

TÍTULO

ESTUDIO DE LOS EFECTOS DE 17 β -ESTRADIOL RESTRINGIDO AL LUMEN VASCULAR EN UN MODELO DE INFARTO DEL MIOCARDIO POR ISQUEMIA-REPERFUSIÓN

Alumno:

ARTURO RODRÍGUEZ HERNÁNDEZ

Asesor interno:

Dr. Guillermo M. Ceballos Reyes

Escuela Superior de Medicina del IPN

Asesor externo:

Dr Lauro Figueroa Valverde

Universidad Juárez Autónoma de Tabasco

INTRODUCCIÓN

La terapia de reemplazo hormonal (TRH) se prescribe en mujeres para aliviar los síntomas agudos de la menopausia tales como los bochornos, atrofia vaginal y para reducir el riesgo, a largo plazo, de otras condiciones como enfermedades cardiovasculares y osteoporosis¹. En 1998 se publicaron en el *Journal of the American Medical Association* los hallazgos de dos estudios clínicos Heart Estrogen Replacement Therapy (HERS) y el Women Health Initiative (WHI) relacionados con el uso de estrógenos equinos conjugados (EEC) y acetato de medroxiprogesterona (AMP), ambos utilizados oralmente en mujeres posmenopáusicas. Los reportes muestran que dicha terapia puede aumentar la frecuencia de cáncer de endometrio, cáncer de mama, además de aumento de peso y otros efectos secundarios².

Dichos ensayos clínicos sugieren que el estrógeno no protege en contra de enfermedades cardiovasculares, la gran evidencia epidemiológica dice lo contrario^{3,4}. Las razones de estos resultados controversiales son varias, pueden incluir el uso de terapias con diferentes combinaciones de estrógenos y progestágenos, el grado de afinidad hacia el receptor de estrógeno, los niveles de expresión del mismo y los varios tipos de estrógenos usados en la clínica. En este sentido suponemos que uno de los factores más importantes en esta controversia y no consideradas profundamente es la dosis que se emplea durante la TRH. Las concentraciones plasmáticas de estrógeno alcanzadas en los ciclos ovulatorios normales van de 50 a 270 pg/ml y solo se alcanza la concentración más alta en la fase ovulatoria. Durante la terapia de reemplazo se mantiene una concentración constante de 50-70 pg/ml a lo largo del tratamiento.

¿Cuál es el origen de la controversia prodaño-protección? Probablemente, la controversia existe en las diferentes vías de acción y en la farmacocinética-farmacodinamia del estrógeno. Los experimentos básicos enfrentan directamente al estradiol ante las células endoteliales midiendo los efectos inmediatos y a largo plazo⁵, en cambio en los tratamientos clínicos los estrógenos son administrados por diferentes vías en donde la biodisponibilidad del esteroide no es inmediata además de que en su farmacocinética involucra eventos de primer paso generando metabolitos activos con efectos genotóxicos^{6,7}.

La difusión de los estrógenos hacia el núcleo (vía clásica o genómica) y sus acciones específicas están determinadas por la estructura de la hormona, el subtipo o isoforma del receptor a estrógeno involucrado, las características del gene promotor blanco, y el balance entre coactivadores

y correpresores que modulan la respuesta transcripción⁸. Los efectos rápidos (“efectos a nivel de membrana”) activan rápidamente vías de señalización que al menos inicialmente, no alteran la expresión génica, tales como la estimulación de la óxido nítrico sintasa endotelial vascular (NOSe) y la consecuente vasodilatación⁵.

Aunque las dos vías convergen en algún punto en las cascadas de señalización intracelular, lo importante es poder estimular solo la vía membranal, bajo esta condición, el separar la vías implica el poder evitar eventos relacionados con el metabolismo intracelular del estradiol en donde sus productos están involucrados en mecanismos responsables de la carcinogenicidad entre los cuales están: i) la actividad hormonal mediada por receptor; ii) activación metabólica mediante el citocromo P-450, y iii) daño en el sistema reparador del DNA permitiendo la acumulación de lesiones en el genoma^{7,8}.

Lo anterior fundamenta la necesidad de estudiar los efectos estrogénicos globales inducidos localmente, particularmente en el endotelio. En este sentido, estudios recientes sugieren fuertemente que los estrógenos ejercen un efecto directo en la pared vascular, específicamente en el endotelio. Se reconoce ahora que el endotelio juega un papel crucial en la fisiología y esta monolamina celular está posicionada en la interfase entre la sangre y la pared celular, de tal forma que podría constituir un blanco estrogénico clave para su regulación^{9,10}. Debido a que el endotelio está expuesto a las hormonas esteroideas ováricas, particularmente en mujeres premenopáusicas, los estudios básicos han postulado que la producción de óxido nítrico derivado del endotelio, estimulada por los estrógenos, es un punto clave que explica los efectos benéficos a nivel vascular.

Sin embargo, el endotelio es un sitio de síntesis extragonadal¹¹ de estrógenos, pero también de su metabolismo lo que implica que en altas concentraciones se producirían metabolitos genotóxicos que junto con los efectos genómicos asociados a factores de crecimiento, favorecerían el desarrollo de cáncer mamario y cervico-uterino como ocurre en la THR si el estrógeno difunde libremente al endotelio. A esto debe sumarse la difusión a otras células en donde pueden presentarse efectos adversos. En este sentido, es posible pensar que para disminuir estos efectos, la distribución del estradiol no debería ser libre sino restringida al lumen vascular, de tal forma que éste no podría difundir a las células parenquimales y por tanto se evitaría la interacción nuclear y el metabolismo local en células de tejidos endotelial, mama y endometrio desencadenando únicamente los efectos benéficos deseables dependientes del NO a nivel de membrana.

En relación a lo anterior, existen estudios en donde un polímero de alto peso molecular se ha unido a algunas hormonas confinando su efecto a la superficie endotelial vascular y demostrando efectos, particularmente a nivel de membrana, en el sistema cardiovascular idénticos a aquellos inducidos por las hormonas solas¹²⁻¹⁶. Sin embargo, esos estudios se han limitado a demostrar estos efectos, sin determinar si la restricción provee efectos benéficos globales.

En un intento por aportar evidencia en este sentido, en el presente trabajo, se sintetizó un conjugado de estradiol unido a dextrán (2×10^6 Da) como una posible estrategia farmacéutica que desencadene los mismos efectos no genómicos que el estradiol libre. Este complejo permite restringir al estradiol únicamente al lumen vascular manteniéndose en contacto con el endotelio, sin que el estradiol difunda a las células parenquimales.

Partiendo de lo anterior, en un futuro las enfermedades cardiovasculares podrían ser blanco terapéutico de complejos moleculares del estradiol bio-dirigidos a un sitio específico del endotelio, desencadenando mecanismos de acción rápida a nivel de la membrana celular sin el estímulo de otros tipos celulares.

Materials and Methods

Preparing Aminocaproic dextrán (ACA)

100mg (5×10^{-8} mol) of dextran (2×10^6 Da) were dissolved in 50 ml of distilled water, and 40 mg (1.87×10^{-4} mol) of NaIO_4 were added. The mixture was kept in constant agitation for during an hour at room temperature. 23 μl of glycerol are added to stop the reaction, keeping agitation for an hour. The 100 mg (7.62×10^{-4} mol) ϵ -amino-*n*-caproic acid is added to the mixture maintaining the same conditions for 12 hours. The product of the reaction was dialyzed with distilled water three times; the product of the dialysis was evaporated to reduced-pressure dryness.

Preparation of dextran-ACA-etilendiamina.

100 mg of dextran-ACA, 120 mg of etilendiamina (EDA) (9×10^{-4} mol) and 15 mg of $\text{N,N}'$ -díciclohexilcarbodiimida (7.8×10^{-5} mol) in 25 ml of distilled water maintaining a pH between 4-6. The reaction is left for coupling during 12 hr.; the product of the reaction was dialyzed with distilled water and evaporated to reduced-pressure dryness.

Preparing dextran-ACA-EDA with 17β -estradiol 17β -estradiol marked with tritium (Mannich's reaction)

In a 25 ml of dioxan 30 % solution, 100 mg of the complex dextran-ACA-EDA plus 3.4 mg of 17β -estradiol, were dissolved. This mixture was kept in constant agitation at temperature of 40-57 $^\circ\text{C}$ until complete dissolution. 2.5 ml of formaldehyde 37 % was added and maintained under the same conditions 24 hrs.; the product of the reaction was evaporated to reduced-pressured dryness.

The radioactively marked conjugate was prepared using the same protocol and making an isotopic mixture 3.4 mg of 17β -estradiol and 10 μl of Estradiol, [$2,4,6,7\text{-}^3\text{H(N)}$], specific activity 70-115Ci(2.96-4.25TBq)/mol.

Estimation of the distribution of estradiol-dextran tritium marked

To evaluate the distribution of estradiol-dextran tritium marked, Wistar male rats were administered 0.2 ml of the product (10 mg /ml) IV. Blood is drawn every 30 minutes through the femoral vein, and at 5 and 12 hrs., the dissected liver, kidney, heart, and lungs were perfused with saline until blood remains were totally removed. The globular package was hemolized with water and left to rest for 24 hrs.; it was centrifuged and the supernatants were obtained. Hemoglobine was precipitated with 0.5 ml tricloroacetic acid 3 %. 500 mg of the dissected tissue is homogenized

with 500 µl of trichloroacetic acid 3 % and supernatants are obtained. 500 µl of supernatant obtained from the globular package and the measure their decompositions per minute (dpm) with the Beckman liquid scintillation counter LS3801.

Ischemia-reperfusion Model in rats

For this model, the rats were anesthetized with ketamine 100 mg/kg body weight and xilacine 8 mg/kg; the animals were then placed supine on the operating table. A mid cervical incision was made on skin and muscles covering the trachea allowing for intubation by placing low caliber polypropylene tube. The animals were ventilated with a volume of 2.5 – 3 ml of environment air using a ventilator for rodents (Harvard Apparatus) at a rate of 56/min. One catheter was placed in the left femoral vein and another one in the right femoral vein to obtain blood samples and recover the volume of blood extracted. The temperature is maintained at approximately 37°C throughout the experiment though a heating plate.

The chest was opened by medial sternotomy, the heart is visualized and the left anterior descending coronary artery 2-3mm is ligated under the auricle with 5 or 6 zeros suture, placing between the artery and the suture a small caliber 3-5mm teflon tube for inducing the occlusion of the artery (ischemia) for 60 minutes and then the tube was withdrawn to allow for reperfusion for 4 hrs.

Measuring the size of the infarction using the tatrazolium method (ischemic damage)

500 mg de chloride de 2,3,5 triphenyl tetrazolium were dissolved in 100 ml of a mixture of phosphates (77.4% of NaH_2PO_4 (0.1M) and 22.6% of Na_2HPO_4 (0.1M) at pH 7.4). In this solution cross sections of the heart of about 3mm wide, previously subject to experimentation and subsequent freezing for 2 hrs, were incubated at 37°C for 20 min, then the tissue was fixed in formol at 10 % for 20 min. The viable tissue was identified with deep red and the infarcted tissue with a pale color. The stained tissue was placed between two plates of glassed and pressed to a width of 2 mm, it was then analyzed for plannimetry using software from IP Lab Scan Analytics which allowed for the calculation of the infarcted area from the total area.

Evaluaton of estradiol-dextran in an ischemia-reperfusion model

With the purpose of evaluating cardiovascular effects, the study included 6 groups of Wistar male rats. With an n of 3. Group 1: infarcted normal male (INM); Group 2: infarcted normal male with estradiol (INME); Group 3: infarcted normal male with estradiol-dextran (INMED); Group 4: infarcted gonadotomized male (IGM); Group 5: infarcted gonadotomized male with estradiol

(IGME) and; Group 6: infarcted gonadectomized male with estradiol-dextran (IGMED). Treatments with free estradiol or estradiol-dextran were administered IV 15 min. prior to the induction of the infarction by ischemia-reperfusion, the infarcted area being then evaluated; free estradiol and estradiol-dextran concentrations of 10^{-9} , 10^{-10} y 10^{-11} M were respectively used.

Evaluation the participation of estrogen receptors alpha and receptors beta in the ischemia-reperfusion model

The effects triggered by the action of estradiol are mostly mediated through the activation estrogenic receptors alpha receptors (ER α). Therefore, it is necessary to know which receptors activate the estradiol-dextran conjugate by proving the effect of estrogen antagonist in the size of the infarction. Whole and gonadectomized rats were administered IV a estrogen receptor alpha PPT {4,4',4''-(4-Propyl-[1H]-pyrazole-1,3,5-triyl) trisphenol} and estrogen receptor beta DPN (Diarylpropionitril) respectively, at a concentration of 10^{-9} M (physiological concentrations) the same protocol as in ischemia-reperfusion was followed.

Evaluation of the activity of protein-kinase C (PKC) in healthy and infarcted tissues in the presence of free estradiol and y estradiol-dextran

PKC activity increases in a myocardial infarction. In our case this increase would be caused by ischemia-reperfusion, this activity being evaluated by Western-blot. Hearts from whole normal rats were obtained and treated with estradiol and estradiol-dextran. The hearts were macerated and lysated with protease inhibitors, lysis buffer, and phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF); through a polytron. Once the homogenate was obtained, it was centrifuged at 10000 rpm for 10 minutes. The supernatants were used to proceed with the determination of the amount of proteins using the Bradford's method. For electrophoresis, a 10% polyacrilamide gel was used. The amount of proteins per lane was 20 μ g . The electrophoresis was done at 200 V for 45 minutes, with running buffer 1x (Trisma base 6.6 g, glycine 11.2 g, sodium dodecilsulphate (SDS) 10 g at a pH of 8.3). After that, followed the transference of the gel into a nitrocellulose membrane, at 125 V for 35 minutes in transfer buffer 1x (Methanol 200 ml, glycine 14.4 g, SDS 1g, trisma base 3 g). Para la determination of phosphorylated PKC (pPKC) polyclonal antibodies, anti p-PKC α (Ser 657): sc-12356 were used, and as a control, polyclonal antibody anti- the ribosomal protein RPS6, which is a constitutive protein, all being used in one dilution of 1:200; the incubation time was three hours with the primary antibody and one hour with the secondary antibody; diaminobencidina (DAB) being used as a chromogenic product. The relative activity of PKC (pPKC/RSP6) in healthy tissue after treatments

was obtained by densitometry, and was expressed in the percentage of relative activity of PKC in healthy tissue. Once the characteristic banding was found, the quantification of the relative values of the expression problem protein/control protein was determined by densitometry.

Statistics

The results were expressed as the mean \pm standard error. The statistical significance was determined by ANOVA and Dunnet's multiple comparison test with $P \leq 0.01$ designated as a significant difference.

RESULTADOS

Acoplamiento de dextrán-ACA-etilendiamina y estradiol

El acoplamiento del dextrán al ácido amino-caproico mediante aminación reductiva y la posterior activación y acoplamiento con etilendiamina produce un rendimiento del 70%. Mediante la reacción de ninhidrina se obtiene una cuantificación de 2.065×10^{-6} M de grupos amino libres por miligramo de conjugado.

La unión de estradiol al dextrán-aminocaproico-etilendiamina se llevó al cabo mediante la reacción de Mannich obteniéndose un 30 % de rendimiento del conjugado.

Este producto se sometió a un análisis espectrofotométrico-uv el cual mostró su máxima absorbancia a los 210 nm obteniéndose un efecto batocrómico respecto al estradiol libre; el cálculo de residuos de estradiol por miligramo del conjugado es de 5.2×10^{-8} M donde el coeficiente de absorción molar para el estradiol es $c=2117$.

Distribución del conjugado

Después de administrar 0.2 ml vía IV del conjugado estradiol-dextrán marcado con tritio (actividad específica 2.22×10^{14} dpm/mmol de E₂ marcado) se pueden apreciar (Fig. 1) valores del paquete globular muy similares a la lectura de fondo por lo que podemos afirmar que nuestro conjugado no se encuentra en este espacio; por otro lado, las dpm del suero son significativamente más altas que las del fondo por lo que en este caso se demuestra que por lo menos en el tiempo que duran nuestros tratamientos, el conjugado permanece en el espacio vascular.

En 12 hrs. (mas del doble de tiempo que duran nuestros experimentos) se puede observar (Fig. 2) que no existe presencia del conjugado marcado con tritio en ninguno de los tejidos, confirmando de este modo su permanencia solo en el lumen vascular al menos en este lapso.

De manera alterna, el dextrano fue (2×10^6) fue fluoresceinado y se puso en contacto con un cultivo de células endoteliales evaluándose su permanencia extracelular con microscopia confocal; aquí se presenta evidencia de que el complejo permanece únicamente en la membrana de la célula (fig. 3). Estos resultados muestran que esta macromolécula no atraviesa la membrana y junto con los

ensayos empleando el dextrán-estradiol marcado radiactivamente demuestran su confinamiento extracelular y en nuestros estudios intravascularmente.

Antes de iniciar los tratamientos, se establece el tamaño del infarto en ratas macho wistar normales íntegras y gonadectomizadas (fig. 4) como datos de control, en donde claramente se observa que es la reperfusión después de la oclusión de la arteria la que causa el mayor daño, y no la isquemia por infarto inducido. Esto se ve representado, en este caso, por el mayor área de infarto en ratas íntegras y aún mayor en ratas gonadectomizadas.

Cuando se administra *estradiol libre*, en concentraciones de 10^{-9} , 10^{-10} y 10^{-11} M, (dosis de 20 pmol, 2 pmol y 0.2 pmol respectivamente) en ratas íntegras normales, se puede observar (Fig. 5), una disminución significativa del tamaño del área de infarto en todos los tratamientos respecto del control.

Del mismo modo cuando administramos el conjugado de *estradiol-dextrán* a las mismas concentraciones de 10^{-9} , 10^{-10} y 10^{-11} M (dosis de 20 pmol, 2 pmol y 0.2 pmol respectivamente) en ratas íntegras normales se observa un comportamiento similar al del estradiol libre (Fig. 6). Por otro lado, cuando se comparan ambos tratamientos entre sí (con estradiol libre y estradiol conjugado con dextrán), estos no presentan diferencia significativa.

Al hacer una comparación de porcentajes de áreas de infarto en ratas íntegras normales (fig. 7), se observa una disminución del tamaño del área de infarto en promedio de 39.5% para el caso de los tratamientos con estradiol solo. Por otra parte, para el caso de los tratamientos con el conjugado estradiol-dextrán se observa una disminución significativa del área de infarto aproximadamente el 42.8 %. Estableciéndose en ambos casos un efecto protector.

Cuando se administra estradiol libre en ratas *gonadectomizadas* e infartadas (Fig. 8), nuevamente se observan comportamientos muy similares, estableciéndose otra vez un efecto protector para el estradiol libre cuando se utilizan concentraciones 10^{-9} , 10^{-10} y 10^{-11} M sin que haya diferencia estadística.

La administración del conjugado estradiol-dextrán a ratas infartadas y gonadectomizadas (Fig. 9), al igual que en los casos anteriores, establece un efecto protector cuando se utilizan concentraciones 10^{-9} , 10^{-10} y 10^{-11} , sin diferencia estadística significativa.

Al comparar los efectos de los tratamientos entre sí en ratas gonadectomizadas (con estradiol libre y estradiol conjugado con dextrán), una vez más no hay diferencia significativa. Comparando una vez más los porcentajes de áreas de infarto en ratas gonadectomizadas (fig. 10), se observa una disminución significativa del tamaño del área de infarto en promedio del 46% para el caso de los tratamientos con estradiol solo y del 58% para el caso de los tratamientos con el conjugado estradiol-dextrán. En este caso el porcentaje de disminución del tamaño del área del infarto es mayor que el de ratas íntegras normales.

Los porcentajes de disminución solo del daño inducido por la reperfusión se presentan resumidos en la fig. 11. En todos los tratamientos hubo una reducción por arriba del 70% en las ratas íntegras con infarto, y de más del 85% en ratas gonadectomizadas.

Al evaluar los agonistas a receptores estrogénicos PPT (agonista α) y DPN (agonista β) en ratas macho íntegras (Fig. 12) y gonadectomizadas (Fig. 13) podemos observar que el tamaño del área del infarto en ambos tratamientos es menor en presencia del agonista α estrogénico (PPT), estableciéndose de esta forma el efecto protector del estradiol mediante la activación del receptor a estrógenos α (ER α). El efecto se ve aumentado en ratas gonadectomizadas, probablemente debido a que no existe la influencia de hormonas gonadales, en este caso testosterona, que en un momento dado pudiera influir en el tratamiento.

Cuando se evalúa la actividad relativa de protein-quinasa C PKC a través de la detección por Western Blot de PKC fosforilada (pPKC) podemos observar (Fig. 14) que ésta se encuentra altamente fosforilada en animales con infarto por isquemia-reperfusión, y significativamente menor en los animales sin infarto.

Se obtiene el porcentaje de actividad relativa de PKC en tejido sano respecto del tejido infartado, cuando se administra tratamiento con estradiol libre y estradiol-dextrán 10^{-9} M (Fig. 15), podemos observar que dicha actividad se ve bloqueada significativamente en presencia de estradiol libre o conjugado con dextrán.

Discusión

El régimen terapéutico utilizado en la THR ha evidenciado, a través de ensayos clínicos, la no prevención de enfermedades cardiovasculares^{3,4} y otros efectos adversos como cáncer de mama, cáncer endometrial, tromboembolismo, entre otros¹⁷. Evidencia epidemiológica y de estudios básicos demuestran lo contrario; las posibles variables que intervienen en esta controversia van desde las características de los receptores a estrógenos así como su expresión, las dosis empleadas así como las combinaciones de estrógenos utilizados, y finalmente la generación de metabolitos genotóxicos derivados del metabolismo del estradiol^{7,8}. Un abordaje farmacéutico que nos permita confinar al esteroide únicamente en el lecho vascular, evitaría al menos, aquellos efectos relacionados con la difusión del estrógeno, su interacción nuclear y su metabolismo en distintos tipos celulares, desencadenando únicamente su efecto benéfico vascular dependiente de membrana.

Se sintetizó un conjugado de estradiol-dextrán como una posible estrategia farmacéutica que desencadene los mismos efectos rápidos, a nivel de membrana, del estradiol solo; las propiedades biológicas del dextrán permiten conjugarlo con sustancias bioactivas potenciando la solubilidad, estabilidad e incrementando el tiempo de vida media de la sustancia acoplada.

En la síntesis de un conjugado químico el dextrán funciona como una matriz en donde un ligando bioactivo puede ser unido covalentemente, la ventaja de tener una matriz de polisacárido es que puede ser activada con sulfatos altamente iónicos o residuos de carboxilato. El dextrán tiene abundantes grupos hidroxilo para la activación y acoplamiento de ligandos de afinidad¹⁸.

La activación del dextrán inicia cuando reacciona con *meta*-periyodato de sodio (NaIO_4), el cual origina la formación de enlaces carbón-carbón entre residuos hidroxilos adyacentes creando dos aldehídos alifáticos. Los grupos formil resultantes fueron usados en un proceso de acoplamiento por una aminación reductiva usando un ligando que contiene aminas, resultando grupos carboxilo libres para otro acople químico; en este punto se usó a la carbodiimida para facilitar la formación de enlaces amida entre el grupo carboxilo y una amina, en este proceso se forma el brazo espaciador entre el dextrán y el estradiol. Los brazos espaciadores son moléculas de bajo peso molecular y generalmente cadenas hidrocarbonadas lineales con grupos funcionales en ambos extremos para facilitar el acoplamiento del ligando al soporte, en nuestro caso el ácido aminocaproico. El propósito del brazo espaciador es evitar algún impedimento estérico que el soporte pudiera tener cuando interactuó con el ligando. Es importante mencionar que la longitud del brazo espaciador para el

acoplamiento con polímeros debe fluctuar entre 6 y 10 átomos para que éste tenga suficiente flexibilidad y no limite su libre movimiento para la interacción con otras moléculas.

El espaciador que contiene una amina reacciona con formaldehído a elevadas temperaturas para provocar la sustitución en la posición *ortho* del anillo aromático del estradiol (posición 4 del anillo A). Esta reacción consiste en la condensación de formaldehído con la amina libre del brazo espaciador¹⁸.

El resultado de la síntesis del conjugado de estradiol dextrán se demuestra cuando se obtiene un espectro de barrido alcanzando su máxima absorción a los 210 nm desplazando la curva hacia la izquierda respecto del estradiol libre, lo que nos indica que se realizó el acoplamiento, mostrando un efecto batocrómico. Datos similares se encontraron en un estudio¹⁶ en donde utilizaron el mismo proceso de síntesis para unir al dextrán de alto peso molecular (2×10^6 Da) al grupo funcional del carbono 3 de la testosterona. Otra forma de demostrar el acople químico estradiol-dextran es la evaluación biológica en un modelo animal. En este sentido, cuando administramos vía IV el complejo estradiol-dextrán marcado radiactivamente encontramos que éste se mantuvo presente en el suero pero no en el paquete globular ni en los tejidos esto sugiere, que por lo menos en las 12 h de experimentación no hubo estradiol libre cuyo origen fuera de una hidrólisis del complejo o una separación del mismo en caso de que pudiera haber estado adsorbido. Estos resultados confirman parte de nuestra hipótesis de que el estradiol-dextrán sintetizado permanece confinado al lumen vascular sin que difunda a las células parenquimales de diferentes órganos y tejidos. Experimentos similares utilizando al dextrán (2×10^6 Da) unido a vasopresina¹³, angiotensina¹⁴ o testosterona¹⁶, demostraron el confinamiento de las hormonas unidas al dextrán cuando el estímulo hormonal en el espacio intravascular coronario activó la liberación endotelial de mensajeros que modulan funciones específicas en células cardiacas parenquimales. Por otro lado se ha demostrado que el diámetro estimado para el poro de la pared capilar es de 0.024-0.032 μm ; el dextrán usado en este estudio tiene un diámetro molecular estimado de $> 0.1 \mu\text{m}$, en consecuencia el complejo estradiol-dextrán no podría permear la pared capilar^{12,15}; esto se demuestra también con pruebas alternas de microscopia confocal con el dextrán marcado con fluoresceína en un cultivo de células endoteliales en donde éste no penetra la membrana. De esta manera tenemos la certeza entonces de que el complejo estradiol-dextrán que nosotros sintetizamos se mantiene confinado en el lumen vascular.

Nuestros experimentos de control, permiten establecer el tamaño del área de infarto y confirmamos que el infarto inducido solo por isquemia genera una lesión menor comparada con la

lesión inducida por la posterior reperfusión. Además, queda manifiesta una clara participación hormonal en el proceso, cuando el mayor daño se presenta en las ratas gonadectomizadas.

La certeza de que el conjugado estradiol unido a dextrán (2×10^6 Da) está restringido al lumen vascular, permite administrar dosis del orden de 10^{-9} M, consideradas dentro de las concentraciones fisiológicas¹⁹, y de allí partimos hacia concentraciones más bajas de 10^{-10} y 10^{-11} M para evaluar los efectos. De acuerdo al volumen administrado (200 μ l) y considerando que el volumen sanguíneo de la rata es aproximadamente el 10% de su peso corporal (20 ml), asumimos que la dosis administrada es del orden de 20, 2 y 0.2 pmoles totales respectivamente que alcanzan su biodisponibilidad total en sangre.

Al evaluar los efectos del estradiol libre y del estradiol conjugado con dextrán en un modelo de infarto del miocardio inducido por isquemia/reperfusión en ratas macho íntegras y gonadectomizadas encontramos que los efectos obtenidos son esencialmente los mismos entre el estradiol libre y el estradiol-dextrán representados por una disminución significativa del tamaño del área del infarto. Esto sugiere que nuestro complejo está desencadenando efectos a nivel de membrana probablemente asociados con la generación de óxido nítrico o bien a canales de calcio. Estos datos se ven reforzados por otros investigadores que encontraron el mismo efecto cuando probaron el estradiol solo, el cual es mediado básicamente por el aumento de NO inducido por el estrógeno²⁰⁻²². Se establece una disminución del área de infarto del 40 %, no obstante, si comparamos ambos tratamientos entre sí no existe diferencia, es decir, la molécula sintetizada tiene el mismo efecto que el estradiol libre, siendo el mismo resultado para el caso de las ratas gonadectomizadas. Cuando comparamos el efecto obtenido en ratas íntegras y ratas gonadectomizadas se observa una clara diferencia en los tamaños del infarto siendo mayor para estas últimas aproximadamente una disminución del 60%. Esto se explica por la influencia hormonal, en este caso de testosterona, que pudiera estar aromatizando a nivel local en el endotelio a estradiol¹¹ e influir en los resultados obtenidos.

El daño por la isquemia, en este estudio, es un daño irreversible porque ocluimos la arteria ligándola durante 1 hora y no podemos influir en éste con los tratamientos. En cambio, nosotros encontramos que el daño por la reperfusión, que es aun más grande que el daño por la isquemia, puede ser abatido casi en su totalidad, incluso cuando empleamos dosis 10 ó 100 veces más bajas con los tratamientos empleados. En este sentido si nosotros observamos el porcentaje de disminución del daño causado solo por la reperfusión (fig. 11), podemos resaltar que en los

tratamientos en donde se empleó estradiol libre o estradiol conjugado hubo una disminución aproximada del 75% del daño causado por la reperfusión en las ratas íntegras; y un porcentaje por arriba del 85% en ratas gonadectomizadas. Aunque no hay una diferencia estadística entre los distintos tratamientos, si existe un efecto cardioprotector derivado del estradiol ya sea libre o unido a dextrán. Estos datos son de relevante importancia, por un lado debido a que el estradiol podría estar preconditionando a las células a protegerse de un daño por reperfusión después de la isquemia por alguna vía de señalización membranal, y por otro, el uso de nuestro conjugado estradiol dextrán nos permite afirmar que esos efectos son originados a nivel de la membrana. Estos resultados concuerdan, al menos en parte, con los de otros investigadores en donde sugieren que la activación del receptor a estrógeno a nivel de membrana desencadenan un efecto cardioprotector mediante la activación de cascadas de señalización^{23,24}.

Cuando se evalúa el efecto de los agonistas a RE α y β , PPT y DPN respectivamente, sobre el tamaño del infarto en el mismo modelo, los resultados sugieren una clara participación del ER α involucrado en los efectos benéficos del estradiol al disminuir el tamaño del infarto significativamente cuando se utiliza el agonista PPT (α). El agonista DPN (β) no muestra diferencia significativa respecto del control, estos datos concuerdan con varios estudios previos en donde se ha demostrado la participación del receptor α estrogénico cuando se evalúan los efectos del estradiol sobre el daño vascular de una forma no genómica a través de eventos desencadenados a nivel de membrana²⁵⁻²⁹. El hecho de que no exista diferencia significativa con el agonista β estrogénico no quiere decir que no haya efecto, se ha propuesto una acción dominante para el receptor α estrogénico sobre el β para algunos tejidos, o bien efectos antagonistas de la misma hormona estimulando diferentes receptores³⁰. En la señalización de los estrógenos debe haber un balance dinámico entre receptores α y β estrogénicos³¹ de tal forma que en nuestro caso, aunque se sabe que hay expresión de receptores β , probablemente no en número suficientes para provocar un efecto significativo. A la fecha aun se sabe poco en relación a la participación de los receptores β estrogénicos y existen controversias de su presencia en el sistema cardiovascular³⁰.

Los mecanismos intracelulares que explican la disfunción endotelial después de un evento de isquemia reperfusión esperan a ser resueltos. En nuestro trabajo encontramos que la actividad de PKC α , se encuentra muy elevada en el proceso de infarto inducido por isquemia-reperfusión en ratas íntegras comparadas con su control normal. Esto concuerda con los datos encontrados por otros investigadores en donde exponen que el daño tisular es mediado al menos en parte por la activación

de PKC dependiente de especies reactivas de oxígeno, por lo que su inhibición se traduce en una protección tisular en contra del daño por isquemia-reperfusión^{32,33}. En este sentido cuando nosotros medimos la actividad relativa de PKC α en condiciones de infarto en ratas tratadas previamente con estradiol libre o estradiol-dextrán observamos una significativa reducción de la actividad de PKC α . Estos resultados también fueron encontrados por otros investigadores, en donde señalan que existe una cardioprotección dependiente de la activación de PKC por el estradiol³⁴, aunque los mecanismos aun son inciertos, se propone que la activación de PKC es dependiente de la activación proteínas G acopladas a fosfolipasa C^{35,36}. En nuestro caso podemos afirmar que el tratamiento previo con estradiol libre o estradiol conjugado evita un daño mayor ante un evento de isquemia-reperfusión y por lo tanto, la activación de PKC α es menor. Con todo, se ha propuesto una vía de señalización en donde la activación de PKC converge en una enzima, cinasa de la sintasa de glicógeno 3 β , que promueve la supervivencia celular³⁵. Nuestros resultados muestran una clara disminución en la activación de PKC inducida por isquemia/reperfusión en presencia de estradiol libre o estradiol-dextrán en los animales tratados.

CONCLUSIÓN

El abordaje terapéutico con THR a mujeres posmenopáusicas tiene como desventajas la generación de controversias relacionadas con el efecto protector de los estrógenos en enfermedades cardiovasculares y la aparición de efectos adversos entre los que se incluyen cáncer de mama, endometrial y tromboembolismo. Es por ello que en este trabajo se presenta una estrategia que permite resolver al menos en parte, estas desventajas, motivo del presente trabajo. En este sentido concluimos:

1. Logramos la síntesis del complejo macromolecular de 17 β -estradiol unido a dextrán 2x10⁶ Da. Esto se demuestra, con el corrimiento espectrofotométrico del conjugado

estradiol-dextrán en donde se observa un efecto batocrómico, mediante el desplazamiento de la curva hacia la izquierda respecto al estradiol libre.

2. Logramos la síntesis del complejo macromolecular de 17β -estradiol marcado con tritio unido a dextrán 2×10^6 Da. Queda demostrado por su actividad específica de 2.22×10^{14} dpm/mmol de E_2 marcado.
3. El confinamiento del conjugado estradiol marcado con tritio unido a dextrán es demostrando por la permanencia en el lumen vascular, al menos en un periodo de 12 hrs, sin que éste difunda a las células de los diferentes tejidos.
4. Cuando se evalúa el conjugado de estradiol dextrán en un modelo de infarto por isquemia/reperfusión en ratas íntegras normales, los resultados demuestran un efecto protector, establecido además de la disminución en el tamaño del área de infarto, por una disminución casi completa del daño ocasionado por la reperfusión en el sistema cardiovascular similar al del estradiol solo. Esta condición es aun mayor cuando las ratas son gonadectomizadas, posiblemente debido a que no hay influencia de la testosterona y a su aromatización local a estradiol a nivel de endotelio. Estos efectos ocurren con dosis incluso 100 veces menores que las dosis fisiológicas reportadas.
5. Sugerimos que el efecto cardioprotector del estradiol-dextran es mediado por la participación del receptor alfa estrogénico, expuesto por la acción del agonista estrogénico PPT (agonista α) sobre la disminución del tamaño del área de infarto en un modelo de daño por isquemia-reperfusión en ratas íntegras y gonadectomizadas.
6. Finalmente exponemos que la actividad relativa de $PKC\alpha$, se ve disminuida cuando se administra el conjugado de estradiol unido a dextrán previo al proceso de isquemia-reperfusión coronaria evitando un mayor daño al tejido.

Lo anterior nos permite afirmar que el confinamiento al lumen vascular del estradiol induce efectos cardioprotectores en un modelo de daño por isquemia/reperfusión coronaria, y que estos efectos son mediados a través de mecanismos iniciados a nivel de la membrana celular probablemente por el aumento de NO o por el preconditionamiento celular.

PERSPECTIVAS

Es necesario buscar moléculas expresadas en el endotelio que puedan ser blanco de un abordaje farmacológico más adecuado que nos permita diseñar complejos moleculares ligados a estradiol que pudieran ser bio-dirigidos a esas moléculas específicas del endotelio en diferentes zonas que desencadenen acciones rápidas a nivel de membrana celular sin afectar otros tipos celulares. Por otro lado, de acuerdo a nuestros resultados, surge la necesidad de evaluar dosis más bajas en el abordaje terapéutico de la terapia hormonal de reemplazo.

Referencias

1. Martínez-Morales G. (2004). "Terapia Hormonal de Reemplazo y Cáncer". Rev Colombiana de Obs y Gin 55(1): 40-59
2. Hulley, S. F., C. Barrett-Connor, E. Cauley, J. Grady, D. Haskell, W. Knopp, R. Lowery, M. Satterfield, S. Schrott, H. Vittinghoff, E. Hunninghake, D. (2002). "Noncardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II)." Jama 288(1): 58-66.
3. Grodstein, F.Manson, J. E.Stampfer, M. J. (2001). "Postmenopausal hormone use and secondary prevention of coronary events in the nurses' health study. a prospective, observational study." Ann Intern Med 135(1): 1-8.

4. Manson, J. E. Martin, K. A. (2001). "Clinical practice. Postmenopausal hormone-replacement therapy." N Engl J Med 345(1): 34-40.
5. Nadal, A. D., M.Valverde, M. A. (2001). "The estrogen trinity: membrane, cytosolic, and nuclear effects." News Physiol Sci 16: 251-5
6. Bellido-Benavente P, (1999) "Concentración plasmática de estrógenos en mujeres posmenopáusicas que reciben terapia estrogénica oral y transdérmica." Ginecol Obstet 45(1):23-6
7. Russo, J.Hu, Y. F.Yang, X.Russo, I. H. (2000). "Developmental, cellular, and molecular basis of human breast cancer." J Natl Cancer Inst Monogr(27): 17-37.
8. Gruber, C. J. Tschugguel, W. Schneeberger, C. Huber, J. C. (2002). "Production and actions of estrogens." N Engl J Med 346(5): 340-52.
9. Arnal, J. F. Bayard, F. (2002). "Alteration in endothelial estrogen receptor expression: a potential key of vasculoprotection by estrogens?" Circ Res 91(9): 759-60.
10. Kim, K. H. Bender, J. R. (2005). "Rapid, estrogen receptor-mediated signaling: why is the endothelium so special?" Sci STKE 2005(288): pe28.
11. Sierra-Ramirez, A.Morato, T.Campos, R.Rubio, I.Calzada, C.Mendez, E.Ceballos, G. (2004). "Acute effects of testosterone on intracellular Ca²⁺ kinetics in rat coronary endothelial cells are exerted via aromatization to estrogens." Am J Physiol Heart Circ Physiol **287**(1): H63-71.
12. Rubio, R. Ceballos, G. (2000). "Functional implications of sole and selective activation of intravascular coronary endothelial hormonal receptors." Acta Pharmacol Sin 21(7): 577-86.
13. Zenteno-Savin, T. Sada-Ovalle, I.Ceballos, G. Rubio, R. (2000). "Effects of arginine vasopressin in the heart are mediated by specific intravascular endothelial receptors." Eur J Pharmacol 410(1): 15-23.
14. Castillo-Hernandez, J. R. Rubio-Gayosso, I.Sada-Ovalle, I. Garcia-Vazquez, A. Ceballos, G.Rubio, R. (2004). "Intracoronary angiotensin II causes inotropic and vascular effects via different paracrine mechanisms." Vascul Pharmacol 41(4-5): 147-58.
15. Rubio, R. Ceballos, G. Balcels, E. (1999). "Intravascular adenosine: the endothelial mediators of its negative dromotropic effects." Eur J Pharmacol 370(1): 27-37.
16. Figueroa-Valverde, L. L., H.Castillo-Henkel, C.Munoz-Garcia, O.Morato-Cartagena, T.Ceballos-Reyes, G. (2002). "Synthesis and evaluation of the cardiovascular effects of two, membrane impermeant, macromolecular complexes of dextran-testosterone." Steroids 67(7): 611-9.

17. Grady, D. H., D. Bittner, V. Blumenthal, R. Davidson, M. Hlatky, M. Hsia, J. Hulley, S. Herd, A. and S. N. Khan, L. K. Waters, D. Vittinghoff, E. Wenger, N. (2002). "Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II)." Jama 288(1): 49-57.
18. Hermanson, GT. Mallia, AK. Smith, PK. "Immobilized Affinity ligand Techniques" 1992. Academic Press Inc.
19. Sudhir, K.Ko, E.Zellner, C.Wong, H. E.Hutchison, S. J. Chou, T. M.Chatterjee, K. (1997). "Physiological concentrations of estradiol attenuate endothelin 1-induced coronary vasoconstriction in vivo." Circulation 96(10): 3626-32.
20. Ogita, H.Node, K.Asanuma, H.Sanada, S.Takashima, S.Asakura, M.Kitakaze, M.Hori, M. (2002). "[Amelioration of ischemia- and reperfusion-induced myocardial injury by the selective estrogen receptor modulator, raloxifene, in the canine heart]." J Cardiol 39(1): 55-6.
21. Sitges, M.Roque, M.Solanes, N.Rigol, M.Heras, M.Roig, E.Luis Pomar, J.Jimenez, W.Sanz, G. (2001). "[Estradiol enhances endothelium-dependent vasodilation via a nitric oxide pathway]." Rev Esp Cardiol 54(8): 990-6.
22. Zhai, P.Eurell, T. E.Cotthaus, R.Jeffery, E. H.Bahr, J. M.Gross, D. R. (2000). "Effect of estrogen on global myocardial ischemia-reperfusion injury in female rats." Am J Physiol Heart Circ Physiol 279(6): H2766-75.
23. Hafezi-Moghadam, A.Simoncini, T.Yang, Z.Limbourg, F. P.Plumier, J. C.Rebsamen, M. C.Hsieh, C. M.Chui, D. S.Thomas, K. L.Prorock, A. J.Laubach, V. E.Moskowitz, M. A.French, B. A.Ley, K.Liao, J. K (2002). "Acute cardiovascular protective effects of corticosteroids are mediated by non-transcriptional activation of endothelial nitric oxide synthase." Nat Med 8(5): 473-9.
24. Ho, K. J. Liao, J. K. (2002). "Non-nuclear Actions of Estrogen: New Targets for Prevention and Treatment of Cardiovascular Disease." Mol Interv 2(4): 219-28.
25. Chambliss, K. L.Simon, L.Yuhanna, I. S.Mineo, C.Shaul, P. W. (2005). "Dissecting the basis of nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estradiol: role of ERalpha domains with known nuclear functions." Mol Endocrinol 19(2): 277-89.
26. Kher, A.Wang, M.Tsai, B. M.Pitcher, J. M.Greenbaum, E. S.Nagy, R. D.Patel, K. M.Wairiuko, G. M.Markel, T. A.Meldrum, D. R. (2005). "Sex differences in the myocardial inflammatory response to acute injury." Shock 23(1): 1-10.

27. Li, L.Haynes, M. P.Bender, J. R. (2003). "Plasma membrane localization and function of the estrogen receptor alpha variant (ER46) in human endothelial cells." Proc Natl Acad Sci U S A 100(8): 4807-12.
28. Pare, G.Krust, A.Karas, R. H.Dupont, S.Aronovitz, M.Chambon, P.Mendelsohn, M. E. (2002). "Estrogen receptor-alpha mediates the protective effects of estrogen against vascular injury." Circ Res 90(10): 1087-92.
29. Zhai, P.Eurell, T. E.Cooke, P. S.Lubahn, D. B.Gross, D. R. (2000). "Myocardial ischemia-reperfusion injury in estrogen receptor-alpha knockout and wild-type mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol 278(5): H1640-7.
30. Koehler, K. F.Helguero, L. A.Haldosen, L. A.Warner, M.Gustafsson, J. A. (2005). "Reflections on the discovery and significance of estrogen receptor beta." Endocr Rev 26(3): 465-78.
31. Imamov, O.Shim, G. J.Warner, M.Gustafsson, J. A. (2005). "Estrogen receptor beta in health and disease." Biol Reprod 73(5): 866-71.
32. Asano, G.Takashi, E.Ishiwata, T.Onda, M.Yokoyama, M.Naito, Z.Ashraf, M.Sugisaki, Y. (2003). "Pathogenesis and protection of ischemia and reperfusion injury in myocardium." J Nippon Med Sch 70(5): 384-92.
33. Inagaki, K.Chen, L.Ikeno, F.Lee, F. H.Imahashi, K.Bouley, D. M.Rezaee, M.Yock, P. G.Murphy, E.Mochly-Rosen, D.. (2003). "Inhibition of delta-protein kinase C protects against reperfusion injury of the ischemic heart in vivo." Circulation 108(19): 2304-7.
34. Hunter, J. C.Kostyak, J. C.Novotny, J. L.Simpson, A. M.Korzick, D. H. (2006). "Estrogen Deficiency Decreases Ischemic Tolerance in Aged Rat Myocardium: Roles of PKC{delta},PKC{epsilon}, Akt, and GSK3{beta}." Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.
35. Przyklenk, K.Li, G.Simkhovich, B. Z.Kloner, R. A. (2003). "Mechanisms of myocardial ischemic preconditioning are age related: PKC-epsilon does not play a requisite role in old rabbits." J Appl Physiol 95(6): 2563-9.