



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Instituto de Investigaciones Biomédicas

**CARACTERIZACIÓN DE LA EFICACIA
VASODILATADORA DE ANDRÓGENOS EN
DIFERENTES LECHOS VASCULARES DEL PERRO**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

BIÓL. MARÍA JULIA ESPINOZA CAMACHO

DIRECTORA DE TESIS: DRA. MA. MERCEDES PERUSQUÍA NAVA

MÉXICO, D. F.

2009



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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


Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 17 de agosto de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** de la alumna **ESPINOZA CAMACHO MARÍA JULIA** con número de cuenta **402029090** con la tesis titulada **"CARACTERIZACIÓN DE LA EFICACIA VASODILATADORA DE ANDRÓGENOS EN DIFERENTES LECHOS VASCULARES DEL PERRO"**, realizada bajo la dirección de la **DRA. MARÍA MERCEDES PERUSQUÍA NAVA**:

Presidente: DR. MAXIMILIANO IBARRA BARAJAS
Vocal: DRA. REBECA LÓPEZ MARURE
Secretario: DRA. MARÍA MERCEDES PERUSQUÍA NAVA
Suplente: DRA. MARÍA CRISTINA PAREDES CARBAJAL
Suplente: DR. LUIS MANUEL MONTAÑO RAMÍREZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 18 de noviembre de 2009.


Dr. Juan Nájera Farfán
Coordinador del Programa

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM); por darme la oportunidad de continuar formándome en los mejores estándares académicos y por todas las facilidades proporcionadas durante mis estudios de Maestría.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por su valioso apoyo, al otorgarme la Beca para Estudios de Maestría.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), UNAM; por la Beca de Prerrequisitos de Maestría, otorgada a través del Programa de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) proyecto IN202507.

A la Coordinación de Estudios de Posgrado-UNAM, por su apoyo económico, a través de su Programa de Fomento a la Graduación.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas de la UNAM, por el uso de sus instalaciones para la realización de este proyecto.

A la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, por todas las facilidades prestadas para la obtención de las muestras utilizadas en esta investigación.

A los miembros del Comité Tutorial que supervisaron este proyecto: Dra. María Mercedes Perusquía Nava (Tutora Principal), Dr. Luis Manuel Montaña Ramírez y Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza; por sus valiosos comentarios y correcciones durante cada sesión Tutorial.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la *Dra. María Mercedes Perusquía Nava*, por la excelente dirección de esta Tesis, por sus sugerencias y correcciones; por la oportunidad de introducirme a la investigación científica.

Al Jurado para el examen de grado: *Dr. Maximiliano Ibarra Barajas, Dra. Rebeca López Marure, Dra. María Cristina Paredes Carbajal y Dr. Luis Manuel Montaña Ramírez*, por la revisión final de esta tesis, también agradezco al Dr. Montaña su valioso apoyo para el análisis estadístico de los datos presentados en esta tesis

Al *M.V.Z. Ciriaco Tista Olmos*, por brindarme amablemente todas las facilidades para la colecta de las muestras caninas en la Sección de Enseñanza Quirúrgica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia, UNAM.

A todo el *Equipo de Cirugía* de la Sección de Enseñanza Quirúrgica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la UNAM, por su importante ayuda dentro del Quirófano; en especial quiero agradecer a la *M.V.Z. Rosa Marina Álvarez Mascareño*, por su diligente apoyo logístico para la toma de las muestras caninas.

A la *Biól. Erika Navarrete Monroy*, por su disposición diaria para escuchar y discutir mis dudas académicas, por compartir conmigo sus puntos de vista y su experiencia académica.

A *Juanita Trejo González*, por instruirme, con paciencia, en el manejo de la Técnica de Registro Isométrico y por su valiosa asistencia en cada uno de los experimentos realizados para esta tesis.

A la *Dra. Norma Angélica Moreno Mendoza*, por su dirección en el manejo y la preparación de las muestras vasculares para su observación histológica.

Al *M. en C. Jonatan Mendoza Gutiérrez*, por su disposición para compartir conmigo sus conocimientos en estadística, en programas para el análisis de datos y en la edición de textos.

Al *M. en C. Ricardo Vázquez Ramírez*, por su colaboración en la elaboración de las estructuras de los andrógenos.

DEDICO ESTA TESIS...

A mi madre, con inmenso cariño.

A Seymour, por ser más que un hermano, un amigo, un maestro, con profunda admiración. Eres el cimiento de este logro, al enseñarme la disciplina, la constancia, el camino.

A mis hermanos, con quienes tengo la fortuna de compartir mi vida, gracias por estar conmigo, este logro también es suyo.

A Jonatan, has sido el alfil de mi vida, contigo este éxito es aún más satisfactorio.

ÍNDICE

RESUMEN	1
SUMMARY	2
1. INTRODUCCIÓN	3
1.1 Generalidades	3
1.2 Andrógenos	4
1.3 Acción de los andrógenos en el tono vasomotor	10
1.4 Eficacia y potencia vasodilatadora de los andrógenos	12
1.5 Mecanismo de acción del efecto vasodilatador de andrógenos	17
a) <i>Participación del endotelio vascular en la acción relajante de andrógenos</i>	19
b) <i>Participación de los canales iónicos en el efecto vasodilatador de los andrógenos</i>	20
c) <i>Vías de señalización interna involucradas en la acción vasodilatadora de andrógenos</i>	23
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	25
3. HIPÓTESIS	27
4. OBJETIVOS	28
5. METODOLOGÍA	29
5.1 Modelo biológico	29
5.2 Disección de los vasos sanguíneos	29
5.3 Preparación y montaje de los anillos vasculares	31
5.4 Protocolo experimental	33
a) <i>Determinación farmacológica de la presencia o ausencia de endotelio</i>	33
b) <i>Prueba de los andrógenos sobre la contracción inducida por KCl (60 mM) en preparaciones con y sin endotelio de los diferentes vasos sanguíneos caninos</i>	36
c) <i>Determinación histológica de la presencia o ausencia de endotelio vascular</i>	37
5.5 Evaluación y análisis estadístico de los datos	38
5.6 Compuestos utilizados	39
6. RESULTADOS	40
6.1 Arteria coronaria izquierda canina	40
a) <i>Determinación de la presencia o ausencia del endotelio</i>	40
b) <i>Efecto vasodilatador de andrógenos sobre la contracción inducida por KCl (60 mM) en la arteria coronaria izquierda canina</i>	40

6.2 Arteria femoral canina	47
a) <i>Determinación de la presencia o ausencia del endotelio</i>	47
b) <i>Efecto vasodilatador de andrógenos sobre la contracción inducida por KCl (60 mM) en la arteria femoral canina</i>	49
6.3 Vena safena canina	55
a) <i>Respuestas atípicas del endotelio de la vena safena canina</i>	55
b) <i>Efecto vasodilatador de andrógenos sobre la contracción inducida por KCl (60 mM) en la vena safena canina</i>	61
6.4 Sensibilidad de los vasos sanguíneos al efecto vasodilatador de los andrógenos	67
6.5 Observación histológica de la presencia o ausencia del endotelio vascular	69
7. DISCUSIÓN	70
7.1 General	70
7.2 Participación del endotelio vascular en el efecto vasodilatador de andrógenos	71
7.3 Sensibilidad de los lechos vasculares caninos al efecto vasodilatador de andrógenos	73
7.4 Relación estructura química-efecto vasodilatador de andrógenos en vasos caninos	77
7.5 Importancia de la acción vasodilatador de los andrógenos	79
8. CONCLUSIONES	83
9. REFERENCIAS	84

RESUMEN

En años recientes se ha establecido que los andrógenos son importantes moduladores del tono vasomotor, capaces de provocar disminución del tono vascular. El efecto vasodilatador de la testosterona (TES), el principal andrógeno, ha sido observado en varios tipos de vasos sanguíneos de diferentes especies; sin embargo, existe discrepancia sobre la sensibilidad a la acción vasodilatadora de TES, en los diferentes lechos vasculares estudiados. Lo cual puede ser debido a: (i) la variación de especie; (ii) el tipo de vaso sanguíneo y; (iii) los diferentes agentes vasoconstrictores empleados en cada estudio. Por tal motivo y con fines comparativos, el objetivo principal de este trabajo fue analizar la potencia vasodilatadora de TES y sus metabolitos 5-reducidos (5α -dihidrotestosterona; 5α -DHT y 5β -dihidrotestosterona; 5β -DHT) sobre contracciones inducidas por un mismo agente vasoconstrictor en tres diferentes vasos sanguíneos de la misma especie. En forma colateral, también se estudio la eficacia vasodilatadora de cada andrógeno y la posible participación del endotelio vascular en su efecto vasodilatador. Para este estudio se utilizaron anillos, con y sin endotelio, de arteria coronaria izquierda, arteria femoral y vena safena de perro macho adulto. Los anillos fueron precontracturados con KCl (60 mM) y su actividad fue registrada mediante la técnica isométrica. Cada andrógeno fue evaluado por separado y a diferentes concentraciones en forma no acumulativa. Los andrógenos mostraron una rápida capacidad vasodilatadora, la cual fue dependiente de la concentración en los tres lechos vasculares, en un rango de concentración de 1.8 a 180 μ M. El efecto vasodilatador de los andrógenos no mostró diferencias significativas entre preparaciones con y sin endotelio de la arteria coronaria izquierda y la arteria femoral; mientras que la vena safena presentó un comportamiento atípico del endotelio vascular; pero aún así, se preservó el efecto relajante de cada andrógeno, descartando la participación del endotelio vascular en el efecto vasodilatador de los andrógenos. Se pudo determinar que cada uno de los tres vasos sanguíneos estudiados tiene diferente sensibilidad al efecto relajante de los andrógenos, siendo la arteria coronaria izquierda el lecho con mayor sensibilidad, mientras que, la arteria femoral fue el vaso con menor sensibilidad. Asimismo, los andrógenos mostraron diferente orden de potencia en cada lecho vascular, en la arteria coronaria izquierda: 5β -DHT >> 5α -DHT > TES; en la arteria femoral: 5β -DHT >> TES >>> 5α -DHT; y en la vena safena: 5β -DHT = TES = 5α -DHT. En general, estos hallazgos indican que 5β -DHT fue el andrógeno con mayor potencia, respecto a TES y 5α -DHT, señalando que la configuración $5\beta/cis$ optimiza la acción vasodilatadora de los C_{19} esteroides. Estos datos resaltan que la diferente sensibilidad de cada lecho vascular canino, al efecto vasodilatador de los andrógenos depende, en parte, de las diferencias funcionales intrínsecas de cada vaso y de la estructura química de cada andrógeno.

SUMMARY

Recently it has been established that androgens are regulators of vascular reactivity by diminishing the vascular tone. The vasodilator property of testosterone (TES), the main androgen, has been observed in several vascular beds from different species; but the different efficiency of TES to induce vasodilation has caused controversy. Thus, this study investigated the vasodilating potency and efficacy of TES and its 5-reduced metabolites (5 α -dihydrotestosterone; 5 α -DHT, and 5 β -dihydrotestosterone; 5 β -DHT) on three different vascular beds from the same species contracted with KCl; as well as the possible role that the vascular endothelium may play. In the dog coronary and femoral arteries and the saphenous vein, with and without endothelium, isometrically recorded, contractions by KCl (60 mM) were inhibited by each androgen in a concentration dependent manner from 1.8 to 180 μ M. Removal of endothelium did not prevent androgen-induced vasodilation in the coronary and femoral artery, while the saphenous vein showed a dysfunctional endothelium, but the vasodilation to androgens was still preserved, suggesting that the endothelium is not involved. Each blood vessel showed different sensitivity to androgen-induced vasodilation. With respect to IC₅₀ values, the order of potency was: (1) left coronary artery 5 β -DHT>>5 α -DHT>TES; (2) femoral artery, 5 β -DHT>>TES>>>5 α -DHT; and (3) saphenous vein TES=5 β -DHT=5 α -DHT. These findings indicate that 5 β -DHT was the best vasorelaxant, revealing that the 5 β /*cis* configuration optimizes the vasodilator action of C₁₉ steroids. In conclusion, the vasodilator effect of androgens depends, in part, from: (i) the different nature of each blood vessel and; (ii) the different chemical structure of each androgen.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Generalidades

Las hormonas esteroides son un grupo de lípidos que comparten una estructura común, el ciclopentanoperhidrofenantreno, compuesto de 4 anillos de carbono fusionados (Fig. 1); los esteroides se han clasificado por su número de carbonos en: progestinas, glucocorticoides y mineralocorticoides (21 carbonos), andrógenos (19 carbonos) y estrógenos (18 carbonos) (Voet *et al.*, 2007).

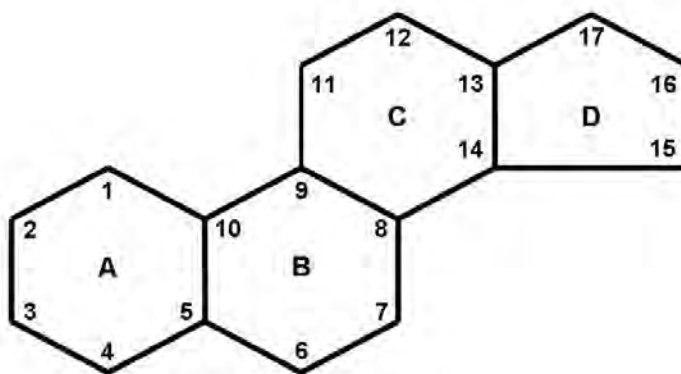


Fig. 1. Estructura básica de las hormonas esteroides, ciclopentanoperhidrofenantreno.

La importancia biológica de las hormonas esteroides es evidente al observar su amplia distribución en la escala filogenética, que va desde los insectos hasta los vertebrados. Asimismo, participan en una gran variedad de funciones fisiológicas, regulando el metabolismo de carbohidratos, proteínas y lípidos; el equilibrio de líquidos y electrolitos; el desarrollo de las características sexuales secundarias de

hembras y machos. Además, las hormonas esteroides intervienen en múltiples procesos en los sistemas: endocrino, genital, inmunitario, muscular, óseo, nervioso y cardiovascular.

Todas las hormonas esteroides derivan de un precursor común: el colesterol, el cual es un lípido de 27 carbonos organizados en el ciclopentanoperhidrofenantreno y una cadena lateral. Durante la biosíntesis de los esteroides (Fig. 2), la cadena lateral del colesterol es cortada por el citocromo p450scc (side chain cleavage), originando a la pregnenolona, primera hormona de 21 carbonos y precursora de los esteroides sexuales (andrógenos, progestinas y estrógenos), los mineralcorticoides y glucocorticoides; la biosíntesis de los esteroides es, principalmente, en las glándulas suprarrenales, las gónadas y la placenta; y en menor medida, en hipotálamo, hígado, tejido adiposo subcutáneo, mamario y músculo liso vascular (Tsutsui *et al.*, 1999).

1.2 Andrógenos

Esta tesis se enfoca al estudio de los esteroides sexuales masculinos (andrógenos). Los C19 esteroides son un grupo de andrógenos que regulan una gran cantidad de procesos biológicos; principalmente, mantienen la fertilidad y el fenotipo masculino (Lyon, 2002).

El principal andrógeno, la testosterona, se sintetiza a partir de otros dos andrógenos: la androstendiona, por la reducción reversible del grupo 17-ceto dirigida por la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (HSD); y el androstendiol, por acción de la 3 β -HSD que oxida el grupo 3 β -hidroxilo (ver Fig. 2). La síntesis de la testosterona es principalmente en los testículos (en las células de Leydig) y, en menor medida, en la corteza adrenal, el hígado, el riñón, el tejido adiposo, el cerebro, el músculo

esquelético y en ovarios (Birlingmaier *et al.*, 1986). En hombres sanos los niveles de testosterona en sangre son ~13.9-31.2 nmol/l; de esta concentración sólo ~2% de la testosterona se encuentra libre en la sangre (Ostátníková *et al.*, 2007), mientras que el resto se encuentra unida a la albumina, a los eritrocitos y a la globulina unida a hormonas sexuales (steroid hormone binding globulin; SHBG) (Diver *et al.*, 2003).

La testosterona, además de ser uno de los andrógenos más importantes, da origen a otros esteroides de gran importancia fisiológica (Fig. 2). Por un lado, la testosterona es precursora del principal esteroide femenino, el 17 β -estradiol, por acción de la enzima p450 aromatasa, que cataliza la aromatización del anillo A y la reducción del grupo 3-ceto (Stoffel-Wagner, 2001), la aromatización de la testosterona ocurre principalmente en los testículos y los ovarios. Por otro lado, la testosterona origina a otros andrógenos, los dihidrometabolitos: 5 α -dihidrotestosterona (5 α -DHT) y 5 β -dihidrotestosterona (5 β -DHT), por acción de la 5 α - y la 5 β -reductasa, respectivamente; estos andrógenos son sintetizados principalmente en testículos y, a diferencia de la testosterona, no son aromatizados a estrógenos (Poletti *et al.*, 1998; Pozzi *et al.*, 2003). Los dihidrometabolitos son reducidos por las enzimas 3 α - ó 3 β -HSD y originan, de manera irreversible, tetrahydroderivados no aromatizables: androstandiol (3 α ,5 α); epiandrostandiol (3 β ,5 α); etiocolanolona (3 α ,5 β) y epietiocolanolona (3 β ,5 β) (Jez y Penning, 1998; Penning *et al.*, 2000) (Fig. 2).

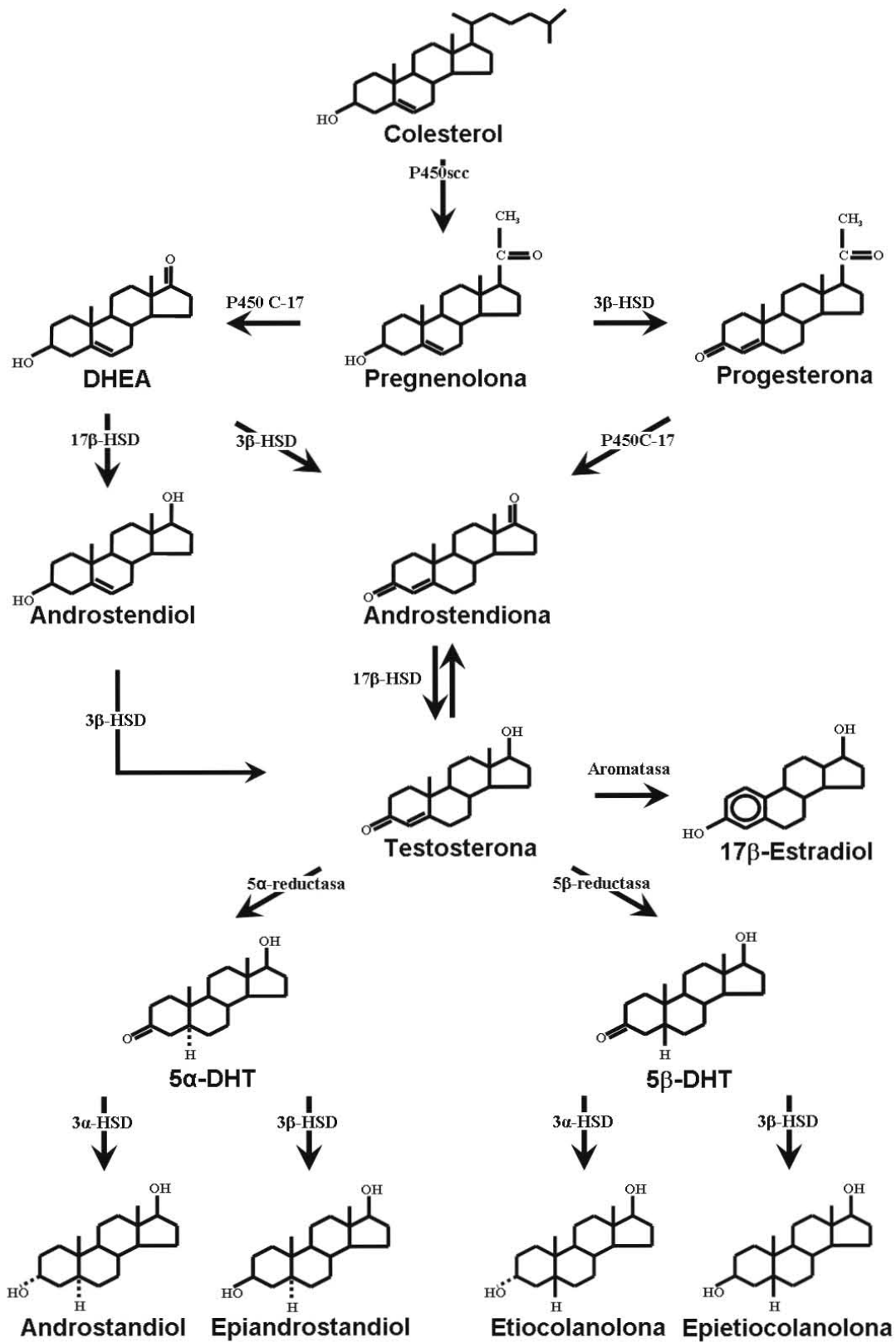


Fig. 2. Biosíntesis de andrógenos. HSD (hidroxiesteroide deshidrogenasa), p450 (citocromo p450), p450scc (p450 side chain cleavage), DHT (dihidrotestosterona) y DHEA (dehidroepiandrosterona).

La testosterona y su dihidrometabolito 5 α -DHT, son los principales andrógenos responsables de la diferenciación sexual durante la embriogénesis, ya que inducen el desarrollo y la maduración de las estructuras sexuales masculinas internas (próstata, epidídimo, conductos deferentes y vesícula seminal) y externas (pene, testículos y escroto) (Grino *et al.*, 1990). También, durante este periodo prenatal, la testosterona tiene efectos irreversibles sobre el sistema nervioso, específicamente, la testosterona determina el desarrollo de las regiones del cerebro relacionadas con la conducta sexual masculina y con habilidades masculinas, como la habilidad espacial (Arnold y Gorski, 1984; Matsuda *et al.*, 2008). En la pubertad y la edad adulta, los andrógenos son esenciales para inducir la maduración sexual y el mantenimiento de los caracteres sexuales masculinos; siendo primordial los niveles normales de testosterona para que se lleve a cabo la espermatogénesis y se mantenga la fertilidad masculina (McLachlan *et al.*, 2002).

Además de sus efectos sobre el sistema reproductor masculino, los andrógenos también modulan varios procesos fisiológicos importantes, entre ellos: el crecimiento y caída del pelo corporal; el incremento de la masa muscular esquelética (Sinha-Hikim *et al.*, 2004), la cantidad y distribución del tejido adiposo (Blouin *et al.*, 2006); el metabolismo de lípidos y azúcares (Osuna *et al.*, 2006); la densidad ósea; estimulan la migración de células madre endoteliales (Ray *et al.*, 2008) y la liberación de la eritropoyetina en la médula ósea; inducen la incorporación de hierro a las células sanguíneas (Shahani *et al.*, 2009). También, se ha aceptado que los andrógenos juegan un importante papel regulador en el sistema cardiovascular, particularmente sobre el tono vasomotor.

Debido a la diversidad de procesos fisiológicos que son regulados por los andrógenos, numerosos estudios clínicos, epidemiológicos y algunos experimentales

han establecido que niveles bajos de andrógenos (deficiencia androgénica) están relacionados con una mayor incidencia de padecimientos asociados con el género, como las enfermedades metabólicas, endocrinas, neurodegenerativas y cardiovasculares (Traish *et al.*, 2009a; Traish *et al.*, 2009b; Traish *et al.*, 2009c). Con respecto a la acción reguladora que los andrógenos pueden ejercer sobre el sistema cardiovascular, cabe resaltar que los efectos que producen han sido controversiales, por lo que actualmente son un tema de creciente investigación.

Algunos estudios epidemiológicos han señalado que los andrógenos son perjudiciales para el sistema cardiovascular masculino, ya que la incidencia de enfermedades cardiovasculares (ECV) es mayor en hombres que en mujeres en edad reproductiva (Wingard *et al.*, 1983; Levy y Kannel, 1988; Farhat *et al.*, 1996; Jousilahti *et al.*, 1999; Ruixing *et al.*, 2008). Asimismo, otros reportes han indicado que los andrógenos anabólicos (como enantato y cipionato de testosterona), solos o combinados con estrógenos, a dosis superiores a las concentraciones fisiológicas de andrógenos (por ejemplo se han administrado 200mg/semana) y/o administrados de forma crónica, disminuyen las concentraciones de lipoproteínas de alta densidad (high density lipoprotein; HDL), aumentan los niveles de triglicéridos, de lipoproteínas de baja densidad (low density lipoprotein; LDL) y la acumulación de grasa abdominal (Haffner *et al.*, 1983; Kantor *et al.*, 1985; Enzi *et al.*, 1990; Rockhold, 1993; Meriggiola *et al.*, 1995; Lovejoy *et al.*, 1996; Sullivan *et al.*, 1998). Debido a que estos efectos están directamente relacionados con el desarrollo de la aterosclerosis y un aumento en el riesgo de sufrir infartos al miocardio, estas evidencias han indicado que los andrógenos tienen efectos perjudiciales para el sistema cardiovascular. Sin embargo, se debe resaltar que varios casos reportados, son de mujeres, hombres y mujeres transexuales, con un claro abuso crónico de los

andrógenos sintéticos, los cuales fueron administrados a concentraciones suprafisiológicas (Schrör *et al.*, 1994; Herman *et al.*, 1997; McCredie *et al.*, 1998; Getov *et al.*, 2008). Por lo tanto, estos reportes no se han considerado como evidencia sólida, que sugiera que los andrógenos endógenos, a concentraciones fisiológicas, sean un factor de riesgo para desarrollar ECV (Wu y von Eckardstein, 2003).

Colateralmente, se ha reportado que en hombres con ECV el tratamiento con testosterona, a dosis fisiológicas, tiene beneficios cardiovasculares (Mårin *et al.*, 1992; Pugh *et al.*, 2003). Por ejemplo, se ha reportado que en hombres con angina de pecho o isquemia la administración crónica y aguda de testosterona disminuye los síntomas (Hamm, 1942; Stigler y Tulgan, 1943; Wu y Weng, 1993; Rosano *et al.*, 1998; Rosano *et al.*, 1999; Webb *et al.*, 1999a; Thompson *et al.*, 2002; Rosano *et al.*, 2005). Del mismo modo, se ha reportado que en hombres con ECV la administración de testosterona, de manera aguda-intravenosa (Ong *et al.*, 2000), crónica-oral (Kang *et al.*, 2002) y crónica-intramuscular (Malkin *et al.*, 2006), tiene beneficios cardiovasculares, ya que se incrementa la reactividad de la arteria subcutánea y la braquial. Asimismo, la administración de testosterona, a dosis fisiológicas, reduce los factores de riesgo cardiovascular, ya que la testosterona disminuye el desarrollo de la aterosclerosis y los niveles de LDL, al mismo tiempo, la testosterona mantiene un nivel adecuado de HDL (Rockhold, 1993; Rosano *et al.*, 1998; Rosano *et al.*, 2005), reduce la presión sanguínea e incrementa el diámetro y el flujo sanguíneo coronario (Rosano *et al.*, 1998; Rosano *et al.*, 1999; Webb *et al.*, 1999b) y; puede mejorar la perfusión cerebral (Azad *et al.*, 2003).

Adicionalmente, se ha observado que hombres con bajos niveles de testosterona tienen un mayor riesgo de padecer diabetes, síndrome metabólico y obesidad, lo que

aumenta el riesgo de desarrollar diversas patologías cardiovasculares, tales como la hipertensión y la arterosclerosis (Khaw y Barrett-Connor, 1991; Phillips *et al.*, 1994; Alexandersen *et al.*, 1996; English *et al.*, 1997; English *et al.*, 2000; Zitzmann *et al.*, 2002; Littleton-Kearney y Hurn, 2004; Nettleship *et al.*, 2009; Traish *et al.*, 2009c).

1.3 Acción de los andrógenos en el tono vasomotor

Entre los efectos cardioprotectores más importantes de la testosterona, se ha considerado su efecto vasodilatador directo sobre la arteria coronaria (Rosano *et al.*, 1999), el cual ha sido observado en diferentes especies animales como: el mono (Adams *et al.*, 1995), el perro (Chou *et al.*, 1995), el cerdo (Crews y Khalil, 1999; Murphy y Khalil, 1999; Quan *et al.*, 1999; Teoh *et al.*, 2000; Deenadayalu *et al.*, 2001) y la rata (English *et al.*, 2001; English *et al.*, 2002).

El efecto vasodilatador de la testosterona, también se ha observado en otros importantes lechos vasculares animales, diferentes a la arteria coronaria, por ejemplo en: la aorta torácica de la rata (Perusquía *et al.*, 1996; Costarella *et al.*, 1996; Honda *et al.*, 1999; Perusquía y Villalón, 1999; Ding y Stallone, 2001; Tepareenan *et al.*, 2003; Unemoto *et al.*, 2007; Montañaño *et al.*, 2008), la aorta torácica y la arteria femoral de conejo (Mosnárová *et al.*, 1994; Yue *et al.*, 1995); las arterias deferentes, cerebral, mesentérica y pulmonar de la rata (Geary *et al.*, 2000; English *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2002; Tepareenan *et al.*, 2002; Lafayette *et al.*, 2008; Rowell *et al.*, 2009) y; las arterias prostáticas de cerdo (Navarro-Dorado *et al.*, 2008).

Los numerosos trabajos que han estudiado el efecto vasodilatador inducido por la testosterona en varios lechos vasculares de animales experimentales, indican que induce un importante efecto vasodilatador, el cual también se presenta en vasos sanguíneos humanos, tales como las arterias: subcutánea (Malkin *et al.*, 2006),

cavernosa (Waldkirch *et al.*, 2008), radial (Seyrek *et al.*, 2007), mamaria interna (Yildiz *et al.*, 2005), pulmonar (Smith *et al.*, 2008; Rowell *et al.*, 2009), y umbilical humana (Fausett *et al.*, 1999; Perusquía *et al.*, 2007; Cairraö *et al.*, 2008) y; la vena espermática (Irkilata *et al.*, 2008).

Aunque son menos estudiados, otros andrógenos también son capaces de disminuir el tono vascular; por ejemplo, se ha demostrado que el primer andrógeno, la dehidroepiandrosterona (DHEA), induce un efecto vasodilatador en la arteria pulmonar del hurón (Farrukh *et al.*, 1998), la aorta torácica de la rata (Gupte *et al.*, 2002) y la arteria umbilical humana (Perusquía *et al.*, 2007). Igualmente, se ha observado que el sulfato de DHEA inhibe el tono de la arteria caudal de rata (Barbagallo *et al.*, 1995) y la arteria oftálmica humana (Hata *et al.*, 1995). Por su parte, los dihidrometabolitos (5α -DHT y 5β -DHT) y tetrahidroderivados de la testosterona (androstandiol, androsterona, eticolanolona, epieticolanolona y epiandrosterona) son capaces de inducir un importante efecto vasodilatador en la aorta torácica de rata (Perusquía *et al.*, 1996; Perusquía y Villalón, 1999; Ding y Stallone, 2001; Montañó *et al.*, 2008), la arteria coronaria de conejo (Yue *et al.*, 1995) y la arteria umbilical humana (Perusquía *et al.*, 2007). Se ha reportado que 5α -DHT tiene un efecto vasodilatador en las arterias coronarias (Deenadayalu *et al.*, 2001) y prostáticas de cerdo (Navarro-Dorado *et al.*, 2008) y; en la arteria carvenosa humana (Waldkirch *et al.*, 2008). También, varios análogos de la testosterona (3α -hidroxi- 5α -androst-16-ene, 17β -hidroxi- 5α -androst-1-ene-3-ona, el enantato de testosterona y el hemisuccinato de testosterona) relajan la coronaria de conejo (Yue *et al.*, 1995) y la aorta torácica de la rata (Ding y Stallone, 2001).

1.4 Eficacia y potencia vasodilatadora de los andrógenos

Existen pocos estudios que se han enfocado a evaluar, de forma comparativa, el efecto vasodilatador de varios andrógenos en diferentes vasos sanguíneos y/o en diferentes condiciones experimentales (ver Tabla 1). Teniendo en cuenta que se ha caracterizado un importante efecto vasodilatador inducido por 17β -estradiol (revisado por Dubey y Jackson, 2001), en forma notable, algunos estudios comparativos han mostrado que el esteroide sexual femenino, 17β -estradiol, es menos efectivo que la testosterona para relajar la aorta torácica (Perusquía y Villalón, 1999) y las arterias coronaria y pulmonar de la rata (English *et al.*, 2001). También, se ha reportado que la testosterona tiene una potencia vasodilatadora mayor que la progesterona (otro importante esteroide femenino) en la aorta torácica (Perusquía y Villalón, 1999) y la arteria coronaria de la rata (English *et al.*, 2001) y; en la arteria umbilical humana (Perusquía *et al.*, 2007). Así, estos datos atribuyen a la testosterona un mayor efecto relajante que el que inducen los esteroides sexuales femeninos.

De manera interesante, como se muestra en la Tabla 1, el 5β -dihidrometabolito de la testosterona, 5β -DHT, también ha resultado ser un vasodilatador más potente que el 17β -estradiol y la progesterona en la aorta torácica de rata (Perusquía *et al.*, 1996; Perusquía y Villalón, 1999) y en la arteria umbilical humana (Perusquía *et al.*, 2007); asimismo, 5β -DHT es más potente para disminuir las corrientes de calcio en miocitos aislados en fresco de la aorta torácica de la rata (Montaño *et al.*, 2008). También, es importante remarcar que 5β -DHT ha resultado ser, en forma consistente, más potente que sus precursores (DHEA y testosterona), su isómero (5α -DHT) y los tetrahidroderivados de la testosterona (androsterona y androstandiol)

para relajar la arteria umbilical humana (Perusquía *et al.*, 2007) y la aorta torácica de rata (Perusquía *et al.*, 1996).

Asimismo, en la Tabla 1 se muestra que el 5 α -dihidrometabolito de la testosterona 5 α -DHT, es menos potente en comparación con la testosterona para relajar varios lechos vasculares (Deenadayalu *et al.*, 2001; Ding y Stallone, 2001; Perusquía *et al.*, 2007); por ejemplo, de acuerdo a la concentración inhibitoria media (CI₅₀; concentración a la que se produce el 50% de inhibición del tono), 5 α -DHT (CI₅₀=188 μ M) fue menos potente que la testosterona (CI₅₀=40.20 μ M) para relajar preparaciones con y sin endotelio de la aorta torácica de rata (Ding y Stallone, 2001); igualmente, la potencia de 5 α -DHT (CI₅₀>1.0 mM) fue muy inferior a la de testosterona (CI₅₀=161.8 μ M) para relajar la arteria umbilical humana (Perusquía *et al.*, 2007). También, 5 α -DHT ha mostrado menor eficacia que la testosterona para relajar la arteria coronaria de cerdo (Deenadayalu *et al.*, 2001) y la arteria umbilical humana (Perusquía *et al.*, 2007). Sin embargo, algunos estudios han reportado que la potencia de 5 α -DHT es igual a la de testosterona en la arteria prostática de cerdo (Navarro-Dorado *et al.*, 2008) y en la arteria cavernosa humana (Waldkirch *et al.*, 2008); algunas observaciones incluso señalan que la potencia de 5 α -DHT puede ser mayor que la de testosterona en la aorta torácica de rata (Perusquía *et al.*, 1996); pero en general, los reportes señalan que en contraste con 5 β -DHT, su isómero 5 α -DHT induce un tenue efecto relajante.

Los resultados discordantes, en cuanto al orden de potencia entre la testosterona, su metabolito 5 α -DHT y otros esteroides, se pueden atribuir a las diferentes variables que hay entre las investigaciones; de manera más específica, se puede considerar: la especie seleccionada, la concentración a la que se prueban los esteroides, los diferentes lechos vasculares, la manera de usar las preparaciones

(anillos o tiras), así como los agentes y las concentraciones utilizadas para inducir las contracciones. Así, estos factores podrían influir en la diferente sensibilidad de los vasos sanguíneos al efecto vasodilatador de los diferentes andrógenos, lo cual hasta el momento hace difícil el análisis de la acción vasodilatadora de la testosterona y sus metabolitos en el músculo liso vascular.

De los datos disponibles, es importante destacar que en los diferentes trabajos varía el agente vasoconstrictor y la concentración a la que fue utilizado, quedando de manifiesto que la eficacia y la potencia de los andrógenos varían en contracciones inducidas con diferentes vasoconstrictores (ver Tabla 1). A este respecto, se ha reportado que en anillos de aorta torácica de rata la testosterona fue más potente para relajar que 5α -DHT cuando se precontracturó con fenilefrina (Phe) (Ding y Stallone, 2001); pero cuando se utilizó noradrenalina (NA) para precontracturar, este resultado fue inverso (Perusquía *et al.*, 1996). De manera similar, en la aorta torácica de rata se observó que sobre la contracción inducida por cloruro de potasio (KCl), 5β -DHT fue 3 veces más potente para inducir relajación que la testosterona, mientras que sobre la contracción inducida por NA la potencia de 5β -DHT se vio disminuida (Montaño *et al.*, 2008). También, en la arteria coronaria de cerdo (Deenadayalu *et al.*, 2001) y la arteria mamaria interna de humano (Yildiz *et al.*, 2005) se observó que la eficacia de la testosterona fue mayor sobre la contracción inducida por prostaglandina $F_{2\alpha}$ ($PGF_{2\alpha}$) que sobre la contracción inducida por KCl. Asimismo, recientemente se reportó que el efecto vasodilatador de la testosterona, DHEA, 5α -DHT y 5β -DHT; fue significativamente mayor sobre la contracción inducida por KCl que sobre la inducida con serotonina (5-HT) en la arteria umbilical humana (Perusquía *et al.*, 2007).

Tabla 1. Comparación entre la potencia vasodilatadora de los andrógenos y otros esteroides en lechos vasculares de diferentes especies

Especie	Agente vasoconstrictor (concentración)	Orden de potencia	Referencia
<u>Conejo:</u>			
Arteria Coronaria	PGF _{2α} (3 μM)	TES = epitiocolanolona = epiandrosterona > 17β-hidroxi-5α-androst-1-ene-3-ona > 3α-hidroxi-5α-androst-16-ene > enantato de TES	Yue <i>et al.</i> , 1995
<u>Rata:</u>			
Aorta Torácica	NA (0.3 μM)	5β-DHT > 5α-DHT > TES > P	Perusquía <i>et al.</i> , 1996
	NA (0.3 μM)	5β-DHT > 17β-estradiol	Perusquía y Villalón, 1999
	KCl (60 mM)	5β-DHT > 17β-estradiol	Perusquía y Villalón, 1999
	Phe (1 μM)	THS-BSA > TES > androsterona = THS = eticolanolona > 5α-DHT >> enantato de TES	Ding y Stallone, 2001
	NA (0.3 μM)	5β-DHT = TES	Montaño <i>et al.</i> , 2008
	KCl (60 mM)	5β-DHT >>> TES	Montaño <i>et al.</i> , 2008
Arteria Coronaria	PGF _{2α} (100 μM)	TES > P > 17β-estradiol > cortisol	English <i>et al.</i> , 2001
Arteria Pulmonar	PGF _{2α} (100 μM)	P > TES > cortisol > 17β-estradiol	English <i>et al.</i> , 2001
<u>Cerdo:</u>			
Arteria Coronaria	PGF _{2α} (10 μM)	TES > 5α-DHT	Deenadayalu, 2001
Arterias Prostáticas	NA (1 μM)	TES = 5α-DHT	Navarro-Dorado <i>et al.</i> , 2008
<u>Humano:</u>			
Arteria Caverosa	NA (1 μM)	TES = 5α-DHT	Waldkirch <i>et al.</i> , 2007
Arteria Umbilical	KCl (40 mM)	5β-DHT > androsterona = DHEA > TES > P >> 5β-pregnandiona > 5α-DHT = androstandiol	Perusquía <i>et al.</i> , 2007
	5-HT (10 μM)	5β-DHT = DHEA > TES > P > 5β-pregnandiona > 5α-DHT	Perusquía <i>et al.</i> , 2007

TES (testosterona), P (progesterona), 5α-DHT (5α-dihidrotestosterona), 5β-DHT (5β-dihidrotestosterona), THS (hemisuccinato de TES), THS-BSA (hemisuccinato de TES conjugado con albumina de suero bovino), DHEA (dehidroepiandrosterona), PGF_{2α} (prostaglandina F_{2α}), NA (noradrenalina), Phe (fenilefrina), cloruro de potasio (KCl) y serotonina (5-HT).

Se ha considerado que la variación en la sensibilidad de las contracciones, inducidas por diferentes agentes vasoconstrictores, al efecto vasodilatador de los andrógenos podría ser debida, en parte, al diferente mecanismo de acción de cada agente vasoconstrictor para inducir la contracción, así como al mecanismo de la acción vasodilatadora de cada andrógeno (Jones *et al.*, 2003b; Yildiz y Seyrek, 2007).

En relación a lo anterior, sólo un par de trabajos han investigado el efecto vasodilatador de la testosterona en diferentes vasos sanguíneos de la misma especie (English *et al.*, 2001; Rowell *et al.*, 2009). Utilizando vasos de rata contraídos con $\text{PGF}_{2\alpha}$ (100 μM), English y colaboradores (2001) mostraron que la arteria coronaria fue más sensible que la arteria pulmonar al efecto vasodilatador inducido por la testosterona a concentraciones superiores a las fisiológicas (1-1000 μM). De manera similar, Rowell y colaboradores (2009) estudiaron la sensibilidad de diferentes vasos pulmonares humanos despolarizados con KCl (1-100 mM). Este trabajo mostró que hubo una mayor sensibilidad al efecto vasodilatador inducido por la testosterona a concentraciones suprafisiológicas (30 ó 100 μM) en: (i) las arterias pulmonares de resistencia vs. las arterias pulmonares de conductancia; (ii) las arterias pulmonares de hombres vs. las arterias pulmonares de mujeres y (iii) las arterias pulmonares con endotelio intacto vs. las arterias pulmonares con el endotelio dañado. Además, en este mismo trabajo no se observaron diferencias en la sensibilidad al efecto vasodilatador inducido por la testosterona (1 nM-100 μM) entre: (i) las arterias pulmonares de resistencia vs. las venas pulmonares de resistencias y (ii) las arterias pulmonares de conductancia vs. las venas pulmonares de conductancia. Cabe resaltar que estas dos investigaciones (English *et al.*, 2001; Rowell *et al.*, 2009) aportan evidencias valiosas de que los diferentes vasos

sanguíneos podrían presentar diferente sensibilidad al efecto vasodilatador inducido por los andrógenos.

Además de lo anterior, varios trabajos han propuesto que la potencia y la eficacia vasodilatadora de cada andrógeno podría obedecer, además, a su estructura química (Yue *et al.*, 1995; Perusquía *et al.*, 1996; Perusquía y Villalón, 1999; Perusquía, 2003; Perusquía *et al.*, 2007; Montañó *et al.*, 2008). Por lo tanto, se debe considerar que la variación en la potencia y eficacia vasodilatadora de los andrógenos, también podría estar determinada por la diferente estructura química de cada andrógeno para actuar en diferentes sitios de acción.

1.5 Mecanismo de acción del efecto vasodilatador de andrógenos

En años recientes, el mecanismo de la acción vasodilatadora de los andrógenos, especialmente de la testosterona, ha sido vigorosamente estudiado. Los estudios funcionales en vasos sanguíneos aislados han reportado que la vasodilatación inducida por los andrógenos se manifiesta rápidamente después de la adición de estos (~2 min) y es reversible; esto ha sugerido que el efecto vasodilatador inducido por los andrógenos es de tipo no genómico (Yue *et al.*, 1995; Perusquía *et al.*, 1996; Chou *et al.*, 1996; Perusquía y Villalón, 1999; Ding y Stallone, 2001; Montañó *et al.*, 2008); es decir, es independiente del receptor intracelular de andrógenos (RA), a la expresión de genes y de la síntesis de proteínas, procesos que requieren al menos ~40 min (Heinlein y Chang, 2002). Varias investigaciones han establecido que el efecto vasodilatador inducido por la testosterona no requiere del RA intracelular, ya que la vasodilatación inducida por los andrógenos no se modifica en presencia de flutamida (antagonista del RA intracelular) en: la coronaria de conejo (Yue *et al.*, 1995); las arterias pulmonares (Jones *et al.*, 2002) y la aorta torácica de rata (Tep-

areenan *et al.*, 2003); la arteria coronaria (Teoh *et al.*, 2000) y prostática de cerdo (Navarro-Dorado *et al.*, 2008) y; la arteria umbilical humana (Perusquía *et al.*, 2007).

Aunado a lo anterior, también se ha mostrado que el dihidrometabolito 5 β -reducido de la testosterona y algunos análogos (17 β -hidroxi-5 α -androst-1-ene-3-ona, 3 α -hidroxi-5 α -androst-16-ene y enantato de testosterona), que no se unen al RA intracelular y por ende no inducen efectos genómicos, son capaces de inhibir el tono de la arteria coronaria de conejo (Yue *et al.*, 1995), la aorta torácica de rata (Yue *et al.*, 1995; Perusquía *et al.*, 1996; Perusquía y Villalón, 1999; Ding y Stallone, 2001; Montaña *et al.*, 2008) y la arteria umbilical humana (Perusquía *et al.*, 2007). Otros hallazgos que apoyan que el efecto vasodilatador de los andrógenos es independiente del RA intracelular, es el hecho de que el análogo de la testosterona, hemisuccinato de testosterona unido a albúmina de suero bovino, forma un complejo incapaz de atravesar la membrana celular y de entrar al citoplasma para unirse al RA intracelular; sin embargo, este complejo fue capaz de inducir un efecto vasodilatador mayor que la testosterona en la aorta torácica de rata (Ding y Stallone, 2001). Colateralmente, se ha reportado que el efecto vasodilatador inducido por la testosterona es producido en vasos de ratones con mutación testicular para feminizarlos (Testicular feminised mouse; Tfm), los cuales carecen de un RA funcional (Jones *et al.*, 2003c).

Con las contundentes evidencias que se han señalado, se ha establecido categóricamente que el efecto vasodilatador de los andrógenos es de tipo no genómico, es decir, independiente del la unión al RA intracelular. Sin embargo, queda por explicar cuál sería el mecanismo que los andrógenos utilizan para producir la acción vasodilatadora; así, a continuación se mencionan los posibles mecanismos de la acción vasodilatadora de los andrógenos que han sido sugeridos.

a) *Participación del endotelio vascular en la acción vasodilatadora de andrógenos*

Numerosos trabajos han investigado si la vasodilatación producida por los andrógenos puede ser a través de inducir la liberación de factores vasodilatadores derivados del endotelio vascular, como óxido nítrico (NO) y la prostaglandina I₂ (PGI₂). En estos trabajos se ha evaluado el efecto vasodilatador de la testosterona en presencia de: (i) L-NAME (N^w-nitro-L-arginina metil ester), un inhibidor de la óxido nítrico sintetasa (NOS), enzima que sintetiza NO y/o; (ii) indometacina, un inhibidor de la ciclooxigenasa (COX), enzima que sintetiza PGI₂.

Algunos trabajos han reportado que el L-NAME y la indometacina disminuyen el efecto vasodilatador de la testosterona (10 pM-10 μM) en la arteria coronaria de perro (Chou *et al.*, 1996) y las arterias mesentéricas de rata (Tep-areenan *et al.*, 2002). En forma colateral, se ha observado que la eficacia vasodilatadora de la testosterona (10 pM-300 μM) disminuye cuando se elimina la capa de endotelio vascular en la aorta torácica (Ding y Stallone, 2001) y las arterias mesentéricas de rata (Tep-areenan *et al.*, 2002). En conjunto, estas evidencias indican que el efecto vasodilatador inducido por la testosterona (en el rango de 10 pM-300 μM) podría ser, parcialmente, a través de inducir la liberación de factores relajantes del endotelio, principalmente NO.

Sin embargo, de forma controversial, existe una gran cantidad de evidencias que indican que la vasodilatación inducida por la testosterona (en el rango de 10-300 μM) no requiere la liberación de los factores relajantes del endotelio, ya que no se modifica: (i) en presencia de indometacina en la arteria coronaria de conejo (Yue *et al.*, 1995), la aorta torácica (Honda *et al.*, 1999) y las arterias pulmonares de rata (Jones *et al.*, 2002); las arterias protáticas de cerdo (Navarro-Dorado *et al.*, 2008) y la arteria radial humana (Seyrek *et al.*, 2007) y; (ii) en presencia de L-NAME en la

arteria coronaria de conejo (Yue *et al.*, 1995) y de cerdo (Deenadayalu *et al.*, 2001); la aorta torácica (Honda *et al.*, 1999) y las arterias pulmonares de rata (Jones *et al.*, 2002); las arterias prostáticas de cerdo (Navarro-Dorado *et al.*, 2008) y; la arteria radial (Seyrek *et al.*, 2007) y umbilical humana (Perusquía *et al.*, 2007).

Además, varios trabajos han descartado que la vasodilatación inducida por la testosterona (0.1-1000 μM) sea a través del guanosín monofosfato cíclico (cGMP); un segundo mensajero que induce vasodilatación y puede sintetizarse en las células del músculo liso, como resultado de la acción del NO sobre la enzima guanilato ciclasa soluble (Yue *et al.*, 1995; Honda *et al.*, 1999; Jones *et al.*, 2002). Complementando que la testosterona actúa de forma independiente al endotelio vascular, varios trabajos han demostrado que la vasodilatación inducida por los andrógenos (0.1-300 μM) se preserva en vasos donde la capa endotelial fue eliminada (Yue *et al.*, 1995; Perusquía *et al.*, 1996; Crews y Khalil, 1999; Honda *et al.*, 1999; Murphy y Khalil, 1999; Perusquía y Villalón, 1999; Deenadayalu *et al.*, 2001; Seyrek *et al.*, 2007; Navarro-Dorado *et al.*, 2008); estos hechos sugieren que el endotelio vascular no participa en el efecto vasodilatador de los andrógenos.

Con base al análisis de los hallazgos existentes, se puede concluir que el efecto vasodilatador de la testosterona es parcialmente dependiente del endotelio a concentraciones menores al rango micromolar (10 pM-100 nM), mientras a concentraciones micromolares (0.1-300 μM), es claramente independiente del endotelio.

b) Participación de los canales iónicos en la acción vasodilatadora de andrógenos

Estudios en vasos sanguíneos han indicado que el mecanismo de la acción vasodilatadora de los andrógenos es directa sobre la membrana de las células de

músculo liso: (i) activando los canales de K^+ : sensibles a ATP (K_{ATP}), de gran conductancia activados por Ca^{2+} (BK_{Ca}) y sensibles al voltaje (K_V) (Yue *et al.*, 1995; Chou *et al.*, 1996; Honda *et al.*, 1999; Deenadayalu *et al.*, 2001; Ding y Stallone, 2001; Tep-areenan *et al.*, 2002); y/o (ii) bloqueando los canales de Ca^{2+} operados por voltaje (CCOV), operados por receptor (CCOR) (Crews y Khalil, 1999; Murphy y Khalil, 1999; Perusquía y Villalón, 1999; Jones *et al.*, 2002; English *et al.*, 2002) y operados por reservas (siglas en inglés: SOCC) (English *et al.*, 2002; Jones *et al.*, 2003c).

Estudios recientes, midiendo las corrientes iónicas mediante la técnica electofisiológica de *patch-clam*, han confirmado que los andrógenos son capaces de activar los canales de K^+ (Deenadayalu *et al.*, 2001) y/o bloquear los canales de Ca^{2+} (Scragg *et al.*, 2004; Hall *et al.*, 2006; Scragg *et al.*, 2007; Montañaño *et al.*, 2008). Estos estudios han demostrado que la testosterona a 200 nM activa los canales BK_{Ca} de células aisladas de la arteria coronaria de cerdo (Deenadayalu *et al.*, 2001). Además, la testosterona (1 pM-10 μ M) es capaz de inhibir las corrientes de Ca^{2+} tipo L y tipo T, en las líneas celulares: (i) de músculo liso vascular, A7r5 y; (ii) de riñón de embrión humano, HEK293 (Scragg *et al.*, 2004; Hall *et al.*, 2006; Scragg *et al.*, 2007). En estos estudios, de acuerdo a la concentración inhibitoria media (CI_{50} ; concentración a la que se produce el 50% de inhibición de las corrientes iónicas), la testosterona, a concentraciones fisiológicas ($CI_{50}=34$ nM), fue más potente que nifedipina ($CI_{50}=55$ nM) para inhibir las corrientes de Ca^{2+} tipo L, un conocido inhibidor de las corrientes de Ca^{2+} tipo L. Scragg y colaboradores (2007) han demostrado que los metabolitos inmediatos de la testosterona, 17β -estradiol y 5α -DHT, carecen de la habilidad para inhibir las corrientes de Ca^{2+} tipo L, a la misma concentración que la testosterona (10 μ M). En marcado contraste, el metabolito de la

testosterona 5 β -DHT, a concentraciones fisiológicas (1-100 nM), resultó capaz de inhibir las corrientes de Ca²⁺ tipo L en la línea celular de músculo liso vascular A7r5, pero su potencia fue menor que la de testosterona para inhibir dichas corrientes (Hall *et al.*, 2006). Respecto al mecanismo de la testosterona, para inhibir las corrientes de Ca²⁺ tipo L, se ha demostrado que es por su unión al mismo sitio que las dihidropiridinas, la región S5 del dominio III del canal de Ca²⁺ tipo L (Scragg *et al.*, 2004; Scragg *et al.*, 2007).

Recientemente, resultados similares fueron observados por Montaña y colaboradores (2008). Utilizando células de músculo liso vascular aisladas en fresco de la aorta torácica de rata, se observó que la testosterona (CI₅₀=150 nM) fue más potente que nifedipina (CI₅₀=450 nM), 5 β -DHT (CI₅₀=1.89 μ M) y 17 β -estradiol (CI₅₀=3.70 μ M) para inhibir las corrientes de Ca²⁺ tipo L. En este trabajo, se confirmó la habilidad de la testosterona para inhibir las corrientes de Ca²⁺ tipo L a concentraciones fisiológicas y cercanas (30-300 nM), la cual fue revertida a concentraciones micromolares (3.2-32 μ M), es decir, a concentraciones farmacológicas, la testosterona fue capaz de activar los canales de Ca²⁺ tipo L, aumentando el influjo de Ca²⁺ extracelular y observándose también un aumento en la concentración de Ca²⁺ citosólico.

Con base a la información actual, existen evidencias sólidas (tanto en vasos aislados como en células) de que el mecanismo de la acción vasodilatadora de los andrógenos a concentraciones fisiológicas podría ser a través de bloquear los canales Ca²⁺ tipo L. Sin embargo, a concentraciones suprafisiológicas (>100 nM) el efecto relajante de la testosterona podría ser a través de activar los canales de K⁺.

c) *Vías de señalización interna involucradas en la acción vasodilatadora de andrógenos*

La variabilidad en la eficacia y potencia de los andrógenos cuando han sido evaluados en diferentes vasos sanguíneos o en diferentes condiciones experimentales, también ha llevado a especular sobre potenciales mecanismos de acción de los andrógenos, relacionados con la activación de cascadas de señalización de segundos mensajeros, independientes del RA. A este respecto, se ha investigado si el efecto vasodilatador inducido por los andrógenos pudiera ser a través de incrementar nucleótidos cíclicos, como el cGMP y el adenín monofosfato cíclico (cAMP); ya que se ha demostrado que estos nucleótidos están implicados en la modulación de la vasodilatación en varios vasos sanguíneos, como la arteria coronaria de cerdo (Lillestill *et al.*, 1998), la arteria cavernosa (Waldkirch *et al.*, 2005) y la pulmonar humana (Rabe *et al.*, 1994). En este sentido, se ha reportado que la testosterona a 200 nM incrementa la producción intracelular del cGMP en músculo liso de la arteria coronaria de cerdo (Deenadayalu *et al.*, 2001); y a 120 μ M incrementa el cAMP en músculo liso de aorta torácica de rata (Montaño *et al.*, 2008).

El cGMP y el cAMP pueden regular la vasodilatación a través de mecanismos comunes (Wang y Robinson, 1997); por ejemplo, el cGMP y el cAMP pueden activar proteínas cinasas (PKG y PKA, respectivamente), que fosforilan a la fosfolamba, una proteína que al ser fosforilada, deja de inhibir a la ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (RS), lo que lleva a una reducción de los niveles de Ca^{2+} intracelular e induce vasodilatación (Raeymaekers *et al.*, 1988). En este contexto, el trabajo de Montaño y colaboradores (2008), mostró que la testosterona, a concentraciones micromolares, incrementa el cAMP intracelular en el músculo liso de la aorta torácica de rata; sin embargo, ellos también observaron que la inhibición de la PKA no

modificó la vasodilatación inducida por la testosterona, por lo que descartaron que el mecanismo fuera dependiente de PKA.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Recientemente se ha considerado que los esteroides sexuales masculinos, los andrógenos, son importantes compuestos vasoactivos, ya que son capaces de inducir un importante efecto vasodilatador en varios vasos sanguíneos de diferentes especies animales, incluyendo al humano. Sin embargo, de forma controversial, se ha observado que el efecto vasodilatador del principal andrógeno, la testosterona, es diferente en cada vaso estudiado.

Respecto al mecanismo de la acción vasodilatadora de los andrógenos, se ha documentado que el efecto es independiente de la vía genómica. Sin embargo, actualmente no es claro si el endotelio participa en el efecto vasodilatador inducido por los andrógenos. Algunos reportes muestran que la acción vasodilatadora de los andrógenos pudiera ser directa sobre las células de músculo liso y, por lo tanto, independiente de la función endotelial; en contraste, otras evidencias han indicado que la vasodilatación pudiera ser indirecta, es decir, a través de vasodilatadores producidos en el endotelio vascular. Por lo anterior, el papel que el endotelio juega en la vasodilatación inducida por los andrógenos ha resultado controversial.

Las controversias señaladas podrían ser causadas por: (i) la variedad de especies, (ii) la diversidad de esteroides probados, (iii) los diferentes agentes vasoconstrictores empleados para la experimentación y/o (iv) la distinta naturaleza de cada uno de los vasos sanguíneos estudiados.

Con base a que no existen datos disponibles concernientes a las respuestas vasodilatadoras inducidas por andrógenos sobre diferentes vasos sanguíneos de la misma especie, el presente estudio consistió en: (i) examinar, de manera comparativa, la capacidad vasodilatadora de diferentes andrógenos: la testosterona

y sus metabolitos 5α -DHT y 5β -DHT, sobre el tono vasomotor inducido por solución despolarizante (KCl 60 mM) en tres lechos vasculares de fundamental importancia fisiológica: las arterias coronaria izquierda y femoral (vasos de conductancia) y la vena safena (vaso de capacitancia) de la misma especie (perro); (ii) analizar la participación del endotelio vascular en la acción vasodilatadora de los distintos andrógenos; y (iii) analizar la posible relación entre la estructura química y la potencia vasodilatadora de los andrógenos de estudio .

3. HIPÓTESIS

Se espera encontrar variación en la sensibilidad de diferentes lechos vasculares de la misma especie a la acción vasodilatadora ejercida por varios andrógenos. Además, como ha sido reportado en varias especies, también se determinará si los andrógenos son capaces de producir una acción vasodilatadora independiente del endotelio en cada vaso sanguíneo.

4. OBJETIVOS

General:

Determinar la acción y eficacia vasodilatadora de la testosterona y sus dihidroderivados, 5 α - y 5 β -dihidrotestosterona, sobre el tono vascular inducido por KCl (60 mM) en la arteria coronaria izquierda, la arteria femoral y la vena safena del perro macho adulto.

Particulares:

1. Construir las curvas concentración-respuesta del potencial efecto vasodilatador de los andrógenos de prueba sobre la contracción producida por KCl en cada uno de los lechos vasculares, determinando la potencia (concentración inhibitoria media; CI_{50}) y la eficacia (relajación máxima; $R_{m\acute{a}x}$).
2. En preparaciones con y sin endotelio de los diferentes vasos sanguíneos, evaluar la participación de la función endotelial en el efecto vasodilatador de cada andrógeno.
3. Analizar la posible relación estructura química-efecto vasodilatador del grupo de andrógenos de estudio.

5. METODOLOGÍA

5.1 *Modelo biológico*

La presente investigación fue realizada con perros mestizos obtenidos de la Sección de Enseñanza Quirúrgica de la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia (FMVZ, UNAM), los cuales fueron tratados de acuerdo a la norma mexicana NOM-062-ZOO-1999 y a la “Guide for the care and laboratory animal use” elaborada por la “Commission Life Sciences”, U.S.A.

Los perros recibidos en la FMVZ fueron mantenidos en cuarentena, con alimento Pedrigee® y agua *ad libitum*. Los animales utilizados en este estudio fueron perros machos, adultos con un peso entre 15-30 Kg y libres de parásitos e infecciones

5.2 *Disección de los vasos sanguíneos*

Los perros fueron sacrificados con pentobarbital sódico a una dosis de 150 mg/Kg, inmediatamente se procedió a rasurar las áreas de incisión para diseccionar los lechos vasculares de estudio (la arteria coronaria izquierda, la arteria femoral y la vena safena).

Arteria Coronaria Izquierda. El corazón fue extraído mediante toracotomía izquierda, y se depletó rápidamente de contenido de sangre por gravedad, después fue colocado en solución fisiológica de bajo calcio a 4°C. Para diseccionar la arteria coronaria izquierda, se separó el tronco pulmonar de la aorta ascendente y se localizó el seno aórtico izquierdo, después se retiró el tejido adiposo que cubre a la arteria hasta la rama interventricular subsinusoide. Finalmente se ligaron los extremos de la arteria y se cortó un segmento de la arteria coronaria izquierda de aproximadamente 4 cm.

Arteria Femoral. Se realizó una incisión longitudinal sobre el triangulo femoral de la cara medial del muslo, entre los músculos sartorio y gracilis del miembro pelviano, cuidadosamente la arteria femoral (aproximadamente 4 cm) se separó del tejido conjuntivo que la une a la vena y al nervio femoral. Las ramificaciones y los extremos de la arteria femoral se ligaron para evitar el sangrado al cortar el segmento de arteria.

Vena Safena. Se realizó una incisión sobre el músculo gastrocnemio de la pierna, por la vista lateral, siguiendo el curso subcutáneo de la vena. Rápidamente se retiró el tejido conjuntivo que une a la vena con la piel y el gastrocnemio, el segmento de vena disecado (aproximadamente 4 cm) fue ligado en sus extremos.

Inmediatamente después de la disección de cada vaso sanguíneo, estos fueron colocados en una caja de Petri que contenía solución Ringer de bajo calcio (4°C) con la siguiente composición (mM): NaCl (110), KCl (5), CaCl₂ (0.16), MgCl₂ (2), Hepes (12), NaHCO₃ (10), KH₂PO₄ (0.5), NaH₂PO₄ (0.5), Glucosa (10), EDTA (0.49) y Taurina (10).

La sangre contenida en los vasos sanguíneos fue depletada por gravedad, eliminando la sangre remanente mediante varios recambios del mismo Ringer. Con ayuda de material de microcirugía, los vasos sanguíneos fueron limpiados cuidadosamente de los tejidos adyacentes (conectivo y adiposo). Finalmente, todas las muestras se colectaron en viales, con Ringer de bajo calcio, para su transporte al laboratorio donde fueron almacenados en refrigeración a una temperatura de 4°C durante 24 y 48 horas antes de iniciar el registro.

5.3 Preparación y montaje de las muestras vasculares

Las muestras de los diferentes vasos sanguíneos disecados se colocaron en una caja de Petri de doble pared que contenía solución Ringer Krebs-Henseleit con la siguiente composición (mM): NaHCO₃ (24.9), NaCl (119.5), KCl (4.74), KH₂PO₄ (1.18), MgSO₄ (1.18) y Glucosa (12). La temperatura de esta solución fue mantenida a 37°C mediante un baño recirculador de agua (Haake, D1); el pH de la solución se estabilizó a 7.4 por burbujeo constante con una mezcla de gases (5% CO₂/95% O₂). En estas condiciones, cada vaso sanguíneo fue cortado en anillos con una longitud de 0.3 cm.

En este trabajo se utilizaron anillos de las muestras vasculares con y sin endotelio. Para retirar la capa endotelial de las preparaciones, los anillos fueron raspados cuidadosamente realizando movimientos circulares con un cordón trenzado de nylon introducido en el lumen de los anillos. Las preparaciones con endotelio fueron manejadas con extremo cuidado evitando dañar la capa endotelial.

El montaje de las preparaciones vasculares se realizó de la siguiente manera: cada anillo vascular fue colocado en una cámara de incubación con 10 ml de solución Krebs-Henseleit normal a temperatura constante (37°C), mantenida mediante un baño recirculador de agua, y con pH de 7.4, mantenido mediante burbujeo continuo de 95% O₂/5% CO₂. Cada anillo fue suspendido de manera horizontal en la cámara de incubación, utilizando dos ganchos de acero inoxidable en forma de "L", que fueron introducidos a través del lumen de manera contrapuesta. Uno de los ganchos fue fijado a la base de la cámara y el otro gancho se sujetó, con ayuda de un hilo de seda (000), a un transductor de tensión (Grass Instruments, FT03C), el cual detectó las señales mecánicas del tejido y las transformó en señales eléctricas que envió a un polígrafo de cuatro canales (Grass Instruments, modelo

79), el cual registró las señales mecánicas en su graficador. Además, el polígrafo fue acoplado a una computadora (Pentium III de 1.13ª GHz), a través de un convertidor analógico/digital (Astro-Med Inc polyView 2.5, ADM-20002), para capturar las señales en tiempo real (Fig. 3).

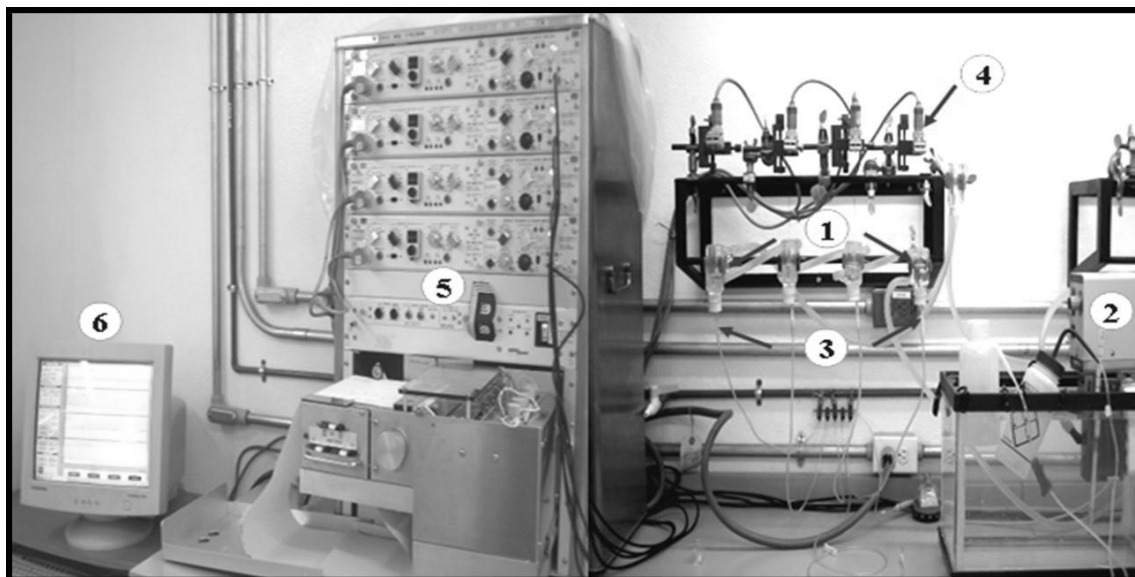


Fig 3. Sistema de registro isométrico para tejido aislado. 1. Cámaras de incubación, 2. Baño recirculador de agua para mantener la temperatura constante a 37°C, 3. Suministro de la mezcla gaseosa 5% CO₂/95% O₂, 4. Transductores de tensión, 5. Polígrafo y 6. Computadora acoplada al polígrafo mediante un convertidor analógico-digital.

5.4 Protocolo experimental

Una vez que los anillos se montaron en el sistema de registro isométrico y se sometieron a una fuerza de tensión de 1 g (10 mN), que se mantuvo durante todo el experimento, se dejó transcurrir un periodo de estabilización (120 min) antes de iniciar cualquier procedimiento experimental.

a) Determinación farmacológica de la presencia o ausencia de endotelio

Después del periodo de estabilización de los anillos, se realizó la determinación farmacológica de la presencia o ausencia del endotelio. Inicialmente, la estandarización de la prueba farmacológica del endotelio, se pretendió hacer de manera comparativa, por lo que se consideró realizar la misma estrategia experimental en los tres vasos estudiados. Dicha estrategia experimental consistió en inducir una contracción con noradrenalina (NA, 0.3 μ M) y, sobre el tono estable de esta contracción, observar la respuesta a acetilcolina (ACh, 20 μ M). La presencia del endotelio en los anillos no raspados sería verificada por la relajación inducida por la ACh (al menos 40% de relajación); mientras que en los anillos raspados, la ausencia de endotelio sería confirmada por el fallo de la ACh para inducir relajación. Sin embargo, este protocolo fue modificado en cada vaso como a continuación se describe.

Arteria Coronaria Izquierda. Debido a que los anillos coronarios tienen una pobre sensibilidad a la NA, la determinación de la presencia o ausencia del endotelio se realizó induciendo una contracción con $\text{PGF}_{2\alpha}$ (1 μ M), la contracción tónica sostenida se registro durante ~20 min antes de adicionar la ACh (por la alta sensibilidad de la coronaria izquierda a la ACh, está se probó a 10 μ M). Los anillos no raspados donde la ACh (10 μ M) produjo una relajación de por lo menos 40%,

fueron considerados preparaciones con endotelio. En los anillos raspados, donde la ACh 10 μ M no modificó el tono de la contracción inducida por PGF_{2 α} , fueron considerados preparaciones sin endotelio.

Arteria Femoral. Los resultados con la prueba inicial con NA (0.3 μ M) y ACh (10 y 20 μ M) no fueron satisfactorios, dado a que la contracción de NA no mantuvo un tono estable y a que la ACh a 10 y 20 μ M produjo un efecto vasoconstrictor en preparaciones sin endotelio. Por lo anterior, se evaluó otra estrategia experimental para determinar la presencia o ausencia del endotelio en esta arteria. Así, los anillos de la arteria femoral fueron contraídos con fenilefrina (Phe) 1 μ M, cuando el tono de la contracción fue estable (~10 min) se adicionó carbacol (CCh) 10 μ M; en los anillos donde CCh produjo una relajación (al menos 40%) fueron considerados preparaciones con endotelio; mientras que en los anillos donde CCh no modificó el tono de la contracción inducida por Phe, fueron considerados preparaciones sin endotelio. Con base en que esta segunda prueba fue repetible, fue utilizada en esta investigación para determinar la presencia o ausencia de endotelio en los anillos de arteria femoral canina.

Vena Safena. De manera similar que en la arteria femoral, en la vena safena, además de realizar la primera prueba con NA (0.3 μ M) y ACh (20 μ M), se realizaron otras pruebas, debido al hecho de que la ACh produjo un incremento del tono en preparaciones donde se raspó el endotelio (raspadas) y donde no fue raspado el endotelio (no raspadas). Así, se realizaron pruebas con ACh (20 y 10 μ M) sobre la contracción inducida con Phe (1 μ M); observándose que sobre esta contracción la ACh a 20 y 10 μ M también incrementó el tono en anillos raspados y no raspados. Por lo tanto, en la vena safena se realizaron otras pruebas con: (i) CCh (0.5, 1 y 10 μ M) sobre la contracción inducida por Phe (1 μ M) y; (ii) ACh (20 y 10 μ M) sobre las

contracciones inducidas por KCl (60 mM), serotonina (5-HT; 10 μ M) y PGF_{2 α} , (1 μ M). En cada una de estas pruebas se observó que la ACh y el CCh, a todas las concentraciones probadas, incrementaron el tono de las contracciones en anillos raspados y no raspados, por lo que estos resultados no permitieron corroborar la presencia o ausencia de endotelio en la vena safena. Colateralmente, estos resultados llevaron a cuestionar la sensibilidad del músculo liso de la vena safena al NO; ya que se sabe que, a través del NO la ACh y el CCh inducen vasorelajación. Por lo tanto se consideró evaluar la sensibilidad del músculo liso de la vena safena al NO. Para este fin, se realizaron pruebas con un donador de NO, nitroprusiato de sodio (NPS), el cual se probó a varias concentraciones (0.001-10 μ M) de manera acumulativa sobre la contracción inducida por Phe (1 μ M) en anillos de vena safena no raspados.

Con base a que no fue posible determinar de manera farmacológica la presencia o ausencia de endotelio en las preparaciones de la vena safena, el protocolo experimental para la prueba de los andrógenos sólo se realizó en preparaciones de vena safena donde el endotelio fue completamente eliminado mediante un delicado raspado (la técnica para eliminar la capa endotelial se corroboró mediante observaciones histológicas).

En la arteria coronaria izquierda y la arteria femoral, al finalizar las pruebas para determinar la presencia o ausencia del endotelio, se retiraron los compuestos mediante un cambio de solución Ringer normal (lavado) y se continuó con el protocolo experimental.

b) Prueba de los andrógenos sobre la contracción inducida por KCl (60 mM) en preparaciones con y sin endotelio de los diferentes vasos sanguíneos caninos

Para continuar con el protocolo experimental en las preparaciones con y sin endotelio de las arterias coronaria izquierda y femoral se dejó pasar un tiempo de recuperación de aproximadamente 20 min. A partir de este punto, todas las preparaciones, incluidas las preparaciones sin endotelio de la vena safena, recibieron el mismo tratamiento experimental.

Los tejidos fueron depolarizados con una solución Ringer de alta concentración de potasio (KCl 60 mM), obtenida por sustitución equimolecular de NaCl 64.7 por KCl 60 mM. Después de 5 min, los tejidos fueron repolarizados mediante un cambio de la solución despolarizante por Ringer Krebs-Henseleit normal y cuando recuperaron su tono basal, se dejó transcurrir 20 min antes de inducir un segundo estímulo con la solución despolarizante (KCl 60 mM), la nueva contracción tónica fue registrada durante 60-90 min y fue considerada como contracción control (100% de contracción). Después de lavar con Ringer normal (repolarización), se esperó un intervalo de 60 min para realizar un tercer estímulo con la misma solución (KCl 60 mM). Una vez que esta contracción mantuvo un tono estable (aproximadamente a los 60 min), se adicionaron los andrógenos de prueba de manera independiente y en forma no acumulativa (cada uno por separado), en el siguiente rango de concentración (cuartos de logaritmo): arteria coronaria izquierda 1.8-100 μ M, arteria femoral y vena safena 18-310 μ M. Los anillos que desplegaron una fuerza de contracción menor a 1 g fueron descartados.

El efecto de cada concentración de los diferentes andrógenos sobre la contracción inducida por KCl (60 mM) se registró durante 30 min, inmediatamente después, los tejidos fueron lavados tres veces con solución Krebs-Henseleit normal

(2 recambios de solución con un intervalo de 10 min cada uno), con el fin de retirar todos los residuos de andrógeno del tejido. Cuando los tejidos regresaron a su tono basal se dejaron reposar durante 60 min, antes de realizar un último estímulo con KCl (60 mM), que se registró durante 60-90 min con el fin de observar la viabilidad y recuperación del tejido (estímulo de recuperación). Además, en las preparaciones de cada vaso estudiado se realizaron las pruebas correspondientes al vehículo (etanol absoluto) en el cual fueron disueltos los andrógenos, a un volumen final de 0.1% v/v.

c) Determinación histológica de la presencia o ausencia de endotelio vascular

Al final de los experimentos, para corroborar mediante la observación histológica la presencia o la ausencia de endotelio vascular, algunas preparaciones con y sin endotelio fueron fijadas en paraformaldehído al 4%. Posteriormente, los tejidos se deshidrataron con etanol al 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100% durante 30 min (para cada concentración de etanol) y con Xilol (60 min), para su impregnación (60 min) e inclusión (60 min) en parafina. Con ayuda de un microtomo (*American Optical*), se realizaron cortes (10 μ m de grosor) de los tejidos incluidos en parafina y se montaron en portaobjetos. Posteriormente, para desparafinar los tejidos fijados en los portaobjetos, se dejaron reposar nuevamente en xilol (15 min), etanol al 70, 96 y 100% (5 min por concentración) y agua destilada (dos min). Finalmente, los cortes fueron teñidos con la técnica convencional de hematoxilina-eosina. Mediante un microscopio de luz convencional (40X), se observó y determinó la presencia o ausencia de la monocapa endotelial, cotejando con la determinación farmacológica la presencia o ausencia del endotelio realizada al inicio del experimento.

5.5 Evaluación y análisis estadístico de los datos

En cada lecho vascular estudiado, el efecto vasodilatador inducido por cada una de las concentraciones de los andrógenos se evaluó durante 30 min, en términos de porcentaje de inhibición (% de relajación) de la contracción inducida con KCl (60 mM). El 100% de la amplitud de la contracción (control) fue considerado justo antes de adicionar el andrógeno y comparado con la amplitud de la contracción 30 min después de la adición del andrógeno (efecto). Todos los datos representan la media de $n=6 \pm$ error estándar de la media (E.E.M.), donde cada “n” representa a un perro. Con los datos obtenidos se construyeron las curvas concentración-respuesta de los andrógenos.

Los datos fueron graficados, ajustando la recta mediante regresión lineal, para obtener la concentración inhibitoria media (CI_{50} ; concentración del andrógeno requerida para inducir 50% de relajación de la contracción inducida por KCl) de los andrógenos. Con la CI_{50} se estableció la relación de potencia de los andrógenos probados con la siguiente fórmula: CI_{50} de testosterona/ CI_{50} de cada dihidrometabolito de testosterona; se asignó el valor de 1 para la testosterona.

La eficacia de los andrógenos se expresó como $R_{m\acute{a}x}$ (relajación máxima inducida por los andrógenos a la mayor concentración probada).

Con la prueba de “t” de *Student* no pareada se comparó: (i) la respuesta del vehículo, en el cual fueron disueltos los andrógenos (etanol 0.1%), con el efecto vasodilatador inducido por cada una de las concentraciones de los andrógenos; y (ii) los valores de $R_{m\acute{a}x}$, obtenidos para cada andrógeno. Las curvas fueron comparadas por el análisis de covarianza (ANCOVA) seguido de la prueba de Tukey. Las CI_{50} de los andrógenos fueron comparadas con la prueba no paramétrica “U” de Mann-

Whitney para dos muestras. En todas la pruebas se consideró un valor significativamente diferente cuando $p < 0.05$.

5.6 Compuestos utilizados

Fueron adquiridos de Sigma (Chemical Co., St Louis MO., U.S.A.) los compuestos: testosterona (17 β -hidroxi-4-androsten-3-ona), 5 α -dihidrotestosterona (5 α -DHT; 17 β -hidroxi-5 α -androstan-3-ona), 5 β -dihidrotestosterona (5 β -DHT; 17 β -hidroxi-5 β -androstan-3-ona, prostaglandina F_{2 α} (PGF_{2 α} ; ácido (5Z,9 α ,11 α ,13E,15S)-9,11,15-trihidroxi-prosta-5,13-dienoico sal tris), fenilefrina hidrociorada (Phe; 3-[(1R)-1-hidroxi-2-metilaminoetil]fenol hidrociorado), carbacol clorado (CCh; 2-carbamiloxi-etil-trimetilazano clorado), acetilcolina clorada (ACh; 2-(acetiloxi),N,N,N,-cloruro de trimetiletanamina) y nitroprusiato de sodio (NPS; pentacianonitrosilferrato (III) de sodio).

Los andrógenos y la PGF_{2 α} se disolvieron en etanol absoluto (Merck-México, S.A.). Cada andrógeno se aplicó en un volumen final de 0.1 % v/v en 10 ml, lo cual corresponde a 17.14 mM. Los compuestos CCh, Phe, ACh y NPS se disolvieron en agua destilada; la Phe y el NPS se mantuvieron en un frasco ámbar para evitar su degradación.

Los reactivos utilizados para realizar las preparaciones histológicas fueron adquiridos de Mallinckdt Baker, S.A., México: hematoxilina ((6aS,11bR)-7,11b-dihidro-6H-indeno[2,1-c]cromene-3,4,6a,9,10-pentol), xilol (1,3-dimetilbenzeno) y eosina (sodio 2-(2,4,5,7-tetrabromo-3-hidroxi-6-oxoxanteno-9-il) ácido benzoico). Los tejidos fueron incluidos en parafina de Kendall plus X-TRA.

6. RESULTADOS

6.1 Arteria coronaria izquierda canina

a) Determinación de la presencia o ausencia del endotelio

Se utilizaron preparaciones con endotelio (anillos donde no se raspó el endotelio) y preparaciones sin endotelio (anillos donde se raspó el endotelio) de la arteria coronaria izquierda. En los anillos de coronaria izquierda, donde se preservó la capa de endotelio intacta (anillos con endotelio), la acetilcolina (ACh; 10 μ M) produjo una disminución del tono de la contracción inducida por la prostaglandina $F_{2\alpha}$ (PGF $_{2\alpha}$; 1 μ M); para este trabajo, se utilizaron anillos con endotelio donde la relajación inducida por la ACh fue mayor al 40%. En los anillos donde se eliminó el endotelio (anillos sin endotelio), la ACh no modificó el tono de la contracción inducida por PGF $_{2\alpha}$ (Fig. 4A).

b) Efecto vasodilatador de andrógenos sobre la contracción inducida por KCl 60 mM en la arteria coronaria izquierda canina

El vehículo utilizado para disolver los andrógenos (etanol, 0.1%) no modificó, de manera significativa ($p > 0.05$), la contracción inducida por KCl en la arteria coronaria izquierda con y sin endotelio (0.37 ± 0.37 y $0.38 \pm 0.68\%$ de relajación, respectivamente). En contraste, los andrógenos, a todas las concentraciones probadas, provocaron una inhibición de la contracción inducida por KCl en la arteria coronaria izquierda con y sin endotelio, esta inhibición fue significativamente diferente ($p < 0.05$) a la inducida por el vehículo.

En las preparaciones de la arteria coronaria con y sin endotelio el efecto vasodilatador de los andrógenos se observó rápidamente tras la adición de estos (~2 min) y, después de que los andrógenos fueron retirados del tejido, en el siguiente

estímulo con KCl, se observó una recuperación total de la amplitud y del tono de contracción (Fig. 4B).

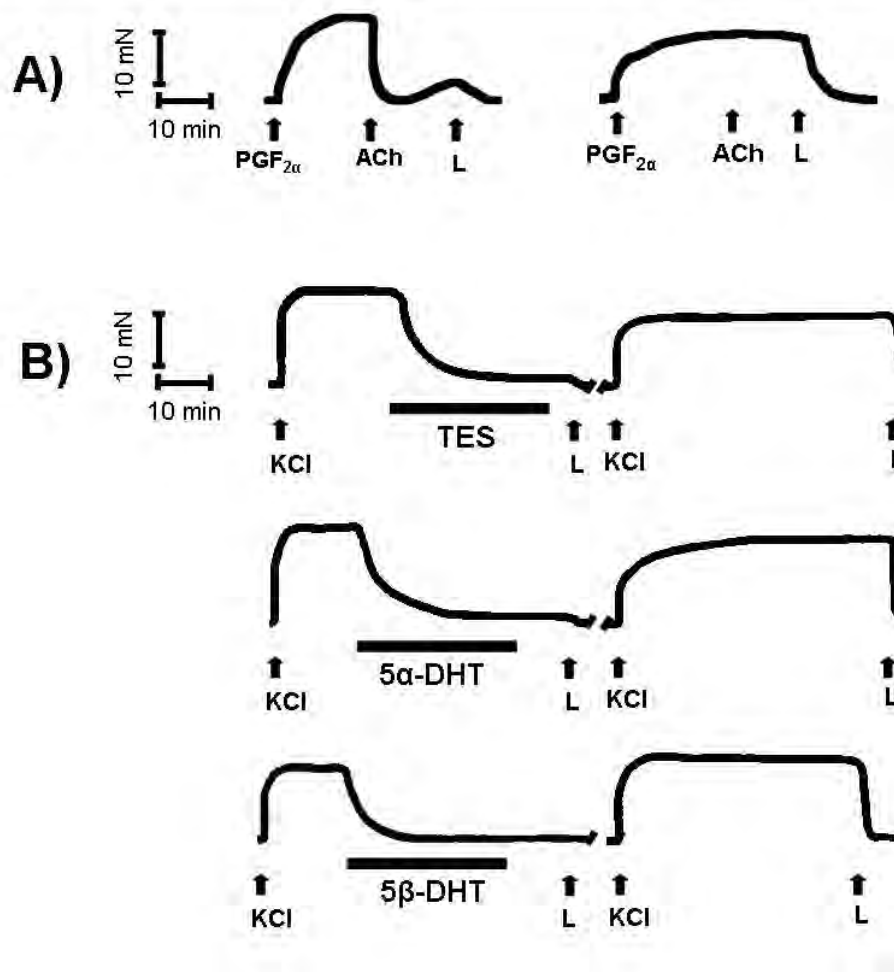


Fig. 4. Registros típicos de la arteria coronaria izquierda canina donde se muestra: A) la contracción inducida por la prostaglandina $\text{F}_{2\alpha}$ ($\text{PGF}_{2\alpha}$, 1 μM) inhibida por la acetilcolina (ACh, 10 μM) en preparaciones con endotelio (panel izquierdo) y sin modificación por la ACh en preparaciones sin endotelio (panel derecho); B) la contracción inducida por KCl (60 mM) en preparaciones con endotelio y el inmediato efecto relajante producido por la testosterona (TES, 100 μM), 5 α -dihidrotestosterona (5 α -DHT, 56 μM) y 5 β -dihidrotestosterona (5 β -DHT, 56 μM). Nótese la recuperación de la contracción después del lavado (L), mostrando que el efecto de los andrógenos es reversible. La barra negra indica el tiempo de incubación de los andrógenos.

Los andrógenos probados provocaron disminución del tono de la contracción inducida por KCl, esta pérdida del tono (relajación) fue dependiente de la concentración (Tabla 2). Como se observa en la Tabla 2, a las concentraciones de 5.6-56 μM 5 β -DHT indujo un fuerte efecto vasodilatador, mayor al provocado por la testosterona y 5 α -DHT, por lo que fue necesario probar concentraciones menores (1.8 y 3.1 μM). En relación a los otros andrógenos, se puede observar que 5 β -DHT tiene un efecto relajante mayor, mientras la testosterona fue el andrógeno que mostró el menor efecto vasodilatador a las concentraciones de 5.6-56 μM ; sin embargo a 100 μM , la testosterona, fue capaz de inducir un efecto vasodilatador máximo ($95.39 \pm 1.30\%$ de relajación) (Tabla 2).

Con los datos de la Tabla 2 se construyeron las curvas concentración-respuesta de los andrógenos (Fig. 5). Como se observa, no hay diferencias significativas ($p > 0.05$) entre el efecto vasodilatador inducido por los andrógenos tanto en preparaciones con endotelio, como en preparaciones sin endotelio de la arteria coronaria izquierda.

El análisis de covarianza mostró que la curva de 5 β -DHT fue significativamente diferente ($p < 0.05$) comparada con las curvas de testosterona y 5 α -DHT, mientras que las curvas de testosterona y 5 α -DHT no mostraron diferencias significativas entre ellas ($p > 0.05$).

Tabla 2. Porcentaje de relajación producido por andrógenos sobre la contracción inducida por KCl (60 mM) en la arteria coronaria izquierda

Andrógeno	1.8 μM	3.1 μM	5.6 μM	10 μM	18 μM	31 μM	56 μM	100 μM
CON ENDOTELIO								
TES	NP	NP	11.90 \pm 1.06	13.72 \pm 1.21	30.70 \pm 1.94	59.16 \pm 2.17	71.70 \pm 1.89	95.39 \pm 1.30
5α-DHT	NP	NP	14.22 \pm 0.89	28.32 \pm 1.37	60.76 \pm 2.38	72.35 \pm 2.22	93.09 \pm 1.58	NP
5β-DHT	10.45 \pm 1.16	29.86 \pm 1.95	35.23 \pm 2.32	44.39 \pm 2.05	57.92 \pm 1.35	91.79 \pm 2.19	98.25 \pm 1.11	NP
SIN ENDOTELIO								
TES	NP	NP	13.77 \pm 1.34	15.44 \pm 1.05	31.03 \pm 1.31	58.13 \pm 2.34	72.48 \pm 2.42	92.68 \pm 2.37
5α-DHT	Np	NP	14.28 \pm 1.45	29.83 \pm 2.24	62.31 \pm 3.02	72.10 \pm 1.57	91.25 \pm 2.17	NP
5β-DHT	9.69 \pm 1.17	27.19 \pm 1.33	34.64 \pm 2.14	44.59 \pm 2.12	58.71 \pm 2.23	91.35 \pm 2.29	98.45 \pm 1.23	NP

Testosterona (TES), 5 α -dihidrotestosterona (5 α -DHT) y 5 β -dihidrotestosterona (5 β -DHT). No hay diferencias significativas entre el efecto vasodilatador de los andrógenos en preparaciones con y sin endotelio ($p > 0.05$). Los valores son la media de $n=6 \pm$ EEM. Concentración no probada (NP).

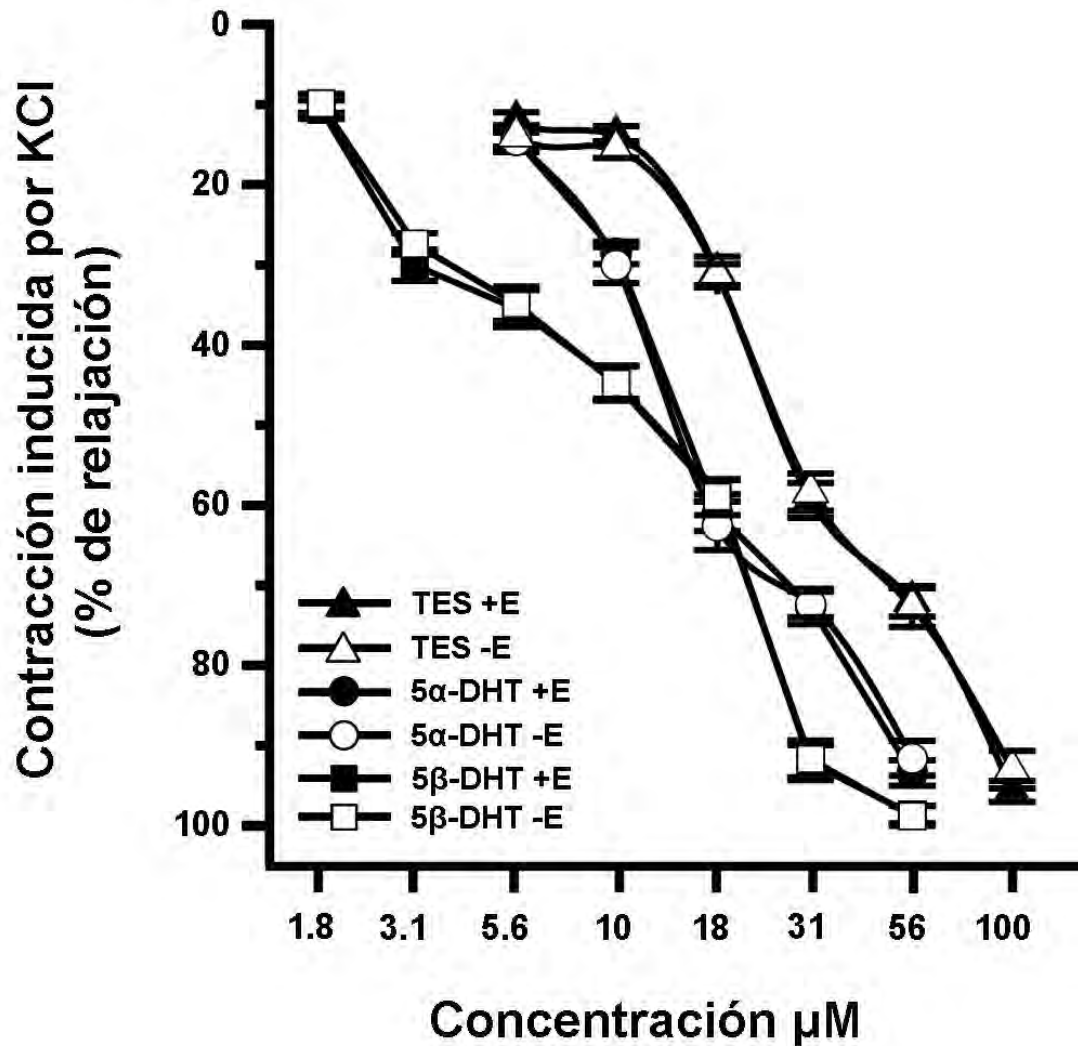


Fig. 5. Curvas concentración-respuesta de testosterona (TES), 5α-dihidrotestosterona (5α-DHT) y 5β-dihidrotestosterona (5β-DHT) sobre la contracción inducida por KCl (60 mM) en la arteria coronaria izquierda con (+E) y sin (-E) endotelio. Cada concentración probada fue significativamente diferente comparada con el vehículo ($p < 0.05$). La curva de 5β-DHT fue significativamente diferente al comparar con las curvas de TES y 5α-DHT ($p < 0.05$). No hay diferencias significativas entre el efecto vasodilatador de los andrógenos en preparaciones con y sin endotelio ($p > 0.05$). Cada símbolo en las curvas es la media de $n = 6 \pm \text{EEM}$.

La testosterona y sus dihidrometabolitos, 5 α -DHT y 5 β -DHT, mostraron una alta eficacia vasodilatadora en la arteria coronaria izquierda; esta eficacia, expresada como la $R_{m\acute{a}x}$, fue cercana al 100% de relajaci3n para los tres andr3genos: testosterona a 100 μ M, 5 α -DHT y 5 β -DHT a 56 μ M (Tabla 3). La comparaci3n entre la $R_{m\acute{a}x}$, de los andr3genos en preparaciones con y sin endotelio, no mostr3 diferencias significativas ($p > 0.05$). Sin embargo, la comparaci3n de las $R_{m\acute{a}x}$ entre los andr3genos mostr3 que 5 β -DHT es un andr3geno vasoactivo, con una eficacia estadisticamente mayor ($p < 0.05$) que la de su is3mero, 5 α -DHT. Por el contrario, la testosterona fue el andr3geno con menor eficacia vasodilatadora, en comparaci3n con sus dihidrometabolitos, ya que requiri3 una concentraci3n mayor (100 μ M) para inducir su $R_{m\acute{a}x}$, (Tabla 3). Con base en lo anterior, el orden de eficacia de los andr3genos fue: **5 β -DHT > 5 α -DHT >> Testosterona.**

Como era de esperarse, los valores de las CI_{50} de los andr3genos, obtenidas en preparaciones con y sin endotelio, no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$). Sin embargo, como es evidente, la comparaci3n de los valores de las CI_{50} entre los tres andr3genos mostr3 diferencias significativas ($p < 0.05$) entre ellos. Este an3lisis revel3 que las CI_{50} de testosterona fueron significativamente mayores ($p < 0.005$) comparadas con las CI_{50} de 5 α -DHT y 5 β -DHT y, entre estos dos andr3genos, las CI_{50} de 5 β -DHT fueron las menores ($p < 0.005$); por lo que 5 β -DHT fue el andr3geno m3s potente en la arteria coronaria izquierda con y sin endotelio (Tabla 3).

Por lo anterior, el orden de potencia de los andr3genos en la arteria coronaria izquierda con y sin endotelio fue: **5 β -DHT >> 5 α -DHT > Testosterona.**

Tabla 3. Análisis de la vasodilatación producida por andrógenos sobre la contracción inducida por KCl (60 mM) en la arteria coronaria izquierda canina

Andrógeno	CI ₅₀ μM (rango)		r		% de R _{máx} (concentración)		Potencia [∞]	
	+E	-E	+E	-E	+E	-E	+E	-E
TES	26.19 (21-30)	26.35 (21-32)	0.97	0.97	95.39 ± 1.30 (100 μM)	92.68 ± 2.37 (100 μM)	1.0	1.0
5α-DHT	16.05* (13-18)	15.30* (13-17)	0.98	0.97	93.09 ± 1.58 (56 μM)	91.25 ± 2.17 (56 μM)	1.63 [#]	1.72 [#]
5β-DHT	9.10* ^{§§} (7-10)	9.30* ^{§§} (7-11)	0.96	0.97	98.25 ± 1.1 [§] (56 μM)	98.45 ± 1.23 [§] (56 μM)	2.87 [#]	2.83 [#]

Testosterona (TES), 5α-dihidrotestosterona (5α-DHT) y 5β-dihidrotestosterona (5β-DHT). La concentración inhibitoria media (CI₅₀), expresada como media (rango), se calculó por regresión lineal de las curvas concentración-respuesta de los andrógenos. La relajación máxima (R_{máx}) inducida por los andrógenos en la arteria coronaria izquierda con (+E) y sin (-E). El coeficiente de correlación de Pearson (r) representa el ajuste a una línea recta. [∞]La potencia se obtuvo mediante la fórmula: CI₅₀ de TES/ CI₅₀ del metabolito, se considero valor de 1.0 para la TES; [#]Veces más potente que TES. Todos los valores son la media de n=6±EEM. Diferencias significativas *p<0.005 al comparar con TES; [§]p<0.05 y ^{§§}p<0.005 al comparar entre 5α-DHT y 5β-DHT. No hay diferencias significativas en la R_{máx} y la CI₅₀ entre preparaciones con y sin endotelio (p>0.05).

6.2 Arteria femoral canina

a) Determinación de la presencia o ausencia del endotelio

En las preparaciones con endotelio (anillos donde no se raspó el endotelio) y preparaciones sin endotelio (anillos donde se raspó el endotelio) de la arteria femoral, a diferencia de la prueba realizada en la arteria coronaria izquierda para determinar la presencia o ausencia del endotelio, inicialmente se realizó la prueba con NA (0.3 μM) para inducir la contracción, sobre la cual, cuando mantuvo un tono estable, se adicionó la ACh (20 μM). Los resultados de esta primera prueba mostraron que en los anillos con endotelio la ACh disminuyó el tono de la contracción inducida por NA (0.3 μM), indicando que en estos anillos se conservó la integridad del endotelio (ver Fig. 6). En los anillos sin endotelio, la ACh no relajó la contracción inducida por NA (0.3 μM), por el contrario, produjo un aumento del tono (Fig. 6), por lo que se consideró realizar esta misma prueba a una concentración menor de ACh (10 μM); a dicha concentración la ACh continuó induciendo un incremento de la contracción inducida por la NA en los anillos sin endotelio de la arteria femoral (Fig. 6). Además, en estas pruebas, la contracción inducida con NA (0.3 μM) no siempre mantuvo el tono estable en la arteria femoral, por lo que se consideró realizar otra estrategia farmacológica (Fig. 6); en la cual se utilizó fenilefrina (Phe; 1 μM) para inducir la contracción, cuando la contracción mantuvo un tono estable, se adicionó CCh (10 μM).

En esta segunda estrategia experimental, se observó que en los anillos con raspados, CCh (10 μM) disminuyó la contracción inducida por Phe (1 μM), confirmando la presencia del endotelio; para este estudio se consideraron las preparaciones con endotelio cuando el CCh relajó al menos 40%. En los anillos sin

endotelio, CCh no modificó la contracción inducida por Phe; estas preparaciones fueron consideradas sin endotelio (Fig. 6). Por los consistentes resultados obtenidos en esta la última estrategia experimental, se utilizó en este trabajo para determinar la presencia o ausencia de endotelio en los anillos de arteria femoral canina.

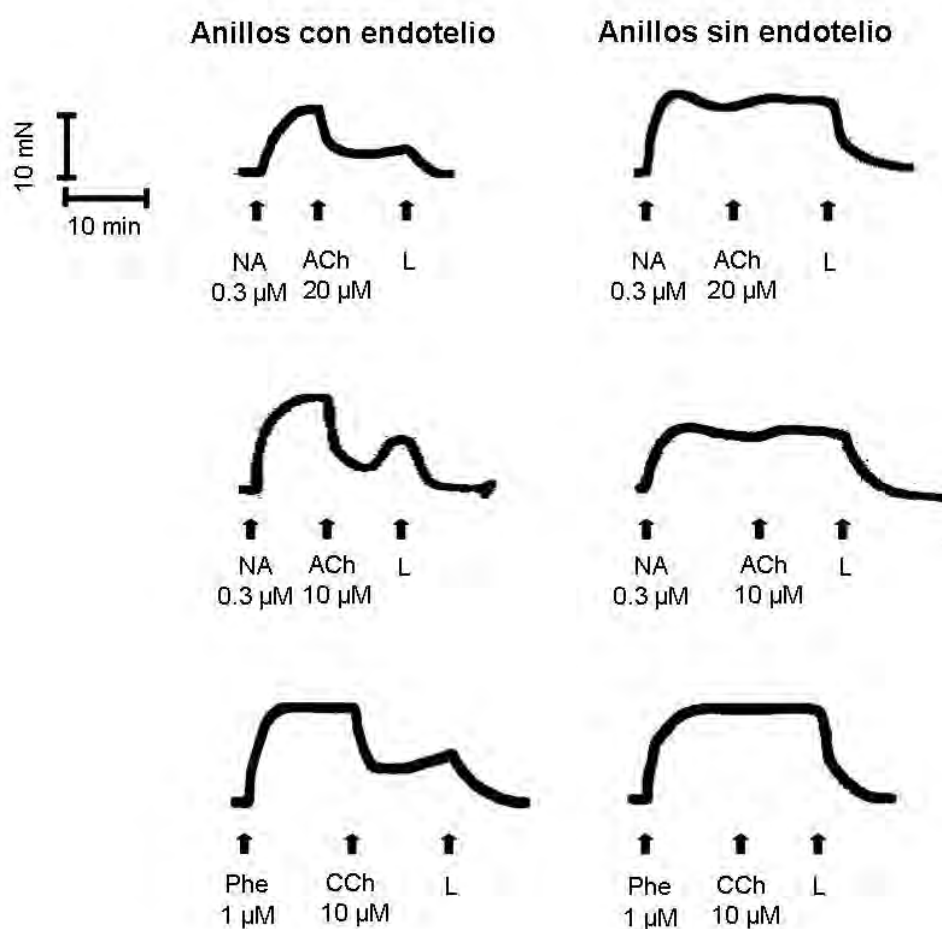


Fig. 6. Registros típicos de la arteria femoral canina donde se muestran las pruebas farmacológicas para determinar la presencia o ausencia del endotelio vascular. Nótese que la contracción inducida por noradrenalina (NA) es inhibida por la acetilcolina (ACh) en anillos no raspados y es aumentada en los anillos raspados. La contracción inducida por fenilefrina (Phe 1 μ M) es inhibida por carbacol (CCh) en anillos no raspados y no se modifica en anillos raspados.

b) Efecto vasodilatador de andrógenos sobre la contracción inducida por KCl (60 mM) en la arteria femoral canina

El vehículo en el cual se disolvieron los andrógenos no modificó de manera significativa ($p > 0.05$) la contracción inducida por KCl en la arteria femoral con y sin endotelio ($0.67 \pm 0.43\%$ y $0.45 \pm 0.45\%$ de relajación, respectivamente). Sin embargo, los andrógenos, a todas las concentraciones probadas, causaron un rápido efecto vasodilatador (~ 2 min) estadísticamente diferente ($p < 0.05$) al inducido por el vehículo. Después de la prueba de los andrógenos, en otro estímulo con KCl, se observó una recuperación total de la amplitud y del tono de la contracción (Fig. 7) en anillos de la arteria femoral.

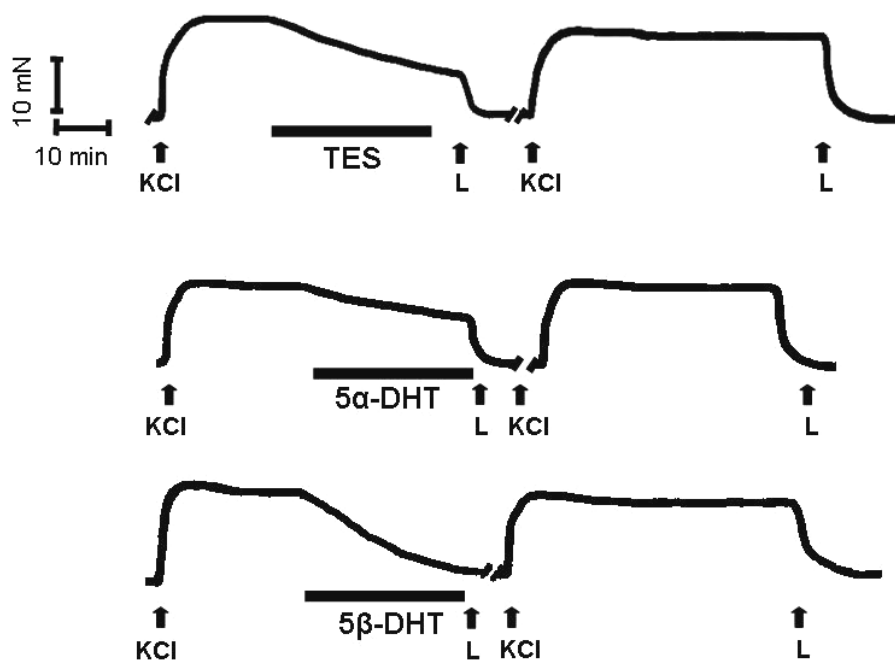


Fig. 7. Registros típicos de la arteria femoral canina donde se muestra la contracción inducida por KCl (60 mM) y efecto relajante de: testosterona (TES; 310 μ M), 5 α -dihidrotestosterona (5 α -DHT; 310 μ M) y 5 β -dihidrotestosterona (5 β -DHT; 180 μ M) en preparaciones con endotelio. Nótese la recuperación de la contracción después del lavado (L), mostrando que el efecto de los andrógenos es reversible. La barra negra indica el tiempo de incubación de los andrógenos.

Los andrógenos provocaron una relajación dependiente de la concentración (Tabla 4). La testosterona y 5 α -DHT a 180 μ M fueron los andrógenos menos efectivos para relajar la contracción inducida por KCl; por anterior, estos dos andrógenos fueron probados a una concentración mayor (310 μ M) (Tabla 4). Aunque los datos muestran que testosterona y 5 α -DHT a 310 μ M no alcanzaron un efecto máximo (>90% de relajación), debido a las propiedades hidrofóbicas de estos compuestos, no se permitió la aplicación de concentraciones más altas.

Tabla 4. Porcentaje de relajación producido por andrógenos sobre la contracción inducida por KCl (60 mM) en la arteria femoral canina

Andrógeno	18 μ M	31 μ M	56 μ M	100 μ M	180 μ M	310 μ M
CON ENDOTELIO						
TES	10.44 \pm 1.50	10.46 \pm 1.47	22.73 \pm 1.87	35.95 \pm 2.13	69.85 \pm 2.13	78.73 \pm 2.73
5α-DHT	9.55 \pm 0.86	13.81 \pm 2.25	21.94 \pm 2.19	24.03 \pm 2.19	34.38 \pm 2.24	49.51 \pm 1.42
5β-DHT	11.30 \pm 1.66	17.76 \pm 2.02	52.70 \pm 2.36	80.08 \pm 2.42	81.62 \pm 1.45	NP
SIN ENDOTELIO						
TES	8.97 \pm 0.61	10.10 \pm 0.87	24.16 \pm 0.97	35.70 \pm 1.05	69.78 \pm 1.71	81.72 \pm 1.74
5α-DHT	9.65 \pm 0.65	12.11 \pm 1.13	22.36 \pm 1.88	27.05 \pm 1.48	35.62 \pm 2.22	52.33 \pm 1.17
5β-DHT	10.18 \pm 0.76	16.95 \pm 1.65	54.72 \pm 2.11	82.19 \pm 2.41	82.58 \pm 1.53	NP

Testosterona (TES), 5 α -dihidrotestosterona (5 α -DHT) y 5 β -dihidrotestosterona (5 β -DHT). No hay diferencias significativas entre el efecto vasodilatador de los andrógenos en preparaciones con y sin endotelio ($p > 0.05$). Los valores son la media de $n=6 \pm \text{EEM}$. Concentración no probada (NP).

Como se observa en la Fig. 8, no hay diferencias significativas ($p>0.05$) en las curvas concentración-respuesta de los andrógenos entre las preparaciones con y sin endotelio en la arteria femoral. Asimismo, la comparación de los valores de $R_{\text{máx}}$ y CI_{50} de los andrógenos, entre preparaciones con y sin endotelio, no mostró diferencias significativas ($p>0.05$), indicando que el efecto vasodilatador de los andrógenos es igual en preparaciones con y sin endotelio (Tabla 5).

En cambio, se observó que las curvas concentración-respuesta de los tres andrógenos mostraron diferencias significativas entre ellas ($p<0.05$), indicando que el efecto vasodilatador de cada andrógeno fue diferente en la arteria femoral, tanto en preparaciones con endotelio, como en preparaciones sin endotelio (Fig. 8). También, es importante resaltar que 5β -DHT fue el único andrógeno que alcanzó un efecto máximo sin diferencias significativas ($p>0.05$) a 100 y 180 μM , por lo que ya no se continuó probando a una concentración mayor (310 μM) (Fig. 8).

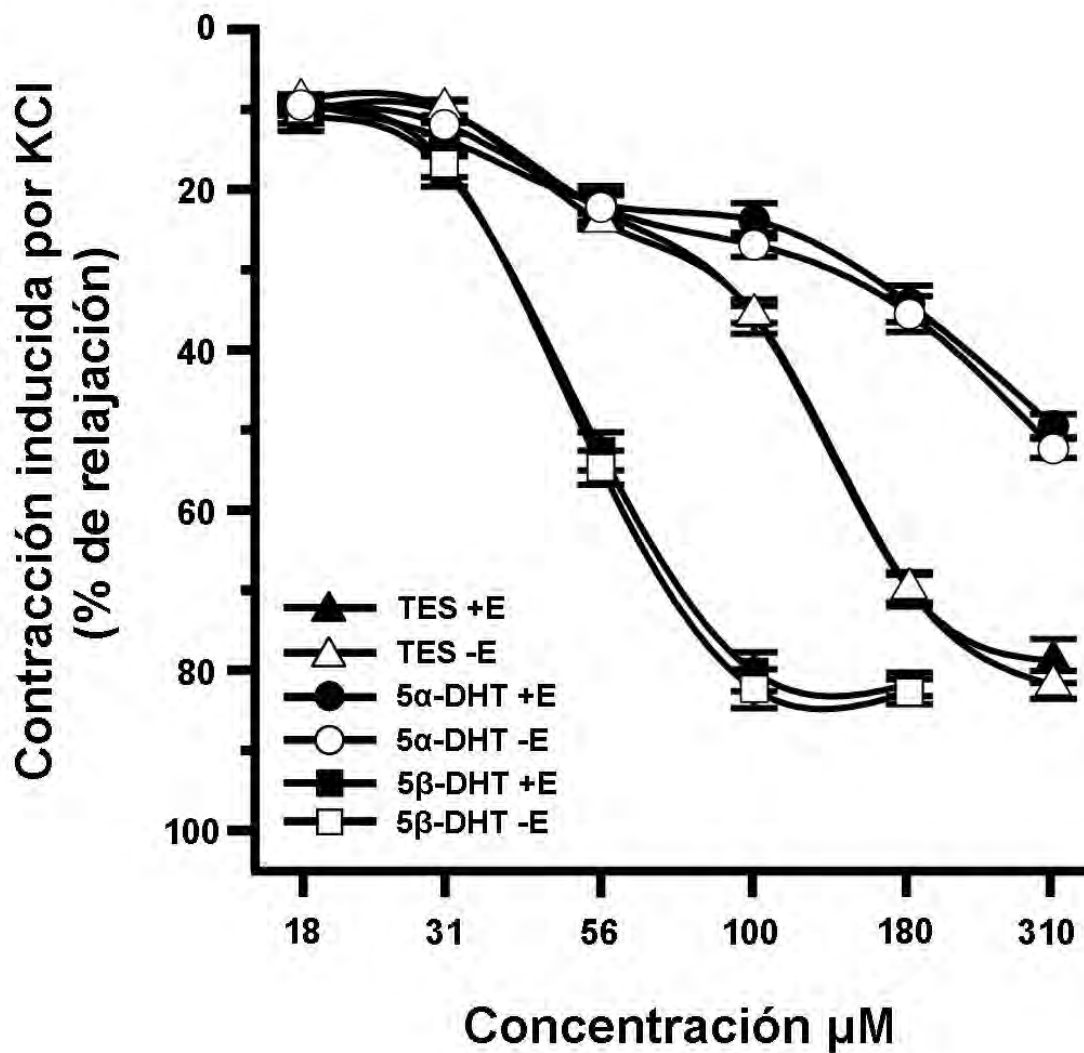


Fig. 8. Curvas concentración-respuesta de testosterona (TES), 5 α -dihidrotestosterona (5 α -DHT) y 5 β -dihidrotestosterona (5 β -DHT) sobre la contracción inducida por KCl (60 mM) en la arteria femoral canina con (+E) y sin (-E) endotelio. Cada concentración probada fue significativamente diferente comparado con el vehículo ($p < 0.05$). Las curvas de los tres andrógenos fueron significativamente diferentes entre ellas ($p < 0.05$). No hay diferencias significativas entre el efecto vasodilatador de los andrógenos en preparaciones con y sin endotelio ($p > 0.05$). Cada símbolo en las curvas es la media de $n = 6 \pm \text{EEM}$.

El análisis de las curvas mostró una marcada diferencia entre los valores de las $R_{m\acute{a}x}$ y las CI_{50} de los andr3genos (Tabla 5). Notablemente, 5 β -DHT fue el andr3geno con mayor eficacia para relajar la arteria femoral, ya que, a pesar que su $R_{m\acute{a}x}$ fue estadisticamente igual ($p>0.05$) a la de testosterona, se obtuvo a una concentraci3n menor (180 μ M) en comparaci3n con la testosterona y, respecto a 5 α -DHT, la $R_{m\acute{a}x}$ de 5 β -DHT fue significativamente mayor ($p<0.0005$). La comparaci3n entre los valores de $R_{m\acute{a}x}$ de testosterona y 5 α -DHT (ambos a 310 μ M) mostr3 que la eficacia vasodilatadora de 5 α -DHT fue significativamente menor ($p<0.0005$), comparada con la de testosterona. De acuerdo a las diferencias en la $R_{m\acute{a}x}$, el orden de eficacia de los andr3genos fue: **5 β -DHT >> Testosterona >> 5 α -DHT.**

Como se observa en la Fig. 8, 5 α -DHT mostr3 valores de CI_{50} significativamente mayores ($p<0.05$) a los obtenidos para la testosterona y 5 β -DHT, por lo que fue el andr3geno con menor potencia vasodilatadora. En contraste, las CI_{50} de 5 β -DHT fueron significativamente menores ($p<0.05$) que las de testosterona, mostrando que 5 β -DHT fue el andr3geno m3s potente para relajar en la arteria femoral con y sin endotelio. As3, con base en los valores de las CI_{50} el orden de potencia de los andr3genos fue: **5 β -DHT >> Testosterona >>>> 5 α -DHT.**

Tabla 5. Análisis de la vasodilatación producida por andrógenos sobre la contracción inducida por KCl (60 mM) en la arteria femoral canina

Andrógeno	CI ₅₀ μM (rango)		r		% de R _{máx} (concentración)		Potencia [∞]	
	+E	-E	+E	-E	+E	-E	+E	-E
TES	119.77 (90-150)	114.72 (96-132)	0.94	0.95	78.73 ± 2.73 [§] (310 μM)	81.72 ± 1.74 [§] (310 μM)	1.0	1.0
5α-DHT	483.18* ^T (434-560)	404.54* ^T (252-593)	0.92	0.94	49.51 ± 1.42* (310 μM)	52.33 ± 1.17* (310 μM)	0.24 ^{†T}	0.28 ^{†T}
5β-DHT	58.80* [§] (49-69)	57.72* [§] (50-66)	0.95	0.95	81.62 ± 1.45 [§] (180 μM)	82.58 ± 1.53 [§] (180 μM)	2.05 [#]	2.00 [#]

Testosterona (TES), 5α-dihidrotestosterona (5α-DHT) y 5β-dihidrotestosterona (5β-DHT). La concentración inhibitoria media (CI₅₀), expresada como media (rango), se calculó por regresión lineal de las curvas concentración-respuesta de los andrógenos; ^TValores teóricos obtenidos por extrapolación de la recta. La relajación máxima (R_{máx}) inducida por los andrógenos en la arteria femoral con (+E) y sin (-E) endotelio. El coeficiente de correlación de Pearson (r) representa el ajuste a una línea recta. [∞]La potencia se obtuvo mediante la fórmula: CI₅₀ de TES/ CI₅₀ del metabolito, se consideró valor de 1.0 para la TES; [#]veces más potente que TES y [†]veces menos potente que TES. Los valores son la media de n=6±EEM. Diferencias significativas *p<0.0005 al comparar con TES y [§]p<0.0005 al comparar entre 5α-DHT y 5β-DHT. No hay diferencias significativas en la R_{máx} y la CI₅₀ entre preparaciones con y sin endotelio (p>0.05).

6.3 Vena safena canina

a) Respuestas atípicas del endotelio de la vena safena canina

En anillos de vena safena con endotelio intacto (no raspado) y sin endotelio (eliminado mediante un suave raspado), se llevaron a cabo varias pruebas para estandarizar un protocolo experimental que permitiera determinar la ausencia o la presencia de endotelio en dichas preparaciones. En la primera estrategia experimental realizada se produjo una contracción con NA (0.3 μM), cuando el tono de la contracción se mantuvo estable, se adicionó ACh (20 μM). En estos experimentos se observó lo siguiente: (i) la contracción inducida por NA no siempre mantuvo un tono estable en las preparaciones (raspadas y no raspadas) de la vena safena; y (ii) la ACh (20 μM) adicionada sobre la contracción de NA produjo un fuerte incremento del tono en ambas preparaciones de la vena safena (con y sin endotelio) (Fig. 9).

Por los dos resultados anteriores, que no permitieron corroborar la presencia o ausencia de endotelio en la vena safena, se realizó una segunda estrategia experimental, en la cual se utilizó Phe (1 μM) para inducir una contracción tónica sostenida, sobre la cual se adicionó ACh (10 y 20 μM); en esta segunda prueba, nuevamente se observó que la ACh a 10 y 20 μM incrementó del tono de la contracción en anillos de la vena safena con y sin endotelio (Fig. 9).

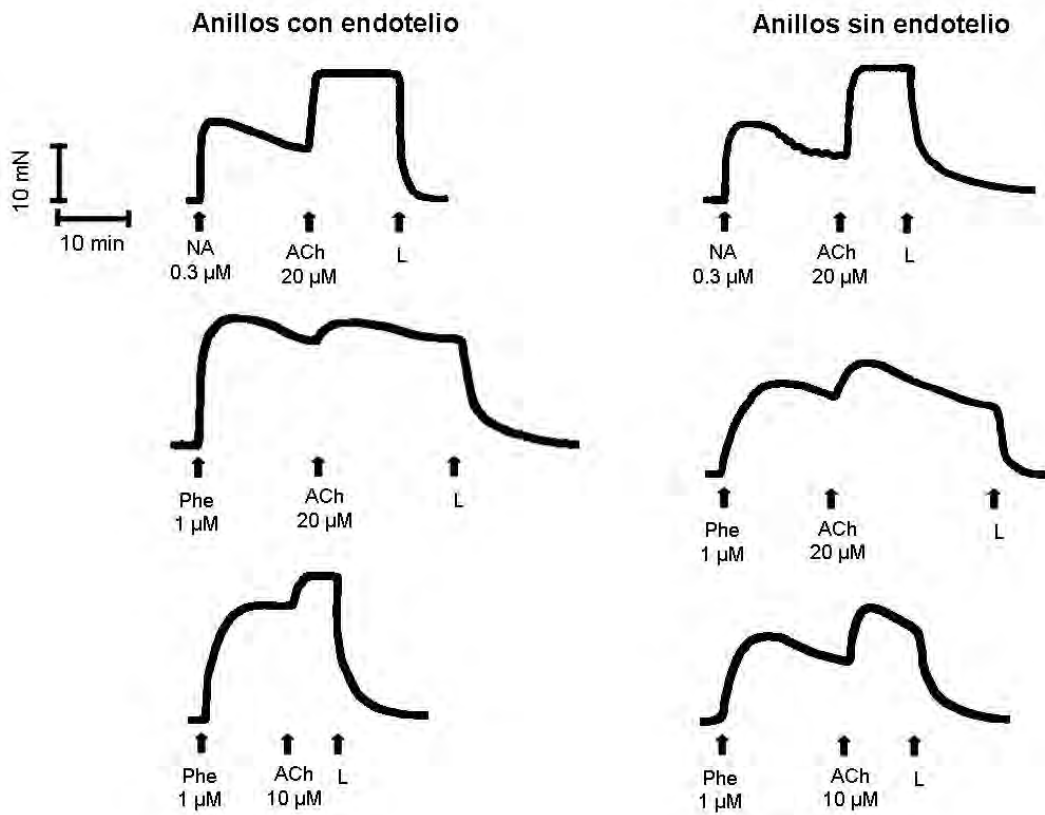


Fig. 9. Registros típicos de la vena safena donde se muestran las pruebas farmacológicas para determinar la presencia o ausencia del endotelio vascular. Nótese que las contracciones inducidas por noradrenalina (NA) y fenilefrina (Phe) son aumentadas por la acetilcolina (ACh) en anillos raspados y no raspados.

Por los resultados obtenidos, se decidió realizar otra estrategia experimental, en la cual se utilizó Phe 1 μ M para inducir una contracción con un tono estable, sobre la cual se adicionó CCh a diferentes concentraciones (0.5, 1 y 10 μ M). El CCh a 0.5, 1 y 10 μ M, de manera similar que la ACh, incrementó el tono inducido por Phe en las preparaciones con y sin endotelio de la vena safena (Fig. 10). Debido a que estos resultados tampoco permitieron diferenciar preparaciones con o sin endotelio de la vena safena, se realizaron otras series de pruebas.

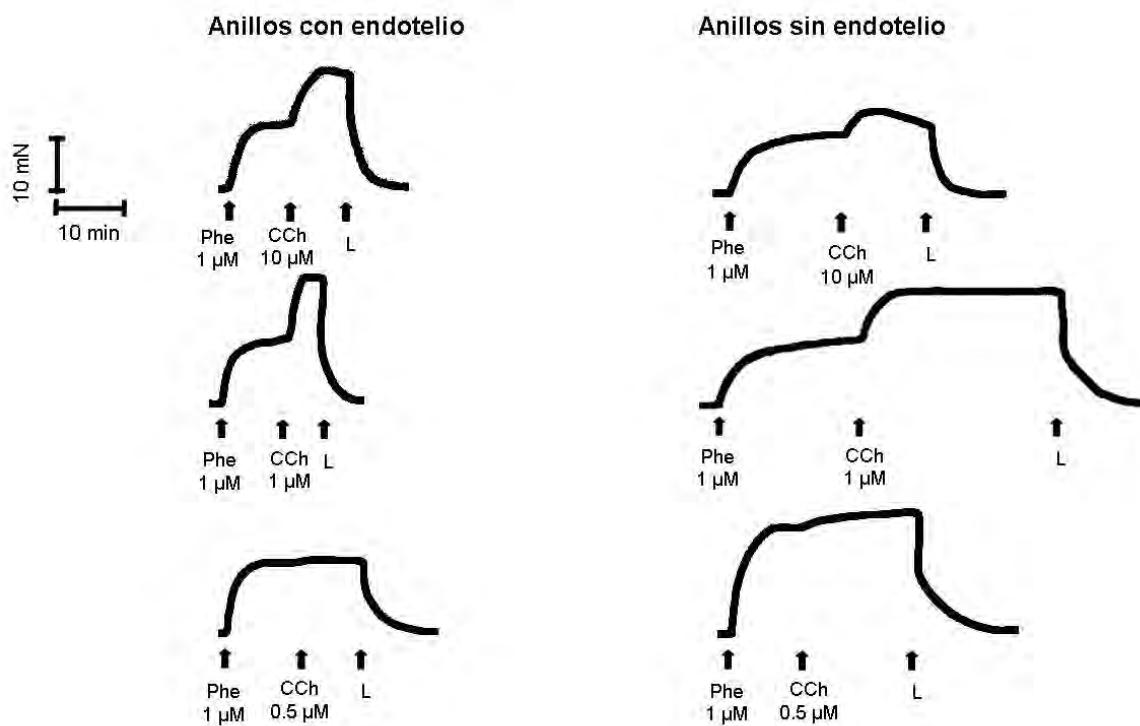


Fig. 10. Registros típicos de la vena safena donde se muestran las pruebas farmacológicas para determinar la presencia o ausencia del endotelio vascular. Nótese que la contracción inducida por fenilefrina (Phe) es aumentada por carbacol (CCh) en anillos raspados y no raspados.

De manera independiente, se provocaron contracciones estables con diferentes agentes vasocontractores, como KCl (60 mM), 5-HT (10 μ M) y PGF_{2 α} (1 μ M), sobre estas contracciones se adicionó ACh (10 ó 20 μ M); en todos los casos, la ACh a 10 ó 20 μ M produjo un aumento del tono de las contracciones, tanto en anillos con y sin endotelio (Fig. 11).

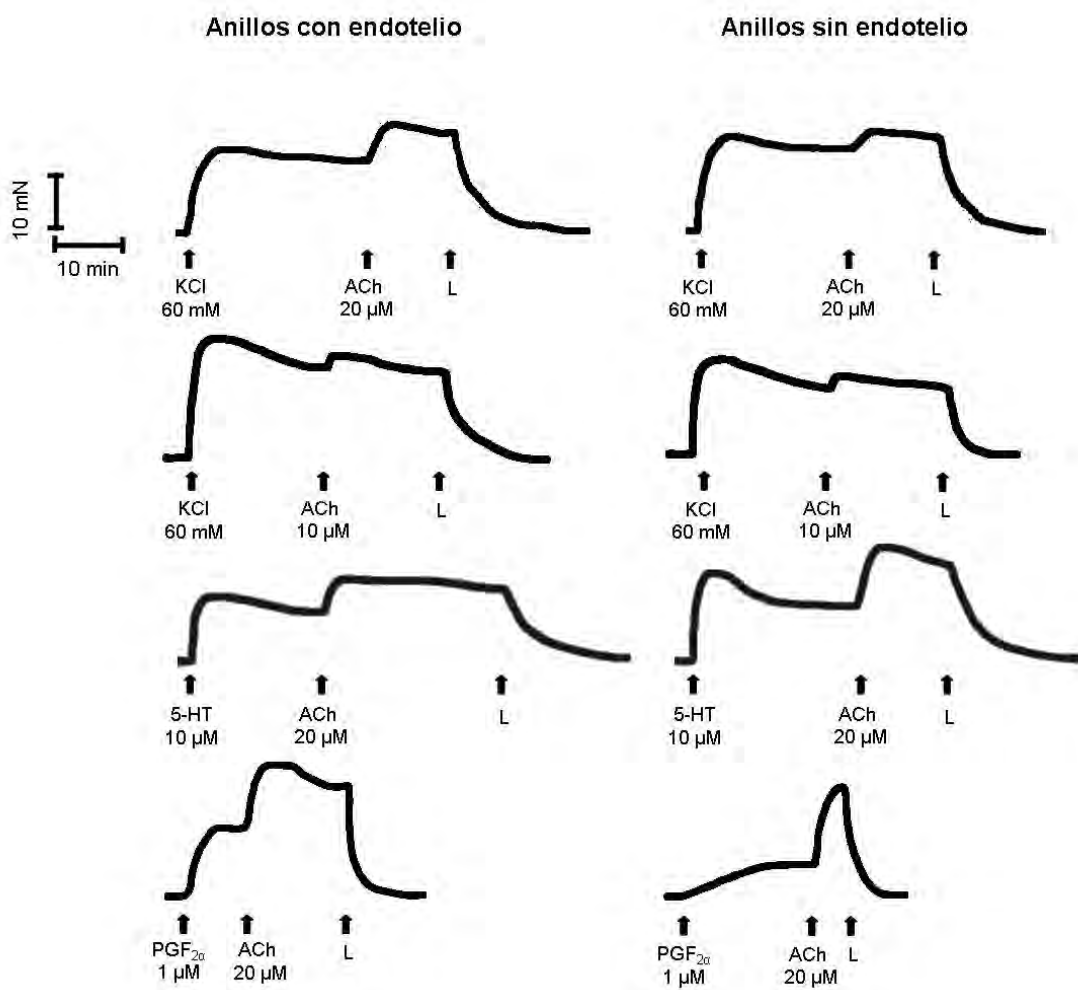


Fig. 11. Registros típicos de la vena safena donde se muestran las pruebas farmacológicas para determinar la presencia o ausencia del endotelio vascular. Nótese que las contracciones inducidas por KCl, 5-HT y PGF_{2 α} son aumentadas por la ACh en anillos raspados y no raspados.

De las pruebas realizadas, se observó que ni la ACh ni el CCh, a diferentes concentraciones y sobre contracciones inducidas por diferentes agentes vasoconstrictores, fueron capaces de inducir relajación en preparaciones con endotelio de la vena safena; un efecto igual se observó en las preparaciones sin endotelio de esta vena. Por lo anterior, se consideró que, posiblemente, el músculo liso de la vena safena no fuera capaz de responder al óxido nítrico (NO), a través del cual se sabe que la ACh y el CCh inducen relajación.

Para confirmar que el músculo liso de la vena safena puede responder al NO, se evaluó la sensibilidad de este lecho vascular al NO. Para este objetivo, se probó un donador de NO, nitroprusiato de sodio (NPS), el cual se adicionó a varias concentraciones (0.001-10 μ M) acumulativas sobre la contracción inducida por Phe (1 μ M) en preparaciones no raspadas de la vena safena.

Las pruebas con el NPS, realizadas para evaluar la sensibilidad de la vena safena al NO, mostraron que a todas las concentraciones probadas, el NPS relajó la contracción inducida con Phe, de manera inmediata (~2 seg) y dependiente de la concentración (Fig. 12).

A)

NPS (μM)	0.001	0.01	0.1	1	10
% de relajación de la contracción inducida por Phe	4.58 ± 0.59	26.65 ± 2.0	64.89 ± 2.17	85.92 ± 1.45	98.8 ± 0.54

B)

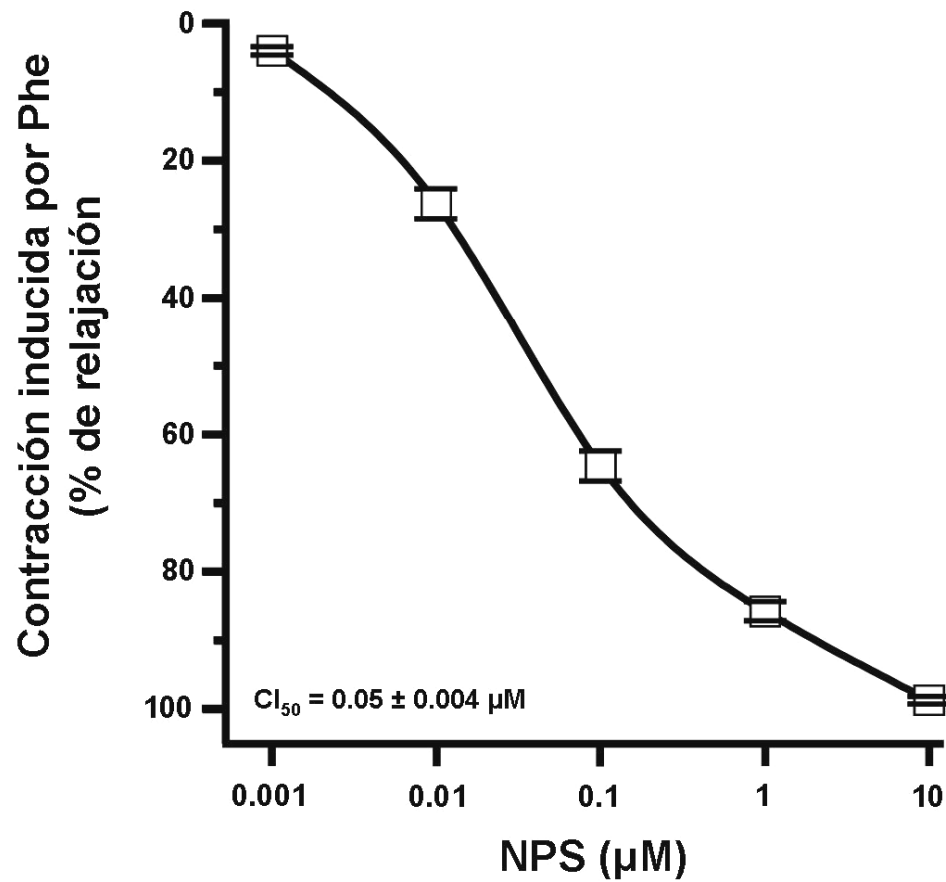


Fig. 12. A) Porcentajes de relajación y B) curva concentración-respuesta del efecto relajante producido por nitroprusiato de sodio (NPS) sobre la contracción inducida por fenilefrina (Phe, 1 μM) en la vena safena. La concentración inhibitoria media (CI₅₀), expresada como media \pm E.E.M, se calculó por regresión lineal de la curva concentración-respuesta de NPS. Los datos son la media de n=6.

Con los datos anteriores, se puede considerar que el endotelio de esta vena tiene respuestas atípicas a ACh y a CCh, ya que no fueron capaces de inducir relajación dependiente del endotelio en este vaso; por el contrario, en todas las pruebas provocaron un incremento del tono. En contraste, el donador de NO (NPS) fue capaz de inducir un agudo efecto vasodilatador ($CI_{50}=0.05 \mu\text{M}$) en la vena safena, indicando que el músculo liso de la vena safena sí es capaz de relajarse por acción de NO.

Con base en los resultados comentados arriba y a que no fue posible determinar (ni cuantificar el porcentaje de relajación dependiente del endotelio) de manera farmacológica la presencia o ausencia de endotelio en la vena safena canina, para los fines de este trabajo, las pruebas de los andrógenos se realizaron únicamente en anillos de vena safena donde el endotelio fue completamente eliminado mediante un delicado raspado (la técnica para eliminar la capa endotelial fue corroborada mediante observaciones histológicas de los anillos). De esta forma, se determinó si los andrógenos mantienen la habilidad de inducir vasodilatación en preparaciones sin endotelio de vena safena.

b) Efecto vasodilatador de andrógenos sobre la contracción inducida por KCl 60 mM en la vena safena canina

El vehículo utilizado para disolver los andrógenos no mostró un efecto significativo ($p>0.05$; $1.99\pm 0.63\%$ de relajación) sobre la contracción inducida por KCl (60 mM) en preparaciones sin endotelio de la vena safena canina.

Notablemente, los andrógenos, a todas las concentraciones probadas, fueron capaces de inducir un efecto vasodilatador significativo ($p<0.05$) sobre la contracción

inducida por KCl (60 mM) en preparaciones de la vena safena donde se eliminó el endotelio (Tabla 6).

Es importante resaltar que el efecto vasodilatador inducido por los andrógenos en la vena safena sin endotelio mostró un comportamiento similar al observado en los otros vasos estudiados (las arterias femoral y coronaria izquierda), es decir, este efecto fue inmediato a la adición de los andrógenos (~2 min) y, después de retirar los andrógenos del tejido, se observó una recuperación total de la amplitud y del tono en la siguiente contracción inducida con KCl (Fig. 13).

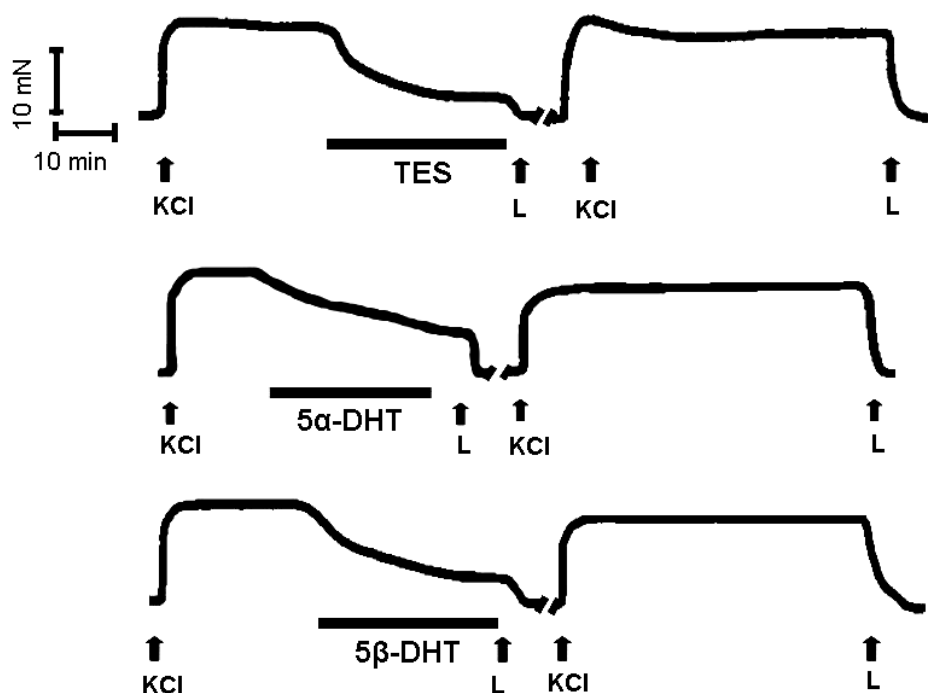


Fig. 13. Registros típicos de la vena safena sin endotelio donde se muestra la contracción inducida por KCl (60 mM) y el inmediato efecto vasodilatador de: testosterona (TES; 310 μ M), 5 α -dihidrotestosterona (5 α -DHT; 180 μ M) y 5 β -dihidrotestosterona (5 β -DHT; 310 μ M). Nótese la recuperación después del lavado (L), mostrando que el efecto de los andrógenos es reversible. La barra negra indica el tiempo de incubación de los andrógenos.

Cabe señalar que en algunas preparaciones de la vena safena donde no se eliminó el endotelio (corroboración histológica), se realizaron algunas pruebas de los andrógenos (datos no mostrados). La comparación entre el efecto vasodilatador de los andrógenos entre preparaciones donde se eliminó el endotelio y donde no fue eliminado el endotelio de la vena safena, no mostró diferencias significativas ($p > 0.05$) (datos no mostrados).

Tabla 6. Porcentaje de relajación producido por andrógenos sobre la contracción inducida por KCl (60 mM) en la vena safena canina sin endotelio

Andrógeno	18 μ M	31 μ M	56 μ M	100 μ M	180 μ M	310 μ M
TES	11.28 \pm 0.59	19.92 \pm 1.53	44.09 \pm 2.09	77.75 \pm 2.14	81.53 \pm 1.63	87.92 \pm 1.47
5 α -DHT	15.06 \pm 1.90	23.12 \pm 1.16	54.45 \pm 2.44	66.11 \pm 2.12	67.96 \pm 2.29	NP
5 β -DHT	11.98 \pm 1.90	24.60 \pm 2.16	44.90 \pm 2.29	73.38 \pm 2.16	79.20 \pm 2.10	82.04 \pm 2.40

Testosterona (TES), 5 α -dihidrotestosterona (5 α -DHT) y 5 β -dihidrotestosterona (5 β -DHT). No hay diferencias significativas entre el efecto vasodilatador de los andrógenos en preparaciones con y sin endotelio ($p > 0.05$). Los valores son la media de $n=6 \pm$ EEM. Concentración no probada (NP).

Como se observa en la Fig 14, de manera similar a lo observado en las arterias caninas en este trabajo, en las preparaciones de vena safena sin endotelio, los andrógenos fueron capaces de inducir un efecto vasodilatador dependiente de la concentración. Cabe mencionar que 5 α -DHT a 100 μ M mostró un efecto

vasodilatador máximo ($66.11 \pm 2.12\%$ de relajación) sin diferencias estadísticas con su $R_{\text{máx}}$ a $180 \mu\text{M}$ ($67.16 \pm 2.29\%$ de relajación), por lo que ya no se probó a una concentración mayor ($310 \mu\text{M}$) (Tabla 6 y Fig. 14).

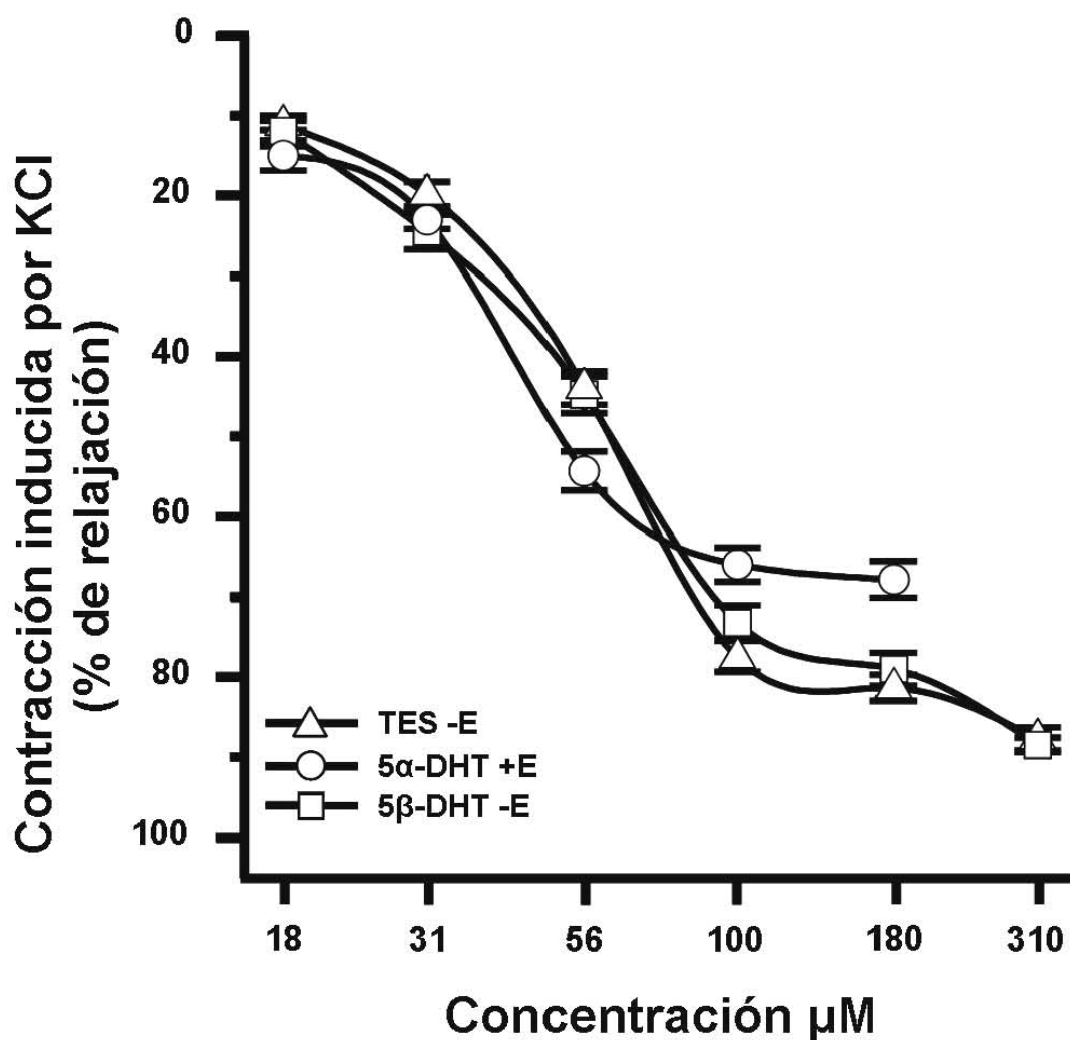


Fig. 14. Curvas concentración-respuesta de testosterona (TES), 5 α -dihidrotestosterona (5 α -DHT) y 5 β -dihidrotestosterona (5 β -DHT) sobre la contracción inducida por KCl 60 mM en la vena safena canina sin endotelio. Cada concentración probada fue significativamente diferente comparado con el vehículo ($p < 0.05$). No hubo diferencias entre las curvas de los andrógenos ($p > 0.05$). Cada símbolo en las curvas es la media de $n = 6 \pm \text{EEM}$.

De forma interesante, el análisis de las curvas concentración-respuesta de los andrógenos no mostró diferencias significativas ($p>0.05$) entre ellas, este resultado indica que el efecto vasodilatador de la testosterona y sus dihidrometabolitos, 5α -DHT y 5β -DHT, es igual en la vena safena canina sin endotelio (Fig. 14).

Respecto a la eficacia de los andrógenos en la vena safena, la comparación de los valores de $R_{m\acute{a}x}$ entre la testosterona y 5β -DHT (ambos a $310\ \mu\text{M}$) no mostró diferencias significativas ($p>0.05$), indicando que estos dos andrógenos tienen la misma eficacia para relajar la vena safena (Tabla 7). Sin embargo, los valores de $R_{m\acute{a}x}$ de 5α -DHT fueron significativamente menores ($p<0.005$) respecto a los obtenidos por la testosterona y 5β -DHT (ambos a $310\ \mu\text{M}$), indicando que este andrógeno es menos eficaz para relajar la vena safena canina (Tabla 7). De acuerdo a la $R_{m\acute{a}x}$, el orden de eficacia vasodilatadora de los andrógenos, en la vena safena sin endotelio fue: **5β -DHT = Testosterona \gg 5α -DHT.**

Finalmente, de manera consistente con el análisis de las curvas, la comparación de los valores de las CI_{50} , calculadas para los andrógenos en la vena safena, no mostró diferencias significativas entre los tres ($p>0.05$) (Tabla 7). Estos resultados indican que la potencia de la testosterona y 5α -DHT y 5β -DHT es igual en la vena safena.

Tabla 7. Análisis de la vasodilatación producida por andrógenos sobre la contracción inducida por KCl (60 mM) en la vena safena canina sin endotelio.

Andrógeno	CI₅₀ μM (rango)	r	% de R_{máx} (concentración)	Potencia[∞]
TES	66.49 (55-76)	0.95	87.92 ± 1.47 (310 μM)	1.0
5α-DHT	68.76 (54-58)	0.93	67.96 ± 2.29* (180 μM)	0.96
5β-DHT	66.00 (51-79)	0.96	88.69 ± 0.89 [§] (310 μM)	1.0

Testosterona (TES), 5α-dihidrotestosterona (5α-DHT) y 5β-dihidrotestosterona (5β-DHT). La concentración inhibitoria media (CI₅₀), expresada como media (rango), se calculó por regresión lineal de las curvas concentración-respuesta de los andrógenos. La relajación máxima (R_{máx}) inducida por los andrógenos. El coeficiente de correlación de Pearson (r) representa el ajuste a una línea recta. [∞]La potencia se obtuvo mediante la fórmula: CI₅₀ de TES/ CI₅₀ del metabolito, se considero valor de 1.0 para la TES. Los valores son la media de n=6±EEM. Diferencias significativas *p<0.005 al comparar con TES y [§]p<0.005 al comparar entre 5α-DHT y 5β-DHT.

6.4 Sensibilidad de los vasos sanguíneos al efecto vasodilatador de los andrógenos

Las curvas concentración-respuesta de los andrógenos fueron comparadas entre los tres vasos sanguíneos sin endotelio; este análisis mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el efecto vasodilatador inducido por cada andrógeno en los diferentes vasos estudiados. Asimismo, la comparación de las CI_{50} de los andrógenos entre los tres vasos sanguíneos mostró diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la potencia de la testosterona, 5α -DHT y 5β -DHT en cada uno de los vasos sanguíneos (Tabla 8). Cabe aclarar que las curvas y las CI_{50} de 5β -DHT en la arteria femoral y en la vena safena no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$), indicando que estos dos vasos son igualmente sensibles al efecto vasodilatador inducido por 5β -DHT.

Con base en las comparaciones antes mencionadas, el orden de sensibilidad de los vasos estudiados a la acción de testosterona y 5α -DHT fue: **Coronaria Izquierda >>> Vena Safena >>> Arteria Femoral**; y a 5β -DHT fue: **Arteria Coronaria Izquierda >>> Vena Safena = Arteria Femoral**.

Tabla 8. Comparación del efecto vasodilatador de andrógenos sobre la contracción inducida por KCl (60 mM) en vasos caninos

Andrógeno	Endotelio	Cl ₅₀ µM (rango)	r	% de R _{máx} (concentración)
TES				
<i>Coronaria Izquierda</i>	+E	26.19 (21-30)	0.97	95.39 ± 1.30 (100 µM)
	-E	26.35 (21-32)	0.97	92.68 ± 2.37 (100 µM)
<i>Arteria Femoral</i>	+E	119.77 (90-150)	0.94	78.73 ± 2.73 (310 µM)
	-E	114.72 (96-132)	0.95	81.72 ± 1.74 (310 µM)
<i>Vena Safena</i>	-E	66.49 (55-76)	0.95	87.92 ± 1.47 (310 µM)
5α-DHT				
<i>Coronaria Izquierda</i>	+E	16.05 (13-18)	0.98	93.09 ± 1.58 (56 µM)
	-E	15.30 (13-17)	0.97	91.25 ± 2.17 (56 µM)
<i>Arteria Femoral</i>	+E	483.18 ^T (434-560)	0.92	49.51 ± 1.42 (310 µM)
	-E	404.54 ^T (252-593)	0.94	52.33 ± 1.17 (310 µM)
<i>Vena Safena</i>	-E	68.76 (54-58)	0.93	67.96 ± 2.29 (180 µM)
5β-DHT				
<i>Coronaria Izquierda</i>	+E	9.10 (7-10)	0.96	98.25 ± 1.10 (56 µM)
	-E	9.30 (7-11)	0.97	98.45 ± 1.23 (56 µM)
<i>Arteria Femoral</i>	+E	58.80 (49-69)	0.95	81.62 ± 1.45 (180 µM)
	-E	57.72 (50-66)	0.95	82.58 ± 1.53 (180 µM)
<i>Vena Safena</i>	-E	66.00 (51-79)	0.96	88.69 ± 0.89 (310 µM)

Testosterona (TES), 5α-dihidrotestosterona (5α-DHT) y 5β-dihidrotestosterona (5β-DHT). La concentración inhibitoria media (Cl₅₀) en preparaciones con (+E) y sin (-E) endotelio de vasos caninos. La concentración inhibitoria media (Cl₅₀), expresada como media (rango), se calculó por regresión lineal de las curvas concentración-respuesta de los andrógenos. ^T Valores teóricos obtenidos por extraplación de la recta. La relajación máxima (R_{máx}) inducida por los andrógenos es la media (n=6) ± EEM. El coeficiente de correlación de Pearson (r) representa el ajuste a una línea recta.

6.4 Observación histológica de la presencia o ausencia del endotelio vascular

En la Fig. 15 se muestran las imágenes obtenidas de la observación histológica de las preparaciones con y sin endotelio de los vasos estudiados: la arteria coronaria izquierda, la arteria femoral y la vena safena caninas. Como se puede observar, se confirmó la presencia de la capa endotelial en las preparaciones donde se mantuvo integro el endotelio. De la misma forma, en las preparaciones donde se eliminó el endotelio, no se observaron células endoteliales.

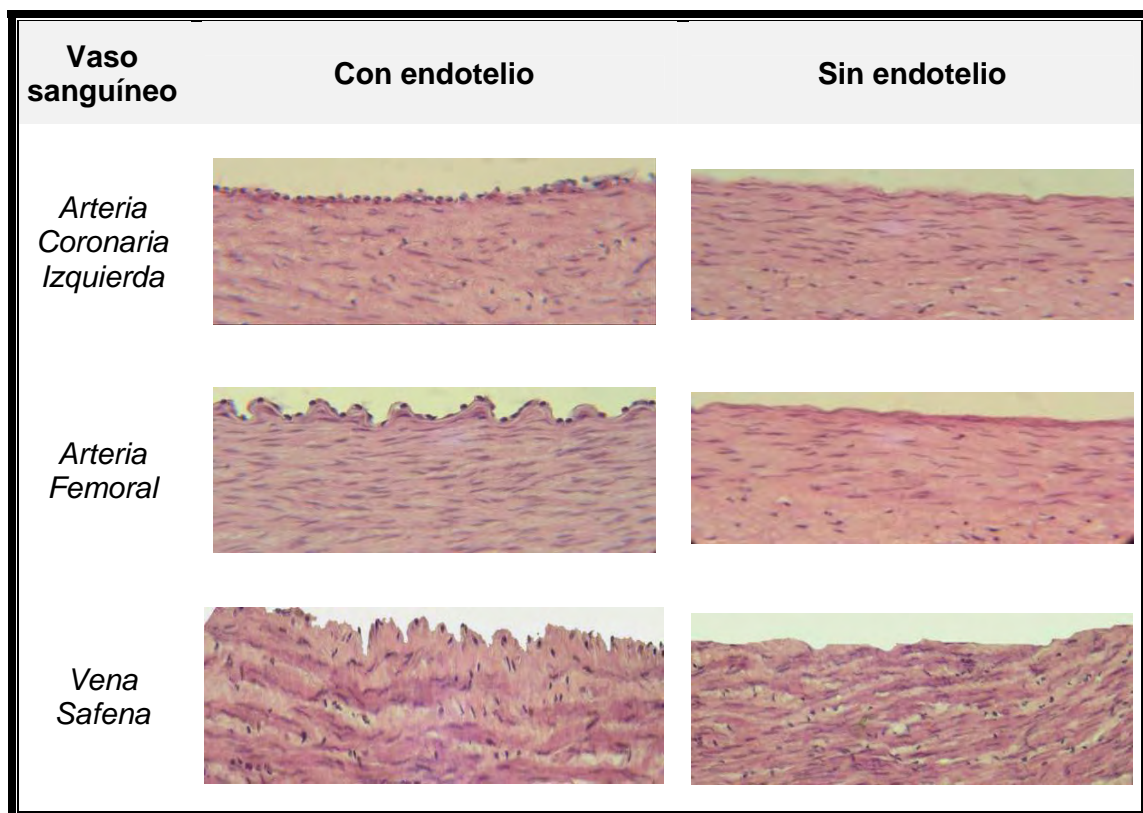


Fig. 15. Fotomicrografías de la sección transversal de la pared de la arteria coronaria, la arteria femoral y la vena safena caninas con y sin endotelio vascular (X40).

7. Discusión

7.1 General

Los resultados de esta tesis muestran que la testosterona, 5 α -DHT y 5 β -DHT a concentraciones suprafisiológicas (1.8-310 μ M), fueron capaces de inducir vasodilatación en preparaciones con y sin endotelio de la arteria coronaria izquierda, la arteria femoral y la vena safena del perro macho adulto.

El efecto vasodilatador inducido por los andrógenos, a todas las concentraciones probadas, fue inmediato (~2 min), indicando que éste es un efecto no genómico, es decir, no es mediado por el receptor intracelular de andrógenos (RA), ni requiere la síntesis y transcripción de proteínas (procesos que, juntos, tardan al menos ~40 min); esto también fue confirmado, al revertir el efecto cuando los andrógenos fueron retirados del tejido y se observó una recuperación total de la amplitud y del tono en una segunda contracción. Lo anterior, además se refuerza con la capacidad vasodilatadora de 5 β -DHT, en todos los vasos estudiados, el cual es un andrógeno con mínima o nula afinidad al RA (Fang *et al.*, 2003). Esta observación está en acuerdo con reportes previos que han mostrado que 5 β -DHT y algunos análogos de la testosterona, sin afinidad al RA, son capaces de relajar la arteria coronaria de conejo (Yue *et al.*, 1995), la aorta torácica de rata (Perusquía *et al.*, 1996; Perusquía y Villalón, 1999; Ding y Stallone, 2001; Montañaño *et al.*, 2008) y la arteria umbilical humana (Perusquía *et al.*, 2007).

Varios estudios han caracterizado que el efecto vasodilatador de los andrógenos es independiente de la clásica vía de acción genómica de las hormonas esteroides, siendo entonces de tipo no genómico, ya que se ha observado que la flutamida, un antagonista del RA, no modifica el efecto vasodilatador de la testosterona en la

arteria coronaria de conejo (Yue *et al.*, 1995), las arterias pulmonares (Jones *et al.*, 2002) y la aorta de rata (Tep-areenan *et al.*, 2003); la arteria coronaria (Teoh *et al.*, 2000) y prostática de cerdo (Navarro-Dorado *et al.*, 2008) y; la arteria umbilical humana (Perusquía *et al.*, 2007).

7.2 Participación del endotelio vascular en el efecto vasodilatador de andrógenos

El mecanismo preciso para explicar la acción nongenómica del efecto relajante de los andrógenos no ha quedado esclarecido. Así, se han hecho esfuerzos para determinar si existe alguna participación del endotelio vascular en el efecto vasodilatador que inducen los andrógenos. En el presente trabajo, se observó que la testosterona, 5 α -DHT y 5 β -DHT, a concentraciones de 1.8-310 μ M, provocaron un efecto vasodilatador sin diferencias entre las preparaciones con y sin endotelio en los tres vasos estudiados, indicando que el efecto vasodilatador de los andrógenos es independiente del endotelio en la arteria coronaria izquierda, la arteria femoral y la vena safena canina. Estos resultados coinciden con numerosos trabajos donde se ha demostrado que la vasodilatación inducida por la testosterona es preservada en vasos sin endotelio (Yue *et al.*, 1995; Perusquía *et al.*, 1996; Crews y Khalil, 1999; Honda *et al.*, 1999; Murphy y Khalil, 1999; Perusquía y Villalón, 1999; Deenadayalu *et al.*, 2001; Navarro-Dorado *et al.*, 2008) o en presencia de inhibidores de la NOS (L-NAME) o de la COX (indometacina) (Yue *et al.*, 1995; Honda *et al.*, 1999; Deenadayalu *et al.*, 2001; Jones *et al.*, 2002). A este respecto, es preciso señalar que la vasodilatación independiente del endotelio de los andrógenos, observada en los estudios anteriores y el presente trabajo, es dada a concentraciones suprafisiológicas (> 100 nM) y a altas concentraciones micromolares.

En este contexto, Rowell y colaboradores (2009) recientemente indicaron que en venas y arterias pulmonares humanas, la testosterona induce un efecto vasodilatador “bifásico”, es decir, que su acción vasodilatadora es independiente del endotelio a concentraciones suprafisiológicas (30-100 μ M), mientras que a concentraciones cercanas a las fisiológicas (1 nM-100 nM), muestra un efecto vasodilatador, parcialmente dependiente del endotelio.

En el presente estudio, también se pudo observar que dependiendo del tipo de vaso sanguíneo es, también, la importancia del endotelio vascular en la regulación del tono vasomotor. Nuestros datos muestran una función atípica en la vena safena, ya que a pesar de que el músculo liso de esta vena se relajó por acción de NPS (un donador de NO), la ACh y el CCh no provocaron relajación a través del endotelio, por el contrario la ACh y el CCh provocaron un incremento del tono de la contracción en preparaciones de vena safena con y sin endotelio. Estos resultados coinciden con otros reportes donde, de manera similar, se observó que la ACh incrementó el tono de la vena safena canina con endotelio (De Mey y Vanhoutte, 1982; Furchgott, 1983; Seidel y LaRochelle, 1987; Miller *et al.*, 1989; Argyle *et al.*, 1999) y de las venas pulmonar y esplénica caninas (De Mey *et al.*, 1982; Furchgott y Vanhoutte, 1989). Claramente, estas respuestas parecen no ser iguales en todas las venas, como en general se ha reportado, la capacidad de varios lechos vasculares a relajarse por ACh (Furchgott, 1983) es resultado directo de la producción de NO en las células endoteliales de los vasos sanguíneos (Furchgott, 1983; Miller, 1991).

Debido a que la vena safena se contrae por la ACh y el CCh, pero se relaja por el NO, como fue observado en las pruebas con NPS, en este trabajo y previamente (Verhaeghe y Shepherd, 1976); algunos estudios han sugerido que el endotelio de la vena safena canina no produce NO por acción de la ACh (De Mey *et al.*, 1982;

Furchgott, 1983; Seidel *et al.*, 1987). La vasoconstricción inducida por la ACh y el CCh en la vena safena con y sin endotelio podría ser explicada por: (i) una acción directa de la ACh sobre los receptores muscarínicos M1 y M3 en el músculo liso, los cuales se expresan más abundantemente en las venas que en las arterias (Furchgott, 1983; Ryberg *et al.*, 2008) y; (ii) a que el endotelio en las venas es menos reactivo que en las arterias (Wu y Thiagarajan, 1996). Es necesario señalar que, el incremento del tono inducido por la ACh en varios vasos sanguíneos, se ha atribuido a la disfuncionalidad del endotelio (Vanhoutte, 1996; Vanhoutte y Tang, 2008); aunque de manera controversial, también se ha reconocido que en lechos vasculares, sin daño aparente, el endotelio puede liberar factores que inducen vasoconstricción (Feletou y Vanhoutte, 2006). Se ha sugerido que, posiblemente, el endotelio modula de diferente manera el tono de cada lecho vascular (Aird, 2007).

7.3 Sensibilidad de los lechos vasculares caninos al efecto vasodilatador de andrógenos

En este trabajo, se muestra que la sensibilidad de la arteria coronaria izquierda, la arteria femoral (vasos de conductancia) y la vena safena (vaso de capacitancia), al efecto vasodilatador inducido por los andrógenos, fue diferente. Observándose que la arteria coronaria izquierda fue el vaso que mostró mayor sensibilidad a la relajación inducida por los tres andrógenos probados, la testosterona, 5 α -DHT y 5 β -DHT. La vena safena fue el siguiente vaso con mayor sensibilidad al efecto vasodilatador de la testosterona y 5 α -DHT y la arteria femoral fue el vaso con menor sensibilidad al efecto de la testosterona y su metabolito 5 α -reducido (5 α -DHT). Estos resultados indican que los vasos sanguíneos de la misma especie, usando un mismo

vasoconstrictor (KCl) difieren en su respuesta al efecto vasodilatador inducido por los andrógenos.

Las evidencias del presente estudio confirman que, dependiendo del lecho vascular será la eficacia o potencia vasodilatadora que los andrógenos puedan provocar, un hecho que explica la discrepancia entre los estudios disponibles, donde se ha observado que diferentes lechos vasculares, de la misma especie, presentan diferente sensibilidad a la acción vasodilatadora de la testosterona (ver Tabla 1). Es evidente que la diferencia entre especies debe, sin duda, ser otro factor que cuenta para no poder hacer coincidir la información, que indica diferencias en la potencia de la testosterona en vasos sanguíneos de especies diferentes (revisado por: Perusquía, 2003; Jones *et al.*, 2003b; Yildiz y Seyrek, 2007).

Otro factor en la inconsistencia de los datos sobre la efectividad de los andrógenos para producir vasorelajación aún los mismos vasos sanguíneos en la misma especie, es el hecho que se han usado, sin distinción, diferentes agentes vasoconstrictores. En este contexto, la simple explicación sobre la capacidad relajante provocada por los andrógenos, es que los reportes disponibles vienen de experimentos realizados en vasos precontracturados con varios agentes, tal como: (i) la despolarización del tejido; y (ii) la vasoconstricción inducida por agonistas. A este respecto es pertinente discutir estas diferencias.

Ha sido ampliamente reconocido que la despolarización membranal producida por altas concentraciones de KCl se debe a la estimulación de la entrada de Ca^{2+} del espacio extracelular, principalmente a través de los CCOV para inducir contracciones tónicas sostenidas en el músculo liso vascular. En contraste, la respuesta contráctil generada por diferentes agonistas como: $\text{PGF}_{2\alpha}$, Phe, 5-HT o NA puede ser por diferentes mecanismos. En general, la contracción inducida por un

agonista es conocida por activar la fosfolipasa C, una enzima que causa la conversión de fosfatidil inositol-4,5-bisfosfato a inositol 1,4,5-trifosfato (IP₃) y 1,2-diacilglicerol (Berridge y Irvine, 1984). En consecuencia, IP₃ estimula la liberación de Ca²⁺ de los reservorios intracelulares para causar un incremento transitorio en la concentración citoplasmática de Ca²⁺ (Suematsu *et al.*, 1984), mientras, 1,2-diacilglicerol activa la proteína cinasa C (Nishizuka, 1992). En particular, en el caso de PGF_{2α} y 5-HT se propone que el disparo de la entrada de Ca²⁺ extracelular es a través de ambos tipos de canales de Ca²⁺, tanto CCOV como CCOR (Medeiros y Calixto, 1991; Priest *et al.*, 1998). La Phe puede estimular dos vías; la liberación de Ca²⁺ del RE y el influjo de Ca²⁺ (Khalil y van Breemen, 1988). La contracción generada por NA puede, también, promover la entrada de Ca²⁺ extracelular por CCOV, CCOR y, además, a través de los SOCC. Sumado a lo anterior, también debe tomarse en cuenta que, los diversos lechos vasculares pueden presentar diferente densidad y distribución de los diferentes subtipos de receptores a los agonistas que generan vasoconstricción; como es el caso de los receptores α-adrenérgicos entre vasos sanguíneos de conductancia y de resistencia (Vargas y Gorman, 1995).

Debido a lo anterior, es importante enfatizar que la sensibilidad a la respuesta relajante que producen los andrógenos, varía sobre las distintas respuestas contráctiles, las cuales generan diferentes vías de señalización; sin embargo, los datos muestran que los andrógenos son capaces de relajar todas estas respuestas contráctiles, por lo que es preciso destacar que, en primera instancia, estos agentes contráctiles producen la estimulación de la entrada de Ca²⁺ externo, predominantemente, a través de CCOV, siendo éste el primer sitio del blanco de la acción de los andrógenos, como se ha postulado previamente (Crews y Khalil, 1999;

Perusquía y Villalón, 1999; Perusquía, 2003; Jones *et al.*, 2003b; Scragg *et al.*, 2004; Hall *et al.*, 2006; Scragg *et al.*, 2007; Montaña *et al.*, 2008). Cabe indicar que la exploración del mecanismo de la acción vasodilatadora de los andrógenos escapa de los objetivos del presente trabajo.

Los datos de esta tesis aclaran la aparente discrepancia existente sobre la capacidad relajante de los andrógenos, mostrando que aún en la misma especie (perro) y sobre respuestas producidas por el mismo agente vasoconstrictor (KCl), esta controversia radica en el hecho de la diferente naturaleza cada vaso sanguíneo, e.g., respuesta a vasorelajantes y vasoconstrictores, dependiendo de la función de cada tipo de vaso sanguíneo; conductancia, resistencia o capacitancia. En resumen, como se puede apreciar, la comparación que ha generado discrepancia ha sido indebida.

En el presente trabajo es importante destacar que, la arteria coronaria izquierda fue el vaso más sensible a la vasodilatación inducida por los andrógenos, posiblemente debido a su importante papel en la regulación del flujo sanguíneo coronario; mientras que el vaso menos sensible resultó ser la arteria femoral. De forma notable, la vena safena resultó ser igualmente sensible al efecto vasodilatador de los andrógenos, pero se pudo apreciar que es un vaso con función atípica, dado que resultó ser insensible a la respuesta relajante de ACh y CCh y, por los resultados con los andrógenos, parece ser más resistente a la relajación (con menor reactividad, en comparación con la arteria coronaria); no obstante, aunque menos drástica, la respuesta de los andrógenos se observó.

7.4 Relación estructura química-efecto vasodilatador de andrógenos en vasos caninos

Los resultados de este trabajo, muestran que la potencia y eficacia de los diferentes andrógenos estudiados difiere en cada vaso sanguíneo; en la arteria coronaria izquierda 5β -DHT fue alrededor de tres veces más potente para inducir vasodilatación, en comparación con su precursor, la testosterona; de forma similar, en la arteria femoral 5β -DHT mostró el doble de potencia vasodilatadora que la testosterona; en contraparte, su isómero 5α -DHT mostró menor potencia en ambas arterias caninas estudiadas. Cabe resaltar que la potencia de 5β -DHT fue igual en la arteria femoral y en la vena safena y, que en dicha vena, la potencia vasodilatadora de los 3 andrógenos fue igual; sin embargo, marcadamente la eficacia de 5α -DHT fue menor en la vena safena y la arteria femoral.

Con excepción de la vena safena, se observó que 5β -DHT puede inducir una aguda vasorelajación, mayor a testosterona, como se ha reportado en otros vasos sanguíneos (Perusquía *et al.*, 1996; Perusquía 2007; Montañó *et al.*, 2008); además de otros músculos lisos como el uterino (Perusquía *et al.*, 2005; revisado por Perusquía, 2003) e intestinal (Kubli-Garfias *et al.*, 1987), donde también se determinó que 5α -DHT induce una tenue respuesta relajante.

A este respecto, se ha propuesto que la diferente potencia y eficacia vasodilatadora de estos andrógenos, podría atribuirse a las diferencias en la conformación estructural de los andrógenos. Todos los andrógenos comparten un núcleo esteroide, pero poseen grupos funcionales o arreglos estereoquímicos diferentes, cambiando así, su conformación estructural. Como se observa en la Fig. 16, la conformación $\Delta^{4,3}$ -ceto de la testosterona tiene un núcleo esteroide plano, semejante a su metabolito 5α -reducido que posee una configuración *5 α /trans*. En

marcado contraste, el metabolito 5β -reducido de la testosterona con configuración β /cis, obliga al anillo "A" a rotarse 90° con respecto a los otros anillos de la estructura esteroidal.

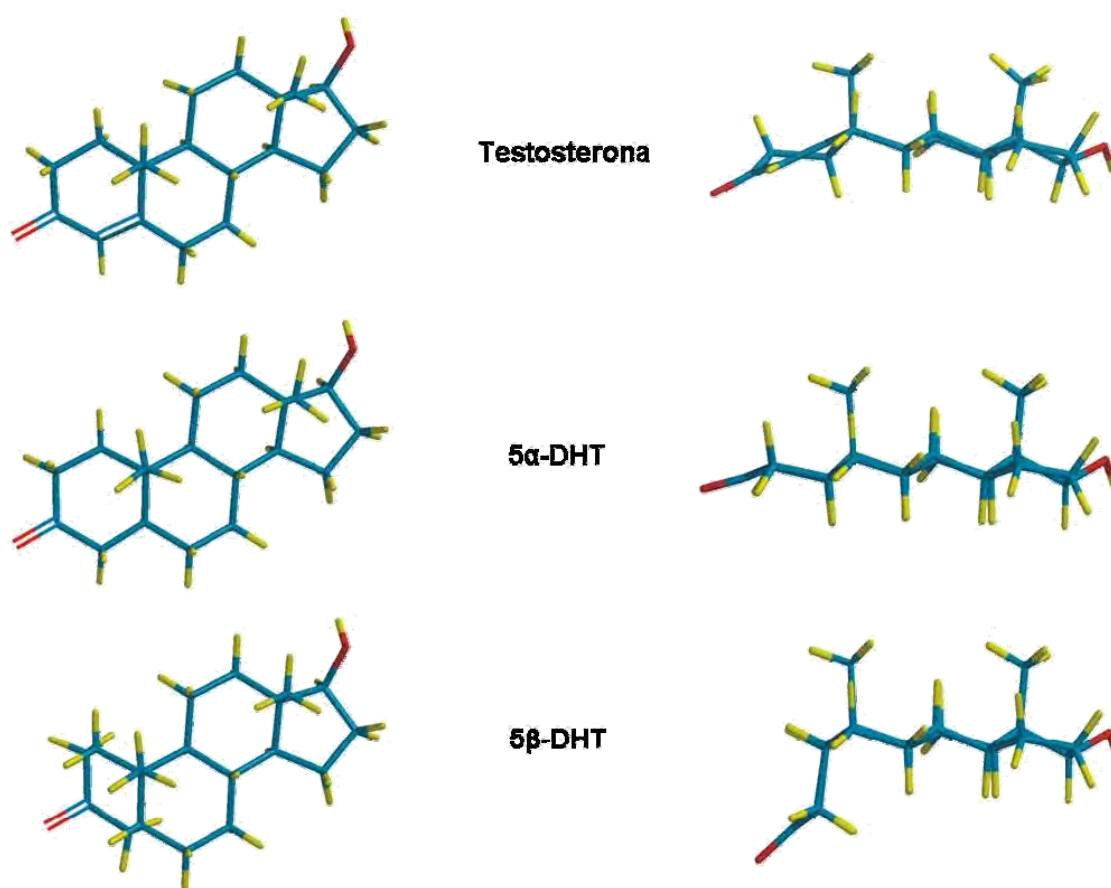


Fig. 16. Estereoquímica de las moléculas de andrógenos en vista frontal (panel izquierdo) y en vista lateral (panel derecho) mostrando: la estructura $\Delta 4,3$ -ceto de la testosterona; la conformación α /trans de 5 α -DHT (5 α -dihidrottestosterona) y la conformación 5β /cis de 5 β -DHT (5 β -dihidrottestosterona).

Inicialmente, Yue y colaboradores (1995) fueron los primeros en considerar que el efecto vasodilatador de los andrógenos podría estar determinado por la estructura de estos; ellos mostraron que el grupo hidroxilo en la posición 17β podría ser importante para el efecto vasodilatador de los andrógenos, ya que observaron que análogos de testosterona (3α -hidroxi- 5α -androst-16-ene y enantato de testosterona), carentes de este grupo funcional, eran menos eficaces que la testosterona para vasorelajar la arteria coronaria de conejo.

Los hallazgos del presente trabajo, muestran que la configuración $5\beta/cis$ de 5β -DHT, posiblemente le confiere mayor potencia vasodilatadora en comparación con los andrógenos que tienen una estructura esteroidal plana como la testosterona y 5α -DHT. Lo anterior está en línea con lo observado en la aorta de rata y la arteria umbilical humana (Perusquía *et al.*, 1996; Perusquía, 2003; Perusquía *et al.*, 2007). Por lo tanto, la configuración $5\beta/cis$ es esencial para una optima acción vasodilatadora.

Sin embargo, la baja potencia vasodilatadora de 5α -DHT, podría ser el resultado de la configuración $5\alpha/trans$, que disminuye la potencia vasodilatadora en los andrógenos 5α -reducidos, como se ha observado en otros vasos sanguíneos (Perusquía *et al.*, 1996; Perusquía, 2003; Perusquía *et al.*, 2007).

7.5 Importancia de la acción vasodilatadora de los andrógenos

El efecto vasodilatador inducido por la testosterona y sus dihidrometabolitos en los tres vasos caninos estudiados indica que, estos andrógenos son importantes moduladores del tono vasomotor, al inducir vasorelajación. A pesar que este efecto vasodilatador se observó a concentraciones suprafisiológicas, en el rango micromolar (1.8-310 μ M), previamente, se ha mostrado que la habilidad

vasodilatadora de la testosterona se mantiene, a concentraciones cercanas a las fisiológicas (0.1 nM-100 nM), en la arteria coronaria de perro (Chou *et al.*, 1996) (donde la testosterona se administró a concentraciones nanomolares *in vivo*, en contraste en la presente tesis se aplicaron concentraciones micromolares *in vitro*); en las arterias mesentéricas de rata (Tep-areenan *et al.*, 2002) y; en las venas y arterias pulmonares humanas (Rowell, *et al.*, 2009). Aunado a lo anterior y como consecuencia de una vasodilatación, se ha reportado que en condiciones *in vivo* 5 β -DHT produce una respuesta vasodepresora sobre la respuesta presora de NA en ratas descerebradas y desmeduladas (Perusquía y Villalón, 2002), esta acción resulta ser de vital importancia en la regulación de la presión arterial.

Se admite que la determinación del efecto vasodilatador a concentraciones micromolares puede cuestionar su relevancia fisiológica, por lo cual, es importante considerar las limitaciones de las condiciones experimentales *in vitro* utilizadas en esta investigación, ya que debido a las propiedades hidrofóbicas de los andrógenos es necesario la adición de altas concentraciones de andrógenos para detectar su efecto vasodilatador, por lo que la concentración final que llegó al tejido, posiblemente sea menor a la concentración adicionada.

Por otro lado, numerosas evidencias indican que en hombres con bajos niveles de andrógenos, la administración de testosterona, a concentraciones fisiológicas, induce varios efectos cardioprotectores, entre ellos, la vasodilatación (Khaw y Barrett-Connor, 1991; Phillips *et al.*, 1994; Alexandersen *et al.*, 1996; English *et al.*, 1997; English *et al.*, 2000; Zitzmann *et al.*, 2002; Littleton-Kearney y Hurn, 2004; Nettleship *et al.*, 2009; Traish *et al.*, 2009c). Asimismo, se ha considerado que la deficiencia de andrógenos es, *per se*, un factor de riesgo cardiovascular (Jones *et al.*, 2003a; Traish *et al.*, 2009c), ya que hay una ausencia de los beneficios

cardiovasculares de los andrógenos. En este contexto, Jones y colaboradores (2003) mostraron que ratones con feminización testicular, con hipotestosteronemia, tienen mayores riesgos cardiovasculares, ya que en estos ratones se observó reducida la funcionalidad del endotelio vascular y se incrementaron los niveles plasmáticos de colesterol.

A pesar de los riesgos cardiovasculares en hombres con niveles bajos de andrógenos (Khaw y Barrett-Connor, 1991; Phillips *et al.*, 1994; Alexandersen *et al.*, 1996; English *et al.*, 1997; Zitzmann *et al.*, 2002; Littleton-Kearney y Hurn, 2004; Nettleship *et al.*, 2009) y a los beneficios de la terapia sustitutiva con testosterona (Mårin *et al.*, 1992; Malkin *et al.*, 2006), actualmente la administración terapéutica de la testosterona es controversial, debido a que varios reportes han indicado que incrementa los riesgos cardiovasculares (Haffner *et al.*, 1983; Kantor *et al.*, 1985; Enzi *et al.*, 1990; Rockhold, 1993; Meriggiola *et al.*, 1995; Lovejoy *et al.*, 1996; Sullivan *et al.*, 1998) a elevadas dosis farmacológicas, cuando la testosterona es usada como anabólico o para transexuales (female to male). Además el desarrollo prostático y de otros órganos masculinos es asociado a 5α -DHT y el cáncer de próstata está íntimamente relacionado con esta hormona (Titus *et al.*, 2005; Pierorazio *et al.*, 2009; Gat *et al.*, 2009).

Por lo anterior, y con base a que el dihidrometabolito de la testosterona 5β -DHT fue, por mucho, el andrógeno más potente en la arteria coronaria izquierda (la cual tiene un papel fundamental en la regulación del flujo sanguíneo en el corazón), es claro que este derivado de la testosterona podría poseer un importante uso terapéutico en padecimientos cardiovasculares, como en la aterosclerosis coronaria, que puede causar infarto al miocardio. Asimismo, 5β -DHT, también mostró ser un importante vasodilatador en los vasos sistémicos, la arteria femoral y la vena safena,

por lo que su potencial terapéutico, también podría ser considerado en enfermedades vasculares sistémicas como la obstrucción arterial o venosa periférica y la hipertensión arterial. Finalmente, es necesario remarcar que 5 β -DHT es un andrógeno que carece de afinidad al RA (Fang *et al.*, 2003) y no es aromatizado a estrógenos (Poletti *et al.*, 1998; Pozzi *et al.*, 2003). Así, estas propiedades muestran que dicho andrógeno no presentaría efectos secundarios, como andrógenización o estrogenización. Finalmente, cabe aclarar que los diversos efectos inducidos por los andrógenos en diferentes órganos y sistemas, así como sus múltiples mecanismos de acción (Kang *et al.*, 2003) requieren ser considerados antes de prescribir la terapia con andrógenos.

8. CONCLUSIONES

- El efecto vasodilatador inducido por la testosterona y sus dihidrometabolitos en los tres vasos caninos estudiados (arterias coronaria izquierda y femoral; vena safena), indica que estos andrógenos son importantes moduladores del tono vasomotor.
- La sensibilidad al efecto vasodilatador inducido por los andrógenos difiere dependiendo del tipo de vaso sanguíneo, es decir, depende de la naturaleza y funcionalidad de cada lecho vascular.
- El efecto vasodilatador de la testosterona, 5α -DHT y 5β -DHT, a concentraciones suprafisiológicas (1.8-310 μ M), fue independiente del endotelio vascular en la arteria coronaria izquierda, la arteria femoral y la vena safena caninas.
- Los resultados de este trabajo muestran que 5β -DHT fue el andrógeno con mayor potencia, respecto a testosterona y 5α -DHT, en la arteria coronaria izquierda y la arteria femoral, sugiriendo que la configuración $5\beta/cis$ de este dihidrometabolito optimiza su potencia vasodilatadora. Así, la potencia y eficacia depende de la estructura química de cada andrógeno.

9. REFERENCIAS

1. Adams MR, Williams JK, Kaplan JR (1995) Effects of androgens on coronary artery atherosclerosis and atherosclerosis-related impairment of vascular responsiveness. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 15:562-70.
2. Aird WC (2007) Phenotypic heterogeneity of the endothelium: II. Representative vascular beds. *Circ.Res.* 100:174-190.
3. Alexandersen P, Haarbo J, Christiansen C (1996) The relationship of natural androgens to coronary heart disease in males: a review. *Atherosclerosis* 125:1-13.
4. Argyle SA, Dargie H, McGRATH JC (1999) Alterations in vascular reactivity in isolated vessel segments from dogs with naturally occurring heart failure. *Res.Vet.Sci.* 67:277-284.
5. Arnold AP, Gorski RA (1984) Gonadal steroid induction of structural sex differences in the central nervous system. *Annu.Rev.Neurosci.* 7:413-42.
6. Azad N, Pitale S, Barnes WE, Friedman N (2003) Testosterone treatment enhances regional brain perfusion in hypogonadal men. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 88:3064-8.
7. Barbagallo M, Shan J, Pang PK, Resnick LM (1995) Effects of dehydroepiandrosterone sulfate on cellular calcium responsiveness and vascular contractility. *Hypertension* 26:1065-9.
8. Berridge MJ y Irvine RF (1984) Inositol trisphosphate, a novel second messenger in cellular signal transduction. *Nature* 312:315-321.
9. Bidlingmaier F, Dorr HG, Eisenmenger W, Kuhnle U, Knorr D (1986) Contribution of the adrenal gland to the production of androstenedione and testosterone during the first two years of life. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 62:331-5.

10. Blouin K, Richard C, Brochu G, Hould FS, Lebel S, Marceau S, Biron S, Luu-The V, Tchernof A (2006) Androgen inactivation and steroid-converting enzyme expression in abdominal adipose tissue in men. *J.Endocrinol.* 191:637-49.
11. Cairrao E, Alvarez E, Santos-Silva AJ, Verde I (2008) Potassium channels are involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch.Pharmacol.* 376:375-83.
12. Chou TM, Sudhir K, Hutchison SJ, Ko E, Amidon TM, Collins P, Chatterjee K (1996) Testosterone induces dilation of canine coronary conductance and resistance arteries in vivo. *Circulation* 94:2614-9.
13. Costarella CE, Stallone JN, Rutecki GW, Whittier FC (1996) Testosterone causes direct relaxation of rat thoracic aorta. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 277:34-9.
14. Crews JK, Khalil RA (1999) Antagonistic effects of 17 β -estradiol, progesterone, and testosterone on Ca²⁺ entry mechanisms of coronary vasoconstriction. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 19:1034-40.
15. Deenadayalu VP, White RE, Stallone JN, Gao X, Garcia AJ (2001) Testosterone relaxes coronary arteries by opening the large-conductance, calcium-activated potassium channel. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 281:H1720-7.
16. De Mey JG y Vanhoutte PM (1982) Heterogeneous behavior of the canine arterial and venous wall. Importance of the endothelium. *Circ.Res.* 51:439-447.
17. Ding AQ, Stallone JN (2001) Testosterone-induced relaxation of rat aorta is androgen structure specific and involves K⁺ channel activation. *J.Appl.Physiol* 91:2742-50.
18. Diver MJ, Imtiaz KE, Ahmad AM, Vora JP, Fraser WD (2003) Diurnal rhythms of serum total, free and bioavailable testosterone and of SHBG in middle-aged men compared with those in young men. *Clin.Endocrinol.(Oxf)* 58:710-7.
19. Dubey RK, Jackson EK (2001) Estrogen-induced cardiorenal protection: potential cellular, biochemical, and molecular mechanisms. *Am.J.Physiol.* 280:F365-88.

20. English KM, Jones RD, Jones TH, Morice AH, Channer KS (2001) Gender differences in the vasomotor effects of different steroid hormones in rat pulmonary and coronary arteries. *Horm.Metab Res.* 33:645-52.
21. English KM, Jones RD, Jones TH, Morice AH, Channer KS (2002) Testosterone acts as a coronary vasodilator by a calcium antagonistic action. *J Endocrinol Invest* 25:455-8.
22. English KM, Steeds R, Jones TH, Channer KS (1997) Testosterone and coronary heart disease: is there a link? *QJM.* 90:787-91.
23. English K, Jones RD, Channer KS, Jones TH (2000) The coronary vasodilatory effect of testosterone is mediated at the cell membrane, not by an intracellular receptor. *J.Endocrinol* 164:296.
24. Enzi G, Casadei A, Sergi G, Chiarelli A, Zurlo F, Mazzoleni F (1990) Metabolic and hormonal effects of early nutritional supplementation after surgery in burn patients. *Crit Care Med.* 18:719-21.
25. Fang H, Tong W, Branham WS, Moland CL, Dial SL, Hong H, Xie Q, Perkins R, Owens W, Sheehan DM (2003) Study of 202 natural, synthetic, and environmental chemicals for binding to the androgen receptor. *Chem.Res.Toxicol.* 16:1338-58.
26. Farhat MY, Lavigne MC, Ramwell PW (1996) The vascular protective effects of estrogen. *FASEB J.* 10:615-24.
27. Farrukh IS, Peng W, Orlinska U, Hoidal JR (1998) Effect of dehydroepiandrosterone on hypoxic pulmonary vasoconstriction: a Ca^{2+} -activated K^{+} -channel opener. *Am.J.Physiol* 274:L186-95.
28. Fausett MB, Belfort MA, Nanda R, Saade GR, Vedernikov Y (1999) The effects of sex steroids on human umbilical artery and vein. *J.Soc.Gynecol.Investig.* 6:27-31.
29. Feletou M y Vanhoutte PM (2006) Endothelium-derived hyperpolarizing factor: where are we now? *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 26:1215-1225.

30. Furchgott RF (1983) Role of endothelium in responses of vascular smooth muscle. *Circ.Res.* 53:557-573.
31. Furchgott RF y Vanhoutte PM (1989) Endothelium-derived relaxing and contracting factors. *FASEB J.* 3:2007-2018.
32. Gat Y, Joshua S, Gornish MG (2009) Prostate cancer: a newly discovered route for testosterone to reach the prostate: Treatment by super-selective intraprostatic androgen deprivation. *Andrologia* 41:305-15.
33. Geary GG, Krause DN, Duckles SP (2000) Gonadal hormones affect diameter of male rat cerebral arteries through endothelium-dependent mechanisms. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 279:H610-18.
34. Getov SV, Lee RW, Dockery F, Rajkumar C (2008) Androgens, ageing and vascular function. *Age Ageing* 37:361-3.
35. Grino PB, Griffin JE, Wilson JD (1990) Testosterone at high concentrations interacts with the human androgen receptor similarly to dihydrotestosterone. *Endocrinology* 126:1165-72.
36. Gupte SA, Tateyama M, Okada T, Oka M, Ochi R (2002) Epiandrosterone, a metabolite of testosterone precursor, blocks L-type calcium channels of ventricular myocytes and inhibits myocardial contractility. *J.Mol.Cell Cardiol.* 34:679-88.
37. Haffner SM, Kushwaha RS, Foster DM, pplebaum-Bowden D, Hazzard WR (1983) Studies on the metabolic mechanism of reduced high density lipoproteins during anabolic steroid therapy. *Metabolism* 32:413-20.
38. Hall J, Jones RD, Jones TH, Channer KS, Peers C (2006) Selective inhibition of L-type Ca^{2+} channels in A7r5 cells by physiological levels of testosterone. *Endocrinology* 147:2675-80.
39. Hamm L (1942) Testosterone propionate in the treatment of angina pectoris. *J Clin Endocrinol* 2:325-8.

40. Hata T, Hashimoto M, Senoh D, Hata K, Kitao M, Masumura S (1995) Effect of dehydroepiandrosterone sulfate on ophthalmic artery flow velocity waveforms in full-term pregnant women. *Am.J.Perinatol.* 12:135-7.
41. Heinlein CA, Chang C (2002) The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol.Endocrinol.* 16:2181-7.
42. Herman SM, Robinson JT, McCredie RJ, Adams MR, Boyer MJ, Celermajer DS (1997) Androgen deprivation is associated with enhanced endothelium-dependent dilatation in adult men. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.* 17:2004-9.
43. Honda H, Unemoto T, Kogo H (1999) Different mechanisms for testosterone-induced relaxation of aorta between normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension* 34:1232-6.
44. Irkilata HC, Yildiz O, Yildirim I, Seyrek M, Basal S, Dayanc M, Ulku C (2008) The vasodilator effect of testosterone on the human internal spermatic vein and its relation to varicocele grade. *J.Urol.* 180:772-6.
45. Jez JM, Penning TM (1998) Engineering steroid 5 β -reductase activity into rat liver 3 α -hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochemistry* 37:9695-703.
46. Jones RD, English KM, Pugh PJ, Morice AH, Jones TH, Channer KS (2002) Pulmonary vasodilatory action of testosterone: evidence of a calcium antagonistic action. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 39:814-23.
47. Jones RD, Pugh PJ, Hall J, Channer KS, Jones TH (2003a) Altered circulating hormone levels, endothelial function and vascular reactivity in the testicular feminised mouse. *Eur.J.Endocrinol.* 148:111-20.
48. Jones RD, Pugh PJ, Jones TH, Channer KS (2003b) The vasodilatory action of testosterone: a potassium-channel opening or a calcium antagonistic action? *Br.J.Pharmacol.* 138:733-44.
49. Jones RD, Ruban LN, Morton IE, Roberts SA, English KM, Channer KS, Jones TH (2003c) Testosterone inhibits the prostaglandin F $_{2\alpha}$ -mediated increase in intracellular calcium in A7r5 aortic smooth muscle cells: evidence of an

- antagonistic action upon store-operated calcium channels. *J Endocrinol* 178:381-93.
50. Jousilahti P, Vartiainen E, Tuomilehto J, Puska P (1999) Sex, age, cardiovascular risk factors, and coronary heart disease: a prospective follow-up study of 14 786 middle-aged men and women in Finland. *Circulation* 99:1165-72.
 51. Kang HY, Tsai MY, Chang C, Huang KE (2003) Mechanisms and clinical relevance of androgens and androgen receptor actions. *Chang Gung.Med J* 26:388-402.
 52. Kang SM, Jang Y, Kim JY, Chung N, Cho SY, Chae JS, Lee JH (2002) Effect of oral administration of testosterone on brachial arterial vasoreactivity in men with coronary artery disease. *Am.J.Cardiol.* 89:862-4.
 53. Kantor MA, Bianchini A, Bernier D, Sady SP, Thompson PD (1985) Androgens reduce HDL2-cholesterol and increase hepatic triglyceride lipase activity. *Med.Sci.Sports Exerc.* 17:462-5.
 54. Khalil RA y van Breemen C (1988) Sustained contraction of vascular smooth muscle: calcium influx or C-kinase activation? *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 244:537-542.
 55. Khaw KT, Barrett-Connor E (1991) Endogenous sex hormones, high density lipoprotein cholesterol, and other lipoprotein fractions in men. *Arterioscler.Thromb.* 11:489-94.
 56. Kubli-Garfias C, Medina-Jiménez M, García-Yañez E, Vázquez-Álvarez A, Perusquía M, Gómez-García N, Almanza J, Ibañez R, Rodríguez R (1987) Relaxant action of androgens, progestins and corticosteroids on the isolated ileum of the guinea pig. *Acta Physiol Pharmacol.Latinoam.* 37:357-364.
 57. Lafayette SS, Vladimirova I, Garcez-do-Carmo L, Monteforte PT, Caricati NA, Jurkiewicz A (2008) Evidence for the participation of calcium in non-genomic relaxations induced by androgenic steroids in rat vas deferens. *Br.J.Pharmacol.* 153:1242-50.

58. Levy D, Kannel WB (1988) Cardiovascular risks: new insights from Framingham. *Am.Heart J.* 116:266-72.
59. Lillestøl IK, Helle KB, Aardal S (1998) Relaxing effects of cyclic GMP and cyclic AMP-enhancing agents on the long-lasting contraction to endothelin-1 in the porcine coronary artery. *Scand.J.Clin.Lab Invest* 58:625-34.
60. Littleton-Kearney M, Hurn PD (2004) Testosterone as a modulator of vascular behavior. *Biol.Res.Nurs.* 5:276-85.
61. Lovejoy JC, Bray GA, Bourgeois MO, Macchiavelli R, Rood JC, Greeson C, Partington C (1996) Exogenous androgens influence body composition and regional body fat distribution in obese postmenopausal women--a clinical research center study. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 81:2198-203.
62. Lyon MF (2002) X-chromosome inactivation and human genetic disease. *Acta Paediatr.Suppl* 91:107-12.
63. Malkin CJ, Jones RD, Jones TH, Channer KS (2006) Effect of testosterone on ex vivo vascular reactivity in man. *Clin.Sci.(Lond)* 111:265-74.
64. Mårin P, Holmäng S, Jönsson L, Sjöström L, Kvist H, Holm G, Lindstedt G, Bjorntoröp P (1992) The effects of testosterone treatment on body composition and metabolism in middle-aged obese men. *Int.J Obes.Relat Metab Disord.* 16:991-7.
65. Matsuda K, Sakamoto H, Kawata M (2008) Androgen action in the brain and spinal cord for the regulation of male sexual behaviors. *Curr.Opin.Pharmacol.* 8:747-51.
66. McCredie RJ, McCrohon JA, Turner L, Griffiths KA, Handelsman DJ, Celermajer DS (1998) Vascular reactivity is impaired in genetic females taking high-dose androgens. *J.Am.Coll.Cardiol.* 32:1331-5.
67. McLachlan RI, O'Donnell L, Meachem SJ, Stanton PG, de Kretser DM, Pratis K, Robertson DM (2002) Identification of specific sites of hormonal regulation in spermatogenesis in rats, monkeys, and man. *Recent Prog.Horm.Res.* 57:149-79.

68. Medeiros YS y Calixto JB (1991) Influence of calcium entry blockers and calmodulin inhibitors on 5-hydroxytryptamine-, potassium- and calcium-induced contractions in human umbilical artery in-vitro. *J.Pharm.Pharmacol.* 43:411-416.
69. Merigliola MC, Marcovina S, Paulsen CA, Bremner WJ (1995) Testosterone enanthate at a dose of 200 mg/week decreases HDL-cholesterol levels in healthy men. *Int.J.Androl* 18:237-42.
70. Miller VM (1991) Selective production of endothelium-derived nitric oxide in canine femoral veins. *Am.J.Physiol* 261:H677-H682.
71. Miller VM, Komori K, Burnett JC, Jr., Vanhoutte PM (1989) Differential sensitivity to endothelin in canine arteries and veins. *Am.J.Physiol* 257:H1127-H1131.
72. Montaña LM, Calixto E, Figueroa A, Flores-Soto E, Carbajal V, Perusquía M (2008) Relaxation of androgens on rat thoracic aorta: testosterone concentration dependent agonist/antagonist L-type Ca^{2+} channel activity, and 5β -dihydrotestosterone restricted to L-type Ca^{2+} channel blockade. *Endocrinology* 149:2517-26.
73. Mosnárová A, Huzuláková I, Stecová A, Slámová J, Motesická M (1994) The influence of 1-month sex hormones administration on the isolated rabbit vessels reactivity. *Acta Physiol Hung* 82:251-6.
74. Murphy JG, Khalil RA (1999) Decreased $[Ca^{2+}]_i$ during inhibition of coronary smooth muscle contraction by 17β -estradiol, progesterone, and testosterone. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 291:44-52.
75. Navarro-Dorado J, Orensanz LM, Recio P, Bustamante S, Benedito S, Martínez AC, García-Sacristan A, Prieto D, Hernández M (2008) Mechanisms involved in testosterone-induced vasodilatation in pig prostatic small arteries. *Life Sci.* 83:569-73.
76. Nettleship JE, Jones RD, Channer KS, Jones TH (2009) Testosterone and coronary artery disease. *Front Horm.Res.* 37:91-107.
77. Nishizuka Y (1992) Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science* 258:607-614.

78. Ong PJ, Patrizi G, Chong WC, Webb CM, Hayward CS, Collins P (2000) Testosterone enhances flow-mediated brachial artery reactivity in men with coronary artery disease. *Am.J.Cardiol.* 85:269-72.
79. Ostátníková D, Celec P, Putz Z, Hodosy J, Schmidt F, Laznibatova J, Kudela M (2007) Intelligence and salivary testosterone levels in prepubertal children. *Neuropsychologia* 45:1378-85.
80. Osuna JA, Gomez-Perez R, rata-Bellabarba G, Villaroel V (2006) Relationship between BMI, total testosterone, sex hormone-binding-globulin, leptin, insulin and insulin resistance in obese men. *Arch.Androl* 52:355-61.
81. Penning TM, Burczynski ME, Jez JM, Hung CF, Lin HK, Ma H, Moore M, Palackal N, Ratnam K (2000) Human 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1-AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones. *Biochem.J.* 351:67-77.
82. Perusquía M (2003) Androgen-induced vasorelaxation: a potential vascular protective effect. *Exp.Clin.Endocrinol.Diabetes* 111:55-9.
83. Perusquía M, Hernández R, Morales MA, Campos MG, Villalón CM (1996) Role of endothelium in the vasodilating effect of progestins and androgens on the rat thoracic aorta. *Gen.Pharmacol.* 27:181-5.
84. Perusquía M, Navarrete E, Jasso-Kamel J, Montaña LM (2005) Androgens induce relaxation of contractile activity in pregnant human myometrium at term: a nongenomic action on L-type calcium channels. *Biol.Reprod.* 73:214-221.
85. Perusquía M, Navarrete E, González L, Villalón CM (2007) The modulatory role of androgens and progestins in the induction of vasorelaxation in human umbilical artery. *Life Sci.* 81:993-1002.
86. Perusquía M, Villalón CM (1999) Possible role of Ca²⁺ channels in the vasodilating effect of 5b-dihydrotestosterone in rat aorta. *Eur.J.Pharmacol.* 371:169-78.

87. Perusquía M, Villalón CM (2002) The vasodepressor effect of androgens in pithed rats: potential role of calcium channels. *Steroids* 67:1021-8.
88. Phillips GB, Pinkernell BH, Jing TY (1994) The association of hypotestosteronemia with coronary artery disease in men. *Arterioscler.Thromb.* 14:701-6.
89. Pierorazio PM, Ferrucci L, Kettermann A, Longo DL, Metter EJ, Carter HB (2009) Serum testosterone is associated with aggressive prostate cancer in older men: results from the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *BJU.Int.*
90. Poletti A, Coscarella A, Negri-Cesi P, Colciago A, Celotti F, Martini L (1998) 5 α -reductase isozymes in the central nervous system. *Steroids* 63:246-51.
91. Pozzi P, Bendotti C, Simeoni S, Piccioni F, Guerini V, Marron TU, Martini L, Poletti A (2003) Androgen 5-alpha-reductase type 2 is highly expressed and active in rat spinal cord motor neurones. *J.Neuroendocrinol.* 15:882-7.
92. Priest RM, Robertson TP, Leach RM, Ward JP (1998) Membrane potential-dependent and -independent vasodilation in small pulmonary arteries from chronically hypoxic rats. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 285:975-982.
93. Pugh PJ, Jones TH, Channer KS (2003) Acute haemodynamic effects of testosterone in men with chronic heart failure. *Eur.Heart J.* 24:909-15.
94. Quan A, Teoh H, Man RY (1999) Acute exposure to a low level of testosterone impairs relaxation in porcine coronary arteries. *Clin.Exp.Pharmacol.Physiol* 26:830-2.
95. Rabe KF, Tenor H, Dent G, Schudt C, Nakashima M, Magnussen H (1994) Identification of PDE isozymes in human pulmonary artery and effect of selective PDE inhibitors. *Am.J.Physiol* 266:L536-43.
96. Raeymaekers L, Hofmann F, Casteels R (1988) Cyclic GMP-dependent protein kinase phosphorylates phospholamban in isolated sarcoplasmic reticulum from cardiac and smooth muscle. *Biochem.J.* 252:269-73.
97. Ray R, Novotny NM, Crisostomo PR, Lahm T, Abarbanell A, Meldrum DR (2008) Sex steroids and stem cell function. *Mol.Med.* 14:493-501.

98. Rockhold RW (1993) Cardiovascular toxicity of anabolic steroids. *Annu.Rev.Pharmacol.Toxicol.* 33:497-520.
99. Rosano GM, Cornoldi A, Fini M (1998) Plasma testosterone levels in male patients with coronary artery disease. *Eur.Heart J.* 19:141A.
100. Rosano GM, Cornoldi A, Fini M (2005) Effects of androgens on the cardiovascular system. *J Endocrinol Invest* 28:32-8.
101. Rosano GM, Leonardo F, Pagnotta P, Pelliccia F, Panina G, Cerquetani E, la Monica PL, Bonfigli B, Volpe M, Chierchia SL (1999) Acute anti-ischemic effect of testosterone in men with coronary artery disease. *Circulation* 99:1666-70.
102. Rowell KO, Hall J, Pugh PJ, Jones TH, Channer KS, Jones RD (2009) Testosterone Acts as an Efficacious Vasodilator in Isolated Human Pulmonary Arteries and Veins : Evidence for a Biphasic Effect at Physiological and Supra-Physiological Concentrations. *J.Endocrinol.Invest*.DOI:10.3275/6331.
103. Ruixing Y, Jinzhen W, Shangling P, Weixiong L, Dezhai Y, Yuming C (2008) Sex differences in environmental and genetic factors for hypertension. *Am.J.Med.* 121:811-9.
104. Ryberg AT, Selberg H, Soukup O, Gradin K, Tobin G (2008) Cholinergic submandibular effects and muscarinic receptor expression in blood vessels of the rat. *Arch.Oral Biol.* 53:605-616.
105. Schrör K, Morinelli TA, Masuda A, Matsuda K, Mathur RS, Halushka PV (1994) Testosterone treatment enhances thromboxane A₂ mimetic induced coronary artery vasoconstriction in guinea pigs. *Eur.J.Clin.Invest* 24 Suppl 1:50-2.
106. Scragg JL, Dallas ML, Peers C (2007) Molecular requirements for L-type Ca²⁺ channel blockade by testosterone. *Cell Calcium* 42:11-5.
107. Scragg JL, Jones RD, Channer KS, Jones TH, Peers C (2004) Testosterone is a potent inhibitor of L-type Ca²⁺ channels. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 318:503-6.
108. Seidel CL y LaRochelle J (1987) Venous and arterial endothelia: different dilator abilities in dog vessels. *Circ.Res.* 60:626-630.

109. Seyrek M, Yildiz O, Ulusoy HB, Yildirim V (2007) Testosterone relaxes isolated human radial artery by potassium channel opening action. *J.Pharmacol.Sci.* 103:309-16.
110. Shahani S, Braga-Basaria M, Maggio M, Basaria S (2009) Androgens and Erythropoiesis: A Review. *J.Endocrinol.Invest.* Epub ahead of print Epub ahead of print.
111. Sinha-Hikim I, Taylor WE, Gonzalez-Cadavid NF, Zheng W, Bhasin S (2004) Androgen receptor in human skeletal muscle and cultured muscle satellite cells: up-regulation by androgen treatment. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 89:5245-55.
112. Smith AM, Bennett RT, Jones TH, Cowen ME, Channer KS, Jones RD (2008) Characterization of the vasodilatory action of testosterone in the human pulmonary circulation. *Vasc.Health Risk Manag.* 4:1459-66.
113. Stigler HL, Tulgan J (1943) Treatment of angina pectoris by testosterone propionate. *NY State J Med* 43:1424-8.
114. Stoffel-Wagner B (2001) Neurosteroid metabolism in the human brain. *Eur.J.Endocrinol.* 145:669-79.
115. Suematsu E, Hirata M, Hashimoto T, Kuriyama H (1984) Inositol 1,4,5-trisphosphate releases Ca^{2+} from intracellular store sites in skinned single cells of porcine coronary artery. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 120:481-485.
116. Sullivan AK, Nelson MR, Moyle GJ, Newell AM, Feher MD, Gazzard BG (1998) Coronary artery disease occurring with protease inhibitor therapy. *Int.J.STD AIDS* 9:711-2.
117. Teoh H, Quan A, Leung SW, Man RY (2000) Differential effects of 17β -estradiol and testosterone on the contractile responses of porcine coronary arteries. *Br.J.Pharmacol.* 129:1301-8.
118. Tep-areenan P, Kendall DA, Randall MD (2003) Mechanisms of vasorelaxation to testosterone in the rat aorta. *Eur.J.Pharmacol.* 465:125-32.

119. Tep-areenan P, Kendall DA, Randall MD (2002) Testosterone-induced vasorelaxation in the rat mesenteric arterial bed is mediated predominantly via potassium channels. *Br.J.Pharmacol.* 135:735-40.
120. Thompson PD, Ahlberg AW, Moyna NM, Duncan B, Ferraro-Borgida M, White CM, McGill CC, Heller GV (2002) Effect of intravenous testosterone on myocardial ischemia in men with coronary artery disease. *Am.Heart J.* 143:249-56.
121. Titus MA, Schell MJ, Lih FB, Tomer KB, Mohler JL (2005) Testosterone and dihydrotestosterone tissue levels in recurrent prostate cancer. *Clin Cancer Res.* 11:4653-7.
122. Traish AM, Guay A, Feeley R, Saad F (2009a) The dark side of testosterone deficiency: I. Metabolic syndrome and erectile dysfunction. *J.Androl* 30:10-22.
123. Traish AM, Saad F, Guay A (2009b) The dark side of testosterone deficiency: II. Type 2 diabetes and insulin resistance. *J Androl* 30(1):23-32.
124. Traish AM, Saad F, Feeley RJ, Guay A (2009c) The dark side of testosterone deficiency: III. Cardiovascular disease. *J.Androl* 30:477-94.
125. Tsutsui K, Ukena K, Takase M, Kohchi C, Lea RW (1999) Neurosteroid biosynthesis in vertebrate brains. *Comp Biochem.Physiol C. Pharmacol.Toxicol.Endocrinol.* 124:121-9.
126. Unemoto T, Matsushita M, Tamura K, Tanaka Y, Koike K, Kogo H (2007) Role of BK channels in testosterone-induced relaxation of the aorta in spontaneously hypertensive rats. *Biol.Pharm.Bull.* 30:1477-80.
127. Vanhoutte PM (1996) Endothelial dysfunction in hypertension. *J.Hypertens.Suppl* 14:S83-S93.
128. Vanhoutte PM y Tang EH (2008) Endothelium-dependent contractions: when a good guy turns bad!. *J.Physiol* 586:5295-5304.
129. Vargas HM y Gorman AJ (1995) Vascular α_1 adrenergic receptor subtypes in the regulation of arterial pressure. *Life Sci.* 57:2291-2308.

130. Verhaeghe RH y Shepherd JT (1976) Effect of nitroprusside on smooth muscle and adrenergic nerve terminals in isolated blood vessels. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 199:269-277.
131. Voet, Voet J, and Prat C. (2007) *Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular.* (2), Ed. Panamericana. Pág. 1260. España.
132. Waldkirch E, Uckert S, Schultheiss D, Geismar U, Bruns C, Scheller F, Jonas U, Becker AJ, Stief CG, Hedlund P (2008) Non-genomic effects of androgens on isolated human vascular and nonvascular penile erectile tissue. *BJU.Int.* 101:71-5.
133. Waldkirch E, Uckert S, Yildirim H, Sohn M, Jonas U, Stief CG, Andersson KE, Hedlund P (2005) Cyclic AMP-specific and cyclic GMP-specific phosphodiesterase isoenzymes in human cavernous arteries--immunohistochemical distribution and functional significance. *World J.Urol.* 23:405-10.
134. Wang X, Robinson PJ (1997) Cyclic GMP-dependent protein kinase and cellular signaling in the nervous system. *J.Neurochem.* 68:443-56.
135. Webb CM, Adamson DL, de ZD, Collins P (1999a) Effect of acute testosterone on myocardial ischemia in men with coronary artery disease. *Am.J.Cardiol.* (A9)83:437-9,.
136. Webb CM, McNeill JG, Hayward CS, de ZD, Collins P (1999b) Effects of testosterone on coronary vasomotor regulation in men with coronary heart disease. *Circulation* 100:1690-6.
137. Wingard DL, Suarez L, Barrett-Connor E (1983) The sex differential in mortality from all causes and ischemic heart disease. *Am.J.Epidemiol.* 117:165-72.
138. Wu FCW, von EA (2003) Androgens and coronary artery disease. *Endocr.Rev.* 24:183-217.
139. Wu KK y Thiagarajan P (1996) Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Annu.Rev.Med.* 47:315-331.

140. Wu SZ, Weng XZ (1993) Therapeutic effects of an androgenic preparation on myocardial ischemia and cardiac function in 62 elderly male coronary heart disease patients. *Chin Med.J.(Engl.)* 106:415-8.
141. Yildiz O, Seyrek M (2007) Vasodilating mechanisms of testosterone. *Exp.Clin. Endocrinol. Diabetes* 115:1-6.
142. Yildiz O, Seyrek M, Gul H, Un I, Yildirim V, Ozal E, Uzun M, Bolu E (2005) Testosterone relaxes human internal mammary artery in vitro. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 45:580-5.
143. Yue P, Chatterjee K, Beale C, Poole-Wilson PA, Collins P (1995) Testosterone relaxes rabbit coronary arteries and aorta. *Circulation* 91:1154-60.
144. Zitzmann M, Brune M, Nieschlag E (2002) Vascular reactivity in hypogonadal men is reduced by androgen substitution. *J.Clin.Endocrinol.Metab* 87:5030-7.