



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Capacidad de la testosterona para prevenir el
broncoespasmo en un modelo de asma en cobayos
sensibilizados por ovoalbúmina**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGA

P R E S E N T A :

Blanca Rosalba Rosales Macías



**DIRECTOR DE TESIS:
Dra. María Mercedes Perusquía Nava
2013**



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.



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

1. Datos del alumno	1. Datos del alumno
Apellido paterno	Rosales
Apellido materno	Macías
Nombre(s)	Blanca Rosalba
Teléfono	56446839
Universidad Nacional Autónoma de México	Universidad Nacional Autónoma de México
Facultad de Ciencias	Facultad de Ciencias
Carrera	Biología
Número de cuenta	306114232
2. Datos del tutor	2. Datos del tutor
Grado	Dra.
Nombre(s)	María Mercedes
Apellido paterno	Perusquía
Apellido materno	Nava
3. Datos del sinodal 1	3. Datos del sinodal 1
Grado	Mtra. en C
Nombre(s)	Cándida María Cristina
Apellido paterno	Lemini
Apellido materno	Guzmán
4. Datos del sinodal 2	4. Datos del sinodal 2
Grado	Dra.
Nombre(s)	Pilar
Apellido paterno	Durán
Apellido materno	Hernández
5. Datos del sinodal 3	5. Datos del sinodal 3
Grado	Dra. en C.
Nombre(s)	María Sandra
Apellido paterno	Cabrera
Apellido materno	Benítez
6. Datos del sinodal 4	6. Datos del sinodal 4
Grado	Dra. en C.
Nombre(s)	Ruth
Apellido paterno	Jaimez
Apellido materno	Melgoza
7. Datos del trabajo escrito.	7. Datos del trabajo escrito.
Título	Capacidad de la testosterona para prevenir el broncoespasmo en un modelo de asma en cobayos sensibilizados por ovoalbúmina
Número de páginas	48p
Año	2013

Agradecimientos

A la Dra. Mercedes Perusquía por la oportunidad de entrar a su laboratorio, por sus enseñanzas, paciencia, experiencia profesional y apoyarme en cada una de las actividades que desempeñé.

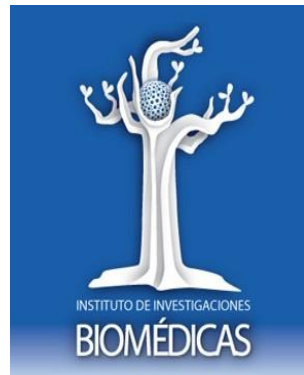
A la M. en C. María Julia Espinoza Camacho por la enseñanza, apoyo, ayuda y comprensión. Por la valiosa contribución para el desarrollo de este trabajo.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, por abrirme las puertas a la investigación.

A la Universidad Nacional Autónoma de México por ser la cuna de mi formación profesional.

Investigación realizada gracias al **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)** de la UNAM, proyecto No. IN205511-3, Papel Fisiológico de las Hormonas Sexuales Masculinas en la Patogénesis del Asma. Agradezco a la DGAPA-UNAM la beca recibida.

CAPACIDAD DE LA TESTOSTERONA PARA PREVENIR EL BRONCOESPASMO EN UN MODELO DE ASMA EN COBAYOS SENSIBILIZADOS POR OVOALBÚMINA: Esta tesis fue dirigida y supervisada por la Dra. María Mercedes Perusquía Nava y el trabajo experimental, el análisis de los datos y la escritura fueron realizados en el laboratorio a su cargo: Endocrinología de la Reproducción, perteneciente al Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. El Proyecto fue desarrollado con financiamiento de PAPIIT/DGAPA (Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica/Dirección General de Asuntos del Personal Académico), proyecto No. IN205511-3 otorgado a la Dra. Perusquía.



Dedicado a...

A mi Mamá, por su apoyo incondicional en las buenas y en las malas; por su enseñanza, sabiduría y gran amor, por creer en mí y enseñarme con el ejemplo a luchar por ser Feliz.

A mi padre, por ser mi ejemplo a seguir, por animarme y compartir el entusiasmo de cada aventura por mínima que fuera, y por siempre estar conmigo.

A mis padres, por ser mi plataforma para brincar cada vez más alto. Con la educación, firmeza y valor que me han transmitido, he aprendido a luchar siempre en los momentos más difíciles, gracias por sus palabras de aliento.

A mis hermanas y sobrinas: que con sus ocurrencias y apoyo, han sido un pilar más para mi vida.

A mis abuelos, que aun cuando ya no están a mi lado, siempre me respaldaron en todo, se preocuparon por mí y fueron indispensables en el desarrollo de mi persona. Están en mi memoria todos los días y en cada paso que doy.

A mi familia, por entender y comprender mi ausencia durante mi carrera, por que a pesar de ello, siempre he contado con su apoyo en los momentos de alegría y de tristeza.

A todas aquellas personas que me han brindado su amistad sincera, cariño, confianza, y sobre todo motivación. Y a todos los que escapan de mi mente.

ÍNDICE

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	
1.1. Definición de asma	2
1.2. Fisiopatología del asma	3
1.3. Epidemiología del asma	4
1.4. Relación de asma con el sexo y la edad	5
1.5. Generalidades de las Hormonas Esteroides	7
1.5.1 Fluctuación de los niveles plasmáticos de testosterona en el hombre	9
1.5.2. Biosíntesis de andrógenos	10
1.6. Evidencias de los efectos de testosterona en el sistema respiratorio	14
1.6.1. Efectos sobre la respuesta inmunológica	14
1.6.2. Efectos en músculo liso de la vía aérea (MLVA)	15
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
3. HIPÓTESIS	19
4. OBJETIVOS	20

5. MATERIAL Y MÉTODO	
5.1. Animales	21
5.2. Modelo de asma en el cobayo	21
5.3. Evaluación de la prevención del broncoespasmo por testosterona	23
5.4. Presentación de datos y análisis estadístico	27
5.5. Compuestos	28
6. RESULTADOS	28
6.1 Efecto de Testosterona sobre el brocoespasmo producido por un reto antigénico a ovoalbúmina (OVA)	29
6.2 Comparación de la prevención del broncoespasmo por testosterona y salbutamol	35
7. DISCUSIÓN	37
8. CONCLUSIONES	42
9. REFERENCIAS	43

RESUMEN

El asma es un importante problema de salud pública mundial que afecta las vías aéreas inferiores, con inflamación crónica e hiperreactividad. Algunos trabajos señalan que las hormonas esteroides masculinas (andrógenos) podrían influir en el desarrollo de esta enfermedad, debido a que en la infancia el asma es más frecuente en los niños que en las niñas y, después de la pubertad esta situación se invierte, con mayor prevalencia en las mujeres, pero en la vejez, los ataques asmáticos se agudizan y la prevalencia vuelve a ser mayor en los hombres. Se ha documentado que la testosterona tiene efectos no genómicos al producir relajación en preparaciones aisladas de músculo liso traqueal; sin embargo, no se ha determinado que la relajación *in vitro*, que provoca este andrógeno en el músculo liso aéreo, tenga la capacidad de prevenir un broncoespasmo. En este trabajo se estudió el efecto de la testosterona sobre el broncoespasmo producido por un reto antigénico en cobayos machos adultos sensibilizados a ovoalbúmina (modelo experimental de asma). Los cambios de la resistencia pulmonar (R_L) de la vía aérea fueron evaluados mediante pletismografía barométrica. La testosterona fue capaz de prevenir el broncoespasmo en una forma dependiente de la dosis sobre la respuesta asmática temprana del broncoespasmo (fase aguda), con una dosis efectiva 50 (DE_{50}) de: $89.63 \pm 1.30 \mu\text{mol Kg}^{-1} \text{min}^{-1}$. Asimismo, se observó que la testosterona puede abolir completamente la respuesta asmática tardía y no permitir que esta se desarrolle. Los datos revelan que la testosterona puede ejercer una acción protectora sobre los ataques asmáticos: (1) al producir una rápida acción (no genómica) broncodilatadora que previene la fase aguda del broncoespasmo y; (2) una acción (genómica) antiinflamatoria, previamente reportada, de esta hormona que impide el desarrollo de la fase tardía del broncoespasmo. Los datos sugieren investigar el potencial uso terapéutico de la testosterona en el asma, mediante el restablecimiento de sus niveles fisiológicos en hombres asmáticos.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Definición de asma

Las vías aéreas son susceptibles a diversas infecciones y enfermedades, como la influenza, la neumonía, el edema pulmonar y el asma, entre otras. En particular, el asma, que afecta las vías aéreas inferiores (laringe, tráquea, bronquios, bronquiolos y alvéolos), es un problema de salud pública mundial que perjudica alrededor de 300 millones de personas en todo el mundo (The Global Initiative for Asthma; GINA, 2012). Esta importante enfermedad se define como un desorden inflamatorio crónico de las vías aéreas. La inflamación crónica está asociada con la hiperreactividad de la vía aérea, provocando respiración sibilante, disnea (dificultad para respirar), contracción del músculo liso de la vía aérea (broncoconstricción), presencia de espasmos bronquiales (habitualmente acompañados de tos), rigidez torácica y secreciones mucosas; síntomas que regularmente se presentan en las noches y las mañanas. La combinación de la inflamación y la broncoconstricción en las vías aéreas, provoca un estrechamiento en dichas vías lo que dificulta el paso del aire; esta condición puede ser reversible, ya sea espontáneamente o con ayuda de algún fármaco (GINA, 2012). Sin embargo, cuando los síntomas del asma empeoran se produce una crisis de asmática. En una crisis severa las vías aéreas pueden cerrarse tanto que los órganos vitales no reciben suficiente oxígeno y la crisis asmática puede provocar la muerte.

Es importante señalar que existen casos en los que el tratamiento no revierte completamente la obstrucción, debido a la disminución de la función pulmonar. Una de las causas de esta disminución puede ser la remodelación de las vías aéreas, que es el resultado de un proceso de reparación del tejido bronquial, que provoca un engrosamiento subepitelial (Manuyakorn, 2013); es decir, el bronquio se endurece y disminuye su flexibilidad, lo cual afecta el flujo de aire.

1.2. Fisiopatología del asma

La etiología del asma se desconoce, pero se considera como una enfermedad multifactorial, ya que la disminución de flujo aéreo pulmonar está asociada al incremento en la respuesta de las vías aéreas (hiperreactividad) provocada por una variedad de estímulos y factores, principalmente genéticos y ambientales. Aunque es notable que la mayoría de los casos de asma se relacionan con una respuesta alérgica (García y Caraballo, 2007).

Con base a lo anterior, el asma es explicada comúnmente como una respuesta alérgica. Sin embargo, en ciertos casos el factor desencadenante del asma no está asociado con alérgenos, siendo así un tipo de asma no alérgica, conocida también como intrínseca, que aparece en individuos adultos, especialmente mujeres. Algunas de las causas más usuales del asma intrínseca son la sensibilidad a la aspirina, la poliposis nasal y la dependencia a esteroides. El asma intrínseca es cada vez más frecuente en la población y, salvo la presencia

de atopía en el asma alérgica, el asma no alérgica es clínica, inmunológica y fisiopatológicamente similar al asma alérgica (Vargas, 2005).

1.3. Epidemiología del asma

Se estima que 5% de la población mundial está diagnosticada con asma, es decir, alrededor de 300 millones de personas la presentan, de los cuales el 30% son niños y el 10% adultos. La prevalencia del asma varía según el país y asciende de un 0.8% hasta 32.6% (García *et al.*, 2012).

El asma en el año 2001 ocupó el duodécimo quinto lugar como causa de la pérdida de años de vida ajustados por discapacidad o muerte (DALYs; de sus siglas en inglés: *disability-adjusted life years*), es decir, los años que habrían vivido los individuos si hubiesen cumplido con la esperanza de vida del país o región en el que se encuentran y los años en que el padecimiento provocó discapacidad. Por lo que, el asma es una de las enfermedades que producen discapacidad y/o muerte de manera más prematura (GINA, 2012).

Aunque, el asma es una enfermedad con baja mortalidad, la Organización Mundial de la Salud estimó que durante el año 2001 el asma fue responsable de 1 de cada 250 muertes en el mundo. En algunos países los fallecimientos por asma rebasan los 20 por cada 100,000 pacientes asmáticos, como en Rusia y China. México es el octavo país con mayor número de casos fatales, con 14.5 por cada 1,000,000 de asmáticos diagnosticados (GINA, 2012).

Es importante destacar que la incidencia de esta enfermedad es más alta en la infancia, mientras que los individuos de 15 a 24 años de edad son los que presentan menor frecuencia de casos nuevos (Vargas, 2009); No obstante, durante la adultez y vejez esta incidencia vuelve a aumentar, aunque no alcanza los valores de la niñez. Se ha estimado que la incidencia anual de asma en adultos es de 4.6 a 5.9 por 1,000 en mujeres y de 3.6 a 4.4 por 1,000 en hombres en el mundo (Egan, 2005).

1.4. Relación de asma con el sexo y la edad

Observaciones clínicas y estudios epidemiológicos indican que la edad y el sexo influyen en el desarrollo del asma (Balzano *et al.*, 2001). En la infancia, el asma es más frecuente en los niños varones; pero después de la pubertad, la prevalencia del asma es mayor en las mujeres adultas (menarquia-menopausia) que en los hombres de la misma edad; siendo las mujeres las que presentan una forma más severa de asma (Osman, 2003; Vargas, 2009; Townsend *et al.*, 2012). Durante la adolescencia la severidad del asma disminuye en los hombres; sin embargo, después de los 50 o 60 años, los ataques asmáticos se agudizan y la prevalencia es mayor en los hombres (Balzano *et al.*, 2001; Chen *et al.*, 2008).

Dichas observaciones señalan la influencia del sexo y la edad en la incidencia, prevalencia y gravedad del asma, lo cual sugiere que las hormonas sexuales esteroides podrían desempeñar un papel en la patogénesis de la enfermedad. En particular, se nota una clara asociación con los niveles de andrógenos (hormonas

esteroides masculinas) a lo largo de la vida del varón. El estudio de este tipo de esteroides y sus acciones en el sistema respiratorio son muy escasos. Se ha reportado que el principal andrógeno, la testosterona, es un inmunomodulador al inducir una acción antiinflamatoria, en contraste con los estrógenos (esteroides sexuales femeninos) que son proinflamatorios (Osman, 2003; Balzano *et al.*, 2001). Lo cual podría explicar en parte que las mujeres adultas tienen mayor prevalencia (75% de los casos) que los hombres de padecer enfermedades autoinmunes, como artritis reumatoide y esclerosis múltiple, y además asma.

Algunos estudios han reportado la correlación de los niveles plasmáticos de hormonas sexuales con las características clínicas del asma. Por ejemplo, la variación hormonal durante el ciclo menstrual parece influir en los síntomas del asma, dado que cuando los niveles de progesterona se encuentran elevados (fase lútea del ciclo menstrual) se presentan crisis asmáticas (Farha *et al.*, 2009; Townsend *et al.*, 2012). Además, cuando las mujeres tienen la menarquia a edad temprana (antes de los 12 años), aumentan al doble su posibilidad de presentar asma después de la pubertad, en comparación a las mujeres que iniciaron su menstruación más tarde (Pastma, 2007). Asimismo, en la menopausia (aproximadamente después de los 50 años) se ha reportado que las admisiones hospitalarias de mujeres por casos asmáticos es menor en relación a las admisiones de mujeres asmáticas entre 20 y 50 años (Balzano *et al.*, 2001). Durante el embarazo, cuando los niveles de progesterona son muy elevados sólo un tercio de las embarazadas asmáticas mejora sus síntomas (Schatz *et al.*,

2003). Por lo anterior, se puede plantear que la progesterona y/o los estrógenos aumentan el riesgo de padecer asma.

Por otro lado, según la incidencia del asma durante la vida del hombre, los niveles bajos de andrógenos en la infancia masculina y la deficiencia de ellos en la tercera edad, podría desproteger y hacerlos más susceptible al asma; en contraste a cuando los niveles de andrógenos son elevados durante la juventud. Así, los andrógenos podrían resultar benéficos, protegiendo del asma (Townsend *et al.*, 2012). Debido a lo anterior, es importante estudiar la participación de los andrógenos en la fisiopatología del asma.

1.5. Generalidades de las Hormonas Esteroides

Con relación a las bases anteriores, es importante resaltar que los andrógenos pueden jugar un papel importante en la patogénesis del asma, para lo cual es necesario entender el origen de estas hormonas esteroides.

Los esteroides son lípidos no saponificables que tienen en común un núcleo llamado ciclopentanoperhidrofenantreno o esterano, que está formado por cuatro anillos fusionados, tres con seis átomos de carbono (nombrados A, B y C) y uno con cinco (D); con un total de 17 átomos de carbono (Fig. 1). Esta estructura básica se modifica por adición de diversos grupos funcionales, como carbonilos e hidroxilos (hidrófilos) o cadenas hidrocarbonadas (hidrófobas) para dar como resultado a los diferentes tipos de esteroides (Devlin, 2004).

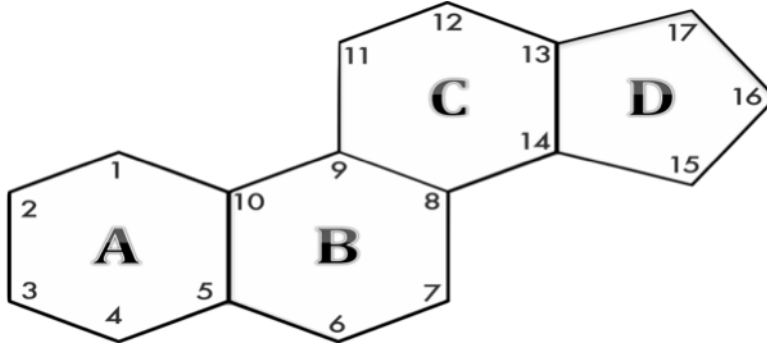


Figura 1. El ciclopentanoperhidrofenantreno o esterano, es la estructura base de las hormonas esteroides. Consiste en 4 anillos fusionados (A, B, C, D), con un total de 17 átomos de carbono.

Las hormonas esteroides conforman un grupo de compuestos lipófilos de señalamiento que controlan el metabolismo, el crecimiento y la reproducción, se agrupan según el número de carbonos en: estrógenos con 18 carbonos; andrógenos con 19 y; progestinas, glucocorticoides y mineralocorticoides con 21 (Koolman y Röhm, 2004).

Los andrógenos, conocidos como hormonas masculinas, tienen entre sus funciones: la masculinización del feto de los machos en desarrollo, la espermatogénesis, la fertilidad y la inhibición de la deposición de grasa (Gilbert, 2005). Los andrógenos, principalmente la testosterona, se producen en las células de Leydig de los testículos y en menor medida en el hipotálamo, hígado, riñón, tejido adiposo subcutáneo, en el músculo esquelético, en la corteza suprarrenal de las glándulas suprarrenales y en los ovarios (Tsutsui *et al.*, 2006).

1.5.1. Fluctuación de los niveles plasmáticos de testosterona en el hombre

La testosterona es el andrógeno más representativo de la masculinidad, siendo el andrógeno con uno de los mayores niveles plasmáticos en el organismo. Entre sus funciones están las expresiones fenotípicas y genotípicas masculinas, los caracteres sexuales secundarios, adquiridos progresivamente a lo largo de la vida, tales como el timbre de voz, la distribución del vello, la morfogénesis genital, masa muscular, función sexual y reproducción; además también participa en la salud cardiovascular y hemodinámica (Vela *et al.*, 2009).

En hombres adultos sanos, los niveles plasmáticos de testosterona son de 11-36 nmol/L, mientras que la producción diaria es de 4-10 mg/día, de los que el 95% son secretados por las células de Leydig testiculares bajo el estímulo fundamental de la hormona luteinizante (LH) (Kaufman y Vermeulen, 2005). Es también conocido que la testosterona no actúa de igual modo en función de la edad y esto está relacionado directamente con los niveles plasmáticos de testosterona. Durante la infancia (hasta los 12 años) los niveles de testosterona en plasma son bajos y oscilan entre 0.52 y 3 nmol/L. Durante la adolescencia (13 a 18 años) se observa un claro aumento en los niveles plasmáticos, que van de los 3 a 16.5 nmol/L (Winter y Faiman, 1972). El envejecimiento masculino se acompaña de una disminución progresiva de la testosterona plasmática, fenómeno denominado con las siglas ADAM (*Androgen Deficiency in the Aging Male*). Esta declinación es lineal, de 1 a 2% por año y comienza en la adultez temprana (4ta.

década). Se ha registrado que el descenso de la testosterona total ha oscilado entre 0.11 y 0.38 nmol/L por año (Harman *et al.*, 2001) (Fig. 2).

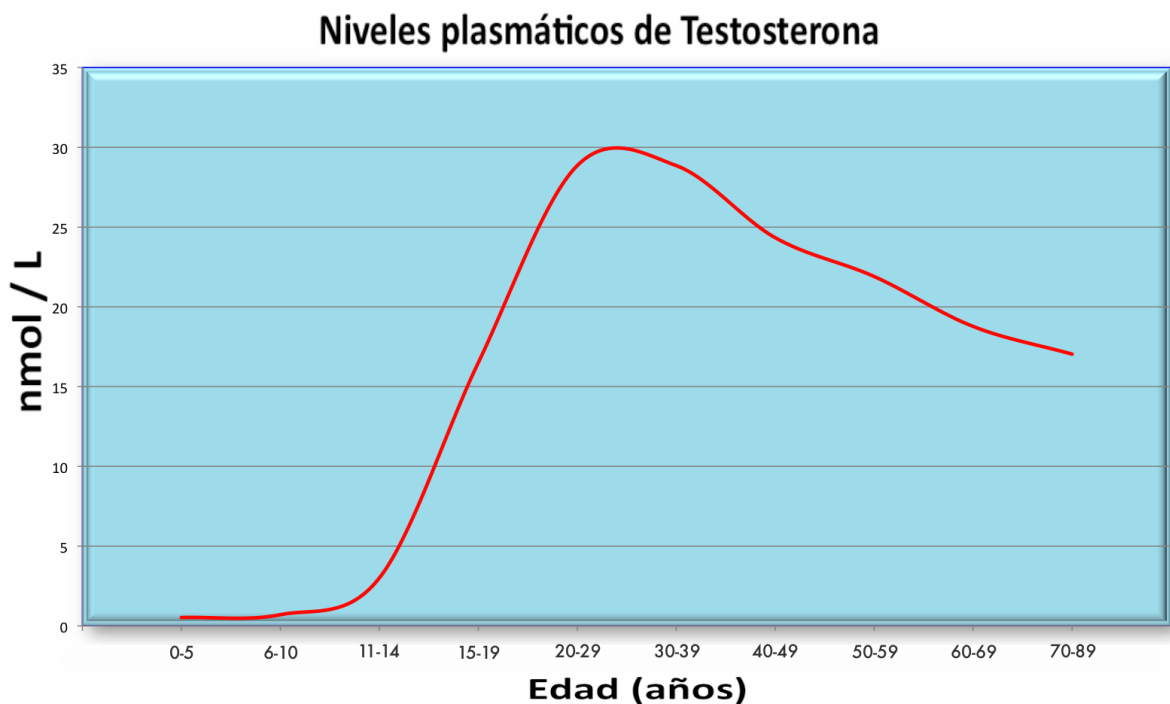


Figura 2. La grafica muestra los niveles de testosterona totales (nmol/L) de los hombres a lo largo de la vida. Datos tomados de Schatzl *et al.*, 2003; Anderson *et al.*, 1998; y Winter y Faiman, 1972.

1.5.2. Biosíntesis de andrógenos

En la figura 3 se representa la biosíntesis de andrógenos. A partir del colesterol se sintetiza la pregnenolona. La formación de progesterona a partir de pregnenolona requiere de dos reacciones en secuencia, inicialmente (1) una deshidrogenación, realizada por la enzima 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa Δ 5-isomerasa (3 β -HSDH, Δ 5 isomerasa), del grupo alcohólico en el C-3 e

inmediatamente, por (2) un proceso de isomerización, se forma la progesterona (Hu *et al.*, 2010; Payne y Hales, 2004).

La pregnenolona y la progesterona se biotransforman en 17α -hidroxipregnenolona o 17α -hidroxiprogesteroa respectivamente, por una hidroxilación en el C-17, que es el primer paso para la ruptura de la cadena lateral, catalizada por el citocromo P450c17. Posteriormente, por acción de una $17, 20$ esteroide liasa del citocromo P450c17, se rompe la unión entre los átomos C-17 y C-20 (Payne y Hales 2004) y se obtienen la dehidroepiandrosterona (DHEA) y la androstenediona. La acción secuencial de este citocromo de localización microsomal es dependiente de NADPH y O_2 (Miller, 2008).

La reducción del grupo cetónico del C-17 de la androstenediona, por acción de la 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β -HSD), transforma a este andrógeno a testosterona. Esta acción es reversible (Hu *et al.*, 2010).

La testosterona puede ser aromatizada para transformarse en estrógenos, por acción de la aromatasa (citocromo P450aro), en este proceso, además de la pérdida del átomo de C-19, el anillo A de los andrógenos se transforma en un anillo aromático o fenólico característico de los estrógenos (Fig. 3). La androstendiona puede ser directamente aromatizada a estrona o primero convertirse a testosterona por la acción de la 17β -HSD y aromatizarse luego a

estradiol. La 17β -hidroxilación de androstenediona a testosterona o de estrona a estradiol, son reacciones reversibles (Payne y Hales, 2004).

Posteriormente, la testosterona se biotrasforma a sus metabolitos 5-reducidos, cada uno con una conformación distinta: *cis* (5α) o *trans* (5β), por medio de las enzimas 5α - y 5β -reductasa respectivamente, que reducen el doble enlace 4-5 de la testosterona (Fig. 3).

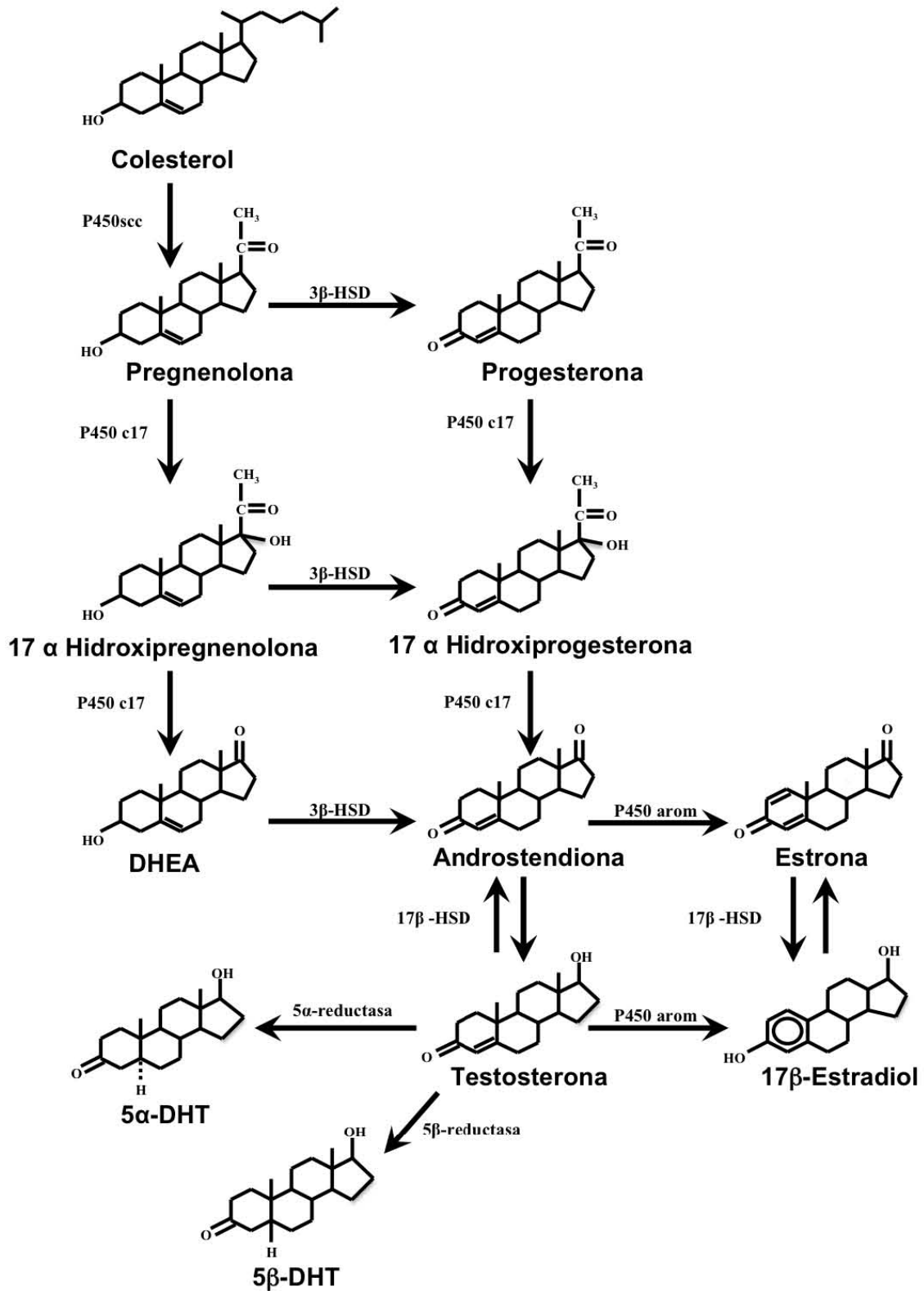


Figura 3. Resumen de la biosíntesis de hormonas esteroides (andrógenos y estrógenos). En cada una de las flechas se señala la enzima que cataliza la reacción correspondiente. Modificado de Gore-Langton, 1988; y Morales et al., 2007.

Una vez sintetizadas las hormonas esteroideas son liberadas al torrente sanguíneo, donde se fijan a proteínas plasmáticas. La testosterona y la dihidrotestosterona (DHT) se unen fuertemente a una globulina de transporte llamada globulina fijadora de hormona sexual (SHBG; *sex hormone binding globulin*) y con menor afinidad a la albúmina. Mientras que el 17β -estradiol, estrona, androstenediona y progesterona se unen con gran afinidad a la albúmina para su transporte plasmático (Avvakumov, 2010).

1.6. Evidencias de los efectos de testosterona en el sistema respiratorio

1.6.1. Efectos sobre la respuesta inmunológica

En la vía aérea, las hormonas esteroideas sexuales tienen efectos sobre la respuesta inmune, por lo que son inmunomoduladores. La testosterona tiene una acción antiinflamatoria, mientras que los estrógenos y las progestinas son proinflamatorios (Osman, 2003; Gilliver, 2010).

La testosterona disminuye las citocinas proinflamatorias, IL- β y el TNF α ; además la testosterona también incrementa los niveles de la IL-10 (Malkin *et al.*, 2004; Corrales *et al.*, 2006). Con estas evidencias, se ha documentado que la administración de la testosterona provoca la disminución de respuestas inflamatorias (Olsen y Kovacs, 1995; Cutolo, 1997; Dalal *et al.*, 1997) y disminuye los síntomas en hombres asmáticos que padecen hipogonadismo (Malkin *et al.*, 2004; Corrales *et al.*, 2006).

1.6.2. Efectos en músculo liso de la vía aérea (MLVA)

Se ha demostrado que las hormonas esteroideas sexuales, en especial los andrógenos, afectan la contracción del músculo liso de los vasos sanguíneos produciendo vasodilatación (Perusquía y Stallone, 2010) y produciendo útero relajación (Perusquía *et al.*, 2005). Estos efectos son mediados por mecanismos de tipo no genómicos, independientes de la unión de los andrógenos a su receptor intracelular específico (AR).

En el MLVA, se ha observado que la testosterona tiene un efecto relajante sobre la contracción causada por acetilcolina (ACh) y carbacol (CCh) en tráquea de conejo (Kouloumenta *et al.*, 2006). Lo cual quedó corroborado en otro trabajo donde se reporta que, en preparaciones traqueales de bovino, la testosterona y sus derivados 5-reducidos, 5 α - y 5 β -dihidrotestosterona (DHT), también producen un efecto relajante sobre la contracción causada por CCh y cloruro de potasio (KCl), mientras que en preparaciones traqueales de cobayo la 5 α -DHT produce un efecto relajante sobre la contracción causada por CCh (Bordallo *et al.*, 2008).

En ambos trabajos (Koloumenta *et al.*, 2006; Bordallo *et al.*, 2008) se caracterizó que la acción relajante de los andrógenos es independiente del receptor de andrógenos (AR). El trabajo de Koloumenta y cols., (2006) demostró fehacientemente que la relajación de testosterona es una acción no genómica, desde que la relajación fue observada con un análogo no permeable de la testosterona, BSA-testosterona y, es independiente de la transcripción de ADN.

Además, sus datos señalan, que el efecto relajante de la testosterona es ajeno de la producción de prostaglandinas. En el trabajo de Bordallo y cols., (2008) se reportó que la relajación provocada por 5 α -DHT no es mediada a través de los AR, siendo un efecto no genómico. Dicha respuesta tampoco es mediada por la activación de los receptores β_2 adrenérgicos o del incremento del adenosín trifosfato cíclico (AMPc) o por las poliaminas; sin embargo, puede influir en la disminución del paso de calcio extracelular.

Es importante señalar que, en estos trabajos se encontraron discrepancias sobre el papel que el epitelio de la traquea puede jugar en la relajación inducida por los andrógenos, ya que, la ausencia de epitelio en las preparaciones traqueales de conejo parcialmente disminuyó el efecto relajante de la testosterona (Kouloumenta *et al.*, 2006). En contraparte, en las preparaciones de tráquea de bovino y de cobayo la presencia o ausencia de epitelio no afectó la relajación producida por 5 α -DHT (Bordallo *et al.*, 2008).

En un trabajo reciente, nuestro grupo reportó que la dehidroepiandrosterona, DHEA, precursor de la testosterona, tiene un efecto relajante de tipo no genómico sobre las contracciones inducidas por CCh, KCl y ovoalbúmina (OVA) en preparaciones traqueales de cobayo; producido directamente por DHEA y no después de su biotransformación hacia los esteroides considerados “activos” (estrógenos o testosterona); que es independiente del epitelio de la vía aérea y de los β_2 adrenoreceptores, pero que involucra el bloqueo

de la entrada de calcio extracelular por inactivación de los canales de calcio dependientes de voltaje (Espinoza *et al.*, 2013).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La evidencia experimental sobre la influencia de la testosterona (el principal andrógeno) en el asma, es escasa. Existen dos estudios funcionales que han demostrado que la testosterona tiene la capacidad de producir relajación en tráquea aislada de conejo (Kouloumenta *et al.*, 2006), de cobayo y bovino (Bordallo *et al.*, 2008). Estos trabajos muestran un claro efecto broncodilatador de la testosterona *in vitro*, el cual no ha sido explorado *in vivo* para confirmar su capacidad broncorelajante.

Por lo anterior, el presente proyecto pretendió investigar, por primera vez, si la broncodilatación *in vitro*, que provoca la testosterona en un tejido aislado es operativa *in vivo*, en un modelo experimental de asma.

3. HIPÓTESIS

Se espera que la testosterona pueda prevenir el broncoespasmo producido por un reto antigénico en cobayos sensibilizados (modelo experimental de asma).

4. OBJETIVOS

General:

Caracterizar la potencial acción broncodilatadora de la testosterona sobre el broncoespasmo de cobayos asmáticos.

Particulares:

1. Mediante pletismografía barométrica, explorar la capacidad de la testosterona para prevenir el broncoespasmo causado por el reto antigénico con OVA en cobayos machos adultos:

a) Determinar la respuesta a testosterona a diferentes dosis (curva dosis-respuesta) sobre el broncoespasmo para establecer la DE_{50} (dosis efectiva 50). Asimismo, como control positivo, comparar con un conocido agonista β_2 adrenérgico (salbutamol) usado terapéuticamente para el tratamiento de ataques asmáticos.

b) Analizar el efecto de testosterona en: el retardo y disminución de la intensidad del broncoespasmo; y el tiempo para ver si testosterona restablece los valores basales de la resistencia pulmonar (R_L).

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Animales

Se utilizaron cobayos (*Cavia cobaya*) machos adultos de la cepa Hartley con peso aproximado de 450-600 g, obtenidos del Bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Los animales se mantuvieron en condiciones de bioterio convencionales, con alimento para cobayos (Harlan Inc.) y agua *ad libitum*. Los protocolos que se realizaron fueron aprobados por la “Comisión para el uso y cuidado de animales de laboratorio” del Instituto de Investigaciones Biomédicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM). Además, los experimentos se realizaron siguiendo los “Principios que guían en el cuidado y uso de los animales” aprobados por la *American Physiological Society*.

5.2. Modelo de asma en el cobayo

Los cobayos fueron sensibilizados con OVA para obtener el modelo de asma experimental (cobayos asmáticos). El día 1 de tratamiento, los animales recibieron dos administraciones de una mezcla que contenía 60 mg ml^{-1} de OVA y 1 mg ml^{-1} de $\text{Al}(\text{OH})_3$, como coadyuvante; disueltos en solución salina fisiológica (SSF; 0.9% NaCl): (1) 0.5 ml vía intraperitoneal y; (2) 0.5 ml vía subcutánea. El día 8 de tratamiento, los animales fueron sometidos a un reto antigénico con 3 mg ml^{-1} de OVA en SSF, nebulizada durante 5 min, mediante un nebulizador ultrasónico (WH; Yuehue Medical Instrument Factory Co., Ltd.; China). En el día 15, los

cobayos nuevamente fueron retados con 0.5 mg ml^{-1} de OVA en SSF, nebulizada durante 1 min. Finalmente, entre el día 21 y 25 los cobayos se utilizaron para los experimentos (Fig. 4). La respuesta al antígeno fue siempre establecida al observar disnea, durante el reto, *i.e.*, una evidente hiperventilación (respiración agitada), apreciada por un rápido y continuo estrechamiento y expansión del abdomen. Los animales con una respuesta pobre al antígeno fueron excluidos del estudio.

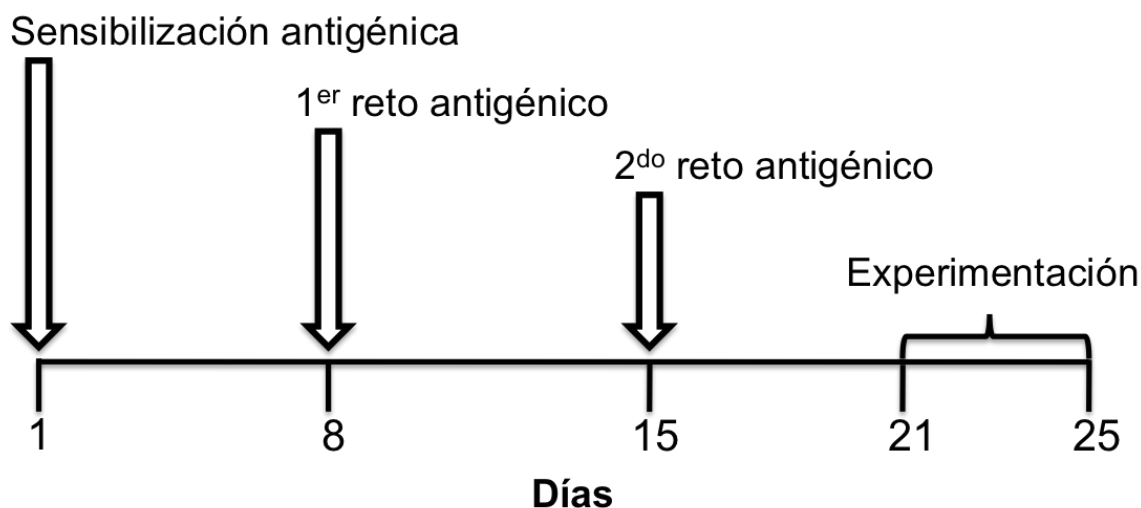


Figura 4. Esquema del tratamiento utilizado para obtener el modelo de asma experimental (cobayos asmáticos). En la sensibilización antigénica se administró 0.5 ml i.p. y 0.5 ml s.c. de una mezcla de 60 mg ml^{-1} de OVA y 1 mg ml^{-1} de Al(OH)_3 disuelto en SSF. Durante el primer reto el animal fue nebulizado con $3 \text{ mg ml}^{-1} 5 \text{ min}^{-1}$ de OVA en SSF y en el segundo reto se nebulizó con $0.5 \text{ mg ml}^{-1} 1 \text{ min}^{-1}$ de OVA en SSF.

5.3. Evaluación de la prevención del broncoespasmo por testosterona

El efecto de testosterona sobre el broncoespasmo producido por un reto antigénico a OVA fue evaluado *in vivo* en cobayos previamente sensibilizados a este antígeno. La resistencia pulmonar (R_L) fue medida mediante el método isovolumétrico con una cámara pletismográfica cerrada (Buxco Electronics Inc. Wilmington, NC, USA).

La pletismografía barométrica de cuerpo entero es una prueba de la función pulmonar (Rozanski y Hoffman, 1999), la cual mide la relación entre la presión y el flujo en las vías aéreas en términos de su amplitud y tiempo. Se basa en convertir el aparato respiratorio momentáneamente en un sistema cerrado y aplicar la ley de Boyle-Mariotte, para medir las presiones y se deduce el volumen pulmonar para medir los cambios de volumen, determinando así el volumen total de gas torácico (Pérez, 2013).

Entre los días 21 - 25 después de haber iniciado el tratamiento de sensibilización con OVA, los cobayos sensibilizados fueron anestesiados con pentobarbital sódico (35 mg kg^{-1} , i.p.) para provocar una anestesia profunda, la cual se mantuvo mediante la administración de dosis adicionales de pentobarbital (9 mg kg^{-1} , i.v.) cada hora o según se requiriera. Asimismo, cada animal recibió bromuro de pancuronio (0.06 mg kg^{-1} , i.v.) para suprimir los posibles movimientos respiratorios espontáneos que los cobayos pudieran desplegar.

Posteriormente, con ayuda de material de microcirugía, se colocó una cánula en la tráquea de los cobayos para proporcionar ventilación mecánica con un ventilador para roedores (7025; Ugo Basile Biological Research Apparatus, Varese, Italia) que administraba un volumen de 10 ml kg^{-1} , a $48 \text{ respiraciones min}^{-1}$ durante todo el experimento. La vena yugular y la arteria carótida fueron canuladas para: (1) la administración del fármaco (testosterona u OVA) y; (2) censar la presión arterial, respectivamente. La presión arterial fue registrada por un dinógrafo (BPA 400A; Digi-Med Blood Pressure Analyzer, Louisville, KY, EUA). También se colocó una cánula en la parte media del esófago, con la finalidad de medir la presión intraesofágica, como un indicador de la presión intrapleurales. Las presiones de las cánulas esofágica y traqueal fueron registradas con un transductor de presión diferencial (SCXL004DN, Sen Sym, Biosystem, EUA). La presión dentro de la cámara pletismográfica fue también registrada por otro transductor de presión diferencial (Fig. 4), la cual fue convertida en una señal de flujo por un software especializado (XA v2.1; Buxco Biosystem, EUA). Con éste software se calculó la relación entre las señales de ambos transductores para obtener la resistencia pulmonar (R_L), con la fórmula:

$$R_L = \frac{\Delta P}{\Delta V}$$

Donde ΔP es el cambio de presión y; ΔV es el cambio de volumen.

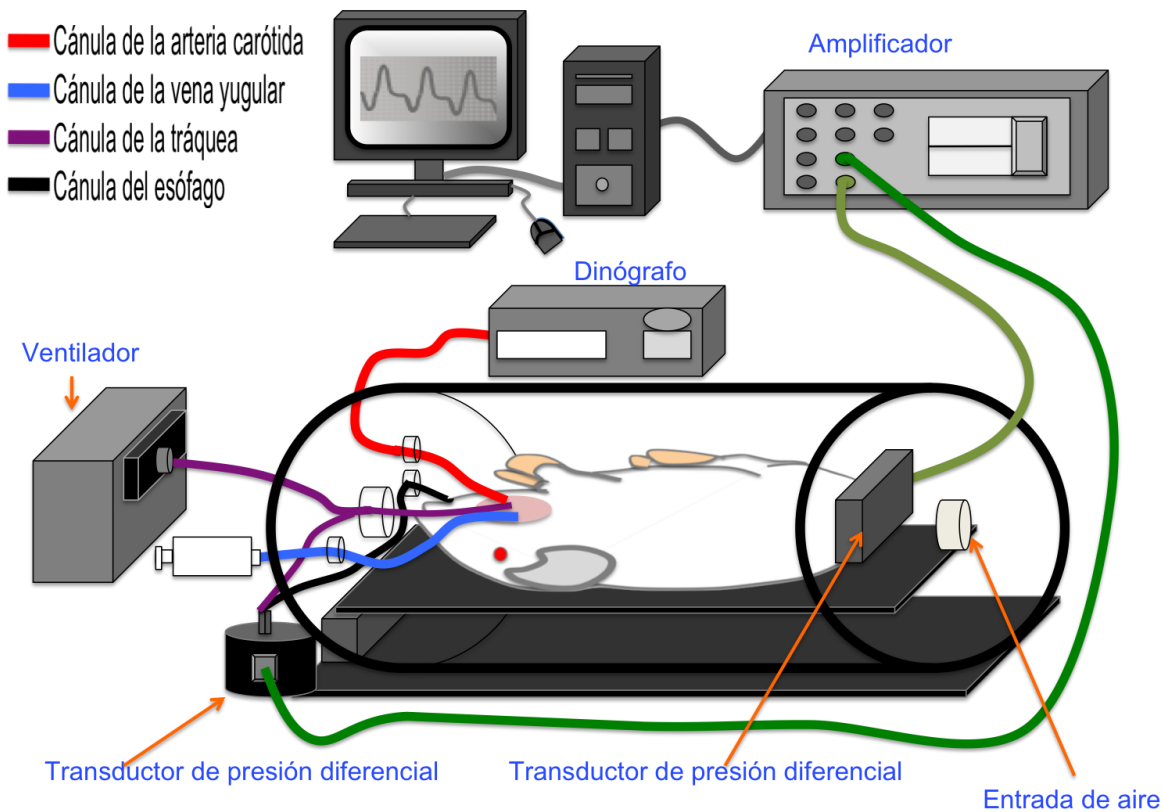


Figura 5. Equipo de plethysmografía barométrica para animales anestesiados. En el esquema se representa a un cobayo anestesiado dentro de una cámara de plethysmografía barométrica. Las presiones de las cánulas esofágica y traqueal fueron registradas con un transductor de presión diferencial y para medir los cambios de presión generados dentro de la cámara se utilizó otro transductor de presión diferencial para registrar los cambios con relación a la presión atmosférica (constante). La señal generada por los transductores es transferida a un amplificador y posteriormente hacia una computadora.

Una vez que los animales se encontraron en las condiciones previamente descritas, la R_L se registró durante 3 min, para obtener el promedio de la R_L control (R_L basal). Inmediatamente después de obtener el valor basal, el broncoespasmo fue provocado por administración de OVA ($75 \mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ i.v.), esta fue la respuesta control del broncoespasmo (*grupo A control*; respuesta control del broncoespasmo). En otro grupo de animales, 15 min antes de inducir el

broncoespasmo por OVA, se administró el volumen equivalente del vehículo (dimetilsulfóxido; DMSO; 0.04 - 0.06 ml min⁻¹, i.v.) en el cual se administró la testosterona (*grupo B*, control del vehículo) o la testosterona; 17β-hidroxi-4-androsten-3-ona (*grupo C*) a diferentes dosis (35, 110 o 350 μmol kg⁻¹ min⁻¹, i.v.), de manera independiente y no acumulativa; es decir, una dosis de testosterona por animal. En otro grupo de animales, se administro salbutamol (1, 10 o 100 nmol kg⁻¹ min⁻¹, i.v.; agonista β₂ adrenérgico), de manera independiente y no acumulativa (*grupo D*, control positivo). En los grupos *B*, *C* y *D*, después de 15 min se provocó el broncoespasmo a OVA.

Descripción de los grupos utilizados:

Grupo	Tratamiento
<i>Grupo A</i>	Control (sin tratamiento)
<i>Grupo B</i>	DMSO (vehículo de testosterona)
<i>Grupo C</i>	Diferentes concentraciones de Testosterona
<i>Grupo D</i>	Diferentes concentraciones de Salbutamol

El incremento de la R_L provocado por la OVA de todos los grupos se registró durante 30 min (Fig.6); y se obtuvo el promedio de la R_L cada min para comparar la respuesta en todos los grupos.

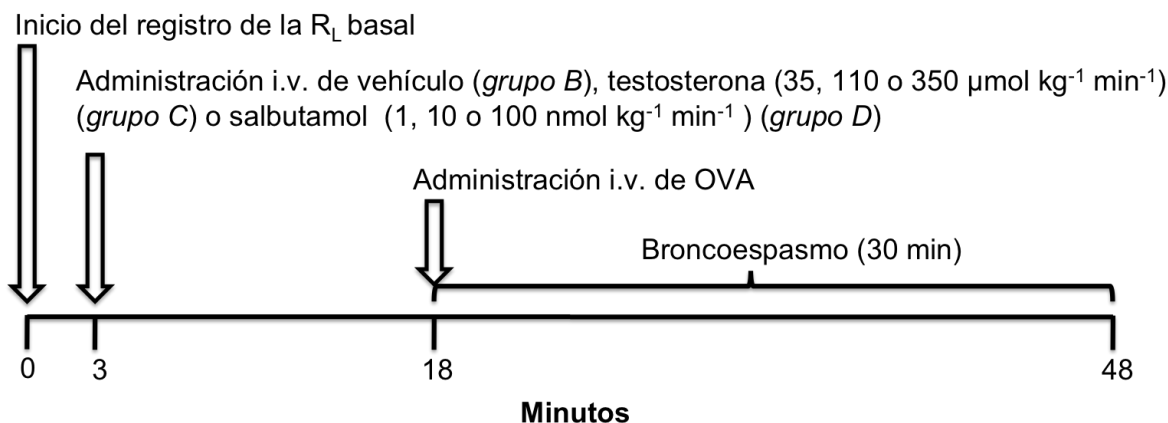


Figura 6. Esquema del diseño experimental para registrar en cobayos asmáticos.

5.4. Presentación de datos y análisis estadístico

La prevención del broncoespasmo en los cobayos se expresó como cambios en la R_L (% de inhibición de cada broncoespasmo). Las curvas dosis-respuesta fueron expresadas en términos de porcentaje de inhibición del broncoespasmo. Todos los datos son expresados como la media \pm D.E.M. ($n = 6$ en cada grupo, cada n corresponde a un cobayo). Se estableció el tiempo de la repuesta asmática temprana (EAR por sus siglas en inglés) como el tiempo con mayor aumento de la R_L (siendo esta la fase aguda del broncoespasmo 4 min después del reto antigénico). La respuesta asmática tardía (LAR por sus siglas en inglés) fue establecida cuando la R_L disminuye pero no llega a los valores basales (12 min después del reto antigénico), la cual fue registrada hasta 30 min. La eficacia de la testosterona o salbutamol se expresó como efecto máximo ($E_{\text{máx}}$; efecto inducido por la testosterona a la dosis más alta). La dosis efectiva 50 de la testosterona y salbutamol (DE_{50} ; dosis requerida para inhibir el 50% del

broncoespasmo provocado por el reto antigénico) fue obtenida a partir de las curvas dosis respuesta, ajustando la recta por una regresión lineal. La potencia fue obtenida al comparar las DE₅₀s. Para comparaciones entre dos grupos se utilizó la prueba *t* de *Student* no pareada; las comparaciones entre tres grupos se realizaron con un análisis de varianza (ANOVA) de una vía seguido de la prueba de Dunnett, con los valores de R_L y area bajo la curva. Diferencias con $p < 0.05$ fueron consideradas como significativas.

5.5. Compuestos

A excepción del pentobarbital sódico (Pfizer, México) los compuestos utilizados en este estudio fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. St. Louis MO.

EUA:

- Ovoalbúmina (OVA)
- Hidróxido de aluminio (Al(OH)₃)
- Bromuro de pancuronio
- Dimetilsulfóxido (DMSO)
- Testosterona (17 β -hidroxi-4-androsten-3-ona)
- Salbutamol (α -[(terc-Butilamino) metil]-4-hidroxi-m-xileno- α , α' -diol, Albuterol)

6. RESULTADOS

6.1. Efecto de testosterona sobre el broncoespasmo producido por un reto antigénico con OVA

Durante el broncoespasmo, provocado por el reto antigénico en los cobayos sensibilizados del *grupo A control*, se observó que la R_L aumentó desde el primer minuto, alcanzando un pico máximo al minuto 4, con un valor de 3.60 ± 0.11 $\text{cmH}_2\text{O ml}^{-1} \text{s}^{-1}$ ($n = 6 \pm \text{D.E.M.}$). Como se observa en la Fig. 7, los valores de la R_L disminuyeron gradualmente y se estabilizaron (1.37 ± 0.21 $\text{cmH}_2\text{O ml}^{-1} \text{s}^{-1}$) aproximadamente al minuto 12, este período del broncoespasmo corresponde a la respuesta asmática temprana (EAR). Posteriormente, se observó que la R_L continuo disminuyendo, pero no regresó al valor basal ($R_L = 0.41 \pm 0.02$ $\text{cmH}_2\text{O ml}^{-1} \text{s}^{-1}$) (Fig. 7), esta segunda etapa del broncoespasmo, es conocida como la respuesta asmática tardía (LAR).

En los cobayos sensibilizados que fueron pretratados con el vehículo (DMSO; $0.04\text{-}0.06$ ml min^{-1}) utilizado para la administración de la testosterona (*grupo B*), 15 min antes de provocar el reto antigénico con OVA, el broncoespasmo fue similar; es decir, se observó el incremento de la R_L durante la EAR, la R_L máxima fue al min 4 ($R_L = 3.80 \pm 0.54$ $\text{cmH}_2\text{O ml}^{-1} \text{s}^{-1}$) y su valor no fue estadísticamente diferente ($p > 0.05$) a la R_L evaluada en los cobayos del *grupo A control*, al minuto

4 del broncoespasmo. Del mismo modo, los valores de la R_L durante la LAR no mostraron diferencias significativas ($p > 0.05$) respecto al *grupo A control*.

De forma contrastante, en el *grupo C* de los cobayos que fueron pretratados con las dosis de testosterona (35 , 110 y $350 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$), 15 min antes del reto antigénico con OVA, se observó que la testosterona tuvo una potente prevención del broncoespasmo provocado por OVA (Fig. 7). Con base en el análisis del área bajo la curva, del incremento de la R_L en el *grupo A control* y el *grupo C*, se observó que el incremento de la R_L durante el broncoespasmo (EAR y LAR), fue diferente entre el *grupo A control* y a cada dosis de pretratamiento con la testosterona: $35 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ($p < 0.0001$), $110 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ($p < 0.000001$) y $350 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ ($p < 0.000001$). Así, contundentemente, a las tres dosis utilizadas, la testosterona evitó el incremento de la R_L , característico del broncoespasmo. Además, dicha prevención fue dependiente de la dosis, como se muestra en la Fig. 7. También, se pudo observar que el inicio del broncoespasmo se retrasó 2 min cuando la testosterona fue administrada a las dosis de 110 o $350 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ (Fig. 7, nótese un desplazamiento a la derecha del incremento de la R_L con el pretratamiento de cada dosis de testosterona).

Particularmente, durante la EAR todas las dosis de la testosterona utilizadas previnieron el incremento de la R_L , dicho efecto fue estadísticamente significativo para cada dosis (35 , 110 y $350 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$) al comparar con el *grupo A control* ($p < 0.05$, $p < 0.005$ y $p < 0.001$, respectivamente); de manera que la EAR fue prevenida por testosterona de manera dependiente de la dosis.

La LAR (Fig. 7) también fue abolida por el pretratamiento con las tres dosis de testosterona (35, 110 y 350 $\mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$) de manera significativa ($p < 0.00001$, $p < 0.000001$ y $p < 0.000001$, comparación de cada dosis de testosterona vs. *grupo A control*). Cabe mencionar que en los cobayos sensibilizados pretratados con las dosis 110 y 350 $\mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ de testosterona el despliegue de la LAR se abolió totalmente, a partir del minuto 6 de iniciado el broncoespasmo, no habiendo diferencias significativas con respecto al valor de la R_L basal ($p > 0.05$; Fig. 7). La dosis de 35 $\mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ de testosterona inhibió la LAR desde el minuto 22, cuando los valores de la R_L disminuyeron y fueron iguales a la basal ($p > 0.05$).

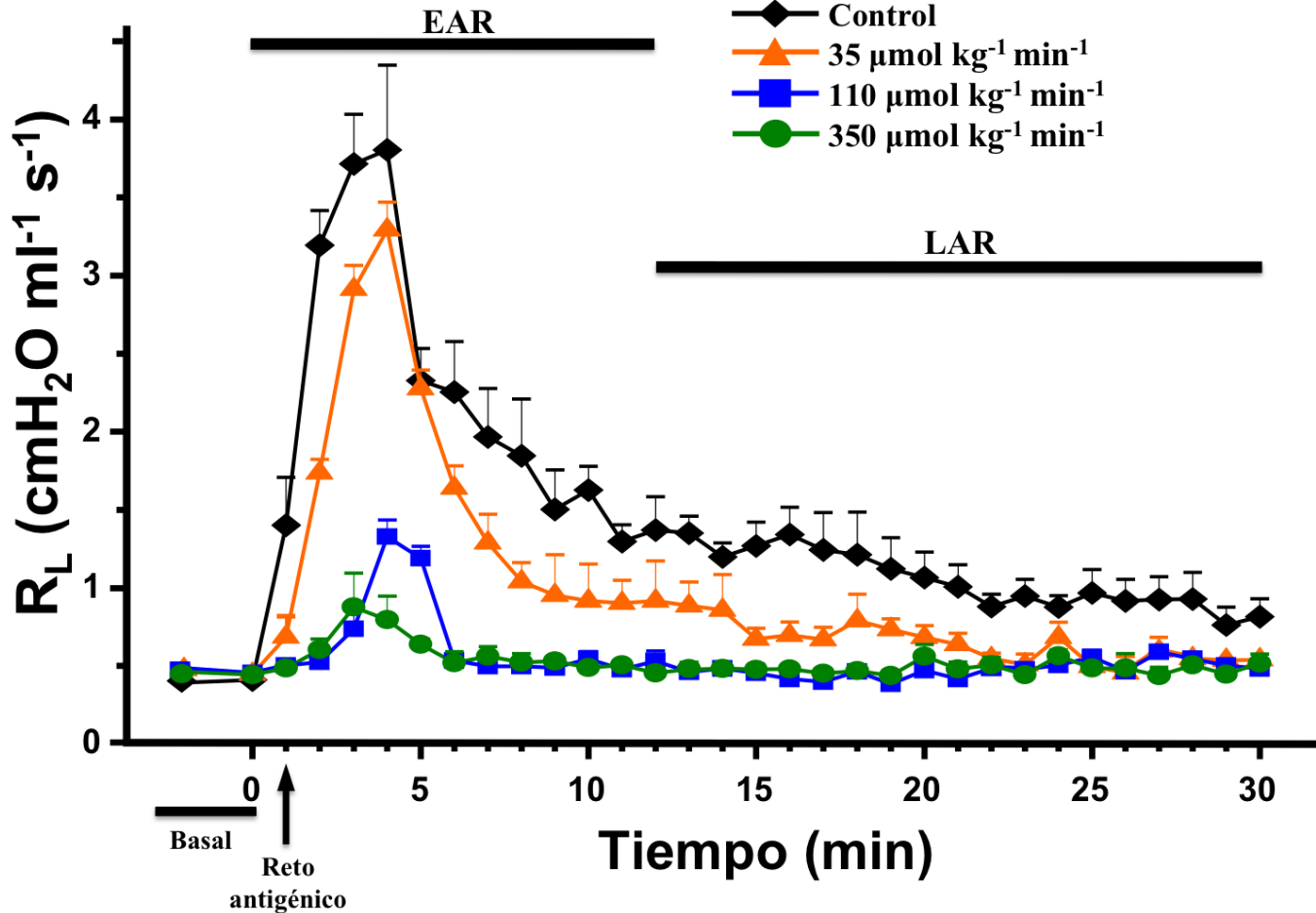


Figura 7. Efecto preventivo de testosterona sobre la resistencia pulmonar (R_L) incrementada durante un reto antigénico por OVA en cobayos sensibilizados. Las diferentes dosis de testosterona fueron administradas 15 min antes del reto antigénico con OVA y evaluadas durante 30 min. En la respuesta asmática temprana (EAR) la R_L del grupo A control (en ausencia de testosterona) fue significativamente mayor a la R_L obtenida con el pretratamiento de las diferentes dosis de testosterona: 35 ($p < 0.0001$), 110 ($p < 0.000001$) y 350 ($p < 0.000001$) $\mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$. La respuesta asmática tardía (LAR) fue completamente abolida a las dosis de 110 y 350 $\mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ de testosterona. R_L ; resistencia pulmonar. Cada símbolo es la media de $n = 6 \pm \text{D.E.M.}$

Como se mencionó los valores del incremento máximo de la R_L en la EAR (4 min después del reto antigénico), obtenidos con el pretratamiento con 35, 110 y 350 $\mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ de testosterona, fueron significativamente menores ($p < 0.05$, $p < 0.005$ y $p < 0.001$, respectivamente) al incremento máximo de la R_L obtenido en el *grupo A control*. De manera que al minuto 4, el broncoespasmo fue prevenido del 20 al 80%, dependiendo de la dosis (Fig. 8). El análisis de los datos mostró que la DE_{50} (dosis a la cual la testosterona inhibió el 50% de la EAR del broncoespasmo) de la testosterona, calculada a partir de la curva dosis respuesta fue $89.63 \pm 1.30 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$, con un valor de $E_{\text{máx}}$ (efecto máximo de la testosterona para inhibir la EAR del broncoespasmo) de $82.73 \pm 4.10 \%$ de prevención de la EAR del broncoespasmo.

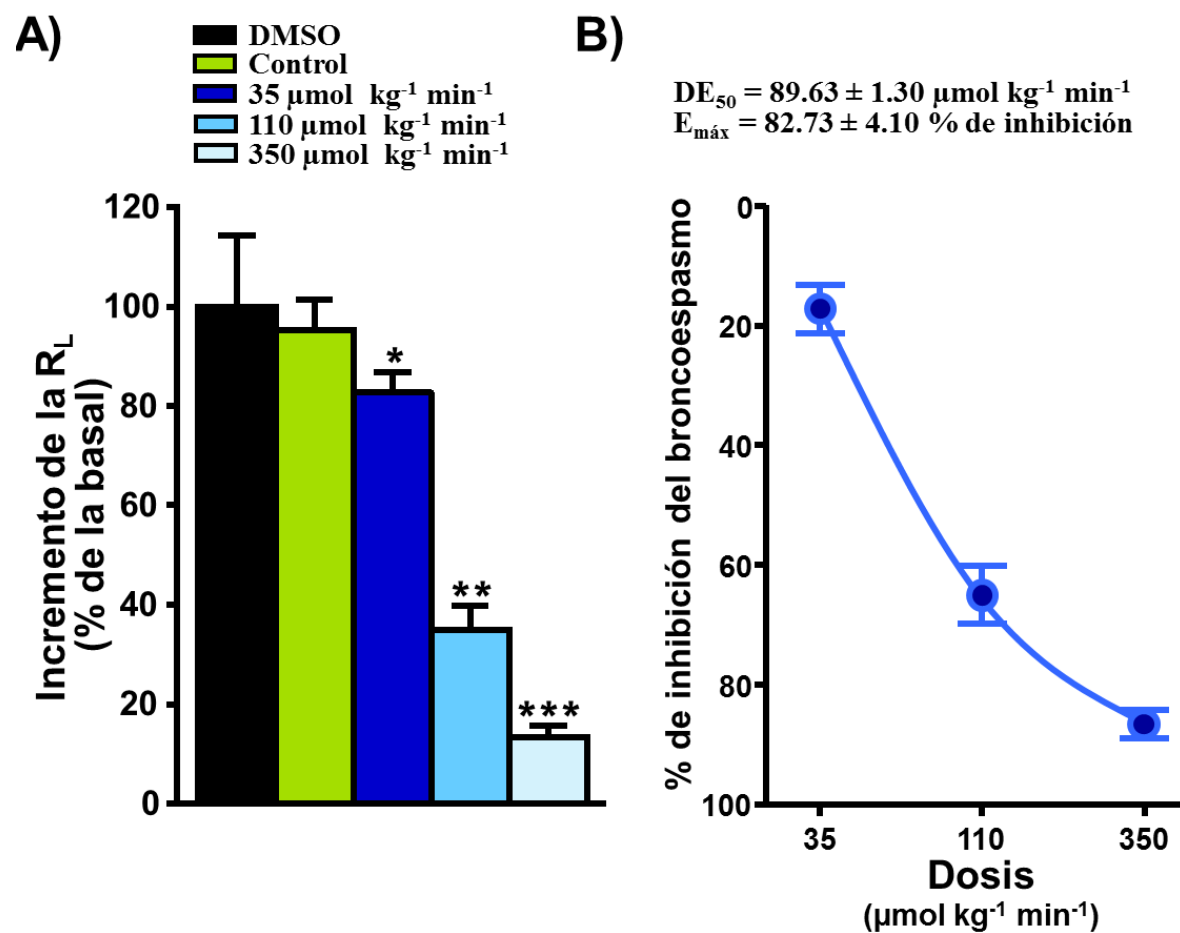


Figura 8. Efecto dependiente de la dosis de testosterona sobre la R_L al min 4 del reto antigénico con OVA (incremento máximo de la EAR). A) Porcentaje del incremento en la R_L ; diferencias significativas (* $p < 0.05$, ** $p < 0.005$ y *** $p < 0.001$) al comparar con el *grupo A control* y con el *grupo B* pretratado con el vehículo de testosterona (dimetilsulfóxido, DMSO; 0.04-0.06 ml min^{-1} , volumen equivalente en el que se administró cada dosis de testosterona). B) Curva dosis respuesta del incremento la R_L a diferentes dosis de testosterona. Cada barra o símbolo es la media de $n = 6 \pm \text{D.E.M.}$ La dosis efectiva 50 (DE_{50}) y el efecto máximo ($E_{m\acute{a}x}$) son expresados como la media $\pm \text{D.E.M.}$ ($n = 6$).

Colateralmente, se observó que la presión arterial de los cobayos durante el broncoespasmo del *grupo A control* (sistólica = 73.99 ± 15.38 mmHg y diastólica = 67.62 ± 15.28 mmHg) y la frecuencia cardiaca (144.20 ± 13.34 latidos por minuto) fue estadísticamente igual a la presión arterial (sistólica = 73.65 ± 10.67 mmHg y diastólica 67.48 ± 11.06 mmHg) y a la frecuencia cardiaca (154.43 ± 17.22 latidos por minuto) obtenidos en el *grupo C*, pretratado con las dosis de testosterona ($p > 0.05$).

6.2. Comparación de la prevención del broncoespasmo por testosterona y salbutamol

Como se esperaba, en el *grupo D* o control positivo, el pretratamiento con salbutamol (1, 10 y 100 $\text{nmol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$), previno la EAR del broncoespasmo de forma dependiente de la dosis (Fig. 9); sin embargo, durante la LAR la disminución gradual de la R_L se vio revertida aproximadamente a los 18 minutos del inicio del broncoespasmo, ya que la R_L comenzó a incrementarse, indicando que el salbutamol no abolió la LAR, como sucedió por el pretratamiento con testosterona.

La comparación entre las curvas dosis respuesta de testosterona y salbutamol en la fase aguda del broncoespasmo (EAR) indicó que la testosterona tuvo un efecto preventivo significativamente menor al efecto preventivo que produce salbutamol ($p < 0.000001$), con un valor de la DE_{50} de salbutamol de $12.58 \pm 1.31 \text{ nmol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$, lo cual muestra que la testosterona requiere de dosis mil veces más altas para prevenir el broncoespasmo agudo. Sin embargo, se

observó que la eficacia de ambos, testosterona ($E_{m\acute{a}x} = 82.73 \pm 4.10 \%$) y salbutamol ($E_{m\acute{a}x} = 81.30 \pm 2.8 \%$), no fue diferente ($p > 0.05$) para prevenir la EAR del broncoespasmo (Fig. 9).

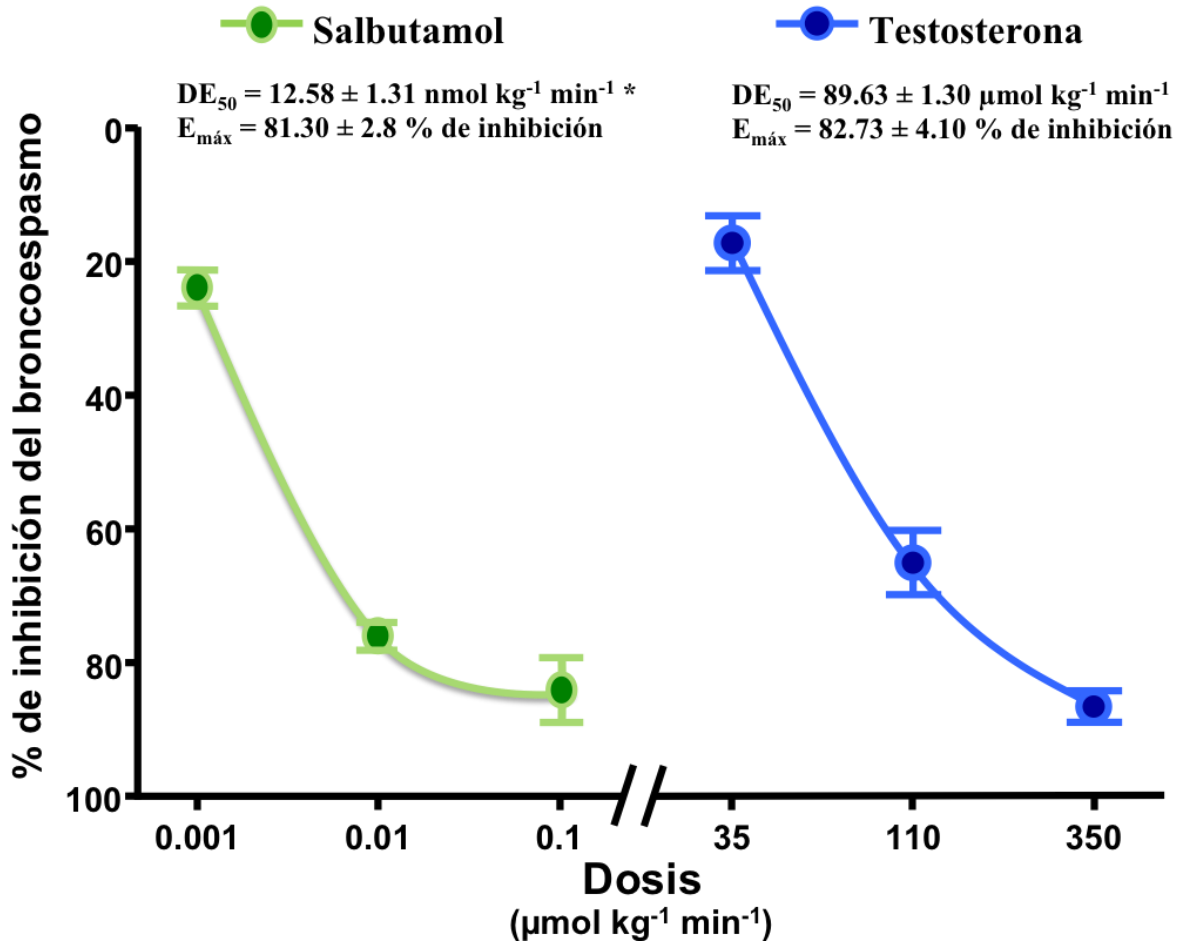


Figura 9. Comparación de la inhibición del broncoespasmo dependiente de la dosis de testosterona y salbutamol al min 4 del reto antigénico con OVA, momento del incremento máximo de la respuesta asmática temprana (EAR). La dosis efectiva 50 (DE_{50}) y el efecto máximo ($E_{m\acute{a}x}$) son expresados como la media \pm D.E.M. ($n = 6$). Con base en las DE_{50} , la testosterona fue significativamente ($*p < 0.000001$) menos potente que el salbutamol. El $E_{m\acute{a}x}$ de testosterona fue igual al $E_{m\acute{a}x}$ de salbutamol ($p > 0.05$). Cada símbolo es la media de $n = 6 \pm$ D.E.M.

7. DISCUSIÓN

Teniendo en cuenta que el broncoespasmo es el estrechamiento de la luz bronquial como consecuencia de la contracción del MLVA, las evidencias experimentales de esta tesis demostraron que el efecto relajante que ejerce la testosterona sobre el músculo liso traqueal *aislado* de conejo, cobayo y bovino (Kouloumenta *et al.*, 2006; Bordallo *et al.*, 2008) se efectúa también en el animal completo, y con las características para desarrollar un broncoespasmo producido por un alérgeno (modelo experimental de asma). Los hallazgos indican que el efecto relajante de la testosterona *in vitro*, puede ocurrir *in vivo*, debido a que la testosterona es capaz de prevenir el broncoespasmo de cobayos asmáticos (sensibilizados a OVA). Por lo tanto, la testosterona es un inhibidor efectivo de la broncoconstricción y por consiguiente del broncoespasmo.

En este trabajo se determinó que la testosterona puede retardar y prevenir la respuesta asmática temprana (EAR) del broncoespasmo provocado por OVA en cobayos sensibilizados. Asimismo, una observación muy relevante fue el hecho de que éste andrógeno también impide el despliegue y mantenimiento la respuesta asmática tardía (LAR), la cual es un incremento secundario de la resistencia de las vías respiratorias asociada con hiperreactividad o hipersensibilidad prolongada (Lemanske y Kaliner, 1997). Así, el análisis del efecto que la testosterona ejerce en estas dos fases asmáticas requiere de especial consideración.

La EAR es la fase aguda del broncoespasmo, principalmente mediada por histamina al producir broncoconstricción, el efecto preventivo de la testosterona en esta fase podría explicarse como resultado de su rápido efecto relajante no genómico directo sobre el MLVA (Kouloumenta *et al.*, 2006; Bordallo *et al.*, 2008). Posteriormente, la prevención de la LAR por la testosterona, en donde existe gran afluencia de moléculas inflamatorias; por ejemplo, los productos activados de la vía de las lipoxigenasas (es decir, leucotrienos), podría ser mediada por la acción genómica antiinflamatoria que posee la testosterona (Osman, 2003; Gilliver, 2010).

En este estudio se confirmó la alta potencia del salbutamol para prevenir la fase aguda del broncoespasmo, ya que este agonista β adrenérgico previene la EAR del broncoespasmo en el rango de dosis nanomolares; mientras que la testosterona requiere de dosis en el rango micromolar para prevenir el broncoespasmo. Sin embargo, es importante hacer notar que aunque los agonistas β_2 adrenérgicos son potentes agentes para el tratamiento del broncoespasmo, pueden tener ciertas desventajas, debido a que no tienen ningún efecto sobre la inflamación de las vías aéreas o sobre la hiperreactividad bronquial; asimismo, el uso de agonistas β adrenérgicos puede desarrollar taquifilaxis o tolerancia, arritmias por estimulación de los receptores β_1 adrenérgicos e hipoxemia. Es necesario subrayar que las metas generales de la terapia farmacéutica para el asma son la prevención del broncoespasmo y el control a largo plazo de la inflamación bronquial. En este sentido la testosterona queda en marcada *ventaja* con respecto al salbutamol, debido a que: (i) el efecto broncodilatador inmediato (no genómico) de la testosterona previene la fase aguda

del broncoespasmo en forma muy rápida y; (ii) tiene una respuesta antiinflamatoria a largo plazo (genómico) que impide la hiperreactividad bronquial. Estas propiedades de la testosterona, aunado al hecho de que es una hormona esteroide endógena, podrían ser terapéuticamente relevantes en el tratamiento del asma para recuperar la función respiratoria y hacer desaparecer los síntomas asmáticos de manera muy rápida. Cabe destacar que el desarrollo de fármacos antiasmático tiene un enorme valor terapéutico, ya que un broncoespasmo puede traer consecuencias fatales al impedir el paso del aire hacia los pulmones y llegar a la muerte por paro respiratorio.

El efecto antibroncoespasmódico de la testosterona, reportado en esta tesis, no es privativo de este andrógeno, este hallazgo es consistente con un reporte reciente de nuestro grupo donde se demostró que el precursor de la testosterona, la dehidroepiandrosterona, tiene también la capacidad de relajar el MLVA y prevenir el broncoespasmo inducido por OVA en cobayos sensibilizados (Espinoza *et al.*, 2013). Los datos de este trabajo, en conjunto con los del presente estudio, sugieren que la disminución de la concentración fisiológica de la testosterona y de su precursor dehidroepiandrosterona, es un factor importante que puede agravar los episodios asmáticos al propiciar la broncoconstricción.

Con fundamento en lo anterior, es un hecho bien documentado el declive de los niveles de dehidroepiandrosterona y testosterona con la edad (Traish *et al.*, 2011; Yeap, 2008), lo cual está estrechamente relacionado con numerosos estudios observacionales sobre la exacerbación del asma en la vejez masculina y

con los hallazgos experimentales de estos andrógenos: (i) por promover relajación en el MLVA (Koulomenta *et al.*, 2006; Bordallo *et al.*, 2008) previniendo el broncoespasmo (Espinoza *et al.*, 2013; datos de la presente Tesis) y; (ii) por su propiedad inmunomoduladora antiinflamatoria (Osman, 2003; Gilliver, 2010; Traish *et al.*, 2011). Por lo tanto, la falta de andrógenos en la niñez o la deficiencia de andrógenos en la vejez del varón asmático podrían ser, en parte, la causa de una exacerbación del cuadro asmático. Con estas bases, el restablecimiento de los niveles fisiológicos de la testosterona en los hombres asmáticos, exclusivamente en la madurez, podría ser un tratamiento preventivo para evitar broncoespasmos frecuentes. En apoyo a esta propuesta, algunos estudios clínicos pueden sustentar esta propuesta, debido a que se ha reportado que la testosterona, producto del metabolismo de la dehidroepiandrosterona, también induce efectos benéficos en los hombres asmáticos y otras enfermedades autoinmunes. La administración de testosterona provoca la disminución de respuestas inflamatorias (Olsen y Kovacs, 1996; Cutolo, 1997; Dalal *et al.*, 1997) y mejora los síntomas asmáticos en hombres con hipogonadismo (Malkin *et al.*, 2004; Corrales *et al.*, 2006).

Cabe mencionar que la fluctuación de los niveles de testosterona también ocurren en el cobayo, en el que la testosterona tiene su máximo nivel en plasma durante la pubertad (entre 30 y 90 días de edad), mientras que durante la madurez (90 días-24 meses de edad) los niveles de testosterona son ligeramente menores pero permanecen estables (Rigaudière, *et al.*, 1976). Dado que los cobayos utilizados fueron adultos de más de 90 días, es posible que por los niveles de

testosterona en ellos, la respuesta observada sea menor a la que se podría obtener en animales viejos, con menores niveles de testosterona en plasma, lo cual podría ser un experimento para continuar con esta línea de investigación.

Finalmente, es importante enfatizar que este estudio aporta algunos fundamentos básicos sobre el entendimiento de la fisiopatología del asma y el papel que la testosterona juega en este proceso. Es aceptado que se requieren estudios básicos para determinar el mecanismo de la acción relajante de la testosterona en el MLVA, así como llevar a cabo experimentos clínicos en pacientes asmáticos sobre el efecto preventivo de la testosterona en los ataques asmáticos.

8. CONCLUSIONES

- 1.** La testosterona previene y retarda la fase aguda del broncoespasmo por mecanismos no genómicos.

- 2.** La testosterona tiene también la capacidad de abolir la respuesta tardía del broncoespasmo (hiperreactividad bronquial prolongada) por la propiedad antiinflamatoria de este andrógeno a través de mecanismos genómicos.

- 3.** La testosterona podría presentar ventajas con respecto al uso de medicamentos antiasmáticos (β – agonistas), por su efecto broncodilatador aunado a su efecto antiinflamatorio.

- 4.** Los datos de esta Tesis proponen que el restablecimiento de los niveles fisiológicos de la testosterona en hombres asmáticos mayores podría ser una alternativa para evitar broncoespasmos frecuentes. Además, estos hallazgos dan la pauta para el diseño de nuevos fármacos antiasmáticos.

9. REFERENCIAS

Anderson A, Toppari J, Haavisto A, Petersen J, Simell T, Simell O, Skakkebaek NE. (1998). Longitudinal reproductive hormone profiles in infants: peak of inhibin B levels in infant boys exceeds levels in adult men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 83 (2): 675–681.

Avvakumov G, Cherkasov A, Muller Y, Hammond G. (2010). Structural analyses of sex hormone-binding globulin reveal novel ligands and function. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 316 (1): 13–23.

Balzano G, Fuschillo G, Melillo G, Bonini S. (2001). Asthma and sex hormones. *Allergy*. 56 (1): 13–20.

Bordallo J, García de Boto M, Meana C, Velasco L, Bordallo C, Suárez L, Cantabrana B, Sánchez M. (2008). Modulatory role of endogenous androgens on airway smooth muscle tone in isolated guinea-pig and bovine trachea; involvement of β_2 -adrenoceptors, the polyamine system and external calcium. *European Journal of Pharmacology*. 601 (1-3): 154–162.

Chen W, Mempel M, Schober W, Behrendt H, Ring J. (2008). Gender difference, sex hormones, and immediate type hypersensitivity reactions. *Allergy*. 63 (11): 1418–1427.

Corrales J, Almeida M, Burgo R, Mories M, Miralles J, Orfao A. (2006). Androgen-replacement therapy depresses the ex vivo production of inflammatory cytokines by circulating antigen-presenting cells in aging type-2 diabetic men with partial androgen deficiency. *The Journal of Endocrinology*. 189 (3): 595–604.

Cutolo M. (1997). Do sex hormones modulate the synovial macrophages in rheumatoid arthritis?. *Annals of the Rheumatic Diseases*. 56 (5): 281–284.

Dalal M, Kim S, Voskuhl R. (1997). Testosterone therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces a T helper 2 bias in the autoantigen-specific T lymphocyte response. *Journal of Immunology*. 159 (1): 3–6.

Devlin T. (2004). *Bioquímica. Libro de texto con aplicaciones clínicas*. 4ª Ed. Editorial Reverté. Barcelona. España. 1219p.

Eagan T, Brøgger J, Eide G, Bakke P. (2005). The incidence of adult asthma: a review. *The International Journal of Tuberculosis and Lung Disease*. 9 (6): 603–612.

Espinoza J, Montañó L, Perusquía M. (2013). Nongenomic bronchodilating action elicited by dehydroepiandrosterone (DHEA) in a guinea pig asthma model. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 138 (2013): 174–182.

Farha S, Asosingh K, Laskowski D, Hammel J, Dweik R, Wiedemann H, Erzurum S. (2009). Effects of the menstrual cycle on lung function variables in women with asthma. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*. 180 (4): 304–310.

García E, y Caraballo L. (2007). *Asma*. Editorial Médica Panamericana. D.F. México. 562p.

García C, Fernández R, Martínez D, Franco F, Pérez J. (2012). Prevalencia y riesgos asociados con pacientes adultos con asma de 40 años o más de la ciudad de México: estudio base poblacional. *Salud Pública de México*. 54 (4): 425–432.

Gilbert S. (2005). *Biología del Desarrollo*. 7ª Ed. Editorial Médica Panamericana. Madrid. España. 902 p.

Gilliver S. (2010). Sex steroids as inflammatory regulators. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*. 120 (2-3): 105–115.

GINA. (2012). The global burden of asthma: executive summary of the Global Initiative for Asthma (GINA). Dissemination Committee report: Masoli M, Fabian D, Holt S, Beasley. Medical Research Institute of New Zealand Wellington, New Zealand and University of Southampton Southampton, United Kingdom.

Gore, R. (1988). Cyclosporine differentially affects estrogen and progesterone synthesis by rat granulosa cells in vitro. *Molecular and Cellular Endocrinology*. 57 (3): 187–198.

Harman M, Metter E, Tobin J, Pearson J, Blackman M. (2001). Longitudinal effects of aging on serum total and free testosterone levels in healthy men. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 86 (2): 724–731.

Hu J, Zhang Z, Shen W, Azhar S. (2010). Cellular cholesterol delivery, intracellular processing and utilization for biosynthesis of steroid hormones. *Nutrition and Metabolism*. 1 (7): 47.

ISAAC. (1998). Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee. *Lancet*. 351 (911): 1225–1232.

Kaufman J, y Vermeulen A. (2005). The decline of androgen levels in elderly men and its clinical and therapeutic implications. *Endocrine Reviews*. 26 (6): 833–876.

Kouloumenta V, Hatziefthimiou A, Paraskeva E, Gourgoulialis K, Molyvdas P. (2006). Non-genomic effect of testosterone on airway smooth muscle. *British Journal of Pharmacology*. 149 (8): 1083–1091.

Koolman J, y Röhm K-H. (2004). *Bioquímica Humana. Texto y Atlas*. 3ª Ed. Editorial Médica Panamericana. Alemania. 488p.

Lemanske R, y Kaliner A. (1997). Late phase allergic reactions. En: *Allergies, Principles and Practice*. Mosby Yearbook, Inc. 4ª ed.

Malkin C, Pugh P, Jones R, Kapoor D, Channer K, Jones T. (2004). The effect of testosterone replacement on endogenous inflammatory cytokines and lipid profiles in hypogonadal men. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 89 (7): 3313–3318.

Manuyakorn W, Howarth P, Holgate S. (2013). Airway remodelling in asthma and novel therapy. *Asian Pacific Journal of Allergy and Immunology*. 31 (1): 3–10.

Miller W. (2008). Steroidogenic enzymes. *Endocrine Development*. 13: 1–18.

Morales A, Robles G, Díaz V. (2007). Las hormonas esteroides y el páncreas: Un nuevo paradigma. *Revista de Investigación Clínica*. 59 (2): 124–129.

Olsen N, y Kovacs W. (1996). Gonadal steroids and immunity. *Endocrine Reviews*. 17: 369–384.

Osman M. (2003). Therapeutic implications of sex differences in asthma and atopy. *Archives of Disease in Childhood*. 88 (7): 587–90.

Payne H, y Hales B. (2004). Overview of steroidogenic enzymes in the pathway from cholesterol to active steroid hormones. *Endocrine Reviews*. 25 (6): 947–970.

Pérez J. (2013). Sisinio de Castro. *Manual de patología general*. 7a Ed. Elsevier Health Sciences. Barcelona. España. 724 pp.

Perusquía M, Navarrete E, Jasso-Kamel J, Montañó LM. (2005). Androgens induce relaxation of contractile activity in pregnant human myometrium at term: a nongenomic action on L-type calcium channels. *Biology of Reproduction*. 73 (2): 214–221.

Perusquía M, y Stallone J. (2010). Do androgens play a beneficial role in the regulation of vascular tone? Nongenomic vascular effects of testosterone metabolites. *American Journal of Physiology, Heart and Circulatory Physiology*. 298 (5): H1301–H1307.

Postma D. (2007). Gender differences in asthma development and progression. *Gender Medicine*. 4 (B): S133–S146.

Rigaudière N, Pelardy G, Robert A, Delost P. (1976). Changes in the concentrations of testosterone and androstenedione in the plasma and testis of the guinea-pig from birth to death. *Journal of Reproduction and Fertility*. 48 (2): 291–300.

Rozanski E, y Hoffman A. (1999). Pulmonary Function Testing in Small Animals. *Clinical Techniques in Small Animal Practice*. 14 (4): 237–241.

Schatz M, Dombrowski M, Wise R, Thom E, Landon M, Mabie W, Newman R, Hauth J, Lindheimer M, Caritis S, Leveno K, Meis P, Miodovnik M, Wapner R, Paul R, Varner M, O'sullivan M, Thurnau G, Conway D, McNellis D. (2003). Asthma morbidity during pregnancy can be predicted by severity classification. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 112 (2): 283–288.

Townsend E, Miller V, Prakash Y. (2012). Sex Differences and Sex Steroids in Lung Health and Disease. *Endocrine Reviews*. 33 (1): 1–47.

Tsutsui K, Matsunaga M, Miyabara H, Ukena K. (2006). Neurosteroid biosynthesis in the quail brain: a review. *Journal of Experimental Zoology Part A: Comparative Experimental Biology*. 305A (9): 733–742.

Traish A, Kang H, Saad F, Guay A. (2011). Dehydroepiandrosterone (DHEA)--a precursor steroid or an active hormone in human physiology. *Journal of Sexual Medicine*. 8 (11): 2960–2982.

Vargas M. (2005). Patogenia del asma. En: *Asma. Enfoque integral para Latinoamérica*. Salas J, Chapala R, Vargas M (eds). McGraw-Hill Interamericana. D.F. México. 1154p.

Vargas M. (2009). Epidemiología del asma. *Neumología y Cirugía de Tórax*. 68 (S2): S91–S97.

Vela R, García J, Pardo M, Jiménez P, López A. (2009). Testosterona, función endotelial, salud cardiovascular y adrogenodeficiencia del varón añoso. Archivos Españoles de Urología. 62 (3): 173–178.

Winter JS, y Faiman C. (1972). Pituitary-Gonadal Relations in Male Children and Adolescents. Pediatric Research. 6 (2): 126–135.

Yeap B. (2008). Are declining testosterone levels a major risk factor for ill-health in aging men. International Journal of Impotence Research. 21 (1): 24–36.