

03062

12
29



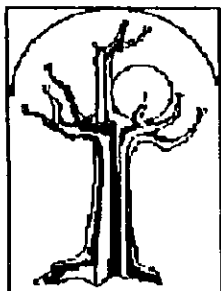
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

UNIDAD ACADÉMICA DE LOS CICLOS PROFESIONAL Y DE
POSGRADO.

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS.

**“MECANISMO DE ACCIÓN DEL EFECTO VASODILATADOR
DE ANDRÓGENOS Y SU PARTICIPACIÓN SOBRE LA
PRESIÓN ARTERIAL DE LA RATA”.**

TESIS QUE PARA OBTENER DE GRADO DE MAESTRO EN
INVESTIGACIÓN BIOMÉDICA BÁSICA PRESENTA:



Q.F.B. RICARDO HERNÁNDEZ ÁVILA

MÉXICO, D.F., 1998.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

25-7-10



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente:	Dr. José Luis Reyes Sánchez
Vocal:	Dra. María Mercedes Perusquía Nava
Secretario:	Dr. Carlos Miguel Villalón Herrera
Suplente:	Dr. Marco Antonio Cerbón Cervantes
Suplente:	Dra. Marta Romano Pardo

LUGAR DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

El presente trabajo fue realizado en el laboratorio de Endocrinología de la Reproducción, perteneciente al Departamento de Biología Celular del Instituto de Investigaciones Biomédicas, U. N. A. M., bajo la dirección de la Dra. María Mercedes Perusquía Nava. Desarrollado con financiamiento de la Dirección General del Personal Académico (DGAPA), proyecto No. IN211597.

Los experimentos de presión arterial en la rata descerebrada y desmedulada fueron realizados en el laboratorio de Farmacología Cardiovascular, Sección de Terapéutica Experimental, CINVESTAV IPN, bajo la asesoría del Dr. Carlos Miguel Villalón Herrera, quién fungió como cotutor en los exámenes tutorales del tema, según el programa de Maestría y Doctorado en Investigación Biomédica Básica.

AGRADECIMIENTOS

Deseo expresar mi agradecimiento a la Dra. Mercedes Perusquía Nava por su invaluable asesoría, orientación, motivación, sus rígidas indicaciones y enseñanzas para la realización de este trabajo.

Al Dr. Carlos Miguel Villalón Herrera por su dirección en los experimentos de registro de presión arterial; además de reconocer sus valiosos comentarios durante mi formación académica.

Al Dr. Carlos Kubli Garfias por sus valiosas enseñanzas, sus agudos comentarios y sus exigentes indicaciones.

Al CONACyT por la beca que me otorgó como estudiante de la Maestría en Investigación Biomédica Básica.

A la Sra. Irma Rodríguez García y al Sr. Arturo Contreras Bustos por su apoyo técnico; así como la ayuda de Ricardo Vazquez.

A mis demás compañeros del laboratorio: M.C. Armando Juárez y a la Sra. Margarita Salazar.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas y a la U.N.A.M.

DEDICATORIAS

A Kenya:

Por todo ese tiempo
no compartido.

A Bárbara:

Ya que en todo momento me
ha brindado su amor y confianza.

¡A las dos Gracias por darme la oportunidad de seguir superándome!

A mis padres: Galdina y Genaro;
a mis hermanos: Fabiola, Enrique
y Magdalena.

A mi tío Pedro;
la base de donde partí
hacia esta aventura.

A todos ellos “gracias por estar ahí”.

Parte del presente estudio fue publicado en:

Perusquía, M., Hernández, R., Morales, M.A., Campos, M.G. and Villalón, C.M. ROLE OF ENDOTHELIUM IN THE VASODILATING EFFECT OF PROGESTINS AND ANDROGENS ON THE RAT THORACIC AORTA. Gen. Pharmacol. 27(1): 181-185, 1996.

Y presentado en:

Perusquía, Mercedes and Hernández, Ricardo. VASODILATING EFFECT OF 5-REDUCED STEROIDS ON ISOLATED RAT AORTA 37th Annual Meeting of Western Pharmacology Society. Hawaii, USA. January 30-February 4 abstract 31-1 (1994).

Hernández, Ricardo y Perusquía, Mercedes. PAPEL DEL ENDOTELIO EN EL EFECTO VASODILATADOR DE PROGESTINAS Y ANDRÓGENOS. I Congreso de Carteles del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. 12 de mayo. pag. 2 (1995)

Hernández, R. y Perusquía, M. MECANISMO DE ACCIÓN DEL EFECTO VASODILATADOR DE 5 β -DIHIDROTESTOSTERONA EN AORTA TORÁCICA AISLADA DE RATA. XVIII Congreso Nacional de Farmacología, Facultad de Medicina; Universidad Autónoma de San Luis Potosí, San Luis Potosí, San Luis Potosí. 12 al 14 de julio. pag. 7 (1995).

Hernández, Ricardo y Perusquía, Mercedes. VASODILATACIÓN DE ANDRÓGENOS 5-REDUCIDOS EN LA AORTA AISLADA DE RATA XXXVIII Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas; Querétaro, Querétaro. 27 al 31 de agosto. O-85 (1995).

Hernández, R., Villalón, C. y Perusquía, M. DISMINUCIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL MEDIA DE LA RATA DESCEREBRADA Y DESMEDULADA POR 5 β -DIHIDROTESTOSTERONA. II Congreso de Carteles del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. 11 de marzo pag. 17 (1996).

Hernández, R. y Perusquía, M. EFECTO RELAJANTE DE 5 β -DIHIDROTESTOSTERONA SOBRE LA CONTRACTURA DE NORADRENALINA Ó POTASIO EN LA AORTA TORÁCICA AISLADA DE RATA. Curso-Simposio Reproducción en Vertebrados. Querétaro, Gro. 28 de febrero (1997).

Hernández, R. y Perusquía, M. MECANISMO DE ACCIÓN DEL EFECTO VASODILATADOR DE 5 β -DIHIDROTESTOSTERONA *IN VITRO*. III Congreso de Carteles del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. 8 de mayo pag. 24 (1997).

ÍNDICE

	Página
Índice	ii
Lista de Tablas	v
Lista de Figuras	vi
Lista de Abreviaturas	viii
RESUMEN	xi
CAPITULO I. ANTECEDENTES	1
a) Enfermedades Cardiovasculares y Esteroides Sexuales.	1
b) Efecto de los Esteroides en el Sistema Cardiovascular.	2
i) Efecto vasodilatador de hormonas esteroides.	2
ii) Presión arterial y esteroides.	3
c) Mecanismo de la Acción Vasodilatadora de Esteroides Sexuales.	5
CAPITULO II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	9
CAPITULO III. HIPÓTESIS	10
CAPITULO IV. METAS	11
CAPITULO V. JUSTIFICACIÓN	12
CAPITULO VI. OBJETIVO GENERAL	13
CAPITULO VII. OBJETIVOS PARTICULARES	14
1) Estudio del sitio y mecanismo de la acción vasodilatadora <i>in vitro</i> de 5 β -dihidrotestosterona.	14
2) Efecto de los andrógenos sobre la presión arterial.	15
CAPITULO VIII. METODOLOGÍA	16
1) Estudio del sitio y mecanismo de la acción vasodilatadora <i>in vitro</i> de 5 β -dihidrotestosterona.	16
a) Acción GABAérgica sobre el tono vasomotor de la aorta torácica de rata.	18
b) Efecto vasodilatador de 5 β -DHT en presencia de los antagonistas GABA _A .	19

ÍNDICE

	Página
c) Efecto vasodilatador de 5 β -DHT sobre contracciones inducidas por noradrenalina (NA) ó por altas concentraciones de cloruro de potasio (KCl).	19
d) Prevención de la contracción de NA y KCl por nifedipina y 5 β -DHT.	20
e) Efecto de nifedipina y 5 β -DHT sobre la contracción inducida por NA y KCl.	20
f) Acción de BAY K 8644 sobre el efecto vasodilatador de 5 β -DHT.	21
g) Efecto vasodilatador de 5 β -DHT en presencia de un antagonista β -adrenérgico.	22
2) Efecto de los andrógenos sobre la presión arterial media de la rata descerebrada y desmedulada en:	23
a) Condiciones control.	23
b) Condiciones de pretratamiento con atropina.	24
3) Análisis de los datos.	25
4) Substancias utilizadas.	26
CAPITULO IX. RESULTADOS	29
1) Acción GABAérgica sobre el tono vasomotor de la aorta torácica aislada de rata.	30
2) Efecto vasodilatador de 5 β -DHT en presencia de los antagonistas GABA $_A$.	30
3) Efecto de 5 β -DHT sobre contracciones inducidas por NA y KCl.	33
4) Prevención de las contracciones de NA y KCl por nifedipina y 5 β -DHT.	35
5) Relajación del tono de las contracciones de NA y KCl por nifedipina y 5 β -DHT.	39
6) Efecto del agonista de los canales de calcio BAY K 8644 sobre el efecto vasodilatador de 5 β -DHT.	40

ÍNDICE

	Página
7) Efecto vasodilatador de 5β -DHT en presencia de un antagonista β -adrenérgico.	43
8) Efecto sobre la presión arterial.	45
a) Estudio de vehículos.	45
b) Efecto de andrógenos.	47
c) Efecto de 5β -DHT en presencia de atropina.	55
CAPITULO X. DISCUSIÓN	58
CAPITULO XI. CONCLUSIONES	65
CAPITULO XII. BIBLIOGRAFÍA	66

LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla I	Relajación de la contracción de NA por 5 β -DHT en presencia y ausencia de bicuculina y picrotoxina.	32
Tabla II	Porcentaje de relajación provocado por 5 β -DHT sobre las contracciones inducidas por noradrenalina ó potasio.	33
Tabla III	Efecto relajante de 5 β -DHT sobre las contracciones de noradrenalina y potasio en la aorta torácica aislada de rata libre de endotelio.	35
Tabla IV	Porcentaje de relajación por 5 β -DHT sobre la contracción de noradrenalina y potasio alto en ausencia y presencia de BAY K 8644.	40
Tabla V	Porcentaje de relajación de isoproterenol y de 5 β -DHT sobre contracciones inducidas por noradrenalina en presencia y ausencia de propranolol.	44
Tabla VI	Efecto de los andrógenos sobre presión arterial media de las ratas descerebradas y desmeduladas con infusión continua de noradrenalina.	47
Tabla VII	Efecto de acetilcolina en presencia y ausencia de atropina sobre la presión arterial media de ratas macho adultas descerebradas y desmeduladas con infusión continua de noradrenalina.	55

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Sistema de registro.	17
Figura 2	Efecto de vehículos sobre la contractura de NA.	29
Figura 3	Efecto de GABA, muscimol, bicuculina y picrotoxina sobre la contractura de NA.	31
Figura 4	Efecto de 5 β -DHT en presencia y ausencia de bicuculina y picrotoxina sobre la contractura de NA.	32
Figura 5	Curvas concentración-respuesta del efecto de 5 β -DHT sobre la contractura de NA ó KCl.	34
Figura 6	Trazos típicos del efecto de nifedipina y 5 β -DHT en la contracción inducida por NA.	36
Figura 7	Trazos típicos del efecto de nifedipina y 5 β -DHT en la contracción inducida por potasio.	37
Figura 8A	Porcentaje del antagonismo por nifedipina y 5 β -DHT en las contracciones inducidas por noradrenalina y potasio.	38
Figura 8B	Porcentaje de relajación de nifedipina y 5 β -DHT sobre las contracciones inducidas por noradrenalina y potasio.	38
Figura 9	Registros típicos del efecto 5 β -DHT en presencia y ausencia de BAY K sobre la contractura de NA.	41
Figura 10	Registros típicos del efecto de 5 β -DHT en presencia y ausencia de BAY K sobre la contracción de potasio.	42
Figura 11	Trazos típicos del efecto de 5 β -DHT en presencia y ausencia de propranolol sobre la contracción de NA.	43
Figura 12	Efecto de vehículos sobre la presión arterial media en la rata descerebrada y desmedulada.	46
Figura 13	Registro típico de presión arterial media y el efecto hipotensor producido por diferentes andrógenos.	48

LISTA DE FIGURAS

	Pagina	
Figura 14	Curva dosis-respuesta del efecto hipotensor de diferentes andrógenos.	49
Figura 15	Efecto hipotensor de diferentes andrógenos a una dosis equimolecular.	51
Figura 16	Evaluación del efecto hipotensor de diferentes andrógenos durante 90 min.	52
Figura 17	Representación estereoquímica de 5 α -DHT, 5 β -DHT y eticolanolona.	54
Figura 18	Efecto hipotensor de 5 β -DHT en presencia y ausencia de atropina.	56
Figura 19	Registro típico del efecto de 5 β -DHT en presencia de atropina	57
Figura 20	Representación esquemática para el mecanismo de acción de andrógenos.	65

LISTA DE ABREVIATURAS.

α	Alfa
ACh	Acetilcolina
AMP _c	Adenosin monofosfato cíclico
β	Beta
BAY K 8644	Activador de los canales de calcio por dihidropiridina
Bic	Bicuculina
CaCl ₂	Cloruro de calcio
Cl ⁻	Cloro
CI ₅₀	Concentración inhibitoria media
cm	Centímetros
cm ³	Centímetros cúbicos
CO ₂	Bióxido de carbono
DHT	Dihidrotestosterona
E.E.M.	Error Estándar de la Media
e.g.	Por ejemplo (<i>exempli gratia</i>)
E _{max}	Efecto máximo
et al.	Y alumnos (<i>et alumni</i>)
ETOH	Etanol
g	Gramos
GABA	Ácido γ -amino butírico
GTP	Guanosin trifosfato
°C	Grados centígrados
h	Hora
i. e.	Es decir (<i>id est</i>)
Iso	Isoproterenol
KCl	Cloruro de potasio
KH ₂ PO ₄	Fosfato dibásico de potasio
L	Lavado
M	Molar
MgSO ₄	Sulfato de magnesio

LISTA DE ABREVIATURAS.

min	Minutos
ml	Mililitro
ML	Músculo Liso
MLV	Músculo Liso Vascular
μ M	Micromolar
μ mol/Kg·min	Micromoles por Kilogramo por minuto
mm	Milímetros
mM	Milimolar
mN	Milnewtons
Mus	Muscimol
N	Normal
NA	Noradrenalina
NaCl	Cloruro de sodio
NaHCO ₃	Bicarbonato de sodio
NIF	Nifedipina
nM	Nanomolar
NMDA	Ácido N-metil-D-aspartico
O ₂	Oxígeno
P	Propranolol
P.A.M.	Presión Arterial Media
PGF _{2α}	Prostaglandina F _{2α}
pH	Potencial de hidrógeno
Pic	Picrotoxina
%	Por ciento
RK	Ringer-Krebs
seg	segundos
SNC	Sistema Nervioso Central
>	Mayor que
<	Menor que

LISTA DE ABREVIATURAS.

\geq	Mayor ó igual que
\pm	Más menos
$=$	Igual

RESUMEN

La hipertensión arterial ha sido asociada entre otras cosas a la acción de los glucocorticoides y mineralocorticoides; los estrógenos tienen efectos opuestos, produciendo vasodilatación en diferentes lechos vasculares.

Asimismo, las progestinas y andrógenos 5-reducidos inducen un marcado efecto vasodilatador en la aorta torácica de la rata. Sin embargo, se desconoce el mecanismo por el cual ejercen su acción vasodilatadora. Por lo tanto, se evaluó la acción GABAérgica sobre el tono vascular de la aorta torácica de rata, analizando el efecto de la 5 β -dihidrotestosterona (5 β -DHT) en ausencia y presencia de antagonistas GABAérgicos. Colateralmente la participación del calcio externo en la vasodilatación del esteroide fue evaluada con nifedipina (90 nM) y 5 β -DHT (30 μ M) antes y sobre la contracción de noradrenalina y potasio. En otros experimentos se evaluó el efecto de BAY K 8644 (10 μ M) antes y sobre la vasodilatación de 5 β -DHT en ambos tipos de contracciones. También, se evaluó la posible interacción de 5 β -DHT con los β -adrenoreceptores independientes del endotelio presentes en la membrana de la célula vascular en presencia y ausencia de propranolol. Los andrógenos (5 α -DHT, 5 β -DHT y eticolanolona) fueron evaluados sobre la presión arterial media de la rata descerebrada y desmedulada, investigando también la acción de 5 β -DHT en presencia de atropina en el mismo modelo experimental.

La relajación de la aorta producida por la 5 β -DHT no se modificó por los antagonistas GABAérgicos. El esteroide relaja las contracciones de noradrenalina ó potasio en una forma dependiente de la concentración; la nifedipina y el esteroide muestra un sinergismo del efecto de cada compuesto por separado. La reversión de la relajación con BAY K indica que la 5 β -DHT produce su efecto por bloqueo del calcio extracelular al interior de la célula y que no es por una interacción con los receptores que inducen relajación (β -adrenérgicos) ya que el efecto persiste aun en presencia de propranolol (antagonista β -adrenérgico).

En la rata descerebrada y desmedulada con vagotomía bilateral, los andrógenos produjeron un efecto hipotensor dependiente de la dosis. Asimismo, la atropina no bloqueo el efecto hipotensor de 5 β -DHT. Estos hallazgos indican que el efecto hipotensor de los andrógenos no es debido a una interacción con el Sistema Nervioso Central, el nervio vago ó con receptores muscarínicos; más bien, el efecto hipotensor podría deberse a una acción directa de los andrógenos sobre las células del músculo liso vascular.

I. ANTECEDENTES

a) Enfermedades Cardiovasculares y Esteroides Sexuales

Las alteraciones fisiológicas que se observan en el sistema cardiovascular bajo la influencia hormonal ó el embarazo son bien conocidas. Los esteroides sexuales en enfermedades cardiovasculares, se han considerado epidemiológicamente ligados al sexo por la incidencia de ciertos desórdenes. Así, por ejemplo, se ha reportado menor incidencia de enfermedades cardiovasculares y cerebrovasculares en mujeres premenopausicas que en hombres de la misma edad, incrementándose los riesgos progresivamente después de la menopausia, cuando la producción de estrógenos y progestinas en las mujeres es marcadamente reducida (Kannel y Feinleib, 1972; Weiss, 1972; Bengtsson, 1973; Kannel et al., 1976; World Health Organization, 1976; Godsland et al., 1987). También se ha reportado que los problemas coronarios y cardiacos aumentan rápidamente después de la cesación de la función ovárica (Kannel et al., 1976), sugiriendo que todos estos cambios pueden ser hormonalmente mediados (Weiss, 1972) y relacionados con el decremento en la producción de estrógenos y progesterona en la perimenopausia.

Algunos estudios epidemiológicos han sugerido que los estrógenos podrían tener un efecto "protector" sobre el estado de las enfermedades cardiovasculares *i.e.*, hipertensión arterial, isquemia, infarto del miocardio, etc., (Von Eiff et al., 1985; Williams et al., 1990), además de la mortalidad producida por estos trastornos (Henderson y Paganini-Hill, 1991; Mann e Inman, 1975). Por otro lado, es generalmente aceptado que la terapia de remplazamiento de estrógenos en mujeres posmenopausicas reducen el riesgo de problemas coronarios en relación a la incidencia que se presenta en las posmenopausicas sin remplazo de estrógenos (Knopp, 1988, Matthews et al., 1989). Los efectos benéficos de los estrógenos en los síntomas de la menopausia (Campbell y Whitehead, 1977) y osteoporosis (Ettinger et al., 1985) son actualmente de gran interés. Así, resulta cautivante estudiar los

mecanismos a través de los cuales las hormonas esteroides podrían proveer beneficios cardiovasculares, particularmente a la mujer.

b) Efecto de los Esteroides en el Sistema Cardiovascular

i) Efecto vasodilatador de las hormonas esteroides

El efecto de las hormonas esteroides en el sistema cardiovascular incluye efectos directos sobre los vasos sanguíneos. El cortisol, por ejemplo, es necesario para mantener el tono vascular y en su ausencia ocurre una vasodilatación anormal con una consecuente disminución de la presión arterial. Las primeras evidencias señalaron una vasodilatación periférica inducida por estrógenos (Reynolds y Foster, 1940) y progesterona (Selye, 1941). Posteriormente, estudios *in vitro* han sugerido que los estrógenos afectan directamente la contractilidad vascular (Batra y Bengtsson, 1978), mostrando que los estrógenos causan vasodilatación en diferentes lechos vasculares de varias especies, *e.g.*, vasos uterinos, umbilicales y de la piel; vena portal y arterias coronarias arteroescleróticas (Silva de Sa y Meirelles, 1977; Raddino et al., 1986; Vargas et al., 1989; Magness y Rosenfeld, 1989; McCalden, 1975; Williams et al., 1990; Shan et al., 1994).

Las progestinas y andrógenos también han sido reportados como sustancias vasodilatadoras. Así, se describe que una progestina (pregnanolona) produce un efecto relajante sobre la arteria coronaria de perro (Kubli-Garfias, 1987) y, más recientemente, se ha demostrado que progestinas y andrógenos 5-reducidos inducen un marcado efecto vasodilatador en la aorta torácica de rata; siendo el andrógeno 5 β -dihidrotestosterona el más potente (Perusquía et al., 1996).

El efecto relajante de los esteroides no es privativo del músculo liso vascular, ya que se ha mostrado que la progesterona (Csapo, 1959; Csapo y Weist, 1969) y varios de sus metabolitos son capaces de inhibir la contracción uterina espontánea (Kubli-Garfias et al., 1979, 1980, 1983a), así como la

inducida por calcio y potasio (Perusquía et al., 1990; Perusquía y Villalón, 1996), oxitocina (Perusquía y Campos, 1991), prostaglandinas (Perusquía y Kubli-Garfías, 1992), acetilcolina (Perusquía et al., 1991b) y serotonina (Perusquía et al., 1991a). También pueden inhibir la respuesta contráctil inducida por bario en epidídimo y vesícula seminal (Kubli-Garfías et al., 1983b), además de provocar relajación en el tracto urinario, tejido gastrointestinal (Kumar, 1962; Bruce y Behsudi, 1979; Batra et al., 1985; Kubli-Garfías et al., 1987) y músculo liso aéreo (Perusquía et al., 1997).

ii) Presión arterial y esteroides

La hipertensión arterial se ha asociado, entre otras cosas, con niveles elevados de glucocorticoides y mineralocorticoides (Kuhlman et al., 1939; Tonolo et al., 1988; Bravo, 1986). Más aún, la elevación de la presión sanguínea parece estar mediada por una acción de los esteroides adrenales en el Sistema Nervioso Central (van den Berg et al., 1990; Gómez-Sánchez, 1991). En los últimos años se ha reportado que los receptores cerebrales de mineralocorticoides desempeñan un papel importante en la patogénesis de la hipertensión clínica (Janiak y Brody, 1988; Gómez-Sánchez, 1991).

En marcado contraste, se ha encontrado un efecto contrario al de los glucocorticoides y mineralocorticoides por los esteroides sexuales. Así, un notable efecto vasodilatador reportado para los esteroides sexuales sugiere un aumento del flujo sanguíneo, con una consecuente disminución en la resistencia periférica, resultando un efecto hipotensor. Las evidencias señalan una disminución de la presión arterial en ratas castradas tratadas con estradiol (Fischer y Swain, 1977) y que, niveles elevados de estrógenos incrementan el flujo sanguíneo uterino durante el estro (Stice et al., 1987b). En mujeres posmenopausicas pueden causar una reducción de la resistencia periférica e incremento del flujo sanguíneo medio (Volterrani et al., 1995), además de producir una acción hipotensora por incrementar la velocidad del fluido arterial, así como, disminuir la resistencia vascular sistólica y diastólica

de la presión sanguínea (Magness y Rosenfeld, 1989; Vargas et al., 1995). Siendo también capaces de antagonizar los efectos vasopresores de la noradrenalina en ratas (Kondo et al., 1980) y que, el tratamiento prolongado de estradiol disminuye la respuesta presora de: angiotensina II en conejas castradas (Chesley y Tepper, 1967; Yoshimura et al., 1984) y en ratas macho (Shan et al., 1994) y, de [Arg⁸] vasopresina en ratas ovariectomizadas (Toba et al., 1991).

Adicionalmente, se ha mostrado que otros esteroides no estrógenos pueden disminuir la presión sanguínea, por ejemplo: en gatos anestesiados con Altesín (alfaxolona, 3 α -hidroxi-5 α -pregnan-11, 20-diona), un esteroide anestésico de uso clínico que produce hipotensión (Dodds y Twissell, 1972). Por su parte, la progesterona (Armstrong, 1959; Franklin et al., 1962; Genest et al., 1962; Soldati et al., 1966; Rylance et al., 1985), el acetato de deoxicorticosterona (Wambach y Higgins, 1979), la tetrahidroprogesterona (Holsbauer et al., 1985) y la dehidroepiandrosterona (Shafagoj et al., 1992) son capaces de inducir un efecto hipotensor. Además del efecto antihipertensivo de la progesterona, se le ha atribuido un efecto diurético en la enfermedad hipertensiva del embarazo (toxemia gravídica) (Sammour et al., 1975, 1982).

No obstante a toda la información anterior, se deben considerar las evidencias de algunos reportes clínicos previos, que han mostrado que el tratamiento con estrógenos a mujeres posmenopausicas no han sido conclusivos. Así, se ha reportado que su administración sola ó en combinación con progesterona ha producido efectos contradictorios sobre la presión sanguínea; la hiperestrogémia puede constituir un factor de riesgo cardiovascular cuando se presenta patológicamente en machos (Phyllips, 1975), cuando altas dosis de estrógenos son administradas en algunas condiciones patológicas, como es el cáncer de próstata (Veterans Administration Cooperative Urological Research Group, 1967), ó cuando se usan anticonceptivos orales (Mann e Imman, 1975). En humanos, se ha reportado que los estrógenos administrados oralmente no presentaron un

efecto discernible sobre la función renal y la respuesta presora a angiotensina II en mujeres no preñadas, concluyendo que estas observaciones contradictorias hacen difícil entender la acción de los estrógenos en el sistema cardiovascular (Chesley y Tepper, 1967).

c) Mecanismo de la Acción Vasodilatadora de Esteroides Sexuales

Debido a que el efecto vasodilatador de estradiol (Vargas et al., 1995; McNeill et al., 1996; Jiang et al., 1991; Shan et al., 1994), progestinas y andrógenos (Perusquía et al., 1996) ha sido observado como una respuesta rápida (2-8 min), estos estudios han sugerido que la unión al receptor nuclear, la transcripción del gene y la síntesis de proteínas no pueden estar involucrados en esta acción, determinando que se trata de efectos de tipo no genómico, como se ha reportado para la acción anestésica, sedativa/hipnótica y anticonvulsiva de algunos neuroesteroides y esteroides neuroactivos en el Sistema Nervioso Central (Baulieu et al., 1978; Schumacher, 1990 y McEwen, 1991).

El descubrimiento de un sitio receptor a esteroides en el canal de cloro (Cl⁻) del complejo receptor ácido γ -aminobutírico_A-benzodiazepinas y, el hallazgo de los efectos de progesterona sobre la movilización de iones de calcio (Ca²⁺) en oocitos y espermatozoides, han encausado nuevamente la atención a la acción de los esteroides sobre la superficie membranal.

El interés en los efectos no genómicos de los esteroides en la función cerebral ha aumentado desde el descubrimiento de un mecanismo molecular que media los efectos rápidos de ciertos esteroides. Investigaciones en relación a la acción de los esteroides anestésicos revelan que pueden modular alostéricamente, a los receptores del ácido γ -aminobutírico (GABA) (Harrison y Simmonds, 1984), aumentando la conductancia al Cl⁻. Así, numerosos reportes posteriores han mostrado una relativa alta afinidad de los 3 α -hidroxiesteroides por los receptores GABA_A (Majewska et al., 1986;

Harrison et al., 1987; Morrow et al., 1987; Gee et al., 1988; Gee et al., 1987; Peters et al., 1988; Turner et al., 1989; Morrow et al., 1990); proponiendo la existencia de sitios de unión del esteroide con el receptor GABA_A (Morrow et al., 1990; Lan et al., 1990), con múltiples sitios de reconocimiento en las subunidades de este receptor GABAérgico (Rommerts y van der Molen, 1971; Robinson y Karabolos, 1973; Jung-Testas et al., 1989; Krieger y Scott, 1984; Barnea et al., 1990; Melcangi et al., 1990). Todos estos estudios han promovido la especulación de que algunos de los 3 α -hidroxiesteroides, son moduladores endógenos de los receptores GABA_A, facilitando la respuesta de GABA (potenciación), la cual aumenta la entrada de Cl⁻ para disminuir la excitabilidad celular.

Sin embargo, se ha propuesto que los neuroesteroides y esteroides neuroactivos pueden también modular canales iónicos operados por otros ligandos. Tal es el caso para el receptor de glicina sensitivo a estriocina y el receptor de NMDA, donde algunos esteroides inhiben las corrientes de Cl⁻ inducidas por glicina y, otros potencian la despolarización inducida por glicina (Prince y Simmonds, 1992). Asimismo, se ha propuesto que algunos esteroides pueden ser inhibidores competitivos de la unión de ligandos al receptor σ de opioides (Su et al., 1988).

Algunas evidencias han sugerido que los esteroides neuroactivos pueden interactuar con la proteína G acoplada a receptores ó sistemas efectores en membranas de neuronas. Varios estudios han confirmado que el esteroide puede estar involucrado con la inhibición de la actividad de la adenil ciclasa y la activación de la fosfolipasa C (Finidori-Lepicard et al., 1981; Sadler y Maller, 1981 y 1982; Blondeau y Baulieu, 1984; Smith, 1989; Chien et al., 1991). Además, se ha reportado que los esteroides pueden estar regulando sus respuesta a través del AMPc (Minami et al., 1990; Borski et al., 1991; Petitti, 1992) y de estimular la actividad de la GTPasa (Ravindra y Aronstam, 1992).

También se ha propuesto un mecanismo adicional para algunos esteroides GABA_A activos, en el que pueden rápida y reversiblemente suprimir las corrientes de Ca²⁺ dependientes de voltaje en neuronas (French-Mullen y Spence, 1991).

Con respecto al mecanismo de acción que tienen los esteroides sexuales en su efecto vasodilatador, existen pocas y encontradas evidencias. Así, se ha descrito que los estrógenos pueden inducir efectos indirectos en el sistema cardiovascular, *e.g.*, a través de una interacción con el sistema nervioso adrenérgico (Colucci et al., 1982). Considerando que el endotelio vascular desempeña un papel preponderante en la acción de varios agentes vasoactivos, en los últimos años se ha descrito que el 17β-estradiol muestra un efecto relajante por un mecanismo dependiente del endotelio (Miller et al., 1988; Williams et al., 1990; McNeill et al., 1996). Estos resultados, sin embargo, contrastan con numerosos reportes que muestran una acción no genómica e independiente del endotelio para el efecto vasodilatador de estrógenos (Jiang et al., 1991; Ravi et al., 1994; Shan et al., 1994; Rodríguez et al., 1996), progesterona, testosterona y varios de sus metabolitos 5-reducidos (Perusquía et al., 1996).

También ha sido propuesto que las hormonas esteroides sexuales podrían interferir con la entrada de Ca²⁺ hacia las células del músculo liso vascular (McCalden, 1975; Harder y Coulson, 1979; Stice et al., 1987a,b; Jiang et al., 1991; Dhar et al., 1994) y uterino (Takayama, 1986; Downing et al., 1988; Perusquía et al., 1990, 1991a,b; Perusquía y Campos, 1991; Perusquía y Kubli-Garfias, 1992 y 1994, Perusquía y Villalón, 1996). Asimismo, para explicar el directo y agudo efecto inhibitorio de 17β-estradiol sobre la contracción del músculo liso vascular, recientemente se ha utilizado la técnica de "*patch-clamp*" para estudiar el efecto de esta hormona sobre los canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje en células cultivadas de músculo liso vascular de la línea A7r5 (Zhang et al., 1994) y en células aisladas de la arteria

caudal de rata (Shan et al., 1994), observando que 17β -estradiol es capaz de inhibir las corrientes de Ca^{2+} voltaje dependientes.

II. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Se sabe que los padecimientos cardiovasculares son menos frecuentes en mujeres premenopausicas que en hombres de la misma edad y mujeres posmenopausicas. Asimismo, la estrógenoterapia en mujeres posmenopausicas reduce el riesgo de problemas coronarios. Sin embargo, la información existente en relación a los demás esteroides sexuales (no estrógenos) es prácticamente nula. Así, resulta importante estudiar los mecanismos, a través de los cuales las hormonas esteroides puedan proveer beneficios cardiovasculares, particularmente en la mujer. En este sentido, el presente estudio pretende revelar la participación de estas hormonas en la modulación del tono vasomotor del sistema vascular y su posible acción como "protectores" en padecimientos cardiovasculares, específicamente en la hipertensión arterial.

III. HIPÓTESIS

Se propone que tanto los estrógenos como otros esteroides sexuales, como son la 5 β -dihidrotestosterona y algunos eticolanos, participen como vasomoduladores para prevenir trastornos en el sistema circulatorio como puede ser la hipertensión arterial. Se plantea que esta modulación es directamente en la membrana celular del músculo liso; a través de la disminución de la entrada de calcio extracelular, sin la participación indirecta de neurotransmisores y/ó interacción con receptores.

IV. METAS.

1. Debido a que el mecanismo molecular de la acción no genómica de las hormonas esteroides en tejidos excitables no se ha determinado, se pretende dilucidar el sitio(s) y mecanismo de acción del efecto relajante de los esteroides sexuales masculinos en músculo liso vascular.

2. El estudio permitirá establecer la importancia y relación entre el efecto vasodilatador e hipotensor de los esteroides sexuales con repercusión directa en el discernimiento de la etiología de la hipertensión arterial y así, proveer beneficios cardiovasculares.

V. JUSTIFICACIÓN

Puesto que la hipertensión arterial es un problema de salud pública, resulta necesario estudiar, comprender y establecer los mecanismos endocrinos de la regulación de la presión arterial. Más aún cuando parece evidente que un grupo de hormonas esteroides *i.e.*, glucocorticoides y mineralocorticoides la aumentan y otras familias como estrógenos, andrógenos y progestinas la disminuyen. Sin embargo, lo anterior no es suficiente, es necesario conocer los mecanismos subyacentes en la acción biológica de las hormonas esteroides.

VI. OBJETIVO GENERAL

Establecer el papel que desempeñan los esteroides sexuales masculinos en el Sistema Cardiovascular, proponiendo así, el mecanismo y sitio de acción de su efecto vasodilatador. Así como, determinar la posible acción antihipertensiva de algunos andrógenos naturales, estructuralmente relacionados, sobre la presión arterial.

VII. OBJETIVOS PARTICULARES

1) Estudio del sitio y mecanismo de la acción vasodilatadora *in vitro* de 5 β -dihidrotestosterona.

En trabajos previos hemos mostrado que a partir de una amplia serie de progestinas y andrógenos 5-reducidos, la 5 β -dihidrotestosterona (5 β -DHT) resultó ser el esteroide con mayor potencia vasodilatadora (Perusquía et al., 1996). Por lo que se pretende investigar:

a) La posible participación del neurotransmisor GABA sobre el tono vascular de la aorta torácica aislada de rata, estableciendo farmacológicamente la presencia del receptor GABA_A, a través de la respuesta de GABA y muscimol (agonista GABA_A). Asimismo, determinar si el efecto vasodilatador de la hormona (5 β -DHT) es por interactuar con los receptores GABA_A; para tal propósito, se emplearon los antagonistas GABA_A específicos bicuculina y picrotoxina.

b) Relacionar la participación del calcio extracelular con la acción vasodilatadora de 5 β -DHT:

1) Estudiar la asociación de los canales de calcio, operados por voltaje y los operados por receptor, en el efecto relajante de 5 β -DHT; examinando la potencia vasodilatadora de esta hormona sobre las contracciones inducidas por la noradrenalina (NA) y el cloruro de potasio (KCl). Así como comparar su acción vasodilatadora con nifedipina (antagonista de canales de calcio sensibles a voltaje) en ambos tipos de contracciones.

ii) Analizar la posible reversión del efecto relajante de 5β -DHT por BAY K 8644 (activador de los canales de calcio sensibles a las dihidropiridinas), sobre las contracciones inducidas por NA y KCl.

c) Evaluar la probable interacción de 5β -DHT con los adrenoceptores β_2 independientes del endotelio, presentes en la membrana de la célula muscular que inducen vasodilatación; para tal propósito, se analizará el efecto de la 5β -DHT antes y después de propranolol (antagonista β -adrenérgico).

2) Efecto de los andrógenos sobre la presión arterial.

a) Relacionar el efecto vasodilatador, inducido por andrógenos, con una acción hipotensora; estableciendo la acción de 5β -DHT y otros dos andrógenos, estructuralmente relacionados (5α -DHT y eticolanolona), sobre la respuesta presora a NA en la rata descerebrada y desmedulada, colateralmente descartando la posibilidad de que el efecto sea por depresión del Sistema Nervioso Central.

b) Determinar la posible participación del Sistema Colinérgico, como un efecto indirecto de los andrógenos en su acción hipotensora, observando su efecto en presencia de atropina (antagonista colinérgico muscarínico).

c) Establecer la relación estructura química-actividad biológica de los andrógenos en base a su potencia hipotensora.

VIII. METODOLOGÍA

1) Estudio del sitio y mecanismo de la acción vasodilatadora *in vitro* de 5 β -dihidrotestosterona.

Para este estudio se utilizaron ratas macho adultas (200-250 g) de la cepa Wistar. Los animales fueron sacrificados mediante dislocación cervical, inmediatamente la aorta torácica, de la porción descendente, fue extraída y colocada en una caja de Petri, la cual contenía solución Ringer Krebs-Henseleit con la siguiente composición (mM): Glucosa (12.0), NaHCO₃ (24.9), NaCl (119.5), KCl (4.74), KH₂PO₄ (1.18), MgSO₄ (1.18) y CaCl₂ (2.5); mantenida a 37°C y con pH de 7.4 ajustado mediante burbujeo constante de una mezcla gaseosa de 5 % de CO₂ en 95 % de O₂.

En todos los experimentos se utilizaron aortas libres de endotelio, debido a que el efecto vasodilatador de las progestinas y andrógenos ha sido propuesto como independiente del endotelio (Perusquía et al., 1996). Las preparaciones fueron obtenidas raspando cuidadosamente la cara interna de la aorta mediante la introducción de un hilo de *nylon* trenzado a través del lumen. Posteriormente la aorta fue cortada en anillos de aproximadamente 1 cm de longitud. De esta manera los anillos aórticos fueron suspendidos horizontalmente, con la ayuda de dos ganchos de acero inoxidable en forma de "L", en cámaras de incubación para tejido aislado que contenían 10 ml de solución Ringer. Uno de los ganchos se sujetó a la base de la cámara de incubación y el otro gancho fue atado a un hilo (seda de 000) y sujetado a un transductor (Grass, modelo FT03C), el cual detectó las señales mecánicas y las envió a un polígrafo (Grass, modelo 79) de 4 canales (Fig. 1). Los anillos fueron sometidos a una tensión inicial de 1 g (10 mN de fuerza) y mantenidos en un período de estabilización de 1 h.

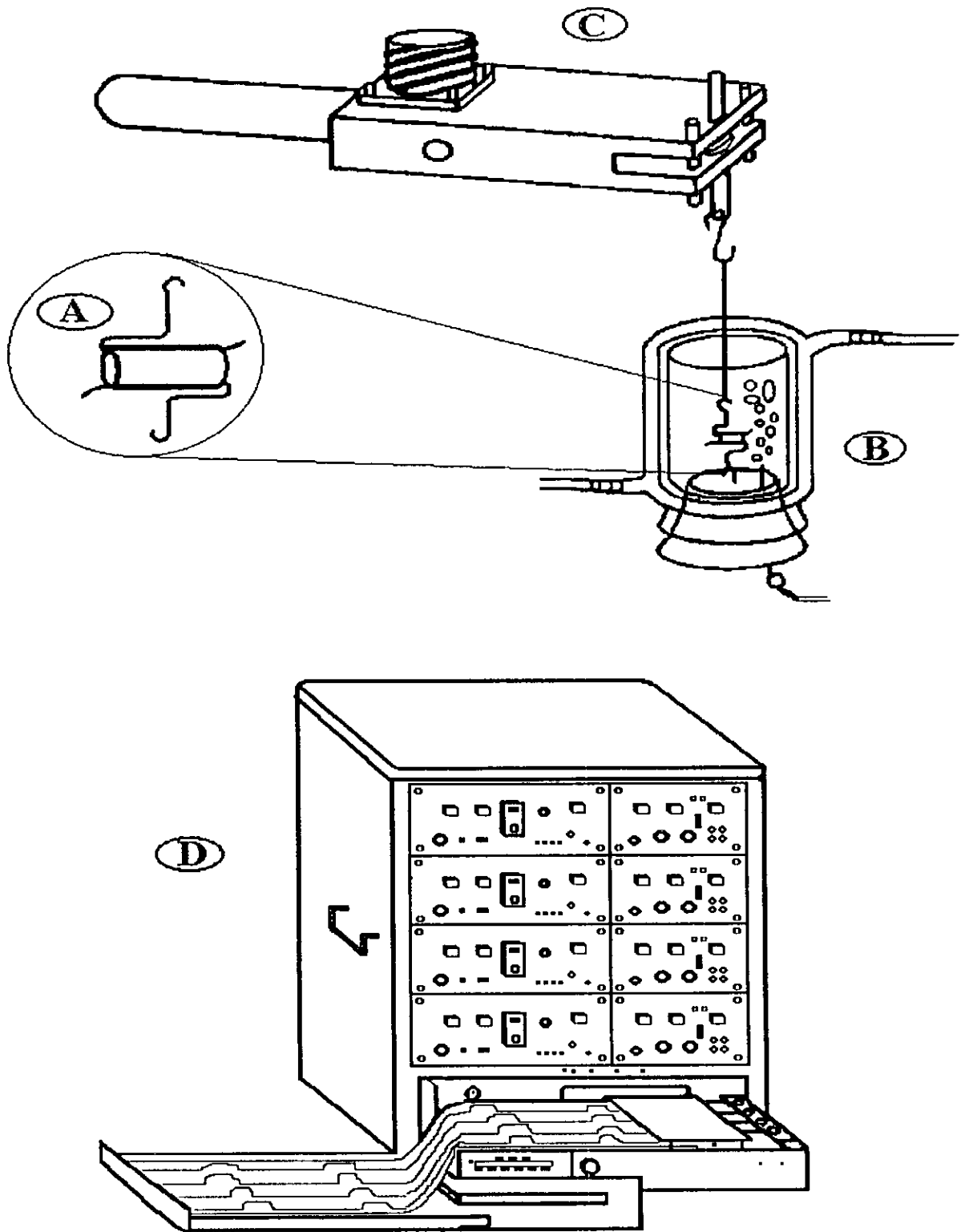


Figura 1. Sistema de registro: A) Anillos sujetos por dos ganchos de acero inoxidable, B) Cámara de incubación, C) transductor, D) Polígrafo.

Después del tiempo de estabilización, los anillos aórticos fueron estimulados con noradrenalina (NA 0.3 μ M) y la contracción fue registrada durante 30 min. Inmediatamente después, el tejido fue lavado con la misma solución Ringer y se dejó recuperar durante 1 h. Para estandarizar la respuesta de NA, se repitieron dos estímulos consecutivos de NA, bajo las mismas condiciones, con la finalidad de establecer reproducibilidad en la contracción inducida por NA. En un estímulo posterior de NA, la contracción fue registrada durante 5 min y fue tomada como valor control; posteriormente se adicionó acetilcolina (ACh 20 μ M) con la finalidad de mostrar farmacológicamente la ausencia de endotelio. Se consideró como preparaciones sin endotelio aquellas en las cuales ACh no modificó el tono de la contracción inducida por NA. Después de 20 min, los tejidos fueron lavados con Ringer, observando la relajación de la contracción hasta que la línea basal alcanzara su posición original. Todas las preparaciones fueron tratadas en la misma forma antes de efectuar algún protocolo experimental.

En todos los experimentos que a continuación se describirán, después de todos los tratamientos, los tejidos fueron lavados (cuando menos 4 veces) con Ringer normal, dejándolos reposar durante 1 h antes de realizar el siguiente estímulo. Por último, se tomó siempre un segundo control con las mismas condiciones del primero para verificar la recuperación y viabilidad del tejido.

a) Acción GABAérgica sobre el tono vasomotor de la aorta torácica de rata.

Después de realizar el protocolo antes descrito para verificar la ausencia de endotelio, se indujo otra contracción con 0.3 μ M de NA y, pasados 5 min se adicionó: GABA (10^{-7} , 10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} y 10^{-3} M) ó muscimol (10^{-6} , 10^{-5} y 10^{-4} M) de manera no acumulativa, después de 10 min los tejidos fueron lavados con

Ringer; posteriormente, se verificó la viabilidad del tejido con otro estímulo de NA sin ningún tratamiento.

b) Efecto vasodilatador de 5 β -DHT en presencia de los antagonistas GABA_A.

Después del protocolo requerido para determinar la ausencia de endotelio, se corroboró el efecto relajante de 5 β -DHT a 30 μ M [concentración que induce un 33.2 ± 0.9 % de relajación previamente reportada (Perusquía et al., 1996)] sobre una siguiente contracción de NA 0.3 μ M. En otros experimentos 5 min después de inducida la contracción con NA, se adicionaron 1, 10 y 100 μ M de bicuculina en unas cámaras y, en otras 1, 10 y 100 μ M de picrotoxina, de manera no acumulativa, y su efecto fue registrado durante 20 min; colateralmente, 5 min después de inducida la contracción con NA se adicionó 100 μ M de bicuculina en unas cámaras y, en otras 100 μ M de picrotoxina. Después de 10 min fueron adicionados 30 μ M de 5 β -DHT. El efecto relajante de 5 β -DHT sobre la contractura de NA fue registrado durante 10 min y comparado en ausencia y presencia de los antagonistas GABA_A. Después de los lavados se registró un último estímulo con NA sin ningún tratamiento.

c) Efecto vasodilatador de 5 β -DHT sobre contracciones inducidas por noradrenalina (NA) ó por altas concentraciones de cloruro de potasio (KCl).

Se evaluó el efecto relajante de 5 β -DHT a diferentes concentraciones (en un rango de 7.5 a 120 μ M) en forma no acumulativa, tanto en las contracciones inducidas por NA (0.3 μ M) como por Ringer de potasio alto (el cual fue obtenido por sustitución de NaCl 64.7 mM por KCl 60 mM). El

esteroide fue adicionado 10 min después de inducida la contracción, registrando su efecto durante 20 min. Con el fin de comparar el efecto del andrógeno, se construyeron así las curvas concentración-respuesta en ambos tipos de contracciones, según el método de Litchfield y Wilcoxon (1949).

d) Prevención de la contracción de NA y KCl por nifedipina y 5 β -DHT.

Posterior al tratamiento previo para iniciar los experimentos, se indujo en unos experimentos la contracción de NA, y en otros la contracción de KCl. La contractura fue registrada durante 20 min y considerada como control; 10 min antes de inducir una segunda contracción, el tejido fue incubado con 90 nM de nifedipina (concentración con la cual se observa la máxima inhibición de la contracción de KCl) ó 5 β -DHT (30 μ M), registrando la contracción durante 20 min y comparada con la contracción anterior (control). De esta forma, se evaluó el efecto de nifedipina ó 5 β -DHT sobre las respuestas inducidas por dos diferentes agentes.

Colateralmente, con la finalidad de observar el efecto preventivo en conjunto de nifedipina y 5 β -DHT, 15 min antes de inducir la contracción con NA ó KCl se adicionó nifedipina (90 nM) y 5 min después 5 β -DHT (30 μ M); pasados 10 min de esta incubación, se indujo la contracción con el agente correspondiente (NA ó KCl), registrando su efecto durante 20 min.

c) Efecto de la nifedipina y 5 β -DHT sobre la contracción inducida por NA y KCl.

Siguiendo con la misma estrategia, en otros experimentos 10 min después de inducida la contracción de NA ó KCl se adicionó nifedipina (90 nM)

ó 5 β -DHT (30 μ M), su efecto fue registrado durante 10 min. La aplicación en conjunto del esteroide y nifedipina también fue probada sobre el tono de la contracción de NA y KCl. Así, 10 min después de inducida la contracción se adicionó nifedipina (90 nM) y 10 min después 5 β -DHT (30 μ M), registrando su efecto durante 10 min.

Finalmente, después de los tratamientos descritos, los tejidos fueron lavados y se indujo una última contracción, que sirvió para observar la recuperación del tejido sin tratamiento.

f) Acción de BAY K 8644 sobre el efecto vasodilatador de 5 β -DHT.

Para obtener información sobre el posible mecanismo de acción de la 5 β -DHT en su efecto vasorelajante *in vitro*, se evaluó la reversión de su acción vasodilatadora con la aplicación del activador de los canales de calcio por dihidropiridina (BAY K 8644). Así, 10 min después de observado el efecto relajante de 30 μ M de 5 β -DHT sobre la contracción inducida por NA ó KCl (según se describió anteriormente), se adicionó el calcio agonista BAY K 8644 a tres diferentes concentraciones (1, 10 y 100 μ M), registrando su efecto durante 10 min. Posteriormente, los tejidos fueron lavados con Ringer y, 1 h después se indujo un estímulo más (con NA ó KCl, según el caso), con el objeto de observar la recuperación de la contracción y la viabilidad del tejido. De esta manera, se evaluó el porcentaje de recuperación que induce el BAY K 8644 sobre la contracción de NA y KCl relajada por el esteroide.

Una vez determinada la concentración adecuada de BAY K 8644 (10 μ M), que induce la respuesta máxima para revertir el efecto relajante del esteroide, en otro diseño experimental, se adicionó BAY K 8644 (10 μ M) 10 min después de inducida la contracción por NA ó KCl, transcurridos 10 min, se adicionó 5 β -DHT (30 μ M). El efecto del esteroide en presencia del activador de

los canales de calcio fue valorado durante 10 min. Finalmente, las preparaciones fueron lavadas con solución Ringer normal.

El efecto del esteroide en ambas preparaciones fue observado y comparado con la adición del BAY K 8644, antes y durante el efecto del esteroide; de esta manera se evaluó el porcentaje de recuperación que induce el activador sobre las contracciones de NA ó KCl relajadas por el esteroide.

g) Efecto vasodilatador de 5 β -DHT en presencia de un antagonista β -adrenérgico.

El efecto de diferentes concentraciones (1, 10 y 100 μ M) del agonista β -adrenérgico, isoproterenol, fue evaluado sobre la contractura de NA (0.3 μ M); el agonista fue adicionado 5 min después de inducida la segunda contracción de NA, registrando la relajación provocada por este agente durante 10 min. Posteriormente, las preparaciones fueron lavadas con Ringer normal, dejando recuperar al tejido durante 1 h antes de adicionar el antagonista β -adrenérgico, propranolol (20 μ M, concentración obtenida en experimentos previos y con la cual se bloquea el efecto relajante de isoproterenol), 5 min después se aplicó NA, la contracción fue registrada durante 10 min, y en seguida se adicionó 100 μ M de isoproterenol (concentración utilizada para observar la respuesta máxima); la acción fue registrada por 10 min, después los tejidos fueron lavados con Ringer. Una hora después, se incubó nuevamente al tejido con 20 μ M de propranolol, 5 min antes del tercer estímulo con NA, y 10 min después de inducida la contracción se adicionó 5 β -DHT (30 μ M), su efecto fue registrado durante 10 min.

2) Efecto de los andrógenos sobre la presión arterial media de la rata descerebrada y desmedulada en:

a) Condiciones control

Para este estudio se utilizaron ratas Wistar macho adultas (220-240 g). Los animales fueron anestesiados con éter para practicar una traqueotomía, a través de la cual se les asistió con respiración artificial (aire ambiental $2 \text{ cm}^3/100 \text{ g}$ de peso del animal) mediante una bomba Palmer (modelo SW). Posteriormente, el animal fue descerebrado y desmedulado, con ayuda de un estilete de acero inoxidable, de 2 mm de diámetro y 25 cm de longitud, el cual fue introducido oblicuamente por la fisura ocular en un ángulo de 45° hasta la parte media del cerebro, seguido de la introducción del estilete a lo largo del canal espinal, para así, desmedular al animal, según la técnica descrita por Shipley y Tilden (1947). Inmediatamente después, el animal fue vagotomizado bilateralmente a nivel cervical y canulado en la carótida para monitorear la presión arterial mediante un transductor de presión (Grass modelo P23XL), enviando la señal a un polígrafo de 6 canales (Grass, modelo 7H). A estos animales se les realizaron dos canulaciones más: en la vena femoral izquierda para administrar los compuestos de prueba (andrógenos) y en la vena femoral derecha para administrar una infusión continua (durante todo el experimento) de NA ($0.059 \mu\text{moles/Kg}\cdot\text{min}$), la cual incrementa la presión arterial del animal en un rango de 125-135 mmHg.

Una vez que la presión arterial media (P.A.M.) se mantuvo constante, por más de 10 min, fue considerada como valor control y se administró por separado: eticolanolona, 5α -DHT y 5β -DHT a diferentes dosis (5, 10, 15, 20 y $25 \mu\text{moles/Kg}$ durante 1.2 min) disueltos en propilen glicol en un volumen variable de 7 a $38 \mu\text{l}$, según la dosis administrada. Cada dosis fue evaluada en forma independiente (no acumulativa). La respuesta fue cuantificada en intervalos de 10 min, comenzando 2 min después de la administración y hasta el min 60. El efecto fue expresado en términos de diferencia de la P.A.M. en

mmHg en relación al valor control. Con los valores obtenidos se construyeron las curvas dosis-respuesta para cada hormona.

Previamente se evaluó el efecto de varios solventes con la finalidad de ser usados como vehículos de los esteroides. De esta forma se probaron: etanol absoluto, propilen glicol y moleculsol a diferentes volúmenes (dosis) y tiempos de administración sobre la P.A.M. con infusión continua de NA (0.059 $\mu\text{moles/Kg}\cdot\text{min}$) en la rata descerebrada y desmedulada.

b) Condiciones de pretratamiento con atropina.

Para descartar la posibilidad de que el efecto hipotensor de los andrógenos sea dado por liberación de acetilcolina (ACh) y/o una posible interacción del esteroide con receptores colinérgicos muscarínicos, previamente, con el mismo modelo experimental, se probaron diferentes dosis de ACh (0.0006-0.06 $\mu\text{moles/Kg}$ durante 1.2 min), administradas a través de la cánula de la vena femoral izquierda. Así, se determinó el efecto máximo (E_{max}) de la acción hipotensora de ACh sobre la respuesta presora de NA (0.059 $\mu\text{moles/Kg}\cdot\text{min}$) a una dosis de 0.0684 $\mu\text{moles/Kg}$ durante 1.2 min, posteriormente se probó atropina a la dosis de 0.003 $\mu\text{moles/Kg}$ durante 1.2 min, con la cual se bloquea la disminución de la P.A.M. que induce ACh. Colateralmente, en otros experimentos, se administró por la vena femoral izquierda atropina (0.003 $\mu\text{moles/Kg}$ durante 1.2 min), 5 min antes de la administración por vena femoral izquierda del andrógeno con mayor potencia hipotensora 5 β -DHT (20 $\mu\text{moles/Kg}$ durante 1.2 min), y así poder comparar el efecto hipotensor del esteroide en presencia y ausencia de atropina.

3) Análisis de los datos.

El efecto *in vitro* de los compuestos es expresado tanto en el texto como en las figuras, en terminos de porcentaje de inhibición en relación al control, obtenido de una media de $n \geq 6 \pm E.E.M.$ para cada concentración (cada concentración fue evaluada en experimentos independientes).

La prevención de la contracción de NA ó KCl por nifedipina ó 5 β -DHT fue considerada en términos de porcentaje en relación a la amplitud (en cm) de la contracción anterior inducida en ausencia de nifedipina ó 5 β -DHT (control 100 %). En los experimentos en los cuales se adicionaron cada uno de los compuestos sobre el tono de la contracción inducida (NA ó KCl) el control considerado (100 %) fue la amplitud de la contracción justo antes de adicionar el compuesto de prueba, y comparado con la amplitud de la contracción 10 min posteriores a la adición de los compuestos.

La evaluación del efecto de los andrógenos, a diferentes dosis, sobre la P.A.M. (125-135 mmHg) inducida por NA, fue cuantificado por la diferencia de la presión arterial en mmHg del control (justo antes de la administración de la droga). El efecto fue la comparación con la presión arterial observada desde el inicio de la administración del esteroide hasta 60 min después, en intervalos de 10 min. Las diferentes dosis probadas fueron evaluadas de manera individual *i.e.*, una sola dosis por experimento ($n = 6 \pm E.E.M.$).

La prueba de "t" de Bonferroni fue utilizada para comparar los datos obtenidos en los experimentos *in vitro*, considerando como diferencia significativa un valor de $P < 0.05$. Sólo en el caso de los experimentos *in situ* con los diferentes andrógenos, se utilizó análisis de varianza.

4) **Substancias utilizadas.**

Con excepción de BAY K 8644 y nifedipina de INC Pharmaceuticals, Inc., Costa Mesa CA., los demás compuestos fueron obtenidos de Sigma Chemical Co., St. Louis MO.

Andrógenos: 3α -hidroxi- 5β -androstan-17-ona (etiocolanolona), 17β -hidroxi- 5α -androstan-3-ona (5α -dihidrotestosterona, 5α -DHT) y 17β -hidroxi- 5β -androstan-3-ona (5β -dihidrotestosterona, 5β -DHT). Debido a la respuesta *per se* que producen los diferentes vehículos probados se usó el de menor toxicidad. Así, para los experimentos *in situ* los esteroides fueron solubilizados en propilen glicol y para los experimentos *in vitro*, 5β -DHT fue solubilizada en etanol absoluto y aplicado en un volúmen final de 0.1 % (17.14 mM).

Activador de los canales de calcio: ácido 1-4-dihidro-2,6-dimetil-5-nitro-4 [2-(triflurometil)-fenil]-3-ácido piridino carboxílico metil éster (BAY K 8644), solubilizado en etanol absoluto y aplicado a un volúmen de 0.1 %.

Bloqueador de la entrada de calcio: ácido 1-4-dihidro-2,6-dimetil-4-(2-nitro-fenil)-3,5-piridino carboxílico dimetil éster (nifedipina), solubilizado en etanol absoluto y aplicado a un volúmen de 0.1 %.

Sustancias colinérgicas

Agonista colinérgico: 2-(acetiloxi)-N,N,N-Cloruro de trietiletanamina (clorhidrato de acetilcolina), solubilizada en agua bidestilada. Antagonista colinérgico: ácido endo (\pm)- α -(hidroxi metil)benzeno acético 8-metil-8-azabicyclo[3.2.1]oco-3-il éster (sulfato de atropina), solubilizado en solución salina fisiológica para su uso en experimentos *in situ*.

Sustancias adrenérgicas

Agonistas adrenérgicos: 1-(3,4-dihidroxifenil)-2-aminoetanol (clorhidrato de noradrenalina) y 4-[1-hidroxi-2-[(1-metiletíl)-amino]etil]-1,2-benzenodiol (isoproterenol), solubilizados en agua bidestilada.

Antagonista adrenérgico: 1-[(1 metietíl)amino]-3-(1-naptleniloxy)-2-propranolol (propranolol), solubilizado en agua bidestilada.

Compuestos GABAérgicos

Ácido γ -amino-n-butírico (GABA), solubilizado en agua bidestilada, y el agonista GABA_A: 5-aminometil-3-hidroxisozole (muscimol), solubilizado en etanol absoluto (0.1 %). Antagonistas GABA_A: [R-(R*,S*)-6-(5,6,7,8-tetrahidro-6-metil-1,3-dioxolo-[4,5-g] isoquinolin-5-y) furo [3,4-e]-1-3-benzodioxol-8-(6H)-ona (bicuculina), solubilizada en etanol absoluto, [1aR-(1 α ,2 β ,3 β ,6 β ,6 α ,8 α S*,8b,3,9R*)]-Hexahidro-2a-hidroxi-8b-metil-9-(1-metileténil)-3,6-metano-8H-1,5,7-trioxaciclopenta[ij]cicloprop[a]-azuleno-4,8(3H)-diona (picrotoxina), solubilizada en HCl (0.1 N), quedando en la cámara de incubación a una concentración de 0.1 mM.

Vehículos

1,2-propanodiol (propilen glicol) de Merck-México. S.A. Utilizado para disolver los esteroides de prueba en los experimentos *in situ*.

Alcohol Etílico (etanol absoluto) de Merck-México, S.A., usado en los experimentos *in vitro* para disolver 5 β -DHT, BAY K 8644, nifedipina, muscimol y bicuculina; aplicando una concentración final de 17.14 mM (volumen total de 0.1 %).

Ácido clorhídrico de Baker analyzed, México usado para solubilizar picrotoxina (volumen total de 0.1 %).

2,3-dihidroxiopropil 2-hidroxy-1,3propanediil éter (moleculsol dilución al 10 %) de Aldrich Chemical Company, Inc. Utilizado como solvente para los andrógenos a administrar por vía intravenosa.

Anestésico:

Éter anhidro (éter) de Baker analyzed, México.

IX. RESULTADOS

Los experimentos *in vitro* designados para evaluar el efecto de los vehículos en que se solubilizaron los esteroides, BAY K 8644, Nifedipina, Bicuculina y Muscimol mostraron que, hasta 30 μ l de etanol (ETOH 0.3 %), al igual que 20 μ l de ácido clorhídrico (HCl 0.1 N) usado para solubilizar picrotoxina, no modifican significativamente ($P > 0.5$) el tono de la contracción inducida por NA ó KCl (Fig. 3C, 3D y 3E). Sin embargo, se pudo observar que otro solvente como moleculsol, el cual solubilizaba idealmente a los esteroides, produce una pérdida del efecto de la hormona.

De esta forma, se determinó que el moleculsol es un buen solvente pero inactiva la acción de los esteroides. Nuestros experimentos indican que el mejor solvente en nuestro modelo para probar los esteroides es el etanol (Fig. 2).

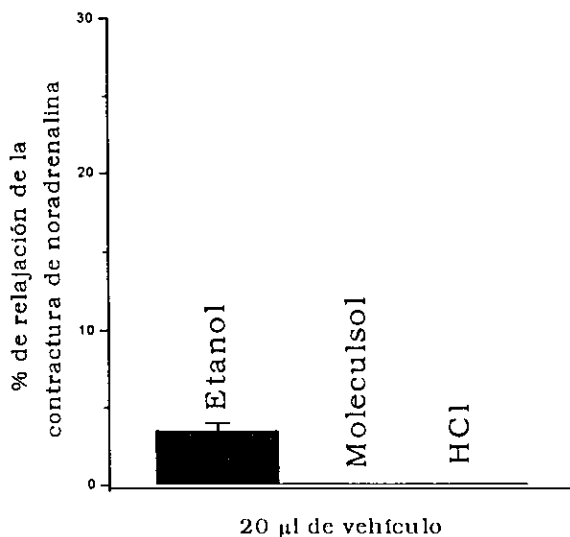


Figura 2. Efecto de los vehículos utilizados para solubilizar 5 β -DHT, Bay K 8644, nifedipina, muscimol, bicuculina y picrotoxina. Las barras verticales muestran el E.E.M. de n = 6.

1) Acción GABAérgica sobre el tono vasomotor de la aorta torácica aislada de rata.

Tanto el neurotransmisor, GABA, evaluado en un amplio rango de concentraciones (10^{-7} a 10^{-3} M), como el agonista GABA_A (muscimol) evaluado a tres diferentes concentraciones (10^{-6} , 10^{-5} y 10^{-4} M), no mostraron modificación del tono de la contracción inducida por NA en preparaciones de aorta sin endotelio (Fig. 3B y 3C).

2) Efecto vasodilatador de 5β-DHT en presencia de los antagonistas GABA_A.

Los antagonistas GABA_A (bicuculina y picrotoxina), a las tres concentraciones usadas (10^{-6} , 10^{-5} y 10^{-4} M) no modificaron el tono de la contracción inducida por NA (Fig. 3D y 3E). Asimismo, la incubación del tejido con cada uno de los antagonistas GABAérgicos no bloquearon el efecto relajante inducido por 5β-DHT (30 μM), mostrando que no hay diferencia significativa ($P > 0.5$) en la vasodilatación inducida por el esteroide en ausencia y presencia de los antagonistas GABA_A (Fig. 4 y Tabla I).

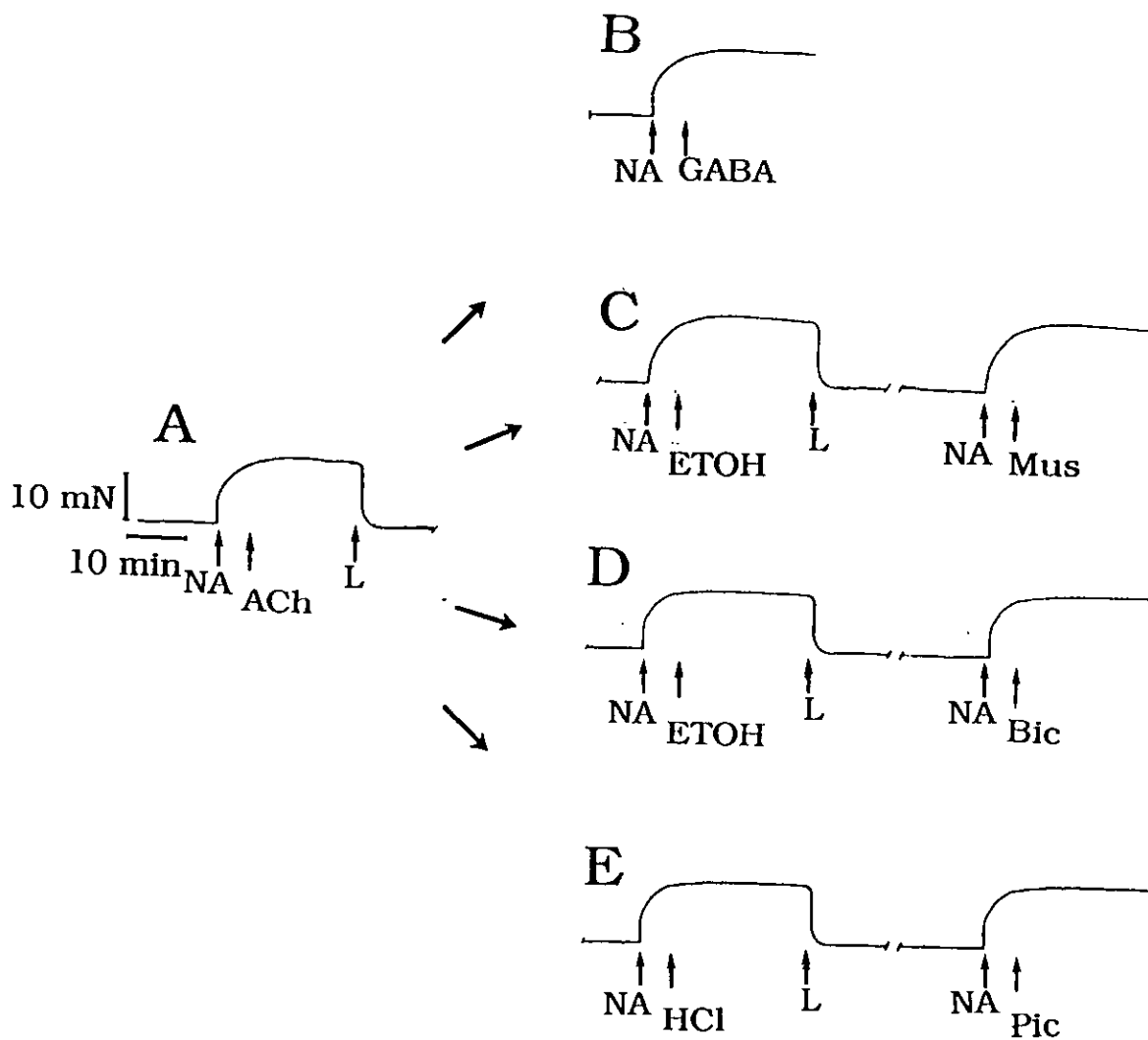


Figura 3. Trazos típicos de la contracción inducida por noradrenalina (NA $0.3 \mu\text{M}$) en aorta torácica de rata sin endotelio, A) muestra la ausencia de endotelio al no observar relajación por acetilcolina (ACh $20 \mu\text{M}$); B) el tono de la contracción inducida por NA no se modifica al administrar GABA (10^{-3} M), C) muscimol (Mus $100 \mu\text{M}$), D) bicuculina (Bic $100 \mu\text{M}$) ó E) picrotoxina (Pic $100 \mu\text{M}$). A la izquierda de cada registro se muestran los controles previos del vehículo utilizado: etanol (ETOH 17.14 mM) para Mus y Bic, ácido clorhídrico (HCl 0.1 N) para Pic, los cuales no inducen cambio sobre el tono de la contracción. L significa lavado del tejido cambiando la solución Ringer.

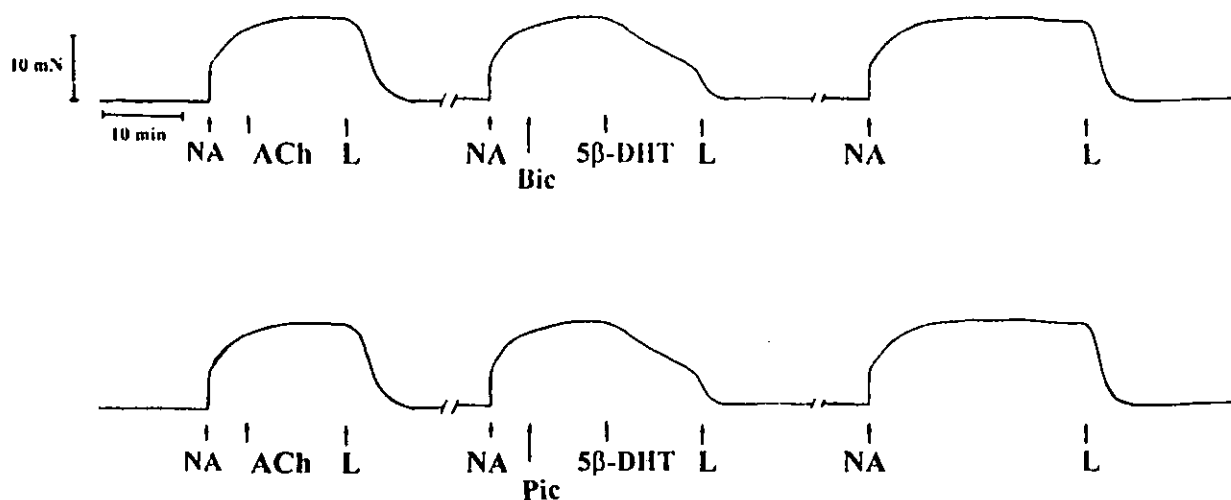


Figura 4. Trazos típicos de la contracción inducida por noradrenalina (NA 0.3 μ M) en aorta torácica de rata sin endotelio, a la izquierda se corrobora la ausencia de endotelio al no observar relajación por acetilcolina (ACh 20 μ M). En la parte central, obsérvese el efecto relajante de 5 β -dihidrotestosterona (5 β -DHT 30 μ M) en presencia de bicuculina (Bic 100 μ M) y picrotoxina (Pic 100 μ M), el último estímulo de NA muestra la viabilidad del tejido. Después de cada tratamiento el tejido fue lavado (L).

TABLA I

Relajación de la contracción de NA por 5 β -DHT en presencia y ausencia de bicuculina y picrotoxina.

TRATAMIENTO	5 β -DHT (30 μ M)	BIC + 5 β -DHT (100 μ M + 30 μ M)	PIC + 5 β -DHT (100 μ M + 30 μ M)
% DE RELAJACION DE LA CONTRACCION INDUCIDA POR NA 0.3 μ M.	33.2 \pm 0.9	32.8 \pm 0.8	33.5 \pm 0.7

Los valores son el resultado de una media de $n \geq 6 \pm$ E.E.M. Los datos fueron no significativos ($P > 0.5$) al comparar con el efecto de 5 β -DHT.

3) Efecto de 5 β -DHT sobre contracciones inducidas por NA y KCl.

El efecto vasodilatador de 5 β -DHT fue observado sobre la contracción inducida por NA y KCl, mostrando un comportamiento lineal dependiente de la concentración. Sin embargo, se observó que las contracciones inducidas por KCl resultaron ser más sensibles a la acción vasodilatadora de 5 β -DHT (Tabla II), mostrando una pendiente mayor (Fig. 5). Los valores del análisis de las curvas, se reflejan en la tabla III, también muestran que el esteroide tiene una potencia relajante mayor sobre la contractura de KCl.

TABLA II

Porcentaje de relajación provocado por 5 β -DHT sobre las contracciones inducidas por noradrenalina ó potasio.

CONCENTRACION (μ M) DE 5 β -DHT	% DE RELAJACION n \geq 6 \pm E.E.M.	
	CONTRACCION INDUCIDA POR	
	NA (0.3 μ M)	KCl (60 mM)
7.5		15.7 \pm 0.3
15	12.6 \pm 0.8	25.1 \pm 0.4*
30	33.2 \pm 0.9	42.1 \pm 0.7*
60	41.3 \pm 1.8	76.5 \pm 2.6**
120	53.6 \pm 1.0	

Diferencia significativa *(P < 0.01), **(P < 0.001), entre ambos tipos de contracciones.

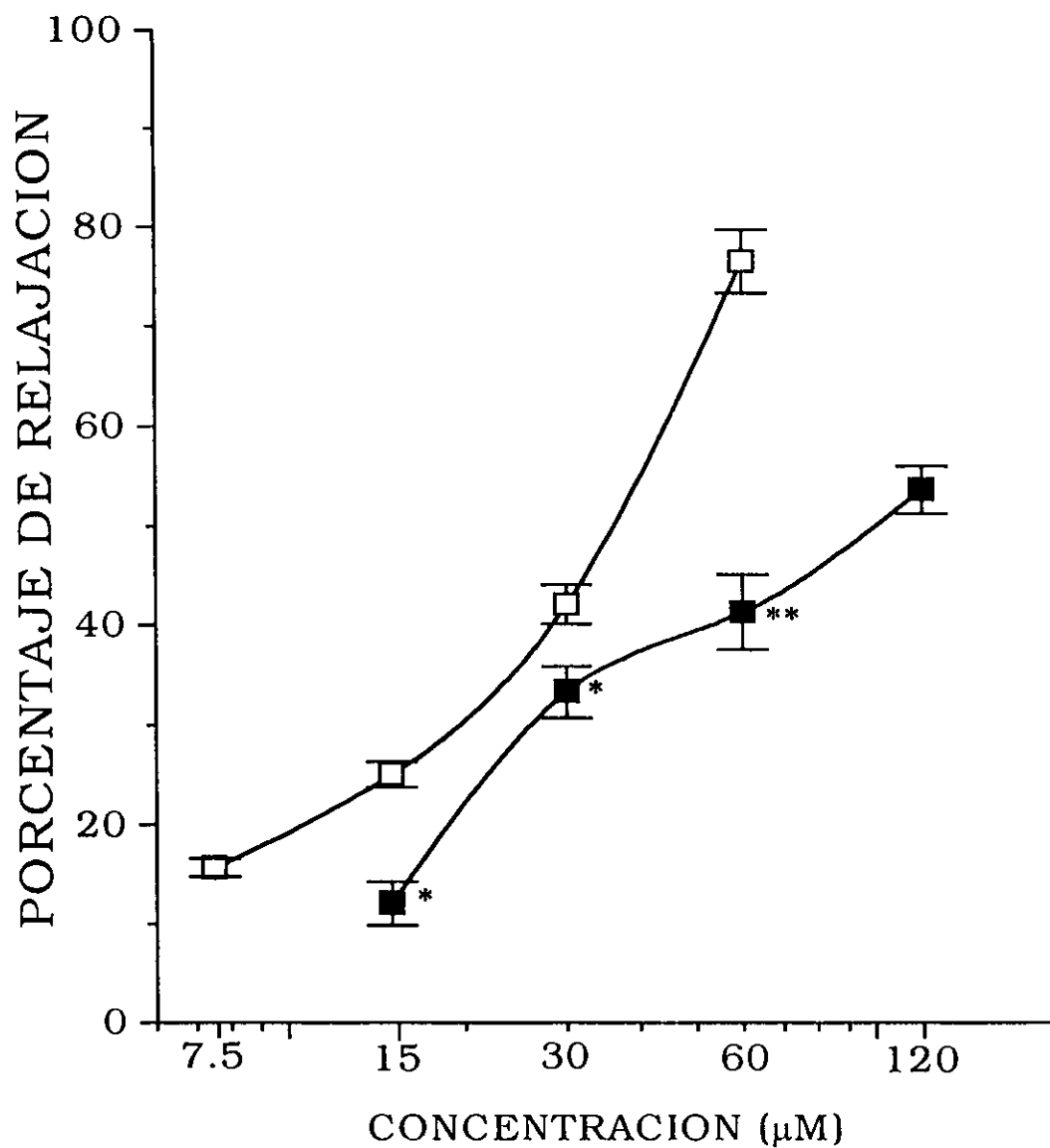


Figura 5. Curvas concentración-respuesta de 5β-DHT sobre la contracción inducida por 0.3 μM de noradrenalina (■) y sobre la contracción inducida por 60 mM de potasio (□) en preparaciones de aorta torácica aislada de rata libre de endotelio. Cada punto representa la media de 6 experimentos ± E.E.M., valores con diferencia significativa *(P < 0.01), **(P < 0.001) comparando ambos tipos de contracciones.

TABLA III

Efecto relajante de 5 β -DHT sobre las contracciones de noradrenalina y potasio en la aorta torácica aislada de rata libre de endotelio.

CONTRACCION INDUCIDA POR:	CI ₅₀	LIMITES INFERIOR-SUPERIOR	PENDIENTE	POTENCIA*
NA (0.3 μ M)	70.8	24.9-201.0	0.38	1.0
KCl (60 mM)	36.9	13.6-100.4	1.1	1.9

CI₅₀ = valor de la concentración de 5 β -DHT la cual causa el 50 % de relajación de la contracción. Obtenido según el método de Lichtfield y Wilcoxon (1949).

*Relación de potencia obtenida por la fórmula: CI₅₀ del esteroide sobre la contractura de NA / CI₅₀ del esteroide sobre la contractura de KCl; asumiendo valor = 1.0 para el efecto sobre la contractura de NA.

4) Prevención de las contracciones de NA y KCl por nifedipina y 5 β -DHT.

Los resultados indican que el bloqueador de los canales de calcio sensibles a voltaje, nifedipina (NIF 90 nM), puede prevenir las contracciones inducidas por NA (Fig. 6) y KCl (Fig. 7). Sin embargo, el antagonista de calcio a 90 nM previene 19.9 \pm 1.7 % la respuesta a NA, en contraste con un 86.9 \pm 1.5 % de prevención de la contracción inducida por KCl (Fig. 8). Con respecto a 5 β -DHT (30 μ M), esta previno tanto la contracción inducida por NA (32.5 \pm 0.9 %) como la contracción inducida por KCl (35.1 \pm 1.0 %), sin diferencia significativa (P > 0.5). Los datos obtenidos muestran un sinergismo entre 5 β -DHT y nifedipina para prevenir las contracciones de NA y KCl. El pretratamiento con nifedipina más 5 β -DHT previenen la contracción de NA (50.4 \pm 0.8) de manera sumatoria (Fig. 6 y 8).

También se observó que el pretratamiento con nifedipina más 5 β -DHT previene totalmente la contracción de KCl (100 %) con mayor potencia que la que hace cada compuesto por separado, mostrando una acción sinérgica (Fig. 7 y 8A).

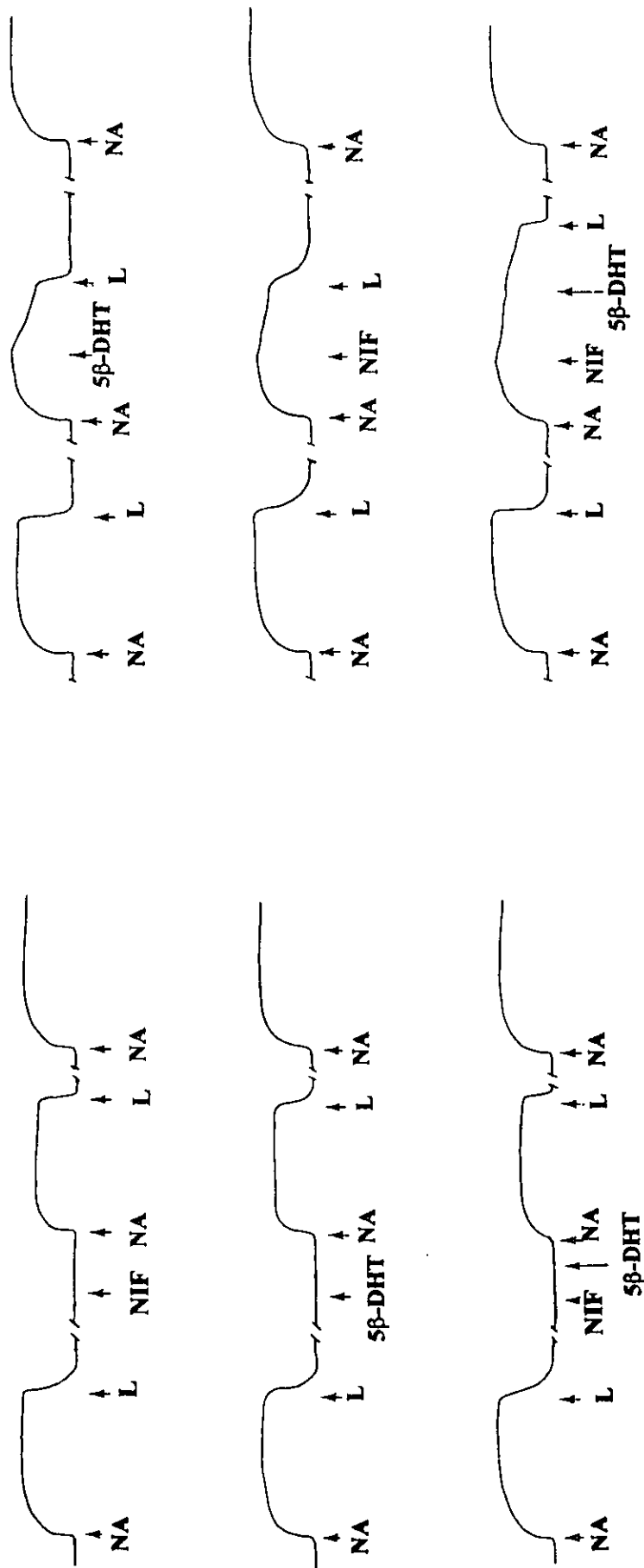
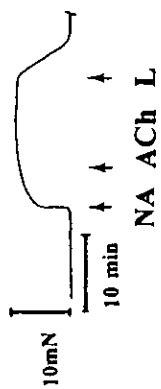


Figura 6. Trazos típicos de la contracción inducida por noradrenalina (NA 0.3 μ M) en aorta torácica aislada de rata sin endotelio: Arriba (en el centro) se corrobora la ausencia de endotelio al no observar relajación por acetilcolina (ACh 20 μ M) sobre la contractura de NA. Los registros de la izquierda muestran el antagonismo de nifedipina (NIF 90 nM) y 5 β -dihidrotestosterona (5 β -DHT 30 μ M) sobre la contracción inducida por NA, también se muestra el sinérgismo de NIF más 5 β -DHT. En los trazos de la derecha se muestra la relajación inducida por 5 β -DHT y NIF sobre la contracción de NA y el sinérgismo de ambos. El último estímulo de NA muestra la viabilidad del tejido. Los tejidos fueron lavados (L) después de cada tratamiento.

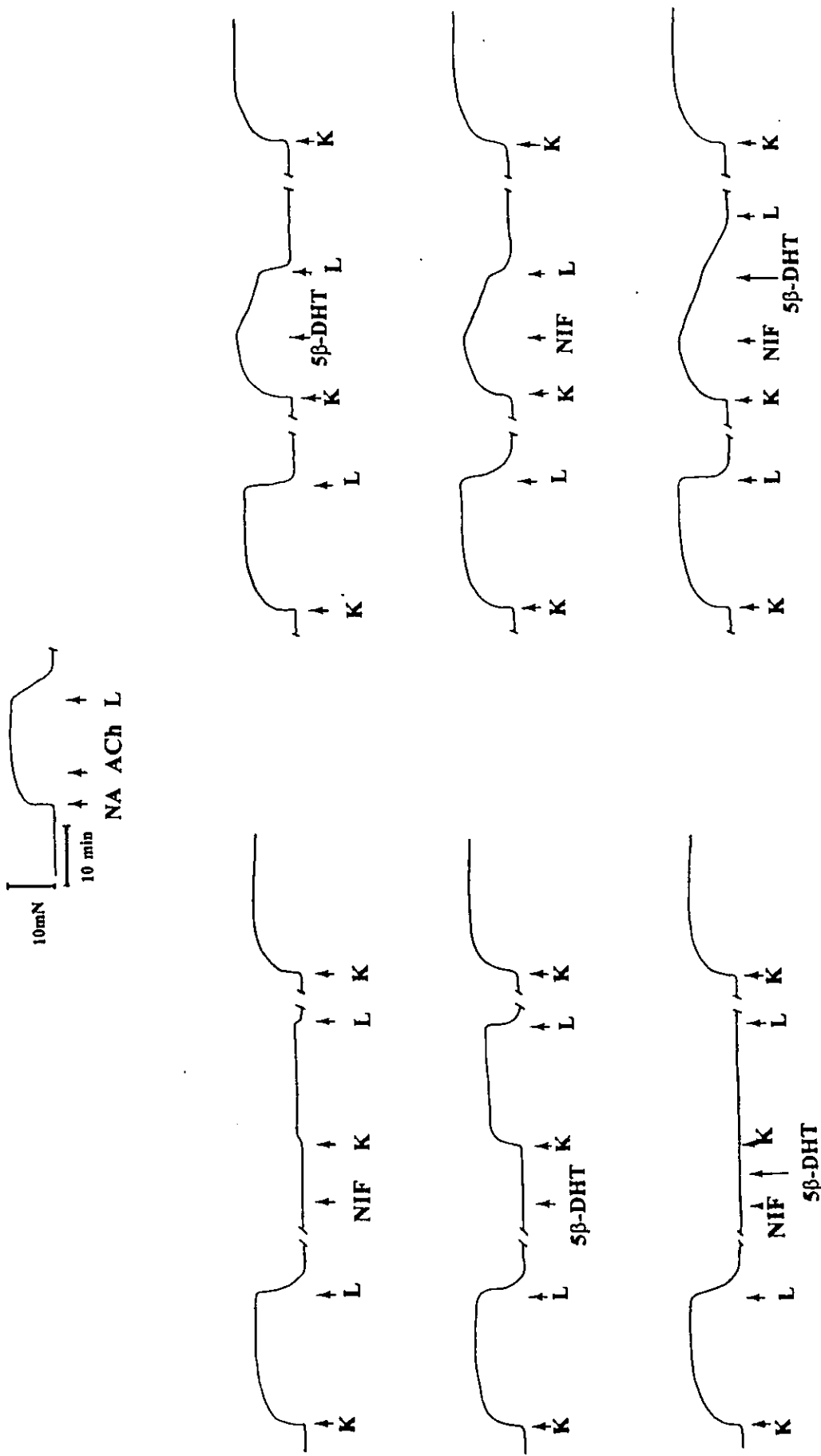
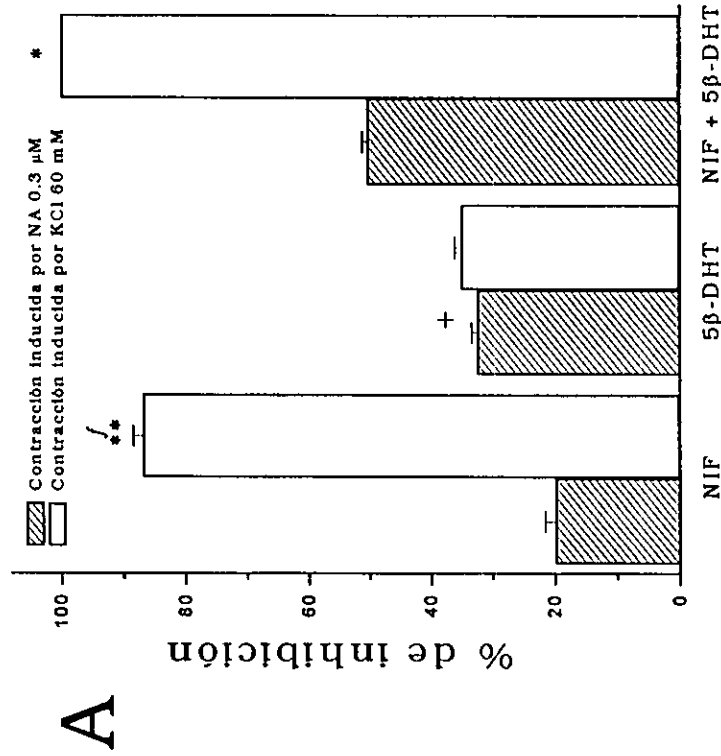


Figura 7. Trazos típicos de la contracción inducida por potasio alto (K 60 mM) en aorta torácica aislada de raía sin endotelio: Arriba (parte central) se corrobora la ausencia de endotelio al no observar relajación por acetilcolina (ACh 20 μ M) sobre la contractura de noradrenalina (NA 0.3 μ M). Los registros de la izquierda muestran el antagonismo de nifedipina (NIF 90 nM) y 5 β -dihidrotestosterona (5 β -DHT 30 μ M) sobre la contracción inducida por K, también se muestra el sinérgismo de NIF más 5 β -DHT. En los trazos de la derecha se muestra la relajación inducida por 5 β -DHT y NIF sobre la contracción de K y el sinérgismo de ambos. Nótese que en todos los casos la contracción inducida por K se recupera después del tratamiento, L significa lavado.

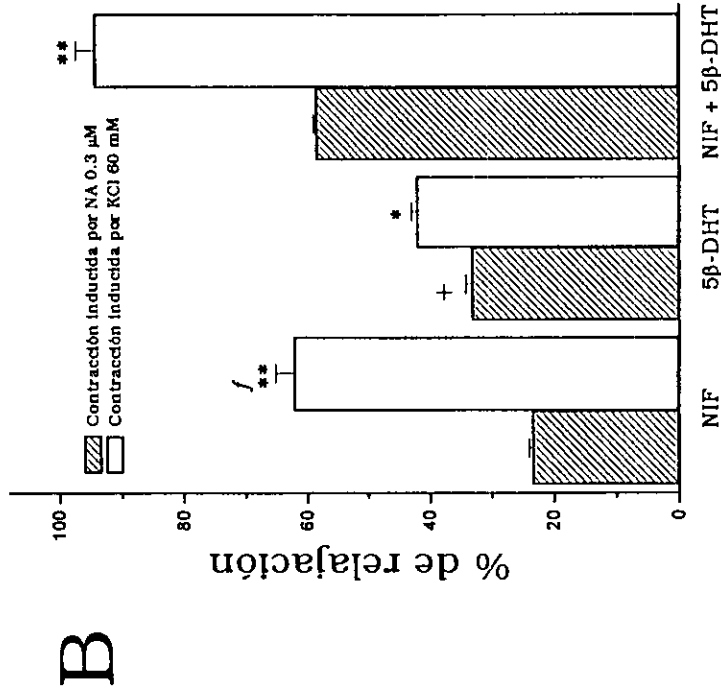
Figura 8

Porcentaje del antagonismo por nifedipina y 5 β -DHT en las contracciones inducidas por noradrenalina y potasio.



NIF (nifedipina 90nM), 5 β -DHT (5 β -dihidrotestosterona 30 μ M). Diferencia significativa *(P < 0.001), ***(P < 0.0001) entre la inhibición de la contracción de KCl y la inhibición de la contracción de NA. Diferencia significativa *(P < 0.01), / (P < 0.001) comparación entre el efecto antagonico de NIF y 5 β -DHT. Los valores son las medias de n \geq 6 \pm E.E.M.

Porcentaje de relajación de nifedipina y 5 β -DHT sobre las contracciones inducidas por noradrenalina y potasio.



NIF (nifedipina 90nM), 5 β -DHT (5 β -dihidrotestosterona 30 μ M). Diferencia significativa *(P < 0.01), ***(P < 0.001) de la inhibición de la contracción de NA comparada con la inhibición de la contracción de KCl. Diferencia significativa *(P < 0.01), / (P < 0.001) entre el efecto relajante de NIF y 5 β -DHT. Los valores son la medias de n \geq 6 \pm E.E.M.

5) Relajación del tono de las contracciones de NA y KCl por nifedipina y 5 β -DHT.

Como era de esperarse la nifedipina fue capaz de disminuir el tono de la contracción inducida tanto por NA (25.3 ± 0.4 % de relajación) como por KCl (62.2 ± 3.0 % de relajación), ver Figs. 6 y 7. Asimismo, sobre el tono de la contracción de NA, NIF + 5 β -DHT también muestran una acción sumatoria (58.4 ± 0.4 % de relajación) entre ambos compuestos (Fig. 8B).

La acción de ambos compuestos (NIF + 5 β -DHT) sobre el tono de la contracción de KCl también ejerce un efecto mayor que cuando se prueba cada compuesto por separado (Fig. 8B). La mayor potencia que inducen 5 β -DHT y nifedipina en forma conjunta sobre la contracción de KCl muestra una acción sumatoria del efecto que inducen ambos compuestos (Fig. 7 y 8B).

Los datos mostraron que nifedipina es más efectiva que el esteroide, tanto para prevenir como para relajar la contracción de KCl ($P < 0.001$), mientras que 5 β -DHT a la concentración de 30 μ M, antagonizó en igual magnitud ($P > 0.5$) ambas contracturas (NA y KCl), ver Fig. 6, 7 y 8A. Sin embargo, la relajación que induce el esteroide sobre el tono de la contracción de KCl muestra una diferencia significativa ($P < 0.01$) comparada con la contractura de NA (Fig. 7 y 8B). Asimismo, 5 β -DHT fue más efectiva que NIF ($P < 0.01$), tanto para prevenir como para relajar la contractura de NA, pero no así para la de KCl, donde NIF resulto ser más efectiva.

6) Efecto del agonista de los canales de calcio BAY K 8644 sobre el efecto vasodilatador de 5 β -DHT.

Los resultados muestran que BAY K 8644 (10 μ M) produce un aumento del tono de las contracciones inducidas por NA (16.8 \pm 0.9 % de incremento) y KCl (18.6 \pm 0.8 % de incremento) y que el efecto relajante de 5 β -DHT es antagonizado de manera significativa (P < 0.001) con respecto a la relajación que provoca en ausencia del activador de los canales de calcio (Tabla IV; Figs., 9 parte inferior, y 10D). Además, la relajación inducida por el esteroide sobre las contracciones de NA y KCl fue recuperada significativamente (P < 0.001) al administrar BAY K (80.3 \pm 1.0 % y 78.4 \pm 1.5 % respectivamente) ver Tabla IV, Figs., 9 trazo superior y 10C).

La respuesta del tejido a NA ó KCl resultó afectada, después de los tratamientos mencionados con BAY K 8644, ya que en un siguiente estímulo se observó una pérdida gradual del tono de la contracción (Figs., 9 y 10).

TABLA IV

Porcentaje de relajación por 5 β -DHT sobre la contracción de noradrenalina y potasio alto en ausencia y presencia de BAY K.

CONTRACCIÓN INDUCIDA POR:	5 β -DHT (30 μ M)	BAY K + 5 β -DHT (10 μ M + 30 μ M).	5 β -DHT + BAY K (30 μ M + 10 μ M)
	% DE RELAJACIÓN		% DE RECUPERACIÓN
NA (0.3 μ M)	33.2 \pm 0.9	13.7 \pm 0.2*	80.3 \pm 1.0 [†]
KCl (60 mM)	42.5 \pm 0.7	12.8 \pm 0.6*	78.4 \pm 1.5 [†]

*Valores significativos (P < 0.001) al comparar el efecto relajante de 5 β -DHT en presencia de BAY K. [†]Diferencia significativa (P < 0.001) al comparar la recuperación de las contracciones con el control; considerado justo antes de adicionar el andrógeno. Los valores son las medias n \geq 6 \pm E.E.M.

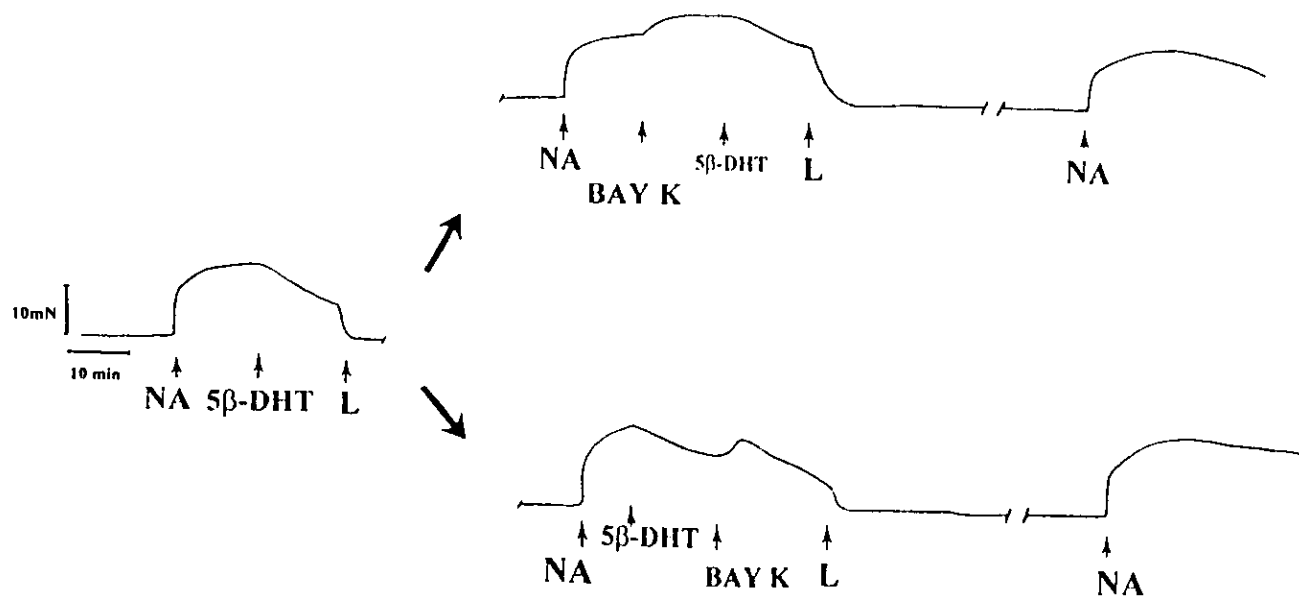


Figura 9. Registros típicos de la contracción inducida por noradrenalina (NA $0.3 \mu\text{M}$) en aorta torácica de rata sin endotelio donde se muestra la relajación provocada por 5β -dihidrotestosterona (5β -DHT $30 \mu\text{M}$); abajo se observa una reversión transitoria del efecto relajante inducido por 5β -DHT después de la adición de BAY K ($10 \mu\text{M}$); arriba se observó un aumento del tono de la contracción por la adición de BAY K, seguido de una disminución del efecto relajante de 5β -DHT, observándose que la relajación inducida por el esteroide es atenuada con la incubación del agonista de calcio. El último estímulo de NA muestra la viabilidad del tejido; sin embargo, el tono muscular se pierde gradualmente. Los tejidos fueron lavados (L) después de cada tratamiento.

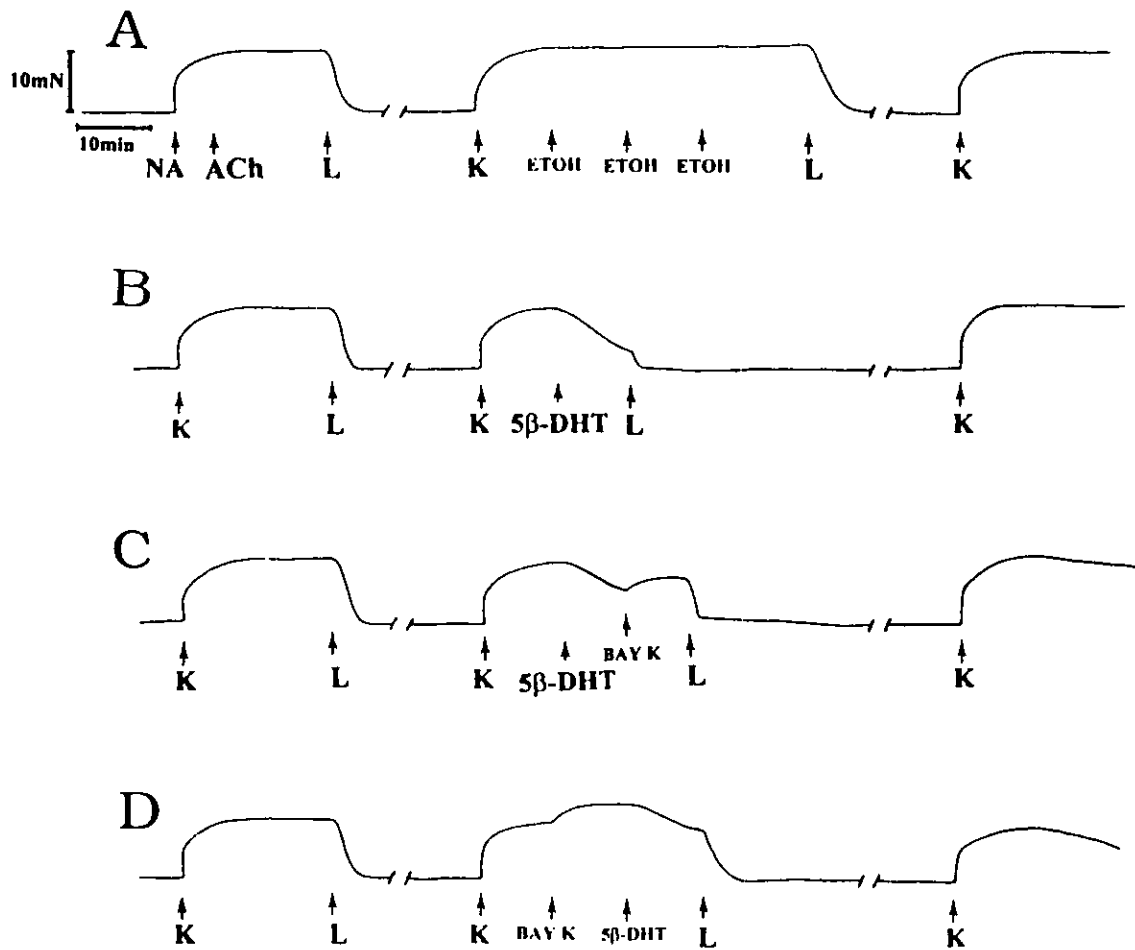


Figura 10. Registros típicos de la contracción inducida por potasio alto (K 60 mM) en aorta torácica de rata sin endotelio. A) muestra la ausencia de endotelio al no observar relajación por acetilcolina (ACh 20 μ M) y el control del vehículo utilizado etanol (ETOH 17.14 mM) para solubilizar 5 β -dihidrotestosterona (5 β -DHT 30 μ M) y el activador de canales de calcio (BAY K 10 μ M). Se observa que el vehículo no modifica el tono de la contracción inducida por K; B) muestra que 5 β -DHT (30 μ M) disminuye el tono de la contracción inducida por K; C) reversión transitoria del efecto relajante inducido por 5 β -DHT después de la adición de BAY K); D) aumento del tono de la contracción inducida por K con la adición de BAY K disminuyendo la relajación inducida por 5 β -DHT. El último estímulo de K muestra la viabilidad del tejido; sin embargo, el tono muscular se pierde gradualmente. Los tejidos fueron lavados (L) después de cada tratamiento.

7) Efecto vasodilatador de 5 β -DHT en presencia de un antagonista β -adrenérgico.

Los controles mostraron que el efecto relajante del agonista β -adrenérgico (isoproterenol 100 μ M), fue bloqueado por el propranolol (20 μ M). Sin embargo, el efecto relajante de 5 β -DHT se observó sin diferencia significativa ($P > 0.5$) tanto en presencia como en ausencia del bloqueador adrenérgico (Fig. 11 y Tabla V).

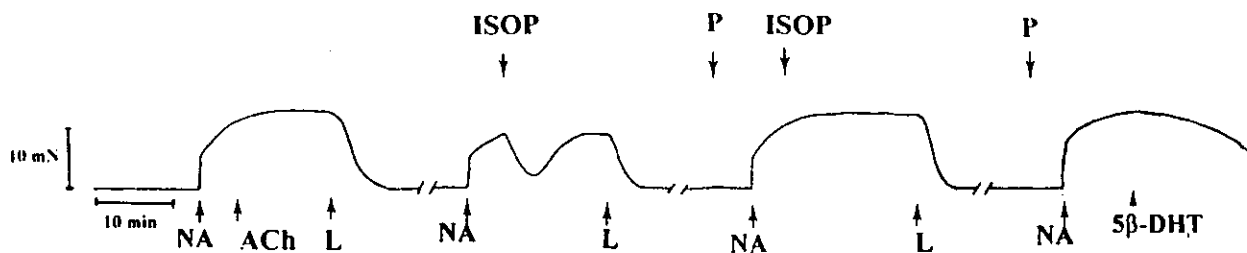


Figura 11. Trazos típicos de la contracción inducida por noradrenalina (NA 0.3 μ M) en aorta torácica de rata sin endotelio, donde se corrobora la ausencia de endotelio al no observar relajación por acetilcolina (ACh 20 μ M). Obsérvese el efecto relajante del isoproterenol (ISOP 100 μ M), el cual es bloqueado cuando los tejidos son incubados con propranolol (P 20 μ M). Nótese el efecto relajante de 5 β -dihidrotestosterona (5 β -DHT 30 μ M) en presencia de P. Después de cada tratamiento el tejido fue lavado (L).

TABLA V

Porcentaje de relajación de isoproterenol (ISOP) y de 5 β -dihidrotestosterona (5 β -DHT) sobre contracciones inducidas por noradrenalina (NA) en presencia y ausencia de propranolol (P).

CONTRACCIÓN INDUCIDA POR	% DE RELAJACIÓN n \geq 6 \pm E.E.M.			
	ISOP (100 μ M)	5 β -DHT (30 μ M)	P + ISOP (20 μ M + 100 μ M)	P + 5 β -DHT (20 μ M + 30 μ M)
NA (0.3 μ M)	85.3 \pm 1.8	33.2 \pm 0.9	0.0	35.2 \pm 0.4

El efecto relajante de 5 β -DHT resulto no significativo (P > 0.5) al ser comparado en presencia de propranolol (P).

8) Efectos sobre la presión arterial

a) Estudio de vehículos:

Sobre la presión arterial media inducida por infusión continua de NA ($0.059 \mu\text{moles/Kg}\cdot\text{min}$) en la rata descerebrada y desmedulada, se pudo determinar y evaluar el efecto de la administración, por vía intravenosa, de diferentes vehículos a utilizar para disolver los esteroides como son: propilen glicol, etanol y moleculsol; los diferentes volúmenes utilizados para los vehículos mencionados, mostraron que: (i) el etanol presenta un efecto hipotensor (disminución de 10 a 35 mmHg) significativo ($P < 0.001$) sobre la presión arterial media del animal, de tal forma que se producen arritmias aún a bajos volúmenes (15 μl), finalizando con la muerte del animal; (ii) el propilen glicol no modifica en forma significativa ($P > 0.5$) la presión arterial (disminución de 8.3 mmHg), al ser administrado en un rango de 7 a 38 μl en 1.2 min sin observar cambios tanto en la presión arterial como en la frecuencia cardiaca del animal. Moleculsol, no ocasiona cambios sobre la presión arterial media de los animales (Fig. 12); además permite solubilizar dosis altas de esteroide. Este compuesto resultó ser un magnifico solvente; sin embargo, al ser administrado el andrógeno disuelto en este vehículo, el efecto del esteroide no se presentó. Así, se hicieron pruebas del efecto conocido de varios esteroides *i.e.*, sobre el músculo liso uterino y vascular *in vitro*, observando que el efecto no se presenta cuando el esteroide es disuelto en el moleculsol; ésto podría sugerir que posiblemente el moleculsol inactiva la acción del esteroide, tal vez debido a alguna modificación en la estructura del esteroide y/ó que no puede ser liberado de la molécula del agente (vehículo) que lo tiene atrapado.

Por los presentes hallazgos se decidió utilizar propilen glicol como el mejor vehículo para administrar las tres hormonas esteroides indicadas en la metodología (Figs. 12 y 13).

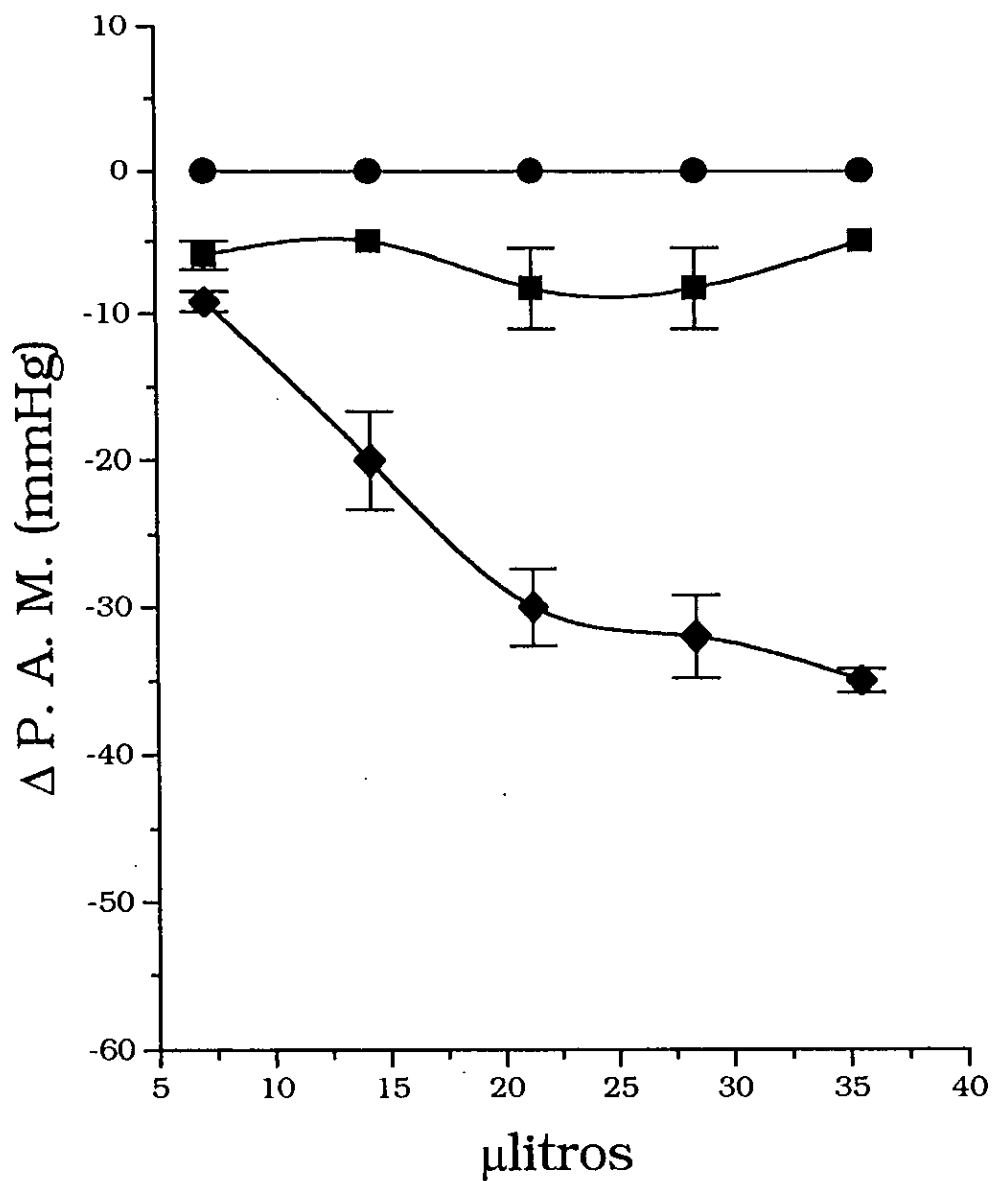


Figura 12. Efecto de: moleculsol (●), propilen glicol (■) y etanol (◆), vehículos administrados en 1.2 min; utilizados para solubilizar los andrógenos probados, sobre la presión arterial media incrementada por una infusión continua de noradrenalina ($0.059 \mu\text{moles /Kg}\cdot\text{min}$) en la rata descerebrada y desmedulada. Cada punto representa la media de 6 experimentos \pm E.E.M.

b) Efecto de andrógenos.

Los andrógenos probados (etiocolanolona, 5 α -DHT y 5 β -DHT) disminuyen la respuesta presora de NA (0.059 μ moles/Kg·min) en la rata descerebrada y desmedulada (Fig. 13). Se observó una disminución inmediata, registrada a los 30 seg después de iniciar la administración del esteroide *i.e.*, 50 seg. antes de terminar la administración del esteroide y con una duración aproximada de 2 min. Esta respuesta resultó ser dependiente de la dosis y fue considerada como la primera fase del efecto (Tabla VI y Fig. 14). Así, la DE₅₀ para cada andrógeno investigado fue de 23.3 μ moles/Kg durante 1.2 min para 5 β -DHT, 29.7 μ moles/Kg durante 1.2 min para 5 α -DHT y 28.9 μ moles/Kg durante 1.2 min para etiocolanolona,

TABLA VI

Efecto de los andrógenos sobre la presión arterial media de las ratas descerebradas y desmeduladas con infusión continua de noradrenalina (0.059 μ moles/Kg·min).

Dosis (μ mol/Kg durante 1.2 min)	Disminución de la presión arterial media (mmHg) n = 6 \pm E.E.M.		
	Etiocolanolona	5 α -DHT	5 β -DHT
5.0	5.8 \pm 0.8*	5.0 \pm 0.0*	9.2 \pm 0.7
10.0	11.6 \pm 1.0**	10.8 \pm 0.8**	22.5 \pm 3.3
15.0	19.1 \pm 0.8**	26.0 \pm 0.9*	35.0 \pm 2.6
20.0	34.1 \pm 0.8*	31.6 \pm 2.4*	40.0 \pm 2.8
25.0	43.3 \pm 1.0**	40.7 \pm 1.7**	54.1 \pm 0.8

Diferencia significativa *(P < 0.01), ***(P < 0.001) al comparar el efecto de los andrógenos evaluados contra 5 β -DHT a la misma dosis.

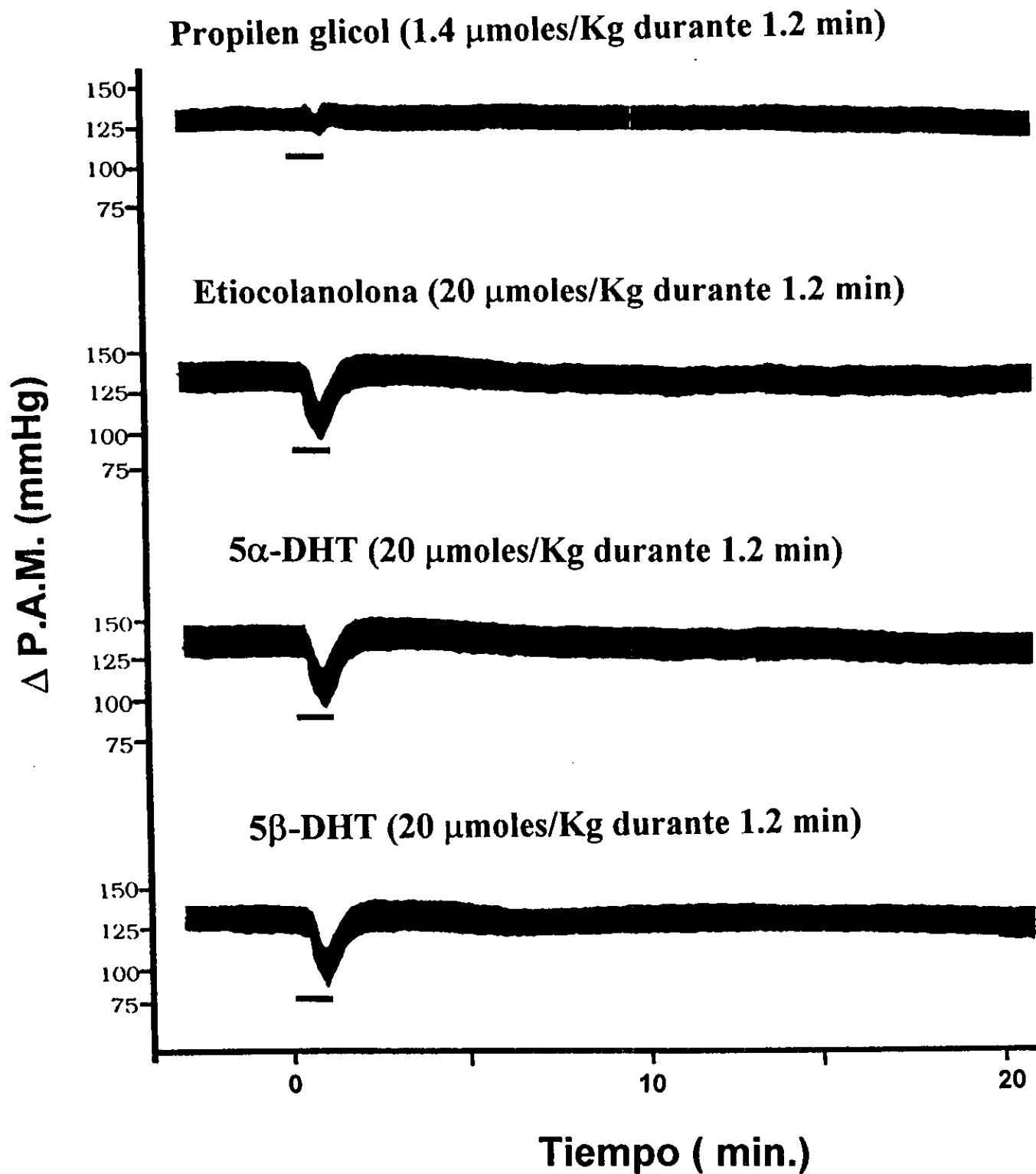


Figura 13. Registro típico de presión arterial media (P.A.M., mmHg) por infusión continua de noradrenalina (0.059 μ moles/Kg·min) en la rata descerebrada y desmedulada; se muestra el efecto de la administración durante 1.2 min (barra sólida) del vehículo (propilen glicol) y una dosis equimolecular de los diferentes andrógenos. Nótese la primera fase del efecto.

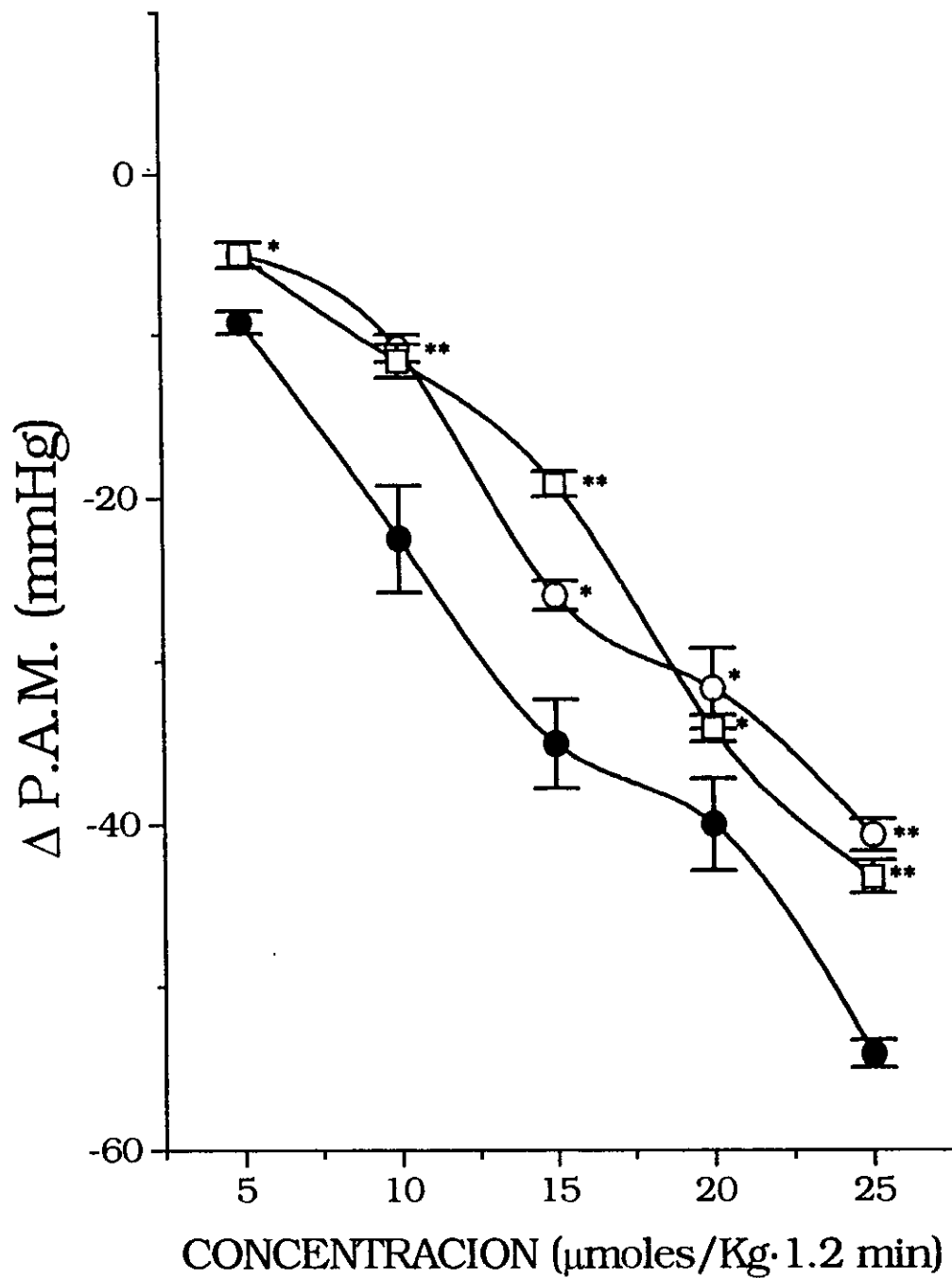


Figura 14. Curva dosis-respuesta de la primera fase del efecto hipotensor observado del minuto 1.0 al 2.0 después de la administración de: 5 α -DHT (O), 5 β -DHT (●) y etlocolanolona (□) sobre la presión arterial media incrementada por infusión continua de noradrenalina (0.059 μ moles/Kg·min) en la rata descerebrada y desmedulada. Cada punto representa la media de 6 experimentos \pm E.E.M. Diferencia significativa *(P < 0.01). **(P < 0.001) al comparar el efecto de los andrógenos evaluados contra 5 β -DHT a la misma dosis.

Sin embargo, después de esta disminución drástica, la presión se recuperó llegando nuevamente a los valores del control, en algunos casos se registro un pequeño incremento (5-10 mmHg) con un tiempo de duración de aproximadamente 5-7 min. Cabe mencionar que del minuto 7 al 20 no se observan cambios de presión, pero, pasado este tiempo se puede observar una pérdida paulatina de la P.A.M., cuantificando hasta -21 ± 0.9 mmHg para 5β -DHT, -32.5 ± 1 mmHg para 5α -DHT y -17.5 ± 1 mmHg para eticolanólona, al minuto 60 y a altas dosis (> 20 μ moles/Kg \cdot 1.2 min). Esta etapa de la acción del esteroide fue considerada como una segunda fase del efecto (Fig. 15), dependiente de la dosis y, con un orden de potencia:

5α -DHT $>$ 5β -DHT $>$ eticolanólona.

En algunos experimentos se continuó registrando la caída de la P.A.M. observando que tal efecto hipotensor persistió y que después del min 80 era de -75 a -80 mmHg, presentándose rápidas fluctuaciones y culminando con la muerte del animal (Fig. 16).

Los resultados indican que los esteroides disminuyen la respuesta presora a NA; inicialmente con un decremento rápido, el cual es compensado de manera inmediata y, posteriormente continúa el efecto hasta el deceso del animal a dosis altas.

El andrógeno 5β -DHT a dosis altas (más de 30 μ moles) puede disminuir dramáticamente la presión e incluso provocar el deceso del animal, en algunos casos inmediato a la aplicación del andrógeno y en otros en aproximadamente 10 min.

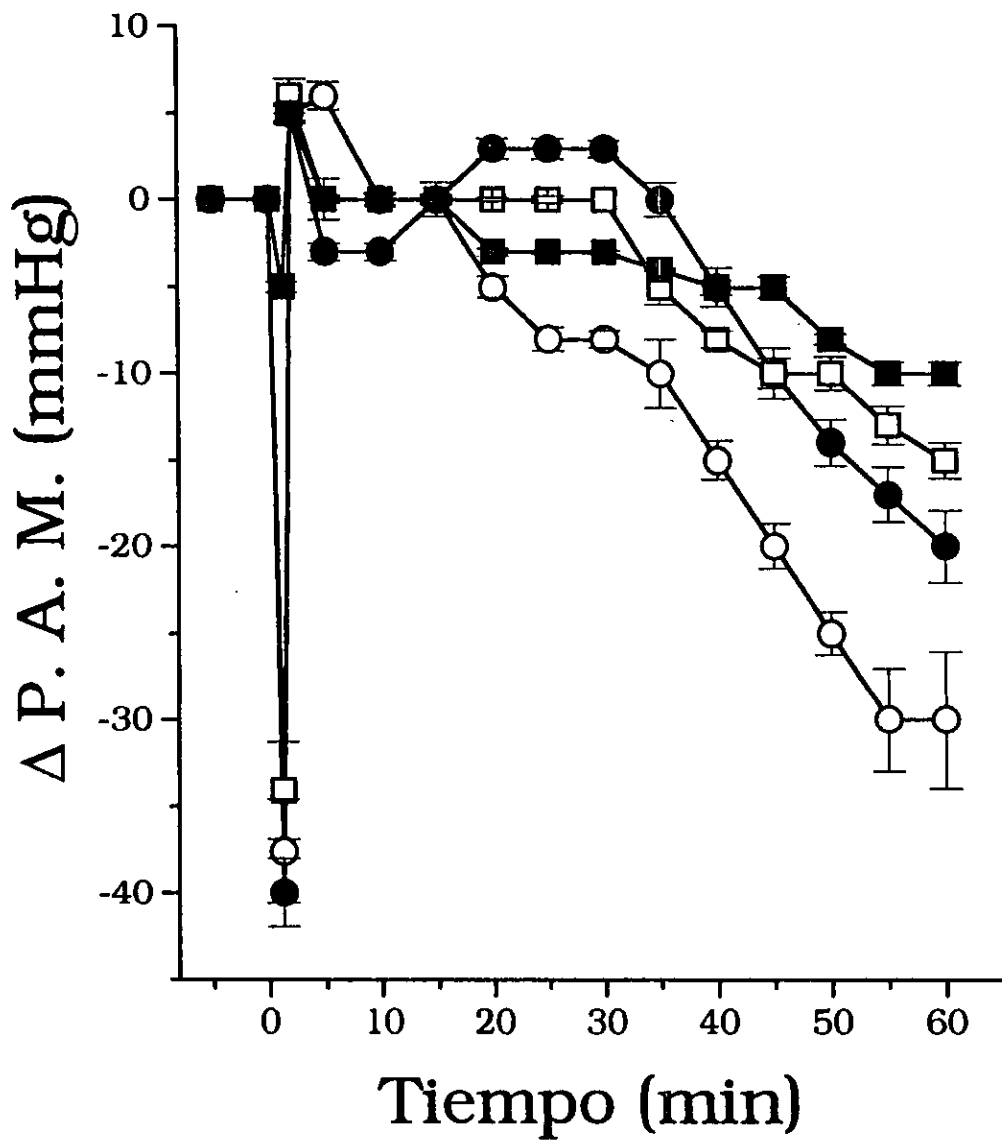


Figura 15. Efecto hipotensor de 5 α -DHT (○), 5 β -DHT (●) ó Etiocolanolona (□) a la dosis equimolecular de 20 μ moles/Kg durante 1.2 min sobre la presión arterial media incrementada por infusión continua de noradrenalina (0.059 μ moles/Kg·min) en la rata descerebrada y desmedulada; vehículo (propilen glicol ■) utilizado para administrar los andrógenos. Cada punto representa la media de 6 experimentos \pm E.E.M.

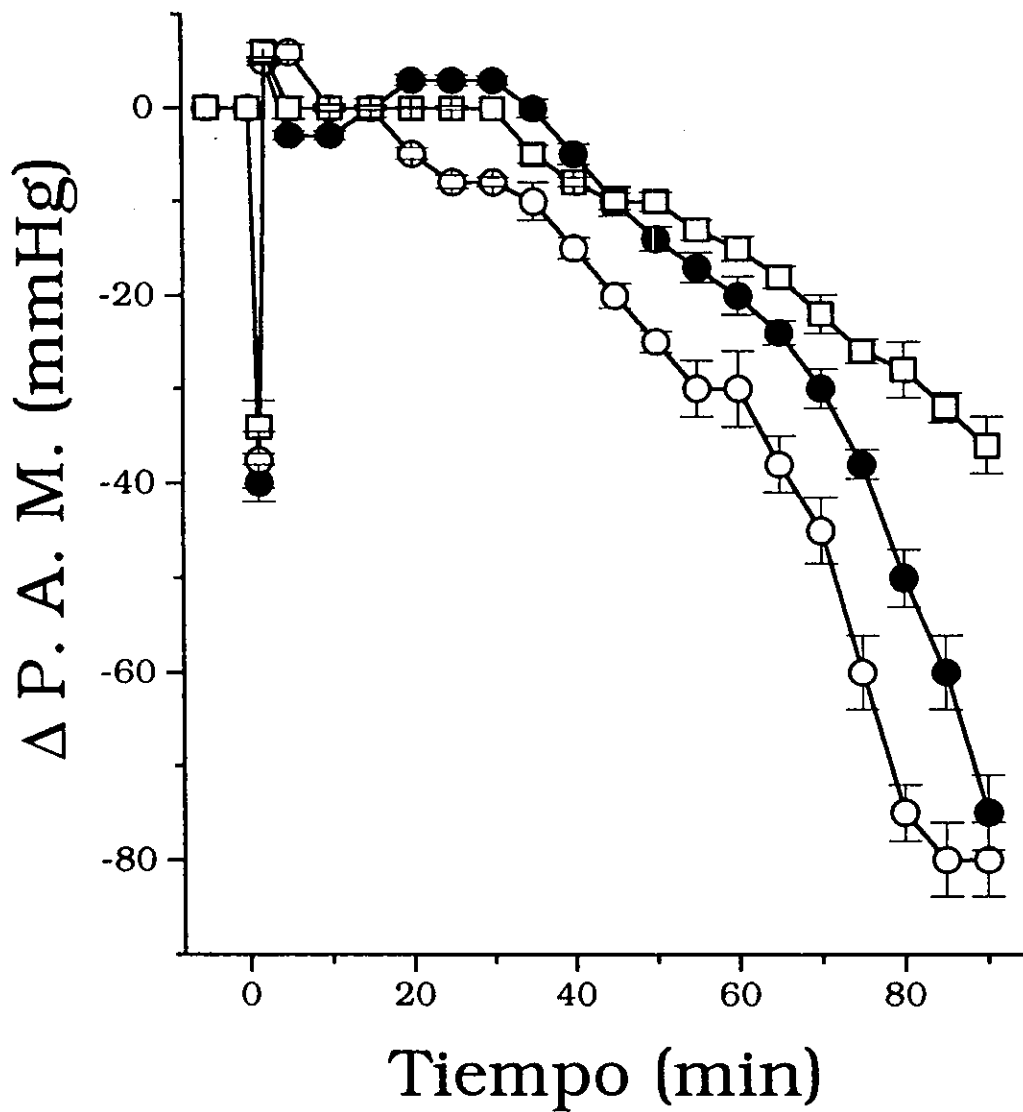
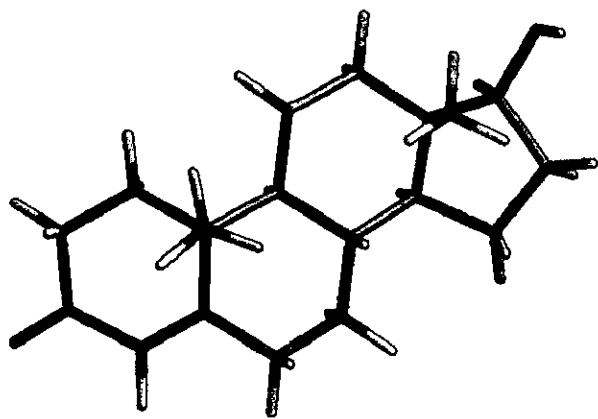


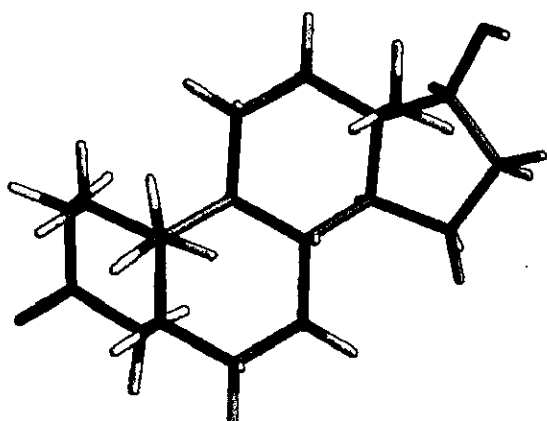
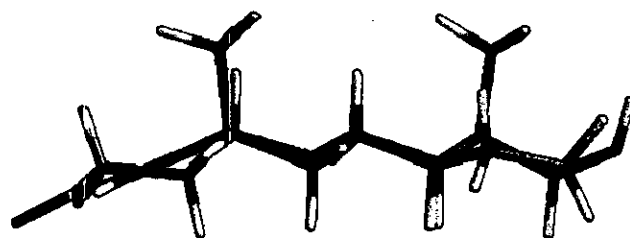
Figura 16. Evaluación durante 90 min del efecto hipotensor de Etiocolanolona (□), 5α-DHT (○) y 5β-DHT (●), a la dosis equimolecular de 20 μmoles/Kg durante 1.2 min sobre la presión arterial media incrementada por infusión continua de noradrenalina (0.059 μmoles/Kg·min) en la rata descerebrada y desmedulada. Cada punto representa la media de 6 experimentos ± E.E.M.

Los resultados del efecto hipotensor de los andrógenos probados sobre la P.A.M. inducida por NA en ratas descerebradas y desmeduladas muestra un efecto dependiente de la dosis (Fig. 15) y del tiempo (Fig. 16). También puede observarse que el andrógeno 5β -DHT resultó ser la hormona más potente durante la primera fase de evaluación. Sin embargo, fue menos efectiva en su efecto hipotensor durante la segunda fase de evaluación comparada con 5α -DHT que resultó ser el andrógeno más potente durante esta segunda fase de evaluación, siendo así el más potente de los tres esteroides probados. Claramente puede verse en la figura 15 y 16 que a partir del min 20 de evaluación, la 5α -DHT muestra una mayor potencia del efecto hipotensor comparado con el efecto de 5β -DHT y etiocolanolona.

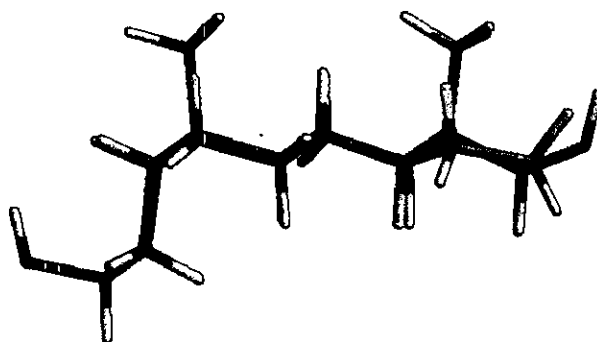
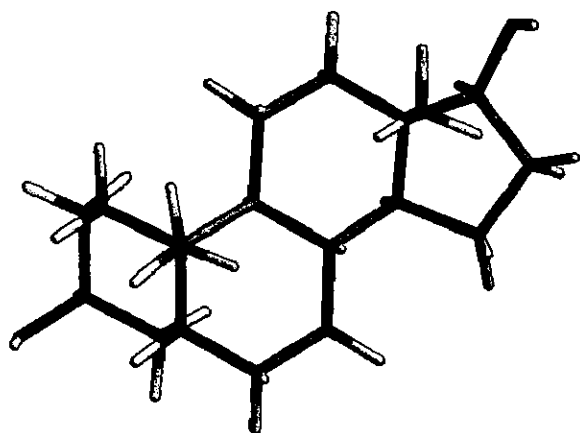
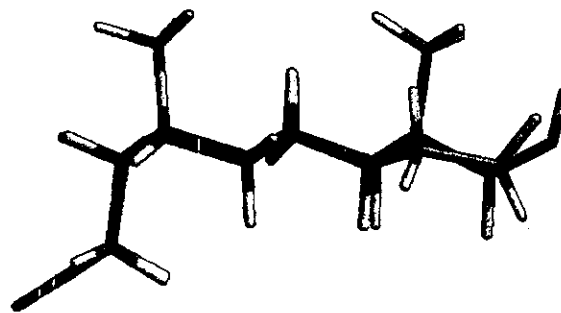
Así, el orden de potencia resultó ser: en la primera fase del efecto; 5β -DHT > 5α -DHT > Etiocolanolona. Mientras que en la segunda fase del efecto fue; 5α -DHT > 5β -DHT > Etiocolanolona. Estos resultados indican que la diferencia en su estructura química puede ser la responsable del efecto. La conformación $\alpha/trans$ ó β/cis en el C_5 del anillo A no es importante para su efecto vasoactivo. Sin embargo, cuando la molécula se modifica en el C_{17} por un grupo ceto y, en C_3 por un grupo hidroxilo como en el caso de la etiocolanolona parece disminuir su potencia. Esto sugiere que la parte importante de la molécula para producir mayor hipotensión está en la posición β/cis en C_{17} del anillo D para la primera fase del efecto, mientras la posición $\alpha/trans$ en C_{17} es importante para la segunda fase del efecto (Fig. 17).



5 α -DHT



5 β -DHT



ETICOLANOLONA

Figura. 17 Representación estereoquímica de 5 α -DHT (5 α -dihidrotestosterona), 5 β -DHT (5 β -dihidrotestosterona) y eticolanolona. Nótese la diferencia entre 5 α -DHT y 5 β -DHT por la conformación en el anillo A; y entre 5 β -DHT y eticolanolona por la posición de los sustituyentes en el carbono 3 y 17.

c) Efecto de 5 β -DHT en presencia de atropina.

Estudios previos mostraron que ACh disminuye la respuesta presora a NA (0.059 μ moles/Kg·min) en una forma dependiente de la dosis (tabla VII) y que este efecto fue bloqueado por atropina (0.003 μ moles/Kg durante 1.2 min). Asimismo, el efecto hipotensor de 5 β -DHT (20 μ moles/Kg durante 1.2 min) no fue bloqueado con la administración de atropina (0.003 μ moles/Kg durante 1.2 min), ver figura 18 y 19.

TABLA VII

Efecto de acetilcolina en presencia y ausencia de atropina (0.003 μ moles/Kg durante 1.2 min) sobre la presión arterial media de ratas macho adultas descerebradas y desmeduladas con infusión continua de noradrenalina (0.059 μ moles/Kg·min).

ACh (μ moles/Kg durante 1.2 min)	Disminución de la presión arterial media (mmHg) n = 6 \pm E.E.M.	
	sin atropina	con atropina
0.0006	15 \pm 2.7	0.0 *
0.0020	25 \pm 2.1	0.0 *
0.0068	45 \pm 2.8	0.0 *
0.0205	60 \pm 2.3	0.0 *
0.0684	80 \pm 1.2	0.0 *

Diferencia significativa *(P < 0.0001) al comparar el efecto de acetilcolina en ausencia y presencia de atropina

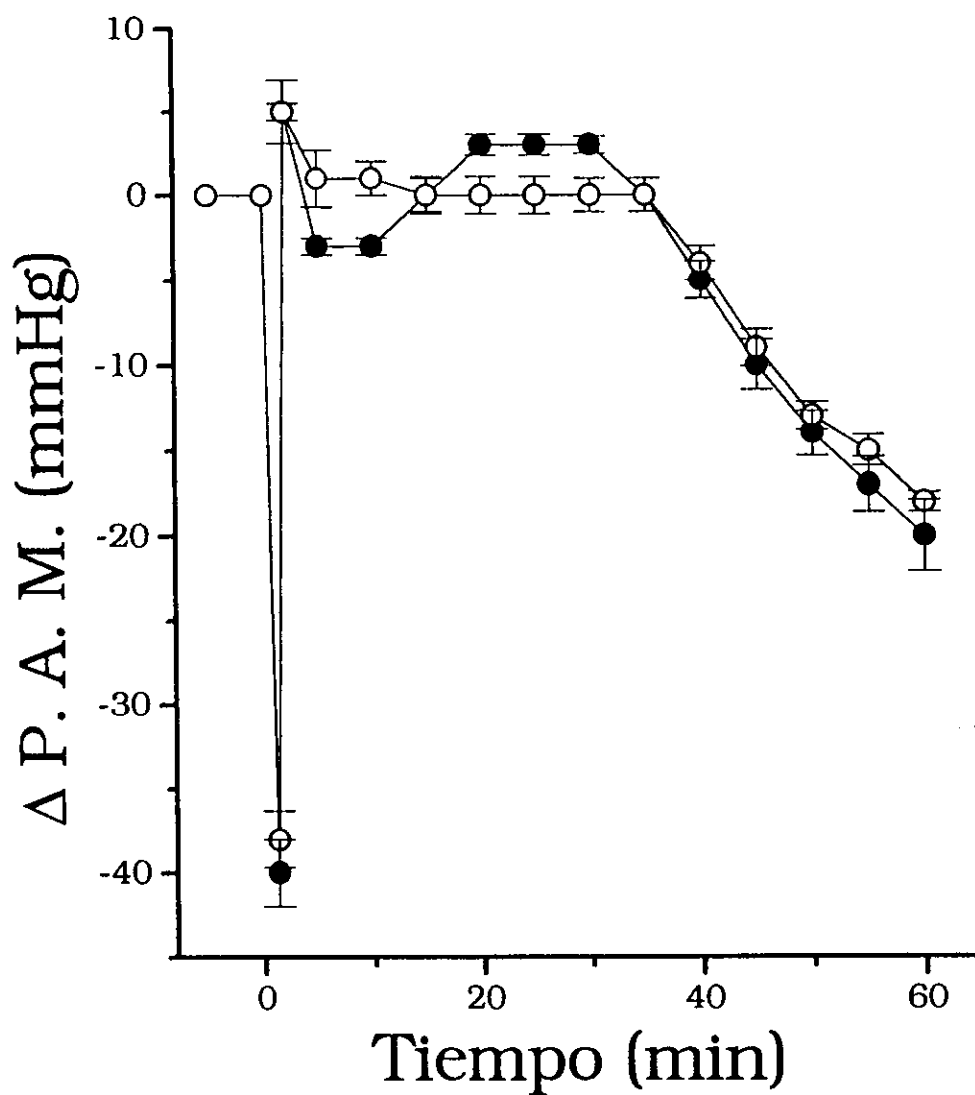


Figura 18. Efecto hipotensor de 5β -DHT ($20 \mu\text{moles/Kg}$ durante 1.2 min) en ausencia (●) y presencia (○) de atropina ($0.003 \mu\text{moles/Kg}$ durante 1.2 min) sobre la presión arterial media incrementada por medio de una infusión de NA ($0.059 \mu\text{moles/Kg}\cdot\text{min}$) en la rata descerebrada y desmedulada. Cada punto representa la media de 6 experimentos \pm E.E.M.

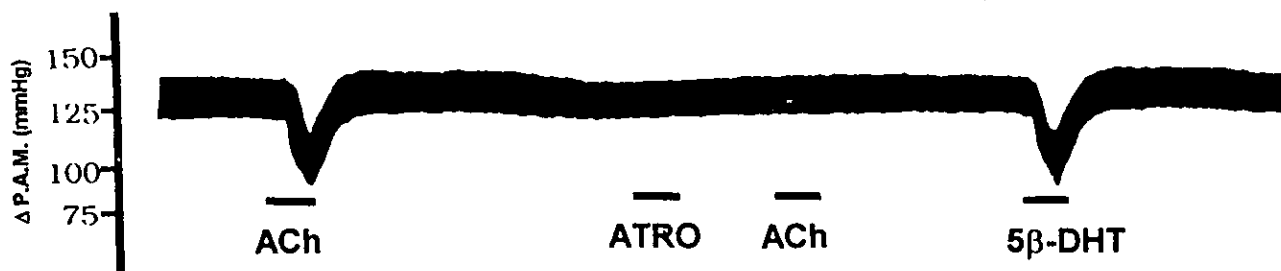


Figura 19. Registro típico de presión arterial media (P.A.M., mmHg) por infusión continua de NA ($0.059 \mu\text{moles/Kg}\cdot\text{min}$) en la rata descerebrada y desmedulada; donde se muestra el efecto hipotensor de ACh ($0.0205 \mu\text{moles/Kg}$ durante 1.2 min), así como su inhibición por atropina ($0.003 \mu\text{moles/Kg}$ durante 1.2 min). Nótese que el efecto hipotensor de $5\beta\text{-DHT}$ ($20 \mu\text{moles/Kg}$ durante 1.2 min) no se modifica por la presencia de atropina.

X DISCUSIÓN

Previamente hemos reportado que 5β -DHT induce un efecto vasodilatador independiente del endotelio, siendo este andrógeno el compuesto más activo en relación a la testosterona, progesterona y otros andrógenos y progestinas en la aorta torácica aislada de rata precontraída con NA (Perusquía et al., 1996). El presente estudio muestra que la 5β -DHT produce vasorelajación dependiente de la concentración sobre las contracciones tónicas inducidas por NA como por KCl en el mismo modelo biológico. De igual manera, este efecto no fue relacionado con los factores relajantes derivados del endotelio vascular.

La latencia de respuesta de los esteroides ha sido usada como un indicador de los mecanismos de acción genómicos vs no genómicos (McEwen, 1991). Así, el rápido efecto relajante de la 5β -DHT podría ser explicado como una acción no genómica (membranal), la cual no puede ser mediada por los receptores intracelulares a esteroides.

Por otro lado, las bases celulares y moleculares de la acción de los esteroides en músculo liso vascular (MLV) no han sido aún definidas. La farmacología de la respuesta vasodilatadora del esteroide no es consistente con la modulación de la función de los receptores $GABA_A$ en el cerebro por algunos neuroesteroides (Majewska et al., 1986), dado por la evidencia experimental en nuestro estudio, de que el agonista $GABA_A$ (muscimol) no produjo cambios sobre las contracciones del MLV. En congruencia con estos hallazgos, los $GABA_A$ antagonistas (picrotoxina y bicuculina) no bloquearon el efecto vasodilatador del esteroide. Por lo tanto, el receptor $GABA$ érgico no parece estar involucrado en la acción vasodilatadora del esteroide, lo cual concuerda con hallazgos recientes en útero de rata (Perusquía y Villalón, 1996) y traquea de cobayo (Perusquía et al., 1997) para el efecto relajante de los esteroides.

Colateralmente, nuestros resultados muestran que el antagonista β -adrenérgico (propranolol) tampoco bloqueó el efecto vasodilatador del andrógeno probado, sugiriendo que esta respuesta tampoco es mediada por la unión del esteroide a los receptores membranales β -adrenérgicos. En este contexto, se ha reportado que los agonistas β -adrenérgicos, después de interactuar con sus receptores específicos, producen una rápida estimulación de la adenilato ciclasa con una resultante elevación de los niveles de AMPc, inhibiendo el influjo de Ca^{2+} para producir vasodilatación (Sperelakis, 1990).

Es interesante resaltar nuestros resultados que muestran que la vasorelajación inducida por 5β -DHT fue más prominente sobre la contracción de KCl que sobre la de NA. Esta evidencia sugiere que la relajación del esteroide involucra una disminución de la concentración de Ca^{2+} intracelular en la célula vascular.

Es bien conocido que el KCl despolariza la membrana y abre los canales operados por voltaje (COV), resultando en un aumento en la entrada de Ca^{2+} . En contraste, la NA es capaz de abrir los canales operados por receptor (COR), induciendo influjo de Ca^{2+} en la aorta sin producir despolarización en la membrana (Cauvin et al., 1985). Por lo tanto, la alta potencia del esteroide para producir relajación sobre las contracciones inducidas por KCl podría distinguir la fuente y clase de canales de Ca^{2+} involucrados en la acción relajante del esteroide. Consecuentemente, la relajación substancial del esteroide sobre las respuestas vasoconstrictoras inducidas por la despolarización de KCl está indicando una reducción del influjo de Ca^{2+} extracelular con mejor afinidad para inactivar los COV. Esta proposición es basada en el hecho de que la vasoconstricción inducida por KCl es exclusivamente por activación de los COV permitiendo el influjo de Ca^{2+} extracelular.

Otro argumento que apoya el bloqueo del influjo de Ca^{2+} externo por el esteroide es que el componente tónico de las contracciones de NA y KCl fue la

parte evidentemente afectada por el efecto relajante del esteroide. Esto está relacionado con lo reportado para la contracción de varias arterias, donde la respuesta inicial rápida de la contracción es dada por liberación de Ca^{2+} intracelular y su componente tónico es por influjo de Ca^{2+} (Bolton, 1979; van Breemen et al., 1982; Skärby et al., 1984).

Los resultados obtenidos en el presente estudio apoyan la idea de que la 5β -DHT atenúa las contracciones del MLV por reducir el influjo de Ca^{2+} a través de los canales. En este trabajo se ha mostrado que el efecto vasodilatador del esteroide es por actuar en distintos canales iónicos; activados por despolarización celular (COV) ó por interacción entre ligando y receptor (COR). A este respecto, se observó que tanto las contracciones por NA como por KCl fueron antagonizadas con magnitud similar con la preincubación de 5β -DHT, en contraste con nifedipina que se asocia con los COV para inhibir la entrada de Ca^{2+} y, fue más potente para antagonizar la contracción inducida por KCl que la inducida por NA. Estos datos correlacionan bien con estudios previos que muestran que las contracciones inducidas por NA son más dependientes de la liberación de Ca^{2+} intracelular (Casteels et al., 1977) y consecuentemente menos inhibida por bloqueadores del canal de Ca^{2+} (van Breemen et al., 1982). Sin embargo, al comparar el efecto antagónico de nifedipina y el esteroide, la hormona presentó mayor potencia que nifedipina sobre la contractura de NA, lo que puede explicarse porque nifedipina es un agente conocido para inhibir los COV de Ca^{2+} . Así, tal vez la nifedipina y el esteroide poseen diferentes sitios de acción sobre los COV y/ó el esteroide está también interactuando con los COR. Adicionalmente, se observó que la nifedipina más el esteroide, sumaron la prevención y la relajación de la contracción provocada por ambos agentes vasoconstrictores, pero este efecto aditivo inhibió significativamente más las contracciones de KCl que las de NA. Con estos hallazgos, es posible que el esteroide pueda estar inactivando ambos tipos de canales de Ca^{2+} .

Paralelamente, se observó que BAY K 8644, el cual promueve influjo de Ca^{2+} por interactuar con los receptores de dihidropiridina en los canales de Ca^{2+} (Spedding, 1985), aumentó el componente tónico de las contracciones inducidas por KCl y NA. En el presente estudio se encontró que la 5β -DHT induce relajación de estas contracciones aumentadas por BAY K 8644, lo que podría ser la evidencia de que el andrógeno tiene un efecto inactivador sobre los COV. Además, el efecto inhibitorio de 5β -DHT fue substancialmente atenuado con la preincubación de BAY K 8644, posiblemente por que este compuesto activa los COV por un cambio conformacional (Spedding, 1985) y/ó, quizás, antagoniza competitivamente el efecto inhibitorio del esteroide, como ha sido reportado para los Ca^{2+} bloqueadores de dihidropiridina en músculo liso (Towart y Schramm, 1984; Spedding, 1985). Los experimentos también mostraron que la relajación del esteroide fue revertida por la adición de BAY K 8644 en ambas clases de contracciones; sin embargo, la reversión del efecto del esteroide fue temporal sobre la contracción de NA y, mantenida sobre las contracciones de KCl. Esto indica que la NA induce un incremento del Ca^{2+} intracelular por activar los COR y por liberación de Ca^{2+} de los reservorios intracelulares, corroborando que BAY K 8644 promueve la entrada de Ca^{2+} por interactuar con los sitios de dihidropiridina en los COV.

Uno podría, así, especular que la relajación muscular provocada por el esteroide es consecuencia del bloqueo de la entrada de Ca^{2+} vía los COV. Sin embargo, hemos mostrado que 5β -DHT induce una relajación de la contracción provocada por NA, un activador de los canales de Ca^{2+} operados por receptor, en presencia de Ca^{2+} extracelular. Estos resultados indican que el esteroide bloquea el paso del Ca^{2+} externo por inactivar ambos tipos de canales, probablemente con mayor afinidad para inactivar los COV (Fig. 20). Esta hipótesis es apoyada por numerosas evidencias experimentales que explican el efecto vasodilatador para estrógenos; reportando que el incremento del flujo sanguíneo por altos niveles de estrógenos es consecuencia de un bloqueo de los COV en las arterias de cerdo (Stice et al., 1987ab) y las arterias coronarias de conejo (Jiang et al., 1991; White, 1995). También se ha

mostrado que el 17β -estradiol inhibe la respuesta contráctil de fenilefrina y $\text{PGF}_{2\alpha}$ en la arteria coronaria de cerdo asociada por una prevención de la entrada de Ca^{2+} extracelular (Vargas et al., 1989). Además, existe la prueba contundente de que el estradiol produce disminución de las corrientes de Ca^{2+} a través de los COV en células de MLV (Shan et al., 1994 y Zhang et al., 1994). Con respecto a los andrógenos y progestinas, que también relajan al músculo liso uterino, se ha propuesto un efecto calcio-antagónico por bloqueo tanto de los COV (Perusquía et al., 1990; Perusquía y Villalón, 1996) como de los COR (Perusquía y Campos 1991; Perusquía et al., 1991ab; Perusquía y Kubli-Garfías, 1992).

Esta propiedad calcio-antagónica podría ser uno de los mecanismos de la relajación independiente de endotelio que induce el esteroide en la aorta torácica aislada de rata.

Por otro lado, la vasorelajación que induce 5β -DHT se correlacionó con la disminución de la presión arterial que indujo esta hormona, sugiriendo así una acción hipotensora. El estudio de otros andrógenos estructuralmente relacionados mostraron también un agudo efecto hipotensor, cuya potencia dependió de los cambios en su estructura química. La diferente potencia que mostró cada uno de los andrógenos probados, sugiere que la interconversión entre los grupos carbonilo e hidroxilo en C_3 y C_{17} , respectivamente, modifica la potencia de los andrógenos 5β -reducidos para producir un efecto hipotensor mayor.

El efecto inmediato presentado por los esteroides para disminuir la presión arterial (llamado "primera fase") resultó muy rápido comparado con el efecto tardío (llamado "segunda fase") que se observó paulatinamente en la primera hora después de la administración del esteroide. Estas diferencias podrían explicarse por un mecanismo natural compensador. Las pruebas realizadas en animales descerebrados y desmedulados excluye enteramente la posibilidad de que el efecto hipotensor que producen los andrógenos sea

debido a una interacción en el Sistema Nervioso Central. Adicionalmente, la vagotomía bilateral, efectuada sistemáticamente en todos los animales, descarta la posibilidad de una interacción con el nervio vago. Asimismo, el efecto hipotensor del esteroide, manifestado en presencia de atropina, también muestra que esta acción no es a través de una interacción con los receptores muscarínicos. Así, estas evidencias están sugiriendo que la acción de los andrógenos incide directamente sobre la vasculatura sistémica, posiblemente en la membrana plasmática de estas células, como es propuesto por los datos obtenidos en los experimentos en tejido aislado.

La vasodilatación producida por los esteroides propone un aumento de la luz de los vasos sanguíneos, disminuyendo la resistencia periférica y aumentando el flujo sanguíneo. Lo anterior correlaciona con la disminución de la presión sanguínea que inducen los andrógenos encontrada en este estudio, lo cual sugiere que el sistema cardiovascular puede ser también el blanco de las hormonas sexuales masculinas. Esto concuerda con la evidencia de que el corazón es blanco de andrógenos en monos hembras (McGill et al., 1980) y en general para estradiol, progesterona y testosterona (para revisión ver Lin et al., 1990; Stumpf, 1990).

Las evidencias experimentales y epidemiológicas generalmente indican que las hormonas sexuales femeninas (estrógenos y progesterona) tienen un efecto "protector" sobre el estado de las enfermedades cardiovasculares, reduciendo el tono vascular. Sin embargo, los presentes datos muestran que los andrógenos pueden también desempeñar un papel protector en la hipertensión arterial. En los últimos años se ha aceptado que los niveles circulantes de dehidroepiandrosterona (DHEA) declinan progresiva y marcadamente con la edad en humanos; adicionalmente, algunos estudios epidemiológicos han sugerido que los niveles elevados en suero de sulfato de DHEA pueden estar asociados con mayor longevidad y decremento de enfermedades cardíacas en el hombre. Interesantemente, las concentraciones de sulfato de DHEA son independientes de la síntesis gonadal y en adrenales

(Baulieu, 1991). Así, estas observaciones y los presentes datos sugieren que la acción benéfica de DHEA y el sulfato de DHEA, en hombres jóvenes, podría ser producido indirectamente por los productos de su metabolismo como son 5α - y 5β -DHT.

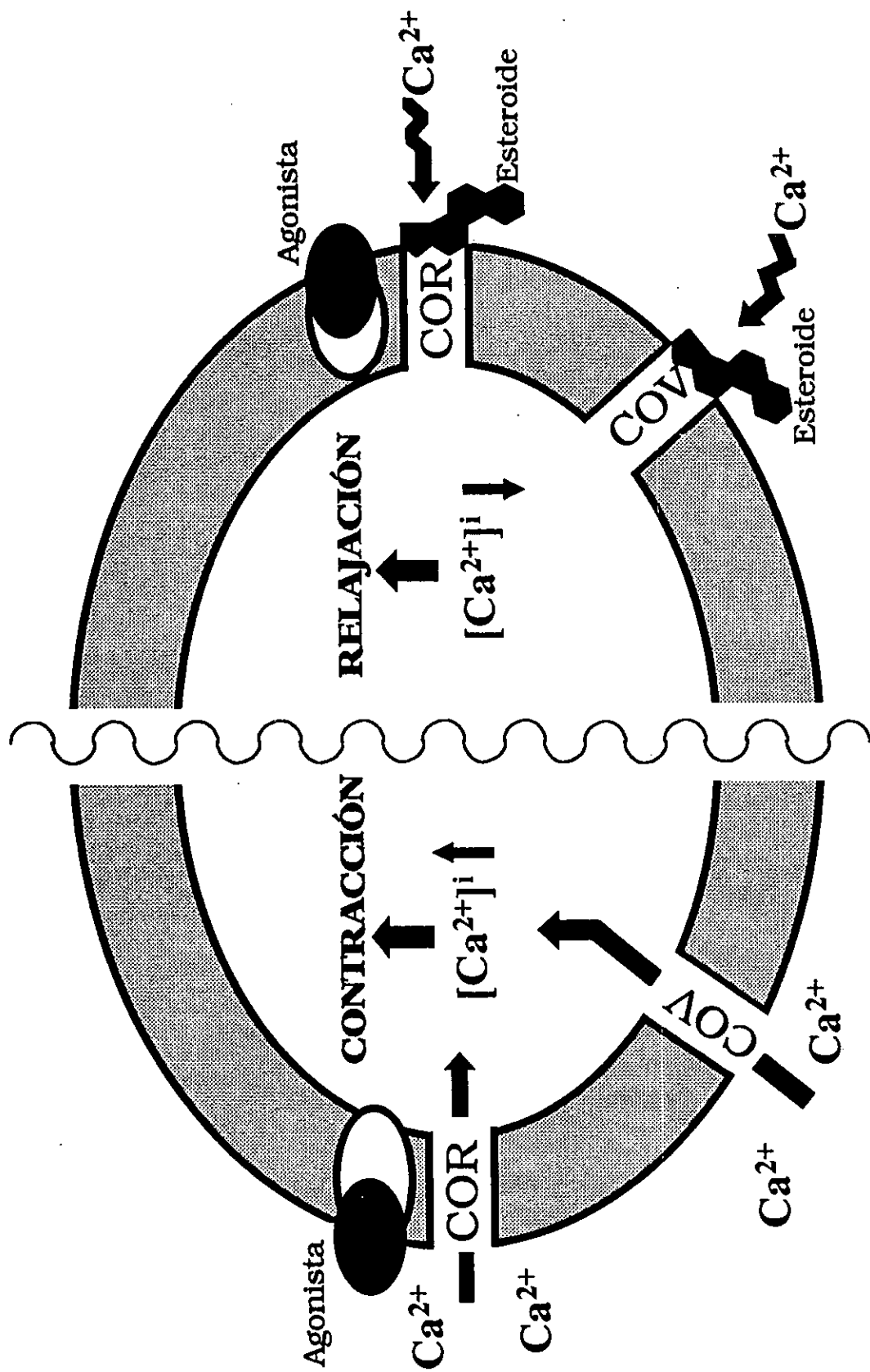


Figura 20. Representación esquemática de la célula vascular lisa, la cual explica el mecanismo de acción propuesto para el efecto vasodilatador e hipotensor de los andrógenos probados. La contracción es resultado del aumento de la concentración de Ca^{2+} citosólico ($[Ca^{2+}]_i$) a través de los canales operados por receptor (COR) y/o canales operados por voltaje (COV). El efecto relajante que producen los andrógenos podría ser debido a una disminución de ($[Ca^{2+}]_i$) a través de bloquear los COR y los COV.

XI. CONCLUSIONES

El efecto vasodilatador independiente de endotelio de la 5β -DHT se debe a un bloqueo del influjo de calcio externo, inactivando así los canales de calcio operados por voltaje y por receptor, probablemente con mayor afinidad para inactivar los canales operados por voltaje.

Los andrógenos inducen una acción hipotensora que no es a través de una interacción con el Sistema Nervioso Central, con el nervio vago, ó por interacción con los receptores muscarínicos, sino más bien debido a una acción directa sobre la membrana plásmatica de las células vasculares lisas que conforman la vasculatura sistémica.

La diferente potencia hipotensora de los andrógenos muestra que la interconversión entre los grupos carbonilo e hidroxilo en C_3 y C_{17} modifica la potencia de los andrógenos 5β -reducidos para producir una acción mayor.

Los presentes datos sugieren que los andrógenos podrían presentar una acción protectora sobre el estado de diferentes enfermedades cardiovasculares. Así, la acción benéfica de dehidroepiandrosterona y sulfato de dehidroepiandrosterona en los problemas vasculares de hombres jóvenes podría ser el resultado de la acción de sus metabolitos como son: 5α - y 5β -DHT.

IX BIBLIOGRAFIA

ARMSTRONG, J.G. (1959). Hypotensive action of progesterone in experimental and human hypertension. *Proc. Soc. Exp. Biol. Metab.* 102, 452-455.

BARNEA, A., HAJIBEIGI, A., TRANT, J.M. AND MASON, J.L. (1990). Expression of steroid metabolizing enzymes by aggregating fetal brain cells in culture: a model for developmental regulation of the progesterone 5 α -reductase pathway. *Endocrinology.* 127, 500-502.

BATRA, S.C. AND BENGTTSSON, B. (1978). Effect of diethylstilbestrol and ovarian steroids on the contractile responses and calcium. *J. Physiol. Lond.* 276, 329-342.

BAULIEU, E.E. (1991). Neurosteroids: a new function in the rat. *Biol. Cell.* 71, 3-10.

BAULIEU, E.E. AND GODEAU, F., SCHORDERET, M. AND SCHOREDET-SLATHRINE, S. (1978). Steroids-induce meiotic division in *Xenopus* oocytes *sufase* and calcium. *Nature, Lond.* 275, 596-598.

BENGTTSSON, C. (1973). Ischaemic heart disease in women. *Acta Med. Scand. suppl.* 549, 1-128.

BLONDEAU, J.-P., BAULIEU, E.E. (1984). Progesterone receptor characterized by photoaffinity labelling in the plasma membrane of *Xenopus laevis* oocytes. *Biochem. J.* 219, 785-792.

BOLTON, T.B. (1979). Mechanism of action of transmitters and other substances on smooth muscle. *Pharmacol. Rev.* 59, 606-718.

BORSKI, R.J., HELMS, L.M.H., RICHMAN, N.H., III. AND GRAU, E.G. (1991). Cortisol rapidly reduces prolactin release and cAMP and $^{45}\text{Ca}^{2+}$ accumulation in the cichlid fish pituitary in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88, 2758-2762.

BRAVO, E.L. (1986). Aldosterone and other adrenal steroids. In: Zanchetti A., Tarazi R.C (eds) Handbook of Hypertension. Elsevier, Amsterdam, vol 8, 603.

CAMPBELL, S. AND WHITEHEAD, M. (1977). Oestrogen therapy and the menopause syndrome. *Clin. Obstet. Gynecol.* 4, 31-47.

CAUVIN, C., LUKEMAN, S., CAMERON, J., HWANG, O. AND van BREEMEN, C. (1985). Differences in norepinephrine activation and diltiazem inhibition of calcium channels in isolated rabbit aorta and mesenteric resistance vessels. *Circ. Res.* 56, 822-828.

CASTEELS, R., KITAMURA, K., KURIYAMA, H. AND SIZUKI, H. (1977). Excitation-contraction coupling in the smooth muscle cells of the rabbit main pulmonary artery. *J. Physiol.* 271, 63-79.

CHESLEY, L.C. AND TEPPER, I.H. (1967). Effects of progesterone and estrogen on the sensitivity to angiotensin II. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 27, 576-581.

CHIEN, E.J., MORRILL, G.A. AND KOSTELLOW, A.B. (1991). Progesterone induce second messengers at the onset of meiotic maturation in the amphibian oocyte: Interrelationships between phospholipid N-methylation, calcium and diacylglycerol release, and inositol phospholipid turnover. *Mol. Cell Endocrinol.* 81, 53-67.

COLUCCI, W.S., GIMBRONE, M.A. Jr., McLAUGHLIN, M.K., HALPERN, W. AND ALEXANDER, R.W. (1982). Increase vascular catecholamine sensitivity and α -adrenergic receptor affinity in female and estrogen treated male rats. *Circ. Res.* 50, 805-811.

- CSAPO, A. (1959). An introduction to the molecular physiology and regulation of the uterus. *Clin. Obstet. Gynec.* 2, 275-283.
- CSAPO, A. AND WEIST, W. (1969). An examination of the quantitative relationship between progesterone and the maintenance of pregnancy. *Endocrinology.* 85, 735-746.
- DHAR, H.L., DWIVED, A., SRIVASTARA, A. AND SETTY, B.S. (1994). Structure activity relationship of some 2,3-diaryl-2H-1-benzopyrans to their anti implantation, estrogenic and antiestrogenic activities in rat. *Contraception.* 49, 609-616.
- DODDS, M.G. AND TWISSELL, D.J. (1972). Effect of althesin (CT 1341) on circulation responses to adrenaline and on halothane-adrenaline cardiac dysrhythmias in the cat. *Postgrad. med. J.* 42(Suppl. 2), 17-24.
- DOWNING, S.J., HOLLINGSWORTH, M. AND MILLER, M. (1988). The influence of oestrogen and progesterone on the actions of two calcium entry blockers in the rat uterus, *J. Endocrinol.* 118, 251-258.
- ETTINGER, B., GENANT, H.K. AND CANN, C.E. (1985). Long-term estrogen replacement therapy prevents bone loss and fractures. *Ann. Intern. Med.* 102, 319-324.
- FRENCH-MULLEN, J.M.H. AND SPENCE, K.T. (1991). Neurosteroids block Ca^{2+} channel current in freshly isolated hippocampal CA1 neurons. *Eur. J. Pharmacol.* 202, 269-272.
- FINIDORI-LEPICARD, J., SCHORDERET-SLATKINE, S., HANOUNE, J. AND BAULIEU, E.E. (1981). Progesterone inhibits membrane bound adenylate cyclase in *Xenopus laevis* oocytes. *Nature.* 292, 255-257.

FISCHER, G.M. AND SWAIN, M.L. (1977). Effect of sex hormones on blood pressure and vascular connective tissue in castrated and noncastrated male rats. *Am. J. Physiol.* 232, H617-H621.

FRANKLIN, M.J., HERD, J.A. AND METCALFE, J. (1962). Effects of progesterone on the circulation in goats. *Fed. Proc.* 21, 138.

GEE, K.W., BOLGER, M.B., BRINTON, R.E., COIRINI, H. AND McEWEN, B.S. (1988). Steroid modulation of chloride ionophore in the rat brain: structure-activity requirements, regional dependence and mechanism of action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 246, 803-812.

GEE, K.W., CHANG, W-C., BRINTON, R.E. AND McEWEN, B.S. (1987). GABA-dependent modulation of the Cl⁻ ionophore by steroids in the rat brain. *Eur J. Pharmacol.* 136, 419-423.

GENEST, J., NOWACZYNSKI, W., KOIW, E., SANDOR, T. AND BIRON, B. (1962). Adrenocortical function in essential hypertension. En: *Essential hypertension: an International Symposium on Hypertension*; Vol. I, pp. 126-146. Springer, Berling.

GODSLAND, I.F., WYNN, V., CROK, D. AND MILLER, N.E. (1987). Sex plasma lipoproteins and arteriosclerosis: Prevailing assumption and outstanding questions. *Am. Heart J.* 114, 1467-1503.

GÓMEZ-SÁNCHEZ, E.P. (1991). What is the role of central nervous system in mineralocorticoids hypertension?. *Am. J. Hypertens.* 4, 374-381.

HARDER, D.R. AND COULSON, P.B. (1979). Estrogen receptors and effect of estrogen on membrane electrical properties of coronary vascular smooth muscle. *J. Cell. Physiol.* 100, 375-382.

HARRISON, N.L. AND SIMMONDS, M.A. (1984). Modulation of the GABA receptor complex by a steroid anaesthetic. *Brain Res.* 323, 287-292.

HARRISON, N.L., MAJEWSKA, M.D., HARRINGTON, J.W. AND BARKER, J.L. (1987). Structure-activity relationships for steroid interaction with the γ -aminobutyric acid_A receptor complex. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 241, 346-353.

HENDERSON, B.E. AND PAGANINI-HILL, A. (1991) Decreased mortality in users of estrogen replacement therapy. *Arch. Intern. Med.* 151, 75-78.

HOLSBAUER, M., BIRMINGHAM, M.K., de NICOLA, A.F. AND OLIVER, J.T. (1985). *In vivo* secretion of 3 α -hydroxy-5 α -pregnan-20-one, a potent anaesthetic steroid, by the adrenal gland of the rat. *J. Steroid. Biochem.* 22(1), 97-102.

JANIAK, P. AND BRODY, M.J. (1988). Role of central mineralocorticoid (MC) binding sites (BS) in the development of DOCA-salt hypertension (DOC-H) in the rat. *FASEB* 2, 5719 (Abstr.).

JIANG, C., SARREL, P.M., LINSAY, D.C., POOLE-WILSON, P.A. AND COLLINS, P. (1991). Endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery by 17 β -oestradiol in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 104, 1033-1037.

JUNG-TESTA, I., HU, Z.Y., BAULIEU, E.E. AND ROBEL, P. (1989). Neurosteroids: biosynthesis of pregnenolone and progesterone in primary cultures of rat glial cells. *Endocrinology.* 125, 2083-2091.

KANNEL, W.B. AND FEINLEIB, M. (1972). Natural history of angina pectoris in the Framingham study: Progestins and survival. *Am. J. Cardiol.* 29, 154-163.

KANNEL, W.B., HJORTLAND, M.C., McNAMARA, P.M. AND GORDON, T. (1976). Menopause and risk of cardiovascular disease. The Framingham study. *Ann. Inter. Med.* 85, 447-452.

KNOPP, R.H. (1988). The effect of posmenopausal estrogen therapy on the incidence of arteriosclerotic vascular disease. *Obstet. Gynecol.* 72, 23s-30s.

KONDO, K., OKUNO, T., EGUCHI, T., SUZUKI H., NAGAHAMA, S. AND GORDON, T. (1980). Vascular action of high dose estrogen in rats. *Endocrinol. Jpn.* 27, 307-313.

KRIEGER, N.R. AND SCOTT, R.G. (1984). 3α -Hidroxisterodoxireductase in rat brain. *J. Neurochem.* 42, 1866-1870.

KUBLI-GARFIAS, C., MEDRANO-CONDE, L., BEYER, C. AND BONDANI, A. (1979). In vitro inhibition of rat uterine contractility induced by 5α and 5β progestins. *Steroids.* 34, 609-617.

KUBLI-GARFIAS, C., LÓPEZ-FIESCO, A., PACHECO-CANO, M.T., PONCE-MONTER, H. AND BONDANI, A. (1980). In vitro effects of androgens upon the spontaneous rat uterine contractility. *Steroids.* 35, 633-641.

KUBLI-GARFIAS, C., AZPEITIA, E., VILLANUEVA-TELLO, T. AND PONCE-MONTER, H. (1983a). Inhibition of noradrenaline release by 5β -progestins in cerebral cortex slices. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 26, 135-138.

KUBLI-GARFIAS, C., HOYO-VADILLO, C., LÓPEZ-NIETO, E. AND PONCE-MONTER, H. (1983b). Inhibition of spontaneous contractions of the rat pregnant uterus by progesterone metabolites. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 26, 115-118.

KUBLI-GARFIAS, C. (1987). Modulatory action of 5-reduced androgens and progestins on the excitability of CNS and smooth muscle. *J. Steroid. Biochem.* 27, 613-634.

KUHLMAN, D., REGAN, C., FERREBEE, J.W., ATCHLEY, D.W. AND LOEB, R.F. (1939). Toxic effects of deoxycorticosterone esteres in dog. *Science.* 90, 496-497.

LAN, N.C., CHEN, J-S., BELELLI, D., PRITCHETT, D.B., SEEBURG, P.H. AND GEE, K.W. (1990). A steroid recognition site is funcionally coupled to an expressed GABA_A-benzodiazepine receptor. *Eur. J. Pharmacol. (Mol. Pharmacol. Sect.)*. 188, 403-406.

LIN, A.L., SCHULTZ, J.J., BRENNER, R.M., AND SHAIN, S.A. (1990). Sexual dimorphism characterizes baboon myocardial androgen and progesterone receptors. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 37, 85-95.

LITCHFIELD, J.T. AND WILCOXON, F.A. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96, 99-113.

MAGNESS, R.R. AND ROSENFELD, C.R. (1989). Local and systemic estradiol-17 β : effects on uterine and systemic vasodilation. *Am. J. Physiol. (Endocrinol. Metab., 19)*, 256, E536-E542.

MAJEWSKA, M.D., HARRISON, N.L., SCHWARTZ, R.D., BARKER, J.L. AND PAUL, S.M. (1986) Steroid hormone metabolites are barbiturate-like modulators of the GABA receptor, *Science.* 232, 1004-1007.

MANN, J.I. AND IMMAN, W.H.W. (1975). Oral contraceptive and death from myocardial infarction. *Br. Med. J.* II, 245-251.

MATTHEWS, K.A., MEILAHN, E., KULLER, L.H., KELSEY, S.F., GAGIULA, A.W. AND WING, R.R. (1989). Menopause and risk factors for coronary heart disease. *N. Engl. J. Med.* 321, 641-646.

McCALDEN, T.A. (1975). The inhibitory action of oestradiol-17 β and progesterone on venous smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 53, 183-192.

McEWEN, B.S. (1991). Non-genomic and genomic effects of steroids on neuronal activity. *Trens. Pharmac. Sci.* 12, 141-147.

McGILL, W.A., RIVERA, O. AND HOWARD, R. (1980). The heart is a target organ for androgen. *Science.* 207, 775-777.

McNEILL, A.M., DUCKLES, S.P. AND KRAUSE, D.N. (1996). Relaxant effects of 17 β -estradiol in the rat tail artery are greater in females than males. *Eur. J. Pharmacol.* 308, 305-309.

MELCANGI, R.C., CELOTTI, F., BALLABIO, M., CASTANO, P., MASSARELLI, A., POLETTI, A. AND MARTINI, L. (1990). 5 α -Reductase activity in isolated and cultured neuronal and glial cells of the rat. *Brain Res.* 516, 229-236.

MILLER, V.M., GISCLARD, V. AND VANHOUTTE, P.M. (1988). Modulation of endothelium-dependent and vascular smooth muscle responses by estrogens. *Phlebologie.* 224, 19-22.

MINAMI, T., OOMURA, Y., NABEKURA, J. AND FUKUDA, A. (1990). 17 β -Estradiol depolarization of hypothalamic neurons is mediated by cyclic AMP. *Brain Res.* 519, 301-307.

MORROW, A.L., SUZDAK, P.D. AND PAUL, S.M. (1987). Steroid hormone metabolites potentiated GABA receptor-mediated chloride ion flux nanomolar potency. *Eur. J. Pharmacol.* 142, 483-485.

MORROW, A.L., PACE, J.R., PURDY, R.H. AND PAUL, S.M. (1990). Characterization of steroid interactions with γ -aminobutyric acid receptor-gated chloride ion channels: evidence for multiple steroid recognition sites. *Mol. Pharmacol.* 37, 263-270.

PERUSQUÍA, M., GARCÍA-YAÑEZ, E., IBAÑEZ, R. AND KUBLI-GARFIAS, C. (1990). Non-genomic mechanism of action delta-4 and 5-reduced androgens and progestins on the contractility of the isolated rat myometrium. *Life Sci.* 47, 1547-1553.

PERUSQUÍA, M. AND CAMPOS, G. (1991). Inhibitory effect of androgens and progestins on the contraction induced by oxytocin in the rat myometrium. *Med. Sci. Res.* 19, 177-179.

PERUSQUÍA, M., CAMPOS, G., CORONA, J.L. AND KUBLI-GARFIAS, C. (1991a). Antagonism by 5-reduced steroid of the tonic and phasic contractions induced by serotonin in the isolated rat uterus. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 34, 395-398.

PERUSQUÍA, M., CORONA, J.L. AND KUBLI-GARFIAS, C. (1991b). Inhibitory effect of 5-reduced androgens and progestins on the uterine contraction induced by acetylcholine. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 34, 89-92.

PERUSQUÍA, M. AND KUBLI-GARFIAS, C. (1992). External calcium dependence of the uterine contraction induced by prostalands E_2 and $F_{2\alpha}$ and its antagonism with natural progestins. *Prostaglandins.* 43, 445-455.

PERUSQUÍA, M. AND KUBLI-GARFIAS, C. (1994). Progesterone-like relaxant effect of RU 486 in the rat myometrium. *Life Sci.* 54, 1506-1513.

PERUSQUÍA, M., HERNÁNDEZ, R., MORALES, M.A., CAMPOS, M.G. AND VILLALÓN, C.M. (1996). Role of endothelium in the vasodilating effect of progestins and androgens on the rat thoracic aorta. *Gen. Pharmacol.* 27, 181-185.

PERUSQUÍA, M. AND VILLALÓN, C.M. (1996). The relaxant effect of sex steroids in the rat myometrium is independent of the gamma-amino butyric acid system. *Life Sci.* 58, 913-926.

PERUSQUÍA, M., HERNÁNDEZ, R., MONTAÑO, C., VILLALÓN, C.M. AND CAMPOS, M.G. (1997). Inhibitory effect of sex steroids on guinea-pig airway smooth muscle contractions. *Comparative Biochem. Physiol.* (C). 118, 5-10.

PETERS, J.A., KIRKNESS, E.F., CALLACHAN, H., LAMBERT, J.J. AND TURNER, A.J. (1988). Modulation of the GABA_A receptor by depressant barbiturates and pregnane steroids. *Br. J. Pharmacol.* 94, 1257-1269.

PETITTI, N. AND ETGEN, A.M. (1992). Progesterone promotes rapid desensitization of alpha 1-adrenergic receptor augmentation of cAMP formation in rat hypothalamic slices. *Neuroendocrinology.* 55, 1-8.

PHYLLIPS, G.B. (1975). Evidence for hyperestrogemia as a risk factor for myocardial infraction in men, *Br. Med. J.* II, 245-251.

PRINCE, R.J. AND SIMMONDS, M.A. (1992). Steroid modulation of the strychnine-sensitive glycine receptor. *Neuropharmacology.* 31, 201-205.

RADDINO, R., MANCA, C., POLI, E., BOLOGNESI, R. AND VISIOLI, O. (1986). Effects of 17 beta-estradiol on the isolated rabbit heart. *Arch. Int. Pharmacodyn. Ther.* 281, 57-65.

RAVI, J., MANTZOROS, C.S., PRABHU, A.S, RAM, J.L. AND SOWERS, J.R. (1994). In vitro relaxation of phenylephrine- and angiotensin II-contracted aortic rings by β -estradiol. *Am. J. Hypertens.* 7, 1065-1069.

RAVINDRA, R. AND ARONSTAM, R.S. (1992). Progesterone, testosterone and estradiol-17beta inhibit gonadotropin-releasing hormone stimulation of G protein GTPase activity in plasma membranes from rat anterior pituitary lobe. *Acta Endocrinol.* 126, 345-349.

REYNOLDS, S.R.M. AND FOSTER, F.I. (1940). Peripheral vascular action of estrogen observed in the ear of the rabbit. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 68, 173-184.

ROBINSON, J.A. AND KARAVOLAS, H.J. (1973). Conversion of progesterone by rat anterior pituitary tissue to 5α -pregnane-3,20-dione and 3α -hydroxy- 5α -pregnan-20-one. *Endocrinology.* 93, 430-435.

RODRÍGUEZ, J., GARCÍA de BOTO, M.J. AND HIDALGO, A. (1996). Mechanisms involved in the relaxant effect of estrogens on rat aorta strips. *Life Sci.* 58, 607-615.

ROMMERTS, F.F.G. AND van der MOLEN, H.J. (1971). Occurrence and localization of 5α -steroid reductase, 3α - and 17β -hydroxysteroid dehydrogenase in hypothalamus and other brain tissues of the male rat. *Biochem. Biophys. Acta.* 248, 489-502.

RYLANCE, P.B., BRINCAT, M., LAFFERTY, K., de TRAFFORD, J.C., BRINCAT, S., PARSONS, V. AND STUDD, J.W.W. (1985). Natural Progesterone and antihypertensive action. *Br. Med. J.* 290, 13-14.

SADLER, S.E. AND MALLER, J.L. (1981). Progesterone inhibits adenylate cyclase in *Xenopus* oocytes. Action on the guanine nucleotide regulatory protein. *J. Biol. Chem.* 256, 6368-6373.

SADLER, S.E. AND MALLER, J.L. (1982). Identification of a steroid receptor on the surface of *Xenopus* oocyte by photoaffinity labeling. *J. Biol. Chem.* 257, 355-361.

SAMMOUR, M.B., EL-KABARITY, H. AND KHALIFA, A.S. (1975). Progesterone therapy in pre-eclamptic toxemia. *Acta Obst. Gynecol. Scand.* 54, 195-202.

SAMMOUR, M.B., EL-MAKHZANGY, M.N., FAWZY, M.M. AND SCHINDLER, A. (1982). Progesterone therapy in pregnancy induced hypertension. Therapeutic value and hormonal profile. *Clin. Exp. Hypertens.* 1, 455-478.

SCHUMACHER, M. (1990). Rapid membrane effects of steroid hormones: an emerging concept in neuroendocrinology. *Trends Neurosci.* 13, 359-362.

SELYE, H. (1941). Anaesthetic effect of steroid hormones. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 46, 116-121.

SHAFAGOJ, Y., OPOKU, J., QURESHI, D., REGELSON, W. AND KALIMI, M. (1992). Dehydroepiandrosterone prevents dexamethasone-induced hypertension in rats. *Am. J. Physiol.* 263, E210-E213.

SHAN, J., RESNICK, L.M., LIU, Q-Y., WU, X-C., BARBAGALLO, M. AND PANG, P.K.T. (1994). Vascular effects of 17 β -estradiol in male Sprague-Dawley rats. *Am. J. Physiol* 266 (*Heart Circ. Physiol.* 35), H967-H973.

SHIPLEY, R.E. AND TILDEN, J.H. (1947). A pithed rat preparation suitable for assaying pressor substances. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 64, 453-455.

SILVA de SA, M.F. AND MEIRELLES, R.S. (1977). Vasodilating effect of estrogen on the human umbilical artery. *Gynecol. Invest.* 8, 307-313.

SKÄRBY, T., HÖGESTÄTT, E.D. AND ANDERSON, K.-E. (1984). Influence of extracellular calcium and nifedipine on α_1 - and α_2 -adrenoreceptor mediated contractile responses in isolated rat and cat cerebral and mesenteric arteries. *Acta Physiol. Scan.* 123, 445-456.

SMITH, L.D. (1989). The induction of oocyte maturation: transmembrane signaling events and regulation of the cell cycle. *Development.* 107, 685-689.

SOLDATI, L. de, FORTEZA, I.E. de., PELLEGATA, C.R. AND CAMMAROTA, H. (1966). The antihypertensive action of progesterone. *Cardiologica.* 48, 489-503.

SPEEDING, M. (1985). Calcium antagonist subgroups. *Trends Pharmacol. Sci.* 6, 101-114.

SPERELAKIS, N. (1990). Properties of calcium channels in cardiac muscle and vascular smooth muscle. *Mol. Cell Biochem.* 99, 979-109.

STICE, S.L., FORD, S.P., ROSAZZA, J.P. AND van-ORDEN, D.E. (1987a). Role of 4-hydroxylated estradiol in inducing Ca^{2+} uptake of uterine arterial smooth muscle cells through potential-sensitive channels. *Biol. Reprod.* 36, 361-368.

STICE, S.L., FORD, S.P., ROSAZZA, J.P. AND van-ORDER, D.E. (1987b). Interaction of 4-hydroxylated estradiol and potential-sensitive Ca^{2+} channels in altering uterine blood flow during the estrous cycle and early pregnancy in gilts. *Biol. Reprod.* 36, 369-375.

STURPF, W.E. (1990). Steroids hormones and cardiovascular system: Direct actions of estradiol, progesterone, testosterone, gluco- and mineralocorticoids, and soltriol [vitamin D] on central nervous regulatory and peripheral tissue. *Experientia*. 46, 13-25.

SU, T-P., LONDON, E.D. AND JAFFE, J.H. (1988). Steroid binding at σ receptors suggests a link between endocrine, nervous and immune system. *Science*. 240, 219-221.

TAKAYAMA, T. (1986). Effects of highly concentrated estrogen and progesterone on the contractile mechanism of uterine smooth muscles. *Nippon. Heikatsukin. Gakkai. Zasshi*. 22, 43-51.

TOBA, K., CROFTON, J.T., INOVE, M. AND SHRE, L. (1991). Effects of vassopressin on arterial blood pressure and cardiac output in male and female rats. *Am. J. Physiol.* 261 (*Regulatory Integrative Comp. Physiol.* 30), R1118-R1125.

TONOLO, G., FRASER, R., CONNELL, J.M.C. AND KENYON, C.J. (1988). Chronic low dose of dexamethasone in rats: effects on blood pressure, body weight and atrial natriuric peptide. *J. Hypertens.* 6, 25-31.

TOWART, R. AND SCHRAMM, M. (1984). Recent advances in the pharmacology of the calcium channel. *Trends Pharmacol. Sci.* 5, 111-113.

TURNER, D.M., RAMSON, R.W., YANG, JS-J. AND OLSEN, R.W. (1989). Steroid anesthetics and naturally occurring analog modulate the γ -aminobutyric acid receptor complex at a site distinct from barbiturates. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 248, 960-966.

van BREEMEN, C., MANGE, A., FAHIM, M. AND MEISHERI, K. (1882). Selectivity of calcium antagonist action in vascular smooth muscle. *Am. J. Cardiol.* 49, 507-510.

van den BERG, D.T.W.M., de KLOET, E.R., van DIJKEN, H.H. AND de JONG, W. (1990). Differential central effects of mineralocorticoids and glucocorticoids agonists and antagonists on blood pressure. *Endocrinology.* 126,118-124.

VARGAS, R., DELANEY, M., FARHAT, M.Y., WOLFE, R., REGO, A. AND RAMWELL, P.W. (1995). Effect of estradiol 17 β on pressor response of rat mesenteric bed to norepinephrine, K⁺, and U-46619. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 25, 200-206.

VARGAS, R., THOMAS, G., WROBLEWSKA, B. AND RAMWELL, P.W. (1989). Differential effects of 17 α and 17 β estradiol on PGF_{2 α} mediated contraction of the porcine coronary artery. *Adv. Prostaglandin Thromboxane Leukotriene Res.* 19, 227-280.

VETERANS ADMINISTRATION COOPERATIVE UROLOGICAL RESEARCH GROUP. (1967). Treatment and survival of patients with cancer of the prostate. *Surg. Gynecol. Obst.* 124, 1011-1017.

VOLTERRANI, M., ROSANO, G., COATS, A., BEALE, C. AND COLLINS, P. (1995). Estrogen acutely increases peripheral blood flow in postmenopausal women. *Am. J. Med.* 99, 119-122.

VON EIFF, A.W., LUTZ, H.M., GRIES, J. AND KRETZCHMAR, R. (1985). The protective mechanism of estrogen on high blood pressure. *Basic. Res. Cardiol.* 80, 191-201.

WAMBACH, G. AND HIGGINS, J.R. (1979). Antihypertensive effect of progesterone in rats with mineralocorticoid-induced hypertension. *Am. J. Physiol.* 236, E366-370.

WEISS, N.S. (1972). Relationship of menopause to serum cholesterol and arterial blood pressure: The United States health examination survey of adults. *Am. J. Epidemiol.* 96, 237-241.

WILLIAMS, J.K., ADAMS, M.R. AND KLOPFENSTEIN, H.S. (1990). Estrogen modulates responses of atherosclerotic coronary arteries. *Circulation.* 81, 1680-1687.

WHITE, R.E., DARKOW, D.J. AND FALVO LANG, J.L. (1995). Estrogen relaxes coronary arteries by opening BK_{Ca} channels through a cGMP-dependent mechanism. *Circ. Res.* 77, 936-942.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. (1976). Myocardial Infarction Community Registers. *World Health Organization., Copenhagen.* 1-232.

YOSHIMURA, T., ITO, M. AND NAKAMURA, T. (1984). Effects of pregnancy and estrogens on the angiotensin II pressor response of the rabbit using several blood pressure measurement in the ear (Abstract) *Clin. Exp. Hypertens.* B3, 97.

ZHANG, F., RAM, J.L., STANDLEY, P.R. AND SOWERS J.R. (1994). 17 β -Estradiol attenuates voltage-dependent Ca²⁺ currents in A7r5 vascular smooth muscle cell line. *Am. J. Physiol.* 266 (*Cell Physiol.* 35), C975-C980.