

UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

**“Efecto de la privación de hormonas ováricas sobre la
reactividad vascular a la 5-HT”**

TESIS QUE PRESENTA

JOSÉ CARLOS VILLEGAS BEDOLLA

PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICO FARMACOBIOLOGO

DIRECTOR DE TESIS

D.C. IGNACIO VALENCIA HERNÁNDEZ

D.C. DANIEL GODÍNEZ HERNÁNDEZ

MORELIA MICHOACÁN, MAYO DEL 2011

Contenido

RESUMEN.....	4
ABSTRACT	5
INTRODUCCIÓN.....	6
MENOPAUSIA DEFINICIÓN Y TIPOS	6
Alteraciones fisiológicas en la menopausia.....	7
Cambios cardiovasculares que ocurren en la menopausia	8
Alteraciones vasculares en la menopausia	10
Papel de los estrógenos en las alteraciones vasculares que ocurren en la menopausia	11
Efecto de la sustitución estrogénica sobre las alteraciones provocadas por la menopausia	13
Terapia hormonal.....	14
Modelos animales de menopausia	16
ESTRÓGENOS.....	18
Definición	18
Síntesis y metabolismo.....	19
Mecanismo de acción de los estrógenos.....	20
CONTROL DEL TONO VASCULAR	25
Papel de la 5-HT en el control del tono vascular.....	27
Papel del Ca^{2+} en la contracción mediada por la 5-HT	32
EFFECTO DE LA MENOPAUSIA SOBRE LA CONTRACCIÓN A LA 5-HT EN MÚSCULO LISO VASCULAR	34
EFFECTO DE LOS ESTRÓGENOS SOBRE LA CONTRACCIÓN A LA 5-HT EN MÚSCULO LISO VASCULAR	35
EFFECTO DEL 17 -ESTRADIOL Y LA MENOPAUSIA SOBRE EL MANEJO DE CALCIO EN EL MÚSCULO LISO VASCULAR.	37
JUSTIFICACIÓN.....	41
HIPÓTESIS	41
OBJETIVOS	42
OBJETIVO GENERAL	42
OBJETIVOS PARTICULARES.....	42
METODOLOGÍA.....	42

Animales de laboratorio.....	42
Procedimiento quirúrgico.....	43
Tratamiento de sustitución con 17 β -estradiol	43
Anillos aórticos.....	44
Protocolo experimental.....	45
Fármacos utilizados	45
Estadística	45
RESULTADOS.....	46
Efecto del tiempo del procedimiento quirúrgico simulado y del verapamil sobre la contracción por la 5-HT en los anillos de aorta de ratas falsamente operadas.	49
Efecto de la ovariectomía y del tiempo postovariectomía sobre la contracción, de los anillos de aorta de rata, inducida por la 5-HT.....	46
Efecto del tiempo de postovariectomía sobre la contracción inducida por la 5-HT en los anillos de aorta de rata en presencia y en ausencia de verapamil.	50
Efecto del 17 β -estradiol, del tiempo de postovariectomía y del verapamil sobre la contracción de los anillos aórticos inducida por la 5-HT.....	47
Efecto del tiempo de postovariectomía y del tratamiento con verapamil sobre la contracción inducida por la 5-HT en los anillos aórticos de ratas tratadas con 17 β - estradiol.....	51
DISCUSIÓN.....	52
CONCLUSIONES.....	52
PERSPECTIVAS	54
BIBLIOGRAFÍA.....	54

RESUMEN

Los receptores 5-HT₂ participan en el control del tono vascular, estos son activados por la 5-HT circulante, lo que provoca la activación de una cascada de señalización que involucra el rompimiento de fosfoinositidos para formar IP₃ y diacilglicerol. El IP₃ incrementa la concentración de Ca²⁺ intracelular proveniente del retículo sarcoplásmico. No obstante, las fuentes externas de Ca²⁺ pueden participar en la reactividad a la 5-HT. Por otro lado, los estrógenos pueden participar en la regulación del tono vascular activando mecanismos genómicos y no genómicos a través de la activación de los receptores para estrógeno (ER α y ER β). Por ejemplo, se sabe que los estrógenos bloquean vías de ingreso de Ca²⁺. A pesar que estas vías se relacionan con el efecto contráctil de la 5-HT, a la fecha se tiene evidencia insuficiente del efecto de los estrógenos sobre el manejo de Ca²⁺ activado por la 5-HT, por lo que el objetivo del presente trabajo fue analizar el efecto de los estrógenos sobre la entrada de Ca²⁺ activada por la 5-HT. Con este fin se construyeron curvas concentración respuesta a la 5-HT en anillos de aorta provenientes de ratas ovariectomizadas (11, 28 y 49 días de postovariectomía) tratadas con vehículo o 17 β -estradiol durante 5 días en la ausencia o en la presencia de verapamil. Los resultados muestran que la 5-HT produjo contracción dependiente de la concentración. Al aumentar el tiempo postovariectomía la reactividad a la 5-HT se reduce. El tratamiento con verapamil reduce la reactividad a la 5-HT solo en el grupo postovariectomía de 11 días y no se modifica en los grupos de 28 y 49 días. El tratamiento con 17 β -estradiol reduce la reactividad a la 5-HT en los grupos postovariectomía de 28 días y dicha reducción es menor en el grupo de 49 días. Con el tratamiento con verapamil estos efectos tienden a desaparecer. Con estos datos podemos afirmar que los estrógenos regulan la reactividad a la 5-HT y que el tiempo de postovariectomía es importante en la terapia de sustitución. En las diferencias encontradas parece contribuir un control sobre el manejo de Ca²⁺ a través de los canales sensibles a voltaje de tipo L.

ABSTRACT

Activation of 5-HT₂ receptors by 5-HT are involved in controlling vascular tone through the activation of a signaling cascade that involves the breakdown of phosphoinositides to form IP₃ and diacylglycerol. IP₃ releases Ca²⁺ from the sarcoplasmic reticulum sources. However, external sources of Ca²⁺ would participate in the 5-HT effect. On the other hand, estrogen may be involved in the regulation of vascular tone by activating genomic and nongenomic mechanisms through activation of ER α and ER β estrogen receptors. For example, estrogen is known to block routes of entry of Ca²⁺. Although these pathways are related to the contractile effect of 5-HT, to date there is insufficient evidence about the effect of estrogen on the 5-HT activated-handling of Ca²⁺. The aim of this study was to analyze such effect. In order to do these, concentration response curves to 5-HT in the absence or in the presence of verapamil (10⁻⁶ M) were constructed in aortic rings from ovariectomized rats treated with 17 β -estradiol for 5 days at the end of 11, 28 and 49 days of postovariectomy period. Groups, treated with vehicle (corn oil) or sham, were considered. Results show that 5-HT produced a concentration-dependent contraction. Ovariectomy reduced the contraction of 5-HT in a way that is dependent of the postovariectomy period. Treatment with verapamil reduces reactivity to 5-HT only in the 11 days of postovariectomy group. Treatment with 17 β -estradiol reduces reactivity to 5-HT in the 28 days of postovariectomy group and this reduction is lower in the 49 days group. Such effects are avoid with the verapamil treatment. In conclusion estrogens regulate the reactivity to 5-HT and the time of postovariectomy is important in the estrogen replacement therapy. Control by estrogens in the Ca²⁺ handling through "L" type voltage-sensitive channels seems to contribute to the differences found.

INTRODUCCIÓN

La menopausia es un proceso biológico que se produce como parte del envejecimiento en las mujeres. El aumento de la esperanza media de vida y el descenso de la mortalidad han causado el envejecimiento de la población mundial y, actualmente, las mujeres viven cerca de un tercio de su vida posmenopáusicas.

Durante la menopausia las mujeres están más predispuestas a cambiar sus hábitos y a adoptar estilos de vida saludables. Experimentan cambios físicos y psicológicos durante la perimenopausia y posmenopausia, derivada del envejecimiento e hipoestrogenismo. Es esencial que el médico de cabecera reconozca los síntomas y su impacto en la calidad de vida de las mujeres, ofreciendo un tratamiento cuando sea necesario. La terapia de reemplazo hormonal y su seguimiento se puede realizar en la atención primaria de salud.⁴

MENOPAUSIA DEFINICIÓN Y TIPOS

El comienzo de la transición a la menopausia está marcado por los cambios en el ciclo menstrual y en la duración o la cantidad de menstruación. Posteriormente, los ciclos se pierden, pero el patrón es a menudo irregular a principios de la transición a la menopausia. La menopausia se define *a posteriori* después de 12 meses de amenorrea.²

Menopausia inducida: Cese de la menstruación debido a la pérdida de la función ovárica por extirpación quirúrgica de ambos ovarios (con o sin histerectomía) o daño de la función ovárica por quimioterapia o radiación.

Menopausia prematura: Cuando el cese de la menstruación ocurre a una edad menor a dos desviaciones estándar de la media estimada para una población de referencia. Se acepta la edad menor de 40 años como criterio práctico.

Menopausia tardía: Cuando el cese de la menstruación ocurre después de lo estimado en una población de referencia. Se acepta 54 años de edad como criterio práctico.

Menopausia natural: Último periodo menstrual que ocurre debido a la pérdida de la actividad folicular del ovario. Se diagnostica en retrospectiva, una vez que han transcurrido 12 meses consecutivos de amenorrea, para la cual no exista ninguna otra causa obvia, patológica o fisiológica. (NOM-035-SSA2-2002).¹

Alteraciones fisiológicas en la menopausia

Las mujeres en la transición menopáusica comúnmente reportan una variedad de síntomas; dentro de los que se incluyen los vasomotores (sofocos y sudoración nocturna), los síntomas vaginales, incontinencia urinaria, dificultad para dormir, disfunción sexual, depresión, ansiedad, estado de ánimo lábil, pérdida de memoria, fatiga, dolor de cabeza, dolores en las articulaciones, descalcificación y aumento de peso.⁹ Sin embargo; en estudios longitudinales y después de ajustar por edad y otros factores de confusión; sólo los síntomas vasomotores, los vaginales y los problemas para dormir se asocian con la menopausia. Los síntomas tales como pérdida de la memoria y la fatiga pueden ser debidos a los frecuentes bochornos o a la dificultad para dormir.² Por otro lado, hay evidencia que indica que las hormonas sexuales tienen una influencia importante en la

fisiología cardiovascular. Por ejemplo, la reducción de la reserva de flujo coronario y los bochornos implican a las células musculares lisas (CML).⁷

Cambios cardiovasculares que ocurren en la menopausia

Las enfermedades cardiovasculares representan la principal causa de morbilidad y la mortalidad en las mujeres. Hay evidencia experimental que indica varios efectos ateroprotectores de los estrógenos endógenos, que interfieren con la progresión de la aterosclerosis y la inflamación.⁸ Por otro lado, el infarto al miocardio y el daño cerebral son la principal causa de muerte en la sociedad, con aproximadamente el 50% de la tasa de mortalidad. El periodo de la menopausia parece relacionarse también con la transición hacia un incremento significativo en el riesgo de enfermedades a este nivel. De tal forma, la incidencia de enfermedades cardiovasculares es menor en mujeres premenopáusicas comparadas con la de los hombres de la misma edad. La insuficiencia de hormonas ováricas en la menopausia se correlaciona con un mayor número de eventos cardiovasculares. Por estas observaciones se ha propuesto la hipótesis de que los estrógenos protegen a la mujer de dichas enfermedades. Hay dos grandes grupos de factores de riesgo involucrados en la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares: la constitucional (edad, género, herencia) y adquiridas (la hiperlipidemia, la hipertensión, el tabaquismo, la diabetes). Hay que mencionar que la obesidad juega por sí misma su propio papel, como un factor de riesgo independiente de las ECV.³ Además, las manifestaciones clínicas de la ECV es mucho menor en mujeres premenopáusicas que en hombres ajustando por edad. De hecho, alrededor del 95% de las mujeres desarrollan ECV después

de la menopausia, cuando los niveles de estrógeno endógeno son bajos. En consecuencia, los estrógenos endógenos protegen de la aterogénesis acelerada debido a la obesidad en mujeres adolescentes y adultas en comparación con los hombres.⁸

Con respecto al género, existen un gran número de datos obtenidos de estudios epidemiológicos, clínicos y experimentales que indican variaciones en la incidencia de las alteraciones cardiovasculares. De tal manera que estas alteraciones representan una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en las mujeres menopáusicas y la privación de los estrógenos que ocurre en este periodo de vida de la mujer parece incrementar el riesgo de dichas enfermedades. No obstante, existen distintos estudios a favor y otros en contra de esta asociación. Por ejemplo, se ha demostrado que las mujeres en edad fértil están protegidas contra enfermedades cardiovasculares, protección que desaparece cuando los ovarios dejan de producir estas hormonas durante la menopausia o por la extirpación de los ovarios en mujeres en edad reproductiva. Se tienen antecedentes clínicos sobre la protección de los estrógenos en donde se señalan diferencias de género en enfermedades coronarias desde hace tres siglos, cuando Heberdenn (1802) escribió: “He visto cerca de cien pacientes con angina de pecho, en los que sólo había tres mujeres y un muchacho de 12 años de edad, el resto fueron hombres y rebasaban los 50 años de edad”. Posteriormente, Kalin y Zumoff (1990) realizaron un estudio en el que analizaron datos recopilados por la OMS durante 1987 en una población de 100,000 personas observando la preponderancia del género masculino en las enfermedades coronarias. La relación en la mortalidad

hombre-mujer por enfermedades coronarias en todos los países analizados, fue de 2.24 ± 0.08 , confirmando la influencia del género en estas enfermedades. Con respecto a los valores de presión arterial, se ha demostrado, mediante estudios de monitoreo de 24 horas y ajustando por edad, que los hombres presentan valores más altos que las mujeres premenopáusicas, y que esta diferencia desaparece en la menopausia. Sin embargo, los mecanismos precisos a través de los cuales las hormonas estrogénicas confieren protección cardiovascular en las mujeres no se han aclarado completamente. En este sentido y a pesar de que se han realizado un buen número de ensayos clínicos en relación a los efectos protectores de los estrógenos, datos recientes del estudio ***Women's Health Initiative (WHI)*** no han mostrado un efecto benéfico de los estrógenos sobre la incidencia de las enfermedades cardiovasculares. Estos resultados han sido criticados por la comunidad científica internacional en el sentido de que no se ha tomado en cuenta la variable edad en el estudio, solo considera pacientes mayores de 64 años, ni el tiempo en el que se restaura la terapia de reemplazo.

Alteraciones vasculares en la menopausia

La enfermedad vascular isquémica es la más frecuente causa de muerte entre las mujeres, su prevalencia en comparación con los hombres no aumenta significativamente hasta después de la menopausia cuando se producen cambios importantes en las hormonas sexuales. Las condiciones de riesgo y los hallazgos clínicos indican que la fisiopatología causante de la enfermedad vascular isquémica difiere entre mujeres y hombres. Una serie de condiciones son únicas, por ejemplo en las mujeres, la menopausia a temprana edad, los trastornos

hipertensivos del embarazo, diabetes gestacional, periparto, disección coronaria, el síndrome de ovario poliquístico e hipotálamo. Las mujeres tienen más rígido y pequeño el conducto arterial que los hombres, incluso cuando se ajusta en altura, peso y presión arterial.⁷

Claramente se ve asociada con las resistencias periféricas provocando otra fisiopatología común en la menopausia. Un bochorno es una repentina sensación de calor que suele ser más intensa en la cara, el cuello y el pecho. La duración es variable alrededor de 4 minutos, a menudo se acompaña de sudoraciones profusas que puede ser seguidas de un escalofrío.

La prevalencia de los bochornos se ve aumentada en la transición de la menopausia tardía, y se asemejan a las respuestas de disipación de calor y puede representar la termorregulación anormal por el hipotálamo anterior. El papel de los estrógenos en la patogénesis de este síntoma, no está claro.²

Papel de los estrógenos en las alteraciones vasculares que ocurren en la menopausia

Los estudios epidemiológicos han demostrado las diferencias en la morbilidad y la mortalidad entre hombres y mujeres posmenopáusicas de la misma edad, así como las diferencias en estos dos parámetros entre hombres y mujeres premenopáusicas de la misma edad. Estas diferencias podrían atribuirse a los efectos específicos de las hormonas esteroideas sexuales sobre la función vascular. Los estrógenos y la progesterona son comúnmente considerados como protectores contra las ECV. Mientras que los andrógenos y la testosterona no.

Aunque algunos estudios han establecido que los andrógenos juegan un papel como protectores del desarrollo de enfermedades cardiovasculares.³

Los estrógenos, entre sus múltiples funciones biológicas, ejercen acciones importantes a nivel de los vasos sanguíneos, principalmente a nivel de las células endoteliales y las células musculares lisas. Por ejemplo, en la regulación del tono vascular se ha definido mecanismos de acción directos. De tal forma que en el fenómeno de transición a la menopausia y la menopausia, la pérdida de este control hormonal, juega un papel importante en la etiología de las enfermedades cardiovasculares y sus síntomas. El ambiente hormonal fluctuante en este periodo conlleva alteraciones funcionales que hacen a las arterias más susceptibles a daño. Dentro de estos efectos, se han reportado estudios en vasos sanguíneos aislados de animales de experimentación y de humanos que a nivel de la reactividad vascular los estrógenos provocan un efecto vasodilatador directo. Este efecto puede ser consecuencia de las acciones de esas hormonas sobre la función endotelial y que es dependiente de la vía de la eNOS y consecuentemente del incremento en la producción de NO, así como también por la regulación de la movilización de Ca^{2+} o de los canales de K^{+} membranales. La pérdida de estos mecanismos regulatorios puede explicar de forma parcial algunos de los efectos de la menopausia a nivel cardiovascular. Por ejemplo, se ha descrito que la respuesta vasodilatadora inducida por flujo es de menor magnitud en mujeres postmenopáusicas comparadas con premenopáusicas. Por otro lado, se ha descrito que la menopausia inducida quirúrgicamente provoca un aumento de las resistencias vasculares y de la presión arterial. Efectos que frecuentemente

regresan a sus valores basales con la terapia de reemplazo estrogénica. Poniendo de manifiesto a la insuficiencia ovárica como acelerador de la hipertensión en las mujeres postmenopáusicas. Otros efectos moduladores de los estrógenos que estarían reducidos o ausentes en la menopausia son la modulación que los estrógenos presentan sobre la contracción inducida por distintos agentes como la angiotensina y la serotonina, endotelina, prostanoïdes contráctiles entre otros. En otro estudio realizado en mujeres premenopáusicas que sufrieron ovariectomía bilateral en las que se midió cambios en el flujo sanguíneo en la arteria braquial inducido por la administración de acetilcolina se demostró un menor flujo después de la ovariectomía que regreso a los valores basales después de la terapia de sustitución con estrógenos.

A pesar de que el Ca^{2+} participa en la reactividad vascular inducida por los distintos agentes que mantienen la homeostasis vascular, se cuenta con información limitada en relación al papel del catión en los cambios que la menopausia provoca sobre la mencionada reactividad vascular. Así como si la sustitución estrogénica y el tiempo en que se restaura normalizan dichas alteraciones.

Efecto de la sustitución estrogénica sobre las alteraciones provocadas por la menopausia.

La deficiencia de estrógenos en la postmenopausia se ha asociado con un aumento en las ECV, La terapia hormonal no ha demostrado un beneficio para reducir estas alteraciones y los resultados por lo general no son muy claros.

Terapia hormonal

- **ESTRÓGENOS:** La dosis de estrógeno debe ser la menor que alivie la sintomatología vasomotora, evite la pérdida ósea y prevenga la atrofia urogenital.

Dosis de inicio:

- 0,5-1,0 mg estradiol oral.
- 0,3-0,625 mg estrógenos conjugados.
- 25-50 µg estradiol transdérmico.
- 0,5-1,0 mg estradiol gel.

La dosis puede ser ajustada aproximadamente a los 3 meses dependiendo de la respuesta sintomática.

- **TIBOLONA:** estereroide sintético clasificado como STEAR (regulador tisular selectivo de la actividad estrogénica), Alivia los síntomas vasomotores, protege los tejidos urogenitales, efectos beneficiosos sobre el estado de ánimo, libido y conserva la masa ósea.
- **SERMs (Raloxifeno):** disminuye el riesgo de fracturas vertebrales en mujeres postmenopáusicas osteoporóticas.
- **FITOESTRÓGENOS:** No son considerados medicamentos, por lo que no se exige estudios de eficacia y seguridad. Estudios clínicos publicados no demuestran acción significativa sobre los síntomas vasomotores y sobre el hueso.

La paciente sintomática es la principal beneficiada del tratamiento ya que se pueden emplear diferentes vías de administración:

- La vía oral es la de mayor experiencia. Tiene como desventaja el efecto de primer paso hepático que puede provocar un aumento de factores de coagulación, triglicéridos, angiotensinógeno y proteína C reactiva (PCR).
- La vía transdérmica es de elección en pacientes con hipertrigliceridemia, enfermedad hepática y migraña. No aumenta la PCR y no aumentaría los factores de coagulación, puede ser ventajosa en hipertensas. Tiene como desventaja la posibilidad de irritación dérmica.
- La vía vaginal es adecuada y segura para mujeres con sintomatología urogenital y sin sintomatología climática sistémica.

Hay un grupo de estados clínicos en el que la terapia hormonal puede producir riesgos mayores que beneficios:

- Inicio en edad mayor o luego de largo tiempo de evolución desde la menopausia (en mujeres asintomáticas).
- Estados protrombóticos o trombosis activa.
- Enfermedad coronaria.
- Accidente vascular encefálico.
- Historia personal de cáncer de mama.
- Historia o sospecha de tumor estrógeno - dependiente (hiperplasia endometrial, adenocarcinoma de endometrio o cuello uterino).
- Sangrado uterino de etiología no precisada.
- Insuficiencia hepática aguda.

Para las progestinas:

- En mujeres con útero se debe usar una progestina para proteger el endometrio.
- No se requiere el uso de progestina en pacientes sin útero.
- En esquemas secuenciales la progestina debe ser usada en dosis adecuada por 10-14 días al mes.
- La evidencia médica actual aún no avala el uso de progestinas en ciclos largos cada 3 meses.
- Con dosis baja de sustitución estrogénica se puede utilizar dosis menores de progestina.
- El uso de progestinas por vía vaginal parece una interesante alternativa pero su seguridad aún no se encuentra suficientemente respaldada.
- Existe información creciente que las progestinas comúnmente usadas en TH están involucradas en el riesgo de cáncer de mama y afectan negativamente los factores de riesgo cardiovascular.

No existe un tratamiento alternativo a los estrógenos o estrógeno/progestina tan eficaz en el alivio de la sintomatología y en reducción de fracturas. La indicación de un tratamiento prolongado debe ser revisada anualmente y requiere de una vigilancia estrecha de la paciente.⁹

Modelos animales de menopausia

Es importante que los modelos animales de un padecimiento reproduzcan características del mismo. En el caso de modelos de menopausia se ha descrito el

de la rata ovariectomizada. Por lo tanto es útil conocer si el modelo reproduce un buen número de las alteraciones encontradas en la menopausia humana.

Con este propósito se sabe que la menopausia se caracteriza por una serie de síntomas y alteraciones dentro de los que se encuentran: presencia de síndrome metabólico, en muchos casos sobrepeso u obesidad, dislipidemia, hiperinsulinemia, hipertensión, osteoporosis.¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.¹⁷

Está bien documentado que la osteoporosis se presenta como una complicación de la menopausia en mujeres con deficiencia de estrógenos como consecuencia de una resorción excesiva de hueso y está bien descrito que la rata ovariectomizada presenta una disminución importante en la densidad ósea. Otras alteraciones dentro de las que se incluyen síndrome metabólico, aumento de peso, dislipidemias, hiperinsulinemia, e hipertensión; también se han demostrado en la rata ovariectomizada.

Los estudios con modelos animales, han apoyado la hipótesis de que los esteroides ováricos ejercen importantes acciones de protección en las mujeres, y la ausencia de hormonas vuelve más vulnerables a las mujeres jóvenes a enfermedades cardiovasculares (ECV). Estos modelos experimentales siguen siendo absolutamente esenciales para la investigación. Ha habido intentos para aclarar el efecto cardioprotector de los estrógenos sobre la hipertrofia inducida usando animales ovariectomizados (OVX). Sin embargo, estos modelos rara vez han tenido en cuenta el efecto de la menopausia en el remodelamiento cardíaco

adverso y la transición a la insuficiencia cardíaca. En cualquier caso, no hay modelos animales normotensos que presenten hipertrofia y descompensación con fenotipos posmenopáusicos.⁵

Los datos presentados demuestran que el modelo de la rata ovariectomizada representa un buen modelo de menopausia. Por lo que en el presente trabajo se empleará para estudiar el efecto de dicho padecimiento sobre la reactividad a la 5-HT.¹⁸

ESTRÓGENOS

Definición

Hormonas esteroides de 18 átomos de carbono que se producen principalmente en el ovario y en menor proporción en otros tejidos. Los principales son:

- Estradiol
- Estrona
- Estriol

En la mujer postmenopáusica predomina la estrona, cuya formación ocurre en tejidos periféricos a partir de andrógenos ováricos y suprarrenales (NOM-035-SSA2-2002).¹

Síntesis y metabolismo

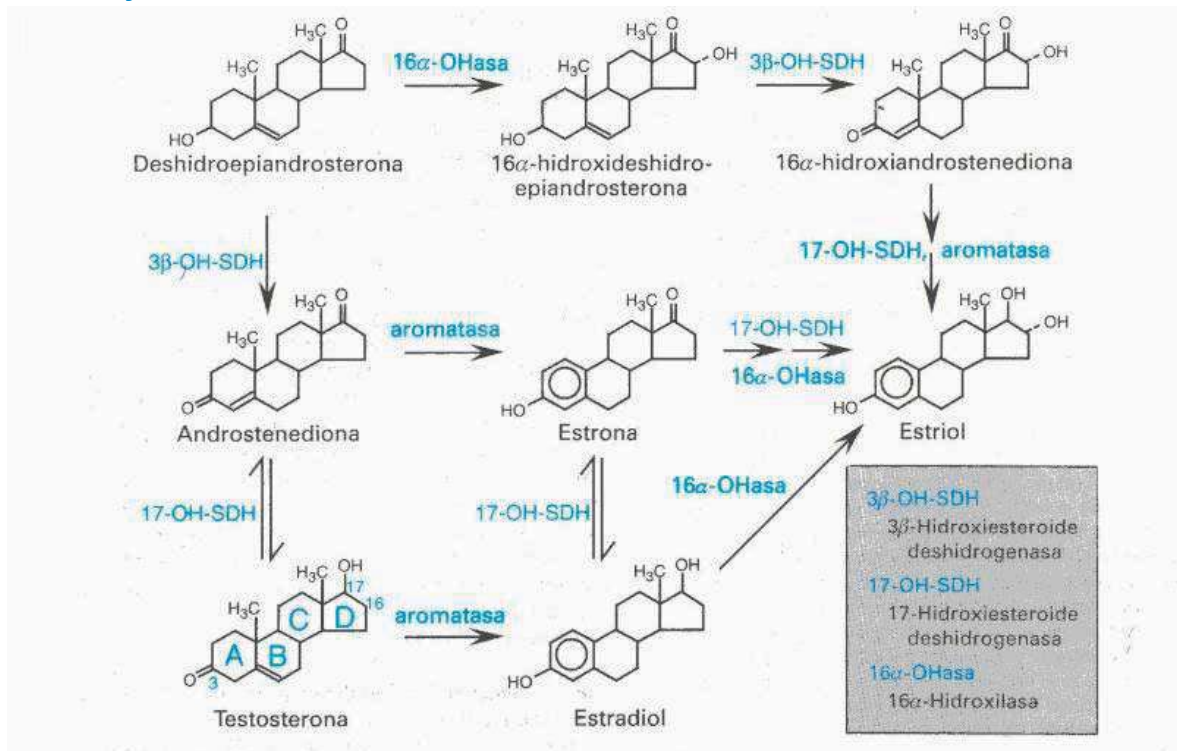


Figura 1. Biosíntesis de estrógenos. Tomado De: Williams C. L. And Stancel G. M. Estrogens And Progestagen. In Goodman and Gilman. The Pharmacological Basis Of Therapeutics Vol. II (Hardman J.G., Limbird L. E., Molinoff P. B., Ruddon R. W. and Gilman A. G. Eds.). Mc Graw-Hill: Interamericana New York, 2006, Pp 1497-1529.

La síntesis de estrógenos parte de la molécula de colesterol donde por acción de la enzima P450_{SCC} (enzima de desdoblamiento de la cadena lateral de colesterol) rompe esa cadena convirtiéndose en pregnenolona por la enzima P450_{17α} (esteroide 17α-hidroxilasa) se transforma en 17α-hidroxipregnenolona y finalmente por la acción de la misma enzima nos queda la deshidroepiandrosterona que es el precursor principal para la formación de estrógenos a partir de las vías esteroidogénicas usadas en la biosíntesis de los corticosteroides. En la figura 1 se aprecia que los estrógenos se forman a partir de varias vías a partir del precursor principal (deshidroepiandrosterona) se puede formar por la androstenediona o

testosterona como precursores inmediatos siendo reacciones reversibles por la acción de la 17-OH-SDH (17-hidroxiesteroide deshidrogenasa), estas reacciones comprenden aromatización del anillo "A" y esta catalizada en tres pasos por un complejo de enzimas monooxigenasas (aromatasa) donde obtenemos estrona y estradiol y estos a su vez son los precursores inmediatos del estriol, reacción catalizada por la enzima 16α -OH_{asa} (16α -Hidroxilasa). Al aromatizar el precursor inicial deshidroepiandrosterona y catalizando con 17-OH-SDH se obtiene también estriol.

La testosterona es un intermediario clave tanto en mujeres como hombres, se convierte en estrógeno por la acción de la aromatasa y al andrógeno más potente, la dihidrotestosterona por la 5α -reductasa. En las mujeres, el estradiol es la forma principal de estrógeno circulante y los niveles circulantes de testosterona son relativamente bajos. En los hombres, la testosterona es el principal andrógeno circulante y los niveles circulantes de estrógeno son mucho más bajos que en los hombres.⁶

Mecanismo de acción de los estrógenos

Los estrógenos ejercen una función primordial en el desarrollo sexual, la reproducción¹² y el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios. Además, posee efectos pleiotrópicos, es decir participa en el control de distintos tejidos, órganos y sistemas. Por ejemplo, ejerce efectos importantes en el sistema cardiovascular. Todos estos efectos se obtienen gracias a que los estrógenos se unen a receptores propios. Tradicionalmente, los receptores de estrógeno se han reconocido como factores de transcripción que regulan la expresión de genes

blanco. En forma adicional, los estrógenos desencadenan efectos rápidos como vasodilatación, efectos antiinflamatorios, regulan el crecimiento y migración de células vasculares y confieren protección a los cardiomiocitos. Estas acciones no requieren de expresión genética o síntesis de proteínas y son independientes de la localización nuclear de los receptores de estrógeno.^{11,12}

Los efectos biológicos de los estrógenos están mediados por tres tipos de receptores: 2 factores de transcripción activados por ligando (los receptores nucleares de estrógenos ER α y ER β), 1 receptor acoplado a proteínas G (GPER o también llamado GPR30) y un tercero ER-X, el cual está pobremente definido. No obstante, se cuenta con evidencia de que los GPER pueden ser semejantes a los nucleares, es decir de dos tipos los ER α y los ER β y pueden estar localizados en el citoplasma y en la membrana celular, y parecen mediar los efectos rápidos de los estrógenos.

Los receptores nucleares ER α y ER β al ser activados por el ligando endógeno activan la transcripción de distintas proteínas. Por ejemplo, estas proteínas participan en la regulación del aparato cardiovascular. El mecanismo de activación inicia cuando un ligando pasa al líquido intracelular y se une al receptor de estrógenos y al ocurrir esto, el complejo formado se transloca al núcleo. Posteriormente, los receptores de estrógeno interactúan con elementos de respuesta a estrógenos en la región promotora de los genes diana, en donde inducen la síntesis de proteínas.

Por otro lado, los estrógenos también pueden interaccionar con subpoblaciones de receptores ER α y ER β asociados a la membrana activando una cascada de señalización intracelular.

Los estudios experimentales sugieren que al menos en ratones, los receptores ER α son responsables de los efectos protectores en las ECV. Por otro lado, la expresión de ER β en los seres humanos se correlaciona con calcificación coronaria y aterosclerosis. Este receptor se expresa en niveles más altos en mujeres posmenopáusicas que presentan aterosclerosis avanzada. Esto podría explicar la pérdida de la respuesta a la administración de los estrógenos sobre las arterias con aterosclerosis. Por el contrario, una deficiencia del ER β así como las mutaciones funcionales pertinentes del gen de este receptor en las mujeres se ha relacionado con el desarrollo de hipertensión. Además, polimorfismos en dicho gen se ha relacionado con un mayor riesgo cardiovascular en mujeres.⁸

Los receptores nucleares para los estrógenos, ER α y ER β , conservan un dominio de unión al DNA. La estimulación de estos receptores por el 17 β -estradiol, u otro agonista estrogénico, induce la interacción del receptor con ciertos elementos de respuesta hormonal en el genoma estimulando la transcripción de distintos genes. Estos efectos son conocidos como mecanismos genómicos de las hormonas sexuales. Una característica de estos receptores es su capacidad de adoptar múltiples estados conformacionales que dependen de la naturaleza del ligando unido. Es decir, cada ligando puede inducir una conformación del receptor diferente. Esto provoca, que dependiendo del ligando, se reclutan distintos

coactivadores y coreceptores al complejo receptor-transcripción, provocando distintos efectos.

A lo largo del tiempo las exigencias ambientales han estructurado distintos dominios para los miembros de esta familia de receptores. De estos, el más conservado durante la evolución es el dominio de unión al DNA, el cual está involucrado en el reconocimiento y unión del DNA. El dominio para la unión del ligando se encuentra en el COOH-terminal del receptor. Existe también un par de dominios que participan en la activación transcripcional, AF1 y AF2. Estos dominios reclutan una gran cantidad de proteínas correguladoras para el receptor unido al DNA. El dominio AF1 se localiza en la región N-terminal mientras que el AF2 en el dominio de unión al ligando, este fragmento permite el cambio conformacional de la proteína inducido por la unión del ligando agonista. Ambos fragmentos de activación de la transcripción pueden actuar de forma sinérgica o independiente en la regulación de la expresión génica como su principal función.

A diferencia de otros miembros de la familia de receptores nucleares, la cavidad de unión con el ligando de los ER permite que ajusten distintas estructuras químicas, dentro de las que se incluyen metabolitos de los estrógenos e incluso algunos contaminantes ambientales también conocidos como disruptores endocrinos. Con respecto a las herramientas farmacológicas para el estudio de los ER se cuenta con distintos antagonistas, por ejemplo: ICI 182,780 (fulvestrant) que no distingue entre ambos tipos de ER; el tamoxifen, antagonista que se ha usado en la clínica para el tratamiento del cáncer dependiente de estrógenos, no obstante puede actuar como agonista mejorando la densidad ósea. Por esta

razón, a estas últimas herramientas se les denomina como moduladores del receptor de estrógenos selectivos ya que pueden actuar como agonista o antagonistas. Con respecto a los agonistas, se han desarrollado dos herramientas que distinguen para cada uno de los ER. El propylpyrazol triol (PPT), selectivo para el ER α ; y el diarylpropionitrilo, selectivo para el ER β .

Con respecto a los efectos rápidos, o mecanismo de acción no genómico de los estrógenos, estos se producen en un lapso de tiempo de segundos a minutos, a diferencia de los genómicos que se requieren de horas para la transcripción. Estas acciones rápidas extranucleares también se han descrito para otras hormonas esteroideas como la progesterona y la aldosterona. Se conoce que la activación de vías de señalización, además de modular la función de las proteínas, también influyen la expresión genética y por lo tanto los niveles de proteínas. Por lo que el término “no genómico” describe no solamente las acciones extranucleares. Por lo que se han sugerido alternativas para describir dichas acciones. Por ejemplo: “señalización de los esteroides iniciada en membrana” y “señalización de los esteroides iniciada en el núcleo”.

A la fecha se aceptan dos alternativas para explicar las acciones rápidas de los estrógenos, una de ellas menciona que los receptores nucleares son los mismos que los membranales, la otra alternativa menciona que son distintos. Sin embargo, aún no se llega a un consenso claro. Se ha descrito que los ER se encuentran en la membrana en estructuras llamadas caveolas, en donde los ER se asocian formando complejos con un buen número de proteínas. En las caveolas se logra

una señalización eficiente debido a que en estas estructuras se encuentran otros complejos de señalización importantes. Mediante estas asociaciones se piensa que los estrógenos pueden disparar un buen número de vías de señalización, como por ejemplo: incluyendo la proteína quinasa activada por mitógeno, 3-cinasa de fosfatidilinositol/Akt, la activación de flujos iónicos a través de canales, la generación de segundos mensajeros mediada por receptores acoplados a proteínas G y la estimulación de receptores del factor de crecimiento.¹⁴

Con respecto a la posibilidad de la presencia en la membrana plasmática de ER distintos a los ya conocidos α y β , se han descrito los GPER (GPR30). No obstante, a nivel vascular la información es limitada. Se conoce que en células COS-7 y en líneas celulares cancerígenas que este receptor se encuentra localizado en el retículo endoplásmico y que su activación por los estrógenos causa movilización de Ca^{2+} intracelular y aumento de 3, 4, 5-trifosfato de fosfatidilinositol. Otros grupos de investigadores lo han descrito localizado en la membrana plasmática. A nivel vascular poco se conoce, por lo que es importante realizar investigación a este nivel para incrementar la información de las acciones rápidas de los estrógenos.

CONTROL DEL TONO VASCULAR

El control en el músculo liso vascular es fundamental para la regulación normal del flujo sanguíneo y la presión y al alterarse esta fuerza, en el control del tono vascular, es común que se desarrollen ECV tales como la hipertensión, insuficiencia cardíaca e isquemia. Se ha aprendido mucho de las vías de

señalización que participan en el equilibrio biológico y que son activadas por distintos agentes tanto vasoconstrictores como vasodilatadores. Por ejemplo, dentro de los agentes vasoconstrictores que participan en el control del tono vascular destacan la angiotensina (sistema renina-angiotensina-aldosterona), la endotelina (control local) la norepinefrina (sistema nervioso simpático) y la 5-HT (liberada de las células enterocomafínicas y de las plaquetas), y dentro de los vasodilatadores el óxido nítrico (control local) entre otros. Sin embargo, estas vías pueden encontrarse alteradas en la enfermedad. Por el contrario, hay poca evidencia de cómo el estado fenotípico de la célula del músculo liso vascular puede influir en la respuesta contráctil a estas vías de señalización que son dependientes del desarrollo, del lecho vascular, del ambiente hormonal, entre otros factores.¹⁵ La presión arterial y la distribución del flujo sanguíneo es un proceso dinámico que depende de la regulación y la coordinación de los cambios en el diámetro de las arterias pequeñas de resistencia y las arteriolas en la microcirculación. Las señales vasomotoras se transmiten entre los diferentes segmentos y ramas de la red microvascular, tal como las señales eléctricas en una red neuronal, lo cual es esencial en la sincronización funcional del lecho microcirculatorio. La comunicación entre las células de la pared de los vasos juega un papel crítico en este proceso, ya que las respuestas vasomotoras generadas en un segmento arteriolar corto se extienden a lo largo de los microvasos a través de la conducción de una señal eléctrica ya sea por las células musculares lisas, las células endoteliales o ambos tipos celulares. Aunque los mecanismos de comunicación intercelular que participan en el control y coordinación de la función

vascular no están bien definidos, se piensa que las uniones comunicantes que conectan las células de la pared del vaso proporcionan la vía intercelular para la conducción de las señales vasomotoras. Dichas uniones comunicantes participan en:

- Los mecanismos celulares y moleculares involucrados en la coordinación de la función microvascular, con especial énfasis en la activación y propagación de las respuestas vasomotoras conducidas.
- Las vías de señalización que participan en el control del tono vasomotor, particularmente, en la regulación molecular de la óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS) y la expresión funcional de canales iónicos en la vasculatura, como por ejemplo: canales de Na^+ , Ca^{2+} o K^+ .
- La directa comunicación intercelular en la pared vascular vía uniones comunicantes y los mecanismos por los cuales estos canales intercelulares participan en el control y coordinación del tono vasomotor.^{19,20}

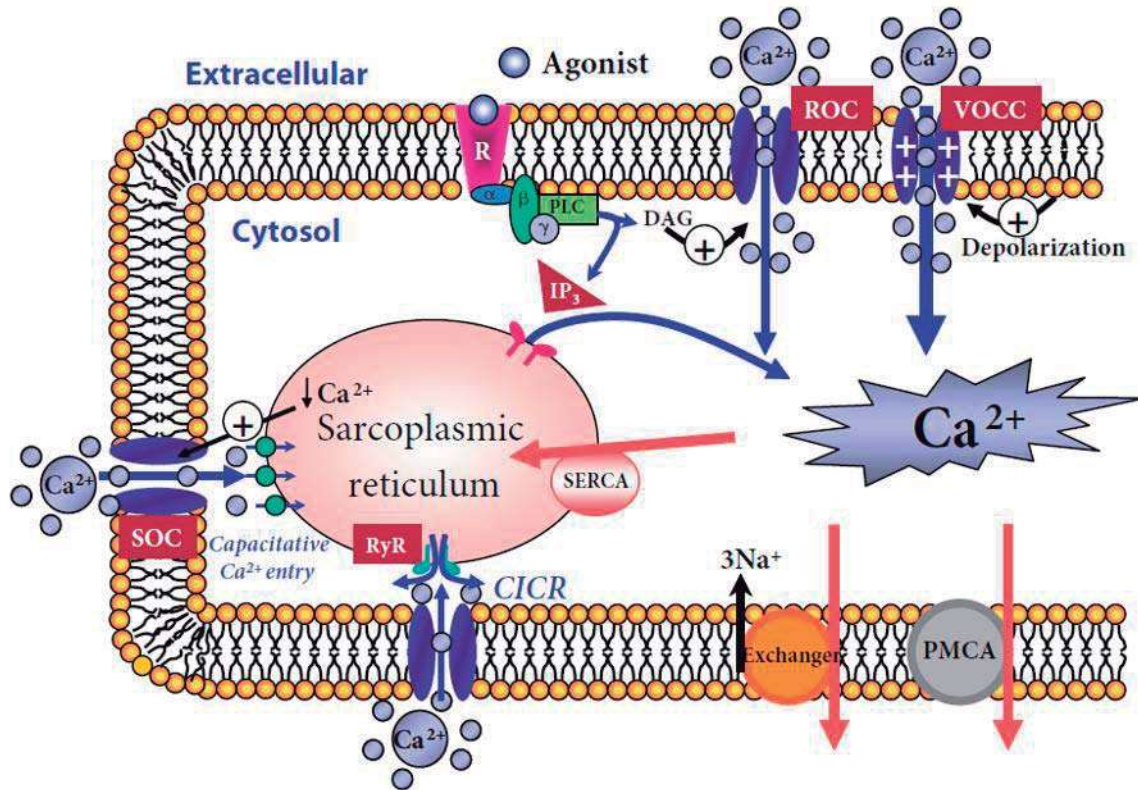
Papel de la 5-HT en el control del tono vascular.

La 5-HT es un efector de varios tipos de musculatura lisa, es un agente que actúa incrementando la agregación plaquetaria y como neurotransmisor en el sistema nervioso central. Se encuentra en altas concentraciones en las células enterocromafines del intestino, en plaquetas y en ciertas regiones del sistema nervioso central.

Los efectos de la 5-HT, los cuales son complejos e incompletamente estudiados, pueden ser explicados gracias a que la amina puede estimular a distintos receptores llamados serotoninérgicos. A la fecha se han descrito 7 tipos de

receptores. Algunos de ellos no representan poblaciones homogéneas ya que se han descrito subtipos para algunos de ellos. Por ejemplo, para los 5-HT₁ se han descrito los subtipos 5-HT_{1A}, 5-HT_{1B}, 5-HT_{1D}, 5-HT_{1E}, 5-HT_{1F}; para los 5-HT₂, los subtipos 5-HT_{2A}, 5-HT_{2B} y 5-HT_{2C}; y para los 5-HT₅, los subtipos 5-HT_{5A} y 5-HT_{5B}. Un resumen de su farmacología se encuentra en las tablas 1 y 2.

Dentro de los receptores que se les ha descrito su presencia y función en músculo liso vascular destacan los receptores 5-HT_{1D} que al ser estimulado por la 5-HT produce contracción de vasos sanguíneos craneales, los 5-HT_{2A} cuya presencia se ha descrito en varios lechos vasculares y se asocian con vasoconstricción y los 5-HT₄ asociando a contracción o vasodilatación de algunos lechos vasculares. En la aorta de la rata el efecto principal de la 5-HT es la vasoconstricción, efecto mediado principalmente por la activación de los receptores 5-HT₂. Por esta en el presente trabajo se hablará fundamentalmente de ellos.



Cogolludo et al. Pharmacol. 79:65-75, (2007)

Los receptores 5-HT₂ participan en el control del tono vascular, estos son activados por la 5-HT circulante, lo que provoca la activación de una cascada de señalización que involucra el rompimiento de fosfoinositidos para formar IP₃ y diacilglicerol. El IP₃ incrementa la concentración de Ca²⁺ intracelular proveniente del retículo sarcoplásmico (tabla 2). No obstante, las fuentes externas de Ca²⁺ pueden participar en la reactividad a la 5-HT.^{13,16}

Las acciones mencionadas en el párrafo anterior son consecuencia de la interacción de la 5-HT con los subtipos de receptores serotoninérgicos 5-HT_{2A} el

resultado de dicha interacción es la contracción del musculo liso vascular. Alteraciones en la función de este receptor se asocian, entre otros mecanismos, con distintas cardiopatías como la hipertensión. A pesar que se conoce que la activación de este receptor por la 5-HT u otros agonistas del receptor conduce a la formación de IP3 y liberación de Ca^{2+} de fuentes internas como el retículo sarcoplásmico, promoviendo de esta manera incremento del tono vascular, los mecanismos que participan en el incremento del tono vascular por la 5-HT no están completamente aclarados. Por un lado, los receptores a la amina requieren de sinergia farmacológica o de otro agonista para inducir sus propiedades contráctiles. Por otro lado se tiene evidencia limitada en relación a la entrada de Ca^{2+} que ocurre por la activación del receptor serotoninérgico y que es sensible al bloqueo por verapamil. El verapamil es un bloqueador de los canales de Ca^{2+} tipo L dependientes de voltaje.¹³

Tabla 1. Receptores para la 5-HT.

RECEPTOR	AGONISTAS	pk _i o pk ₅₀	ANTAGONISTAS	Pk ₅₀ o pk ₅₀	EFFECTOS VASCULARES	DISTRIBUCIÓN*
5-HT _{1A}	S-14671	10.2-10.5	[³ H]NAD 299	9.8		PS, AC, AU, VE, EP.
	Lisurida	9.7-9.8	Rec 15/3079	9.7		
	Roxindol	9.4-9.9	Repinotano	9.4		
5-HT _{1B}	[³ H]Alniditan	8.6-9.0	GR-127935	9.2	Vasoconstricción	HC, HL, AC, MLV, EV.
	Donitriptano	9.7	5-OH-DPAT	8.4		
	Oxymetazolina	9.5	Ketanserina	8.3		
5-HT _{1D}	[³ H]Eletriptano	9.0	Zotepina	9.3		CME, PS, AC, AU, VE, E, GT.
	[³ H]Sumatriptano	8.2	SB 714786	9.1		
	Donitriptano	9.6	Metergolina	8.6-9.2		
5-HT _{1e}	5-HT	8.1-8.2	Metilergonovina	7.0-7.2		CF, GP, AC, AG.
	ORG-5222	8.0	1-Naftilpiperazina	6.7-7.0		
	Naratriptano	7.7	Metiotepina	6.7-7.0		
5-HT _{1F}	[³ H]LY334370	9.4	Metisergida	8.2		C, U (miometrio y endometrio), VE, AU, EP y AC.
	5-HT	8.0	Metilergonovina	7.5		
	LY334370	8.7	1-Naftilpiperazina	7.3		
5-HT _{2A}	5-HT (pk _d)	8.9	[³ H]ketanserina	8.9-9.7	Vasoconstricción	ME, AC, EP, CNS
	ORG-5222	9.6	AC-90179	9.7		
	LSD	9.4	Risperidona	9.3-10.0		
5-HT _{2B}	[³ H]LSD	8.7	RS-127445	9.5		UT, TR, HG, IT, CO, MQ, OV, CB, RÑ, TC, PT, PS, PC
	Metilergonovina	9.3	metiotepina	8.7-9.2		
	Cabergolina	8.9	Ritanserina	8.7-9.2		
5-HT _{2C}	¹²⁵ I]DOI	9.1	[³ H]Mesulergina	8.7-9.3		LF
	YM348	9.0	Metisergida	9.3		
	Ergotamina	8.7	Mesulergina	9.2		
5-HT ₃						
5-HT ₄	[³ H]RS 57639	9.3	[3H]GR 113808	9.6-10.3	Vasoconstricción Vasodilatación	CB, AU, VE, EG, EF, SR, MLR, CL
	5-HT	8.4-8.8	GR 125487	10.6		
	SL65.0155	9.2	RS 100235	8.7-12.2		
5-HT _{5a}	[¹²⁵ I]LSD	9.7	Metiotepina	8.5-8.9		LF
	5-CT	7.9	Ergotamina	8.0-8.7		
	[³ H]5-CT	8.6				
5-HT _{5B}						
5-HT ₆	[³ H]LSD	8.6-8.7	Zotepina	8.9		
	5-HT	7.9	Metiotepina	8.2-9.4		
	LSD	8.4	Clorpromazina	8.4		
5-HT ₇	[¹²⁵ I]LSD	8.9	Risperidona	8.9-9.0		CO, CNS, CL, AG, AO, IT, PC, EG, RÑ
	5-HT	8.1-9.0	Pimozida	9.3		
	5-CT	9.5-9.9	Metiotepina	9.0-9.4		

* AC (coronarias), AG (amígdala), AC (área cortical), AO (aorta), AU (aurículas), CB (cerebro), CF (corteza frontal), CME (corteza de la médula espinal), CNS (sistema nervioso central), CO (corazón), CL (colon), EG (estómago), EF (esófago), EP (epicardio), EV (endotelio vascular), GP (globo pálido), GT (trigémino), HC (hipocampo), HG (hígado), HL (hipotálamo), IT (intestino), LF (linfocitos en reposo), ME (médula espinal), MLV (músculo liso vascular), MLR (músculo liso rectal), MQ (músculo esquelético), OV (ovario), PC (páncreas), PS (próstata), PT (placenta), RÑ (riñón), SR (suprarrenales), TC (testículo), TR (traquea), UT (útero), VE (ventrículos),

<http://www.iuphar-db.org/DATABASE/ObjectDisplayForward?objectId=1>.

Tabla 2. Efecto y vías de señalización tras la activación de los receptores a la 5-HT.

RECEPTOR	FUNCIÓN	VÍAS DE SEÑALIZACIÓN
5-HT_{1A}	Estimula la proliferación celular.	G _i /G _o Inhibición de Adenilato ciclasa
5-HT_{1B}	Vasoconstricción de Arterias coronarias y arteria cerebral cortical	G _i /G _o Inhibición de Adenilato ciclasa
5-HT_{1D}	Crecimiento y liberación hormonal	G _i /G _o Inhibición de Adenilato ciclasa
5-HT_{1e}		G _i /G _o Inhibición de Adenilato ciclasa
5-HT_{1F}		G _i /G _o Inhibición de Adenilato ciclasa
5-HT_{2A}	Vasoconstricción de arterias coronarias. Mejora la activación plaquetaria	G _i /G _o Inhibición de Adenilato ciclasa
5-HT_{2B}		G _q /G ₁₁
5-HT_{2C}		G _q /G ₁₁ estimulación de la Fosfolipasa "C" y G _i /G _o Inhibición de Adenilato ciclasa
5-HT₃		Canal ionico
5-HT₄	Relajación del colon. Estimulación del vaciado gástrico. Estimulación del reflejo peristáltico (contracción ascendente y descendente de relajación). Contracción auricular	G _s estimulación del Adenilato ciclasa, canales de Ca ²⁺ y G ₁₂ /G ₁₃
5-HT_{5a}		G _i /G _o Inhibición de Adenilato ciclasa y G _q /G ₁₁ estimulación de la Fosfolipasa "C"
5-HT_{5B}		
5-HT₆		G _s estimulación del Adenilato ciclasa y G _q /G ₁₁ estimulación de la Fosfolipasa "C"
5-HT₇		G _s estimulación del Adenilato ciclasa

<http://www.iuphar-db.org/DATABASE/ObjectDisplayForward?objectId=1>.

Papel del Ca²⁺ en la contracción mediada por la 5-HT

En la regulación de la respuesta contráctil del músculo liso vascular participan complejos procesos de fosforilación y desfosforilación. La fosforilación de las cadenas ligeras de miocina (MLC) esta mediada por la cinasa de la MLC la cual es dependiente del complejo Ca²⁺-calmodulina. La cinasa, a su vez se activa por el aumento de Ca²⁺ intracelular, el cual es un disparador importante para la vasoconstricción de musculo liso vascular. Sin embargo, está comprobado que la vasoconstricción y la vasodilatación pueden lograrse a una concentración

intracelular de Ca^{2+} constante, lo que indica que la sensibilización y desensibilización de los filamentos contráctiles al Ca^{2+} también contribuyen para el control del tono vascular. En conjunto, dicha regulación esta mediada, entre otros mecanismos, por los cambios de Ca^{2+} intracelular y la sensibilidad al catión por los filamentos contráctiles.

El incremento de las concentraciones intracelulares de Ca^{2+} puede conseguirse a través de dos mecanismos generales que son el ingreso a partir de la fuente extracelular y a partir de la liberación del catión de los depósitos intracelulares, principalmente del retículo sarcoplásmico. En el músculo liso vascular, la activación de los canales dependientes de voltaje de Ca^{2+} del tipo L constituyen las principales fuentes de ingreso de Ca^{2+} . Dichos mecanismos pueden ser disparados por los complejos procesos disparados por la interacción de diversos agonistas contráctiles con sus receptores respectivos. En el caso de la acción contráctil inducida por la 5HT en la aorta de la rata participan mecanismos de liberación de Ca^{2+} de los almacenes intracelulares y posiblemente el ingreso del mismo del espacio extracelular. No obstante, este último mecanismo no ha sido completamente estudiado. Este proceso, en la aorta de la rata, se lleva a cabo por la interacción del agonista por los receptores 5-HT_{2A} , lo que provoca el rompimiento de los fosfoinositidos de membrana para formar inositoltrifosfato (IP3) y diacilglicerol (DAG). El IP3 incrementa la concentración de Ca^{2+} intracelular liberado del retículo sarcoplásmico. Por otro lado, el DAG activa a la proteína cinasa C provocando un incremento en la probabilidad de apertura de los canales de Ca^{2+} a través de un proceso de fosforilación. Se han descrito otros mecanismos

que participan incrementando la concentración intracelular de Ca^{2+} . Uno de ellos es el ingreso a través de los canales operados por receptor (ROC). En el caso de los receptores a la 5-HT, la activación de los receptores del tipo 5-HT₃ provocan la activación del canal y el ingreso no selectivo de cationes monovalentes, no obstante el Ca^{2+} puede permear a través del canal. Otro mecanismo de ingreso es a través de los canales operados por vaciamiento (SOC) de Ca^{2+} . A la fecha se dispone de evidencia insuficiente en relación a si la 5-HT activa este mecanismo en la aorta de la rata. Por otro lado, existen mecanismos que provocan que la célula regrese a sus condiciones de reposo. Dentro de estos mecanismos destacan secuestro de Ca^{2+} en el retículo sarcoplasmico através de ATPasas de Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico (SERCA) y del intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$.^{13,16,22}

EFECTO DE LA MENOPAUSIA SOBRE LA CONTRACCIÓN A LA 5-HT EN MÚSCULO LISO VASCULAR

La hiperreactividad vascular es un fenómeno que ocurre a nivel local en las arterias coronarias. Estas son reactivas a una variedad de agonistas que producen vasoconstricción como la 5-HT y el tromboxano A₂ (TXA₂). Estas sustancias son importantes ya que son liberadas por las plaquetas activas y están involucradas en la modulación del flujo sanguíneo y participan en estados de vasoespasmo coronario. Estos vasoespasmos pueden presentarse incluso en la ausencia de lesión endotelial y de alteraciones del musculo liso vascular. El vasoespasmo provoca disminución del flujo sanguíneo por oclusión coronaria, lo que desencadena la angina de pecho. Estas graves oclusiones coronarias son el sello distintivo de la angina de pecho de *prinzmetal*, pero también se cree que

participan en la muerte súbita cardíaca. Este padecimiento es más frecuente en mujeres posmenopáusicas que cualquier otro segmento de población femenina. La terapia de remplazo hormonal reduce significativamente el riesgo de desarrollar la enfermedad coronaria disminuyendo de esta manera la mortalidad general en mujeres posmenopáusicas. Recientemente se ha establecido que los vasoespasmos en las arterias coronarias pueden ser inducidos en macacos Rhesus hembras ovariectomizadas, mediante la administración de agonistas como la 5-HT y el U46619 (un TXA₂ mimético).²³ Estos datos ponen de manifiesto la participación de ambos agonistas en el desarrollo de la enfermedad coronaria.

EFFECTO DE LOS ESTRÓGENOS SOBRE LA CONTRACCIÓN A LA 5-HT EN MÚSCULO LISO VASCULAR

Los estrógenos se pueden inferir analizando los efectos de la privación de las hormonas ováricas sobre el músculo liso vascular. Por ejemplo, la susceptibilidad incrementa después de la ovariectomía. Este procedimiento quirúrgico reduce los niveles de estrógenos, en el plasma a menos de 10 pg/mL y los niveles de progesterona a 0.1 ng/mL, esto se ha demostrado que provoca en la mayoría de los casos hiperreactividad vascular, que se normaliza cuando se administran dosis hormonales (17 β -estradiol) que restauran los niveles séricos fisiológicos. También la reactividad se mantiene disminuida con la duración del flujo del Ca²⁺ intracelular, en respuesta a la estimulación con la 5-HT, estos estudios nos demuestran la modulación directa de la reactividad vascular por E₂ o progesterona en el tratamiento in vitro. La cual se evalúa por la capacidad de respuesta del Ca²⁺ intracelular y de la PKC a una aplicación breve de supuestas concentraciones de 5-HT en combinación con troboxano A₂. Donde en este

estudio se sacrificaron monos Rhesus OVX adultos (10 a 18 años de edad) en presencia de la combinación de los agonistas (5-HT y tromboxano A₂) después de provocarles vasoconstricción, los cuales fueron tratados con niveles fisiológicos de E₂ o P. Estas hormonas redujeron la capacidad de respuesta del Ca²⁺ intracelular y la respuesta del PKC a 5-HT y tromboxano A₂. Los efectos del E₂ y P. antagonizaron específicamente por ICI 182, 780 y RU486 respectivamente.^{23,24}

Estos resultados experimentales nos indican que los estrógenos ejercen diversos efectos beneficiosos en combinación con un progestágeno sobre la pared vascular, proporcionándole a la mujer cardioprotección en las ECV ya mencionadas. Mas sin embargo una población de mujeres estudiadas en una iniciativa de salud cardiovascular, mostró un aumento de riesgos en padecer ECV para las que se les administraban el estrógeno (E₂) en combinación con un progestina (P) quedando en total controversia el manejo en combinado de estas hormonas para la terapéutica. A lo cual estos estudios siguieren una mejor comprensión de los mecanismos responsables de este fenómeno de cardioprotección en la mujer y dejar para estudios posteriores los efectos de la progestina. La aterogénesis, que se considera un proceso inflamatorio, fibroproliferativa, se puede retrasar por los E₂ a través de regulación a la baja de los marcadores inflamatorios, tales como moléculas de adhesión celular y quimiocinas. El retraso se ve apoyado por la inhibición de la proliferación de células musculares lisas. Además, los estrógenos pueden estabilizar la placa aterosclerótica mediante la reducción de la expresión de las metaloproteinasas de la matriz. La potencia trombogénico de la placa rota puede ser reducido también

por los E2 a través de la síntesis del inhibidor del activador del plasminógeno-1, los propios estudios clínicos sugieren que otros marcadores no endoteliales vasoactivos, como la 5-HT y urodilatina, puede ser positivamente influenciado por los estrógenos.^{23,25}

EFECTO DEL 17 β -ESTRADIOL Y LA MENOPAUSIA SOBRE EL MANEJO DE CALCIO EN EL MÚSCULO LISO VASCULAR.

La actividad eléctrica del músculo liso vascular, provee a las células la capacidad de propagación de los estímulos; así como la inducción del proceso de relajación-contracción del músculo liso vascular. El mecanismo por el cual el potencial de membrana regula el proceso contráctil, involucra la actividad de los diferentes canales de K⁺, [canales de K⁺ dependientes del voltaje (Kv), canales de K⁺ dependientes de Ca²⁺ (KCa²⁺) y de canales de K⁺ dependientes de ATP (KATP)]. Los cambios en el potencial de membrana, tienen un efecto directo sobre la concentración de calcio intracelular, regulando la entrada de calcio al interior de la célula a través de la membrana plasmática mediante canales específicos de calcio, evento que contribuye fuertemente al aumento de la concentración intracelular de calcio y que junto con la liberación de calcio del retículo sarcoplásmico, disparan el proceso de contracción. **Error! No se encuentra el origen de la referencia.** El papel de los estrógenos sobre la actividad eléctrica del MLV y sobre los elementos reguladores de la fisiología cardiovascular ha sido motivo de numerosos estudios. Una de las primeras aproximaciones que se realizaron para analizar estas propiedades, las reportó el grupo de Harder en 1979, en este trabajo se evaluaron *in vitro* los efectos del estrógeno sintético, dietilestilbestrol

(DES), mediante registros intracelulares de la actividad eléctrica de células de arteria coronaria, evaluando el potencial de membrana y los potenciales de acción espontáneos e inducidos por diversos agentes. La incubación de las células durante un período de 15 a 20 minutos con DES (5×10^{-6} M) provocó que el potencial de membrana fuera más negativo (hiperpolarización de 20 mV) en las células musculares, efecto irreversible que fue inhibido en presencia de tetraetilamonio (TEA, 10 mM), un bloqueador de los canales de K^+ y también al aumentar la concentración extracelular de K^+ en el medio de incubación de la arteria coronaria. Resultados que sugieren fuertemente la participación de los canales de K^+ presentes en la membrana del músculo liso vascular. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que los estrógenos tienen efectos también sobre los canales de calcio presentes en el músculo liso vascular. En células aisladas de aorta de rata, tanto el estradiol como DES (10 y 30 μ M, respectivamente) inhiben las corrientes calcio tipo L. Estas sustancias estrogénicas, no tienen efecto sobre los canales catiónicos inespecíficos acoplados a receptores, tales como los activados por ET-1 y vasopresina, lo que sugiere que los estrógenos juegan un papel importante en la modulación del tono vascular, mediante un mecanismo de acción específico, produciendo la inhibición de los canales de calcio tipo L dependientes de voltaje. Además, estos efectos son independientes de endotelio, debido a que el estradiol tiene la capacidad de inhibir la contracción inducida por Bay K8644 (un abridor de canales de calcio) en anillos de arteria coronaria de conejos. Estas observaciones sugieren que las hormonas femeninas alteran el flujo del calcio en el MLV a través de la modulación de los canales de Ca^{2+} .

operados por voltaje. Así mismo el uso de la técnica de patch-clamp en la línea celular A7r5 del MLV mostró que el estradiol (10 μ M) tiene un efecto inhibitorio directo de los canales de calcio dependientes de voltaje, lo que apoya esta hipótesis. Mediante el uso de técnicas de análisis isométrico, en las que se estudió la contracción de anillos de aorta de rata inducida por la aplicación de varios agentes vasoconstrictores como: fenilefrina, 5-Hidroxitriptamina (5-HT), noradrenalina y angiotensina II, el estradiol (5 y 10 μ M) fue capaz de reducir la respuesta de contracción inducida por estos agentes. Estos efectos fueron obtenidos de 30 a 45 minutos de incubación con el estrógeno en preparaciones no dependientes de endotelio, reproducibles y totalmente reversibles. Estas evidencias apoyan la hipótesis de que los estrógenos tienen la capacidad de modificar la actividad contráctil del músculo liso vascular, mediante una interacción directa con la célula muscular, por medio de procesos en los que no se requiere la síntesis de nuevas proteínas. En estos procesos participan los canales de calcio y potasio presentes en la membrana de estas células, elementos importantes para generar y modular el grado de excitabilidad celular del sistema cardiovascular. Los estrógenos participan de manera importante en la regulación de un gran número de factores intrínsecos y extrínsecos del sistema cardiovascular. El tipo y grado de respuesta del sistema cardiovascular ante los estrógenos es muy variable y estará determinada por la concentración sanguínea que se genere de estas sustancias en la circulación cuando se trata de estrógenos endógenos o bien de su administración exógena, así como de otros agentes que alteren su actividad. Es importante resaltar, que las múltiples acciones de estas hormonas sexuales femeninas (independientes de su función reproductiva) venían en función de su

concentración debidas a su regulación de retroalimentación positiva y negativa; por lo que tendrán influencia sobre el gasto cardíaco, la frecuencia de contracción, la resistencia periférica y el grado de contracción ante diversos agentes vasoconstrictores fisiológicos.

En la menopausia se muestran niveles aumentados en la concentración de Ca^{2+} en el citosol, liberado por el estímulo de un agonista a partir del retículo sarcoplásmico y de fuentes externas, también se ha descrito hiperreactividad del catión. Por ejemplo, la 5-HT proveniente de las plaquetas al activar a los receptores 5-HT_2 vasculares provoca vasoconstricción por liberar Ca^{2+} de las fuentes internas e ingreso de las fuentes externas.¹⁶ Se sabe que los estrógenos bloquean vías de ingreso de Ca^{2+} regulando la entrada de este ion en el musculo liso vascular. De tal forma que la privación de estas hormonas en la menomausia provocarían un mayor ingreso del catión y mayor reactividad a la 5-HT. Sin embargo, a pesar de que estas vías se relacionan en este efecto contráctil y de que los estrógenos poseen un efecto inhibitorio en la entrada del catión, a la fecha se tiene evidencia insuficiente del efecto de los estrógenos sobre el manejo de Ca^{2+} activado por la 5-HT.^{24,23}

En relación al papel que juega la menopausia sobre los movimientos de Ca^{2+} inducidos por distintos agonistas como la 5-HT, así como el efecto que tiene la sustitución hormonal y el tiempo en que se aplica no existe información que lo describa. Por lo que es necesario un mayor conocimiento de todos los fenómenos en que participan en estos procesos para poder entender el papel de dichas

hormonas en la regulación cardiovascular y las alteraciones de la menopausia. El incremento en la información en este campo puede ayudar a administrar más racionalmente la terapia de sustitución hormonal en aquellos estados de insuficiencia ovárica.

JUSTIFICACIÓN

La menopausia se asocia a una mayor prevalencia de enfermedades cardiovasculares lo que la hace la causa más frecuente en mortalidad y morbilidad en el género femenino, más que el cáncer ya sea en los Estados Unidos de America o en Europa.²⁶ Estas enfermedades se relacionan con alteraciones vasculares importantes como son una mayor actividad contráctil a distintos agonistas entre ellos a la 5-HT. En general, todos esos agentes contráctiles al ejercer su mecanismo de acción incrementan la concentración de Ca^{2+} intracelular. Aunque se sabe que el tratamiento con 17β -estradiol revierte el incremento del efecto contráctil de la 5-HT inducido por la menopausia y se sabe que el estrógeno bloquea en forma aguda la entrada de Ca^{2+} a través de los canales sensibles a voltaje de tipo L de este ión, se desconoce si dicho tratamiento ejerce su efecto benéfico reduciendo la reactividad a la 5-HT en la menopausia y si este depende de efectos del estrógeno sobre el manejo de Ca^{2+} y del tiempo en que se restaura la terapia de sustitución estrogénica.

HIPÓTESIS

El tratamiento con 17β -estradiol en la postmenopausia reduce la contractilidad a la 5-HT en una forma que depende del tiempo en que se restaura la sustitución de la

hormona y de la magnitud de la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de calcio sensibles a voltaje de tipo L.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Investigar el efecto de la sustitución estrogénica sobre la reactividad a 5-HT en la aorta de las ratas a distintos tiempos postovariectomía.

OBJETIVOS PARTICULARES

1. Evaluar el efecto de la postmenopausia sobre los cambios en la reactividad vascular inducidos por la 5-HT en anillos aórticos de ratas de 11, 28 y 49 días de postovariectomía.
2. Analizar el papel de los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje de tipo L sobre los cambios por la postmenopausia en la contracción a la 5-HT.
3. Determinar el efecto de la sustitución estrogénica con 17β -estradiol sobre los cambios inducidos por la postmenopausia en la contracción a 5-HT.
4. Indagar el papel de los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje de tipo L sobre el efecto de la sustitución estrogénica en la respuesta contráctil a la 5-HT en los anillos aórticos de ratas a distintos tiempos de postovariectomía.

METODOLOGÍA

Animales de laboratorio

Se utilizaron ratas hembra de la cepa Wistar 250 ± 330 g alimentadas con alimento para rata de la marca Purina y agua *ad libitum*, se mantuvieron en

cautiverio en cajas de acrílico en un cuarto a temperatura de 25°C., ciclos de luz obscuridad de 12 por 12 horas. El protocolo de estudio se apegó a los lineamientos éticos para el uso de animales de laboratorio para la investigación y la norma NOM-062-ZOO-1999. El protocolo fue revisado y autorizado por el comité de ética de la escuela.

Procedimiento quirúrgico

Las ratas, bajo anestesia con pentobarbital sódico (40 mg/Kg, I.P.) y previo rasurado y asepsia de la porción dorsal a la altura de la cavidad abdominal con una solución de iodopovidona al 11% (Laboratorios Manuell S.A. México D.F.), se les realizó una incisión en la piel de 1 cm siguiendo la línea sagital 1 cm por debajo del último arco costal. Los ovarios se retiraron a través de dos incisiones dorso-laterales, aproximadamente de 1 cm de largo por encima de los ovarios. Con el uso de una tijera de disección afilada, los músculos dorsales se cortaron para acceder a la cavidad peritoneal. Se utilizó también un grupo de ratas **sham** en las que se realizó la misma operación, pero el abdomen y la piel se cierra sin la eliminación de tejido ovárico. La fascia del músculo recto se cerró con sutura absorbible catgut 4-0, y la piel se cierra con seda 3-0. Las ratas ovariectomizadas se dividieron en dos grupos experimentales, uno de ellos fue tratado con vehículo (aceite de maíz) y el otro con 5 µg/kg/día de 17β-estradiol durante los últimos 5 días de los periodos post-ovariectomía estudiados.

Tratamiento de sustitución con 17β-estradiol

Las ratas ovariectomizadas de 11, 28 y 49 días se dividieron en 2 grupos, a uno de ellos se le administró el vehículo (S.C.) en que se disolvió el 17β-estradiol y el

otro recibió 5 $\mu\text{g/Kg/día}$ de 17β -estradiol (S.C.), ambos tratamientos se aplicaron 5 días antes de que se cumpliera el tiempo de postovariectomía (11, 28 y 49 días).

Anillos aórticos

Al finalizar el tratamiento de sustitución y previa anestesia con pentobarbital sódico (40 mg/Kg, I.P.), las ratas se sacrifican por decapitación, se abre la porción torácica sagitalmente, se localiza la aorta y se disecciona una porción de 4 cm por debajo del cayado aórtico. La aorta se coloca en una caja de Petri llena con solución de Krebs (composición mM: NaCl 118.069, Glucosa 11.66, NaHCO_3 25, KCl 4.7, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.176, KH_2PO_4 1.75, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2.516, Ca-EDTA-Na 0.0267), burbujeada continuamente con carbógeno (95% O_2 y 5% CO_2) a temperatura ambiente, se limpia de tejido graso y se corta en segmentos anulares de 4 mm. A los segmentos aórticos se les remueve el endotelio introduciendo un alambre de acero inoxidable y rodando cada uno de los anillos hacia atrás y hacia adelante sobre una superficie de papel filtro humidificada con solución de Krebs. Los anillos sin endotelio se colocaron en cámara para órgano aislado de 10 mL con la ayuda de un par de ganchos, uno de ellos se introduce a la luz del anillo aórtico y se fija al fondo de la cámara y el otro también se introduce a la luz y se cuelga a un transductor de tensión marca grass (Grass Instrument Co., Quincy, Mass., U.S.A.) el cual se conecta a un polígrafo de la marca BIOPAC (BIOPAC system, Inc. Santa Barbara, Ca., U.S.A.), que se conecta a una computadora que nos permite visualizar en tiempo real los cambios en tensión de los tejidos aórticos. Las cámaras se llenan con solución de Krebs a 37°C , Ph 7.4 y burbujeadas continuamente con carbógeno. Bajo una tensión inicial de 4 g y un

periodo de evaluación de la viabilidad de los tejidos de 1 h en que se aplican 3 retos de fenilefrina (10^{-6} M) separados por periodos de 15 min y varios lavados con solución de Krebs entre reto y reto. La eficacia de remoción de endotelio se hizo aplicando acetilcolina (10^{-6} M) directamente a las preparaciones aórticas precontraídas con fenilefrina en el último reto. Después de 1 h adicional de lavados con solución de Krebs se procedió a seguir el siguiente protocolo experimental.

Protocolo experimental

Se realizaron curvas concentración respuesta acumulativas en los anillos aórticos sin endotelio provenientes de las ratas sham, ovariectomizadas tratadas con vehículo o tratadas con 17β -estradiol a la 5-HT (10^{-7} a 10^{-4} M) tanto en la ausencia como en la presencia de verapamil (10^{-6} M).

Fármacos utilizados

El cloridrato de 5-HT y el 17β -estradiol se obtuvieron de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). La 5-HT se disolvió en agua destilada a una concentración de 10^{-2} M posteriormente se hicieron diluciones de concentración 10^{-3} , 10^{-4} y 10^{-5} M. El 17β -estradiol se disolvió en aceite de maíz a una concentración de 1 mg/mL, a partir de esta solución se preparó una dilución de concentración 5 μ g/mL, la cual se empleó para administrar las dosis diarias del estrógeno. Ambas soluciones se preparaban el día de uso.

Estadística

Los resultados son expresados como la media $\pm$ el error estándar de la media de 6 experimentos. Para establecer diferencias estadísticamente significativas se realizó análisis de varianza de uno o dos factores, según corresponda. El

contraste de medias se realizó aplicando la prueba de Tukey. En el caso de las comparaciones de los valores de la CE_{50} se realizó la prueba t de student. En todos los casos, se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando se obtuvo un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS

Efecto de la ovariectomía y del tiempo postovariectomía sobre la contracción, de los anillos de aorta de rata, inducida por la 5-HT.

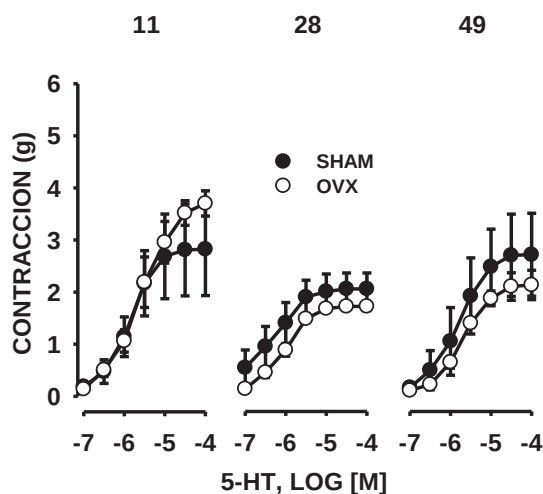


Fig. 1. Curvas concentración respuesta a la 5-HT en anillos aórticos de rata donde los círculos cerrados representan el grupo sham (operación simulada) y los círculos abiertos el grupo OVX (ovariectomizadas) después de 11, 28 y 49 días de la cirugía. Cada punto representa el promedio $\pm$ el error estándar de la media de 6 experimentos.

En la figura 1 se aprecian las curvas concentración respuesta de contracción a la 5-HT tanto en los anillos aórticos provenientes del grupo de ratas sham como aquellos provenientes del grupo de ratas que se les practicó la ovariectomía bilateral. Se resumen los resultados de los distintos grupos de tiempo de postovariectomía. Se aprecia en la figura que la magnitud de la contracción

inducida por la 5-HT no se modifica al comparar los resultados del grupo ovx contra el grupo sham a los distintos tiempos postovariectomía. Asimismo, no se encontró diferencia estadísticamente significativa al comparar los valores de CE_{50} (tabla 3).

Tabla 3. Valores de $CE_{50} \times 10^{-6}$ M para la 5-HT en los anillos aórticos de las ratas con operación simulada (SHAM) y en aquellos de las ratas ovariectomizadas (OVX) a distintos tiempos de realizada la operación. Cada valor representa el promedio $\pm$ el error estándar de 6 experimentos.

TIEMPO DE POSTMENOPAUSIA	SHAM	OVX	P
11	1.38 ± 0.89	2.37 ± 0.58	0.365
28	0.64 ± 0.24	0.91 ± 0.12	0.299
49	1.53 ± 1.00	0.53 ± 0.31	0.324

Efecto del 17 β -estradiol, del tiempo de postovariectomía y del verapamil sobre la contracción de los anillos aórticos inducida por la 5-HT.

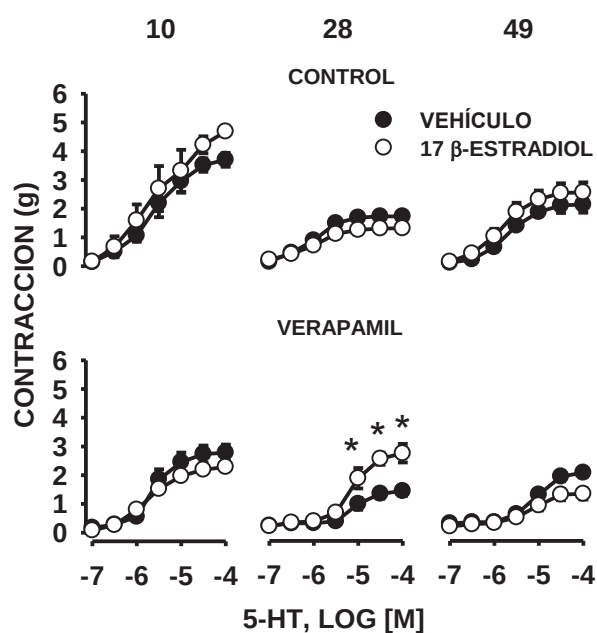


Fig. 2. Efecto del tratamiento de las ratas ovariectomizadas con 17 β -estradiol sobre las curvas concentración respuesta a la 5-HT en los anillos aórticos en la ausencia (panel superior) o en la presencia (panel inferior) de verapamil a los 3 tiempos de postovariectomía estudiados (10, 28 y

49 días). Cada punto representa la contracción promedio de seis experimentos $\pm$ el error estándar de la media. * $p < 0.05$ vs vehículo.

En la figura 2 se observa la contracción dependiente de la concentración a la 5-HT, donde se aprecia que en la ausencia de verapamil el tratamiento con 17β -estradiol ($5\text{ }\mu\text{g/kg/día}$) carece de efecto sobre la contracción inducida por la 5-HT a los distintos tiempos de postovariectomía (fig. 2 y tabla 4). No obstante, en la presencia de verapamil la magnitud del E_{max} es significativamente mayor en el grupo de 28 días (fig. 2). Por otro lado y en ausencia de verapamil, el tiempo de postovariectomía, el tratamiento con 17β -estradiol o con verapamil carece de efecto sobre la CE_{50} . En la presencia de verapamil, la CE_{50} se incrementa significativamente como función del tiempo postovariectomía, efecto que es independiente del tratamiento con 17β -estradiol (tabla 4).

Tabla 4. Efecto del tratamiento con 17β -estradiol ($5\text{ }\mu\text{g/kg/día}$), durante los últimos 5 días de los periodos de 11, 28 y 49 días de postovariectomía, sobre los valores de la $CE_{50} \times 10^{-6}$ (M) para la 5-HT en los anillos aórticos de las ratas y tanto en la ausencia como en la presencia de verapamil (10^{-6} M). Cada valor representa el promedio $\pm$ el error estándar de la media de 6 experimentos.

CONTROL			
POSTMENOPAUSIA (DIAS)	VEHÍCULO	17 β -ESTRADIOL	P
11	2.37 ± 0.58	2.11 ± 0.75	0.797
28	0.91 ± 0.12	0.73 ± 0.18	0.472
49	0.53 ± 0.31	1.45 ± 0.48	0.234
VERAPAMIL			
11	2.44 ± 0.69	1.87 ± 0.26	0.454
28	5.87 ± 2.06 *	7.24 ± 1.91 *	0.702
49	6.52 ± 1.87 *	4.20 ± 1.67 *	0.382

* $P < 0.05$ con respecto al grupo de 11 días.

Efecto del tiempo del procedimiento quirúrgico simulado y del verapamil sobre la contracción por la 5-HT en los anillos de aorta de ratas falsamente operadas.

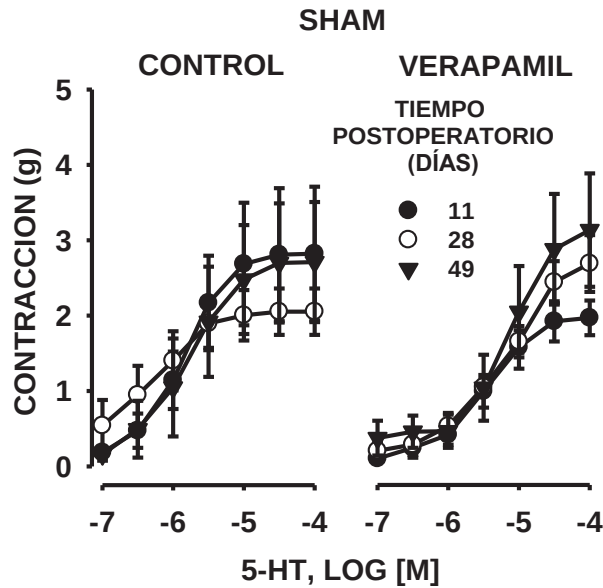


Fig. 3. Curvas concentración respuesta a la 5-HT en anillos aórticos de rata que sufrieron operación simulada (grupo sham) en la ausencia (panel izquierdo) o en la presencia de verapamil (10^{-6} M, panel derecho) después de 11, 28 y 49 días de la cirugía. Cada punto representa el promedio $\pm$ el error estándar de la media de 6 experimentos.

En la figura 3 se aprecia que la 5-HT provoca contracción dependiente de la concentración en las ratas sham (falsamente operadas) tanto en la ausencia como en la presencia de verapamil en los distintos tiempos de la cirugía. Se aprecia en la figura que la contracción a la 5-HT es independiente del tiempo postovariectomía y del tratamiento de los anillos aórticos con verapamil (tabla 5).

Tabla 5. Efecto del tiempo de postovariectomía y el tratamiento de los anillo aórticos de las ratas con operación simulada con verapamil sobre los valores de la $CE_{50} \times 10^{-6}$ M para la 5-HT. Cada valor representa el promedio $\pm$ el error estándar de 6 experimentos.

TIEMPO DESDE LA CIRUGIA	CONTROL	VERAPAMIL	P
11	1.38 $\pm$ 0.89	3.37 $\pm$ 0.91	0.175
28	0.64 $\pm$ 0.24	5.42 $\pm$ 3.07	0.130
49	1.52 $\pm$ 1.00	6.06 $\pm$ 3.16	0.243

Efecto del tiempo de postovariectomía sobre la contracción inducida por la 5-HT en los anillos de aorta de rata en presencia y en ausencia de verapamil.

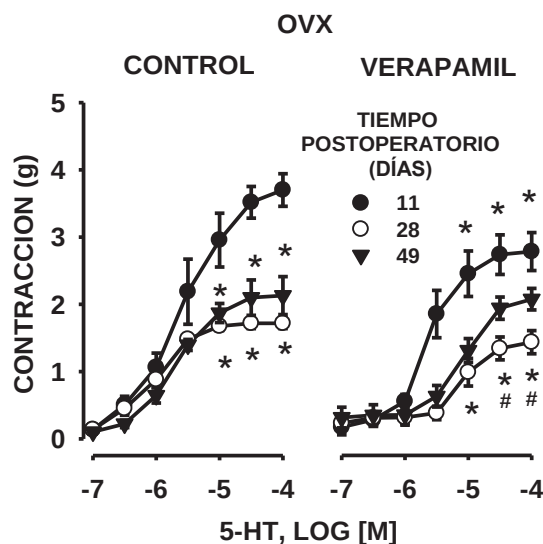


Fig. 4. Curvas concentración respuesta a la 5-HT en anillos aórticos de ratas ovariectomizadas (grupo OVX) en la ausencia (panel izquierdo) o en la presencia de verapamil (panel derecho) después de 11, 28 y 49 días de la cirugía. Cada punto representa la contracción promedio $\pm$ el error estándar de la media de seis experimentos * $p < 0.05$ vs 11 días, # $p < 0.05$ vs 28 días.

En la figura 4 se observa la contracción dependiente de la concentración de la 5-HT en los anillos aórticos provenientes de ratas OVX obtenidos después de distintos tiempos de postovariectomía tanto en la ausencia como en la presencia de verapamil. Se aprecia en la figura que la ovariectomía reduce la magnitud de la contracción a la 5-HT en forma dependiente del tiempo de postovariectomía. Por otro lado, el tratamiento con verapamil redujo la magnitud de la contracción a la 5-HT que se manifestó como una reducción significativa del E_{max} (fig. 4) solo en el grupo de 11 días y de un incremento en el valor de la CE_{50} (tabla 4) que fue evidente desde los 28 días de la ovariectomía.

Efecto del tiempo de postovariectomía y del tratamiento con verapamil sobre la contracción inducida por la 5-HT en los anillos aórticos de ratas tratadas con 17β -estradiol.

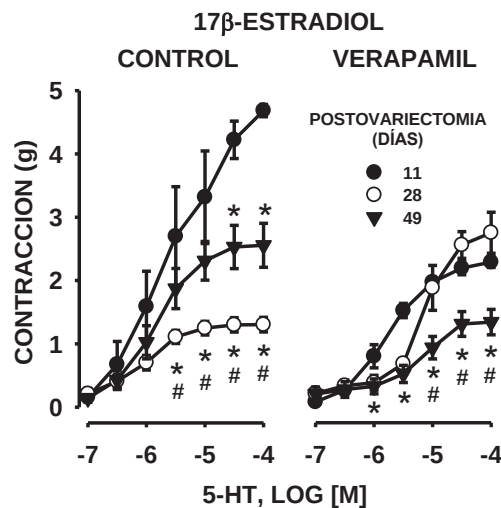


Fig. 5. Efecto del tiempo de postovariectomía y del tratamiento con verapamil sobre la contracción inducida por la 5-HT en los anillos aórticos de ratas tratadas con 17β -estradiol. Cada punto representa la contracción promedio de seis experimentos $\pm$ el error estándar de la media. * $p < 0.05$ vs 11 días # $p < 0.05$ vs 28 días.

En la fig. 5 se observa el efecto vasoconstrictor de la 5-HT, en la aorta de las ratas ovariectomizadas tratadas con 17β -estradiol, tanto en la ausencia como en la presencia de verapamil. Se aprecia una reducción significativa del Emax a los tiempos de 28 y 49 días postovariectomía con respecto al grupo de 11 días, siendo mayor en el grupo de 28 días. El tratamiento con verapamil provoca que las diferencias encontradas entre el grupo de 11 y el de 28 días desaparezcan debido a una disminución de la contractilidad a la 5-HT en el grupo de 11 días y a un aumento de la eficacia de la amina en el grupo de 28 días. En el caso del grupo de 49 días, el verapamil carece de efecto. Con respecto a los valores de la CE_{50} , no se aprecian diferencias estadísticamente significativas al incrementarse el tiempo postovariectomía. Sin embargo, con el tratamiento con verapamil se aprecia un incremento estadísticamente significativo en dichos valores (tabla 4).

DISCUSIÓN

Los resultados de la presente tesis demuestran que en la vasoconstricción inducida por la 5-HT participa, entre las fuentes internas de Ca^{2+} ya descritas en la literatura, el ingreso del catión a través de los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje de tipo L. Dicho ingreso es modulado por las hormonas ováricas, ya que en la rata fértil en que los ovarios presentan su función normal, el efecto contráctil de la 5-HT parece consecuencia de las otras fuentes de Ca^{2+} . Dicha modulación del ingreso de Ca^{2+} se manifiesta.....

CONCLUSIONES

1. La 5-HT produjo una contracción de los anillos aórticos procedentes de las ratas con ovarios íntegros de una manera que depende de la concentración y tanto el tiempo de la operación simulada como el tratamiento con verapamil carecen de efecto sobre dicha contracción.
2. Comparando contra el grupo con la cirugía simulada, la ovariectomía parece carecer de influencia sobre la contracción inducida por la 5-HT a los distintos tiempos de la postovariectomía.
3. En los anillos aórticos procedentes de las ratas ovariectomizadas la 5-HT produjo una contracción dependiente de la concentración y del tiempo de postovariectomía siendo de menor magnitud en los grupos de mayor tiempo de la ovariectomía.

4. En los anillos de las ratas ovariectomizadas, el tratamiento con verapamil provoca una reducción de la eficacia máxima solo en el grupo de 11 días y un incremento en la CE_{50} en los grupos de 28 y 49 días.
5. Los datos anteriores sugieren que la privación de las hormonas ováricas provocan un mayor ingreso de Ca^{2+} a tiempos tempranos de la postovariectomía (11 días) y a tiempos superiores a 28 días este efecto de la supresión hormonal desaparece.
6. Adicionalmente, el tratamiento con verapamil reduce la afinidad de la 5-HT de manera que depende del tiempo postovariectomía y de manera independiente del tratamiento de sustitución con 17β -estradiol.
7. Aparentemente, el tratamiento con 17β -estradiol carece de efecto sobre la contracción aórtica inducida por la 5-HT al comparar para cada tiempo de posovariectomía. No obstante que el tratamiento con verapamil provoca que el estrógeno incremente modestamente dicha contracción en el grupo posovariectomía de 28 días.
8. El tiempo postovariectomía provoca una disminución en la contractilidad a la 5-HT que tiende a normalizarse con el tratamiento con 17β -estradiol a partir de los 49 días de la cirugía, como consecuencia de un mayor ingreso de Ca^{2+} a través de los canales voltaje dependientes de tipo L.

PERSPECTIVAS

Los resultados demuestran que los estrógenos tienen un papel regulando la contractilidad a la 5-HT a través de un efecto sobre la entrada de Ca^{2+} por los canales voltaje dependientes de tipo L de tal forma que en situaciones de insuficiencia ovárica el tiempo postovariectomía juega un papel destacado. No obstante los resultados falta por investigar el papel que juegan los receptores a estrógenos en estos cambios, si se tratan de mecanismos genómicos o no genómicos. Asimismo, queda abierta la pregunta de los mecanismos involucrados que llevan a dichos efectos y que cascadas de señalización están involucradas.

La investigación en este campo puede ayudar a esclarecer las controversias de que si la sustitución hormonal ayuda a mejorar las alteraciones vasculares que se observan en padecimientos como la menopausia y otros estados de disfunción o supresión ovárica.

BIBLIOGRAFÍA

1. NORMA Oficial Mexicana NOM-035-SSA2-2002, Prevención y control de enfermedades en la perimenopausia y postmenopausia de la mujer. Criterios para brindar la atención médica. www.salud.gob.mx.
2. Grady D. Management of Menopausal Symptoms. N. Engl. J. Med. 355:2338-2347, 2006.

3. Atali, B. UnfirerS., Kibel A. and Drenjancevic-Peric I. Different Roles Of Sex Steroid Hormones In The Pathogenesis Of Vascular Dysfunction And The Development Of Cardiovascular Disease In Men And Women. Department of Physiology and Immunology, School of Medicine, University »Josip Juraj Strossmayer«, Osijek, Croatia2: 673–680, 2009.
4. Cavadas L. F., Nunes A., Pinheiro M., Silva P. T. Abordagen Da Menopausa Nos Cuidados De Saude Primarios. Acta. Med. Port. 23: 227-236, 2010. www.actamedicaportuguesa.com
5. Bhuiyan, S., and Fukunaga, K. Characterization Of An Animal Model Of Postmenopausal Cardiac Decompensation Using Ovariectomized Pressure-Overloaded Rats. The North American Menopause Society. Vol. 17, No. 1, pp. 213-221, 2010.
6. Miller V. M. And Duckles S. P. Vascular Actions of Estrogens: Functional Implications. The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics. Pharmacological Reviews. 60:210–241, 2008.
7. Pepine C. J., Nichols W. W., Pauly D. F. Estrogen and Different Aspects of Vascular Disease in Women and Men. Circ Res. 99:459-461. 2006.
8. Meyer M. R. and Barton M. ERa, ERb, and gpER: novel aspects of oestrogen receptor signalling in atherosclerosis. Cardiovascular Research 83: 605–610. 2009.

9. Arriagada M., Arteaga E., Bianchi M., Brantes S., Montaña R., Osorio E., Pardo M., Rencoret C., Suárez E., Valderrama O., Valdivia I. and Villaseca P. Recomendaciones De Tratamiento En La Menopausia. Rev Chilr Oevb Sctheitl Ogbinsetceotl. (52)0:0 354; 07-03(455) 2005.
10. White W. B., Hanes V., Chauhan V. and Pitt B. Effects of a New Hormone Therapy, Drospirenone and 17- β -Estradiol, in Postmenopausal Women With Hypertension. American Heart Association. 48; 246-253, 2006.
11. Simoncini T. Mecanismos De Acción De Los Receptores De Estrógeno En Células Vasculares: Relevancia Para La Menopausia Y El Envejecimiento. Revista del climaterio. 13 (74):41-47, 2010.
12. Arnal JF., Laurell H., Fontaine C., Billon A., Calippe B., Lenfant F. and Gourdy P. Acciones De Los Receptores De Estrógeno En La Biología Vascular Y La Inflamación: Implicaciones En La Fisiopatología Vascular. Revista del climaterio. 13(74):48-55, 2010.
13. McKenzie C., Alapati VR., MacDonald A. and Shaw AM. Mechanisms Involved In The Regulation Of Bovine Pulmonary Vascular Tone By The 5-HT_{1B} Receptor. British Journal of Pharmacology 159, 188–200, 2010.
14. Miller V. M. And Duckles S. P. Vascular Actions of Estrogens: Functional Implications. Pharmacological Reviews 60:210–241, 2008.

15. Fisher S. A. Vascular Smooth Muscle Phenotypic Diversity And Function. *Physiol Genomics*. 42A(3):169-187, 2010.
16. Cogolludo A., Moreno L., Villamor E. Mechanisms Controlling Vascular Tone in Pulmonary Arterial Hypertension: Implications for Vasodilator Therapy. *Pharmacology*;79:65–75 2007.
17. Zeni S. N., Gomez C. A. And Gregorio S. D. El Olpadronato Previene La Perdida De Hueso Cortical Y Trabecular Inducida Por Dosis Suprafisiologicas De Tiroxina En Ratas Ovariectomizadas. *Medicina Buenos Aires*; 58:453-457 2005.
18. Cepeda-Prado E., López-Tobón A., García-Segura L. M. y Cardona- Gómez G. P. El 17β -estradiol disminuye la expresión y asociación de quinasas responsables de la hiperfosforilación de Tau. *scielo Colomb. Med.* vol.39, 2008.
19. Figueroa X.F., Karina A., Martínez A.D., Garcés G., Roseblatt M., Boric M.P. and Saéz J.C. Histamine reduces gap junctional communication of human tonsil high endothelial cells in culture. *Microvasc. Res.*, 68: 247-257, 2004.
20. Figueroa X.F., Isakson B.E., Duling B.R. Connexins: gaps in our knowledge of vascular function. *Physiology*, 19: 277-284, 2004.
21. Ledoux J. E., Brayden W. J., and Nelson M. T. Calcium-Activated Potassium Channels and the Regulation of Vascular Tone. *Physiology* 21: 69-79, 2006.

22. Earley S. and Nelson M. T. Central Role Of Ca^{2+} Dependent Regulation Of Vascular Tone In Vivo. J Appl Physiol 101:10-11, 2006.
23. Minshall R. D., Miyagawa K., Chadwick C. C., Novy M. J., And Hermismeyer K. In Vitro Modulation Of Primate Coronary Vascular Muscle Cell Reactivity By Ovarian Steroid Hormones. FASEB 13: 1419-1429, 1998.
24. Minshall R. D., Pavcnik D., Halushka P. V., And Hermismeyer K. Progesterone Regulation Of Vascular Thromboxane A₂ Receptors In Rhesus Monkeys. Am J Physiol Heart Circ Physiol 281: H1498–H1507, 2001.
25. Mueck Ao. And Seeqer H. Estrogens Acting As Cardiovascular Agents: Direct Vascular Actions. Curr Med Chem Cardiovasc Hematol Aqents. 2 (1):35-42. 2004.
26. Rossi R., Grimaldi T., Origliani G., Fantini G., Coppi F. AND Modena MG. Menopause And Cardiovascular RISK. Pathophysiol Haemost Thromb. 32(5-6):325-8, 2002.
27. Rodrigo Andrade, Nicholas M. Barnes, Gordon Baxter, Joel Bockaert, Theresa Branchek, Marlene L. Cohen, Aline Dumuis, Richard M. Eglen, Manfred Göthert, Mark Hamblin, Michel Hamon, Paul R. Hartig, René Hen, Katharine Herrick-Davis, Rebecca Hills, Daniel Hoyer, Patrick P. A. Humphrey, Klaus Peter Latté, Luc Maroteaux, Graeme R. Martin, Derek N. Middlemiss, Ewan Mylecharane, Stephen J. Peroutka, Pramod R. Saxena, Andrew Sleight, Carlos M. Villalon, Frank Yocca. 5-Hydroxytryptamine receptors: 5-HT_{1A}. Last modified on 2010-12-14.

Accessed on 2011-05-24. IUPHAR database (IUPHAR-DB),
<http://www.iuphar-db.org/DATABASE/ObjectDisplayForward?objectId=1>.