



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**EFFECTO DEL ESTRADIOL EN LA CONTRACCIÓN DEL MÚSCULO LISO  
TRAQUEAL DE COBAYO INDUCIDO POR DIFERENTES AGONISTAS.**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE**

**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

**PRESENTA**

**MÓNICA BERENICE PICHARDO VILLEGAS**

**MÉXICO, D. F.**

**2015**





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:** Atonatiu Edmundo Gómez Martínez

**VOCAL:** José Fausto Rivero Cruz

**SECRETARIO:** Edgar Flores Soto

**1er. SUPLENTE:** María Eva González Trujano

**2° SUPLENTE:** Oscar Armando Pérez Méndez

## **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: MÓNICA BERENICE PICHARDO VILLEGAS**

**(Nombre y firma)**

## ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	5
LISTA DE FIGURAS	7
RESUMEN	10
INTRODUCCIÓN	12
<i>Aparato respiratorio</i>	12
<i>Fisiopatología del asma</i>	14
<i>Hiperreactividad bronquial.</i>	15
<i>Mecanismo de contracción del músculo liso de las vías aéreas.</i>	16
<i>Acople farmacomecánico</i>	17
<i>Acople electromecánico</i>	17
<i>Las hormonas sexuales femeninas y su influencia con las vías aéreas.</i>	18
<i>Esteroide sexual femenino: E<sub>2</sub></i>	19
<i>Biosíntesis, secreción y función del E<sub>2</sub></i>	19
<i>Receptores a estrógenos</i>	22
<i>Efectos genómicos</i>	23
<i>Efectos no genómicos</i>	23
<i>Agonistas utilizados para inducir la contracción del MLVA</i>	24
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.	27
HIPOTESIS	27
OBJETIVOS	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
<i>Sistema de registro de órganos aislados.</i>	28
FÁRMACOS	34
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.	34
RESULTADOS	35

1. El $E_2$ produce un corrimiento a la izquierda (hiperreactividad) en la respuesta de contracción inducida por la His.	35
2. El $E_2$ a $32 \mu M$ produce un corrimiento a la derecha (relajación) en la contracción inducida por el Cch.	37
3. El $E_2$ a $320 nM$ desplaza la curva hacia la izquierda (hiperreactividad) cuando el tejido es contraído por 5-HT.	40
4. Efecto del $E_2$ sobre la respuesta de contracción inducida por KCl.	43
DISCUSIÓN	46
CONCLUSIONES	49
BILBIOGRAFÍA	51

## LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
Ach	Acetilcolina
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
Ca <sup>2+</sup>	Ión calcio
[Ca <sup>2+</sup> ] <sub>i</sub>	Concentración de Ca <sup>2+</sup> intracelular
Cch	Carbacol
CLM	Cadena ligera de la miosina
DAG	Diacilglicerol
EEM	Error estándar de la media
E <sub>2</sub>	Estradiol
GINA	Global Initiative for Asthma
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
INEGI	Instituto Nacional de Estadística Geografía e Informática.
IP <sub>3</sub>	Inositol 1,4-5 trifosfato
His	Histamina
K <sup>+</sup>	Ión Potasio
MLCK	Cinasa de la cadena ligera de la miosina
MLCP	Fosfatasa de la cadena ligera de la miosina
MVLA	Músculo liso de la vía aérea
MP	Membrana plasmática
Na <sup>+</sup>	Ión Sodio
NO	Oxido de nítrico

OMS	Organización Mundial de la Salud
PIP <sub>2</sub>	Fosfatidil inositol 4, 5 bifosfato
PLC <sub>β</sub>	Fosfolipasa C beta
PKC	Proteína cinasa C
r	Coefficiente de correlación
RE	Retículo Endoplásmico
RIP <sub>3</sub>	Receptor de inositol trifosfato
ROC	Canales operados por el receptor
ROCK	Cinasa de RhoA
RS	Retículo Sarcoplásmico
RyR	Receptor de rianodina
SERCA	ATPasa de Ca <sup>2+</sup> del retículo sarcoplásmico
SOC	Canal operado por el almacén
VDCC-L	Canales de Ca <sup>2+</sup> dependientes de voltaje tipo L
5-HT	Serotonina

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Pag.</b>
<b>1</b>	Estructura de la tráquea y los principales bronquiolos	14
<b>2</b>	Hiperreactividad in vitro	16
<b>3</b>	Estructura química del E <sub>2</sub>	20
<b>4</b>	Síntesis del E <sub>2</sub> y otras hormonas gonadales	22
<b>5</b>	Molécula de histamina	25
<b>6</b>	Molécula de carbacol	26
<b>7</b>	Molécula de serotonina .	27
<b>8</b>	Registro original del protocolo experimental de contracción inducida por una curva acumulativa de His cuando es incubado a diferentes concentraciones de E <sub>2</sub> durante 30 min.	31
<b>9</b>	Registro original del protocolo experimental de contracción inducida por una curva acumulativa de Cch cuando es incubado a diferentes concentraciones de E <sub>2</sub> durante 30 min.	32
<b>10</b>	Registro original del protocolo experimental de contracción inducida por una curva acumulativa de 5-HT cuando es incubado a diferentes concentraciones de E <sub>2</sub> durante 30 min.	33



<b>11</b>	Registro original del protocolo experimental de contracción inducida por una curva acumulativa de KCl cuando es incubado a diferentes concentraciones de E <sub>2</sub> durante 30 min.	34
<b>12</b>	Curva concentración-respuesta de His en anillos traqueales de cobayo, incubados a diferentes concentraciones de E <sub>2</sub> .	37
<b>13</b>	Curva concentración-respuesta de Cch en anillos traqueales de cobayo, incubados a diferentes concentraciones de E <sub>2</sub> .	40
<b>14</b>	Curva concentración-respuesta de 5-HT en anillos traqueales de cobayo, incubados a diferentes concentraciones de E <sub>2</sub> .	43
<b>15</b>	Curva concentración-respuesta de KCl en anillos traqueales de cobayo, incubados a diferentes concentraciones de E <sub>2</sub> .	46

## LISTA DE TABLAS

Tabla	Título	Pág.
<b>1</b>	Potencia de la His con E <sub>2</sub>	<b>38</b>
<b>2</b>	Eficacia de la His con E <sub>2</sub>	<b>38</b>
<b>3</b>	Potencia del Cch con E <sub>2</sub>	<b>41</b>
<b>4</b>	Eficacia del Cch con E <sub>2</sub>	<b>41</b>
<b>5</b>	Potencia de la 5-HT con E <sub>2</sub>	<b>44</b>
<b>6</b>	Eficacia de la 5-HT con E <sub>2</sub>	<b>44</b>
<b>7</b>	Potencia del KCl con E <sub>2</sub>	<b>47</b>
<b>8</b>	Eficacia del KCl con E <sub>2</sub>	<b>47</b>

## RESUMEN

El estradiol ( $E_2$  o  $17\beta$ -estradiol) es una hormona esteroidea sexual femenina derivada del ciclopentanoperhidrofenantreno. Durante los años reproductivos, la mayoría del estradiol en las mujeres es producido por las células granulosas de los ovarios por la aromatización de la androstenediona (producida en las células foliculares tecaes) a estrona, seguido por la conversión de estrona a estradiol por  $17\beta$ -beta hidroxisteroide deshidrogenasa, pequeñas cantidades de estradiol también son producidas por la corteza suprarrenal y por los testículos.

El tono de la vía aérea representa el balance entre la contracción y la relajación del músculo liso traqueal. El incremento de  $Ca^{2+}$  genera la formación del complejo  $Ca^{2+}$ -calmodulina, el cual activa a la cinasa de la cadena ligera de la miosina para que fosforile a la serina 19 de la cadena ligera de la miosina de 20 kDa. Esta fosforilación permite que la ATPasa de la miosina sea activada por la actina para llevar a cabo la contracción en el músculo liso de la vía aérea (MLVA). La relajación esta mediada por la disminución de las  $[Ca^{2+}]_i$  y la desfosforilaciones de las cinasas.

Es conocido que el asma, es una enfermedad que se caracteriza por el aumento del tono muscular, hiperreactividad e inflamación de las vías respiratorias. Es más frecuente en mujeres adultas en comparación con los hombres, los datos clínicos revelan que los cambios hormonales en las mujeres durante el ciclo menstrual, embarazo, menopausia, etc. aumentan la severidad y la frecuencia de las exacerbaciones asmáticas. Aunque estos datos clínicos sugieren un papel de las hormonas sexuales (especialmente femeninas) en modular la reactividad de las vías aéreas, existen a la fecha pocas evidencias experimentales que demuestren que los estrógenos puedan ser perjudiciales. Al contrario existen varios estudios como los de Townsend A. y col en 2010 y 2012 en miocitos traqueales de humano, donde demuestran que el estradiol tiene un papel broncodilatador en las vías aéreas, a través de la activación de la adenosin 3', 5' monofosfato cíclico (cAMP), la proteína cinasa A (PKA) y el bloqueo de la entrada de  $Ca^{2+}$  operado por el almacén (SOCE). En esta tesis se investigó el efecto del estradiol sobre la contracción del músculo liso traqueal de cobayo inducidos por diferentes agonistas contráctiles. Para ello, se utilizó la técnica de órganos aislados, donde se mide la tensión del músculo al ser

expuesto a diferentes agonistas. El estradiol (1, 10  $\mu\text{M}$ ) produjeron un desplazamiento de la curva concentración respuesta hacia la izquierda a la Histamina (His); así un incremento en la respuesta máxima a serotonina (5-HT) a 0.32 nM respectivamente. Para el KCl y Carbacol (Cch) hubo un desplazamiento de la curva concentración respuesta a la derecha a 32  $\mu\text{M}$  de estradiol en ambos casos. En conclusión: nuestros resultados sugieren que el estradiol induce hiperreactividad a la His y a la 5-HT, también por otro lado, produce inhibición de la contracción a Cch y KCl. Los datos de esta tesis concuerdan por primera vez con las evidencias clínicas que sugieren que el estradiol tiene un efecto modular en el MLVA.

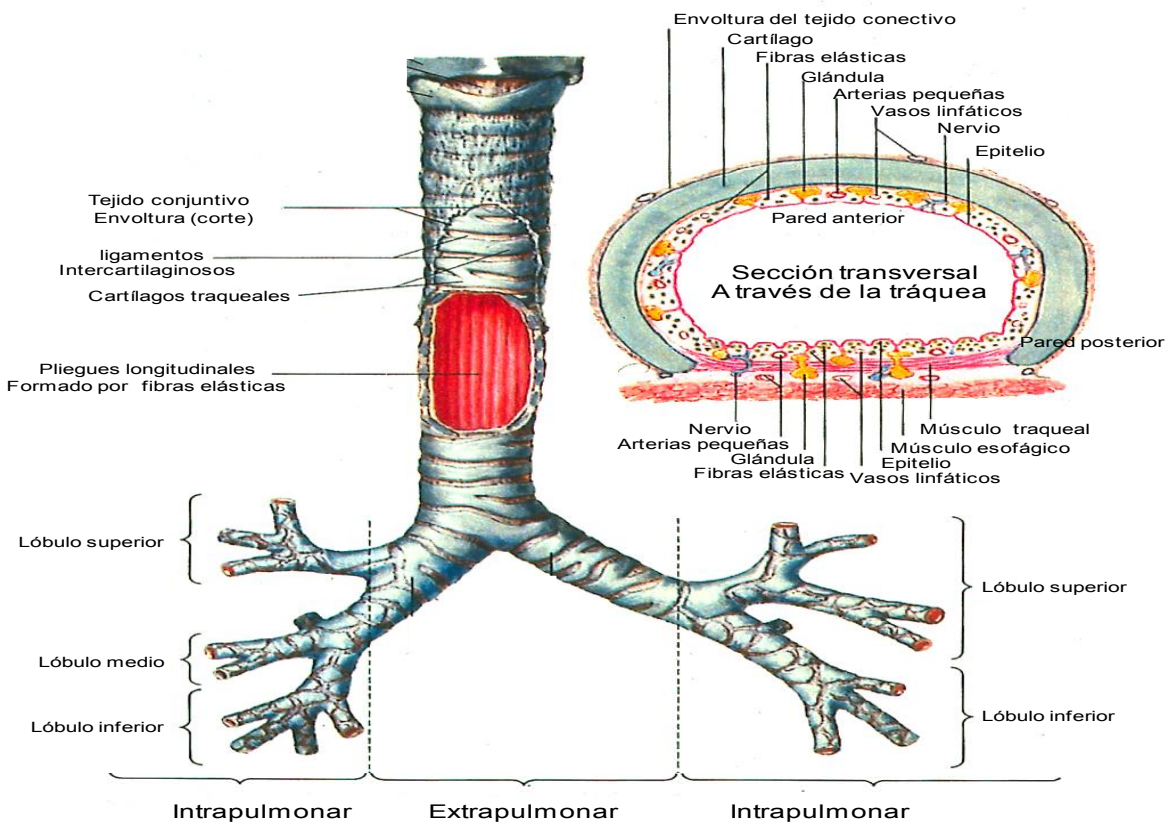
## INTRODUCCIÓN

### Aparato respiratorio

El aparato respiratorio tiene como función captar el oxígeno del aire inspirado y la eliminación del dióxido de carbono producido en el metabolismo celular del organismo. Las dos fosas nasales, la faringe y la tráquea pertenecen a las vías aéreas superiores. Los bronquios primarios y el árbol bronquial pertenecen a las vías aéreas inferiores.

La tráquea es un tubo flexible de unos 11 cm de largo y 2 cm de diámetro. Está recubierta por epitelio cilíndrico pseudo-estratificado ciliado con una lámina basal anormalmente gruesa y con muchas células calciformes diseminadas. Un rasgo característico de la tráquea es su armazón de soporte formado por 16 a 20 cartílagos hialinos, en forma de C, que rodean su porción ventral y lateral. Estos anillos cartilaginosos incompletos están unidos por tejido conjuntivo fibro-elástico. Por fuera de estos cartílagos, hay una capa de tejido conjuntivo denso que contiene muchas fibras elásticas. La pared posterior de la tráquea, próxima al esófago carece de cartílagos. En lugar de ellos, hay una banda gruesa de haces de músculo liso que, por lo general, cursan transversalmente. Sus extremos, están insertados en los haces de fibras elásticas y colagenas que constituyen la capa de tejido conjuntivo denso situada por fuera de los cartílagos traqueales. El músculo liso está unido también a la mucosa por tejido conjuntivo laxo que se continúa con la lámina propia. La tráquea se bifurca en los bronquios primarios derecho e izquierdo, que se dirigen a los pulmones respectivos. Después de entrar a los pulmones, los bronquios primarios se subdividen en otros más pequeños, los bronquios secundarios (o lobulares), uno para cada lóbulo pulmonar. Los bronquios secundarios dan origen a otros de menor calibre, los bronquios terciarios (o segmentados), que a su vez se ramifican en bronquiolos. Éstos se dividen repetidas veces y los más pequeños se denominan bronquiolos terminales. Esta ramificación considerable de la tráquea semeja un árbol invertido, por lo que suele llamarse árbol traqueobronquial, como se muestra en la Figura 1 (Tortora and Graboswki, 2003).

A medida que surgen las ramas del árbol traqueobronquial, se advierten varios cambios estructurales. En primer lugar, el epitelio cambia gradualmente de cilíndrico ciliado pseudo estratificado (en los bronquios) a cúbico sencillo no ciliado en los bronquios terminales. En segundo lugar, los anillos cartilagosos incompletos de los bronquios primarios se sustituyen, también de manera gradual por placas de cartílago, que están ausentes en las ramas pequeñas. En tercer lugar, conforme disminuye la cantidad de cartílago aumenta el músculo liso hasta que ya no hay cartílago y solo hay músculo liso en la pared de los bronquiolos más pequeños, de modo que la contracción muscular puede cerrar la cavidad de estos bronquiolos, impidiendo la entrada de aire en los alvéolos, como sucede por ejemplo en una crisis asmática, lo que puede ser una situación amenazadora para la vida. (Tortora and Graboswki, 2003; Fawcett, 1989). Para cuestiones experimentales se trabaja con la tráquea, ya que la obtención de ella se facilita en comparación con los bronquiolos en nuestro modelo animal.



**Figura 1. Estructura de la tráquea y los principales bronquiolos.**

## **Fisiopatología del asma**

El asma es una enfermedad respiratoria crónica que afecta a niños y adultos, se calcula que afecta a cerca de 300 millones de personas en todo el mundo, siendo más frecuente en niños (OMS 2011). En México aproximadamente el 9 % de la población padece asma, teniendo 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 aproximado de 9.1% de nuevos casos, y se estima que la incidencia anual de asma en adultos es de 4.6 a 5.9 por cada 1,000 en mujeres y de 3.6 a 4.4 por cada 1,000 en hombres (INEGI 2009).

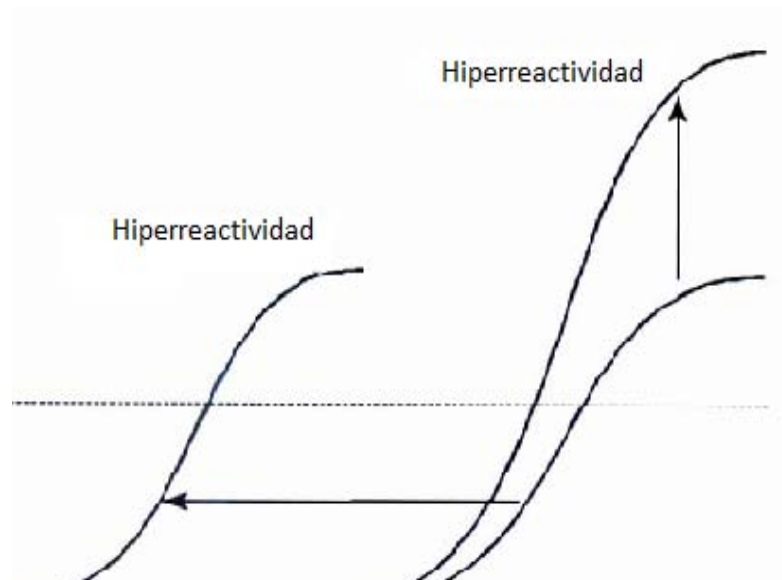
El asma al ser una enfermedad respiratoria crónica se caracteriza por la inflamación prolongada e hiperreactividad de las vías aéreas, que causan episodios recurrentes de sibilancia, disnea, opresión torácica y tos, particularmente por las noches o en la madrugada. Estos episodios están usualmente asociados, aunque puede variar, con la obstrucción del flujo aéreo pulmonar, que es a menudo, pero no siempre, reversible espontáneamente o con tratamiento. Además existen otras características en el asma como el remodelado de la vía aérea (hipertrofia e hiperplasia), engrosamiento de la capa de colágena subepitelial y edema, estas últimas también llevan a una hiperreactividad bronquial (GINA, 2012).

En el asma, la inflamación es un proceso multicelular que involucra principalmente a las células cebadas, células T, neutrófilos, eosinófilos y macrófagos (Siddiquis S. *et al.*, 2007). Cuando se da este proceso, en un inicio la inflamación está restringida a los bronquios de las vías aéreas, pero cuando la enfermedad se vuelve más severa y crónica, el proceso inflamatorio se extiende a las vías respiratorias bajas y en algunos casos a los alvéolos adyacentes (Holgate, 2008; Kraft *et al.*, 1996).

## Hiperreactividad bronquial.

La hiperreactividad es un rasgo patognomónico del asma, se caracteriza por una respuesta broncoconstrictora (estrechamiento de la luz de la vía aérea, provocando obstrucción, lo que dificulta el paso del aire) exagerada del músculo liso a una amplia variedad de estímulos físicos y químicos, cuando son comparados con sujetos sanos (Hirota *et al.*, 2005). A pesar de que la hiperreactividad es un rasgo característico del asma, hasta el momento los mecanismos que llevan a la hiperreactividad no han sido completamente caracterizados.

In vitro una hiperreactividad del músculo liso de las vías aéreas (MLVA) se observa al existir un desplazamiento de la curva concentración-respuesta hacia la izquierda o un aumento en la respuesta bronco constrictora del MLVA (Hirota *et al.*, 2005) (Figura 2).



**Figura 2. Hiperreactividad de las vías aéreas a un agonistas broncoconstrictor (Hirota S. et al., 2005)**



La función del MLVA es controlar el diámetro de la luz traqueobronquial, la inervación más importante es el sistema nervioso parasimpático a través del nervio vago. La liberación de Ach de las terminaciones nerviosas, activa los receptores muscarínicos ( $M_3$ ) en las vías aéreas regulando la contracción del MLVA (Rang *et al.*, 2008). Las células del MLVA además de poseer diferentes receptores acoplados a proteínas G, también poseen canales, entre estos encontramos los canales operados por almacén (SOC), los canales operados por receptor (ROC), canales de  $Ca^{2+}$  dependientes de voltaje tipo L (VDCC-L); así como también poseen ATPasas, como la ATPasa de  $Ca^{2+}$  del retículo sarcoplasmico (SERCA) y la ATPasa de  $Ca^{2+}$  de membrana plasmática (PMCA) e intercambiadores de la membrana citoplasmática (NCX); todos ellos están involucrados en la homeostasis y contracción del MLVA ( Berridge *et al.*, 2003; Floyd and Wray, 2007).

### **Mecanismo de contracción del músculo liso de las vías aéreas.**

El proceso de contracción del músculo liso está regulado principalmente por la interacción de las proteínas contráctiles miosina y actina. El grado de interacción se determina por el nivel neto de fosforilación de la cadena ligera de la miosina (CLM) de 20 kDa, que a su vez depende de las actividades relativas de la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) y la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP)( Janssen, 2002).

La MLCK es activada por la interacción entre el complejo  $Ca^{2+}$ -calmodulina, permitiendo la fosforilación de la CLM en la serina 19 (ser 19). La miosina fosforilada cataliza, en presencia de actina, la hidrólisis de adenosina trifosfato (ATP) a adenosina difosfato (ADP) y la liberación de energía posibilita el desplazamiento de los filamentos de actina a lo largo de la miosina, iniciando el proceso de contracción muscular (Janssen, 2002; Horowitz *et al.*, 1996). Al mismo tiempo que se activa este proceso, se activa la vía de señalización de la RhoA-cinasa (ROCK). La ROCK juega un papel importante en la regulación de la actividad de la MLCP (encargada de desfosforilar a la CLM) ya que puede inhibir su actividad y promueve la

fosforilación de la CLM, permitiendo el mantenimiento de la contracción. A este proceso se le conoce como sensibilización al  $\text{Ca}^{2+}$  (Somlyo, 2003).

En el músculo liso se han descrito dos mecanismos de acople excitación/contracción, uno farmacomecánico y otro electromecánico.

### **Acople farmacomecánico: contracción del MLVA vía receptores metabotrópicos.**

Este acople se da por la unión de agonistas broncoconstrictores (Cch, His, 5-HT) con sus receptores de membrana acoplados a la proteína G (GPCR, por sus siglas en inglés) del tipo  $\text{G}_q$ , lo que promueve la activación de la fosfolipasa  $\text{C}_\beta$  ( $\text{PLC}_\beta$ ) que hidroliza al fosfatidil inositol 4,5-bifosfato ( $\text{PIP}_2$ ), formando dos mediadores intracelulares o segundos mensajeros: diacilglicerol (DAG) e inositol 1,4,5-trifosfato ( $\text{IP}_3$ ). El DAG permanece embebido en la membrana plasmática (MP) y ejerce diferentes efectos celulares: puede activar ácido araquidónico o bien activar a la cinasa de proteína C (PKC, llamada así por su dependencia al  $\text{Ca}^{2+}$ ), ambos procesos activan otras cascadas de señalización (Janssen, 2001). Por otra parte el  $\text{IP}_3$  se acopla a sus receptores ( $\text{RIP}_3$ ) que están situados en la membrana del retículo sarcoplásmico (RS), promoviendo la liberación de  $\text{Ca}^{2+}$  generando la formación del complejo  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulina y la fosforilación de la CLM (Bazan-Perkins *et al.*, 1998; Singer, *et al.*, 2003; Rhee, 2001).

### **Acople electromecánico: contracción del MLVA inducida por despolarización de la membrana plasmática.**

La membrana plasmática del MLVA tiene un potencial de reposo de -60 mV, el cambio en el potencial de membrana debido al movimiento de iones hacia el espacio intracelular (principalmente del  $\text{Na}^+$ ) provoca la despolarización. El potencial de membrana toma valores menos negativos (más positivos) (Montaño, *et al.*, 1996; Janssen, 1997).

El acople opera a través de cambios en el potencial de membrana plasmática producidos por cambios químicos (alto  $K^+$ ) o eléctricos (pulsos despolarizantes). La despolarización genera la apertura de los canales de  $Ca^{2+}$  tipo L dependientes de voltaje (VDCC-L), permitiendo un incremento en la  $[Ca^{2+}]_i$  formando el complejo  $Ca^{2+}$ /calmodulina, lo que lleva al proceso de relleno de  $Ca^{2+}$  del RS y contracción. (Montaño, *et al.*, 1996; Flores-Soto *et al.*, 2013).

En la actualidad existe un gran debate entre los diferentes grupos de investigación en relación a la reactividad de las vías aéreas enfocadas principalmente a la enfermedad del asma y los niveles hormonales presentados durante ciertas etapas de la vida, tanto en hombres como en mujeres, en esta tesis no enfocaremos a las hormonas sexuales femeninas ( $E_2$ ).

### **Las hormonas sexuales femeninas y su influencia con las vías aéreas.**

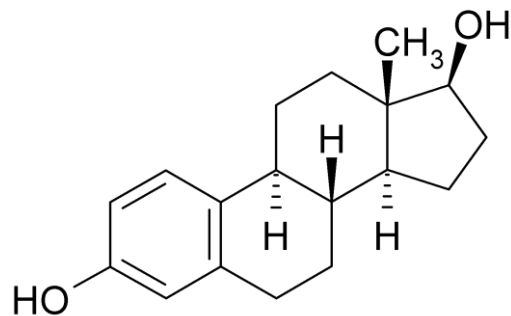
La prevalencia del asma es mayor en niños en comparación con las niñas  $\leq$  de 10 años (Townsend, 2010). Sin embargo cuando se inicia la pubertad esta situación se invierte y la prevalencia del asma aumenta casi en un 50% en mujeres en edad reproductiva (12-45 años) (Carey, *et al.*, 2007). Las mujeres asmáticas en edades reproductivas experimentan cambios en la gravedad de los síntomas y el número de exacerbaciones cuando tienen cambios en el estado hormonal, por ejemplo: diferentes fases del ciclo menstrual, embarazo y la menopausia (Chandler *et al.*, 1997; Chhabra, 2005; Hanley, 1981). Por esta razón se cree que los esteroides sexuales en especial los femeninos juegan un papel importante en la modulación de la reactividad de las vías aéreas. Beynon *et al.* (1988) reportó el efecto beneficioso de la terapia con progesterona en pacientes con exacerbaciones premenstruales severas de asma. Sin embargo con respecto  $E_2$  existen estudios que se contradicen acerca del efecto. Es bien conocido que las hormonas tienen un efecto bifásico y que este efecto depende de la dosis. Degano B., y col. en 2003 demostraron que el tratamiento crónico con  $E_2$  puede alterar la reactividad de las vías aéreas en ratas hembras ovariectomizadas de manera que se puede agravar la reactividad de la rata cuando es comparada con animales sin tratamiento. Por otro

lado Townsend A y col en 2011 propusieron que el E<sub>2</sub> genera la formación de óxido nítrico (NO) de forma endógena en el epitelio y la subsecuente activación de la guanilato ciclasa (GC<sub>s</sub>) para producir guanosín monofosfato cíclico (GMPc), lo que facilita la relajación del MLVA.

Además, en el 2012 estos mismos investigadores propusieron otro mecanismo de relajación donde el E<sub>2</sub> aumenta la actividad de la adenilato ciclasa (AC), y en consecuencia se produce AMPc y la activación de la proteína cinasa A (PKA), el cual fosforila los canales de Potasio produciendo hiperpolarización, esto lleva a que los VDCC-L se bloqueen y se disminuyan los niveles de Ca<sup>2+</sup> citoplasmático.

### **Esteroides sexuales femeninos: E<sub>2</sub>**

El E<sub>2</sub> es una hormona esteroidea femenina derivada del colesterol. Al igual que el estradiol, todos los esteroides poseen la estructura básica con cuatro anillos de carbono (ciclopentanoperhidrofenantreno) que contienen 17 átomos de carbono (O'Neill *et al.*, 2013). Sin embargo, todos los esteroides se diferencian por las cadenas laterales unidas a los carbonos y los enlaces dobles entre los anillos. El E<sub>2</sub> posee grupos hidroxilo en el carbono tres (C3) y el carbono diecisiete (C17), además de tener un anillo aromático (Figura 3).



**Figura 3. Estructura química del 17β-estradiol.**

### **Biosíntesis, secreción y función del E<sub>2</sub>**

El E<sub>2</sub> se sintetiza por diferentes vías. En la fase folicular, la hormona foliculoestimulante (FSH) estimula la secreción de E<sub>2</sub> tras la interacción con sus receptores en las células de la granulosa del ovario; la pregnenolona formada por el colesterol y mediante la 17 $\alpha$ -Hidroxilasa se forma la 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona, deshidroepiandrosterona, androstenediona y testosterona, la cual sufre el proceso de aromatización del anillo A del esteroide con pérdida del carbono 19 (C19) para convertirse en E<sub>2</sub> (Amado and Florez, 2003). En la fase lútea persiste la secreción de E<sub>2</sub> a partir de la producción de androstenediona y testosterona en las células tecales estimuladas por la hormona luteinizante (LH); los andrógenos difunden a las células de la granulosa donde sufren la aromatización correspondiente (Figura 4) (Orrego *et al.*, 1996).

El E<sub>2</sub> actúa en el desarrollo, mantenimiento y función de los órganos reproductores femeninos y masculinos, los ciclos de actividad sexual y las características sexuales secundarias femeninas; además tiene acciones metabólicas (Valsecia, 2012).

Entre las acciones metabólicas encontramos la retención de agua y sal (efecto mineralocorticoide), la regulación de los metabolismos proteico/cálcico y lipídico; así como la ayuda a la coagulación sanguínea por el incremento en la producción de factores de coagulación (Amado and Florez, 2003). El E<sub>2</sub> hace su efecto cuando este interactúa con sus receptores.

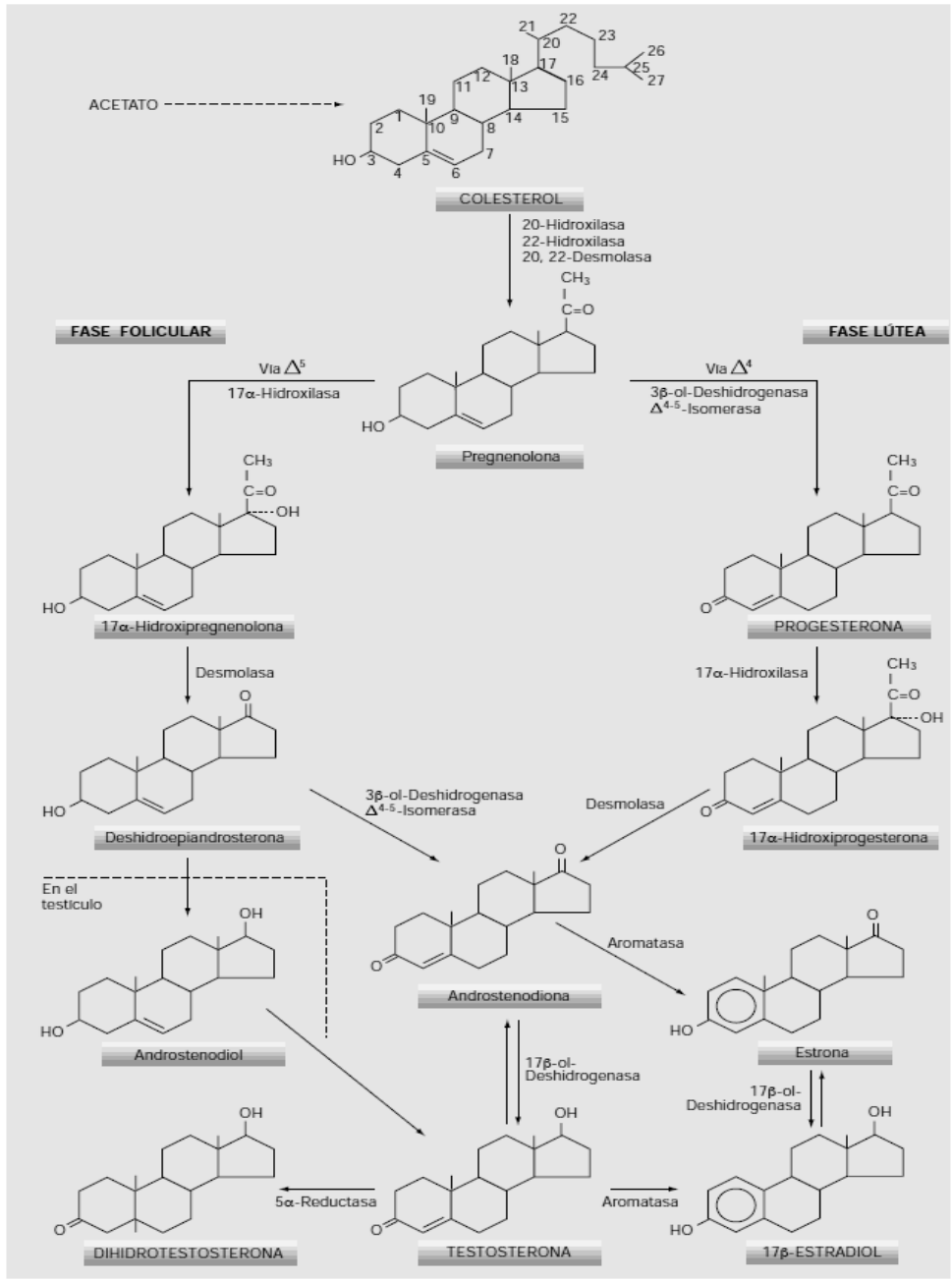


Figura 4. Síntesis del 17 $\beta$ -estradiol y otras hormonas gonadales.

Amado JA., y Florez J., 2003.

## Receptores a estrógenos

Las respuestas fisiológicas a los estrógenos son iniciadas por receptores celulares que alteran la conformación tras la unión del ligando resultando en interacciones proteína-proteína y la activación de las vías de señalización. Estas vías de señalización se conocen como genómica (vía clásica) y no genómica (vía no clásica). Para la vía genómica se han atribuido dos tipos de receptores: receptores a estrógenos  $\alpha$  (RE $\alpha$ ) y los receptores a estrógenos  $\beta$  (RE $\beta$ ) los cuales se consideran receptores nucleares. Para la vía no genómica se han relacionado un grupo de familia de receptores con siete dominios transmembranales acoplados a proteínas G (GPR30) (Edwards, 2005; Kuiper *et al.*, 1996).

Los receptores nucleares pertenecen a una gran familia, los cuales incluyen a los receptores de hormonas esteroideas, entre otros. Los receptores a estrógenos (RE) poseen funciones diferentes de acuerdo al tejido donde ejercen su acción, y están organizados en seis dominios denominados por las letras "A" a la "F". La dominio A/B tiene la función de la transcripción genética e inmediatamente se encuentra la región de unión al ADN o dominio C, siendo la región más conservada entre los RE. El dominio D o región de bisagra, la cual no ha sido bien caracterizada y que actúa en la unión de la proteína chaperona, la cual se mantiene unida al receptor mientras este se mantiene inactivo. Finalmente se encuentra la región E/F o dominio de unión al ligando, donde se une a la hormona E<sub>2</sub> (Pietras, *et al.*, 1995; Trowbridge *et al.*, 1992).

Los GPR30 fueron identificados como un miembro huérfano de la familia de receptores trans-membranales hacia 1990 (Carmeci, *et al.*, 1997; O'Dowd *et al.*, 1998; Owman *et al.*, 1996; Takada *et al.*, 1997). Sin embargo, ciertos estudios revelaron una fuerte correlación entre las isoformas de los RE y los GPR30, lo cual sugería un posible vínculo a las respuestas fisiológicas en los tejidos (Owman *et al.*, 1996). Thomas y col. en el 2005 demostraron que los GPR30 se expresan en la membrana plasmática mediante una tinción de citoesqueleto de actina para marcar la membrana plasmática al interior de la célula. Prossnitz y col en 2007

revelaron que los GPR30 parecían estar expresados en una red tuburreticular intracelular usando marcadores subcelulares, además ellos identificaron este compartimento en el retículo endoplasmático. y que las subunidades  $\beta\gamma$  son inicialmente blancos en el retículo endoplásmico, donde subsecuentemente se asocian con la subunidad  $\alpha$  de la proteína G proporcionando la maquinaria necesaria para iniciar las cascadas de señalización.

### **Efectos genómicos**

Como se mencionó antes, las vías de señalización del  $17\beta$ -estradiol son dos: la genómica y la no genómica. En la vía clásica o genómica el receptor es activado al unirse a su ligando después de haber atravesado la membrana y activa un factor transcripcional que se une al DNA estimulando la transcripción de ciertos genes (Beato *et al.*, 1996). El proceso de transcripción es activado al formarse el complejo de iniciación de la transcripción que incluye diferentes co-activadores, co-represores y proteínas reguladoras de la transcripción; este proceso donde se lleva a cabo la síntesis de RNA y que finaliza con la producción de proteínas se lleva en cuestión de horas (Lieberman, 1997).

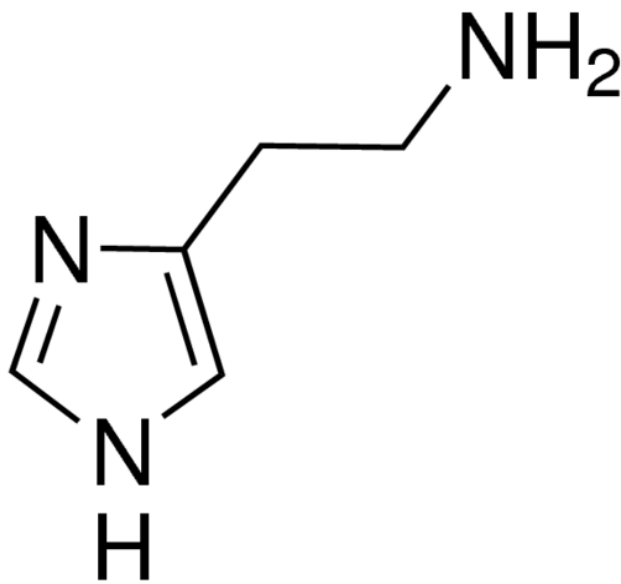
### **Efectos no genómicos**

Al contrario de los efectos genómicos, los efectos no genómicos se llevan en cuestión de segundos a minutos, se podría decir que es un proceso rápido y no requiere de los procesos de transcripción y síntesis de nuevas proteínas para poder producir su efecto primario, por esta razón debe ser mediado por receptores o por la activación o bloqueos de canales, intercambiadores, etc. que están localizados en la membrana (Nemere and Farach C., 1998). Esta vía de señalización rápida incluye la generación de segundos mensajeros  $Ca^{2+}$ ,  $AMP_c$ , y NO, así como la activación de proteínas cinasas asociadas a membrana. Recientemente los RE se han asociado con una proteína G de membrana plasmática, y se han reportado por mediar la producción de NO y por la inhibición de  $AMP_c$  (Hall *et al.*, 2001; Ho and Liao, 2002; Kelly and Levin, 2001; Levin, 2001; Levin, 2002; Razandi *et al.*, 2003).



Es por estos reportes que se puede decir que los estrógenos actúan de manera directa (por ejemplo, bloqueando a los VDCC-L (Towsend *et al.*, 2011) y mediando múltiples eventos rápidos y complejos.

### Agonistas utilizados para inducir la contracción del MLVA



#### Histamina

La histamina es una 2-(4 imidazoil) etilamina (Figura 5). Se forma por la descarboxilación de aminoácido L-histamina, una reacción catalizada en los tejidos de los mamíferos por la enzima histidina descarboxilasa. Aún cuando la histamina se encuentra en casi todos los tejidos, su distribución es muy irregular.

Figura 5. Molécula de histamina

La mayor parte de la histamina tisular se encuentra en forma unida dentro de los 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 (Katzung, 1999). La histamina ejerce sus acciones biológicas al unirse a sus receptores celulares específicos localizados en la membrana citoplasmática. Los tres receptores de la histamina que se han caracterizado hasta la fecha se designan H<sub>1</sub>, H<sub>2</sub> y H<sub>3</sub>. Tanto en humanos como en el cobayo, la histamina produce broncoconstricción mediada por receptores H<sub>1</sub>. Estos receptores están acoplados a una proteína Gq, lo cual está involucrado en la formación de IP<sub>3</sub> y la subsecuente liberación del Ca<sup>2+</sup> del retículo sarcoplasmico (Rang *et al.*, 2008).

## Carbacol

El carbacol es un análogo que reproduce la acción de la Ach, es un agonista de los receptores colinérgicos nicotínicos y muscarínicos resistente a la acción de la acetilcolinesterasa. Los receptores colinérgicos están divididos en 5 tipos, del M<sub>1</sub> al M<sub>5</sub>, de los cuales en el MLVA se han observado el M<sub>2</sub> y el M<sub>3</sub>, que están acoplados a proteínas G<sub>o</sub>/G<sub>i</sub> y G<sub>q</sub> respectivamente. La estimulación de los tipos M<sub>1</sub>, M<sub>3</sub> y M<sub>5</sub> generan IP<sub>3</sub>, lo que moviliza el Ca<sup>2+</sup> del RS, por otro lado los subtipos M<sub>2</sub> y M<sub>4</sub> inhiben a la AC disminuyendo al AMPc intracelular lo que favorece la contracción (Felder, 1995, Sankary *et al.*, 1989). Adicionalmente, los receptores M<sub>2</sub> producen la apertura de canales catiónicos inespecíficos (Wang *et al.*, 1997). Estos canales catiónicos permiten la entrada de Ca<sup>2+</sup> durante la respuesta sostenida y para su activación es necesario el incremento transitorio de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> que se produce por la liberación del Ca<sup>2+</sup> del RS por la activación de los receptores M<sub>3</sub> (Wang *et al.*, 1997).

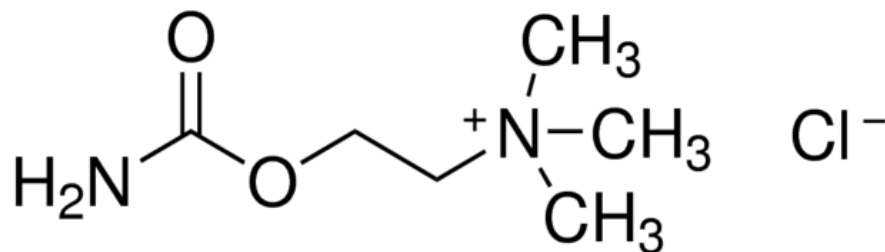
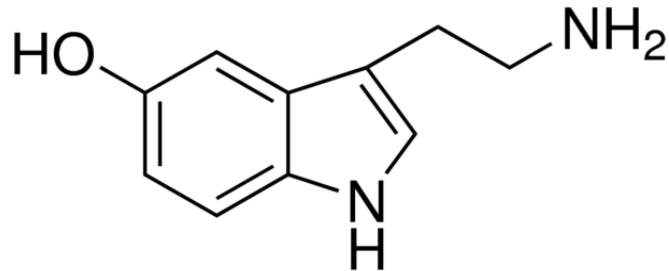


Figura 6. Molécula de Carbacol

## Serotonina

Es una indoletilamina (Figura 7) que se forma en los sistemas biológicos a partir del aminoácido L-triptofano por hidroxilación del anillo indol seguida de una descarboxilación del aminoácido. La serotonina ejerce muchas acciones y, al igual que la histamina, presenta muchas diferencias entre especies. Existen 7 subtipos de receptores 5-HT<sub>1</sub>- 5-HT<sub>7</sub>, muchos de ellos divididos en subcategorías, los más importantes en la vía aérea son los primeros tres (5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub> y 5-HT<sub>3</sub>) (Rang, 2008). Los receptores 5-HT<sub>1</sub> están acoplados a una proteína Go/Gi, los receptores 5-HT<sub>3</sub> están acoplados a un canal iónico Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> operado por un ligando análogo a

los receptores. Los receptores 5-HT<sub>2</sub> están acoplados a una proteína Gq que transduce la señalización de la PLC<sub>β</sub>/IP<sub>3</sub> favoreciendo la liberación de Ca<sup>2+</sup> del RS y la subsecuente contracción del MLVA (De Bie *et al.*, 1998).



**Figura 7. Molécula de serotonina**

### **Cloruro de potasio.**

Es un agente químico 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, lo que lleva a la despolarización de la membrana plasmática, permitiendo la abertura de los VDCC-L (Montaño *et al.*, 1996; Flores-Soto *et al.*, 2013).

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

Estudios preliminares en el laboratorio de investigación en asma nos hicieron especular sobre un posible efecto potenciador del E<sub>2</sub> en la contracción del MLVA inducido por diferentes agonistas. Por lo tanto es importante describir los efectos biológicos que pueda tener el 17β-estradiol sobre la contracción del MLVA, ya que hasta la fecha existe un gran debate en torno a su efecto sobre el MLVA.

## **HIPOTESIS**

El E<sub>2</sub> a concentraciones menores a 32 μM sería capaz de inducir la hiperreactividad del músculo liso traqueal de cobayo a diferentes agonistas (Cch, His, y 5-HT) y a un agente químico (KCl).

## **OBJETIVOS**

### **General**

- ❖ Determinar el efecto del E<sub>2</sub> sobre la contracción del músculo liso traqueal de cobayo inducida por (His), (Cch), (5-HT) y KCl en los anillos traqueales de cobayo.

### **Particulares**

- ❖ Comparar el efecto que muestran el E<sub>2</sub> sobre la contracción cuando es provocada por Cch (0.01, 0.032, 0.1, 0.32, 1, 10 μM) His (0.1, 0.32, 1, 10, 32 y 100 μM) y 5-HT (0.01, 0.032, 0.1, 0.32, 1, 10 μM).
- ❖ Caracterizar la participación del VDCC-L en la contracción inducida por KCl (10, 20, 40 y 80 mM) en un medio incubado con E<sub>2</sub>.
- ❖ Evaluar la importancia de la 5-HT (0.01, 0.032, 0.1, 0.32, 1, 10 μM) en la contracción del MLVA en un medio incubado por E<sub>2</sub>.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Sistema de registro de órganos aislados.**

Se sacrificaron cobayos machos de 300-400 g de la cepa Hartley, con una sobredosis de pentobarbital sódico por vía peritoneal (35 mg/kg), se extrajo la tráquea, finamente disecada y colocada en una caja de disección donde posteriormente se eliminó el exceso de tejido conjuntivo adyacente, todo este proceso fue realizado en solución de Krebs-Ringer en condiciones que aseguraban la integridad de la tráquea. Inmediatamente la tráquea fue seccionada en ocho segmentos cada uno con cuatro anillos de cartílago, cada segmento se colocó en una cámara de órganos aislados de 10 ml de capacidad con la solución Krebs-Ringer con la siguiente composición: 118 NaCl, 25 NaHCO<sub>3</sub>, 4.6 KCl, 1.2 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1.2 MgSO<sub>4</sub>, 11 glucosa, y 2 CaCl<sub>2</sub> (mM). Las preparaciones se mantuvieron a 37°C y se burbujearon continuamente con 5% CO<sub>2</sub> y 95% O<sub>2</sub> a un pH de 7.4.

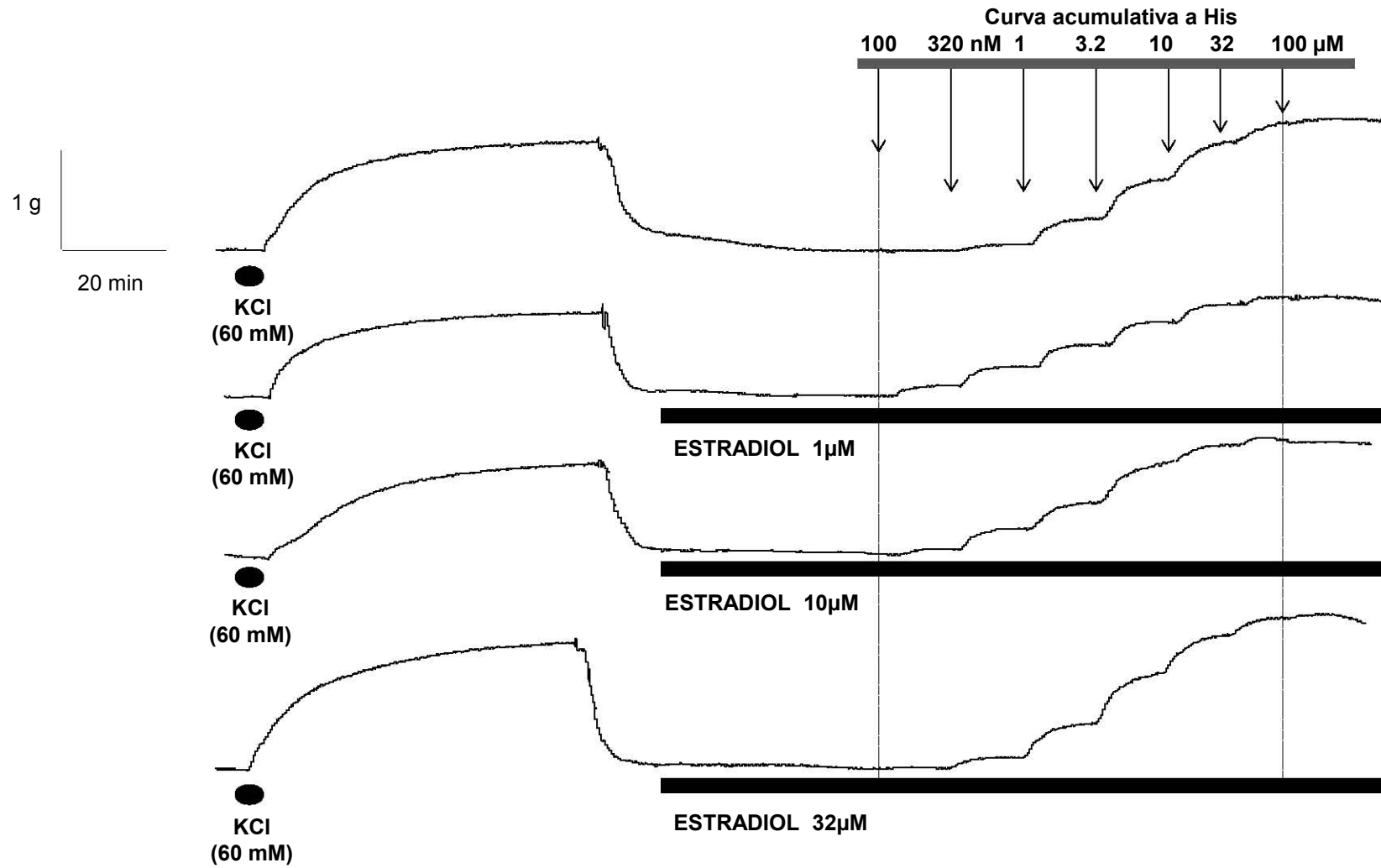
Cada segmento se sujetó a un transductor de fuerza isométrica modelo FT03 (Grass Instruments, West Warwick, RI, USA) conectado a un sistema amplificador de las señales Cyberamp 380 (Axon Instruments, Foster City, C.A, EUA) y a una interfaz análogo-digital Digitada 1440 A (Axon Instruments). Los registros se almacenaron en una computadora y se analizaron con el software AxoScope versión 10.2 (Axon Instruments, Foster City. CA, EUA).

Los segmentos traqueales se equilibraron a una tensión inicial de 1g durante 45 min. Con el propósito de normalizar las respuestas de los tejidos, se estimularon tres veces con 60 mM de KCl hasta alcanzar la respuesta máxima de contracción. Posteriormente, se siguió con el protocolo experimental que a continuación se señala.

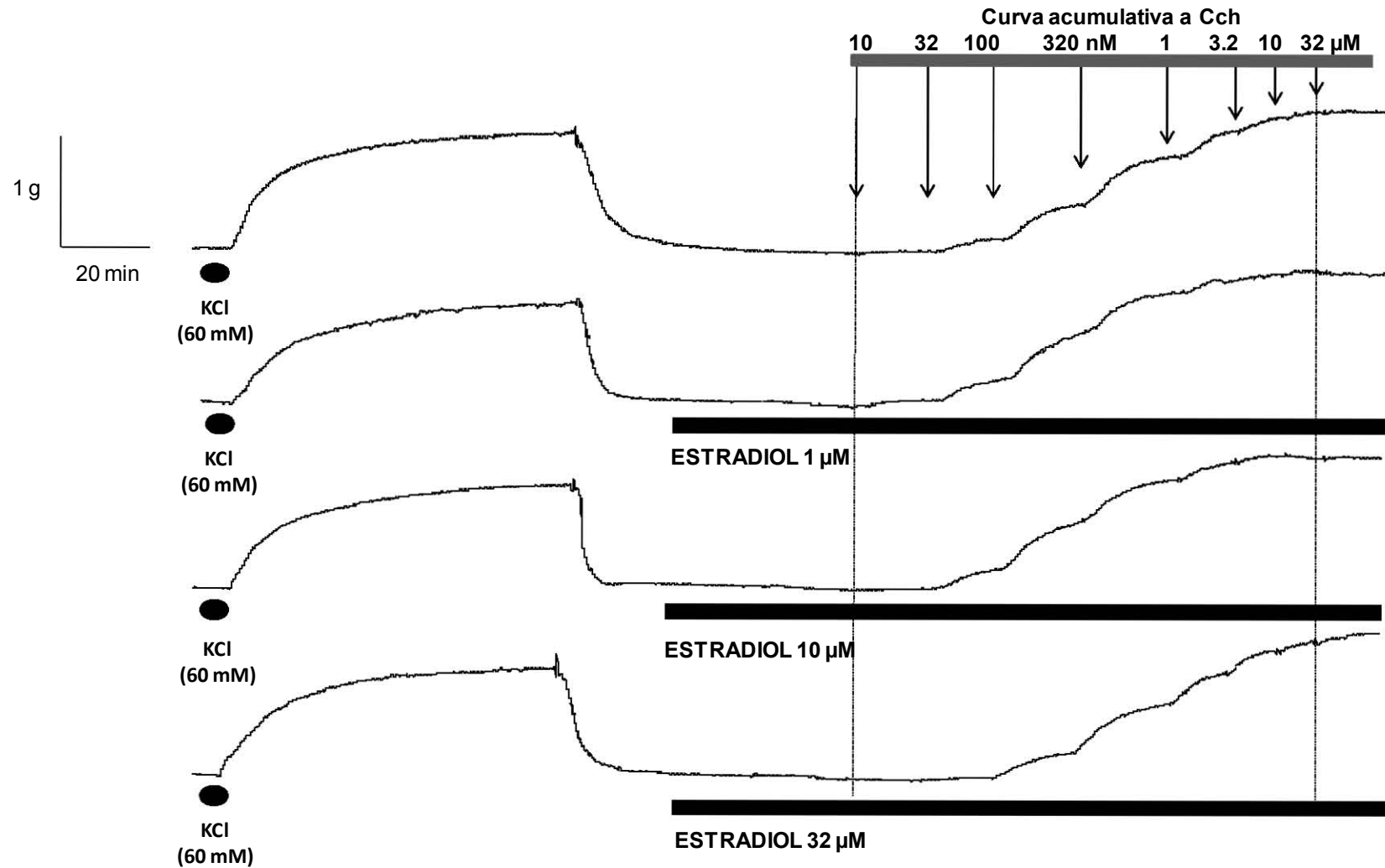
Cuando los tejidos alcanzaban la contracción máxima fueron incubados durante 30 min con E<sub>2</sub> (0.32, 1, 3.2, 10 y 32 μM). Como control para cada experimento se utilizó un tejido que carecía de incubación de E<sub>2</sub>.

La contracción obtenida con el tercer estímulo de KCl (60 mM) se consideró como el 100% de la respuesta. Después de los 30 min de incubación se realizó la curva concentración-respuesta para cada agonista: His (0.1, 0.32, 1, 10, 32 y 100  $\mu$ M), Cch (0.01, 0.032, 0.1, 0.32, 1 y 10  $\mu$ M), 5-HT (0.01, 0.032, 0.1, 0.32, 1 y 10  $\mu$ M) y KCl (10, 20, 40 y 80 mM).

Para cada experimento se calculó la  $CE_{50}$  (potencia) mediante un análisis de regresión lineal simple, empleando los valores de logaritmo de la concentración del agonista (His, Cch y 5-HT). La respuesta máxima (eficacia) expresa los gramos de tensión obtenidos en el punto más alto de la contracción.

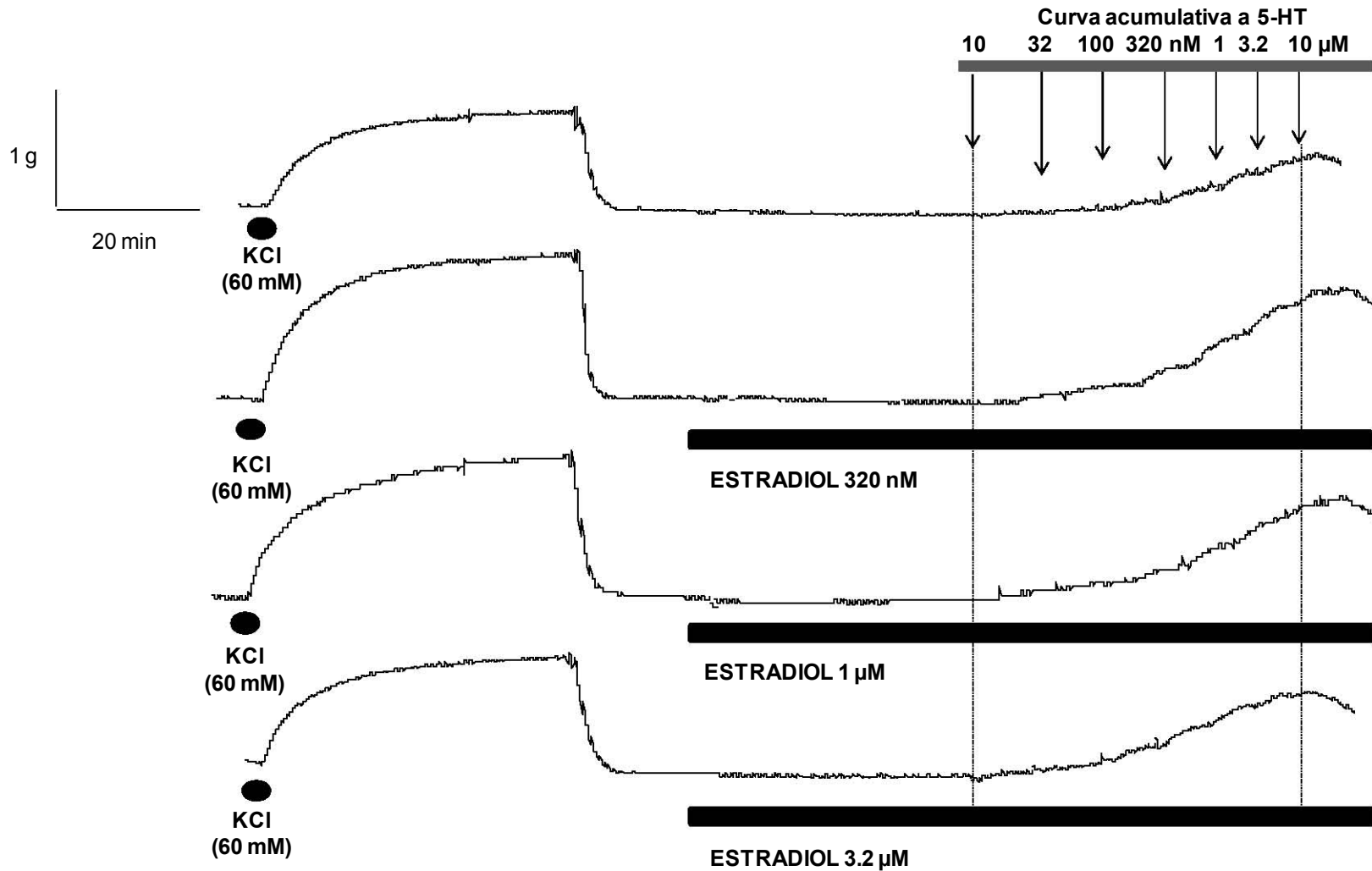


**Figura 8.** Registro original del protocolo experimental de la contracción inducida por una curva acumulativa de His cuando los tejidos son incubados previamente (30 min) con diferentes concentraciones de Estradiol.

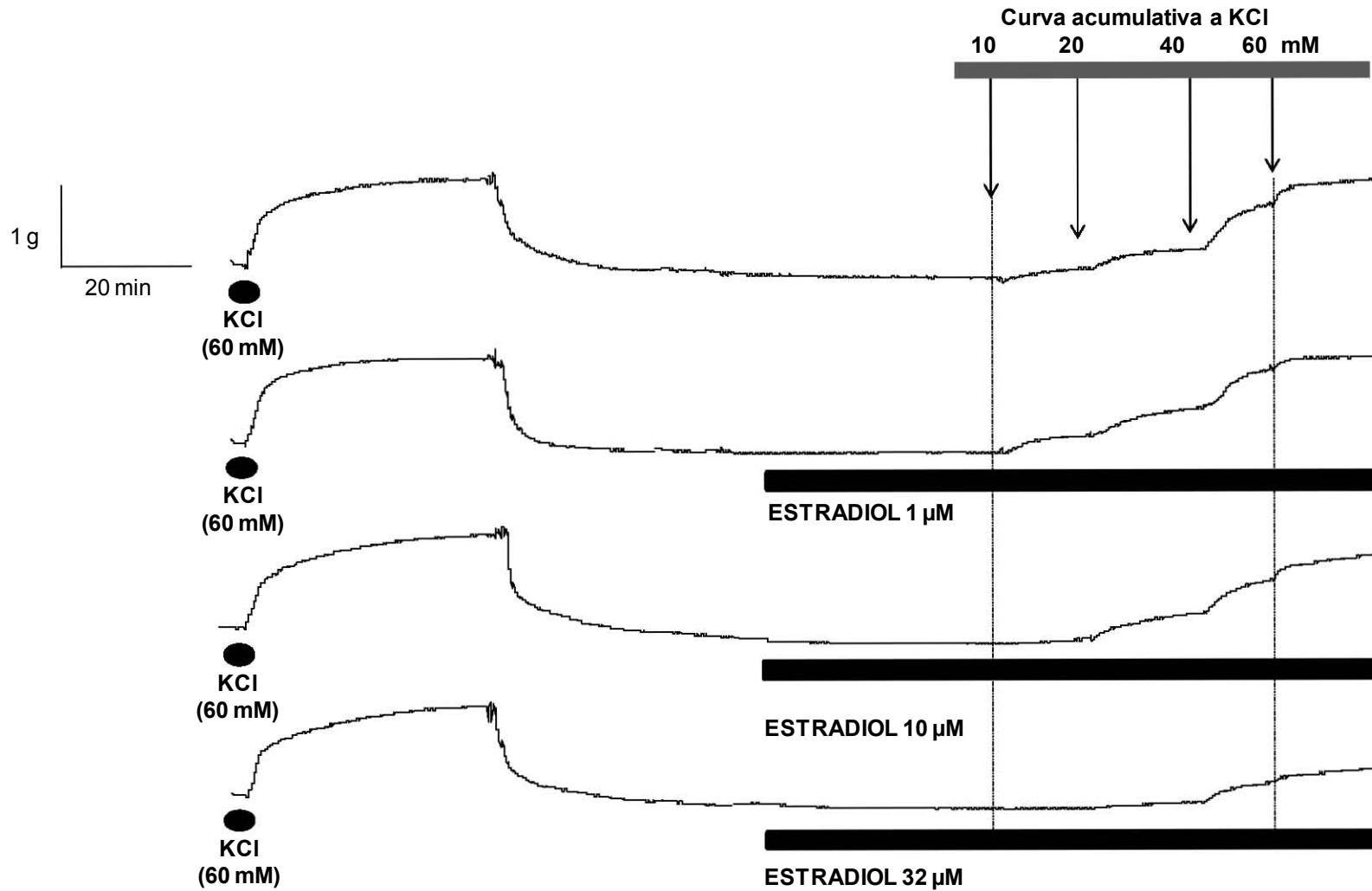


**Figura 9.** Registros originales del protocolo de contracción por una curva acumulativa de Cch, cuando los tejidos son incubados previamente (30 min) con diferentes concentraciones de Estradiol.





**Figura 10.** Registros originales del protocolo de contracción por una curva acumulativa de 5-HT, cuando los tejidos son incubados previamente (30 min) con diferentes concentraciones de Estradiol.



**Figura 11.** Registros originales del protocolo de contracción por una curva acumulativa de KCl, cuando los tejidos son incubados previamente (30 min) con diferentes concentraciones de Estradiol.

## **FÁRMACOS**

La Histamina, el carbacol, la serotonina y el estradiol fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis. Montana, EUA) y fueron disueltos en agua desionizada (desionizador, Milli-Q Academic A10, EUA). El estradiol fue disuelto en etanol (Sigma-Aldrich, St. Montana, EUA).

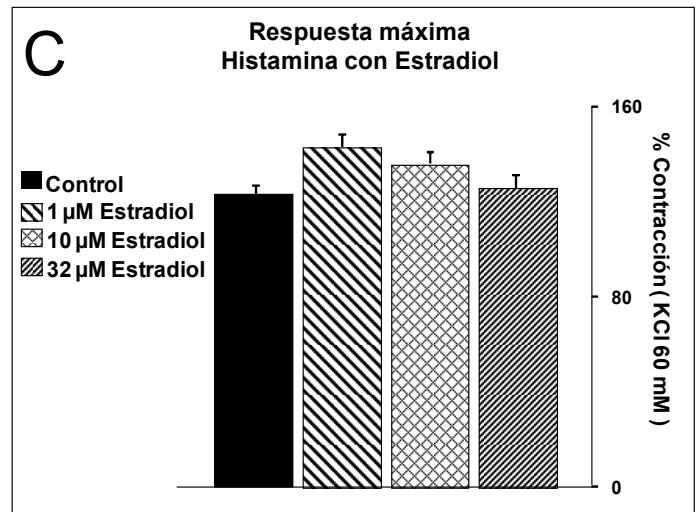
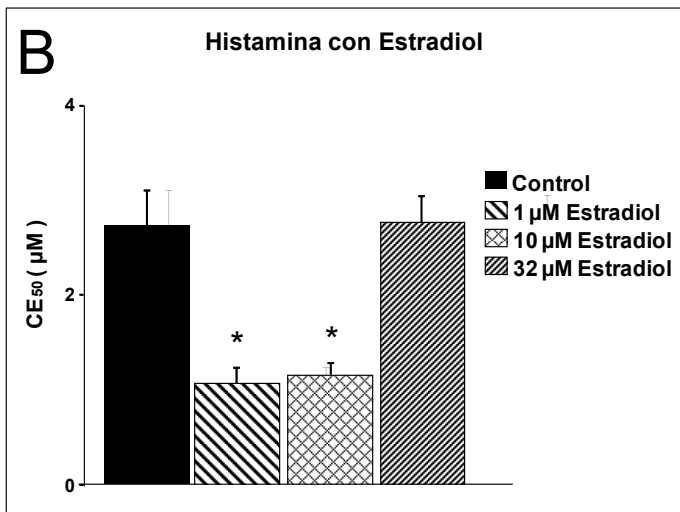
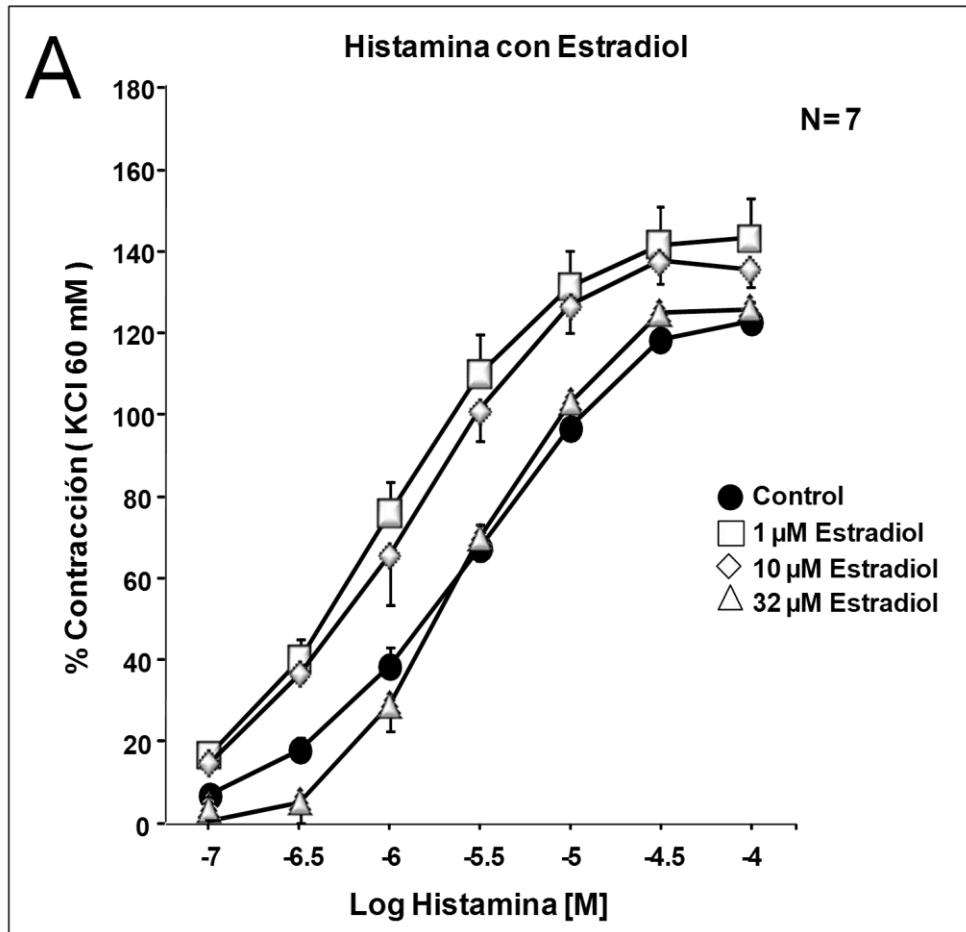
## **ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

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 bimarginal. Todos los experimentos se realizaron por lo menos 5 veces. Los resultados se expresaron con el promedio  $\pm$  el error estándar de la media (EEM).

## RESULTADOS

### 1. El estradiol produce un corrimiento a la izquierda (hiperreactividad) en la respuesta de contracción inducida por la His.

La administración de His al tejido traqueal indujo una respuesta de contracción que fue dependiente de la concentración utilizada ( $10^{-7}$  - $10^{-4}$ ) como se muestra en la Figura 12 A. La incubación por media hora con 1 y 10  $\mu\text{M}$  de  $\text{E}_2$ , produjo un desplazamiento a la izquierda de la curva concentración-respuesta a His (1 y 10  $\mu\text{M}$ ), encontrándose diferencias significativas en  $\text{CE}_{50}$  (potencia) cuando se compararon con respecto al control (Figura 12 B y Tabla 1). En la respuesta máxima (eficacia) no hubo diferencia (Figura 12 C y Tabla 2). Mientras que los tejidos incubados con 32  $\mu\text{M}$  no se observan efectos en las contracciones.



**Figura 12. A)** Curva concentración-respuesta a His en anillos traqueales de cobayo, incubados a diferentes concentraciones de Estradiol. **B)** Análisis respectivo de CE<sub>50</sub>, (n = 7) \*p< 0.05 utilizando ANDEVA y prueba de Dunnet. **C)** Análisis de la respuesta de contracción máxima.

<b>Tabla 1. Potencia de His con Estradiol (*p&lt;0.05)</b>				
<b>N=7</b>	<b>Control</b>	<b>Estradiol [ 1 <math>\mu</math>M ]</b>	<b>Estradiol [ 10 <math>\mu</math>M ]</b>	<b>Estradiol [ 32 <math>\mu</math>M ]</b>
<b>CE<sub>50</sub> [<math>\mu</math>M]</b>	2.7386 $\pm$ 0.3635	<b>1.0692 <math>\pm</math> 0.1654</b>	<b>0.1814 <math>\pm</math> 0.2728</b>	2.7624 $\pm$ 0.2886
<b>r</b>	0.9811	<b>0.9850</b>	<b>0.9808</b>	0.9828

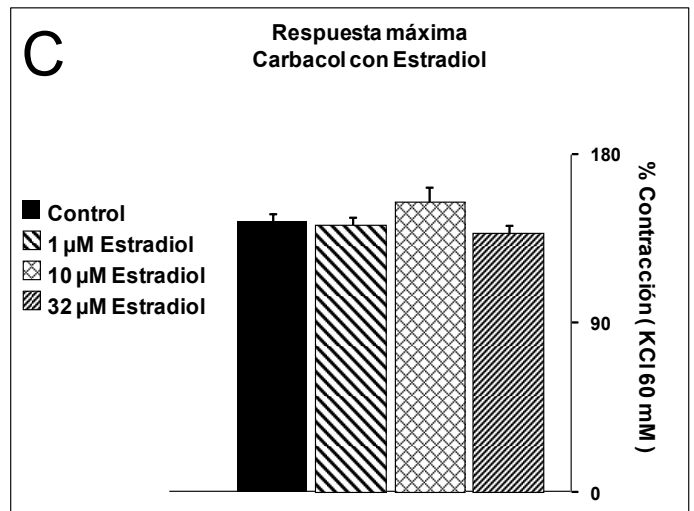
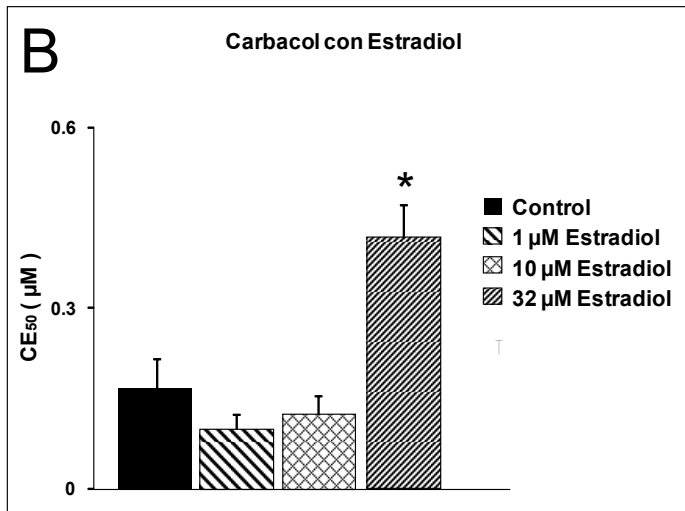
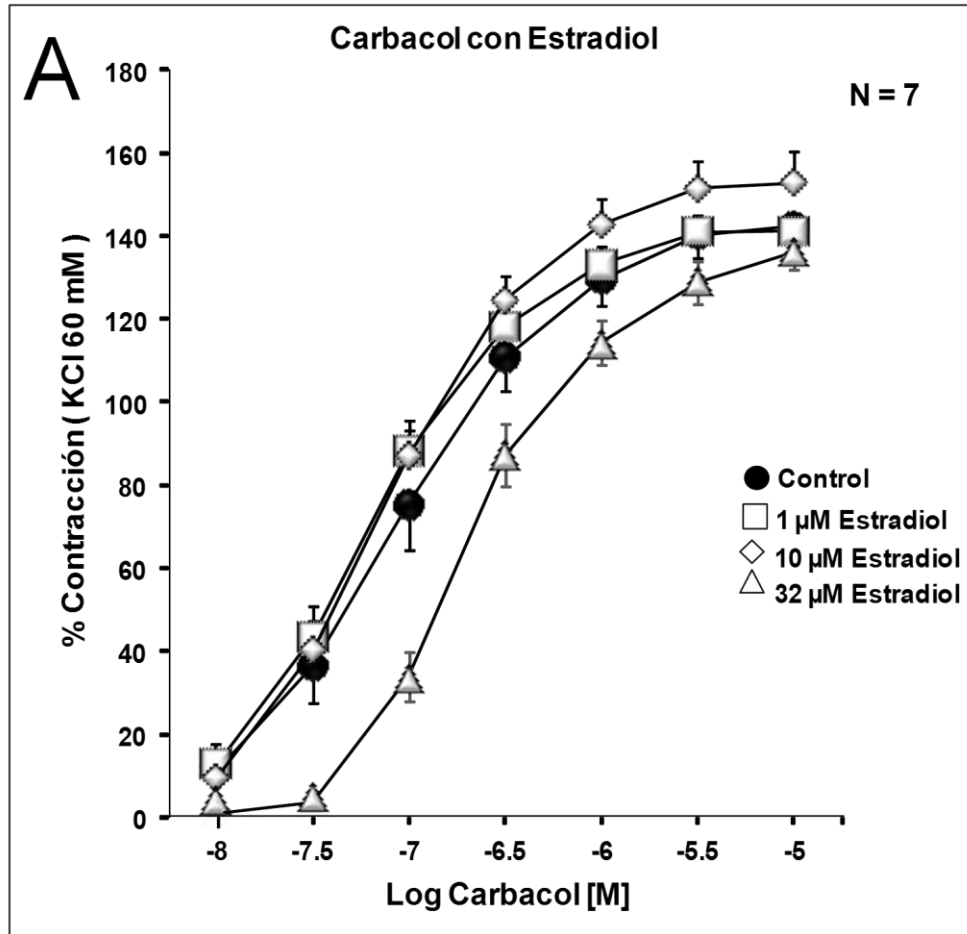
<b>Tabla 2. Eficacia de His con Estradiol (*p&lt;0.05)</b>				
<b>N=7</b>	<b>Control</b>	<b>Estradiol [1 <math>\mu</math>M]</b>	<b>Estradiol [10 <math>\mu</math>M]</b>	<b>Estradiol [32 <math>\mu</math>M]</b>
<b>RM %</b>	122.91 $\pm$ 4.0009	143.05 $\pm$ 5.0050	135.90 $\pm$ 3.5557	117.15 $\pm$ 3.6182

Para corroborar el efecto del E<sub>2</sub> sobre los agonistas contráctiles acoplados a una proteína G<sub>q</sub>, realizamos los mismos experimentos, pero ahora en presencia de un análogo de la Ach, el Cch, y la 5-HT, ya que las vías de señalización y los mecanismos responsables de la contracción del MLVA, difieren con la inducida por la His y sería importante explorarlas, debido a que la Ach y la 5-HT participan de forma constante en la broncoconstricción de las vías aéreas.

## **2. El Estradiol a 32 $\mu$ M produce un corrimiento a la derecha (relajación) en la contracción inducida por el Cch.**

La administración con Cch al músculo liso traqueal de cobayo, produce una respuesta de contracción dependiente de la concentración usada ( $10^{-8}$ - $10^{-5}$ ) (Figura 13 A). La curva concentración-respuesta al Cch se desplazó a la derecha en la preparación que estuvo preincubada con E<sub>2</sub> 32  $\mu$ M por 30 min (figura 13 A). Se encontraron diferencias significativas en la potencia a 32  $\mu$ M de E<sub>2</sub> con respecto al control (Tabla 2 y Figura 13 B), es decir, hubo hiporreactividad. Por lo tanto, necesito mayor cantidad de Cch, para producir un efecto contráctil, ya que el estradiol previene parcialmente su efecto. Para la eficacia no hubo diferencias significativas con respecto al control en los tejidos incubados con diferentes concentraciones de

E<sub>2</sub> (Figura 13 C). Los tejidos pre incubados con 1 y 10  $\mu$ M no tuvieron efecto en la curva a Cch.



**Figura 13. A)** Curva concentración-respuesta a Cch en anillos traqueales de cobayo, incubados a diferentes concentraciones de Estradiol. **B)** Análisis respectivo de CE<sub>50</sub>, (n = 7) \*p < 0.05 utilizando ANDEVA y prueba de Dunnet. **C)** Análisis de la respuesta de contracción máxima.



<b>Tabla 3. Potencia de Cch con Estradiol ( *p&lt;0.05)</b>				
<b>N=7</b>	<b>Control</b>	<b>Estradiol [ 1 <math>\mu</math>M ]</b>	<b>Estradiol [ 10 <math>\mu</math>M ]</b>	<b>Estradiol [ 32 <math>\mu</math>M ]</b>
<b>CE<sub>50</sub> [<math>\mu</math>M]</b>	0.1695 $\pm$ 0.0477	0.0985 $\pm$ 0.0238	0.1262 $\pm$ 0.0298	<b>0.4185 <math>\pm</math> 0.0540</b>
<b>r</b>	0.9405	0.9474	0.9576	<b>0.9543</b>

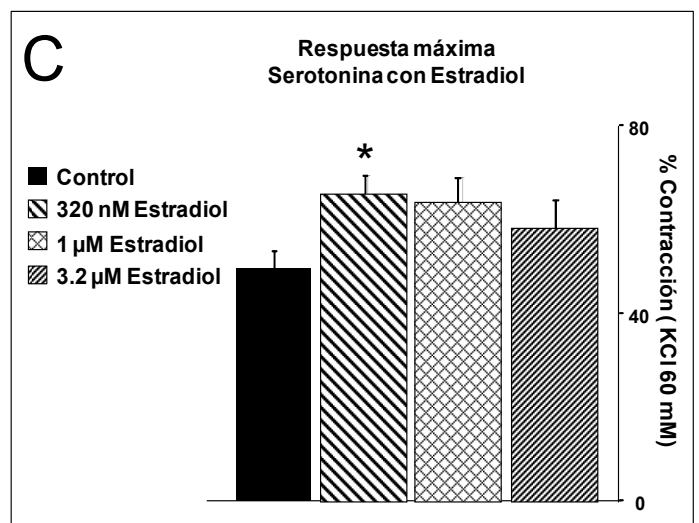
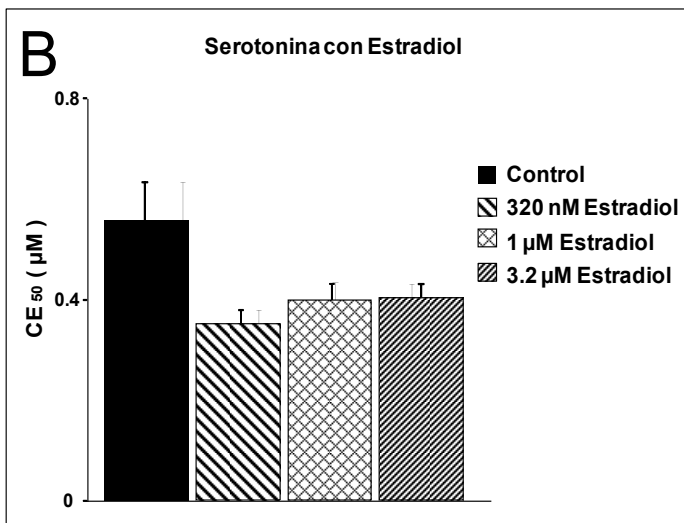
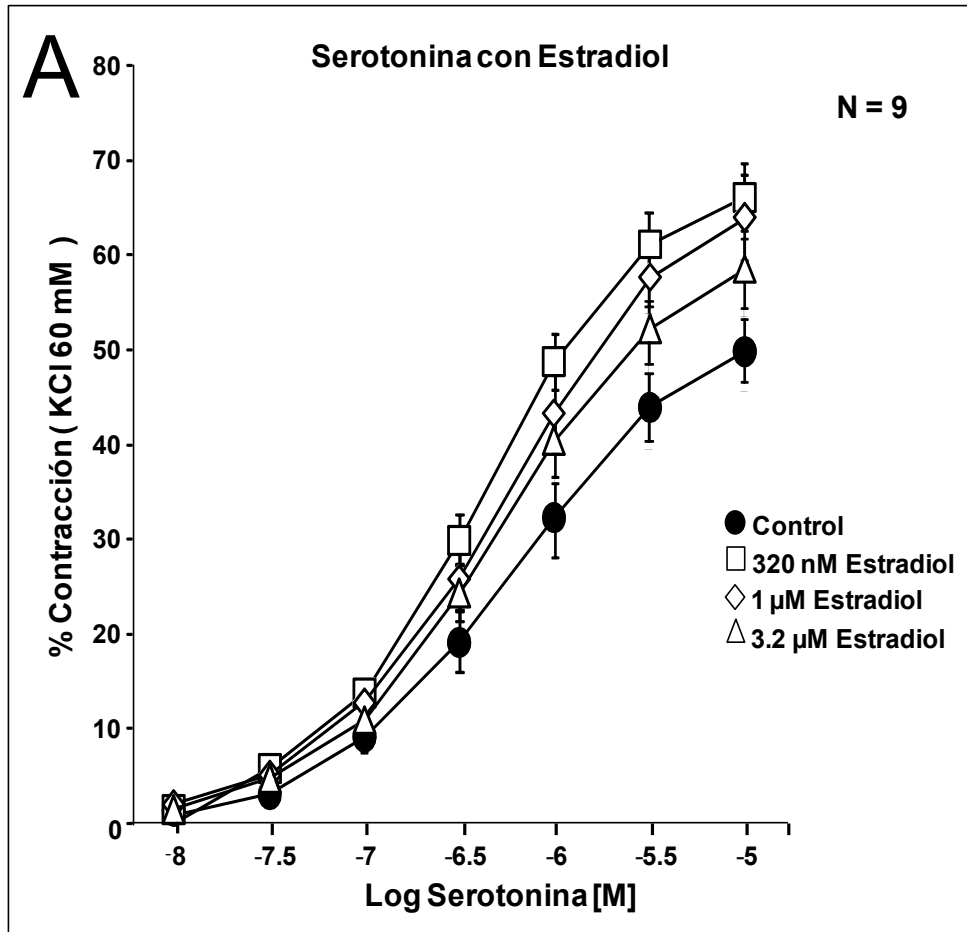
<b>Tabla 4. Eficacia de Cch con Estradiol (*p&lt;0.05)</b>				
<b>N=7</b>	<b>Control</b>	<b>Estradiol [ 1 <math>\mu</math>M ]</b>	<b>Estradiol [ 10 <math>\mu</math>M ]</b>	<b>Estradiol [ 32 <math>\mu</math>M ]</b>
<b>RM %</b>	144.03 $\pm$ 3.9515	142.20 $\pm$ 4.3163	154.49 $\pm$ 7.8612	137.80 $\pm$ 4.3200

Para ayudar a dilucidar y comprender de mejor forma la manera en que el estradiol produce su efecto y dado que los resultados hasta ahora son contradictorios, expusimos los tejidos a otro agonista contráctil, la 5-HT. Se sabe que la 5-HT tiene 7 subtipos principales de receptores (5-HT<sub>1</sub>-5-HT<sub>7</sub>), de los cuales los 5-HT<sub>1</sub>, 5-HT<sub>2</sub> y 5-HT<sub>3</sub> se encuentran presentes en las vías aéreas (Rang H. *et al.*, 2008), y cada uno tiene una vía de señalización diferente y otro dato importante de la 5-HT, es que produce una contracción bifásica que la hace diferir de forma muy importante con los anteriores agonista utilizados.

### **3. El estradiol a 320 nM desplaza la curva hacia la izquierda (hiperreactividad) cuando el tejido es contraído por 5-HT.**

La administración de 5-HT al tejido traqueal produjo una respuesta de contracción que fue dependiente de la concentración utilizada ( $10^{-8}$ - $10^{-5}$ ) (Figura 14). La curva concentración-respuesta a la 5-HT en presencia de 320 nM E<sub>2</sub>, tuvo un desplazamiento de la curva hacia la izquierda. (Figura 14 A). No se encontraron diferencias significativas en la CE<sub>50</sub> (potencia) con respecto al control (Tabla 4) (Figura 14 B). En la respuesta máxima (eficacia) se encontraron diferencias significativas para los tejidos incubados con 320 nM de E<sub>2</sub> (Figura 14 C). Por lo

tanto, se puede decir que la contracción inducida por 5-HT en presencia de estradiol a bajas concentraciones produce hiperreactividad del MLVA. La incubación de 1 y 3.2  $\mu\text{M}$  de estradiol en los tejidos mostro una tendencia en el incremento a la respuesta máxima, aunque no se observan diferencias significativas.



**Figura 14. A)** Curva concentración-respuesta a 5-HT en anillos traqueales de cobayo, incubados a diferentes concentraciones de Estradiol. **B)** Análisis respectivo de CE<sub>50</sub>, (n= 9) \*p< 0.05 utilizando ANDEVA y prueba de Dunnet. **C)** Análisis de la respuesta de contracción máxima.

<b>Tabla 5. Potencia de 5-HT con Estradiol ( *p&lt;0.05 )</b>				
<b>N=9</b>	<b>Control</b>	<b>Estradiol [ 320 nM ]</b>	<b>Estradiol [ 1µM ]</b>	<b>Estradiol [ 3.2 µM ]</b>
<b>CE<sub>50</sub> [µM]</b>	0.5586± 0.1421	<b>0.3512± 0.0281</b>	<b>0.3959± 0.0378</b>	0.4005 ± 0.0316
<b>r</b>	0.9777	<b>0.9802</b>	<b>0.9771</b>	0.9737

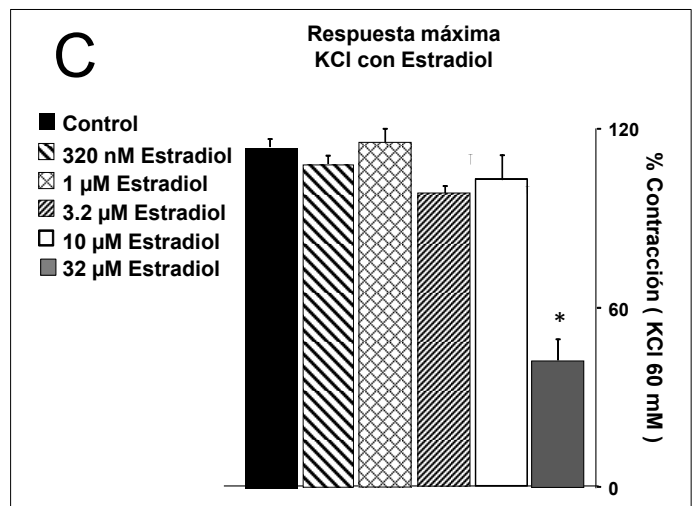
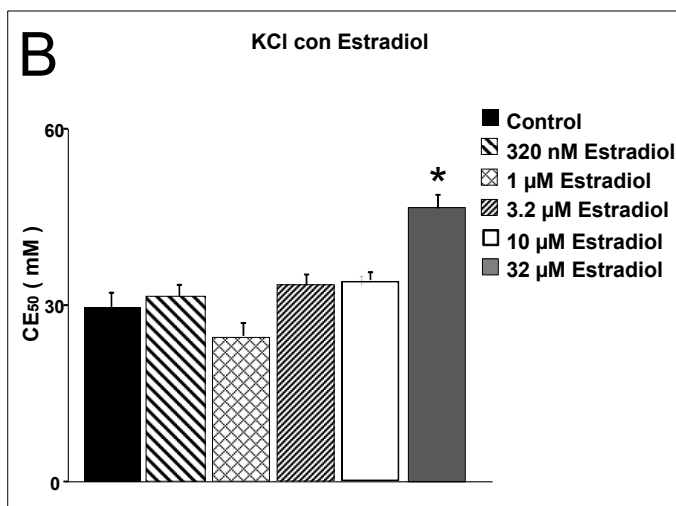
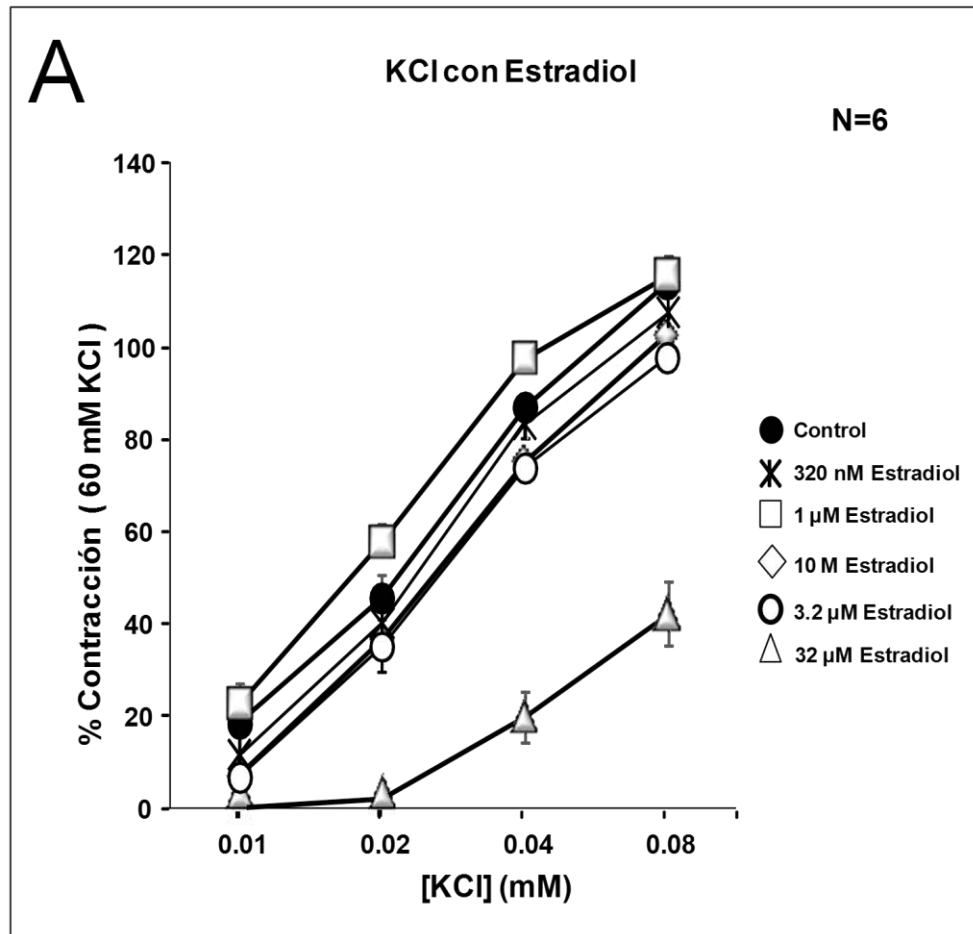
<b>Tabla 6. Eficacia de 5-HT con Estradiol (*p&lt;0.05)</b>				
<b>N=9</b>	<b>Control</b>	<b>Estradiol [320 nM]</b>	<b>Estradiol [1 µM]</b>	<b>Estradiol [3.2 µM]</b>
<b>RM %</b>	49.8444	<b>65.8067</b>	64.0438	58.5468
<b>EEM</b>	3.6416	3.8192	5.1976	5.8628

Para conocer y descartar el efecto del E<sub>2</sub> sobre sustancias constrictoras que no dependen de la activación de receptores acoplados a proteínas G<sub>q</sub>, se realizaron experimentos donde se utilizó el KCl. Cuando el MLVA es estimulado in vitro con diferentes concentraciones de Alto K<sup>+</sup> se depolariza, induciendo la apertura de los canales de Ca<sup>2+</sup> dependientes de voltaje tipo L (VDCCL). Al ocurrir una depolarización se promueve la entrada de Ca<sup>2+</sup> e inician los procesos que nos llevan a la contracción del MLVA. El aumento en la concentración de KCl en el medio extracelular cambia el potencial de membrana aproximadamente de -60 mV a -20 mV (Liu *et al.*, 2005).

#### **4. Efecto del E<sub>2</sub> sobre la respuesta de contracción inducida por KCl.**

El KCl produjo en el tejido una despolarización del MLVA y una subsecuente contracción que fue dependiente de la concentración utilizada (10, 20, 40 y 80 mM) (Figura 15). La incubación con E<sub>2</sub> 32 µM disminuyó significativamente la curva concentración-respuesta

a KCl (10, 20, 40 y 80 mM) (Figura 15 A). Se encontraron diferencias significativas en la potencia y en la eficacia para 32  $\mu$ M de E<sub>2</sub> con respecto al control (Tabla 3), (Figura 15 A y B). Estos resultados concuerdan con los encontrados en la literatura ya que es bien conocido que el estradiol bloquea a los VDCC-L y produce un efecto relájate, en el músculo liso de las vías aéreas (Townsend A., et al., 2010). En la incubación con E<sub>2</sub> menores a 32  $\mu$ M no se encontraron diferencias significativas para la potencia y la eficacia con respecto al control.



**Figura 15. A)** Curva concentración-respuesta de KCl en anillos traqueales de cobayo, incubados a diferentes concentraciones de Estradiol. **B)** Análisis respectivo de CE<sub>50</sub>, ( n=6 ) \*p< 0.05 utilizando ANDEVA y prueba de Dunnet. **C)** Análisis de la respuesta de contracción máxima.

**Tabla 7. Potencia de KCl con Estradiol (\*p<0.05)**

<b>N=6</b>	<b>Control</b>	<b>Estradiol [ 320 nM ]</b>	<b>Estradiol [ 1 µM ]</b>	<b>Estradiol [ 3.2 µM ]</b>	<b>Estradiol [ 10 µM ]</b>	<b>Estradiol [ 32 µM ]</b>
<b>CE<sub>50</sub> [µM]</b>	29.6236 ± 2.7167	31.4361 ± 2.0758	24.4201± 2.1518	33.3392 ± 1.6361	33.8995± 1.2217	<b>46.6592 ± 2.2151</b>
<b>r</b>	0.9502	0.9310	0.9313	0.9397	0.9457	<b>0.9745</b>

**Tabla 8. Eficacia de KCl con Estradiol (\*p<0.05)**

<b>N=6</b>	<b>Control</b>	<b>Estradiol [ 320 nM ]</b>	<b>Estradiol [ 1 µM ]</b>	<b>Estradiol [ 3.2 µM ]</b>	<b>Estradiol [ 10 µM ]</b>	<b>Estradiol [ 32 µM ]</b>
<b>RM %</b>	113.98 ± 2.5273	107.99 ± 3.3762	115.63 ±4.2514	98.06 ± 2.5278	103.00 ± 8.0381	<b>42.3458 ± 6.7772</b>

## DISCUSIÓN

Estudios epidemiológicos sugieren que los estrógenos endógenos modifican la función pulmonar en mujeres posmenopáusicas, estos datos indican que pueden influir en la reactividad de las vías aéreas y en la severidad del asma; esta patología es más común en mujeres adultas en comparación con los hombres (Marco *et al.*, 2000; Melgert *et al.*, 2007; Prakash *et al.*, 2006; Townsend *et al.*, 2010). Por otra parte, las mujeres adultas experimentan cambios en la gravedad de los síntomas y el número de exacerbaciones asmáticas con los cambios en el estado hormonal (diferentes fases del ciclo menstrual, el embarazo y la menopausia). Estas evidencias clínicas sugieren un papel para los esteroides sexuales (especialmente los esteroides sexuales femeninos) en la reactividad de las vías respiratorias.

Los resultados de la presente tesis muestran que el E<sub>2</sub> a concentraciones bajas, tiene la capacidad de inducir un efecto hiperreactor sobre las contracciones generadas por His y 5-HT. Así mismo, también producen un efecto inhibitorio, a concentraciones altas, en la contracción inducida por Cch y alto K<sup>+</sup>.

Recientemente, Flores Soto E. y col, en el 2015, (Aceptado Steroids) reportaron la capacidad que tienen los aminoestrógenos (AEs) (un grupo de estrógenos que

se sintetizan a partir de la estrona, los cuales difieren de los estrógenos naturales al poseer una modificación en el núcleo esteroideo en la posición del carbono 17, donde un grupo OH es substituido por un grupo amino-alcohol) para producir hiperreactividad en el MLVA a diferentes agonistas. Los AEs como pentolame y butolame inducen hiperreactividad a la his, Cch y KCl mediante un mecanismo que favorece la apertura de los VDCC-L. Existe la posibilidad que el E<sub>2</sub> pudiera tener un mecanismo similar para inducir hiperreactividad.

Además es conocido que existen otros mediadores químicos endógenos capaces de producir hiperreactividad en las vías aéreas, como por ejemplo, los Cisteinil-Leucotrienos, el factor de Necrosis Tumoral, TXA<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> y el ATP (Bonner, 1984). En este contexto, el E<sub>2</sub> podría favorecer la liberación de estos mediadores proinflamatorios para inducir hiperreactividad.

En este trabajo, se reporta por primera vez la capacidad que tiene el E<sub>2</sub> (administración única) para producir hiperreactividad en el músculo liso traqueal de cobayo a la His y a la 5-HT pero no al Cch. Sin embargo, Degano B., y col, en el 2003 demostraron que el tratamiento crónico (21 días) con E<sub>2</sub> puede alterar la reactividad de las vías aéreas en ratas hembras ovariectomizadas de manera que depende de la dosis al ser comparado con animales sin tratamiento. A dosis bajas (10 µg/Kg) observaron un decremento en la reactividad *in vivo* de las vías aéreas a la Ach; mientras que a dosis altas (100 µg/Kg) se ve atenuado el decremento de la reactividad a Ach. En los experimentos *in vitro*, encontraron que los anillos traqueales de las ratas tratadas crónicamente con E<sub>2</sub>, la dosis alta de E<sub>2</sub> produjo un corrimiento de la curva concentración respuesta a la Ach hacia la izquierda, es decir, observaron hiperreactividad, mientras que la dosis baja ocasionó un corrimiento de la curva a la Ach hacia la derecha, es decir, hiporreactividad. Asimismo, estos autores no encontraron ninguna diferencia en la curva concentración respuesta cuando usaron otras sustancias como la histamina o el KCl. Una posible explicación a los resultados encontrados por Degano y colaboradores y en el presente estudio es la siguiente: En los experimentos de Degano et al la administración de E<sub>2</sub> fue crónica (21 días), nosotros utilizamos una aplicación aguda



(1 hr). Por lo tanto, los resultados observados por Degano, pudieran deberse a efectos genómicos, mientras que los nuestros son probablemente no genómicos.

Existen también otros estudios en los cuales muestran los efectos del E<sub>2</sub> en la reactividad de las vías aéreas, por ejemplo: Troisi et al., 1995 en un estudio epidemiológico de más de 100,000 enfermeras de los EE.UU, reportó que el uso largo o la terapia de reemplazo con estradiol aumentan los riesgos de sufrir asma, Otro ejemplo sería el de Lieberman et al., en 1995 encontró un pequeño pero significativo empeoramiento del flujo espiratorio máximo entre las mujeres con asma después de comenzar la terapia de reemplazo con estradiol.

Por otro lado existen resultados paradójicos que muestran el efecto contrario del E<sub>2</sub> favoreciendo la relajación; por ejemplo, Townsend y col. en 2012 demostraron que la administración de E<sub>2</sub> en forma aguda reduce los niveles de la [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> inducido por un agonista. La combinación de E<sub>2</sub> (en forma aguda) y un β<sub>2</sub>-adrenergico (isoproterenol), da como resultado una mayor relajación en comparación con tejidos solos tratados con isoproterenol, lo que nos hace pensar que probablemente el E<sub>2</sub> está favoreciendo la activación de un mecanismo AMPc/ PKA. Además, el E<sub>2</sub>, inhibe el flujo de [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> por el bloqueo de los VDCC-L y también activación de los canales de K<sup>+</sup> activados por Ca<sup>2+</sup>, responsables de hiperpolarizar al MLVA y de relajarlo. (Townsend *et al.*, 2011).

El hecho de que el estradiol produce hiperreactividad a la histamina y a la serotonina y no al carbacol y al KCl 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<sup>2+</sup> citosólico. Los mecanismos responsables de incrementar las [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> son variables y dependen del agonista o el agente químico aplicado. La His, Cch y 5-HT tienen receptores acoplados a una proteína Gq, resultando en la liberación de Ca<sup>2+</sup> del RS vía PLCβ/IP<sub>3</sub>, pero existen diferencias en la activación de canales membranales. La His activa los VDCC-L y ROC (Dai et al., 2007), el Cch activa los canales membranales SOC, ROC y VDCC-L, además del intercambiador Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> en su forma reversa (Algara-Suárez., et al., 2007) y la 5-HT activa solo

canales SOC (Hirota *et al.*, 2007). Asimismo, es conocido que la His produce hiperreactividad al ATP vía la producción de COX<sub>2</sub> y que la 5-HT facilita la liberación de ACh de las neuronas colinérgicas parasimpáticas que nos llevan a este fenómeno. Por todo lo anterior, resulta complicado especular los mecanismos por los cuales el estradiol produce hiperreactividad a los diferentes agonistas estudiados en este trabajo.

Recientemente se demostró la presencia de un receptor GPR30 como una nueva proteína de unión al E<sub>2</sub>, diferente a los receptores clásicos de estrógenos (ER $\alpha$  y ER $\beta$ ). Los GPR30 pueden activar vías de señalización no genómicas como, la estimulación del adenilato ciclasa, la transactivación de receptores de factor de crecimiento epidermal,, induce la movilización de Ca<sup>2+</sup> intracelular liberado del RS, activa cinasa de proteínas activadas por mitogenos (MAPK) y la via de PI3K (Prossnitz R. *et al.*, 2007 ).

En base a los múltiples procesos que regulan los GPR30, podríamos postular que el estradiol pudiera activar a un receptor GPR30 en el MLVA, lo cual nos ayudaría a explicar el efecto del E<sub>2</sub> y su posible participación en la hiperreactividad. Este receptor estimula la producción de IP<sub>3</sub>, el cual desencadenaría una liberación de Ca<sup>2+</sup> del RS al citosol, generando los procesos de contracción en mayor magnitud, por lo que sería importante explorar este mecanismo a futuro.

**En Conclusión:** El E<sub>2</sub> produce hiperreactividad a la His en concentraciones de 1 y 10  $\mu$ M, así como a la 5-HT a concentraciones de 320 nM. Además el E<sub>2</sub>, a 32  $\mu$ M, tiene un efecto inhibitorio de la contracción inducida por el Cch y el KCl.

**Perspectivas:**

1. Explorar mediante la técnica de microfluorimetría los mecanismos por los cuales el estradiol induce hiperreactividad a la 5-HT y a la His.
2. Realizar estos mismos experimentos en cobayos hembras ovariectomizadas, para corroborar nuestros resultados obtenidos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Suárez P, Romero-Mendez C, Chrones T, Sánchez-Armass S, Meza U, Sims SM, Espinosa-Tanguma R. Functional coupling between the Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup> exchanger and nonselective cation channels during histamine stimulation in guinea pig tracheal smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2007; 293: L1918.
2. Amado JA., Florez J. Hormonas sexuales: estrogenos, gestágenos, andrógenos y anticonceptivos hormonales. Farmacología humana. 4<sup>a</sup> Edición. Barcelona: Masson, 2003; 887-889.
3. Perkins B, Carbaja V, Sommer B, Macias-Silvia M, González M, Valenzuela F. and L.M Montaña. Involvement of different Ca<sup>2+</sup> pools during the canine bronchial sustained contraction in Ca<sup>2+</sup> free médium: lack of effect of PKC inhibition. *Naunyn Schm Arch Pharmacol* 1998; 358(5): 567-573.
4. Beato M., Chavez S., y Truss M. Transcriptional regulation by steroid hormones. *Stereoids* 1996; 61(4): 240-51.
5. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium Signalling: dynamics, homeostasis and remodelin. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol* 2003; 4: 517-529.
6. Beynon HL., Gorbett ND., Barnes PJ. Severe premenstrual exacerbations of asthma: effect of intramuscular progesterone. *Lancet* 1988; 2: 370-372.
7. Bonner JR. The epidemiology and natural history of asthma. 1984; 5: 557-65.
8. Carmeci, C.,Thompson, D.A., Ring, H.Z., Francke,U.,Weigel, R.J. Identification of a gene (GPR30) with homology to the G-protein-coupled receptor superfamily associated with estrogen receptor expression in breast cancer. *Genomics* 1997; 45, 607–617.
9. Carey MA, Card JW., Voltz JW., Arbes SJ., Gemolec Dr., Korach KS., Zeldin DC. It's all about sex: gender, lung development and lung disease. *Trends Endocrinol Metab* 2007; 18: 308-313.
10. Chandler MH, Schuldheisz S., Phillips BA., Muse KN. Premenstrual asthma: the effect of strogen on symptoms, pulmonary function, and  $\beta_2$  receptors. *Pharmacotherapy* 1997; 17: 224-234.

11. Chhabra SK. Premenstrual asthma. *Indian J. Chest Dist Allied Sci* 2005; 47: 109-116.
12. Dai JM, Kuo KH, Leo JM, Paré PD, Van Breemen C, Lee CH. Acetylcholine-induced asynchronous calcium waves in intact human bronchial muscle hundle. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2007; 36: 600.
13. Degano B., Mourlanette P., Volmary S., Pontier S., Marie-Claude Prevost., Escamilla R. Differential effect of low and high-dose estradiol on airway reactivity in ovariectamized rats. *Respiratory Physiology and Neurobiology* 2003; 138: 265-274.
14. Falkenstein, E., Tillmann, H. C., Christ, M., Feuring, M., and Wehling, M. Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* 2000; 52(4): 513-56.
15. Fawcett D.W. Tratado de Histología. 11ª Edición. México, Interamericana, 1989; 1026 pp.
16. Felder CC. Muscarinic acetylcholine receptors: Signal transduction through multiple effectors. *FASEB J* 1995; 8: 619-625.
17. Fleischmann BK, Wang YK, Kotlikoff MI. Muscarinic activation and calcium permeation of nonselective cation currents in airway myocytes. *Am J Physiol* 1997; 272: C341-C349.
18. Flores-Soto E, Reyes-Garcia J, Sommer B, Montaña LM. Sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> refilling is determined by L-type Ca<sup>2+</sup> and store operated Ca<sup>2+</sup> channels in guinea pig airway smooth muscle. *Eur J Pharmacol* 2013; 5: 721(1-3).
19. Floyd R, Wray S. Calcium transporters and signaling in smooth muscles. *Cell Calcium* 2007; 42 (4-5): 467-76.
20. Global Initiative for Asthma (GINA) *Global strategy for Asthma Management and Prevention*. <http://www.ginasthma.org> 12-02-15.
21. Hall JM, Couse JF, Korach KS. The multifaceted mechanisms of estradiol and estrogen receptor signaling. *J Biol Chem* 2001; 276: 36869–36872.
22. Hanley SP. Asthma variation with menstruation. *Br J Dis Chest* 1981; 75: 306-308.

23. Hirota S., Helli P., Catalli A., Chew A. y Janssen J. Airway smooth muscle excitation-contraction coupling and airway hyperresponsiveness. *J Physiol Pharmacol* 2005; 83: 725-732.
24. Hirota S, Janssen LJ. Store-refilling involves both L-type calcium channels and reversemode sodium-calcium exchange in airway smooth muscle. *Eur Respir J* 2007; 30:269-278.
25. Ho KJ, Liao JK. Nonnuclear actions of estrogen. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2002; 22:1952–1961.
26. Holgate ST. Pathogenesis of asthma. *Clin Exp Allergy* 2008; 38(6): 872-897.
27. Horowitz A., Menice CB. y Morgan KG. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol Rev* 1996; 76: 967-1003.
28. Trowbridge DM., Nelson KG., Bridwel MC., Curtis SW., Washburn TF., McLachlan JA., y Korach KS. Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89(10): 4658-4662.
29. Janssen LJ. Ionic mechanisms and Ca<sup>2+</sup> regulation in airway smooth muscle contraction: do the data contradict dogma?. *J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282:L1161-L1178.
30. Janssen LJ. T-type and L-type Ca<sup>2+</sup> currents in canine bronchial smooth muscle: characterization and physiological roles. *Am J. Physiol* 1997; 272(41): C1757-C1765.
31. Katzung BG. Farmacología básica y clínica. 7ª Edición. San Francisco, EUA, 1999: 326-334.
32. Kelly MJ, Levin ER. Rapid actions of plasma membrane estrogen receptors. *Trends Endocrinol Metab* 2001; 12:152–156.
33. Levin ER. Cell localization, physiology, and nongenomic actions of estrogen receptors. *J Appl Physiol* 2001; 91:1860–1867.
34. Lieberman BA. The estrogen receptor activity cycle: depends on multiple protein-protein interactions. *Crit Rev Eukaryot Gene Expre* 1997; 7(1-2): 43-59.

35. Lieberman D., Kopernik G., Porath A., Lazer S. y Heimer D. Sub-clinical worsening of bronchial asthma during estrogen replacement therapy in asthmatic post-menopausal women. *Journal of the climacteric & postmenopause* 1995; 21: 153-157.
36. Kraft M., DjuKanovic R., Wilson S., Holgate ST., Martín RJ. Alveolar tissue inflammation in asthma. *Am Rev Respir Dis* 1993; 147(3): 697-704.
37. Levin ER. Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors. *Steroids* 2002; 67: 471–475.
38. Marco R., Locatelli F., Sunyer J., Burney P. Differences in incidence of reported asthma related to age in man and woman. A retrospective analysis of the data of the European Respiratory Health Survey. *Am J. Respir Crit Care Med* 2000; 162: 68-74.
39. Martínez Villa Inocencio. Los  $17\beta$ -aminoestrógenos producen hiperreactividad del músculo liso traqueal de cobayo 2014
40. Melgert BN., Ray A., Hylkeman MN., Timens W., Postman Ds. Are there reasons why adult asthma is more common in females?. *Curr Allergy Asthma Rep* 2007; 7: 143-150.
41. Montañó LM., Barajas-López C y Daniel EE. Canine bronchial sustained contraction in  $Ca^{2+}$ -free medium: role of intracellular  $Ca^{2+}$ . *Can J Physiol Pharmacol* 1996; 74(11): 1236-1248.
42. Nemere I., y Farach- Carson M. Membrane receptors for steroid hormones: a case for specific cell surface binding sites for vitamine D metabolites and estrogens. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 248(3): 443-9.
43. O'Dowd, B.F., Nguyen, T., Marchese, A., Cheng, R., Lynch, K.R., Heng, H.H., Kolakowski Jr., L.F., George, S.R., 1998. Discovery of three novel G-protein-coupled receptor genes. *Genomics* 47, 310–313.
44. O'Neill y Ronan. Lo esencial en endocrinología. 4ª Edición Portland; Oregon, 2003: 5-10.
45. Orrego A., Velez H., Rojas W., Borrero J., Restrepo J. Fundamentos de Medicina. Endocrinología. 6ª Edición. Fondo Editorial CIB. Colombia 2004.

46. Owman, C., Blay, P., Nilsson, C., Lolait, S.J., 1996. Cloning of human cDNA encoding a novel heptahelix receptor expressed in Burkitt's lymphoma and widely distributed in brain and peripheral tissues. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 228,285–292.
47. Paoletti P. Application of biomarkers in popular studies for respiratory non-malignant diseases. *Toxicology* 1995; 101; 99-105.
48. Pietras RJ., Arboleda J., Reese DM., Wonquipat N., Pegram MD., Ramon L., Gorman CM., Parker MG., Sliwkowski MX. y Slamon DJ. HER-2 tyrosine Kinasa pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-indepent growth in human breast cancer cells. *Oncogene* 1995; 10(12): 2435-46.
49. Prossnitz R, Arterburn J, Sklar A. GPR30: a G protein-coupled receptor for estrogen. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 265-266: 138-142.
50. Rang H., Dale M., Ritter J. y Flower R. Farmacologia. 6a Edición. Barcelona: Elsevier 2008; 134-142.
51. Razandi M, Pedram A, Park ST, Levin ER. Proximal events in signaling by plasma membrane estrogen receptors. *J Biol Chem* 2003; 278:2701–2712.
52. Rhee SG. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem* 2001; 70: 281-312.
53. Sankay RM, Jones CA, Madison JM, Brown JK. Muscarinic cholinergic inhibition of cyclic AMP accumulation in airway smooth muscle. Role of a pertussis toxin-sensitive protein. *Am Rev Resp Dis* 1989; 130: 145-150.
54. Siddiquis S., Hollins F., Saha S., Brightling CE. Inflammatory cell microlocalisation and airway dysfuntions: cause and effect?. *Eur respire J.* 2007; 30(6):1043-1056.
55. Singer WD., Brown HA. y Sternwes PC. Regulation of eukaryotic phosphatylinositol-specific phospholipase C and phospholipase D. *Annu. Rev Biochem* 1997; 66: 475-509.
56. Somlyo A. y Somlyo A. Ca<sup>2+</sup> sensitivy of smooth muscle and non-muscle myosin II. Modulated by G. Proteíns, kinases and myosin phosphatase. *Physiol Rev* 2003; 83(4): 1325-1358.



57. Takada, Y., Kato, C., Kondo, S., Korenaga, R., Ando, J. Cloning of cDNAs encoding G protein-coupled receptor expressed in human endothelial cells exposed to fluid shear stress. *Biochem. Biophys. Res. Commun* 1997; 240, 737–741.
58. Thomas P, Pang Y, Filardo EJ, Dong J. Identify of an estrogen membrane receptor coupled to a G-protein in human breast cancer cells. *Endocrinology* 2005; 146: 624-632.
59. Tortora G.J and Grabowski S.R. Principios de Anatomía y Fisiología. 9ª Edición. México, Oxford University Press 2003; 783-793 p-p.
60. Townsend A., Thompson MA., Pabelich M. y Prakash YS. Rapid effects of estrogen on intracellular Ca<sup>2+</sup> regulation in human airway smooth muscle. *Am J Physiol Cell Mol Physiol* 2010; 298: L521-L530.
61. Townsend A., Elizabeth A. Townsend, Lucas W. Meuchel, Michael A. Thompson, Christina M. Pabelick, y Y. S. Prakash. Estrogen Increases Nitric-Oxide Production in Human Bronchial Epithelium. *The Journal of Pharmacology and experimental Therapeutics* 2011; 339: 815- 824.
62. Townsend A., Venkatachalem Sathish., Michael A. Thompson., Christina M. Pabelick., e Y.S. Prakash. Estrogen effects on airway smooth muscle involve cAMP and protein kinasa A. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2012; 303: L923-L928.
63. Troisi J., Speizer Frank., Willett W., Trichopoulos D. y Rosner B. Menopause, postmenopausal Estrogen Preparations, and the Risk of Adult-Onset Asthma. *Am J Respir Crit Care Med* 1995; 152: 1183- 8.
64. Wang YX, Fleishmann BK, Kotlikoff MI. M2 receptor activation of nonselective cation channels in smooth muscle cells: Calcium and Gi/Go requirements. *Am J Physiol* 1997; 273: C500- C508.