



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

LOS 17 β -AMINOESTRÓGENOS PRODUCEN HIPERREACTIVIDAD

DEL MÚSCULO LISO TRAQUEAL DE COBAYO

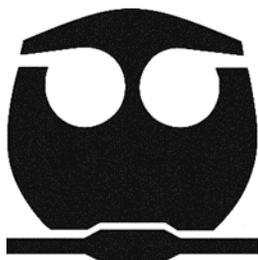
TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

INOCENCIO MARTINEZ VILLA



MÉXICO, D.F.

2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Elia Brosla Naranjo Rodríguez

VOCAL: Profesor: Gómez Martínez Atoniatu Edmundo

SECRETARIO: Profesor: Edgar Flores Soto

1er.SUPLENTE: Profesor: Navarrete Castro Andrés

2° SUPLENTE: Profesor: Moreno Sáenz Enrique

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN ASMA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

ASESOR DEL TEMA: DR. EDGAR FLORES SOTO

(Nombre y firma)

SUPERVISOR TÉCNICO: DR. LUIS MANUEL MONTAÑO RAMÍREZ

(Nombre y firma)

SUSTENTANTE: INOCENCIO MARTÍNEZ VILLA

(Nombre y firma)

ÍNDICE	página
RESUMEN	1
LISTA DE ABREVIATURAS	2
LISTA DE FIGURAS	4
LISTA DE TABLAS	5
INTRODUCCIÓN	6
Los 17 β -aminoestrógenos (AEs).	6
Los AEs y el músculo liso de las vías aéreas.	7
• Los AEs y su posible uso clínico.	8
• Las hormonas sexuales femeninas y su influencia en las vías aéreas.	8
Importancia del Asma.	9
Hiperreactividad bronquial.	10
Fisiología del músculo liso de las vías aéreas.	10
Mecanismos de contracción y relajación del músculo liso de vías aéreas.	10
El acople electromecánico: contracción del MLVA inducida por despolarización de la membrana plasmática.	11
El acople Farmacomecánico: contracción del MLVA vía receptores acoplados a proteínas G y generación de IP ₃ .	12
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	14
HIPÓTESIS	14
OBJETIVOS	14
MATERIAL Y MÉTODOS	15

FÁRMACOS	18
ANÁLISIS ESTADÍSTICOS	21
RESULTADOS	22
El Pentolame produce un corrimiento a la izquierda en la repuesta de contracción inducida por la histamina	22
El Pentolame a 32 μ M produce un corrimiento a la izquierda en la contracción inducida por el carbacol.	24
Efecto de potenciación del Pentolame sobre la respuesta de contracción inducida por KCl.	26
El Butolame produce una potenciación sobre la repuesta de contracción inducida por la histamina.	28
El Butolame no presenta efecto sobre la repuesta de contracción inducida por carbacol.	30
El Butolame (32 μ M) produce un corrimiento a la izquierda en la contracción inducida por KCl.	32
El Aminoestrol no potencia la repuesta de contracción inducida por la histamina.	34
El Aminoestrol no tiene efecto sobre la repuesta de contracción inducida por el carbacol.	36
El Aminoestrol 32 μ M desplaza la curva a la izquierda cuando el tejido es contraído por KCl.	38
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	43
BIBLIOGRAFÍA	45

RESUMEN

Investigadores de la Universidad Nacional Autónoma de México, desarrollaron una serie de derivados de estradiol, los cuales se denominaron en forma genérica como 17 β -aminoestrógenos (AEs). El Pentolame, Butolame, difieren de los estrógenos naturales, ya que poseen una modificación en el núcleo esteroideo en la posición del carbono 17, donde un grupo OH es substituido por un grupo amino-alcohol. A su vez también se encuentra el Aminoestrol un AEs que carece de la cadena alquílica o sustituyente en el grupo amino del C-17 en el esteroide. El objetivo de este estudio fue determinar y analizar las características farmacológicas de los AEs en el músculo liso de las vías aéreas (MLVA) de cobayo. En estudios preliminares en órganos aislados de músculo liso traqueal de cobayo se observó que los AEs (Pentolame) eran capaces de producir hiperreactividad del MLVA. En este estudio los AEs, produjeron un corrimiento hacia la izquierda de la curva de concentración respuesta (potencia) a la Histamina (His), al carbacol (Cch) y al KCl, en el siguiente orden: El Pentolame (10 y 32 μ M) a la His y al KCl, solo tuvo efecto a 32 μ M con el CCh. El Butolame (10 y 32 μ M) a la His, 10 μ M con el Cch y (32 μ M) al KCl. El Aminoestrol mostró efecto solamente a 32 μ M con el KCl. No tuvo efecto con la histamina ni con el carbacol. En Conclusión: nuestros resultados sugieren que el Pentolame y Butolame inducen hiperreactividad a la histamina, KCl y al Cch, y el Aminoestrol solo induce hiperreactividad con el KCl. La potencia en la respuesta es proporcional al número de carbonos del grupo amino-alcohol de los AEs. La eficacia del Pentolame, Butolame y Aminoestrol es la misma para la His, Cch y el KCl. En vista de que los AEs han sido propuestos como una alternativa para el tratamiento de Reemplazo hormonal y como anticonceptivos orales, se debe tener cuidado especial de no administrarlos a pacientes con asma ya que podrían agravar sus crisis asmáticas.

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
AO	Anticonceptivos orales
Ach	Acetilcolina
AEs	17 β -aminoestrógenos
Ca ²⁺	Ión calcio
[Ca ²⁺] _i	Concentración de Ca ²⁺ intracelular
Cch	Carbacol
CLM	Cadena ligera de la miosina
DAG	Diacilglicerol
EEM	Error estándar de la media
EPOC	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica
TEV	Enfermedad Tromboembólica venosa
FEV ₁	Volumen espiratorio forzado en 1 segundo
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
IP ₃	Inositol 1,4-5 trisfosfato
H ⁺	Ión Hidrógeno
His	Histamina
K ⁺	Ión Potasio

kDa	Kilodaltones
MLCK	Cinasa de la cadena ligera de la miosina
MLVA	Músculo liso de la vía aérea
MP	Membrana plasmática
Na ⁺	ión Sodio
NCX _{REV}	Intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺ en su forma reversa
PIP ₂	Fosfatidil inositol 4,5 bisfosfato
PLC _β	Fosfolipasa C beta
PKC	Proteína cinasa C
r	coeficiente de correlación
RE	Retículo Endoplásmico
RIP ₃	Receptor de trifosfato de inositol
ROC	Canales operados por el receptor
ROCK	RhoA-Cinasa
RS	Retículo sarcoplásmico
RyR	Receptor de rianodina
SERCA	ATPasa de Ca ²⁺ del retículo sarcoplásmico
SOC	Canal operado por el almacén
TRH	Terapia de remplazo hormonal
VDCC-L	Canales de Ca ²⁺ dependientes de voltaje tipo L

LISTA DE FIGURAS

Figura	Título	Pág.
1	Estructura química de los aminoestrógenos	7
2	Registro original del protocolo experimental de contracción inducida por una curva acumulativa de KCl, cuando es incubado a diferentes concentraciones de un AEs durante 30 min.	16
3	Registro originales del protocolo de contracción inducida por una curva acumulativa de histamina, cuando son incubados previamente durante 30 min con Pentolame a diferentes concentraciones.	17
4	Molécula de histamina.	19
5	Molécula de carbacol.	20
6	Curva concentración-respuesta de histamina en anillos traqueales de cobayo, incubados a diferentes concentraciones de Pentolame.	23
7	Curva concentración-respuesta de carbacol en anillos traqueales de cobayo, incubados a diferentes concentraciones de Pentolame.	25
8	Curva concentración-respuesta de KCl en anillos traqueales de cobayo, incubados a diferentes concentraciones de Pentolame.	27
9	Curva concentración-respuesta de His en anillos traqueales de cobayo, incubados a diferentes concentraciones de Butolame.	29
10	Curva concentración-respuesta de Cch en anillos traqueales de cobayo, incubados a diferentes concentraciones de Butolame.	31

11	Curva concentración-respuesta de KCl en anillos traqueales de cobayo, incubados a diferentes concentraciones de Butolame.	33
12	Curva concentración-respuesta de His en anillos traqueales de cobayo, incubados a diferentes concentraciones de Aminoestrol.	35
13	Curva concentración-respuesta de Cch en anillos traqueales de cobayo, incubados a diferentes concentraciones de Aminoestrol.	37
14	Curva concentración-respuesta de KCl en anillos traqueales de cobayo, incubados a diferentes concentraciones de Aminoestrol.	39

LISTA DE TABLAS

Tabla	Título	Pág.
1	Potencia de histamina con Pentolame	24
2	Potencia de carbacol con Pentolame	26
3	Potencia de KCl con Pentolame	28
4	Potencia de histamina con Butolame	30
5	Potencia de carbacol con Butolame	32
6	Potencia de KCl con Butolame	34
7	Potencia de histamina con Aminoestrol	36
8	Potencia de carbacol con Aminoestrol	38
9	Potencia de KCl con Aminoestrol	40

INTRODUCCIÓN

Los 17 β -aminoestrógenos (AEs)

Las mujeres durante su edad reproductiva tienen una menor incidencia de enfermedades cardiovasculares y tromboembólicas, comparados con hombres de la misma edad, esta diferencia se atribuye al efecto protector de los estrógenos circulantes. Esta protección parece disminuir durante la menopausia o cuando se realiza una extirpación quirúrgica de los ovarios, seguido de un estado de hipoenestrogenismo, induciendo cambios metabólicos en varios tejidos y órganos. Los estrógenos exógenos se utilizan comúnmente en la terapia de reemplazo hormonal (TRH) durante la menopausia y como anticonceptivos orales (AO), existen numerosos estudios que han evaluado los beneficios y riesgos asociados con su uso (55; 61).

La TRH es comúnmente utilizada por mujeres posmenopáusicas, para disminuir los síntomas de la menopausia, pero su uso puede aumentar la probabilidad de la enfermedad tromboembólica venosa (ETV) de 2 a 4 veces (6). Entre los tromboembolismos más comunes que presentan las mujeres son trombosis venosa profunda, embolia pulmonar y accidente cerebrovascular. Este hecho derivó en la búsqueda de compuestos con actividad estrogénica con menores efectos adversos (48).

Un grupo de investigadores de la Universidad Nacional Autónoma de México, desarrollo una serie de derivados de estradiol, los cuales se denominaron en forma genérica como 17 β -aminoestrógenos (AEs). En este contexto, el Pentolame [17 β -(-5-hidroxi-1-butilamino)-1,3,5 (10)estratrien -3-ol] y el Butolame [17 β -(-4-hidroxi-1-butilamino)-1,3,5 (10) estratrien -3-ol] son un grupo de estrógenos que se sintetizan a partir de la estrona (23; 41), difieren de los estrógenos naturales, ya que poseen una modificación en el núcleo esteroideo en la posición del carbono 17, donde un grupo OH es substituido por un grupo amino-alcohol. El Aminoestrol (AE₂, 3-hidroxi-1, 3,5(10)-estrantrieno-17 β -amino) a diferencia de los 17 β -aminoestrógenos

previamente descritos, carece de la cadena alquílica o sustituyente en el grupo amino del C-17 en el esteroide (Figura 1).

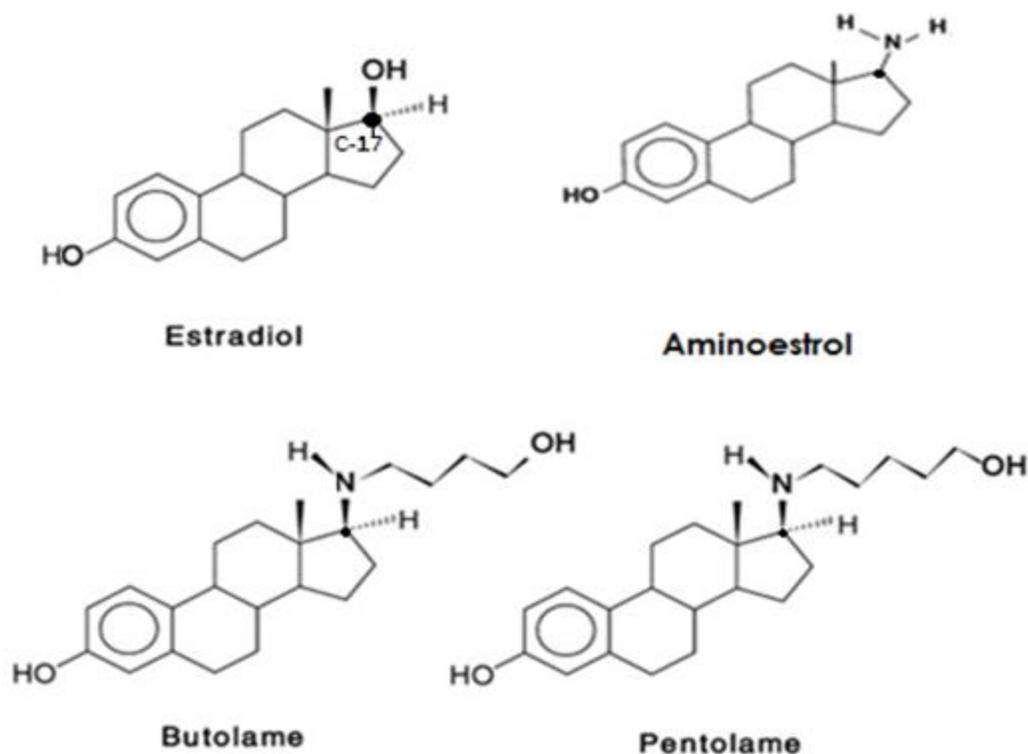


Figura 1. Estructura química de los aminoestrógenos

La administración de dosis altas de AEs en animales de laboratorio han demostrado no ser trombogénicos, por lo que estos agentes se están proponiendo para su uso clínico en la TRH durante la menopausia y como AO en pacientes con predisposición a trombosis.

Los AEs y el músculo liso de las vías aéreas

La realización de esta tesis utilizando AEs en la contracción del músculo liso de las vías aéreas de cobayo se basó en 2 aspectos principales, los cuales a continuación puntualizaré brevemente:

1. Los AEs y su posible uso clínico

En los últimos años va en aumento el interés de los AEs para utilizarse en la clínica como una alternativa en la TRH, ya que muestran una actividad antitrombótica cuando son administrados, lo cual difiere de los estrógenos exógenos utilizados en TRH y anticonceptivos hormonales (43; 32). Sin embargo, en experimentos preliminares realizados en el laboratorio de investigación en asma de la Facultad de Medicina, encontramos que el Pentolame producía hiperreactividad del músculo liso traqueal de cobayo a la histamina. Estos resultados nos invitaron a explorar con mayor profundidad sobre los posibles efectos adversos que podrían tener los AEs en mujeres que reciban estos compuestos para el tratamiento de TRH o como AO y que padezcan enfermedades de vías respiratorias, como el asma y la enfermedad pulmonar obstructiva crónica, (EPOC).

2. Las hormonas sexuales femeninas y su influencia en las vías aéreas

Los AEs difieren únicamente del estradiol al sustituir el grupo hidroxilo del carbono 17, por un grupo amino-alcohol, proporcionándole una serie de nuevas características farmacológicas. Existen numerosos reportes que indican que la prevalencia de varias enfermedades respiratorias (EPOC y Asma) está relacionada con el género, estatus endocrino y la edad.

Estudios recientes han relacionado el asma y sus estados de crisis, con los niveles hormonales presentados durante ciertas etapas de la vida. Durante la infancia la prevalencia del asma es mayor en los niños en comparación con las niñas de la misma edad (≤ 10 años) (7; 11; 21; 38; 53), sin embargo, cuando inicia la pubertad esta situación se invierte, ya que la prevalencia del asma es 50 % mayor en las mujeres que en los hombres en edad reproductiva (12-45 años). Por ello varios grupos han propuesto la importancia de las hormonas femeninas en el asma, cabe mencionar que las mujeres asmáticas presentan más crisis asmáticas graves en comparación con las crisis presentadas por los hombres (2; 6; 7; 34). Conociendo la similitud de los AEs y el estradiol, resulta importante determinar el efecto que tienen estos fármacos en el MLVA.

Importancia del Asma

El asma afecta a 235 millones de personas en el mundo, siendo la enfermedad crónica más frecuentes en niños (OMS 2011). En México aproximadamente el 9% de su población padece asma, teniendo en el país el 5° lugar dentro de las 20 enfermedades no transmisibles, en el 2009 se estimó que hubo 318 689 nuevos casos de asma, se ha calculado a partir de esa fecha que hay un crecimiento anual aproximando de 9.1 % de nuevos casos. Se ha estimado que la incidencia anual de asma en adultos es de 4.6 a 5.9 por 1,000 en mujeres y de 3.6 a 4.4 por 1,000 en hombres (INEGI 2009).

El asma se define como una enfermedad inflamatoria crónica de las vías aéreas en la que participan diversas células y mediadores químicos; se acompaña de una mayor reactividad del músculo liso traqueobronquial (hiperreactividad de las vías aéreas). Esta inflamación provoca en forma recurrente tos, sibilancias, disnea y aumento de la función respiratoria, principalmente en la noche o en la madrugada, estos episodios se asocian generalmente a una obstrucción extensa y variable del flujo aéreo que a menudo es reversible de forma espontánea o como respuesta al tratamiento (*GINA 2006*). Sin embargo, hay otras características en el asma, como el remodelado de la vía aérea (hipertrofia e hiperplasia), engrosamiento de la capa de colágena subepitelial y edema (49), todas estas características también nos llevan a una hiperreactividad bronquial.

El uso rutinario de las pruebas de función respiratoria permitió delimitar la respuesta normal de las vías aéreas, de aquella otra que se presentaba en algunos individuos de manera exagerada ante estímulos específicos e inespecíficos, término denominado **hiperreactividad bronquial**, que es una de las características esenciales de la enfermedad y desde 1962 es determinada como un segundo criterio diagnóstico por definición.

Hiperreactividad bronquial

Es un incremento de la sensibilidad del músculo liso traqueobronquial ante estímulos físicos (aire, frío, etc.) o químicos (agonistas colinérgicos, histaminérgicos, etc.) Esto provoca que el MLVA responda de forma exagerada ante este tipo de estímulos, induciendo un estrechamiento excesivo de la luz aérea y dificultando el paso del aire. Este marcador característico del asma, ha sido extremadamente estudiado, pero los mecanismos involucrados no están bien comprendidos.

Fisiología del músculo liso de las vías aéreas

La función del MLVA es controlar el diámetro de la luz traqueobronquial. Se encuentra innervado por el parasimpático, que forma parte del sistema nervioso autónomo. El principal neurotransmisor parasimpático es la acetilcolina (ACh) y está fuertemente involucrado en la regulación de la contracción del MLVA; las células del MLVA tienen además diversos receptores (M_3 , H_1 , etc.), canales, por ejemplo, canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L (VDCC-L), canales operados por el almacén (SOC) y canales operados por el receptor (ROC), también a su vez participan diferentes ATPasas, como la ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (SERCA), Y la ATPasa de Ca^{2+} de membrana plasmática (PMCA) e intercambiadores de la membrana citoplasmática (NCX), todos ellos están involucrados en la contracción del MLVA (57).

Mecanismo de contracción y relajación del músculo liso de vías aéreas

La actividad contráctil del músculo liso es controlado por neurotransmisores (acetilcolina, sustancia P, ATP, etc.), hormonas (adrenalina, testosterona, estrógenos, etc.), autacoides (histamina, prostaglandinas, tromboxanos, etc.) y otros eventos fisiológicos (osmolaridad, flujo del aire, etc.). Sin embargo, el control de la actividad de contracción varía considerablemente en los diferentes tipos de músculos (esquelético, liso y cardíaco) dependiendo de su función y localización. A pesar de la diversidad en el control de la actividad contráctil, el efecto final es la regulación de $[Ca^{2+}]_i$ y el grado de fosforilación, lo que determina la tensión desarrollada en el músculo liso.

Existen dos mecanismos de acople excitación-contracción del músculo liso de las vías aéreas: el acople electromecánico y el farmacomecánico.

El acople electromecánico: contracción del MLVA inducida por despolarización de la membrana plasmática

Este acople opera a través del cambio en el potencial de membrana (despolarización e hiperpolarización). La despolarización produce la apertura de los canales de Ca^{2+} tipo L dependientes de voltaje (VDCC-L) produciendo un incremento en las $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (50). La hiperpolarización puede causar relajación debido a la reducción en la probabilidad de apertura de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje y a la apertura de los canales de K^+ (63).

La membrana plasmática (MP) del MLVA tiene un potencial de reposo de -60 mV, el cambio en el potencial de membrana- promovido por el movimiento de iones hacia el espacio intracelular (principalmente Na^+) provocan la despolarización, donde el potencial de membrana toma valores menos negativos (más positivo), o en su defecto, la hiperpolarización donde el potencial de membrana tiene valores más negativos (menos positivo), provocada por la entrada de iones Cl^- a la célula y la salida de iones K^+ al espacio extracelular (28).

La participación de los VDCC-L en la contracción del MLVA inducida por despolarización es relevante ya que hasta ahora, se conocen múltiples subtipos de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje. Éstos se han clasificado de acuerdo a su umbral de activación, los que se activan por voltaje bajo y los que se activan por voltaje alto. En el MLVA interesa sobre todo el subtipo L ("Long lasting") que pertenece al grupo de los que se activan por voltaje alto. Los canales de Ca^{2+} son proteínas pentaméricas, de las cuales la subunidad $\alpha 1$ es la más importante y determina el subtipo (19). Los canales pertenecientes a este grupo se caracterizan por ser bloqueados por las dihidropiridinas, como la nifedipina (65).

El acople farmacomecánico: contracción del MLVA vía receptores acoplados a proteínas G y generación de IP₃.

En el MLVA los miocitos tienen una concentración intracelular de Ca ([Ca²⁺]_i) de ~128 nM en estado de reposo; (30; 51) aunque, cuando las células son estimuladas por agonistas broncoconstrictores como la acetilcolina, la serotonina, la histamina, etc., las [Ca²⁺]_i se incrementan ~500-700 nM (10; 51). La unión de estos agonistas con sus receptores membranales acoplados a proteínas G (GPCR) del tipo G_{αq}, promoverá la activación de la fosfolipasa C_β (PLC_β) que hidroliza al fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP₂), presente en pequeñas cantidades en los fosfolípidos de membrana, formando dos importantes mediadores intracelulares: diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trisfosfato (IP₃). El DAG permanece embebido en la membrana plasmática (MP) y ejerce diferentes efectos celulares: puede formar ácido araquidónico o bien activar a la proteína cinasa C (PKC; llamada así por su dependencia al Ca²⁺); ambos procesos activan otras cascadas de señalización (1). Por su parte, el IP₃, que es una molécula soluble en agua, se acopla a los receptores de IP₃ del retículo sarcoplásmico (RS) y promueve la salida de Ca²⁺ (46; 59; 62).

El incremento de la [Ca²⁺]_i promueve la formación del complejo Ca²⁺-calmodulina, la interacción de este complejo con la subunidad catalítica de la cinasa de cadena ligera de miosina (MLCK) permite la fosforilación de la cadena ligera de la miosina en la serina 19 (Ser 19) de la cadena ligera de miosina (CLM) de 20 kDa. La miosina fosforilada cataliza, en presencia de actina, la hidrólisis de adenosina trifosfato (ATP) a adenosina difosfato (ADP) y la liberación de energía subsiguiente posibilita el desplazamiento de los filamentos de actina a lo largo de la miosina, iniciando el proceso de contracción muscular (14; 29; 30; 36). Al mismo tiempo, se activa otra vía de señalización, la RhoA-Cinasa (ROCK), cuya función es inactivar a la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP), encargada de desfosforilar a la CLM, permitiendo el mantenimiento de la contracción. Este proceso es conocido también como sensibilización al Ca²⁺ (63).

La eliminación directa de los agonistas broncoconstrictores (Cch e His), la apertura de canales de K⁺ dependientes de Ca²⁺ y/o el incremento de AMPc y la consecuente

hiperpolarización de la MP, y por otro lado, la recaptura de $[Ca^{2+}]_i$ por medio del retículo sarcoplásmico y la exclusión del $[Ca^{2+}]_i$ por medio de ATPasas de Ca^{2+} de MP, promueven el regreso de $[Ca^{2+}]_i$ a niveles basales, inactivando a ROCK, permitiendo que la MLCP desfosforile a la cadena ligera de la miosina de 20 Kda y el músculo se relaje. (63)

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Estudios preliminares en el laboratorio nos hicieron especular sobre un posible efecto potenciador de los 17β -aminoestrógenos (Pentolame, Butolame, Aminoestrol) en la contracción del músculo liso traqueal de cobayo a diferentes agonistas, lo cual resulta importante explorar, en vista de que los AEs quieren ser utilizados en la clínica como terapia de reemplazo hormonal (TRH) y como anticonceptivos orales (AO). Por lo tanto, este estudio es importante ya que describe por primera vez los efectos biológicos que puedan tener los AEs sobre el MLVA.

HIPOTESIS

Los 17β -aminoestrógenos son capaces de inducir hiperreactividad del músculo liso traqueal de cobayo a diferentes agonistas (Cch e His) y a un agente químico (KCl).

OBJETIVOS

General

- ❖ Evaluar el efecto de los 17β -aminoestrógenos sobre la contracción inducida por Histamina (His), Carbacol (Cch) y KCl en los anillos traqueales de cobayo.

Particulares

- ❖ Comparar el efecto que muestran los AEs sobre las contracción es provocada por Cch (0.01, 0.032, 0.1, 0.32, 1, 10, 32 μ M), His (0.1, 0.32, 1, 10, 32 y 100 μ M).
- ❖ Caracterizar la participación del VDCC-L en la contracción inducida por KCl (10, 20, 40, 80 mM) en un medio incubado con AEs
- ❖ Comparar a cada AEs y su número de carbonos del grupo amino-alcohol con respecto al efecto provocado sobre las contracciones inducidas por Cch, His y KCl

MATERIALES Y MÉTODOS

Sistema de registro para tejido aislado.

Durante la etapa experimental se sacrificaron 60 cobayos machos de 300-400 g de la cepa Hartley, con una sobre dosis de pentobarbital sódico por vía peritoneal, de los que se extrajo la tráquea finamente disecada, limpiando el exceso de tejido conjuntivo y tejido epitelial adyacente, todo este proceso fue realizado en una cámara de disección con solución de Krebs-Ringer en condiciones que aseguraban la integridad de la tráquea. A continuación la tráquea fue seccionada en ocho segmentos cada uno con cuatro anillos de cartílago, colocándose posteriormente en una cámara cada uno, en donde los segmentos traqueales se colgaron a una tensión de 1 g, hasta que fueron totalmente estables después de 30 min, la cámara se mantuvo a una temperatura de 37°C y contenía solución de Krebs-Ringer con la siguiente composición: NaCl 118 mM, NaHCO₃ 25 mM, glucosa 11 mM, KCl 4.6 mM, KH₂PO₄ 1.2 mM, MgSO₄ 1.2 mM, CaCl₂ 2 mM. La solución fue burbujeada con una mezcla de carbógeno (95% O₂ y 5% CO₂) manteniendo un pH estable en intervalos fisiológicos (7.3-7.4). La tensión isométrica fue registrada con un transductor de tensión modelo FT03, (Grass Instruments, West Warwick, RI, USA) conectado a un sistema integrador de señales CyberAmp 380, (Axon Instruments, Foster City, CA, EUA) además de una interfase Digidata 1440A, (Axon Instruments). Para obtener los datos y registros de la contracción del músculo liso traqueal de cobayo se utilizó una computadora con el software AxoScope versión 10.2, (Axon Instruments, Foster City, CA, EUA).

Con el propósito de normalizar las respuestas de los tejidos, éstos se estimularon tres veces con 60 mM de KCl durante 20 min o hasta alcanzar la respuesta máxima de contracción. Posteriormente, se siguió con el protocolo experimental señalado a continuación.

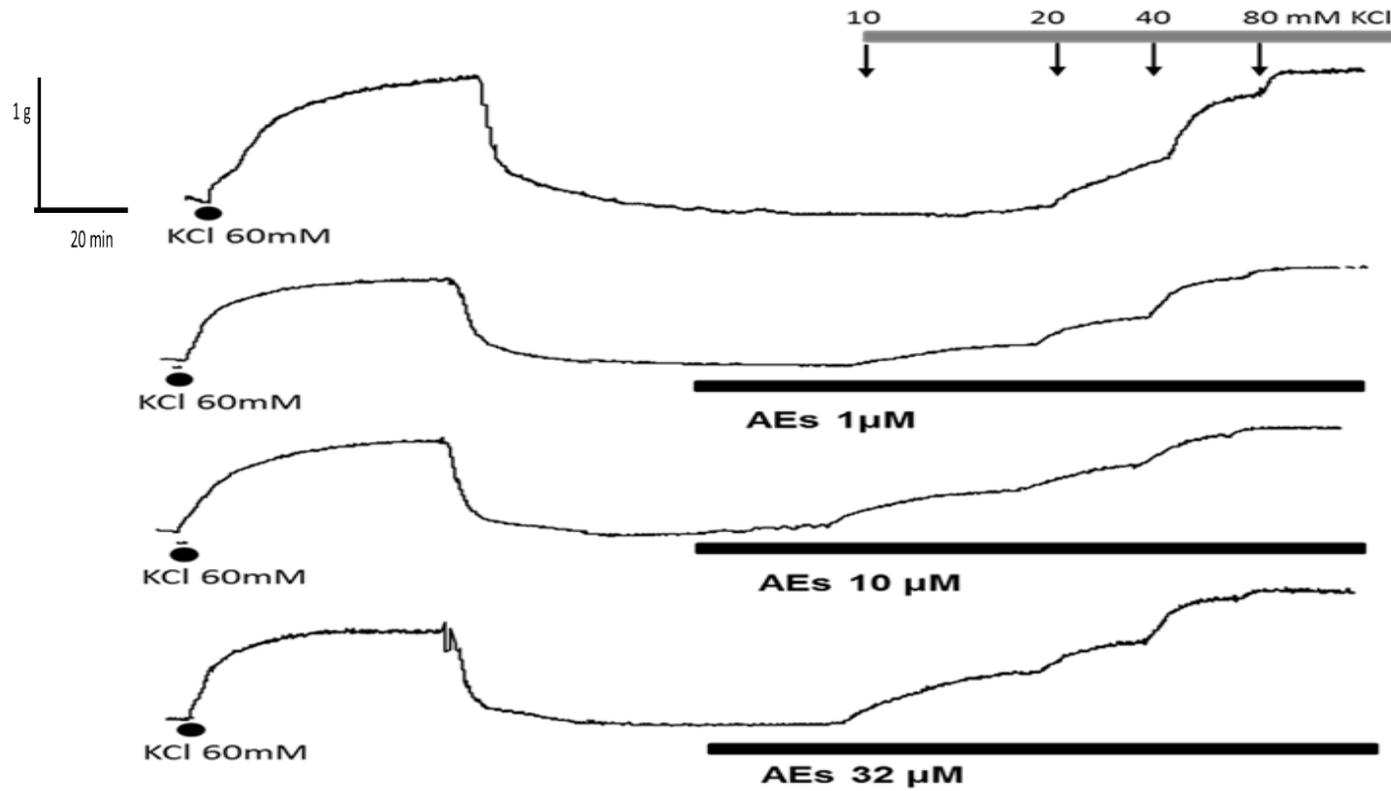


Figura 2. Registro original del protocolo experimental de la contracción inducida por una curva acumulativa de KCl, preincubado por 30 min con diferentes concentraciones de AEs.

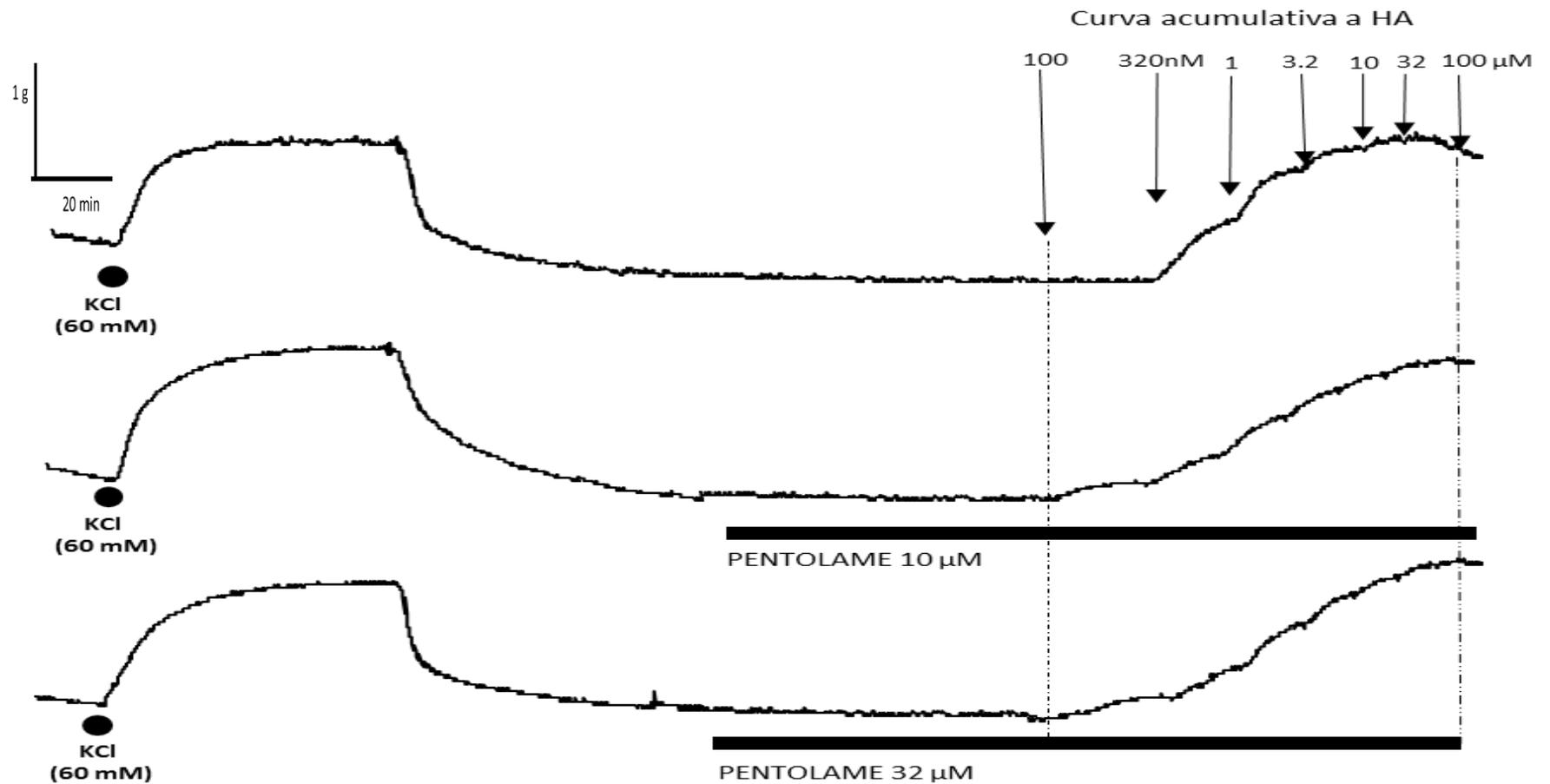


Figura 3. Registros originales del protocolo de la contracción inducida por una curva acumulativa de Histamina, cuando son incubados previamente (30 min) con Pentolame a diferentes concentraciones.

Los tejidos fueron incubados desde el principio con indometacina 1 μM , para inhibir la síntesis de prostaglandinas relajadoras del MLVA. Después del 3^{er} estímulo de KCl, los tejidos fueron incubados durante 30 min con Pentolame (10 y 32 μM), Aminoestrol (1, 10 y 32 μM) y Butolame (1, 10 y 32 μM), se utilizó como control para cada experimento un tejido que carecía de incubación de AEs, la contracción a la tercera respuesta de KCl fue considerada como el 100 % de la respuesta. Después de los 30 min de incubación se realizó la curva concentración-respuesta para carbacol, (0.01, 0.032, 0.1, 0.32, 1, 10, 32 μM), Histamina (0.1, 0.32, 1, 10, 32 y 100 μM) y KCl (10, 20, 40, 80 mM). La CE_{50} definir abreviatura (potencia) representa la concentración del agonista (Cch e His) con el cual se obtuvo el 50 % de la respuesta máxima y refleja la sensibilidad del tejido a este agonista. Para cada experimento se calculó la CE_{50} mediante análisis de regresión lineal simple, empleando los valores de logaritmo de la concentración del agonista (Cch e His), en el caso de KCl solamente se utilizó la concentración en mM, La respuesta máxima (eficacia) expresa los gramos de tensión obtenidos en el punto más alto de la contracción.

FÁRMACOS

Todos los reactivos que se utilizaron fueron obtenidos de Sigma Chem Co (St. Louis MO). Pentolame, Butolame y Aminoestrol fueron donados por el laboratorio de farmacología endocrina (Facultad de medicina. UNAM) y se sintetizaron utilizando el método descrito por Lemini y col (1998, 1993) a partir de estrona (3-hidroxi-1, 3,5(10)-estratieno-17-ona) donada por Syntex de México.

Histamina

La histamina (2-(4-imidazolil) etilamina, se forma en el organismo por la descarboxilación de aminoácido L-histidina, una reacción catalizada por la enzima histidina descarboxilasa, se encuentra en la mayoría de los tejidos, la mayor parte de la histamina tisular se encuentra en forma unida dentro de gránulos en mastocitos (células cebadas) o basófilos y en células de mucosa de vías aéreas. Los mastocitos son especialmente abundantes en enfermedades alérgicas como asma, rinitis y dermatitis. La histamina ejerce sus acciones biológicas uniéndose con receptores celulares específicos localizados en la membrana citoplasmática. Los tres diferentes receptores de la histamina que se han caracterizado hasta la fecha se designan H₁, H₂ y H₃. La histamina es un agonista para la contracción del MLVA por estimulación de los receptores H₁ (3). Estos receptores están acoplados a una proteína G_q, involucrada en la formación de IP₃ (13; 33; 39). En el MLVA de humano y bovino, la histamina produce la formación de IP₃ aunque de menor magnitud con respecto al carbacol (4; 13; 15).

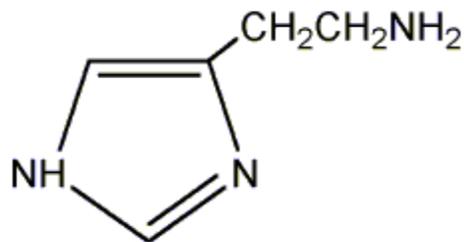


Figura 4. Molécula de histamina

Carbacol

Los nervios colinérgicos son una de las principales inervaciones excitatorias del MLVA. El carbacol es un agonista de los receptores colinérgicos nicotínicos y muscarínicos resistentes a la acción de la acetilcolinesterasa. Los receptores

colinérgicos muscarínicos están divididos en 5 tipos, del M₁ al M₅, de los cuales en el MLVA se han observado el M₂ y el M₃, que están acoplados a proteínas G_o/G_i y G_q respectivamente. La estimulación de los tipos M₁, M₃ y M₅ genera IP₃, movilizándolo Ca²⁺ del RS, mientras que los subtipos M₂ y M₄ inhiben a la adenilato ciclasa disminuyendo al AMPc intracelular y favoreciendo la contracción (22; 60, 64). Adicionalmente, los receptores M₂ producen la apertura de canales catiónicos inespecíficos (64). Estos canales catiónicos permiten la entrada de Ca²⁺ durante la respuesta sostenida y para su activación es necesario el incremento transitorio de la [Ca²⁺]_i que se produce por la liberación del Ca²⁺ del RS por la activación de los receptores M₃ (35; 64).

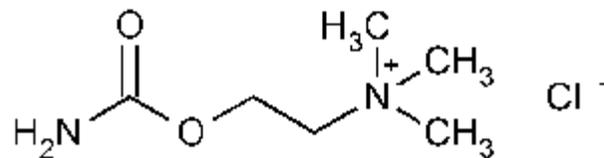


Figura 5. Molécula de carbacol

Cloruro de potasio.

La participación de los VDCC-L en la contracción del MLVA inducida por despolarización ha sido reconocida por la comunidad científica que estudia el MLVA. El cloruro de potasio es un agente utilizado para activar y abrir los VDCC-L, el aumento en la concentración de KCl en el medio extracelular cambia el potencial de membrana de aproximadamente -60 mV a -20 mV (43), despolarizando y abriendo los VDCC-L.

ANÁLISIS ESTADÍSTICOS

La significancia estadística de las diferencias entre los grupos se estimó por análisis de varianza (ANDEVA) de una vía. Las diferencias entre el grupo control y los grupos tratados se estimaron por la prueba de Dunnett. Los resultados se consideraron significativos cuando el valor de p fue menor a 0.05. Todos los experimentos se realizaron por lo menos 5 veces. Los resultados se expresaron como el promedio \pm el error estándar de la media (EEM).

RESULTADOS

1. El Pentolame produce un corrimiento a la izquierda en la repuesta de contracción inducida por la histamina.

La administración de histamina al tejido traqueal produjo una respuesta de contracción que fue dependiente de la concentración utilizada (10^{-7} - 10^{-4} M), (Figura 6 A). La curva concentración-respuesta a la histamina se desplazó a la izquierda (Figura 6 A), se encontraron diferencias significativas en la CE_{50} (Potencia) en 10 y 32 μ M de Pentolame con respecto a su control (Tabla 1). En la respuesta máxima (Eficacia) no hubo diferencias significativas (Figura 6 C).

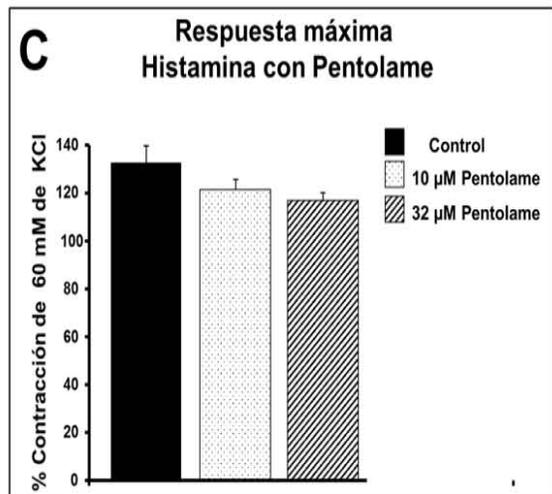
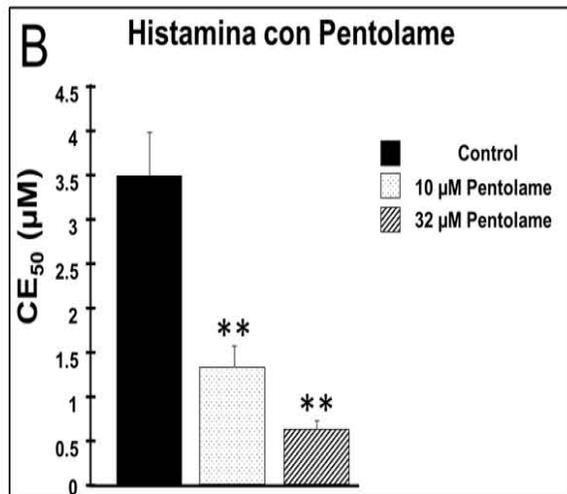
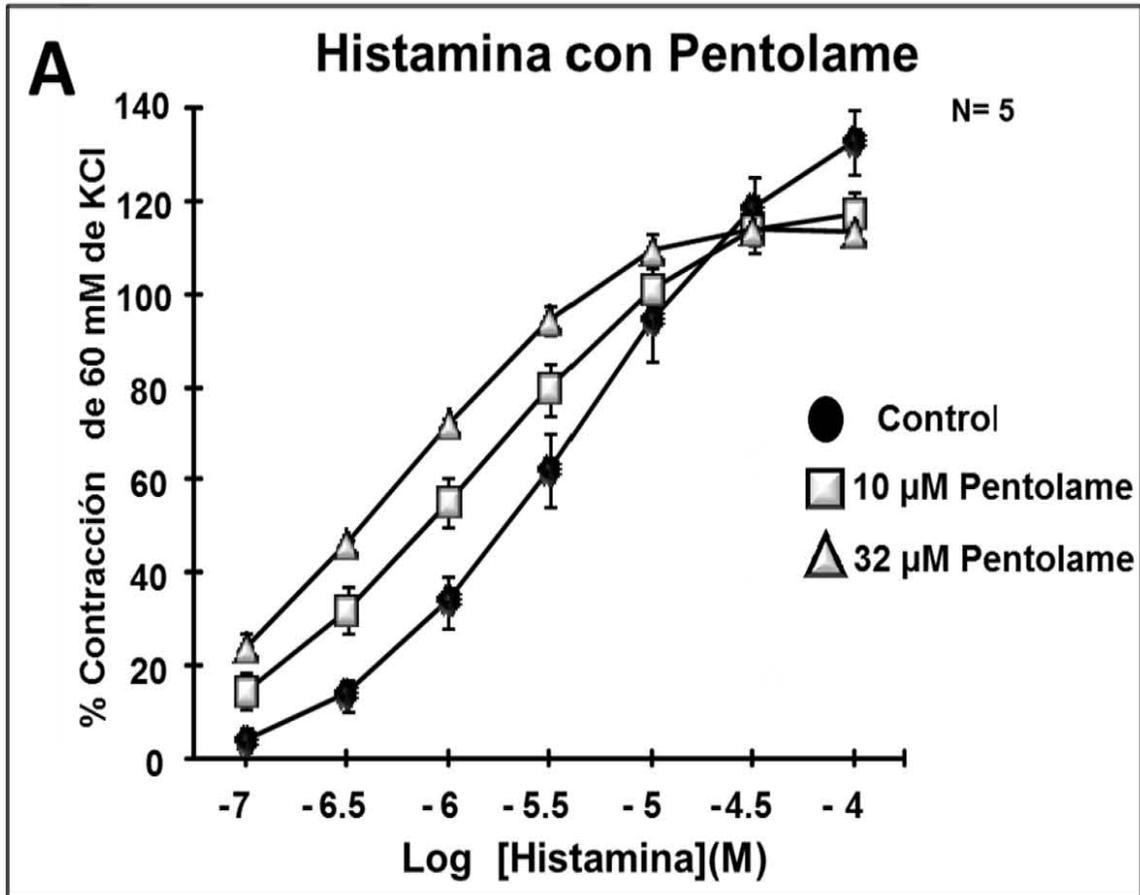


Figura 6. **A)** Curva concentración-respuesta de histamina en anillos traqueales de cobayo, incubados a diferentes concentraciones de Pentolame. **B)** Análisis respectivo de CE₅₀, ** p<0.01 utilizando ANDEVA y prueba de Dunnett. **C)** Análisis de la respuesta de contracción máxima.

Tabla 1. Potencia de histamina con Pentolame(**p<0.01)			
N = 5	Control	Pentolame [10 µM]	Pentolame [32 µM]
CE ₅₀ [µM]	3.4818	1.3193**	0.6180**
EEM	1.0936	0.5469	0.2250
r	0.9877	0.9863	0.9755

Para corroborar el efecto del Pentolame sobre la contracción inducida por un agonista unido a GPCRs (His), se realizó una curva concentración-respuesta con Cch, dicho agonista acoplado a GPCRs tiene una vía de señalización similar a la histamina.

2. El Pentolame a 32 µM produce un corrimiento a la izquierda en la contracción inducida por el carbacol.

La estimulación con carbacol al músculo liso traqueal de cobayo, induce una respuesta de contracción que fue dependiente de la concentración utilizada (10^{-8} - 10^{-5} M). (Figura 7 A). La curva concentración-respuesta al carbacol se desplazó a la izquierda en las preparaciones previamente expuestas a Pentolame 10 y 32 µM (Figura 7 A). Se encontraron diferencias significativas en la Potencia 32 µM de Pentolame con respecto al control (Tabla 2). La Eficacia para ambas concentraciones de Pentolame no mostraron diferencias significativas con respecto al control. (Figura 7 C).

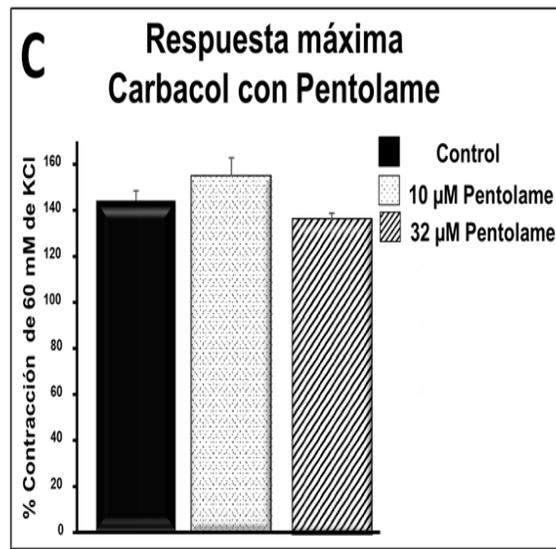
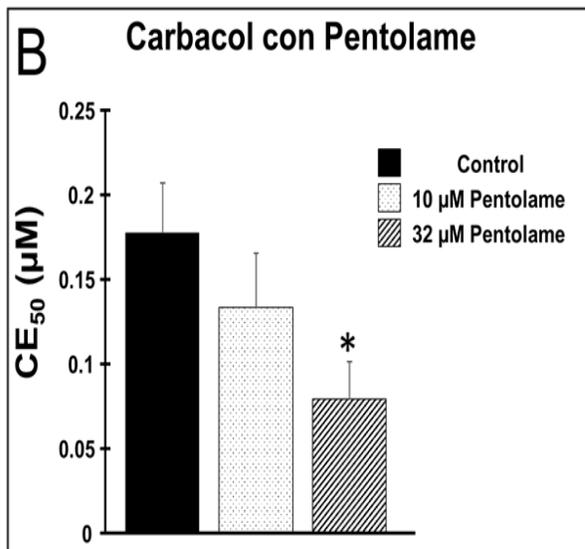
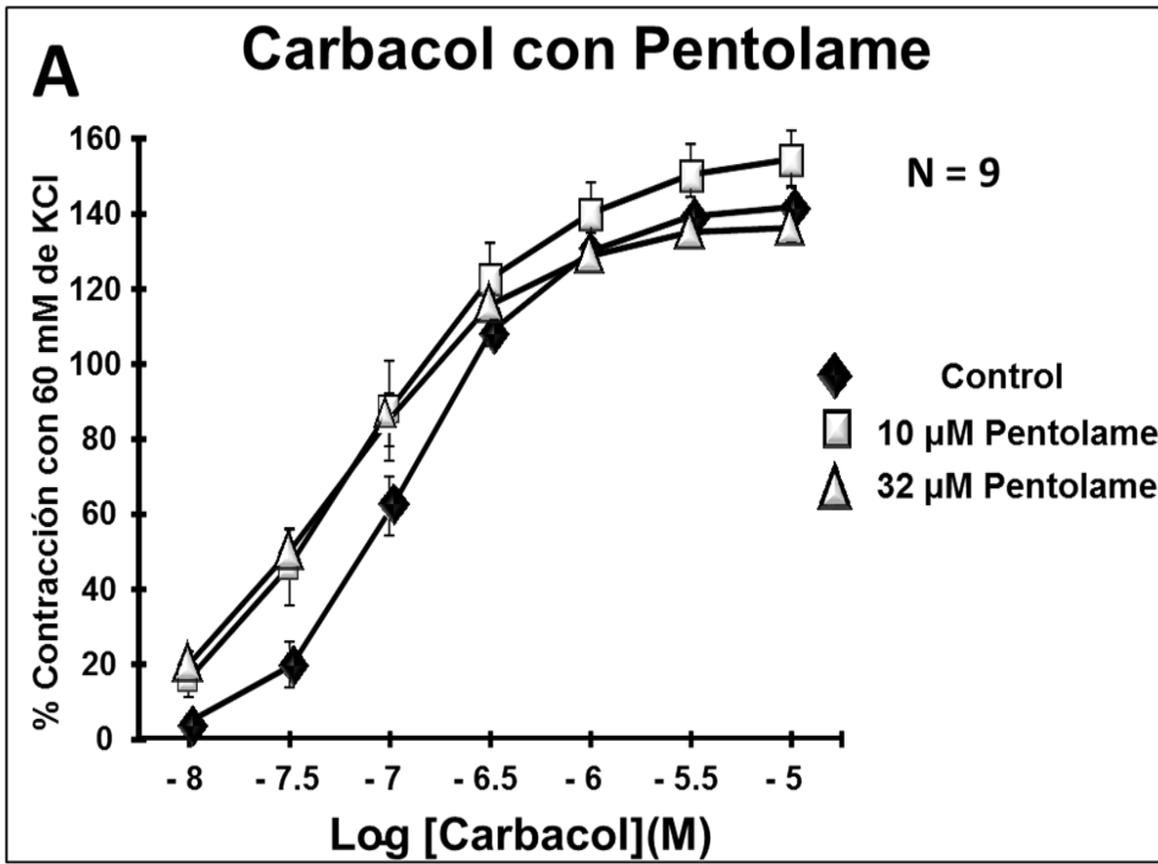


Figura 7. A) Curva Concentración-respuesta a Carbacol en anillos traqueales de cobayo, incubados a diferentes concentraciones de Pentolame. **B)** Análisis respectivo de CE₅₀, *p<0.05 utilizando ANDEVA y prueba de Dunnett. **C)** Análisis de la respuesta de contracción máxima.

Tabla 2. Potencia de carbacol con Pentolame (*p<0.05)			
N = 9	Control	Pentolame [10 µM]	Pentolame [32 µM]
CE₅₀ [µM]	0.1772	0.1332	0.0789*
EEM	0.0894	0.0965	0.0665
R	0.9534	0.9428	0.9439

Con el propósito de explorar el efecto del Pentolame sobre sustancias constrictoras que no dependen de la activación de GPCRs, se realizaron experimentos donde se utilizó KCl a diferentes concentraciones como herramienta para despolarizar al MLVA y producir una contracción dependiente de Ca²⁺ extracelular producido por la apertura del canal de Ca²⁺ dependiente de voltaje (50).

3. Efecto de potenciación del Pentolame sobre la respuesta de contracción inducida por KCl.

La adición de KCl al tejido traqueal produjo una despolarización del MLVA y una subsecuente contracción que fue dependiente de la concentración utilizada (10, 20, 40, 80 mM). (Figura 8 A). La curva concentración-respuesta a KCl se desplazó a la izquierda en las preparaciones previamente expuestas con 10 y 32 µM de Pentolame, mostrando un aumento en la sensibilidad del tejido a este compuesto. (Figura 8 A). Se encontraron diferencias significativas en la potencia a 10 y 32 µM de Pentolame con respecto al control (Tabla 3). Pentolame 1 µM no modificó la respuesta a KCl. Con respecto a la eficacia no hubo diferencias significativas para las 3 concentraciones de Pentolame utilizadas (Figura 8 C).

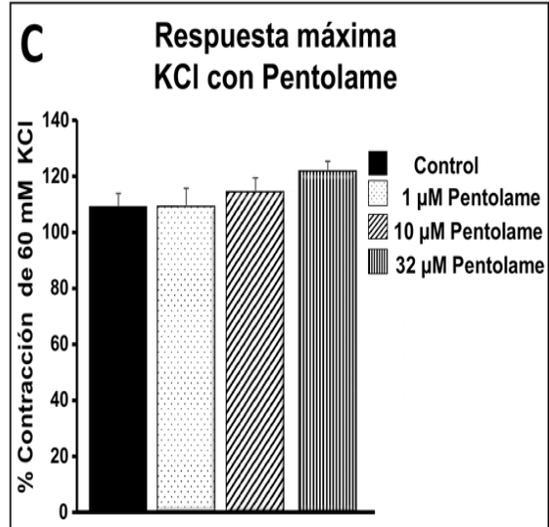
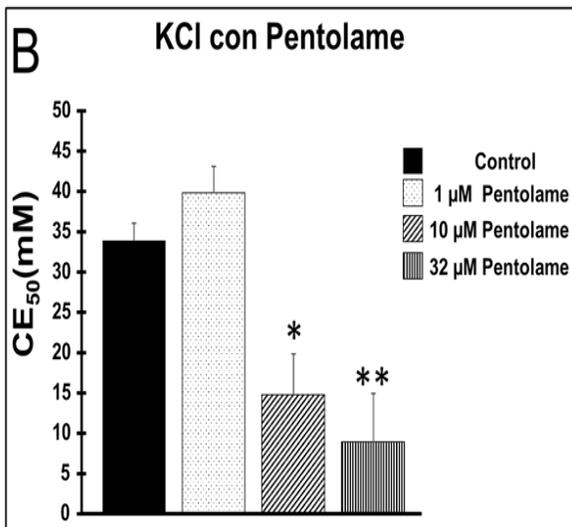
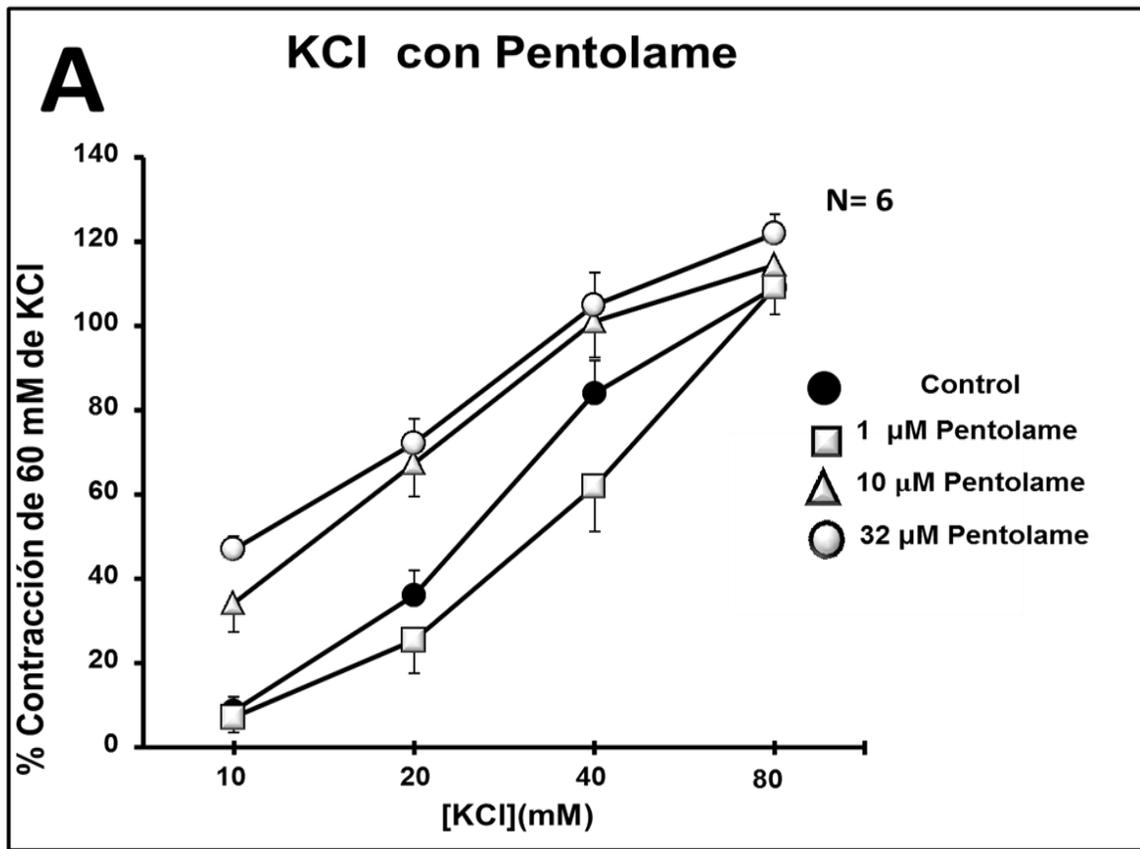


Figura 8. A) Curva Concentración-respuesta a KCl en anillos traqueales de cobayo incubados a diferentes concentraciones de Pentolame. B) Análisis respectivo de CE₅₀, *p<0.05, ** p<0.01 utilizando ANDEVA y prueba de Dunnett. C) Análisis de la respuesta de contracción máxima.

Tabla 3. Potencia de KCl con Pentolame (**p<0.01, *p<0.05)				
N = 6	Control	Pentolame [1 µM]	Pentolame [10 µM]	Pentolame [32 µM]
CE ₅₀ (mM)	33.8711	39.7315	15.8138*	10.9153**
EEM	6.0304	8.7930	12.6203	15.2820
r	0.9311	0.9705	0.8828	0.9044

Nuestros resultados demuestran que el Pentolame produce hiperreactividad del MLVA de cobayo, cuando es estimulado por agonistas que producen contracción como el carbacol y la histamina (GPCRs), así como por KCl (VDCC-L).

Para conocer el grado de eficacia y potencia que mostraban cada tipo de AEs, se repitieron dichos experimentos utilizando diferentes AEs como el Butolame (cuya característica es que tiene un carbono menos que el pentolame) y el Aminoestrol (el cual no tiene carbonos en el grupo amino). Nuestro principal objetivo era determinar la relación estructura química-actividad farmacológica de los AEs.

4.El Butolame produce una potenciación sobre la repuesta de contracción inducida por la histamina

De igual forma que los experimentos de Pentolame primero se realizó una curva concentración-respuesta a His del tejido traqueal, el cual produjo una respuesta de contracción que fue dependiente de la concentración utilizada (10^{-7} - 10^{-4} M). (Figura 9 A). La curva concentración-respuesta a la His se desplazó a la izquierda en las preparaciones previamente expuestas con 10 y 32 µM de Butolame (Figura 9 A), Se encontraron diferencias significativas en la potencia a 10 y 32 µM de Butolame con respecto al control (Tabla 4). 1 µM de Butolame no mostró ningún efecto en nuestras preparaciones (Figura 9 B). En la eficacia no hay diferencias significativas a ninguna concentración del Butolame (Figura 9 C).

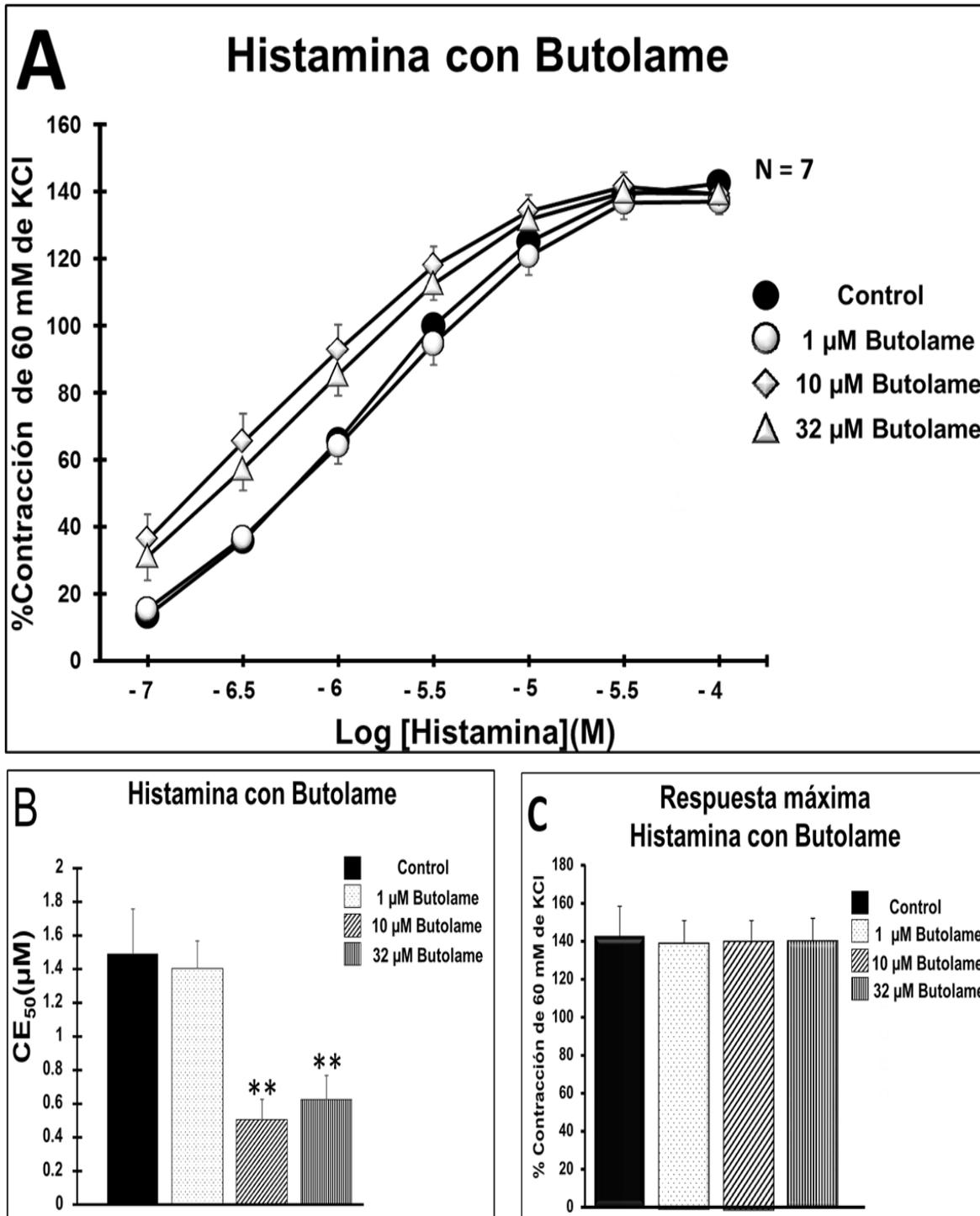


Figura 9. A) Curva concentración-respuesta a histamina en anillos traqueales de cobayo incubados con diferentes concentraciones de Butolame. **B)** Análisis estadístico de CE_{50} , * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ utilizando ANDEVA y prueba de Dunnett. **C)** Análisis de la respuesta de contracción máxima.

Tabla 4. Potencia de histamina con Butolame (**p<0.01)				
N =7	[Control]	Butolame [1 μM]	Butolame [10 μM]	Butolame [32μM]
CE₅₀ (μM)	1.4913	1.4031	0.5030**	0.6217**
EEM	0.7006	0.4367	0.3276	0.3873
r	0.9792	0.9856	0.9722	0.9735

5. El Butolame no presenta efecto sobre la repuesta de contracción inducida por el carbacol.

Se realizó un curva concentración-repuesta de carbacol (10^{-8} - $10^{-4.5}$ M), la cual induce una respuesta de contracción dependiente de la concentración utilizada. (Figura 10 A). La curva concentración-respuesta al carbacol no tuvo diferencias significativas en la potencia, ni en la eficacia, cuando los tejidos fueron incubados con Butolame (1, 10, 32 μM). (Figura 10 B y C).

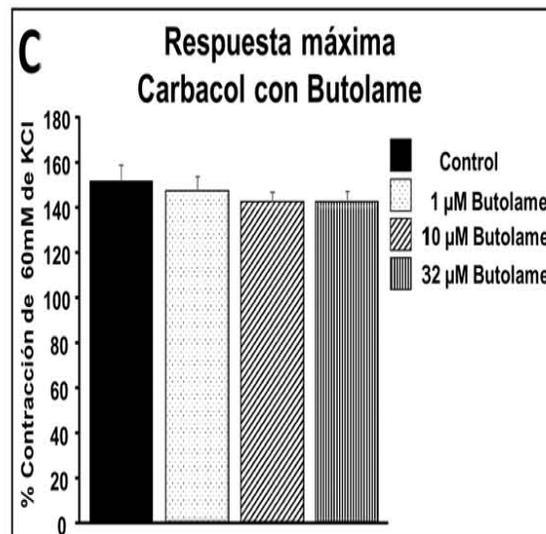
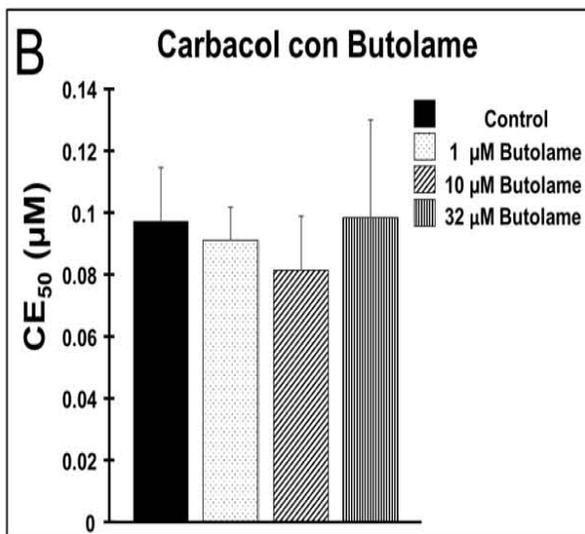
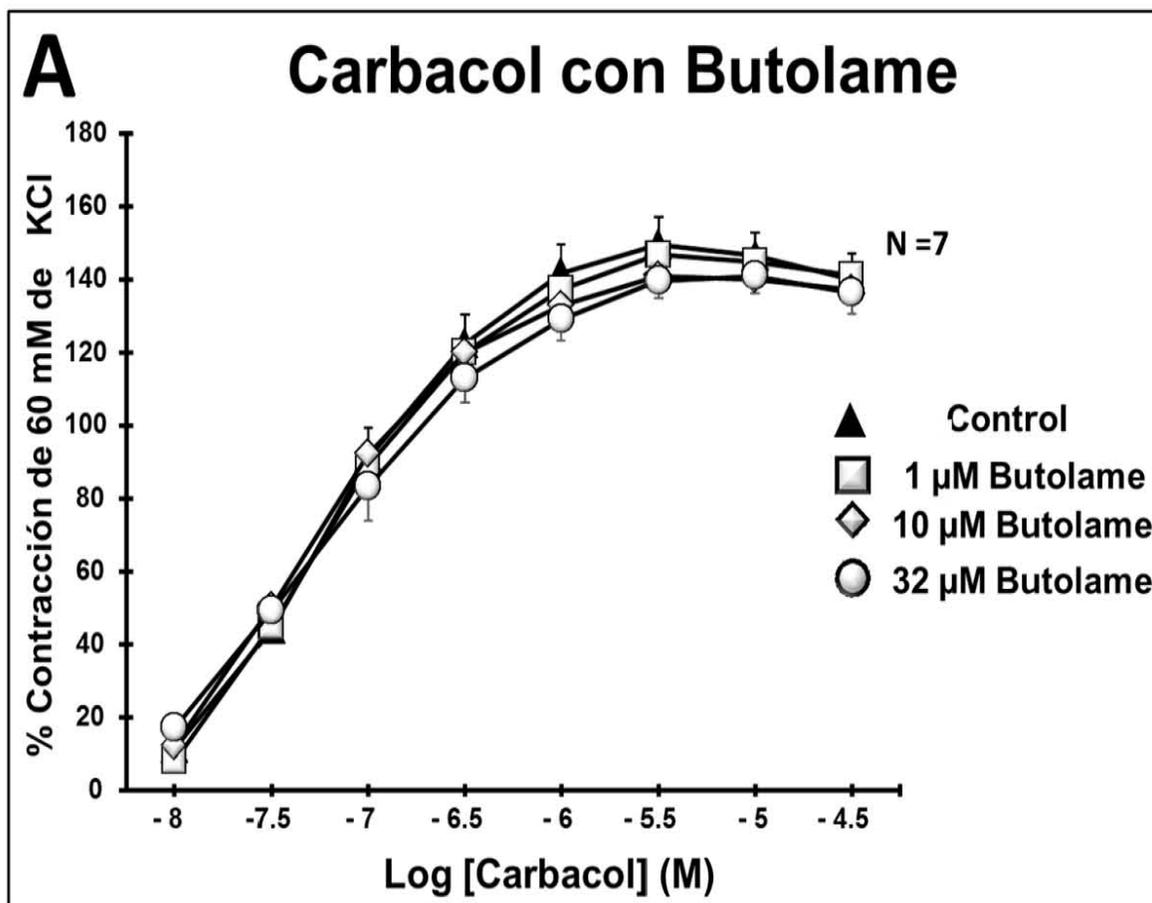


Figura 10. A) Curva concentración-respuesta de Cch en anillos traqueales de cobayo incubados con diferentes concentraciones de Butolame. **B)** Análisis estadístico respectivo de CE_{50} , * $p < 0.05$ utilizando ANDEVA y prueba de Dunnett. **C)** Análisis de la respuesta de contracción máxima.

Tabla 5. Potencia de carbacol con Butolame				
N =7	Control	Butolame [1 μM]	Butolame [10 μM]	Butolame [32μM]
CE₅₀ (μM)	0.0971	0.0910	0.0813	0.098
EEM	0.0046	0.0028	0.0464	0.0839
r	0.9636	0.9686	0.9582	0.9540

6. El Butolame (32 μ M) produce un corrimiento a la izquierda en la contracción inducida por KCl.

La adición de KCl al tejido traqueal produjo una contracción que fue dependiente de la concentración (10, 20, 40, 80 mM). (Figura 11 A). La curva concentración-respuesta a KCl se desplazó a la izquierda cuando fue incubada a 10 y 32 μ M de butolame, mostrando un aumento en la sensibilidad del tejido a este compuesto (Figura 11 A). Se encontraron diferencias significativas en la potencia a 32 μ M de Butolame con respecto al control, Butolame 1 y 10 μ M no tuvieron ninguna diferencia significativa comparados con el control (Tabla 6). La eficacia no mostro ninguna diferencia significativa para las 3 concentraciones de Butolame utilizadas (Figura 9 C).

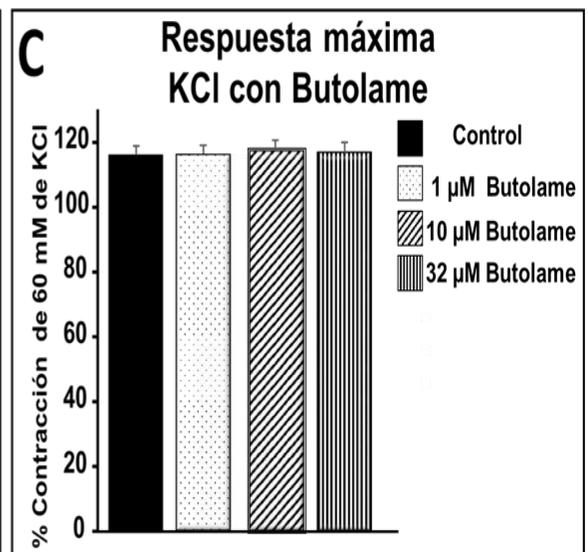
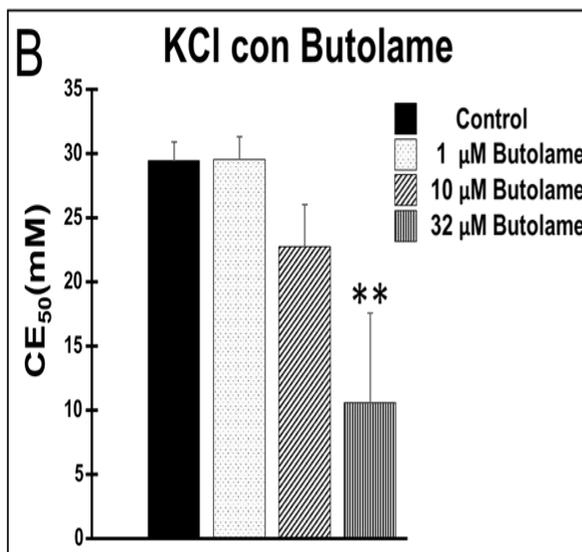
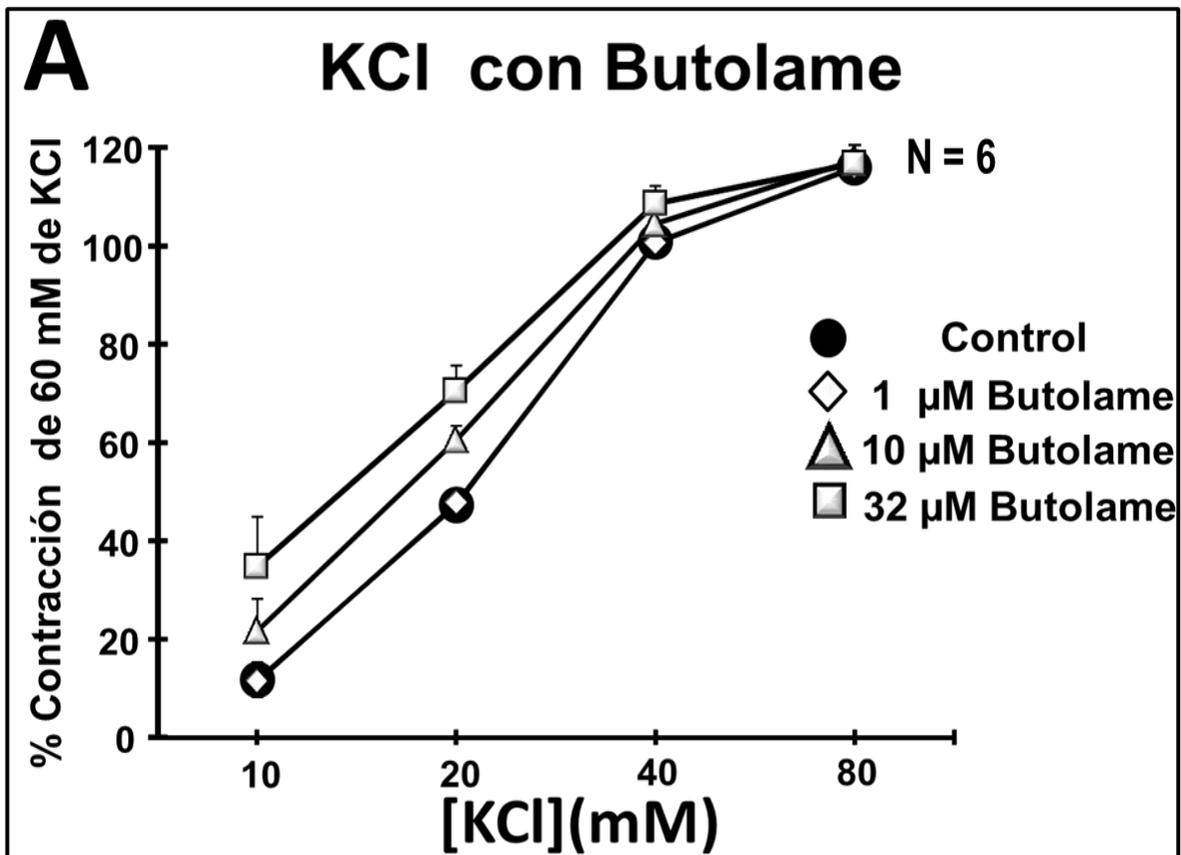


Figura 11. A) Curva Concentración-respuesta de KCl en anillos traqueales de cobayo, incubados a diferentes concentraciones de Butolame. **B)** Análisis respectivo mediante CE_{50} , $**p < 0.01$, utilizando ANDEVA y prueba de Dunnett. **C)** Análisis de la respuesta de Contracción máxima.

Tabla 6. Potencia de KCl con Butolame (*p<0.05)				
N = 6	Control	Butolame [1 µM]	Butolame [10µM]	Butolame [32 µM]
CE ₅₀ (mM)	29.4056	29.5050	22.7373	13.8455*
EEM	1.4807	1.8070	8.0788	12.4201
r	0.8989	0.8996	0.8839	0.8668

Con estos resultados podemos observar que el número de carbonos en la cadena amino-alcohol influye de manera proporcional con respecto al efecto hiperreactor de los AEs en el MLVA, ya que Pentolame mostró mayor potencia hiperreactora que el Butolame.

Ambos compuestos tienen grupo amino y una cadena lateral de carbonos, por lo tanto se realizaron experimentos para determinar cuál grupo funcional podría ser responsable del efecto hiperreactor. Por lo tanto utilizamos al Aminoestrol que solo tiene el grupo amino para ver la relación estructura química-actividad farmacológica.

7. El Aminoestrol no potencia la respuesta de contracción inducida por la histamina.

Las curvas concentración-respuestas, fueron realizadas como anteriormente lo describimos para His en presencia de Pentolame y Butolame.

La curva concentración-respuesta a la His se desplazó a la izquierda en las preparaciones previamente expuestas con todas las concentraciones de Aminoestrol (Figura 12 A). Sin embargo, no se encontraron diferencias significativas a ninguna concentración de Aminoestrol con respecto a su grupo control. (Figura 12 B y Tabla 7). La eficacia no mostraron ninguna diferencia significativa (Figura 12 C).

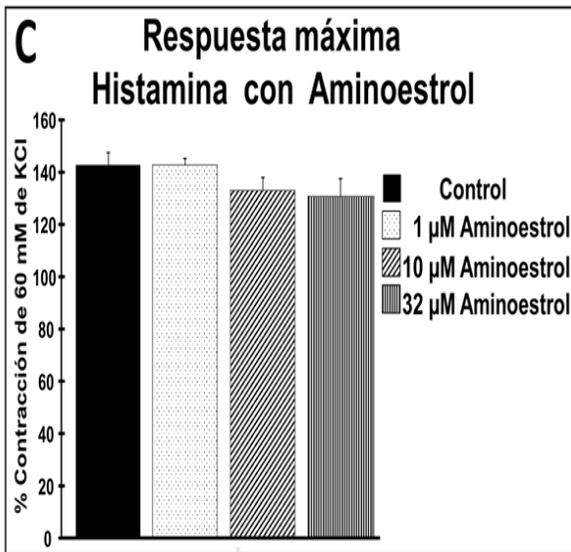
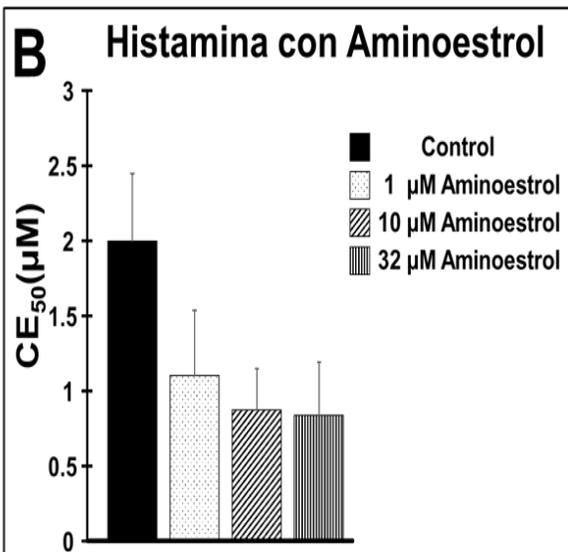
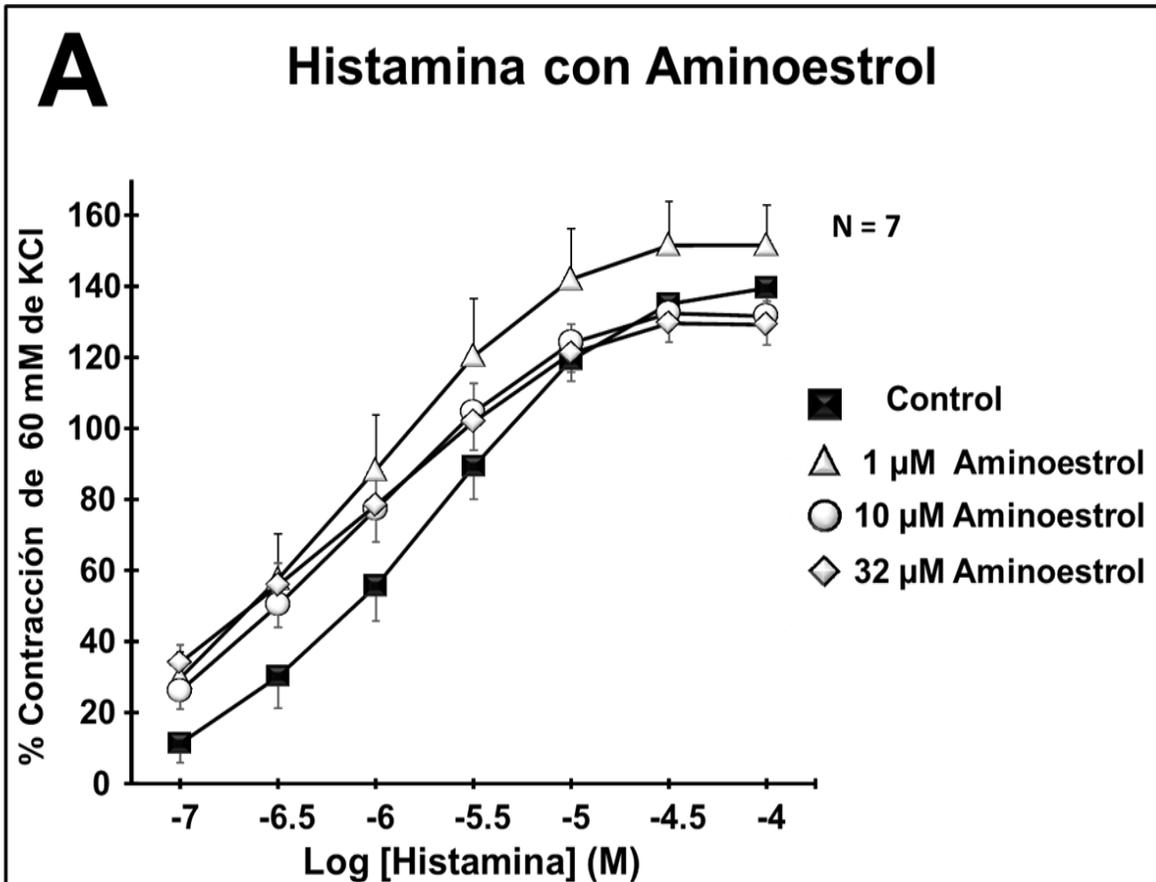


Figura 12. **A)** Curva concentración-respuesta de histamina en anillos traqueales de cobayo, incubados a diferentes concentraciones de Aminoestrol. **B)** Análisis respectivo mediante CE₅₀, * p < 0.05, utilizando ANDEVA y prueba de Dunnett. **C)** Análisis de la respuesta de contracción máxima.

Tabla 7. Potencia de histamina con Aminoestrol				
N =7	Control	Aminoestrol [1 μM]	Aminoestrol [10 μM]	Aminoestrol [32μM]
CE₅₀ (μM)	1.9962	1.0986	0.8715	0.8343
EEM	0.4532	0.4397	0.2783	0.3605
r	0.9775	0.9696	0.9761	0.9863

8. El Aminoestrol no tiene efecto sobre la repuesta de contracción inducida por el carbacol.

De igual forma se realizó una curva concentración-respuesta al carbacol en estos tejidos traqueales, observando que el tamaño de la contracción es dependiente de la concentración (Figura 13 A). En los tejidos incubados con Aminoestrol no se modificó la potencia ni la eficacia con respecto al control cuando fueron estimulados con Cch (tabla 8), estos datos sugiere que el efecto de los AEs lleva una relación con su grupo funcional en el C17. (Figura 13 A), ya que el Butolame muestra una mayor potencia que Aminoestrol.

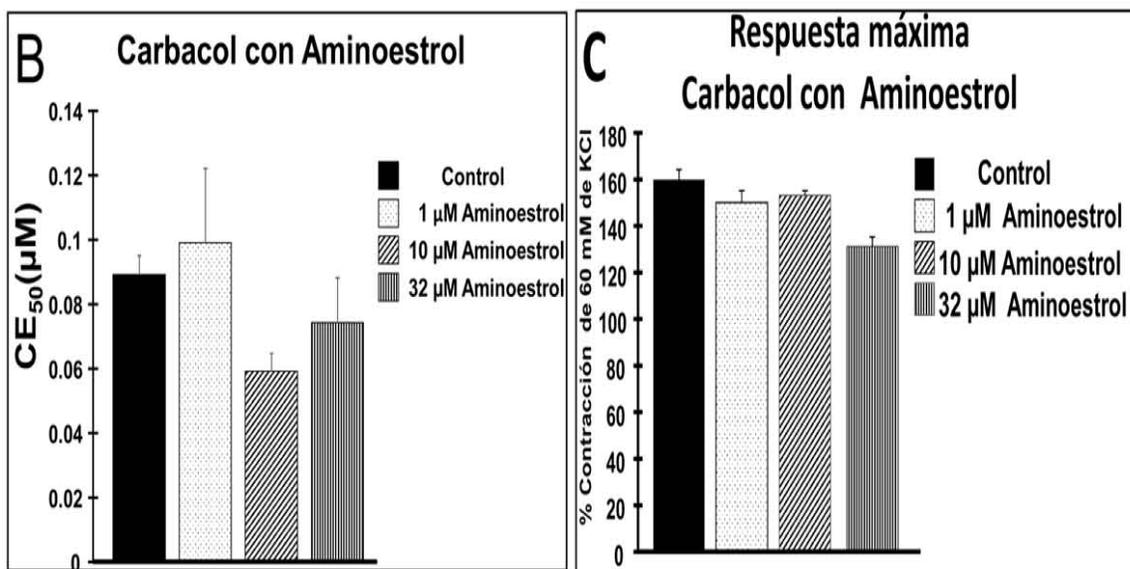
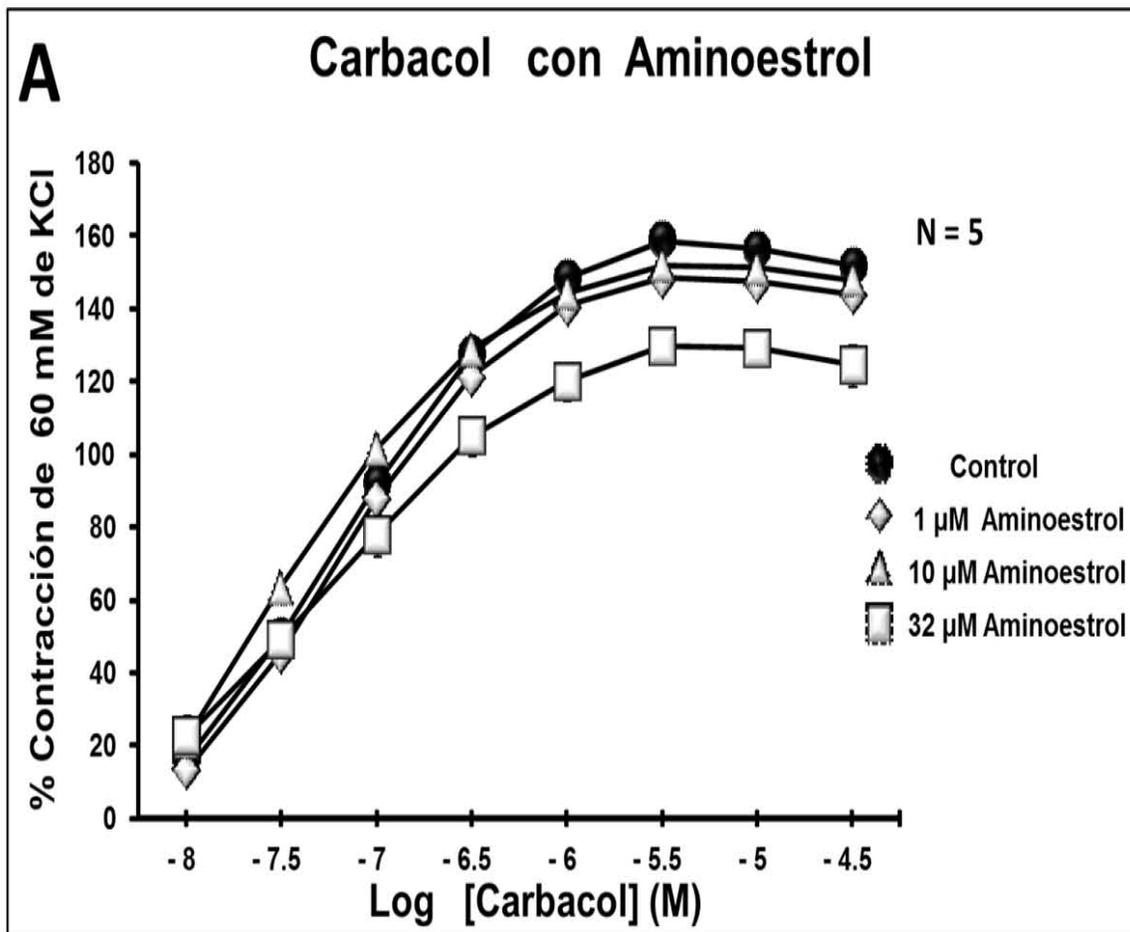


Figura 13. **A)** Curva concentración -respuesta de Carbacol en anillos traqueales de cobayo, incubados a diferentes concentraciones de Aminoestrol. **B)** Análisis respectivo mediante CE_{50} , * $p < 0.05$, utilizando ANDEVA y prueba de Dunnett. **C)** Análisis de la respuesta de contracción máxima.

Tabla 8. Potencia de carbacol con Aminoestrol				
N = 5	Control	Aminoestrol [1 μM]	Aminoestrol [10 μM]	Aminoestrol [32μM]
CE₅₀ (μM)	0.08908	0.0989	0.0590	0.0742
EEM	0.0059	0.0231	0.0057	0.0138
r	0.9746	0.9592	0.9548	0.9634

9. El Aminoestrol 32 μ M desplaza la curva a la izquierda cuando el tejido es contraído por KCl.

El MLVA fue sometido a una curva concentración respuesta con KCl, como anteriormente se ha descrito para los otros AEs (Figura 14 A). La incubación de 1 y 10 μ M de Aminoestrol no modifico la curva concentración respuesta, sin embargo La incubación con 32 μ M de Aminoestrol modificó la CE₅₀, siendo significativa en comparación con el control (Tabla 9). No existen diferencias significativas en la eficacia, en ninguna concentración de Aminoestrol (Figura 14 C).

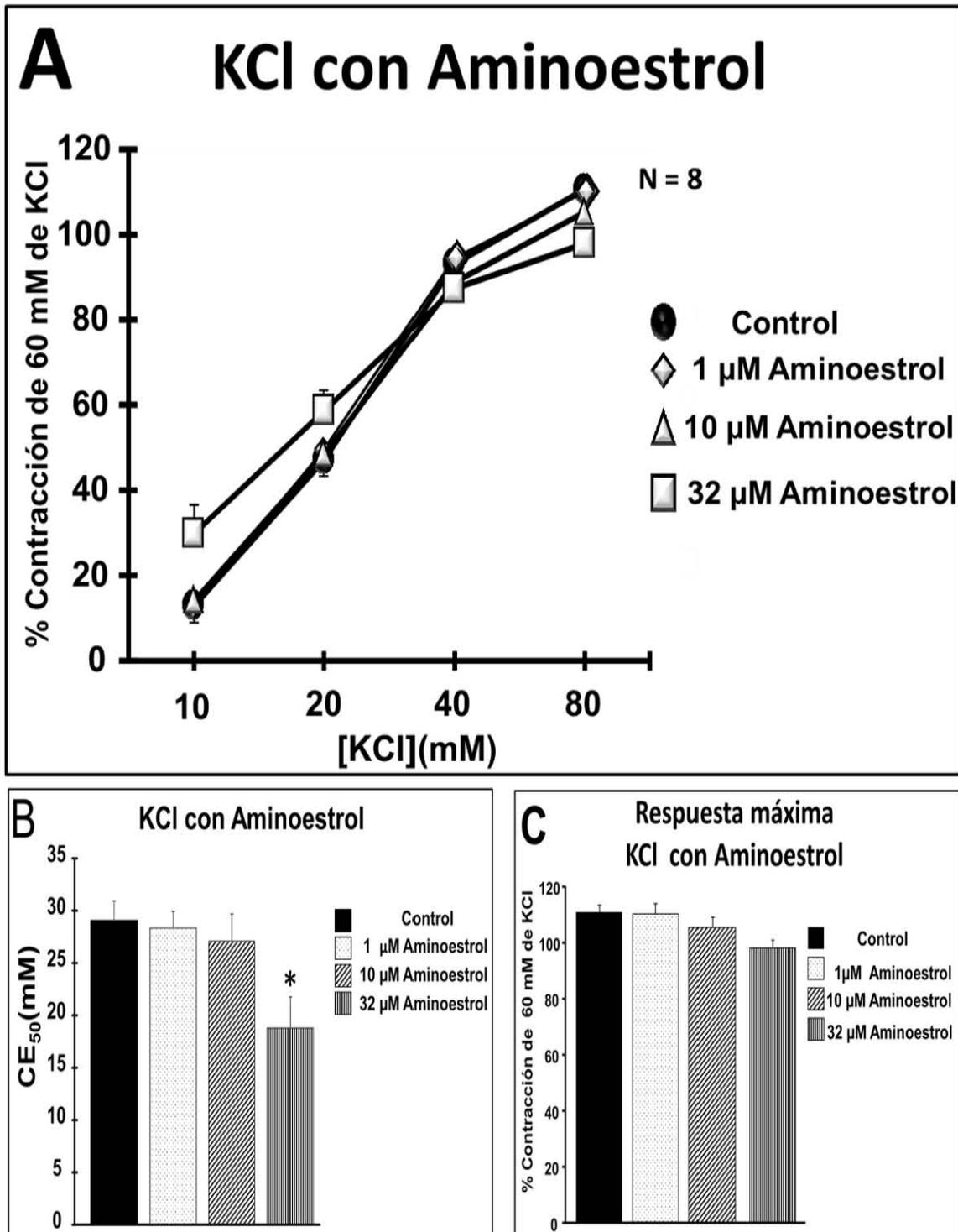


Figura 14. **A)** Curva concentración-respuesta KCl en anillos traqueales de cobayo, incubados a diferentes concentraciones de Aminoestrol. **B)** Análisis respectivo mediante CE₅₀, *p<0.05, utilizando ANDEVA y prueba de Dunnett. **C)** Análisis de la respuesta de contracción máxima.

Tabla 9. Potencia de KCl con Aminoestrol (*p<0.05)				
N = 8	Control	Aminoestrol [1 µM]	Aminoestrol [10µM]	Aminoestrol [32 µM]
CE ₅₀ (mM)	29.0573	28.3281	27.0450	18.7478*
EEM	5.3250	1.6208	2.6626	3.0183
r	0.9084	0.8982	0.9030	0.8830

DISCUSIÓN

Los resultados de la presente tesis muestran que los derivados de estradiol, denominados en forma genérica como 17β-Aminoestrógenos (AEs), Pentolame, Butolame tienen la capacidad de inducir un efecto hiperreactor sobre las contracciones generadas por histamina, Carbacol y KCl en diferentes magnitudes en preparaciones traqueales de cobayo. En el caso del Aminoestrol este fenómeno fue mínimo y solo se observó para el KCl.

Es bien conocido que existen diversos mediadores químicos endógenos capaces de producir hiperreactividad de las vías aéreas, como por ejemplo, los Cisteinil-Leucotrienos, el Factor de Necrosis Tumoral, TXA₂, PGD₂ y el ATP (10; 52). Hasta la fecha se desconoce si los estrógenos o derivados sintéticos producen este fenómeno.

En este trabajo, por primera vez se reporta la capacidad de los AEs para producir hiperreactividad en el músculo liso traqueal de cobayo a diferentes agonistas. Este hallazgo es importante, ya que estos AEs han sido propuestos para su uso clínico en mujeres con terapia de reemplazo hormonal (TRH) después de la menopausia, como anticonceptivos orales y como ansiolíticos (AO) (32; 40). En vista de que podrían ser administrados a pacientes con asma o enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), se debería tener cuidado en su aplicación debido a probables efectos adversos de consecuencia grave o fatal (hiperreactividad bronquial y broncoespasmo severo).

Relación estructura química- actividad farmacológica de los AEs

Diversos autores han concluido que la relación entre la estructura de los AEs y sus efectos a nivel de receptores de estrógeno son inversamente proporcional al número de carbonos del grupo amino-alcohol en el C17 (32). Basado en esta información, exploramos si esta misma relación existía en la hiperreactividad del MLVA de cobayo inducida por los AEs, por ello decidimos emplear el Pentolame, el cual posee 5 carbonos en su grupo amino-alcohol, posteriormente usamos el Butolame, con 4 carbonos en su grupo amino-alcohol y por último utilizamos el Aminoestrol, cuya característica es que carece de cadena de carbonos. A continuación discutiremos punto por punto cada una de estas características.

La Potencia de la hiperreactividad del MLVA a diferentes agonistas, es dependiente al número de carbonos del grupo amino-alcohol en el C17.

En este estudio *in vitro* realizado en el presente trabajo se encontró que el Pentolame es el AEs más potente comparado con el Butolame y el Aminoestrol, ya que muestra mayor potencia con la Hist, Cch y al KCl (Detallado en cada una de las tablas). Con ello se determina que el número de carbonos en el grupo amino-alcohol del C17 del AEs es proporcional a la potencia cuando el MLVA es contracturado con diferentes agonistas y KCl.

Los datos obtenidos comprueban que los AEs potencian la contracción del MLVA a diferentes agonistas, esto se conoce como hiperreactividad (55). La hiperreactividad inducida por los AEs se observa más cuando los tejidos son contracturados con histamina y KCl; por el contrario, cuando se utiliza Cch solo se ve el fenómeno con pentolame y a la concentración más alta.

El hecho que los AEs producen mayor hiperreactividad a la histamina y al KCl en comparación con Cch, nos hace pensar que estas diferencias se deban a que los mecanismos inducidos por estos agonistas para producir contracción son distintos. El inicio de la contracción del músculo liso traqueobronquial depende del incremento de Ca^{2+} citosólico. Los mecanismos responsables de incrementar las $[Ca^{2+}]_i$ son variables

y dependen del estímulo aplicado. En el caso de los agonistas **colinérgicos**, que son los más estudiados, presentan una vía de señalización a través de la estimulación de los receptores muscarínicos (M_3) y que involucra varias etapas que se describen a continuación: **a)** La estimulación de los receptores M_3 produce la formación de IP_3 que a su vez produce la liberación de Ca^{2+} del RS por la unión del IP_3 con su receptor canal. (4; 50). **b)** Entrada de Ca^{2+} extracelular al espacio intracelular es a través de SOC, ROC, Intercambiador Na^+/Ca^{2+} en su forma reversa (NCX_{REV}) y en menor porción el CCDV-L, siendo estos mecanismos los principales responsables del aumento del $[Ca^{2+}]_i$ (25; 28). Por otro lado, los agonistas **histaminérgicos** también liberan Ca^{2+} del RS por la vía del IP_3 , pero se ha propuesto que el incremento de las $[Ca^{2+}]_i$ depende principalmente de la entrada de Ca^{2+} extracelular principalmente a través de CCDV-L. Además es conocido que la respuesta muscarínica a diferencia de la histaminérgica, depende fuertemente de la producción de IP_3 y la subsecuente liberación de Ca^{2+} del RS. (24; 50) Recientemente encontramos que la participación de los CCDV-L en la respuesta de contracción al Cch es mínima (25), mientras que la tensión desarrollada por la histamina depende principalmente de Ca^{2+} extracelular (37).

Ya que las respuestas por His y Cch son a través de la activación de GPCR y en base a la diferencia en la hiperreactividad que mostraron a los AEs, investigamos si los AEs modificaban la respuesta de contracción a KCl, debido a que esta contracción es generada por la despolarización de la membrana y la apertura del CCDV-L, permitiendo el incremento de Ca^{2+} citosólico e iniciando la contracción (28). Nuestros datos muestran que también existe una hiperreactividad del MLVA al KCl cuando es tratado con estos AEs lo que explicaría porque estos compuestos tienen mayor efecto con la histamina.

Hasta el momento se desconocen los mecanismos por los cuales los AEs producen hiperreactividad a los diferentes agonistas estudiados en este trabajo y sería importante explóralos a futuro. Por ejemplo, el TNF α induce hiperreactividad a la acetilcolina en el MLVA de humano a través de la producción de CD38/cADP ribosa, mediador endógeno que activa al receptor de Rianodina, el cual permite que se libere más Ca^{2+} al medio citosólico (17). También es conocido que el LTD_4 , induce hiperreactividad a la

histamina en MLVA de bovino a través de la activación de las cinasa de tirosina, probablemente vía la activación de MAPK ERK $\frac{1}{2}$ (10). Por lo tanto, creemos importante y necesario estudiar los mecanismos de este fenómeno y no descartamos que pueda ser multifactorial.

Relación entre el Estradiol y AEs.

Los AEs difieren únicamente del estradiol al sustituir el grupo hidroxilo del carbono 17, por un grupo amino-alcohol y existen reportes que relacionan al estradiol con la prevalencia de varias enfermedades respiratorias (EPOC, Asma), nosotros utilizamos estradiol con la misma metodología que se realizó para los AEs, (DATOS NO MOSTRADOS) Los resultados obtenidos muestran que a concentraciones menores a 10 μ M produce hiperreactividad solo a la histamina, mientras que concentraciones mayores a 32 μ M disminuye la contracción a His, KCl y Cch. Estos datos son realmente interesantes ya que no existe en la actualidad estudios que muestre al estradiol como una hormona capaz de producir hiperreactividad en el MLVA, sino que al contrario se le vincula a nivel experimental con una actividad farmacológica de relajación (20). Estos datos nos hacen pensar que la hiperreactividad mostrada por el MLVA durante la incubación de AEs cuando es estimulada por agonistas que promueven la contracción podría estar relacionada con el núcleo esteroideo. Con base en estos resultados resulta importante explorar el papel de esta hormona en el MLVA.

Finalmente, la utilización de los AEs puede ser potencialmente peligrosos si son utilizadas en personas con predisposición a padecer Asma, EPOC o cualquier enfermedad involucrada con procesos inflamatorios de las vías aéreas.

En **Conclusión:** Nuestros resultados sugieren que el Pentolame induce hiperreactividad a la histamina, KCl y al Cch, mientras que el Butolame solo lo hace para la histamina y el KCl. El aminoestrol solamente provoca hiperreactividad para el KCl. La potencia en la respuesta es proporcional al número de carbonos del grupo amino-alcohol de los AEs. La eficacia es la misma para cada agonista.

Perspectivas:

1. Explorar mediante patch clamp en las células musculares lisas el efecto de pentolame en las corrientes entrantes de Ca^{2+} dependientes de VDCC-L.
2. Utilizar antagonistas (atropina, Indometacina, etc) para ver los mecanismos por los cuales los AEs inducen hiperreactividad
3. Estudiar a fondo el papel del estradiol en el MLVA.

Bibliografía

1. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P, Wilson J y Hunt T. (2008). *Molecular Biology of the Cell*. 5a edición. *Garland Science*: New York. Pp. 904-920, 1010-1052.
2. Almqvist C, Worm M, Leynaert B. (2008). Impact of gender on asthma in childhood and adolescence. *Allergy*, 63:47-57.
3. Barnes PJ. (1998). Pharmacology of airway smooth muscle. *Am J Respir Crit Care Med* 158:s123-132.
4. Bazan-Perkis B, Carbajal V, Sommer B, Macias-Silva M, González M, Valenzuela F. and L.M Montaño. (1998). Involvement of different Ca^{2+} pools during the canine bronchial sustained contraction in Ca^{2+} -free médium: lack of effect of PKC inhibition. *Naunyn Schm Arch Pharmacol* 358(5): 567-573.
5. Becklake MR and Kauffmann F. (1999). Gender differences in airway behaviour over the human life span. *Thorax*. 54:1119-1138.
6. Breckwoldt M, Keck C, Karck U. (1995). Benefits and risks of hormone replacement therapy (HRT). *J Steroid Biochem Molec Biol*. 53:205-208.
7. Bonner JR. (1984). The epidemiology and natural history of asthma. 5:557-65.
8. Böttiger LE, Boman T, Eklund G, Westerholm B. (1980). Oral contraceptives and thromboembolic disease: effects of lowering oestrogen content. *Lancet*, 1097-101.
9. Carbajal V. (1998). Contracción bronquial sostenida en un medio sin calcio: participación del trifosfato de inositol. Tesis de Maestría en Ciencias biomédicas. UNAM.
10. Carbajal V, Vargas MH, Flores-Soto E, Martínez-Cordero E, Bazán-Perkins B, Montaño LM. (2005). LTD₄ induces hyperresponsiveness to histamine in bovine airway smooth muscle: role of SR-ATPase Ca^{2+} pump and tyrosine kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 288:L84-92.
11. Carey MA, Card JW, Voltz JW, Arbes SJ Jr, Germolec DR, Korach KS, Zeldin DC. (2007). It's all about sex: gender, lung development and lung disease. *Trends Endocrinol Metab*, 18:308-313.

12. Catterall WA. (2000). Structure and regulation of voltage-gated Ca^{2+} channels. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 16:521–555.
13. Challis R.A, Adams D, Mistry R., Boyle J P. (1993). Second messenger and ionic modulation of agonist-stimulated phosphoinositide turnover in airway smooth muscle. *Biochem Soc Trans.* 21: 1138-1145.
14. Cobar L, Montañó LM, Cruz JE, Flores E. (2010). Importancia del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en la regulación del Ca^{2+} intracelular en el músculo liso de las vías aéreas. *Neumol Cir Torax.* 69 (1): 39-45.
15. Daykin K, Widdop S, Hall IP. (1993). Control of histamine induced inositol phospholipid hydrolysis in cultured human tracheal smooth muscle cells. *European J Pharmacol.* 240: 135-140.

16. De la Peña A, Baños G, Izaguirre R, Mandoki JJ, Fernández JM. (1993). Comparative effect of synthetic aminoestrogens with estradiol on platelet aggregation. *Steroids* 58:407-409.
17. Desphande DA, Walseth TF, Panettieri RA, kannan MS. (2003). CD38/cyclic ADP-ribose-mediated Ca^{2+} signaling contributes to airway smooth muscle hyper-responsiveness. *FASEB J* 17: 452-454,
18. D MacMillan and JG McCarron. (2010). The phospholipase C inhibitor U-73122 inhibits Ca^{2+} release from the intracellular sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} store by inhibiting Ca^{2+} pumps in smooth muscle. *British Journal of Pharmacology.* 160:1295–1301.
19. Du W, McMahon TJ, Zhang Zs, Stiber J, Meissner G y Eu JP. (2006). Excitation-contraction coupling in airway smooth muscle. *J Biol Chem.* 281 (40): 30143-30151.
20. Elizabeth A. Townsend, Lucas W. Meuchel, Michael A. Thompson, Christina M. Pabelick, and Y. S. Prakash. (2011). Estrogen Increases nitric-oxide production in human bronchial Epithelium. *J Pharmacol Exp Ther.* 339:815–824

21. Fagan J, Galea S, Ahern J, Bonner S y Vlahov D. (2001). Relationship of Self-Reported Asthma Severity and Urgent Health Care Utilization to Psychological Sequelae of the September 11, 2001 Terrorist Attacks on the World Trade Center Among New York City Area Residents. *Psychosom Med*, 65, 993-996.
22. Felder CC. (1995). Muscarinic acetylcholine receptors: Signal transduction through multiple effectors. *FASEB J* 8: 619-625.
23. Fernández JM, Rubio-Arroyo MF, soriano-Garcta M, Toscano RA, Pérez-César MC. (1985). Synthesis and molecular structure of prolame, N-(3-hydroxy-1,3,5(10)estratrien-17 β -yl)-3-hydroxypropylamine, an aminoestrogen with prolonged anticoagulant and brief estrogenic effects. *Steroids* 45(2):151-157.
24. Fleischmann BK, Wang YK, Kotlikoff MI. (1997). Muscarinic activation and calcium permeation of nonselective cation currents in airway myocytes. *Am J Physiol*. 272: C341-C349.
25. Flores-Soto E, Reyes-García J, Sommer B, Montaña LM. (2013). Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ refilling is determined by L-type Ca(2+) and store operated Ca²⁺ channels in guinea pig airway smooth muscle. *Eur J Pharmacol*. 5;721(1-3)
26. Gruchow HW, Anderson AJ, Barboriak JJ, Sobocinski KA. (1980). Postmenopausal use of estrogen and occlusion of coronary arteries. *Am Heart J*: 954-63.
27. Han G, Li F, Yu X. (2013). GPER: a novel target for non-genomic estrogen action in the cardiovascular system. *Pharmacol Res*. 71:53-60.
28. Hirota S, Helli P y Janssen LJ, (2007). Ionic mechanisms and Ca²⁺ handling in airway smooth muscle. *Eur Respir J*. 30(1): 114-133.
29. Hockerman G, Girvin ME, Malbon CC, Ruoho AE. (1996). Antagonist conformations within the β_2 -adrenergic receptor ligand binding pocket. *Mol. Pharmacol*. 49 (6): 1021–1032.
30. Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG. . Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol. Rev*. 76: 967-1003.

31. Jaimez R, Rubio-Póo C, Lemini C. (2001). Effects on blood clotting time of 17 beta-estradiol and 17 beta-aminoestrogens in rats and mice. *Proc West Pharmacol Soc.* 163-166.
32. Jaimez R, Cooney A , Jackson K , Lemus AE, Lemini C , Cárdenas M, García R , Silva T , F Larrea .(2000). In vivo estrogen bioactivities and in vitro estrogen receptor binding and transcriptional activities of anticoagulant synthetic 17beta-aminoestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 73(1-2):59-66.
33. Janssen LJ and Sims SM. (1993). Histamine activates Cl⁻ and K⁺ currents in guinea pig tracheal myocytes: Convergence with muscarinic signaling pathway. *J Physiol.* 465:661-677.
34. Jeon YH, Yang HJ, Pyun By. (2009). Lung function in Korean adolescent girls: association with obesity and the menstrual cycle. *J Korean Med Sci.* 24.20-25.
35. Kajita J and Yamaguchi H. (1993). Calcium mobilization by muscarinic cholinergic stimulation in bovine single airway smooth muscle. *Am J Physiol.* 264: L496-L503,
36. Kamm KE and Stull JT. (1985). The function of myosin and myosin light chain kinase phosphorylation in smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 25:593-620.
37. Kannan MS. Davis C, Ladenius AR. and Kannan L, (1987). Agonist interactions at the calcium pools in skinned and unskinned canine tracheal smooth muscle. *Am J Physiol Pharmacol.* 65: 1780-1787.
38. Kjellman B and Gustafsson PM. (2000). Asthma from childhood to adulthood: asthma, severity, allergies, sensitization, living conditions, gender influence and social consequences. *Respir Med.* 94, 454-465.
39. Kotlikoff MI. (1988). Calcium currents in isolated canine airway smooth muscle cells. *Am J Physiol.* 254:C793-C801.
40. Lemini C. Franco Y, Avila ME, Jaimez R. (2005). Contrasting effects of estradiol and 17 beta-aminoestrogens on blood clotting time in rats and mice. 229-233

41. Lemini C, Rubio-Poó C, Silva G, García-Mondragón J, Zavala E, Mendoza-Patiño N, Castro D, Cruz-Almanza R, Mandoki JJ. (1993). Anticoagulant and estrogenic effects two new 17β -aminoestrogens, Butolame [17β -(4-hydroxy-1-butylamino) 1,3,5(10)estratrien-3-ol] and Pentolame [17β -(5-hydroxy-1-pentylamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol]. *Steroids*. 58:457-461.
42. Lemini C, Cruz-Ramos E, Toscano RA, Cruz-Almanza R.(1998). A comparative structural study of the steroid epimers : 17β -amino-1,3,5(10)-estratrien-3-ol, 17α -amino-1,3,5(10)-estratrien-3-ol, and some derivatives by ^1H NMR, and x ray diffraction analysis. *Steroids*. 63:556-564.
43. Liu C, Zuo J, Pertens E, Helli P. Janssen L. (2005). Regulation of Rho/ROCK signaling in airway smooth muscle by membrane potential and $[\text{Ca}^{2+}]_i$. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 289 (4), L574-L582.
44. López C.B. (2013). Evaluación del efecto antidepresivo de los 17β -aminoestrógenos, Prolame y pentolame en el modelo de nado forzado. Tesis licenciatura. UNAM. 65-66.
45. Lösel R and Wehling M. (2003). Nongenomic actions of steroid hormones. *Nature Reviews Mol Biol*. Vol 4: 46- 56.
46. Majerus PW, Connolly TM, Deckmyn H, Ross TS, Bross TE, Ishii H, Bansal VS y Wilson DB, (1986). The metabolism of phosphoinositide-derived messenger molecules. *Science*. 234 (4783), 1519-1526.
47. Meade, TW, Brozovic M, Chakrabar. (1976). An epidemiological study of the haemostatic and other effects of oral contraceptives. *Br. J. Haematol*. 34(3): 353-364.
48. Meade TW, Dyer S, Howarth DJ, Imeson JD, Striinq Y. (1990). Antithrombin III and procoagulant activity sex differences and effects of the menopause. *Br J Haematof*. 74:77-81.
49. Messer JW, Peters GA and Bennett WA. (1960). Causes of death and pathologic findings in 304 cases of bronchial asthma. *Dis Chest*. 38: 616-624.

50. Montaña LM, Barajas-López C and Daniel EE. (1996). Canine bronchial sustained contraction in Ca²⁺-free medium: role of intracellular Ca²⁺. *Can J Physiol Pharmacol.* 74 (11):1236-1248.
51. Montaña LM, Bazán Perkins B. (2005). Resting calcium influx in airway smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol.* 83:717-723.
52. Montaña LM, Carbajal V, Vargas MH, García-Hernández LM, Díaz-Hernández V, Checa M, Barajas-López C. (2013). Histamine, carbachol, and serotonin induce hyperresponsiveness to ATP in guinea pig tracheas: involvement of COX-2 pathway. *Can J Physiol Pharmacol.* 465:1171-1179.
53. Ninan TK and Russell G. (1992). Respiratory symptoms and atopy in Aberdeen Schoolchildren: evidence from two surveys 25 years apart. *BMJ.* 304:873-875.
54. Oguma T, Ito S, Kondo M, Makino Y, Shimokata K, Honjow H, Kamiyawa H, Kum H. (2007). Roles of P2X receptors and Ca²⁺ sensitization in extracellular adenosine triphosphate-induced hyperresponsiveness in airway smooth muscle. *Clinical and experimental Allergy.* 37:893-900.
55. Osman M. (2003). Therapeutic implications of sex differences in asthma and atopy. *Arch Dis Child.* 88(7):587-590.
56. Paul M, O'Byrne MB and Mark DJ. (2003). Airway Hyperresponsiveness. *Chest* 123: 411S-416S.
57. Rang H, Dale M, Ritter J y Flower R. Farmacología. (2008). 6a edición. Barcelona: Elsevier. Pp. 134.
58. Rangel-Ávila. (2008). Asma e hiperreactividad bronquial. *Revista Mexicana de Anestesiología*, vol 31. pp S112-S114.
59. Rhee SG. (2001). Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem.* 70: 281-312.
60. Sankary RM, Jones CA, Madison JM, Brown JK. (1989). Muscarinic cholinergic inhibition of cyclic AMP accumulation in airway smooth muscle. Role of a pertussis toxin-sensitive protein. *Am Rev Resp Dis.* 130: 145-150.

61. Schatz M and Camargo Jr. (2003). The relationship of sex to asthma prevalence, health care utilization, and medications in large managed care organization. *Ann Allergy Asthma Immunol.* 91:553-558.
62. Singer WD, Brown HA and Sternweis PC. (1997). Regulation of eukaryotic phosphatidylinositol-specific phospholipase C and phospholipase D. *Annu. Rev Biochem.* 66: 475-509.
63. Somlyo A y Somlyo A. (2003). Ca²⁺ Sensitivity of Smooth Muscle and Non muscle Myosin II: Modulated by G Proteins, Kinases and Myosin Phosphatase. *Physiol Rev.* 83 (4): 1325-1358.
64. Wang YX, Fleishmann BK, Kotlikoff MI. (1997). M₂ receptor activation of nonselective cation channels in smooth muscle cells: Calcium and G_i/G_o requirements. *Am J Physiol.* 273: C500-C508.
65. Xu W and Lipscombe D. (2001). Neuronal CaV1.3α1 L-type channels activate at relatively hyperpolarized membrane potentials and are incompletely inhibited by dihydropyridines. *J Neurosci.* 21 (16): 5944–5951.