspondiente a la membrana celular de sinaptosomas de neuronas de rata (Zheng J y Ramirez VD, 1995).

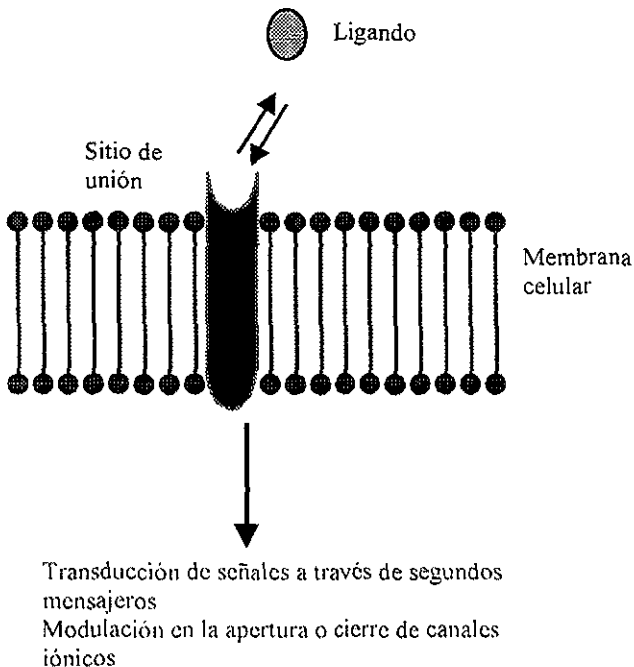


Figura 8. Sitios de unión en la membrana celular

La naturaleza de los sitios de unión en la membrana celular del músculo liso y el papel que estos juegan en la respuesta de corto término de los estrógenos y de las respuestas dependientes de la transcripción, permanecen sin ser determinadas (figura 8). Sin embargo, la posibilidad de que los estrógenos se unan a diferentes proteínas receptoras sobre la membrana celular podría explicar las diferencias cualitativas entre la respuesta de los estrógenos observada en cuestión de segundos en varios tipos celulares y la respuesta estrogénica genómica. En la tabla 3 se muestra los tejidos en los cuales se ha podido establecer la presencia de sitios de unión de esteroides sobre la membrana

Tabla 3. Sitios de unión a esteroides localizados sobre la membrana celular

Esteroides	Tejido	Técnica
Progesterona	Cerebro de rata	Unión de ligando
Aldosterona	Linfocitos de Humano	Marcaje de fotoafinidad
	Riñón de rata	Unión de ligando
	Cerebro de rana	Unión de ligando
Glucocorticoides	Hígado de rata	Unión de ligando
	Hueso	Derivación de estrógenos conjugados
Vitamina D	Endometrio de rata	Unión de ligando
	Hígado de rata	Derivación de estrógenos conjugados
	Hígado de rata	Unión de ligando Western Blot Fluorescencia
Estradiol	Cerebro	Unión de ligando
	Células de cáncer de mama	Anticuerpos anti-ER
	Células de hipófisis	Microscopia focal láser

(Farhat MY, *et al.*, 1996)

6.5 Mecanismos involucrados en las acciones protectoras de los estrógenos sobre el músculo liso vascular

A. Efectos protectores de las hormonas femeninas

Diversos estudios puntualizan el papel de las hormonas femeninas como moduladores que favorecen el balance de los agentes vasodilatadores y vasoconstrictores. Los niveles séricos de nitrato y nitrito, metabolitos estables del vasodilatador óxido nítrico (NO) derivado de endotelio, se elevan durante la fase folicular del ciclo menstrual conjuntamente con el aumento de los niveles de 17β -estradiol y disminuyen en la fase post-ovulatoria, con altos niveles de progesterona. Por otro lado se han observado en mujeres premenopáusicas, niveles más bajos de endotelina (ET-1), un vasoconstrictor derivado de endotelio comparados con hombres de la misma edad. Así mismo se ha encontrado una reducción en los niveles de ET-1 en hombres transexuales después del tratamiento estrogénico (Polderman KH, *et al.*, 1993). Otros estudios han reportado que los niveles de norepinefrina circulante se encuentran reducidos en la fase folicular comparados con los de la fase lútea del ciclo menstrual (Goldstein DS, *et al.*, 1983). Hechos que apoyan la premisa sobre la posibilidad de que los estrógenos aumentan la actividad vasodilatadora y/o inhiben la actividad vasoconstrictora mientras que la progesterona antagoniza los efectos estrogénicos.

B. Efectos mediados por esteroides sobre el endotelio y la función celular del músculo liso vascular.

6.5.1 Óxido Nítrico (NO)

La reactividad y el tono vascular se encuentran modulados por las alteraciones en las actividades vasodilatadora y vasoconstrictora en el endotelio así como también por la

función celular del músculo liso vascular, entre otros mecanismos. El NO derivado del endotelio modula la relajación del MLV a través de la estimulación de la guanilato ciclasa soluble (fig 8). El NO se produce en el endotelio en condiciones normales así como ante una estimulación por agonistas como la acetilcolina y la bradikinina que actúan vía receptores membranales en la superficie endotelial (figura 9, tabla 4) y algunos de ellos se encuentran ligados a la activación de la proteína G (Flavahan NA, *et al.*, 1989 y 1991).

Tabla 4 Posibles factores endoteliales que están involucrados en los efectos de los estrógenos y progesterona.

I Productos derivados del endotelio

Vasodilatadores	Vasoconstrictores
PGE	Angiotensina II
PGI ₂	Endotelina I
Oxido nítrico	Acido araquidónico
Histamina	PGH ₂
PGH ₂	Tromboxano A ₂
Factor Activador de Plaquetas	Histamina
Anión superóxido	Anión superóxido
Leucotricenos	Factor Activador de Plaquetas
EDHF	Leucotricenos

(White MM, *et al.*, 1995)

En ciertas circunstancias las células del MLV, neurales y otros tipos celulares pueden producir NO (Culotta E y Koshland Jr DE, 1992). Numerosos estudios de preparaciones experimentales sugieren que los cambios en las concentraciones fisiológicas de las hormonas femeninas modulan la función celular del endotelio sobre la producción y/o actividad del NO en estado basal. Trabajos donde se han analizado las diferencias en el género, señalan una posible estimulación de los estrógenos produce un incremento en la liberación basal del NO. Los anillos pre-contraídos con fenilefrina aislados de aorta de conejas comparados con los de conejos mostraron una mayor relajación ante la superóxido dismutasa, el inhibidor de la inactivación de NO, y una mayor constricción después de la inhibición de la síntesis de NO por la nitro-metil-L-arginina (Hayashi T, *et al.*, 1992).

La ovariectomía eliminó estas diferencias de género, sugiriendo que los niveles fisiológicos de las hormonas femeninas estimulan la actividad basal del NO y que la relajación ante acetilcolina estimulando la actividad del NO no fue afectada. Por otro lado, en ovejas ovariectomizadas la administración aguda de estradiol, produjo un aumento en el flujo sanguíneo en un 80%, que fue bloqueado por el inhibidor de la síntesis de NO, el éster metil nitro-L-arginina (Van Buren GA., *et al.*, 1992). El E₂ incrementa la síntesis del NO, esto se pudo corroborar al revertir la inhibición del flujo sanguíneo administrando un exceso de L-arginina (figura 9).

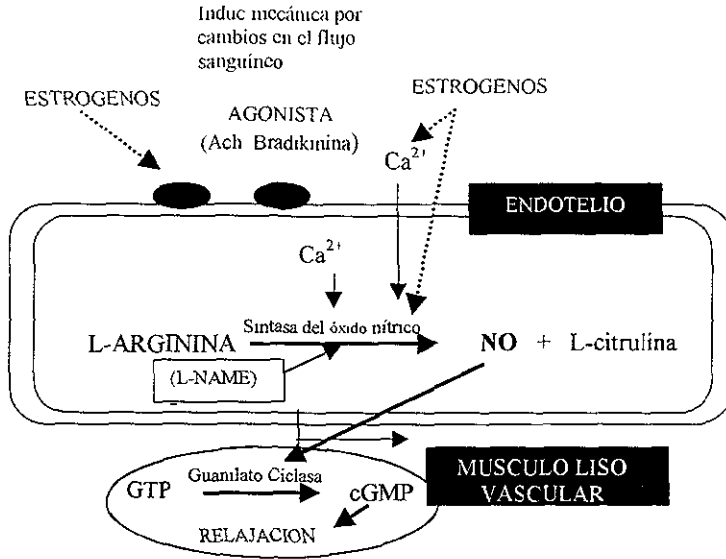


Figura 9. Biosíntesis del óxido nítrico En la figura se muestran los mecanismos principales por los cuales los estrógenos pueden modular la vasodilatación dependiente de endotelio, 1) los efectos sobre el número y/o sensibilidad de los receptores colinérgicos, 2) la modificación del flujo de Ca^{2+} y 3) la inducción de la enzima sintasa del NO. La inducción mecánica por cambios en el flujo sanguíneo, o la activación del receptor por la acetilcolina o la bradikina genera la entrada de Ca^{2+} estimulando a la sintasa del NO. El NO formado a partir de L-arginina difunde hacia las células del músculo liso, estimulando la guanilato ciclasa, incrementando la síntesis de cGMP a partir de GTP. La éster metil nitro-L-arginina (L-NAME) es un inhibidor competitivo de la sintasa del NO y provoca vasoconstricción *in vitro* (Tomada de: White MM, *et al.*, 1995).

El tratamiento crónico con 17β -estradiol también incrementó la relajación en anillos de arteria femoral de conejo y en aorta de rata hipertensa de forma espontánea ante acetilcolina (Williams SP, *et al.*, 1988), así mismo el estradiol produjo la relajación de los anillos pre-contraídos de arteria coronaria aislados de conejo y esta relajación se revirtió por la inhibición del NO (Jiang CW, *et al.*, 1991, Collins P, *et al.*, 1994). Sin embargo, no todos los estudios apoyan que la vasodilatación inducida por estradiol está mediada a través del NO.

Se ha sugerido que E_2 puede estimular la relajación dependiente de endotelio a través de dos mecanismos 1) mediado por receptores como en el caso del tratamiento crónico con 17β -estradiol aumentando la relajación de los anillos de arteria femoral aislados de conejo contraídos con acetilcolina en donde se incrementó el número y la sensibilidad de los receptores muscarínicos (Gisclard V, *et al.*, 1988) y 2) sin la presencia de receptor, como en el caso del aumento de la relajación ante acetilcolina mediado por sustancias como el ionóforo de calcio A23187, que indican que los mecanismos de liberación de NO mediados sin receptor pueden estar presentes en los vasos sanguíneos de algunas especies (Miller VM y Vanhoutte PM, 1990).

Por otra parte, el efecto estimulante de la actividad del NO debido al aumento del E_2 durante el embarazo puede deberse al incremento en la producción o actividad de la NO sintasa constitutiva endotelial (NOS III), esta última se encuentra asociada a un incremento de 4 veces en la $[Ca^{2+}]$ que depende de la actividad de la NOS III. Este efecto se ha medido por la conversión de L-arginina a citrulina radiactivas (Weiner CP, *et al.*, 1994). Utilizando la reacción en cadena de la polimerasa semicuantitativa, el aumento de la relajación ante acetilcolina en las aortas de ratas embarazadas correlacionan con un incremento de 2 veces en la producción de mRNA NOS III con respecto a ratas no embarazadas (Goetz RM, *et al.*, 1994), por un lado

Por otro lado, se ha reportado que en cerdos hembras intactas gonadalmente, la inyección de 17β -estradiol por vía intraperitoneal durante 5 días, también incrementa la actividad de NOS III en corazón, hígado, esófago y músculo esquelético; mientras que la progesterona no produce estos efectos (Weiner CP, *et al.*, 1994).

Otras evidencias señalan que el 17β -estradiol en cultivos de células endoteliales de aorta de humano incrementa la producción de NO y los niveles de la proteína de NOS III e induce la expresión del gen NOS III en la aorta de ratas ovariectomizadas (Goetz RM, *et al.*, 1994, Hishikawa K, *et al.*, 1995)

Finalmente, la presencia de dos sitios palindrómicos del elemento de unión al receptor de estrógeno sobre el gene NOS del endotelio humano apoya un posible efecto mediado por el receptor de estrógenos sobre la expresión de genes (Miyahara K, *et al.*, 1994) Los resultados en diversas especies sugieren que el E_2 en parte modula la relajación dependiente de endotelio en un número de capas vasculares a través del incremento en la actividad de NO debido a la inducción de la expresión génica de NOS III Sin embargo, la estimulación observada durante el embarazo no es totalmente reproducible por el tratamiento con el E_2 ya que los efectos de éste no se producen entre las capas vasculares como las observadas durante el embarazo, por lo que pueden estar involucrados otros mecanismos, tales como el incremento en la sensibilidad o afinidad de los receptores endoteliales o a los efectos sobre pasos intermediarios que involucran una liberación de NO mediada a través del receptor, como por ejemplo en el caso de la modulación en la activación de la proteína G.

6.5.2 Endotelina 1 (ET-1)

Es un derivado de endotelio que en concentraciones subnanomolares, produce un potente efecto vasoconstrictor, pero a concentraciones menores puede inducir una vasodilatación transitoria (Yanagisawa M, *et al.*, 1988) En las capas vasculares se han identificado dos clases de receptores para endotelina, ET-1A (ET_A) y ET-1B (ET_B), que al parecer se encuentran ligados a la proteína G. La activación del receptor ET_A en las células del MLV provoca una constricción que esta mediada por la activación de los canales de Ca²⁺ y de la fosfolipasa C (figuras 10 y 11), mientras que la activación de ET_B sobre las células endoteliales también puede estimular la liberación del NO y prostaciclina.

En cultivos de células endoteliales porcinas y de bovinos, la liberación de ET-1 puede ser estimulada por un gran número de agonistas que incluyen: trombina, arginina vasopresina, angiotensina II y A23187 (Emori T, *et al.*, 1989 y Schini VB, *et al.*, 1989). Por ejemplo, en la aorta aislada de cerdo, el incremento del NO resulta de la inhibición de quelantes de NO, de la superoxido dismutasa, o del análogo no hidrolizable del cGMP, 8-bromo-cGMP, se observa la reducción de la producción de ET-1 estimulada por trombina (Boulanger C y Luscher TF, 1990), dándose el balance dinámico que involucra la relación de retroalimentación entre la producción del NO y ET-1, de manera que la ET-1 estimula la producción del NO y este a su vez reduce la ET-1

Sin embargo, las evidencias acerca de los efectos mediados por estrógenos sobre ET-1 son limitados; una dosis de 17β-estradiol 1000 veces más grande que las fisiológicas normales (3-30 μM) en presencia de ET-1 disminuye la respuesta contráctil en los anillos aislados de arteria coronaria de conejo, tanto de animales macho como en hembras intactas (Jiang C, *et al.*, 1992)

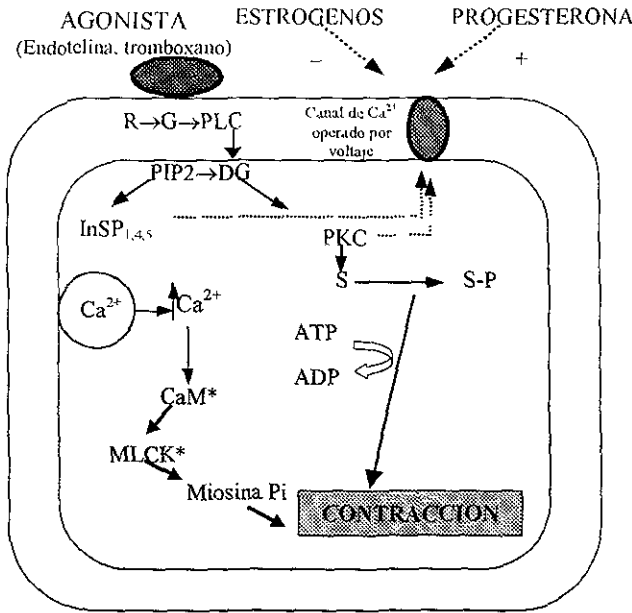


Figura 10. Esquema simplificado del mecanismo de contracción en el músculo liso mediado por receptor. Los estrógenos pueden inhibir directamente a los canales de Ca^{2+} operados por voltaje en las células del MLV y así disminuir la entrada de Ca^{2+} . La progesterona incrementa la entrada de Ca^{2+} a través de la activación de éstos canales. Los esteroides sexuales femeninos pueden influenciar la sensibilidad de las proteínas contráctiles tales como la quinasa de cadena sencilla de la miosina (MLCK^*) y de la calmodulina (CaM^*) ante la presencia de Ca^{2+} . La unión del agonista a un receptor ligado a la proteína G (G), da como resultado la activación de la fosfolipasa C (PLC). Esta se hidroliza a un fosfolípido de membrana, el fosfatidil-inositol-4,5-bisfosfato (PIP2), generando dos segundos mensajeros: diacilglicerol (DG) e inositol-1,4,5-trisfosfato ($\text{InsP}_{1,4,5}$). $\text{InsP}_{1,4,5}$ difunde hacia el citoplasma provocando la liberación de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ intracelular desde los depósitos internos. El incremento del Ca^{2+} citoplasmático promueve la activación del Ca^{2+} unido a la proteína calmodulina (CaM^*), el cual, a su vez activa a MLCK^* . La contracción del músculo se inicia con la fosforilación de la miosina. El DG activa la proteína quinasa C (PKC), la cual fosforila a varias proteínas dando como resultado la contracción del músculo liso. Los agonistas también pueden activar los canales de Ca^{2+} a través de los efectos de segundos mensajeros, tales como, $\text{InsP}_{1,4,5}$ y PKC (Tomada de: WhiteM.M. *et al.*, 1995)

Por otra parte, la éster metil nitro-L-arginina no alteró la respuesta ante 17β -estradiol, sugiriendo que el E_2 actúa por un mecanismo independiente de endotelio. De acuerdo con esta posibilidad, dosis similares a $10\text{-}30\ \mu\text{M}$ de 17β -estradiol disminuyeron la respuesta

contráctil debida a ET-1 en arterias coronarias sin endotelio provenientes de animales macho y hembra. Los autores sugirieron que el E₂ afectó los canales Ca²⁺ en las células del MLV debido a que éste redujo la respuesta contráctil ante BAY K8644, un agonista específico de los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje (Bossu JL, *et al.*, 1992). A otra concentración (10⁻⁸ M) el E₂ potenció el incremento de ET-1 y aumentó la producción de prostaciclina en células endoteliales provenientes de la vena umbilical de humano, sin embargo el mecanismo aún es desconocido (Muck AO, *et al.*, 1993).

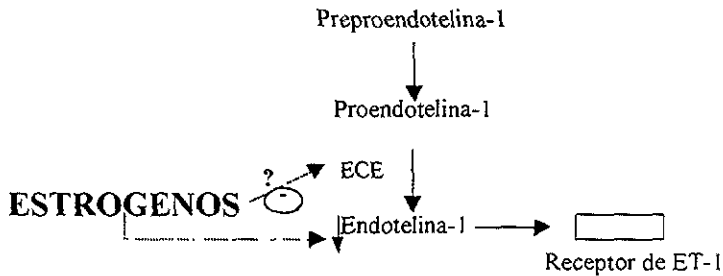


Figura 11. Biosíntesis de ET-1. ET-1 es sintetizada a partir de prepro-ET-1. El mecanismo(s) por el cual los estrógenos disminuyen los niveles ET-1 son desconocidos pero pueden estar involucrados ciertos efectos sobre la transcripción de genes de enzimas importantes como la enzima concertadora de endotelina (ECE). (Tomada de: WhiteMM, *et al.*, 1995).

6.5.3 Eicosanoides

Las células endoteliales metabolizan ácido araquidónico para producir eicosanoides a través de las rutas enzimáticas de la ciclooxigenasa, peroxidasa y lipooxigenasa (figura 12). En general, la vasodilatación se encuentra mediada por la prostaciclina y la prostaglandina E_2 , mientras que el tromboxano A_2 , prostaglandina $F_{2\alpha}$ y algunos leucotrienos son vasoconstrictores (Davis MG, *et al.*, 1993). La relajación de las células de MLV es el resultado de la formación del cAMP y de la activación de la proteína cinasa dependiente de cAMP (figura 13). Por otro lado se piensa que el tromboxano A_2 antagoniza los efectos de la prostaciclina a través de la liberación del Ca^{2+} intracelular mediado por el 1,4,5-trifosfato inositol ($InSP_{1,4,5}$) (figura 10).

Las concentraciones fisiológicas del 17β -estradiol producen un incremento en la producción de prostaciclina y en la actividad biosintética de las células del MLV de aorta de rata y conejo (Chang WC, 1980; Wakasugi M, *et al.*, 1989). Sin embargo el E_2 parece estimular la producción de los prostanoides contráctiles. Esto se demostró en anillos aislados de aorta de conejo utilizando indometacina que redujo la respuesta contráctil inducida por E_2 en presencia de norepinefrina (Miller VM y Vanhoutte PM, 1990).

Sin embargo existen evidencias contradictorias de los efectos de los estrógenos o los progestágenos sobre la producción de eicosanoides en el músculo liso. Por ejemplo, un tratamiento de 2 a 3 semanas con E_2 administrado por vía intraperitoneal a ratas machos y hembras intactas incrementó la liberación de prostaciclina en sus anillos aislados de aorta y también elevó los niveles de la 6-ceto-prostaglandina ($F_{1\alpha}$) un metabolito estable (Wakasugi M, *et al.*, 1989); sin embargo, se desconoce si los niveles sanguíneos de E_2 generados por la administración se encuentran dentro del intervalo fisiológico.

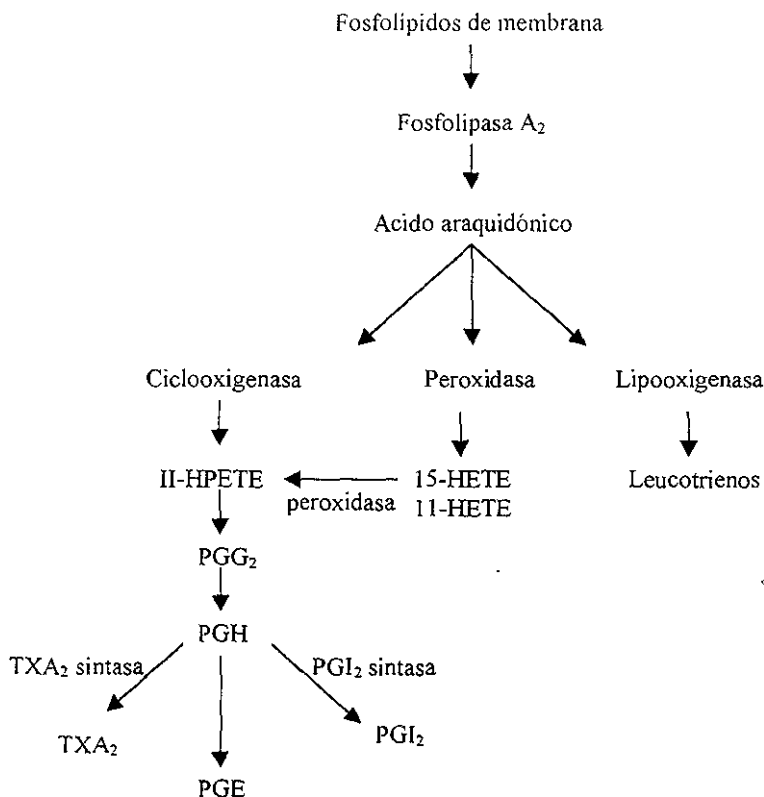


Figura 12. Eicosanoides producidos por las células endoteliales a partir del ácido araquidónico a través de las vías de la ciclooxigenasa, lipooxygenasa y peroxidasa. Las células endoteliales producen eicosanoides a partir de ácido araquidónico a través de las vías de la ciclooxigenasa, lipooxygenasa y peroxidasa. Los productos terminales incluyen principalmente a tromboxano A_2 (TXA_2), prostaglandina E_2 (PGE_2) y prostaciclina (PGI_2) derivados de la vía de la ciclooxigenasa y los leucotrienos de la vía de lipooxygenasa. El ácido hidroxiperoxicicosatetraenoico (II-HPETE) y el ácido hidroxicicosatetraenoico (HETE) son productos intermediarios en las vías de la ciclooxigenasa y peroxidasa. Los mecanismos precisos por los cuales el E_2 incrementa la producción de PGI_2 aún no son claros. (Tomada de, White MM, *et al.*, 1995).

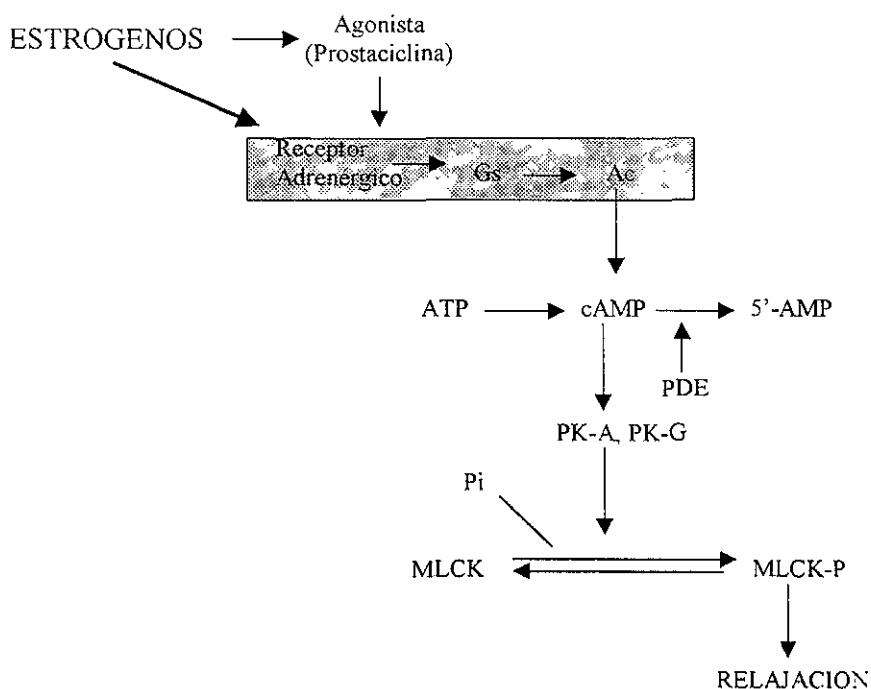


Figura 13. Relajación del músculo liso a través del cAMP. Esquema simplificado. Se ha mostrado que los estrógenos modifican la expresión de los receptores- β en varios tejidos y pueden estimular la producción de prostaciclina en las células endoteliales. Las principales proteínas incluidas en esta vía de relajación en las células del MLV son los receptores para hormona (Rcc), una proteína estimuladora (Gs), adenilato ciclasa catalítica (AC) y fosfodiesterasa (PDE) que hidroliza a cAMP. cAMP estimula a las proteínas quinasas dependientes de cAMP (PK-A, PK-G) que se encuentran involucradas en la fosforilación de miosina quinasas de cadena ligera (MLCK), disparando la relajación (Tomada de White MM, *et al.*, 1995)

6.5.4 Respuestas Adrenérgicas

Algunos estudios en un amplio intervalo de especies y preparaciones en estudio (Harrison GL y Moore LG, 1989, Crandall ME *et al.*, 1990, Weiner C *et al.*, 1991), sugieren que durante el embarazo disminuye la respuesta contráctil del músculo ante la estimulación adrenérgica. Los efectos de los estrógenos y la progesterona sobre las respuestas adrenérgicas varían entre especies y capas vasculares. En los anillos de arteria femoral de conejas ovariectomizadas bajo tratamiento crónico con E_2 que generan concentraciones en el rango de las fisiológicas, se observó una disminución en su respuesta contráctil ante norepinefrina (Gisclard V, *et al.*, 1987), mientras que en las arterias mesentéricas de ratas hembra y macho tratadas con dosis altas de estrógenos se demostró un incremento en la sensibilidad adrenérgica (Colucci WS, *et al.*, 1982)

Así mismo, en arterias perfundidas de rata hembra bajo tratamiento con dosis farmacológicas de progesterona durante 3 días, disminuyó la respuesta presora de norepinefrina mientras que el pre-tratamiento con E_2 no produjo ningún cambio (Dogterom J y De Jong W, 1974). Los resultados de estos estudios reflejan diferencias de respuesta que obedecen a diferencias entre especies, vasos, variaciones de la dosis de las hormonas, así como el uso de preparaciones provenientes de animales castrados o bien intactos gonadalmente. Sin embargo, las hormonas pueden ejercer sus efectos en sitios alternos, como en el caso del receptor α_2 endotelial que estimula la liberación del NO y por consiguiente producen vasodilatación. Mientras que la activación de los receptores α_1 y α_2 del M.V produce la vasoconstricción (Miller VM y Vanhoutte PM, 1985, Angus JA, *et al.*, 1986)

Otro aspecto que ha sido considerado es que los esteroides ováricos pueden influenciar las respuestas adrenérgicas mediante alteraciones en la afinidad al receptor adrenérgico. Tanto los estrógenos como los progestágenos parecen incrementar la afinidad al receptor α_1 . En el caso de las arterias mesentéricas de ratas hembra y macho tratadas con estrógenos se observó un incremento en la respuesta contráctil ante la estimulación adrenérgica que estuvo asociada con un incremento en la afinidad del receptor α_1 adrenérgico (Colucci WS, *et al.*, 1982). En la arteria uterina, la disminución en el flujo sanguíneo uterino durante la fase lútea (con altos niveles de progesterona) se asoció con un incremento en la afinidad de unión de dicho receptor (Ford SP, *et al.*, 1984).

Finalmente, un mecanismo importante que se ha considerado sobre los efectos en MLV, mediados por esteroides involucra la modificación de los niveles de catecolaminas por medio de la alteración en la recaptura, el depósito y el flujo en las terminaciones nerviosas (Hamlet MA, *et al.*, 1980; Crandall ME, *et al.*, 1990).

La sensibilidad a norepinefrina se incrementó en las arterias mesentéricas de ratas preñadas comparadas con las de ratas intactas en la presencia de cocaína, un inhibidor de la captura neuronal, sugiriendo que el embarazo puede estar asociado con éste hecho y/o la desactivación de los receptores de norepinefrina (Crandall ME, *et al.*, 1990). Otros estudios en la vena safena canina sugieren que el E_2 puede estimular la liberación de norepinefrina a partir de las terminaciones nerviosas (Hamlet MA, *et al.*, 1980). De esta forma, durante el embarazo y los esteroides ováricos modulan las respuestas adrenérgicas en varios niveles vasculares y sus efectos específicos pueden ejercerse tanto en el endotelio como sobre el MLV o en ambos.

6.5.5 Homeostasis del Calcio

La homeostasis del Ca^{2+} es un evento central tanto en la función de las células del MLV como en el endotelio, la liberación endotelial del NO y de la postraciclina es dependiente de Ca^{2+} (Adams DJ, *et al.*, 1989), de manera que un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ promueve la contracción del MLV (Khalil R, *et al.*, 1987) La regulación del Ca^{2+} citosólico en ambos tipos celulares es una función del flujo del Ca^{2+} extracelular así como de la liberación o captura y flujo del Ca^{2+} intracelular (figura 14) Los canales iónicos juegan un papel importante en ambos tipos celulares (MLV y endotelio). En el MLV, la corriente predominante es transportada por los canales de calcio dependientes de voltaje que están activados por la depolarización de la membrana (Bean BP, 1991). La entrada de calcio también se lleva a cabo a través de canales de fuga, canales activados por mecanoreceptores y canales operados por receptor (Adams DJ, *et al.*, 1989)

Los estudios en otros tipos de células sugieren que el E_2 y la progesterona tienen influencia en la expresión y la actividad de los canales iónicos a través de mecanismos genómicos y no-genómicos. En las células del músculo liso miométrial, los estrógenos y los progestágenos actúan sobre canales iónicos a través del mecanismo clásico de la transcripción génica. El tratamiento crónico con estrógenos muestra un incremento en el número de sitios de unión nitrendipinos en las membranas de las células del ML (nitrendipina es un bloqueador dihidropiridino del canal de Ca^{2+}) (Batra S, 1990); de manera que se sugiere un incremento en el número de estos canales dependiente de voltaje inducido por estrógeno.

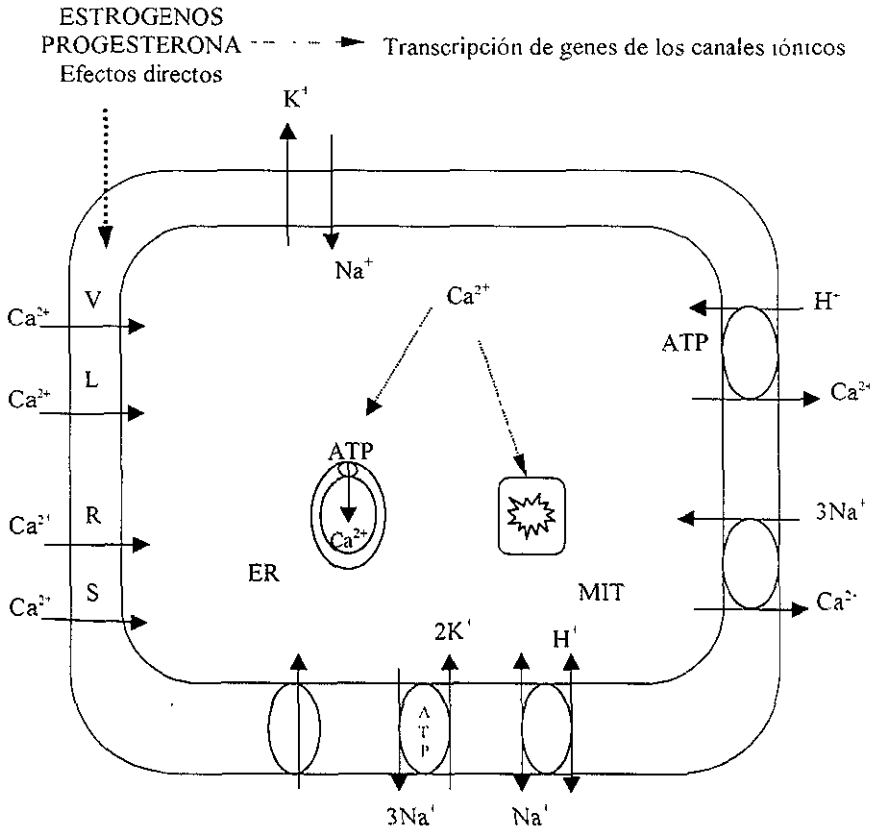


Figura 14. Mecanismo de homeostasis de calcio. Los esteroides ováricos pueden inhibir a los canales de Ca^{2+} operados por voltaje en la membrana celular o influyen en la síntesis de los canales de Ca^{2+} , Na^+ y K^+ a través de la transcripción de genes. La entrada de Ca^{2+} es a través de los canales de goteo (L) canales activados por mecano-receptores (S), canales dependientes de voltaje (V) o por los canales activados por receptor (R). El Ca^{2+} puede ser extraído a partir de la célula por la ATPasa Ca^{2+} - H^+ y por el intercambio Na^+ - Ca^{2+} . Los niveles elevados de Ca^{2+} intracelular pueden ser capturados dentro de la mitocondria (MIT) o del retículo endoplásmico (ER) vía una bomba de ATP- Ca^{2+} . Otros factores que influyen la homeostasis de Ca^{2+} pueden ser la regulación del potencial de membrana que incluye al K^+ y a los canales de Na^+ operados por voltaje así como el intercambio de Na^+ - K^+ y Cl^- , el intercambio de Na^+ - H^+ , y por la bomba de Na^+ - K^+ . Los canales de K^+ identificados en las células del MLV incluyen tanto a canales independientes como a los operados por receptor y a los dependientes de voltaje. (Tomada de White MM, *et al.*, 1995).

Los efectos inmediatos de los estrógenos y los progestágenos sobre la homeostasis de Ca^{2+} en los tejidos vasculares como en tejidos no vasculares apoyan la existencia de efectos directos sobre el MLV, ya que la administración aguda de progesterona y E_2 de manera independiente causan la relajación de los anillos sin endotelio de arteria coronaria de conejo pre-contraídos con Bay K8644, un agonista de los canales de Ca^{2+} operados por voltaje (figura 14). La incubación con E_2 desplaza hacia la derecha la curva de concentración dependiente de Ca^{2+} en un medio con alta depolarización debida al ión K^+ (Jiang C, *et al.*, 1992). Estas observaciones sugieren que las hormonas femeninas pueden alterar el flujo del Ca^{2+} en el MLV a través de la modulación de los canales de Ca^{2+} operados por voltaje (figura 14); así mismo el uso de la técnica de patch-clamp en la línea celular A7r5 del MLV mostró que el E_2 (10 μ M) tiene un efecto inhibitor sobre los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, lo que apoya esta hipótesis (Zhang F, *et al.*, 1994).

Por otro lado otras observaciones indican que en tejidos no vasculares, la progesterona inhibe la contracción inducida por Ca^{2+} en un tiempo de 1-3 minutos después de su adición, mientras que en los miocitos de cerdo, el E_2 disminuye la $[Ca^{2+}]_i$, en un tiempo de 1 minuto después de su administración e inhibe la corriente de Ca^{2+} en una forma dependiente de la concentración (Jiang C, *et al.*, 1992), sugiriendo un efecto inmediato inotrópico negativo en estas células; así como, que dichos efectos agudos pueden ocurrir en la membrana celular. Los canales de K^+ y Na^+ también intervienen en la alteración de los niveles de Ca^{2+} intracelular en tejidos no vasculares, por ejemplo en las células aisladas de ML de miometrio de rata, el estado hormonal del animal tuvo influencia sobre la expresión de los canales de K^+ . También, este efecto se observó en la expresión de su mRNA, ya que

durante la gestación, con el tratamiento estrogénico crónico se experimentó un rápido incremento en la densidad de los canales de Na⁺ (Boyle MB, *et al.*, 1987, Sperelakis N, *et al.*, 1992) Sin embargo se desconoce si éstos cambios ocurren de manera similar en el MLV

Esta información requiere ser interpretada con precaución ya que las concentraciones hormonales utilizadas, no se reportan o en algunos estudios se involucran concentraciones superiores a las fisiológicas de estrógenos (10-30µM) y progesterona (0.3-30µM), dichas concentraciones pueden generar respuestas inespecíficas, ya que podría exceder los niveles sanguíneos a los que generalmente está expuesta la célula (Meizel S y Turner KO, 1991).

6.6 Influencia de los estrógenos sobre el metabolismo de lipoproteínas

Los estrógenos son considerados sustancias cardioprotectoras, en función de su capacidad para modificar el metabolismo de los lípidos que se adhieren a las paredes vasculares. En la aterosclerosis se presenta daño en la pared vascular debido al depósito de lípidos, macrófagos, linfocitos T y músculo liso, siendo esta una de las causas que provocan la enfermedad cardiovascular. Este proceso se inicia con el depósito de material lipídico, seguido de la formación de una lesión que da lugar a la placa fibrosa que vuelve rígidos a los vasos sanguíneos con el consecuente cambio en las propiedades hemodinámicas del sistema circulatorio, generando problemas cardiovasculares (Nathan L y Chaudhuri G, 1997).

Desde hace mucho tiempo se conoce que la mujer en edad fértil está protegida contra la trombosis y pierde esta protección en la menopausia. El empleo de estrógenos sustitutivos en la menopausia, presenta un efecto protector contra las enfermedades cardiovasculares lo que hace pensar que los estrógenos podrían estar involucrados a través de los mecanismos siguientes:

- a) Aumento de las lipoproteínas de alta densidad (HDL).
- b) Disminución de la arteriosclerosis y reparación del endotelio.
- c) Vasodilatación.
- d) Aumento del flujo periférico.

Los estrógenos aumentan las concentraciones plasmáticas de HDL (High Density Lipoprotein), se ha hipotetizado que posiblemente esto sea debido al efecto semejante al que producen los agentes antioxidantes lipofílicos como el probucol y la vitamina E que preservan su función al evitar su oxidación (Guetta V y Cannon III RO, 1996)

La administración de estrógenos orales ocasiona un incremento en las concentraciones de HDL-C (HDL unido a colesterol) y específicamente de la HDL₂, debido a una reducción de la lipasa endotelial hepática la cual las degrada (Tikkanen MJ, *et al.*, 1982). El principal efecto de los estrógenos sobre las HDL, parece ser el incremento en la producción de HDL-C y la síntesis hepática de apolipoproteína (Apo-A₁). En este proceso se requieren estrógenos administrados por vía oral que favorecen el efecto del primer paso. Los estrógenos incrementan los niveles de VLDL (Very Low Density Lipoprotein) y triglicéridos a través de su metabolismo hepático directo, la conversión de VLDL a LDL-C (Low Density Lipoprotein unida a colesterol) se disminuye. Posteriormente, el catabolismo de LDL-C se incrementa con estrógenos; este proceso elimina LDL de la circulación y tiene influencia de las rutas de metabolismo hepático, hecho que no se observa con la administración transdérmica. Lo anterior sugiere que el transporte hepático es un factor importante en el cambio de los niveles de las lipoproteínas así como la inducción de los receptores de LDL, (Guetta V y Cannon III RO, 1996).

En estudios prospectivos de terapia sustitutiva con estrógenos equinos conjugados (EEC, 0.625mg) y después de un año de tratamiento, se observaron incrementos en los niveles de HDL-C en 13.5% y una disminución en los niveles de LDL-C en un 16%. La disminución del colesterol total fue del 6%. El incremento de HDL-C se debió al incremento en HDL₂ y de los triglicéridos totales. Además disminuyó la apoproteína B (Apo-B) y se incrementó Apo-A₁ y VLDL, estos efectos son mediados vía efecto del primer paso (Bush TL, *et al.*, 1987). Por otra parte Walsh y cols., trataron a 8 mujeres postmenopáusicas en un ensayo doble ciego cruzado con 2 tratamientos por 6 semanas (estradiol oral, 2 mg/día; estradiol transdérmico, 0.1mg 2 veces a la semana). El primer

tratamiento incrementó los niveles de HDL₂ y HDL₃-apoA-I en un 37% y 11%, respectivamente, el incremento en la producción de apoA-I es reflejo de que su fracción catabólica no se afectó. En contraste, el segundo tratamiento, el cual fue similar en potencia al tratamiento de estradiol oral, no produjo cambios sobre los niveles de HDL o en su índice metabólico (Walsh BW, *et al.*, 1994)

A medida que las células del organismo mueren y las membranas celulares son renovadas se libera continuamente colesterol en el plasma, el cual es absorbido de inmediato en lipoproteínas de alta densidad, en donde se esterifica con un ácido graso de cadena larga por una enzima plasmática llamada lecitina colesterol acetil transferasa. Estos ésteres recién formados son transferidos rápidamente desde las partículas de HDL a las lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) o a lipoproteínas de densidad intermedia (IDL), mediante una proteína de transferencia de ésteres de colesterol que se encuentra en el plasma. Finalmente son captados por el hígado y convertidas en lipoproteínas de baja densidad (LDL). El proceso por el cual las HDL promueven la eliminación de colesterol de las células periféricas y facilita su regreso al hígado se denomina transporte inverso de colesterol. Este transporte es facilitado por la síntesis y secreción de apoproteína E en los tejidos periféricos (Lobo RA, *et al.*, 1991)

En Helsinki (1987), se llegó a la conclusión de que la reducción de las concentraciones de colesterol-LDL, disminuyen la incidencia de morbilidad y mortalidad en la enfermedad coronaria. Los beneficios clínicos están correlacionados con un descenso en el colesterol-LDL, y un aumento en el colesterol-HDL y la disminución de los triglicéridos plasmáticos. Los estudios epidemiológicos han revelado una correlación inversa entre las concentraciones de HDL y las de LDL en la enfermedad coronaria. Se

desconoce si las concentraciones de HDL por sí mismas son protectoras o si constituyen una indicación de algún otro aspecto benéfico del metabolismo de los lípidos. Los ácidos fibrícos y los inhibidores de la 3-hidroxi-3-metilglutaril coenzima A (HMGCoA) reductasa elevan las HDL y disminuyen las LDL, por lo que esta acción combinada se considera ideal en la prevención de la aterosclerosis.

Los trabajos de Kevin Krasinki (1997), muestran que la administración de estrógenos mediante implantes subcutáneos (1.5 o 5.0 mg de E₂/30 días), disminuye la incidencia de aterosclerosis, evitando el daño en la íntima. Este trabajo fue realizado en ratas ovariectomizadas, a las que se les produjo daño en la arteria carótida por medio de una angioplastia. El uso de E₂ provocó un incremento en la reendotelización dependiente de la dosis y aceleró la función endotelial *in vivo*, manifestándose en un incremento en la producción de NO. Estos estudios propusieron que la acción antiaterogénica de los estrógenos puede estar mediada, en parte, por los efectos directos sobre las células endoteliales de la rata y probablemente se presente esta función en humanos tratados con dosis fisiológicas de E₂ (Krasinki K, *et al*, 1997).

Por otra parte los estrógenos administrados durante el climaterio, tienen un efecto vasodilatador, actuando directamente sobre la pared de los vasos sanguíneos e indirectamente a través de los mediadores químicos que aumentan la producción y liberación de prostaciclina, produciendo efecto vasodilatador y disminuyendo la formación de tromboxano A₂ con acción opuesta (Volterrani M, *et al.*, 1995)

En la década de los 60's, los investigadores comenzaron a estudiar los cambios hemodinámicos mediados por los estrógenos. Por ejemplo, Ueland y Parer en 1966 reportaron una disminución en la resistencia vascular sistémica durante el embarazo,

demostrando efectos de los estrógenos *in vivo* sobre el tono vasomotor, sin embargo, no se conocía si estos efectos estarían mediados por los cambios en los factores sistémicos o por los efectos directos de los estrógenos sobre la pared vascular. No fue sino hasta 1977, cuando Silva de Sa y Meirelles observaron que varias sustancias estrogénicas, incluido el E₂, podrían causar en tiempos cortos la relajación de arterias umbilicales aisladas y perfundidas de humano en experimentos de 4 horas, concluyendo que los rápidos efectos vasodilatadores señalados son probablemente de tipo no-genómico. Por otra parte los efectos ateroprotectores de los estrógenos involucran alteraciones en la expresión de genes, regulando la producción de dos importantes vasodilatadores sintetizados por la pared vascular la prostaciclina y el NO, de manera que los mecanismos moleculares responsables de la vasodilatación mediada por estrógenos, la activación e inactivación de genes específicos y la inhibición de la proliferación celular del MLV, requiere de mayor investigación (Mendelsohn ME y Karas RH, 1994).

7. CONCLUSIONES

- * El MLV de varias especies presenta receptores funcionales para los estrógenos, por lo que representa un tejido blanco para las acciones fisiológicas de estos compuestos
- * La combinación de la actividad aromatasa y dehidrogenasa aunado a los análisis de RE y RNA apoya de manera importante el hecho de que las células de MLV son células blanco para los estrógenos, por lo que es probable que estas sustancias tengan una actividad importante en la función vascular
- * Los estrógenos y derivados sintéticos ejercen efectos significativos sobre las propiedades eléctricas del MLV, modulando el proceso de excitación-contracción.
- * Los estrógenos, específicamente el 17β -estradiol, presentan efectos fisiológicos y farmacológicos sobre la actividad contráctil basal de la musculatura lisa
- * El 17β -estradiol, ejerce efectos moduladores sobre la contracción del músculo liso inducida por varios agonistas como. 5-HT, fenilefrina, angiotensina II, Ca^{2+} y K^+ .
- * Los efectos moduladores del 17β -estradiol y de sus análogos sintéticos sobre el proceso de contracción-relajación se presentan en cuestión de minutos (\leq a 30 min), tiempo incompatible con un efecto a nivel genómico.
- * Los estrógenos ejercen sus acciones protectoras sobre el MLV a través de un mecanismo directo sobre las propiedades eléctricas de la membrana que no involucran un mecanismo genómico.
- * Además de este efecto, los estrógenos pueden proteger la musculatura lisa al inducir la liberación de factores relajantes de las células endoteliales; como NO, ET-1 y eicosanoides.
- * Estos efectos se suman a las acciones protectoras de los estrógenos sobre el MLV, mediadas por la modificación del metabolismo hepático de los lípidos, mecanismo que involucra la síntesis de proteínas.
- * En la actualidad, es necesario dilucidar el mecanismo por el cual los estrógenos de forma directa y rápida protegen al MLV, modulando la actividad contractil basal e inducida

8. REFERENCIAS

- ✿ Adams DJ, Barakeh J, Laskey R, Van Breemen C Ion channels and regulation of intracellular calcium in vascular endothelial cells *FASEB J.* 1989; 3 2389-2400
- ✿ Alberts B, Lewis J, Rass M, Roberts K, Watson JD The Cytoskeleton En *Molecular Biology of the Cell*. Second Edition Adams, R. y Walker, A. (Eds) Garland Publishing, inc. New York pp. 613-680, 1989
- ✿ Altura BT y Altura BM. Influence of sex hormones, oral contraceptives and pregnancy on vascular muscle and its reactivity. En *Factors influencing vascular reactivity*. Carrier, O. and Shibata, S. (Eds). Igaku-Shoin Press, New York, 1977, 221-254.
- ✿ Andersen HL, Weis JU, Fjalland B y Korsgaard N Effects of acute and long-term treatment with 17 β -estradiol on the vasomotor responses in the rat aorta *British J. Pharmacol.* 1999; 126.159-168
- ✿ Angus JA, Cocks TM, Satoh K The alpha adrenoceptors on endothelial cells. *Fed Proc.* 1986, 45:2355-2359.
- ✿ Barret-Connor E y Bush TL. Estrogen and coronary heart disease in women. *J. Am. Med. Assoc.* 1991; 265.1861-1867.
- ✿ Batra S Influence of chronic oestrogen treatment on the density of muscarinic cholinergic receptors and calcium channels in the rabbit uterus *J Endocrinol* 1990; 125.185-189
- ✿ Bayard F, Clamens S, Meggetto F, Blaes N, Delsol G, Faye JC. Estrogen synthesis, estrogen metabolism, and functional estrogen receptors in rat arterial smooth muscle cells in culture. *Endocrinology* 1995; 136 (4) 1523-1529
- ✿ Bean BP Pharmacology of calcium channels in cardiac muscle, vascular muscle, and neurons. *Am J Hypertens* 1991, 4:406S-411S
- ✿ Blackmore PF, Beeb SJ, Danforth DR, Alexander NA Progesterone and 17 α -hydroxyprogesterone: Novel stimulators of calcium influx in human sperm *J. Biol. Chem.* 1990; 265:1376-1380.
- ✿ Bossu JL, Elhamedi A, Feltz A, Tanzi F, Aunis D. Voltage-gated Ca entry in isolated bovine capillary endothelial cells: evidence of a new type of Bay K8644-sensitive channel *Pflugers Arch* 1992; 420:200-207.
- ✿ Boulanger C y Luscher TF Release of endothelin from the porcine aorta. Inhibition by endothelium-derived nitric oxide. *J Clin Invest* 1990; 85 587-590.
- ✿ Boyle MB, MacLusky NJ, Naftolin F, Kaczmarek LK. Hormonal regulation of K⁺-channel messenger RNA in rat myometrium during oestrus cycle and in pregnancy

Nature 1987; 330 373-375

- ✿ Bression D, Michard M, Le Dafniet M, Pagesy P y Peillon F. Evidence for a specific estradiol binding site on rat pituitary membranes. *Endocrinol.* 1986; 119 1048-1051
- ✿ Burkman RT. Lipid and lipoprotein changes in relation to oral contraception and hormonal replacement therapy. *Fertil. Steril.* 1988; 49 39S-50S
- ✿ Bush TL, Barret-Connor E, Cowan LD. Noncontraceptive estrogen use and cardiovascular disease. *Epidemiol. Rev.*, 1985, 7:89-104
- ✿ Ciocca DR y Vargas-Roig LM. Estrogen receptors in human nontarget tissues: biological and clinical implications. *Endocrine Rev.* 1995, 16(1) 35-62.
- ✿ Collins P, Shay J, Jiang C, Moss J. Nitric oxide accounts for dose-dependent estrogen-mediated coronary relaxation after acute estrogen withdrawal. *Circulation* 1994; 90:1964-1968.
- ✿ Colucci WS, Gimbrone Jr MA, McLaughlin MK, Halpern W, Alexander RW. Increased vascular catecholamine sensitivity and alpha-adrenergic receptor affinity in female and estrogen-treated male rats. *Circ Res* 1982; 50:805-811.
- ✿ Corbin W, Graham-Lorence S, McPhaul M, Mason JI, Mendelson CR, Simpson ER. Isolation of a full-length cDNA encoding human aromatase system cytochrome P₄₅₀ and its expression in nonsteroidogenic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 1988. 85, 8948-8952.
- ✿ Crandall ME, Keve TM, McLaughlin MK. Characterization of norepinephrine sensitivity in the maternal splachnic circulation during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol.* 1990; 162:1296-1301.
- ✿ Crook D, Godsland IF, Wynn V. Oral contraceptives and coronary heart disease: modulation of glucose tolerance and plasma lipid risk factors by progestins. *Am J. Obstet. Gynecol.* 1988, 158:1612-1620
- ✿ Culotta E, Koshland Jr DE. NO news is good news. *Science.* 1992, 258:1862-1865
- ✿ Chang WC, Kakao J, Orimo H, Murota SI. Stimulation of prostaglandin cyclooxygenase and prostacyclin synthetase activities by estradiol in rat aortic smooth muscle cells. *Biochem Biophys Acta* 1980; 620:472-482
- ✿ Channing CP, et al. Ovarian follicular and luteal physiology. En Greep, RO (ed.) International review of physiology reproductive physiology III Vol 22. Baltimore, University Park Press, 1980; 117
- ✿ Davis MG y Hagen PO. The vascular endothelium. A new horizon. *Ann Surg* 1993; 218 593-609

- ✿ Dogterom J y De Jong W Diminished pressor response to noradrenaline of the perfused tail artery of pregnant rats *Eur J Pharmacol* 1974, 25:267-269
- ✿ Farhat MY, Aby-Younes S, Ramwell PW Non-genomic effects of estrogen and the vessel wall *Biochem. Pharmacol* 1996, 15(5) 571-576
- ✿ Emori T, Hirata Y, Ohta K, Shichiri M, Marumo F Secretory mechanism of immunoreactive endothelin in cultured bovine endothelial cells *Biochem Biophys Res Commun* 1989, 160:93-100
- ✿ Farhat MY, Lavingne MC, Ramwell PW. The vascular protective effects of estrogen *FASEB J*. 1996; 10:615-624.
- ✿ Flavahan NA, Shimokawa H, Vanhoutte PM. Pertusis toxin inhibits endothelium-dependent relaxations to certain agonists in porcine coronary arteries. *J Physiol* 1989, 408:549-560.
- ✿ Flavahan NA, Shimokawa H, Vanhoutte PM. Inhibition of endothelium-dependent relaxations by phorbol myristate acetate in canine arteries: role of a pertusis toxin-sensitive G-protein. *J Pharmacol Exp Ther*. 1991, 256:50-55.
- ✿ Fritsch MK, Murdoch FE. Estrogens, Progestins, and Oral Contraceptives. En: Human Pharmacology molecular to clinical. Second edition Brody TM, Larner J, Minneman K, Neu HC (eds) New York, NY 1994; 482-500.
- ✿ Ford SP, Reynolds LP, Farley DB, Bhatnagar RK y Van Orden DE Interaction of ovarian steroids and periarterial alpha 1-adrenergic receptors in altering uterine blood flow during the estrous cycle of gilts *Am J Obstet Gynecol*. 1984, 150:480-484.
- ✿ Guyton AC. Transmisión neuromuscular; fisiología del músculo liso. En: Tratado de fisiología médica. 5ª Edición, (eds.) Interamericana McGraw-Hill, 1995; 71-81
- ✿ Guyton AC. Fisiología femenina antes del embarazo: Hormonas femeninas En: Tratado de Fisiología Médica, 7ª. Edición, (eds.) Interamericana McGraw-Hill, 1995 p. 959-971
- ✿ Genuth SM The reproductive glands. En: Physiology. (eds) Berne RM, Levy M. Mosby Co. Washington, 1986; Ch. 55.
- ✿ Gisclard V, Flavahan NA y Vanhoutte PM. Alpha adrenergic responses of blood vessels of rabbits after ovariectomy and administration of 17 beta-estradiol. *J Pharmacol Exp Ther* 1987, 240:466-470.
- ✿ Gisclard V, Miller VM y Vanhoutte PM. Effect of 17beta-estradiol on endothelium-dependent responses in the rabbit. *J Pharmacol Exp Ther*. 1988, 244:19-22

-
- ⊛ Goetz RM, Morano Y, Calovini T, Studer R, Holtz J. Increased expression of endothelial constitutive nitric oxide synthase in rat aorta during pregnancy. *Biochem Biophys Res Commun*. 1994; 205:905-910
 - ⊛ Goldstein DS, Levinson P, Keiser HR. Plasma and urinary catecholamines during the human ovulatory cycle. *Am J Obstet Gynecol*. 1983; 146:824-829
 - ⊛ Granner DK. Hormonal Action. En: Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism. Second Edition, edited by Kenneth L. Becker. JB Lippincott Company, Philadelphia, 1995; 20-34
 - ⊛ Gruchow HW, Anderson AJ, Barboriak JJ, Sobocinski KA. Postmenopausal use of estrogen and occlusion of coronary arteries. *Am. Heart J*. 1988; 115:954-963.
 - ⊛ Guetta V y Cannon III RO. Cardiovascular effects of estrogen and lipid-lowering therapies in postmenopausal women. *Circulation*. 1996;93:1928-1937
 - ⊛ Hamlet MA, Rorie DK y Tyce GM. Effects of estradiol on release and disposition of norepinephrine from nerve endings. *Am J Physiol*. 1980; 239:H450-H456
 - ⊛ Harder DR y Coulson PB. Estrogen receptors and effects of estrogen on membrane electrical properties of coronary vascular smooth muscle. *J. Cell Physiol*. 1979; 100:375-382
 - ⊛ Harrison G y Moore LG. Blunted vasoreactivity in pregnant guinea pigs is not restored by meclofenamate. *Am J Obstet Gynecol*. 1989; 160:258-264.
 - ⊛ Hayashi T, Fukuto JM, Ignarro LJ, Chaudhuri G. Basal release of nitric oxide from aortic rings is greater in female rabbits than in male rabbits. implications for atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1992; 89:11259-11263
 - ⊛ Hedlin AM. The effect of oral contraceptive estrogen on blood coagulation and fibrinolysis. *Throm. Diath Haemost*. 1975; 33:370
 - ⊛ Hishikawa K, Nakaki T, Marumo T, Suzuki H, Kato R y Saruta T. Up-regulation of nitric oxide synthase by estradiol in human aortic endothelial cells. *JFEBS*. 1995; 360:291-293.
 - ⊛ Janssen LJ, Chris H, Roopung N. Ionic mechanisms underlying electrical slow waves in canine airway smooth muscle. *Am. J. Physiol*. 1998; 275(Lung Cell Mol Physiol. 19):L516-L523
 - ⊛ Jenssen EV, Greene GL, Closs LE, DeSombre ER, Nadji M. Receptors Reconsidered: a 20-year perspective. *Recent Prog Horm Res*. 1982; 38:1-40
-

- ✿ Jiang CW, Sarrel PM, Lindsay DC, Poole-Wilson PA y Collins P Endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery by 17 beta-estradiol *in vitro* *Br J Pharmacol* 1991; 104 1033-1037
- ✿ Jiang C, Poole-Wilson PA, Sarrel PM, Mochizuki S, Collins P, MacLeod KT Effect of 17 beta-oestradiol on contraction, Ca²⁺ current and intracellular free Ca²⁺ in guinea-pig isolated cardiac myocytes *Br J Pharmacol*. 1992, 106 739-745
- ✿ Jiang C, Sarrel PM, Poole-Wilson PA, Collins P Acute effects of 17 β -estradiol on rabbit coronary artery contractile responses to endothelin-1 *Am J Physiol*. 1992, 263:H271-H275.
- ✿ Karas RH, y Paterson BL Human vascular smooth muscle cells contain functional estrogen receptor *Circulation*. 1994;89:1943-1950
- ✿ Katzung BG Farmacología básica y clínica Ed. Manual Moderno. 6ª. Edición. México, D F-Santa fé de Bogotá 1992.
- ✿ Khalil R, Lodge N, Saida K, Van Breemen C. Mechanism of calcium activation in vascular smooth muscle. *J Hypertens Suppl* 1987; 5:S5-S15.
- ✿ Koh KK, Horne MK 3rd, Csako G Relation of fibrinolytic potentiation by estrogen to coagulation pathway activation in postmenopausal women. *Am. J. Cardiol*. 1999, 83(3):466-469, A10
- ✿ Krasinski K, Spyridopoulos I, Ashara T, van der Zee R, Isner JM, Losordo DW Estradiol accelerates functional endothelial recovery after arterial injury. *Circulation* 1997;95:1768-1772.
- ✿ Lan NC, Chen JS, Belelli D, Pritchett DB, Seeburg PH, Gee KW. A steroid recognition site is functionally coupled to an expressed GABA benzodiazepine receptor *Eur. J. Pharmacol* 1990;188:403-406
- ✿ Lein A. The Cycling Female: Her Menstrual Rhythm San Francisco. WH Freeman, 1979
- ✿ Lieberherr M y Grosee B Androgens increase intracellular calcium concentration and inositol 1,4,5-triphosphate and diacylglycerol formation via a pertussis toxin-sensitive G-protein *J. Biol. Chem*. 1994, 269:7217-7223.
- ✿ Lobo RA Effects of hormonal replacement on lipids and lipoproteins in postmenopausal women *J Clin Endo Metabolism*. 1991;73(5) 925-930
- ✿ Lonning PE, Dowsett M, Jacobs S, Schem B, Hardy J, Powles TJ. Lack of diurnal variation in plasma levels of androstenedione, testosterone, estrone and estradiol in postmenopausal women *J. Steroid Biochem* 1989. 34 551-3.

-
- ✿ Mendelsohn ME y Karas RH Estrogen and the blood vessel wall *Current Opinion in Cardiology* 1994, 9 619-626
 - ✿ Mendelson CR y Simpson ER Regulation of estrogen biosynthesis by human adipose cells *in vitro*. *Mol. Cell Endocrinol.* 1987 52, 169-176
 - ✿ Meizel S y Turner KO Progesterone acts at the plasma membrane of human sperm *Mol Cell Endocrinol.* 1991, 11 R1-R5.
 - ✿ Miller VM, Vahoutte PM. Endothelial α_2 -adrenoceptors in canine pulmonary and systemic blood vessels. *Eur J Pharmacol* 1985, 118 123-129.
 - ✿ Miller VM, Vanhoutte PM. 17 β -estradiol augments endothelium-dependent contractions to arachidonic acid in rabbit aorta *Am J Physiol.* 1990; 258 R1502-R1507.
 - ✿ Miller E. Molecular biology of steroid hormone synthesis, *Endocr Rev.*, 1988, 9,295-318
 - ✿ Miyahana K, Kawamoto T, Sase K, Yui Y, Toda K, Yang LX, Hattori R, Aoyama T, Yamamoto Y, Doi Y. Cloning and structural characterization of the human endothelial nitric-oxide-synthase gene. *Eur J Biochem* 1994, 223:719-726.
 - ✿ Muck AO, Seeger H, Korte K, Lippert TH The effect of 17-beta-estradiol and endothelin 1 on prostacyclin and thromboxane production in human endothelial cell cultures. *Clin Exp Obstet Gynecol.* 1993; 20:203-206
 - ✿ Nakajima T, Kitazawa T, Hamada E, Hazama H, Omata M, Kurachi Y. 17 β -estradiol inhibits the voltage-dependent L-type Ca^{2+} currents in aortic smooth muscle cells *European Journal of Pharmacology.* 1995; 294:625-635
 - ✿ Nathan L, Chaudhuri G. Estrogens and atherosclerosis. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1997 37,477-515.
 - ✿ Nebert DW, Gonzalez F J. P₄₅₀ genes: structure, evolution, and regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 1987, 56, 045-993.
 - ✿ Nenci I, Marchetti E, Marzola A. Affinity cytochemistry visualizes specific estrogen binding sites on the plasma membrane of breast cancer cells *J. Steroid Biochem.* 1981, 14:1139-1146
 - ✿ Orimo A, Inoue S, Ikegami A, Hosoi T, Masahiro A, Yasuyoshi O, Masami M, Orimo H. Vascular smooth muscle cells as target for estrogen; *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 1993; 195 (2), 730-736.
-

- ✱ Pappas TC, Gametchu B, Yannariello-Brown J, Collins TJ, Watson CS. Membrane estrogen receptor in GH3/B6 cells are associated with rapid estrogen-induced release of prolactin *Endocrine*. 1994; 2: 813-822
- ✱ Peper K, *et al.* The acetylcholine receptor at the neuromuscular junction *Physiol. Rev.* 1982; 62:1271
- ✱ Pietras RJ, Zsengo CM. Partial purification and characterization of estrogen receptor in subfractions of hepatocyte plasma membranes *Biochem. J.* 1980; 191:743-760.
- ✱ Polderman KH, Steouwer CDA, van Kamp GP, Dekker GA, Verheugt FWA, Gooren LJG. Influence of sex hormones on plasma endothelin levels. *Ann Intern Med.* 1993; 118:429-432.
- ✱ Revelli A, Massobrio M, Tesarik J. Non-genomic actions of steroid hormones in reproductive tissues *The Endocrine Society*. 1998; 19 (1): 3-17.
- ✱ Rönnemaa T, Järveläinen H, Lehtonen A, Grönroos M, Marniemi J, Rautio A. Growth of human aortic smooth muscle cells cultured with human serum is retarded when serum lipids are lowered by medroxy progesterone. *Atherosclerosis*. 1987; 67: 223-228.
- ✱ Ross RK, Henderso BE, Paganini-Hill A, Mack TM. Cardiovascular benefits of estrogen replacement therapy. *Am J Obstet Gynecol.* 1989; 160(5 Pt.2):1301-6.
- ✱ Ruehlmann DO, Mann GE. Actions of oestrogen on vascular endothelial and smooth-muscle cells *Biochemical Society Transactions*. 1996; 25: 40-45.
- ✱ Schini VB, Hendrickson H, Heublein DM, Burnett Jr JC, Vanhoutte PM. Thrombin enhances the release of endothelin from cultured porcine aortic endothelial cells. *Eur J Pharmacol* 1989; 165:333-334
- ✱ Sperelakis N, Inoue Y, Ohya Y. Fast Na⁺ channels and slow Ca²⁺ current in smooth muscle from pregnant rat uterus. *Mol Cell Biochem* 1992; 114:79-89.
- ✱ Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Manson JE, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* 1991; 325:756-762.
- ✱ Steinleiter A, Stanczyk FZ, Levin JH. Decreased in vitro production of 6-keto-prostaglandin F_{1a} by uterine arteries from postmenopausal women. *Am. J. Obstet. Gynecol* 1989; 161: 1677-81
- ✱ Strobl J, Thomas JA. Estrogens, progestins and antiestrogens. En: *Modern Pharmacology* third edition. Craig Charles R. Ph.D, Stitzel Robert E. Ph.D, (Eds) Little, Brown and Company, Boston/Toronto/London 1991, 873-890.

-
- ✿ Sullivan JM, Vander Zwaag R, Lemp GF, Hughes JP, Maddock V, Kroetz FW, Ramanathan KB, Marvis DM Postmenopausal estrogen use and coronary atherosclerosis *Ann. Intern Med.* 1988; 108 358-363
 - ✿ Tikkanen MJ, Kikkila EA, Kussi T, Sipinen S High density lipoprotein-2 and hepatic lipase reciprocal changes produced by estrogen and norgestrel *J Clin Endocrinol Metab.* 1982;54:1113-7
 - ✿ Towle A, Sze P Steroid binding to synaptic plasma membrane. Differential binding of glucocorticoids and gonadal steroids. *J Steroid Biochem.* 1983; 18 135-143
 - ✿ Tsai MJ, Clark JH, Schrader W, O'Malley, BW. Mechanisms of action of hormones that act as transcription-regulatory factors. En: *Molecular endocrinology: basic concepts and clinical correlations.* Weintraub BD (Ed) Raven Press, Ltd NY 1995 pp 55-94
 - ✿ Vaghy PL. Calcium Antagonists. En: *Human Pharmacology molecular to clinical* Second edition. Brody TM, Larner J, Minneman KP, Neu HC; (eds.) New York, NY. 1994; 203-214.
 - ✿ Valverde MA, Rojas P, Amigo J, Cosmelli D, Orio P, Sahamonde MI, Mann GE, Vergara C, Latorre R Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the β Subunit. *Science*, 1999; 285. 1929-1931.
 - ✿ Van Buren GA, Yang DS, Clark KE Estrogen-induced uterine vasodilatation is antagonized by L-nitroarginine methyl ester, and inhibitor of nitric oxide synthesis *Am J Obstet Gynecol* 1992; 167:828-833.
 - ✿ Volterrani M, Rosano G, Coats A, Beale C, Collins P Estrogen acutely increases peripheral blood flow in postmenopausal women *Am. J Med* 1995, 99(2):119-22
 - ✿ Wakasugi M, Noguchi T, Kazama YI, Kanemaru Y, Onaya T. The effects of sex hormones on the synthesis of prostacyclin (PGI₂) by vascular tissues *Prostaglandins*. 1989, 37:401-410.
 - ✿ Walsh BW, Li H, Sacks FM Effects of postmenopausal hormone replacement with oral and transdermal estrogen on high density lipoprotein metabolism *Journal of Lipid Research.* 1994; 35:2083-2093
 - ✿ Watts S, Florian JA, Monroe KM. Dissociation of Angiotensin II-Stimulated activation of mitogen-activated protein kinase kinase from vascular contraction *JPET.* 1998, 286(3); 1431-1438.
 - ✿ Wehling M Specific, nongenomic actions of steroid hormones *Ann Rev. Physiol* 1997 59 365-393
 - ✿ Wehling M, Christ M, Theisen K Membrane receptors for aldosterone A novel pathway for mineralocorticoid action *Am. J. Physiol.* 1997, 263:E974-E979
-

- ✳ Weiner C, Liu KZ, Thompson L, Herrig J, Chestnut D. Effect of pregnancy on endothelium and smooth muscle their role in reduced adrenergic sensitivity *Am J Physiol.* 1991; 261:H1275-H1283
- ✳ Weiner CP, Lizasoain Y., Baylis SA, Knowles RG, Charles RG, Moncada S. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91: 5212-5216
- ✳ Weisz A y Bresciani F. Estrogen induces expression of c-fos and c-myc protooncogenes in rat uterus *Mol Endo* 1988, 2:816-824
- ✳ Westfall D, Gerthoffer WT. Vasodilators. En: Human Pharmacology molecular to clinical. Segunda edición. (Eds.) Brody, TM, Larner, J, Minneman, KP, Neu, HC. Mosby, New York, NY. 1994, 215-226.
- ✳ White MM, Zamudio S, Stevens T, Tyler R, Lindenfeld J, Leslie K, Moore LG. Estrogen, progesterone, and vascular reactivity. Potential cellular mechanisms. *Endocrine Reviews* 1995, 16(6):739-750.
- ✳ Williams SP, Shackelford DP, Iams SG, Mustafa SJ. Endothelium-dependent relaxation in estrogen-treated spontaneously hypertensive rats. *Eur J Pharmacol.* 1988; 145:205-207.
- ✳ William Cl, Stancel GM. Estrogenos y progestágenos. En: Las Bases farmacológicas de la terapéutica. Novena edición. Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman Gilman A (eds). México, 1996
- ✳ Wren BG. The effect of oestrogen on the female cardiovascular system. *Med J Aust.* 1992; 157(3):204-208.
- ✳ Xiao-Jian Y. Voltage-Gated K^+ currents regulate resting membrane potential and $[Ca^{2+}]_i$ in pulmonary arterial myocytes *Circ Res.* 1995; 77:370-378.
- ✳ Yangisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature.* 1988; 332:411-415
- ✳ Zhang, F, Ram JL, Standley PR, Sowers JR. 17 beta-estradiol attenuates voltage-dependent Ca^{2+} currents in A7r5 vascular smooth muscle cell line. *Am J Physiol* 1994, 266:C975-980
- ✳ Zheng, J, Ramirez VD. Neural membrane estrogen binding proteins: Western (ligand) blot studies. Proceedings of the 77th annual meeting of the endocrine society, Washington, DC. 1995; P1, 422