



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE QUÍMICA

**LA EXPOSICIÓN CRÓNICA A TESTOSTERONA
AUMENTA LA RELAJACIÓN INDUCIDA POR
SALBUTAMOL EN EL MÚSCULO LISO TRAQUEAL
DE COBAYO**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

P R E S E N T A:

MARÍA FERNANDA CASAS HERNÁNDEZ



CDMX, 2021



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE:	Profesora: Elia Brosla Naranjo Rodríguez
VOCAL:	Profesora: Berenice Ovalle Magallanes
SECRETARIO:	Profesor: Luis Manuel Montaña Ramírez
1er. SUPLENTE:	Profesora: Aleisha Araceli González Arenas
2do. SUPLENTE:	Profesor: Ignacio González Sánchez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Investigación en Asma
Torre de Investigación, Facultad de Medicina
Universidad Nacional Autónoma de México,
Coyoacán, CDMX. C.P. 04510
México

ASESOR DEL TEMA:

Dr. LUIS MANUEL MONTAÑO RAMÍREZ

SUPERVISOR TÉCNICO:

Dr. JORGE EDUARDO REYES GARCÍA

SUSTENTANTE:

MARÍA FERNANDA CASAS HERNÁNDEZ

Agradecimientos

Agradezco a la Universidad Nacional Autónoma de México, la Facultad de Química y la Facultad de Medicina por las instalaciones y recursos brindados que permitieron mi formación profesional y personal.

Este trabajo de tesis se realizó con apoyo de los proyectos PAPIIT (DGAPA-UNAM) IN204319 y CONACYT 137725.

DEDICATORIA

Al Doctor Montaña por su apoyo, su tiempo, sus enseñanzas y su guía.

Al Doctor Jorge por ser mi sensei, mi amigo y por siempre ayudarme a resolver cada una de mis dudas por más pequeñas que estas sean, por su paciencia y por enseñarme a hacer un buen trabajo.

A Abrils por compartir su proyecto conmigo, por su amistad y por entender mis locuras.

A la Doctora Bettina y el Doctor Edgar por ayudarme en cada seminario y darme su punto de vista.

A mis compañeros de laboratorio por aguantar mi humor en él. A la Dra. Elia Brosla Naranjo Rodríguez, la Dra. Berenice Ovalle Magallanes y el Dr. Ignacio González Sánchez por ayudarme con la revisión final de esta tesis y hacer que se enriqueciera el contenido de la misma.

A mis padres por su inmenso amor que me dan siempre y por nunca dejarme sola, por su paciencia, por jamás dudar de mí, por sus consejos y apoyarme en todo.

A mis hermanos Ru y Jim por ser mis compañeros de vida, por siempre confiar en que puedo lograr lo que sea, por amarme y darme ánimos. A Maxi por creer que soy la más inteligente de todas.

A mis abuelos, tíos, primos, por todo su apoyo.

A mis amigos (Richie, Diego, Chucho, Migue, Papaqui, Tata, Erandi, Adri, Diana, Carlos, Salma, Cass, Karen C., Karen V., Fer, Nancy, Mary, Pato, Gaby, Vitoria, etc.) por no dejar que me rindiera, por comprenderme y ayudarme a pasar este nivel con mucha alegría.

A Iván por confiar en mí y amarme.

Índice

Abreviaturas	viii
Lista de Figuras	xi
Resumen	xii
1. Introducción.....	1
1.1 Asma	1
1.1.1 <i>Musculo liso de las vias respiratorias.</i>	1
1.1.2 <i>Inflamación de las vias respiratorias.</i>	2
1.2 Incidencia del Asma y su relación con el género.....	4
1.3 Testosterona.....	6
1.4 Vía genómica y no genómica de los andrógenos.	9
1.4.1 <i>Efectos no genómicos de los andrógenos en el MLVA</i>	9
1.4.2 <i>Efectos genómicos de los andrógenos en el MLVA</i>	12
1.5 Receptores adrenérgicos β_2	13
1.6 Histamina.....	16
2. Pregunta de investigación	18
3. Objetivo general	18
3.1 Objetivos particulares	18
4. Metodología	19

4.1 Fármacos	21
4.2 Análisis estadístico	21
4.3 Método de Schild.	21
5. Resultados	23
5.1. La exposición crónica a la testosterona aumenta la relajación inducida por salbutamol en el músculo liso de la vía aérea.	23
5.2 El efecto de potenciación es mediado por una vía genómica	25
5.3 La testosterona induce una regulación positiva del receptor adrenérgico β_2 favoreciendo la respuesta del salbutamol en el músculo liso de la vía aérea de cobayo.	27
6. Discusión	29
7. Conclusiones	34
8. Perspectivas	34
9. Bibliografía	35
10. Anexos	43

Abreviaturas

Abreviatura	Significado
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADP	Adenosín difosfato
AMP _c	Monofosfato de adenosina cíclica
AR β_2	Receptor adrenérgico β_2
ATP	Adenosín trifosfato
${}_b[\text{Ca}^{2+}]_i$	Concentración basal de Ca^{2+} intracelular
BSA	Albúmina sérica bovina
$[\text{Ca}^{2+}]_e$	Concentración de Ca^{2+} extracelular
$[\text{Ca}^{2+}]_i$	Concentración de Ca^{2+} intracelular
$[\text{Ca}^{2+}]_{\text{RS}}$	Concentración de Ca^{2+} en el retículo sarcoplásmico
Cch	Carbacol
CI ₅₀	Concentración inhibidora 50
CI _{50a}	CI ₅₀ del agonista en presencia del antagonista
CI _{50c}	CI ₅₀ del agonista en ausencia del antagonista
COMT	Catecol-o-metiltransferasa
DAG	Diacilglicerol
DHEA	Dehidroepiandrosterona
E ₂	17 β -estradiol
ESM	Error estandar de la media

GDP	Guanosín difosfato
GPCR	Receptor acoplado a proteína G
GTP	Guanosín trifosfato
h	Hora
His	Histamina
ICI	ICI 118,551
IL	Interleucina
ILC2	Células linfoides innatas del grupo 2
IP ₃	Inositol trifosfato
Iso	Isoprenalina
K _B	Constante de disociación
L-VDCC	Canal de Ca ²⁺ dependiente de voltaje tipo L
MAO	Monoaminoxidasa
min	Minutos
MLCK	Cinasa de la cadena ligera de miosina
MLVA	Músculo liso de la vía aérea
PKA	Proteína cinasa A
PLC _β	Fosfolipasa C _β
RA	Receptor de andrógenos
RIP ₃	Receptor a inositol trifosfato
ROCC	Canal de Ca ²⁺ operados por el receptor
RS	Retículo sarcoplásmico

SERCA	ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico
SOCC	Canal de Ca^{2+} operado por el almacén
T-VDCC	Canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje tipo T
TES	Testosterona
TES-BSA	Testoserona conjugada con albúmina sérica bovina
$\text{T}_{\text{H}2}$	Linfocito T cooperador tipo 2
3β -HSD2	3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2
5α -DHT	5α -dihidrotestosterona
5β -DHT	5β -dihidrotestosterona
17β -HSD3	17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa

Lista de Figuras

Figura	Contenido	Página
1	Componentes estructurales de las vías respiratorias en un sujeto sano y en un paciente con asma.	4
2	Estructura química de la testosterona.	6
3	Biosíntesis de testosterona.	8
4	Estructura química de catecolaminas.	14
5	Vía de señalización del receptor adrenérgico β_2 .	15
6	Biosíntesis de la histamina.	16
7	Vía de señalización del receptor H_1 .	17
8	Método de Schild.	23
9	Efecto de la testosterona (TES, 20 y 40 nM, 48 h) sobre la relajación inducida por salbutamol en anillos traqueales de cobayo.	24
10	Exposición aguda de testosterona (TES 15 y 60 min) no ejerce un efecto de potenciación sobre la relajación inducida por salbutamol en anillos traqueales de cobayo.	25
11	Efecto de la flutamida (Flu 10 μ M) sobre la potenciación de la relajación inducida por salbutamol en anillos traqueales de cobayo.	26
12	Efecto de la testosterona conjugada con albúmina sérica bovina (TES-BSA 40 nM, 48 h) sobre la relajación inducida por salbutamol en anillos traqueales de cobayo.	27
13	Efecto de la testosterona (TES 40 nM) sobre el valor pA2 de ICI 118,551 en anillos traqueales de cobayo.	29
ANEXOS		
Artículo	Testosterone augments β_2 adrenergic receptor genomic transcription increasing salbutamol relaxation in airway smooth muscle	43

Resumen

El asma es una enfermedad inflamatoria crónica de las vías respiratorias que se caracteriza por presentar hiperreactividad y broncoespasmo. Está bien documentado que existe una relación entre las hormonas sexuales y la enfermedad del asma. Durante la niñez los síntomas de esta enfermedad son más severos en niños que en niñas, tendencia que se revierte en la pubertad. Esta observación concuerda con el hecho de que las concentraciones plasmáticas de testosterona aumentan durante la adolescencia alcanzando un pico, lo que sugiere un papel protector de esta hormona contra la sintomatología del asma. Se han postulado diferentes mecanismos para explicar este hallazgo: la testosterona favorece un mayor calibre de las vías aéreas durante la pubertad, regula negativamente la inflamación e interfiere con el receptor de inositol trifosfato. Los andrógenos inducen sus efectos a través de vías no genómicas y genómicas. Los efectos no genómicos ocurren en periodos cortos de tiempo (es decir de segundos a minutos) son independientes de la unión del andrógeno a su receptor citoplasmático y en el músculo liso de la vía aérea han sido bien caracterizados. Los efectos genómicos (esto es de horas a días) involucran la entrada de los andrógenos a través de la membrana para unirse a su receptor androgénico en el citosol y posteriormente, este complejo se transfiere al núcleo donde modula la transcripción y la síntesis de proteínas. Con respecto a los efectos no genómicos sobre el músculo liso de la vía aérea, un grupo de investigadores mostró que los andrógenos relajan el músculo liso traqueal de cobayo y bovino pre-contraído a través del bloqueo de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L. Asimismo otro grupo de investigadores observaron que concentraciones supra fisiológicas de un metabolito reducido de testosterona potenciaron (vía no genómica) la relajación inducida por salbutamol y este fenómeno no se relacionó con la interacción del andrógeno con los receptores adrenérgicos β_2 . Por otro lado, los efectos genómicos de la testosterona sobre el músculo liso de la vía aérea no han sido abordados ampliamente. Con este trabajo se pretende explorar un posible efecto genómico de la testosterona (utilizando concentraciones fisiológicas) sobre la relajación inducida por la activación del receptor adrenérgico β_2 en el músculo liso

de la vía aérea. Para ello se realizaron experimentos en donde se incubaron anillos traqueales de cobayo con testosterona 40 nM durante 48 horas y se observó una potenciación en la relajación inducida por salbutamol, un agonista del receptor adrenérgico β_2 utilizado para revertir el broncoespasmo en pacientes asmáticos. En otro grupo de experimentos se utilizó testosterona conjugada con albúmina sérica bovina (40 nM) la cual previene la entrada del andrógeno al citoplasma; al incubarla durante 48 horas, no se observó la potenciación de la relajación inducida por salbutamol. Asimismo, tampoco se presentó el efecto de potenciación cuando el tejido fue pre-incubado con testosterona solamente durante 15-60 min. Los resultados anteriores sugieren que el efecto de potenciación en la relajación inducida por salbutamol es a través de una vía genómica. Para corroborar estos hallazgos, se realizaron experimentos con flutamida, un antagonista del receptor androgénico (10 μ M). De igual forma, la flutamida bloqueó la potenciación producida por la testosterona en la relajación inducida por salbutamol.

Además, en otro grupo de experimentos donde se utilizó un antagonista selectivo del receptor adrenérgico β_2 (ICI 118,551), se encontró mayor afinidad del receptor adrenérgico por el salbutamol después de la incubación con testosterona, lo que apunta a una regulación positiva del receptor adrenérgico β_2 al incubarlo con este andrógeno. En conclusión, la testosterona regula positivamente al receptor adrenérgico potenciando la relajación inducida por salbutamol a través de una acción genómica. Estos hallazgos representan un mecanismo adicional por el que la testosterona podría ejercer un efecto protector en los varones contra la sintomatología del asma.

1. Introducción

1.1 Asma

Aproximadamente 300 millones de personas en el mundo padecen asma, y al menos 250,000 muertes son atribuidas a esta enfermedad cada año, lo que la convierte en una de las enfermedades pulmonares crónicas más comunes [Croissant, 2014; GINA, 2020]. El paciente asmático se caracteriza por presentar síntomas variables de sibilancias, dificultad para respirar, opresión en el pecho y/o tos, así como limitación variable del flujo de aire espiratorio. Tanto los síntomas como la limitación del flujo de aire varían de forma característica con el tiempo y en intensidad. Estas variaciones a menudo son ocasionadas por factores como el ejercicio, la exposición a alérgenos o irritantes, cambios en el clima o infecciones respiratorias virales (causadas por rinovirus o el virus sincitial respiratorio) y bacterianas (*Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia pneumoniae*, entre otros) [Darveaux *et al.*, 2014]. Asimismo, el asma está asociada con la hiperreactividad de las vías respiratorias, una respuesta broncoconstrictora exacerbada, que no presentan sujetos sanos, a estímulos físicos o químicos, además de una inflamación crónica [GINA, 2020]. La contracción del músculo liso de las vías aéreas (MLVA) reduce el calibre de la vía aérea [Delmotte *et al.*, 2010; Ressmeyer *et al.*, 2010] incrementando la resistencia de esta al paso del aire.

1.1.1 Músculo liso de las vías respiratorias.

La contracción y relajación del músculo liso de las vías respiratorias están reguladas por la señalización y los cambios en la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) [Lam *et al.*, 2019]. Este ión tiene un papel importante como mediador del acoplamiento de excitación-contracción [Bazán-Perkins *et al.*, 2003]. En las células del MLVA en reposo, la regulación de la concentración basal de Ca^{2+} intracelular (${}_b[\text{Ca}^{2+}]_i$) entre 100 y 150 nM, es esencial para mantener el óptimo calibre de la vía aérea. Este proceso de regulación de la ${}_b[\text{Ca}^{2+}]_i$ para

mantener el potencial de membrana en reposo y el tono miogénico se lleva a cabo por distintas proteínas, como la ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (SERCA), la ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática, el receptor de potencial transitorio canónico 3, el canal de Ca^{2+} dependiente de voltaje tipo L (L-VDCC) y el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en su modo normal. Asimismo, proteínas membranales como el canal de Ca^{2+} operado por el receptor (ROCC), el canal de Ca^{2+} operado por el almacén (SOCC) y el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en su modo reverso contribuyen al incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ que ocurre cuando el MLVA es estimulado con agonistas broncoconstrictores [Reyes-García *et al.*, 2018; Montaña *et al.*, 2018].

En este sentido, la contracción de MLVA en respuesta a la liberación de neurotransmisores o mediadores con acción broncoconstrictora como por ejemplo la acetilcolina, la histamina (His) y los leucotrienos está mediada por la activación de sus propios receptores acoplados a proteínas G (GPCRs). La contracción se inicia predominantemente por la liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (RS) en respuesta a la activación del receptor a inositol trifosfato (RIP_3) localizado en el mismo organelo y también por la liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR, por sus siglas en inglés) a través de receptores de rianodina (RyR) [Lam *et al.*, 2019]. Posteriormente ocurre la activación de canales membranales como SOCC y ROCC, lo que permite el influjo de Na^+ y Ca^{2+} al citosol. El influjo de Na^+ desencadena la despolarización de la membrana plasmática con la consecuente activación del L-VDCC y el posterior influjo de Ca^{2+} . Finalmente, el incremento masivo en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ estimula la contracción del MLVA [Reyes-García *et al.*, 2018].

1.1.2 Inflamación de las vías respiratorias.

La inflamación crónica de las vías respiratorias es un marcador característico del asma [GINA, 2020], en la que muchas células del sistema inmune actúan junto con las células epiteliales para causar hiperreactividad. Por mucho tiempo se consideró al asma como una enfermedad caracterizada por presentar una respuesta inflamatoria eosinofílica mediada por linfocitos T

cooperadores de tipo 2 (Th2). Ahora se sabe que algunos pacientes presentan inflamación de tipo neutrofílica, controlada por los linfocitos Th17 y que generalmente es un fenotipo severo y resistente al tratamiento con corticoesteroides. Además, parte de la inflamación eosinofílica está controlada por células linfoides innatas del grupo 2 (ILC2) [Lambrecht *et al.*, 2015].

En conjunto con la presencia de eosinófilos en la respuesta mediada por linfocitos Th2, otro tipo de células inflamatorias son reclutadas al pulmón, incluyendo mastocitos, basófilos, monocitos y macrófagos [Djukanovic *et al.*, 1990]. El reclutamiento de estas células se produce mediante la secreción de citocinas como la interleucina (IL)-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-33, la linfopoyetina del estroma tímico, entre otras [Martinez-Gonzalez *et al.*, 2015].

1.1.3 Remodelación de las vías respiratorias.

En el asma, la pared de las vías respiratorias se engrosa en relación con la gravedad y duración de la enfermedad. Esta remodelación implica un aumento de la musculatura lisa de las vías respiratorias, engrosamiento de la lámina reticular subepitelial, depósito de matriz en toda la pared de las vías respiratorias, angiogénesis, y metaplasia mucosa epitelial, un proceso que implica la aparición de células mucosas en nuevas áreas de las vías respiratorias y aumento en la producción de moco (figura 1) [Holgate *et al.*, 2012].

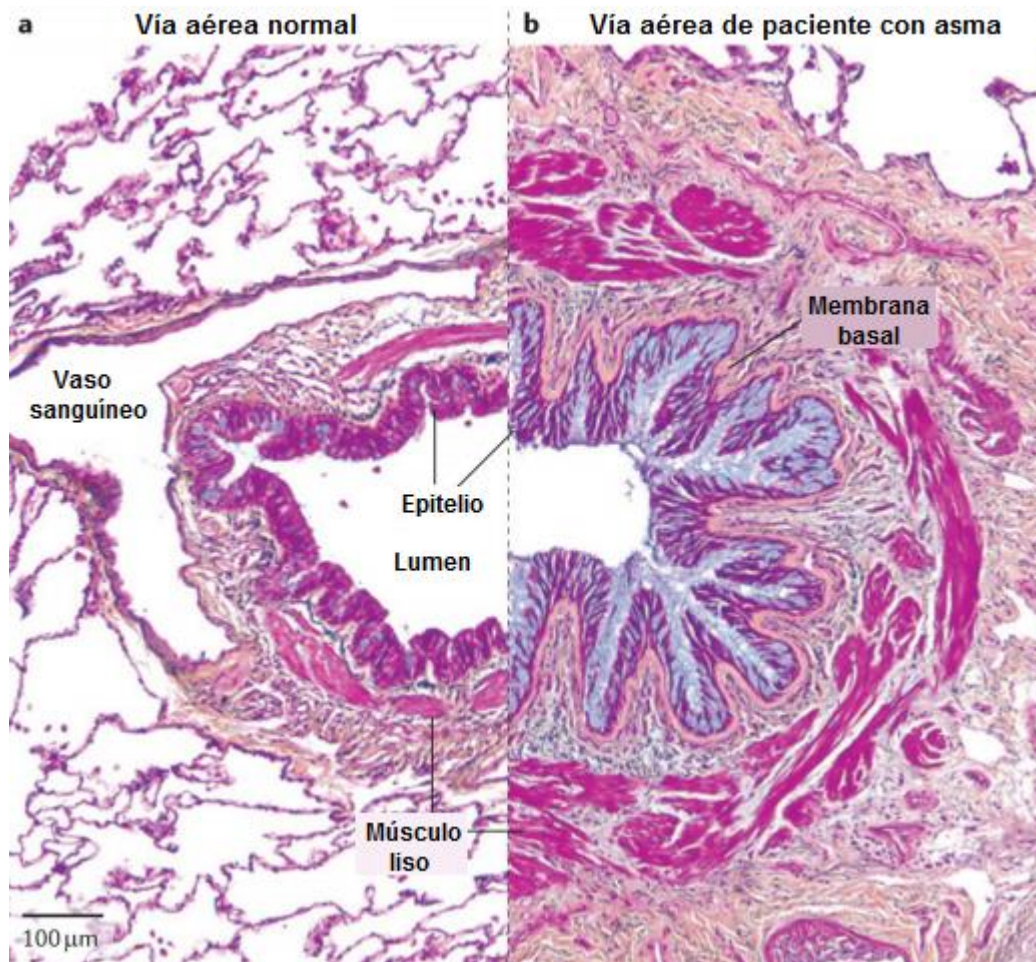


Figura 1. Componentes estructurales de las vías respiratorias en un sujeto sano (panel a) y en un paciente con asma (panel b). Las vías respiratorias en el asma muestran una remodelación estructural considerable, incluyendo hiperplasia de células caliciformes, fibrosis subepitelial y aumento en el volumen del músculo liso. Modificada de Fahy John V. (2015).

1.2 Incidencia del Asma y su relación con el género

Existe evidencia epidemiológica que señala diferencias con respecto al género en la incidencia del asma y enfermedades relacionadas (como rinitis alérgica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica entre otras) que pueden deberse a la susceptibilidad biológica, cambios en los niveles hormonales relacionados con la edad, exposición a factores ambientales, así como factores socioeconómicos y de salud. El sexo masculino es un factor de riesgo importante para el desarrollo de asma a edad temprana. La proporción de niños/niñas es aproximadamente 2:1 antes de los 5 años [Townsend *et al.*, 2012]. Antes de llegar a

la pubertad, la prevalencia de esta enfermedad es 4 veces mayor para los niños con respecto a las niñas. El predominio masculino en la incidencia del asma persiste hasta el inicio de la pubertad (de 10 a 14 años) cuando el número de niños y niñas con esta enfermedad es aproximadamente igual. Curiosamente, durante la pubertad ocurre un cambio en la distribución por género del asma. Después de la pubertad, durante los años reproductivos, aproximadamente el doble de mujeres que de hombres sufren de asma. Con el propósito de explicar estos hallazgos, inicialmente se propuso que los andrógenos como la testosterona (TES) promueven un mayor tamaño de la caja torácica y un mayor calibre de las vías respiratorias, confiriendo una protección a los hombres jóvenes en contra de los síntomas de asma [Hoffstein, 1986]. Sin embargo, el tamaño (es decir, las diferencias estructurales inherentes) por sí solo no representó una explicación suficiente para diversos autores [Townsend *et al.*, 2012; De Marco *et al.*, 2000; Zanolli *et al.*, 1997], y actualmente existe evidencia clara que involucra a las hormonas sexuales (a través de distintos mecanismos) en el desarrollo y la gravedad del asma. En este sentido, los datos publicados demuestran que los niveles altos de TES en plasma (6 a 50 nM) desde la pubertad hasta la edad adulta podrían ser beneficiosos para controlar y disminuir los síntomas del asma, mientras que en los hombres de edad avanzada (después de los 50 años), la disminución de la TES plasmática podría contribuir a la prevalencia del asma y el agravio de los síntomas. Estos postulados sugieren una acción protectora de las hormonas sexuales masculinas, ya que se ha demostrado que los andrógenos poseen efectos anti-inflamatorios que disminuyen las exacerbaciones del asma. [Laffont *et al.*, 2017; Fuseini *et al.*, 2017; Yung *et al.*, 2018]. Estos mecanismos serán explorados con detalle en la sección 1.4 Vía genómica y no genómica de los andrógenos.

1.3 Testosterona

Las hormonas sexuales son moléculas esteroideas derivadas del colesterol, que comparten la misma estructura química de 4 anillos de carbono fusionados, llamada ciclopentanoperhidrofenantreno y se diferencian y clasifican por el número de carbonos y por los grupos funcionales que presentan. Las progestinas, glucocorticoides y mineralocorticoides poseen 21 carbonos; los andrógenos y los estrógenos se componen de 19 y de 18 átomos de carbono, respectivamente [Voet *et al.*, 2007]. Particularmente, la estructura de la TES (la hormona de estudio en este trabajo) es la siguiente: se compone de 19 átomos de carbono con un doble enlace entre el carbono 4 y el carbono 5, un átomo de oxígeno en el carbono 3 y un sustituyente hidroxilo (OH) en el carbono 17 (figura 2).

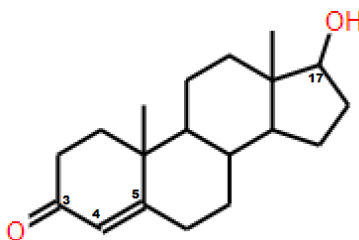


Figura 2. Estructura química de la testosterona.

La TES es la principal hormona esteroidea de la familia de los andrógenos. Aproximadamente el 95% de la TES endógena es producida por los testículos y secretada por las células de Leydig [Callou de Sá *et al.*, 2009]. Adicionalmente, la zona reticular de las glándulas suprarrenales también secreta pequeñas cantidades de TES [Burger, 2002]. Los niveles fisiológicos plasmáticos de TES en los hombres oscilan entre 6 y 50 nM [Muller *et al.*, 2011]. El primer paso de la esteroidogénesis (generación de hormonas esteroideas) es la transferencia del colesterol a la membrana mitocondrial interna con la posterior bioconversión en pregnenolona mediante la enzima de escisión de la cadena lateral P450 (P450_{cc/CYP11A1}). Posteriormente, la pregnenolona se transfiere al retículo endoplásmico donde se convierte en TES a través de una serie de reacciones enzimáticas. Inicialmente, la pregnenolona se biotransforma ya sea en 17 α -hidroxipregnenolona o en progesterona a través de la enzima P450 17 α -

hidroxilasa (P450c17/CYP17A1) o la enzima 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2 (3β -HSD2), respectivamente. Posteriormente la 17α -hidroxipregnenolona se convierte en dehidroepiandrosterona (DHEA) por la acción del citocromo P450c17/CYP17A1. La conversión de DHEA en androstenediona ocurre mediante la acción de 3β -HSD2 o en androstenediol mediante 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β -HSD3). Finalmente, se produce TES a través de la conversión de androstenediona o androstenediol por 17β -HSD3 o 3β -HSD2, respectivamente. De forma adicional, aproximadamente el 7% de la testosterona se puede reducir en dos metabolitos, la dihidrotestosterona (DHT, 5α -DHT) o 5β -dihidrotestosterona (5β -DHT) a través de las enzimas 5α -reductasa o 5β -reductasa, respectivamente. Finalmente, pequeñas cantidades de TES (aproximadamente el 0,5%) pueden ser biotransformadas en 17β -estradiol (E_2) mediante la aromatasa P450aro/CYP19A1; esta enzima reduce el grupo 3-ceto y aromatiza el anillo A con pérdida del carbono 19, para generar, el E_2 . Por otro lado, la enzima 17β -HSD3 cataliza la formación de E_2 a partir de estrona (figura 3). [Carbajal-García *et al.*, 2020; Rang y Dale, 2008].

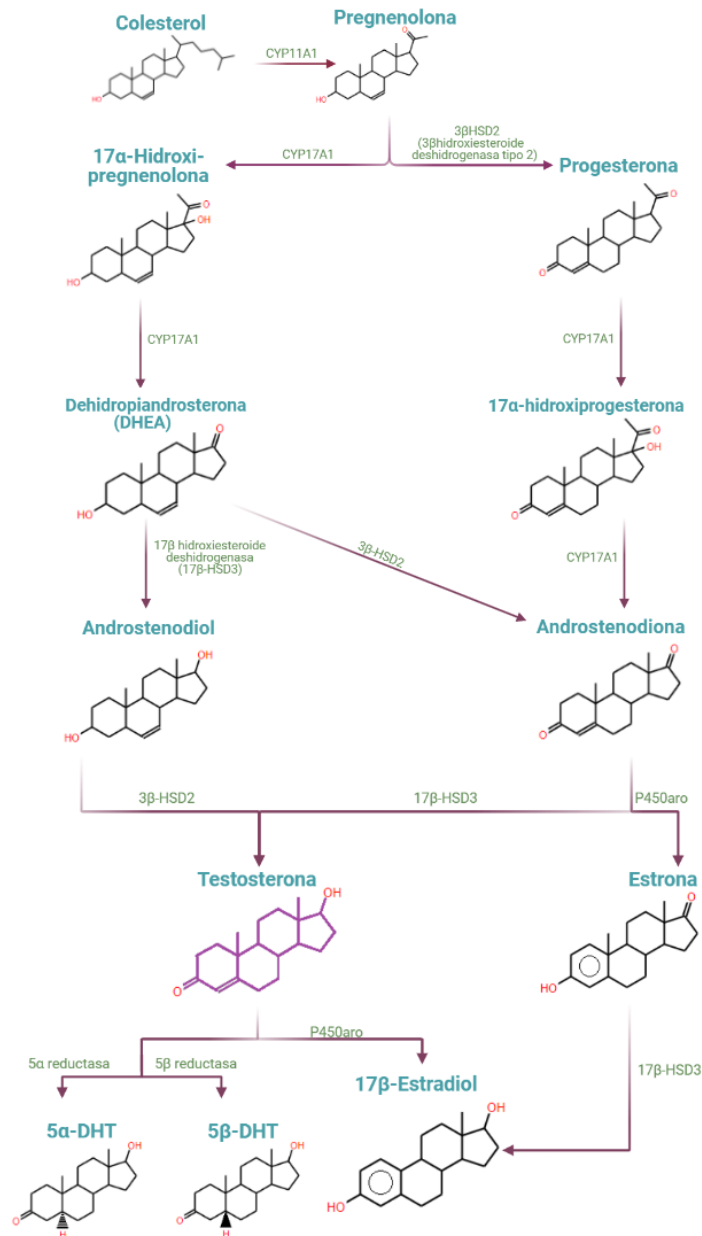


Figura 3. Biosíntesis de testosterona. El primer paso de la esteroidogénesis es la transferencia del colesterol a la membrana mitocondrial interna. Posteriormente se bioconvierte a pregnenolona. Esta se transfiere al retículo endoplásmico donde se convierte en TES a través de una serie de reacciones enzimáticas. La testosterona se puede reducir en dos metabolitos, la dihidrotestosterona (DHT, 5 α -DHT) o 5 β -dihidrotestosterona (5 β -DHT) a través de las enzimas 5 α -reductasa o 5 β -reductasa, respectivamente. Pequeñas cantidades de TES (aproximadamente el 0,5%) pueden ser biotransformadas en 17 β -estradiol (E₂) mediante la aromatasa P450aro/CYP19A1; esta enzima reduce el grupo 3-ceto y aromatiza el anillo A con pérdida del carbono 19, para generar, el E₂. Para mayores detalles ver texto. Tomada de Rang y Dale 2008.

1.4 Vía genómica y no genómica de los andrógenos.

Está bien establecido que los andrógenos ejercen sus efectos fisiológicos a través de vías genómicas (clásica) y no genómicas. Los efectos genómicos involucran la entrada libre del andrógeno a través de la membrana. Una vez en el citoplasma, se une al receptor de andrógenos (RA) citosólico induciendo la disociación de las proteínas chaperonas y la translocación del complejo al núcleo donde se dimeriza y se une a los elementos de respuesta de andrógenos, modulando la transcripción de genes y la síntesis de proteínas [Lucas-Herald *et al.*, 2017]. Por otro lado, los efectos no genómicos son independientes de la unión del andrógeno al RA. [Lucas-Herald *et al.*, 2017; Montañaño *et al.*, 2018]. Además, otro de los criterios para definir un efecto no genómico es el momento en que se produce el fenómeno. Para describir un efecto no genómico, se considera que la respuesta ocurre en un lapso breve como para permitir la transcripción de genes, es decir, de segundos a minutos (min) donde puede ocurrir una rápida inducción de segundos mensajeros para iniciar diferentes eventos (por ejemplo, la fosforilación de proteínas). Los efectos no genómicos no se alteran por los inhibidores de la transcripción y/o traducción, e incluso cuando el andrógeno se conjuga con moléculas como la albúmina sérica bovina (BSA) que le impiden entrar en el citoplasma ya que parte de estos efectos parecen ser llevados a cabo por la unión del andrógeno a los lípidos de la membrana plasmática o canales iónicos [Lucas-Herald *et al.*, 2017; Carbajal-García *et al.*, 2020].

1.4.1 Efectos no genómicos de los andrógenos en el MLVA

Los efectos no genómicos de los andrógenos (incluida la TES) han sido muy estudiados en el MLVA. Uno de los primeros trabajos utilizando tiras traqueales de conejo, demostró que la TES y la TES-BSA a concentraciones suprafisiológicas (micromolares) producen una relajación parcial sobre la contracción inducida por acetilcolina o carbacol (CCh) que, de acuerdo con los autores, parece estar parcialmente mediada por el óxido nítrico producido en el

epitelio. Además, el efecto de la TES reportado en este trabajo no fue influenciado por la presencia de un antagonista específico del receptor de andrógenos (flutamida) o por un inhibidor de la transcripción del ácido desoxirribonucleico (ADN; actinomicina D), ni por un inhibidor de la síntesis de prostanoideos (indometacina) [Kouloumenta *et al.*, 2006]. Posteriormente, otro grupo de investigadores, utilizando anillos y tiras traqueales de cobayos y bovinos, demostraron que el metabolito reducido de TES, la 5 α -DHT produce relajación del tejido presumiblemente de forma no genómica en la contracción inducida por CCh y KCl [Bordallo *et al.*, 2008]. En este trabajo se demostró que la relajación de estos tejidos es independiente del epitelio, lo que contrasta con el estudio de Kouloumenta. Además, Bordallo y colaboradores [Bordallo *et al.*, 2008] también encontraron el primer indicio de que el efecto relajante provocado por 5 α -DHT podría atribuirse al bloqueo del L-VDCC evitando el influjo de Ca²⁺ al citosol. De hecho, los hallazgos de estos dos estudios pioneros han revelado que la relajación inducida por andrógenos (a concentraciones micromolares) en el MLVA no está mediada genómicamente, pero el papel del epitelio aún no está del todo claro y los datos *in vitro* limitados hasta ese entonces no proporcionaban evidencia sólida sobre el mecanismo de la acción relajante de los andrógenos, aunque el fenómeno observado pudiera deberse a un bloqueo de canales de Ca²⁺ membranales por parte de los andrógenos. El laboratorio de investigación en asma de la Facultad de Medicina continuó con esta línea de investigación y se descubrió que la DHEA, la TES y sus metabolitos 5 α -DHT y 5 β -DHT abatían las contracciones inducidas por KCl, CCh u ovoalbúmina en el músculo liso traqueal de cobayos machos sensibilizados y no sensibilizados. En estos trabajos se observó que la, 5 β -DHT es el esteroide más potente para relajar el MLVA y se postuló que el posible mecanismo de acción que relaja el tejido es el bloqueo del L-VDCC [Espinoza *et al.*, 2013, Montañó *et al.*, 2014]. En relación con estos descubrimientos, en el 2007 Scragg y colaboradores demostraron que la TES es capaz de bloquear al L-VDCC en el mismo sitio de acción que las dihidropiridinas [Scragg *et al.*, 2007]. Hallazgos más recientes del laboratorio de investigación en asma señalan que la DHEA y la TES disminuyen el tono del músculo liso de las

vías aéreas y la ${}_b[Ca^{2+}]_i$ mediante el bloqueo del L-VDCC y el SOCC. Asimismo, la TES induce la síntesis de prostaglandina E_2 lo que podría conllevar a un aumento de la síntesis de AMPc y la posterior broncorelajación. [Perusquía *et al.*, 2015; Flores-Soto *et al.*, 2017].

En adición al bloqueo de canales membranales para producir relajación, se ha postulado que los andrógenos potencian la respuesta de relajación inducida por agonistas adrenérgicos [Bordallo *et al.*, 2008]. En este contexto, una de las primeras evidencias acerca de la relación entre los andrógenos y la vía de señalización adrenérgica ocurrió en 1972 en un modelo de corazón aislado de rata. En ese trabajo Salt y colaboradores reportaron que la TES, a concentraciones micromolares fungió como un inhibidor potente de la captación extraneuronal de catecolaminas [Salt, 1972]. Posteriormente, otros investigadores observaron que la TES (40 μ M) potenció 7.6 veces las relajaciones del bronquio de cerdo inducidas por isoprenalina (Iso), un agonista de los receptores adrenérgicos β_1 y β_2 . La potenciación de la relajación inducida por Iso puede explicarse en términos de la inhibición de la catecol-o-aminotransferasa (COMT, la enzima principal en el metabolismo de las catecolaminas) o de la captación extraneuronal [Foster *et al.*, 1983]. Asimismo, Bordallo y colaboradores observaron que, 100 μ M de 5α -DTH (concentración suprafisiológica), favoreció la relajación inducida por salbutamol, un agonista del receptor adrenérgico β_2 ($AR\beta_2$), en el músculo liso traqueal de bovino. Los autores corroboraron que esta respuesta no está relacionada con la interacción del andrógeno con los $AR\beta_2$ pero podría estar vinculado con la inhibición de la recaptación de las catecolaminas o la inhibición de COMT propuesta en trabajos anteriores [Bordallo *et al.*, 2008]. Cabe mencionar que todos los trabajos descritos fueron realizados con concentraciones de TES suprafisiológicas, por lo que es indispensable explorar los efectos androgénicos sobre la relajación del MLVA utilizando concentraciones fisiológicas.

Recientemente, un trabajo hecho en el laboratorio de investigación en asma demostró que la TES, a concentraciones fisiológicas (40 nM), disminuyó el incremento de $[Ca^{2+}]_i$ inducido por Cch e His al interferir con la funcionalidad del

RIP₃ en el músculo liso de las vías aéreas, promoviendo que este tejido sea menos reactivo (hiporreactividad) a los agonistas broncoconstrictores que actúan mediante la cascada de señalización de la fosfolipasa C_β (PLC_β)-IP₃ [Montaño *et al.*, 2018]. Estos últimos hallazgos son de gran importancia ya que forman parte de la regulación que ejercen los andrógenos sobre el MLVA y podrían estar implicados en la fisiopatología y la incidencia de los síntomas del asma en varones.

1.4.2 Efectos genómicos de los andrógenos en el MLVA

Como se definió anteriormente las acciones genómicas implican la penetración de la TES a través de la membrana celular hacia el citosol donde se encuentra el RA. Este receptor se ha reportado en varios tipos de músculos como el cardíaco, el vascular, y el MLVA [Zarazua *et al.*, 2016].

Las investigaciones acerca de los efectos genómicos de los andrógenos en la vía aérea y en el asma se basan principalmente en los mecanismos de la inflamación. El aumento de citocinas tipo 2 y/o IL-17, que conducen a un aumento de eosinófilos y neutrófilos respectivamente en la zona pulmonar, son marcadores característicos de la inflamación que ocurre en la enfermedad asmática. Algunos estudios han demostrado que la TES, que señala a través del RA, inhibió la inflamación de las vías respiratorias debido a la regulación negativa de la producción de citocinas proinflamatorias tipo 2. Asimismo, este andrógeno es capaz de interferir con la diferenciación de las ILC2 y las células CD4+, responsables de la inflamación alérgica [Laffont *et al.*, 2017; Fuseini *et al.*, 2018; Yung *et al.*, 2018]. Adicionalmente, se ha demostrado que la TES redujo la expresión de la IL-17A vía el RA, misma que es responsable de la inflamación neutrofílica [Fuseini *et al.*, 2018]. Estas evidencias, proporcionan una explicación potencial para la mayor prevalencia del asma en mujeres en comparación con los hombres en la etapa adulta.

En resumen, la mayoría de los distintos estudios acerca de los andrógenos y su relación con la funcionalidad de la vía aérea se han elaborado utilizando concentraciones suprafisiológicas (en el orden micromolar) y se han centrado principalmente en su acción no genómica. Por otro lado, los efectos genómicos sólo se han estudiado a nivel de la inflamación. El objetivo del presente trabajo de tesis es explorar la posible acción genómica inducida por la TES en concentraciones nanomolares (una condición fisiológica) sobre los mecanismos de relajación y la vía de señalización de los receptores β_2 adrenérgicos y su funcionalidad en MLVA.

1.5 Receptores adrenérgicos β_2

El tono de vía aérea está regulado parcialmente por catecolaminas circulantes que son compuestos que contienen un grupo catecol (un anillo de benceno con dos grupos hidroxilo adyacentes) y una cadena lateral amino (figura 4). Estos mediadores se sintetizan en la medula suprarrenal y desde el punto de vista farmacológico las más importantes son noradrenalina (norepinefrina), adrenalina (epinefrina) y dopamina [Barnes *et al.*, 1986]. La adrenalina y la noradrenalina ejercen su función al activar receptores especializados que se clasifican en receptores adrenérgicos α_1 ($AR\alpha_1$, subtipos $AR\alpha_{1A}$, $AR\alpha_{1B}$ y $AR\alpha_{1D}$), receptores adrenérgicos α_2 ($AR\alpha_2$, subtipos $AR\alpha_{2A}$, $AR\alpha_{2B}$ y $AR\alpha_{2C}$) y receptores adrenérgicos β ($AR\beta$, subtipos $AR\beta_1$, $AR\beta_2$ y $AR\beta_3$) [Philipp *et al.*, 2004]. En el MLVA predominan principalmente los $AR\beta_2$. Estos últimos son los receptores responsables de la relajación inducida por agonistas adrenérgicos en el MLVA [Johnson, 2006].

En la clínica, existen diversas opciones farmacológicas para el tratamiento del asma, entre ellas los agonistas adrenérgicos β_2 como el salbutamol [GINA, 2020].

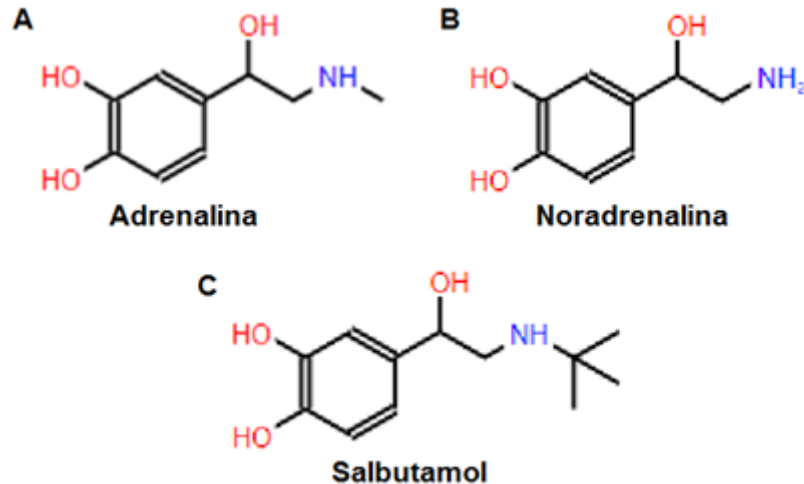


Figura 4. Estructura química de catecolaminas. A) Estructura química de adrenalina. B) Estructura química de noradrenalina. C) Estructura química de salbutamol. El salbutamol es un agonista adrenérgico β_2 , contiene un grupo catecol y una cadena lateral amino. Es considerado como opción para el manejo farmacológico del asma.

El $AR\beta_2$ está compuesto por siete hélices transmembranales; y está acoplado a una proteína Gs. Una vez que el $AR\beta_2$ es estimulado, la subunidad α de la proteína Gs activa a la enzima adenilato ciclasa (AC), que posteriormente cataliza la formación de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) a partir del adenosín trifosfato (ATP) citosólico. El AMPc tiene como una de sus funciones principales estimular a la proteína cinasa A (PKA). Esta enzima tiene distintos blancos por medio de los cuales induce la relajación del MLVA. PKA fosforila a los canales de K^+ en la membrana plasmática, aumentando su posibilidad de apertura. El K^+ saliente promueve la hiperpolarización de la membrana celular impidiendo que aumenten las $[Ca^{2+}]_i$ vía canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje, favoreciendo la relajación del MLVA. Asimismo, PKA fosforila la $PLC\beta$ inhibiendo la formación de fosfoinosítidos como el IP_3 y en consecuencia la salida de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico. Esta cinasa también puede fosforilar al receptor de IP_3 reduciendo su afinidad por éste, limitando así la movilización de Ca^{2+} . Por último, PKA fosforila a la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) disminuyendo su afinidad por el complejo Ca^{2+} -calmodulina, reduciendo por consiguiente la fosforilación de la cadena ligera de la miosina (MLC) [Amrani *et al.*, 2017; Canguven, 2011].

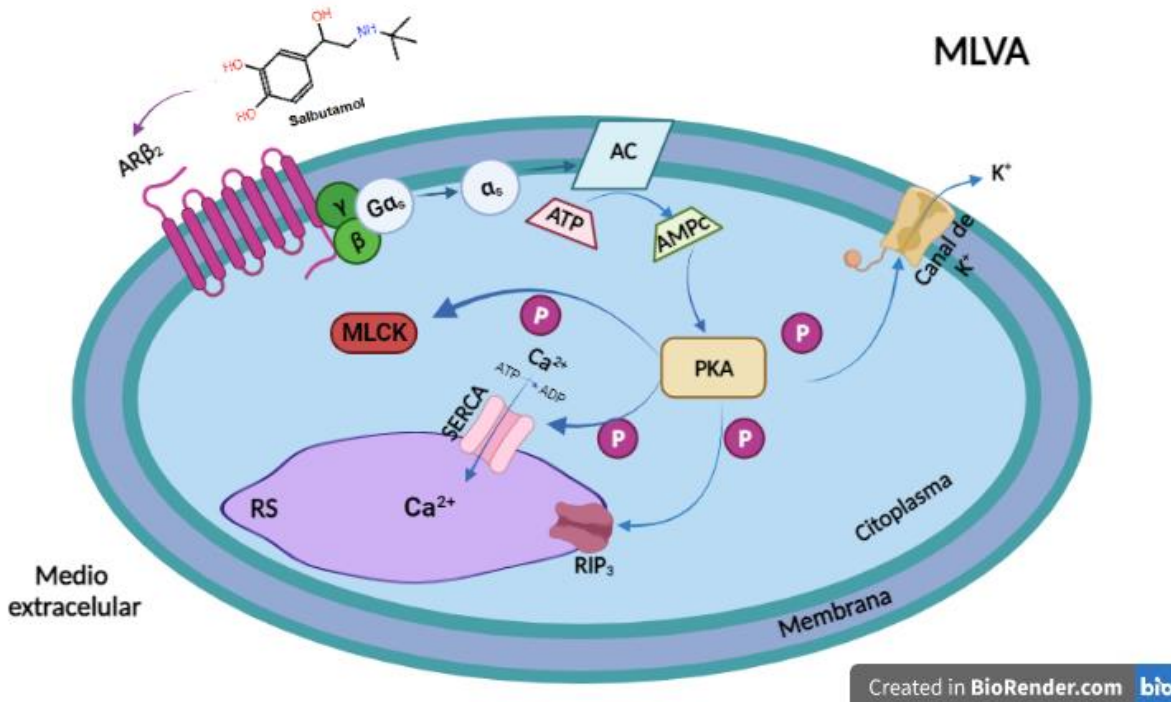


Figura 5. Vía de señalización del receptor adrenérgico β_2 . En células del MLVA, los agonistas β_2 estimulan al $AR\beta_2$, este receptor está unido a una proteína Gs. Una vez que el $AR\beta_2$ es estimulado, la subunidad α de la proteína Gs activa a la enzima adenilato ciclasa (AC), la cual cataliza la formación de monofosfato de adenosina cíclico (AMPc) a partir del ATP citosólico. El AMPc tiene como una de sus funciones principales activar a la proteína cinasa A (PKA). PKA fosforila diferentes blancos que facilitan la relajación del MLVA. ADP= Adenosín difosfato; $AR\beta_2$ = Receptor adrenérgico β_2 ; ATP= Adenosín trifosfato; MLCK= Cinasa de la cadena ligera de miosina; MLVA= Músculo liso vía aérea; P= Fosforo; RIP_3 = Receptor a inositol trifosfato; RS= Retículo sarcoplásmico; SERCA= ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico. Para mayor detalle referirse a la sección 1.5.

Posterior, a la estimulación de los receptores β_2 adrenérgicos en el MLVA, las catecolaminas endógenas sufren recaptación y degradación. Existen dos mecanismos de captación de catecolaminas la captación 1 y captación 2, que corresponden con la captación neuronal y extraneuronal, respectivamente. La captación 1 permite acortar la acción del transmisor y reciclarlo, mientras que la captación 2 se ocupa principalmente de limitar su difusión. La degradación se lleva a cabo principalmente por el catabolismo generado por dos enzimas, monoaminooxidasa (MAO) y COMT (con mayor importancia en la vía aérea). Las catecolaminas circulantes generalmente se eliminan mediante una combinación de captación 1, captación 2 y COMT [Rang y Dale, 2008].

1.6 Histamina

Como se mencionó anteriormente, la His es uno de los mediadores químicos que fisiológicamente inducen broncoconstricción y que está implicado en la patología del asma. Este es el agonista que utilizamos en este proyecto para llevar a cabo la contracción del MLVA y así poder observar posteriormente el efecto broncodilatador con la adición de salbutamol. La histamina (2-(4-imidazolyl)etilamina se forma en el organismo por la descarboxilación de la L-histidina mediante la enzima L-histidina descarboxilasa.

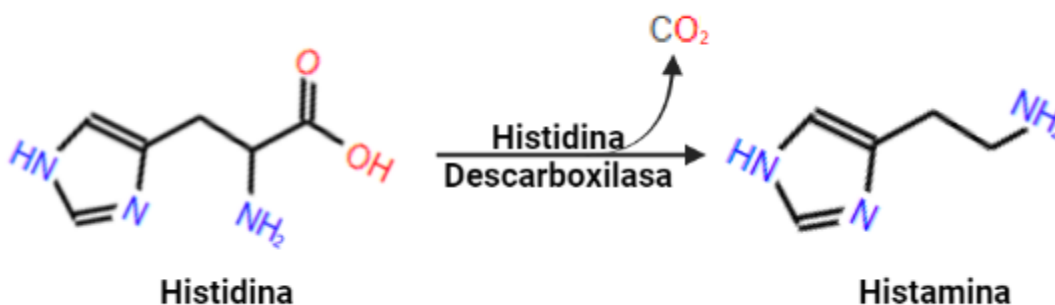
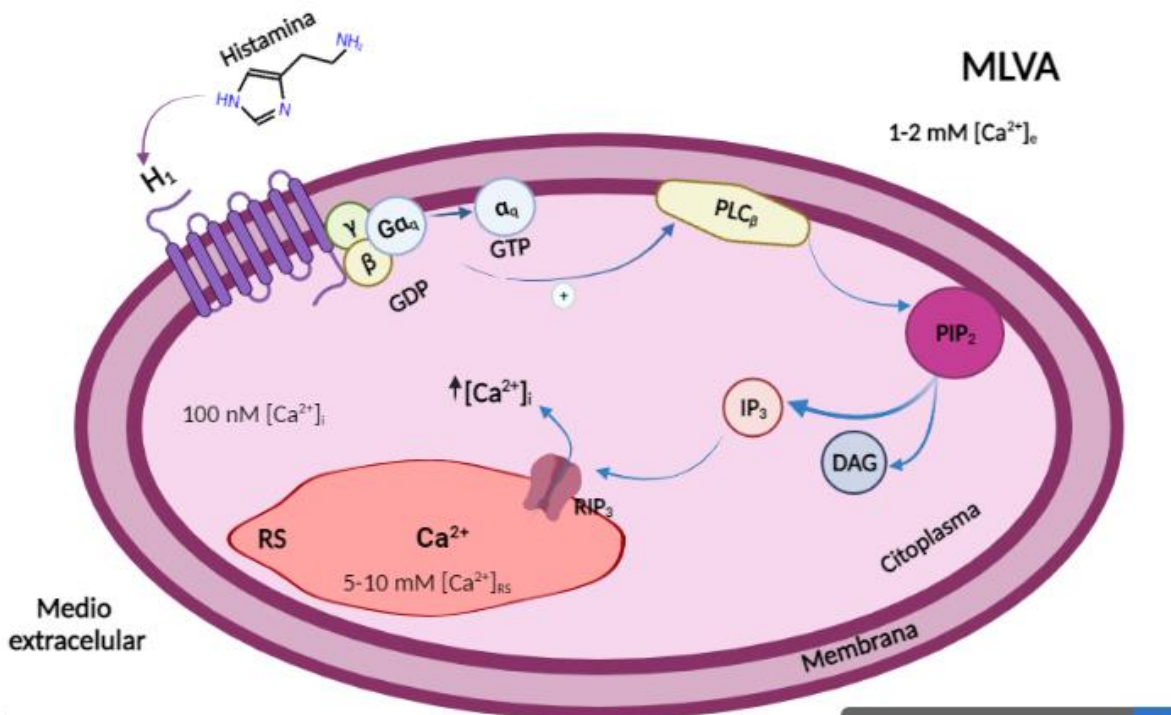


Figura 6. Biosíntesis de histamina. La histamina es un mediador químico que induce la broncoconstricción. Se muestra la descarboxilación de la histidina formando histamina.

La His se sintetiza y se libera en células cebadas, basófilos y en otras células de la mucosa de las vías aéreas. Existen 3 subtipos de receptores a His, H₁, H₂ Y H₃. En el MLVA, la His activa receptores de tipo H₁. Estos receptores están acoplados a una proteína Gq, lo que conduce a la activación de la PLC_β. La PLC_β hidroliza al fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) para producir diacilglicerol (DAG) e IP₃. Este último se une a al RIP₃, en la membrana del RS, ocasionando la salida de Ca²⁺ de este organelo. El incremento de la [Ca²⁺]_i promueve la formación del complejo Ca²⁺-calmodulina que activa a la subunidad catalítica de la cinasa de la cadena ligera de miosina (MLCK); esta cinasa fosforila a la cadena ligera de miosina (en la serina 19). La miosina fosforilada cataliza en presencia de actina, la hidrólisis de ATP hacia ADP y la liberación de energía subsecuente hace posible el desplazamiento de los filamentos de actina a lo largo de la miosina, iniciando el proceso de contracción muscular [Rang y Dale, 2008].



Created in BioRender.com 

Figura 7. Vía de señalización del receptor H₁. En células del MLVA, la His activa receptores de tipo H₁, acoplados a una proteína Gq, lo que conduce a la activación de la PLC_β. La PLC_β hidroliza al fosfatidil inositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) para producir diacilglicerol (DAG) e IP₃. Este último se une a al RIP₃, en la membrana del RS, ocasionando la salida de Ca²⁺ de este organelo. El incremento de la [Ca²⁺]_i conduce a una serie de eventos de fosforilación que producen la contracción del MLVA. [Ca²⁺]_e= Concentración de Ca²⁺ extracelular; [Ca²⁺]_i= Concentración de Ca²⁺ intracelular; [Ca²⁺]_{RS}= Concentración de Ca²⁺ en el retículo sarcoplásmico; GDP= Guanosín difosfato; GTP= Guanosín trifosfato; IP₃= Inositol trifosfato; MLVA= Músculo liso vía aérea; PLC_β = Fosfolipasa C_β; RIP₃=Receptor de inositol trifosfato; RS= Retículo sarcoplásmico; Para mayor detalle ver sección 1.6.

Basados en los antecedentes experimentales y en los descubrimientos de Bordallo y colaboradores (sección 1.4.1), se propuso a investigar si a concentraciones fisiológicas (ya que Bordallo utilizó concentraciones suprafisiológicas), la testosterona incubada por 48 horas (h) ejercería un efecto de tipo genómico sobre la relajación inducida por salbutamol, y si en este efecto está involucrado algún tipo de interacción de la TES con los ARβ₂.

2. Pregunta de investigación

¿La testosterona aumenta la relajación de músculo liso traqueal de cobayo inducida por salbutamol a través de un efecto genómico?

3. Objetivo general

Estudiar si la exposición a TES durante 48 h favorece los mecanismos de relajación del MLVA inducidos por salbutamol en experimentos de órganos aislados, y si este es a través de un efecto genómico.

3.1 Objetivos particulares

- Estudiar si la TES 40 nM en exposición crónica potencia la relajación inducida por salbutamol en el MLVA de cobayo.
- Evaluar si la exposición a TES en periodos cortos de tiempo favorece los mecanismos de relajación del MLVA inducidos por salbutamol en experimentos de órganos aislados.
- Explorar si la posible potenciación en la relajación (observada en el primer punto) inducida por salbutamol es anulada con el uso de flutamida, un antagonista del RA.
- Evaluar si existe un componente no genómico en la potenciación de la relajación del MLVA con el uso de TES-BSA (40nM, 48 h) en experimentos de órganos aislados.
- Explorar si existe una regulación positiva de los receptores adrenérgicos β_2 en el MLVA incubado con TES (40 nM, 48 h), por medio del método de Schild como herramienta farmacológica, utilizando un antagonista selectivo de los receptores β_2 adrenérgicos (ICI 118,551).

4. Metodología

Sistema de registro de órganos aislados, medición de la respuesta de contracción y relajación del MLVA de cobayo.

Se utilizaron cobayos machos con un peso de 300-400 gramos de la estirpe Hartley, los cuales fueron criados en condiciones convencionales del bioterio de la Facultad de Medicina (aire acondicionado filtrado, 21 ± 1 °C, humedad entre 50-70 % y camas esterilizadas) y fueron alimentados con pellets Harlan®. Número de aprobación del proyecto ante el comité de ética de la Facultad de Medicina: FM/DI/021/20178

Se sacrificaron con una sobredosis de pentobarbital sódico por vía intraperitoneal (200 mg/kg) y posteriormente se les extrajo la tráquea. Una vez obtenida, la tráquea se colocó en una placa de disección que contenía solución de Krebs-Ringer con la siguiente composición [mM]: 118 NaCl, 25 NaHCO₃, 4.6 KCl, 1.2 KH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 11 glucosa, y 2 CaCl₂; burbujeada con una mezcla de carbógeno (5 % CO₂ y 95 % oxígeno) y pH 7.4. Posteriormente se eliminó el exceso de tejido conjuntivo adyacente, la tráquea se seccionó en ocho segmentos (anillos) de aproximadamente 3 mm. Cada anillo se colocó en un tubo Eppendorf de 2 ml que contenían 1 ml de solución Krebs-Ringer que fue burbujeada previamente durante 30 min con la misma mezcla de carbógeno descrita anteriormente y con un pH de 7.4. Los segmentos traqueales fueron almacenados por 48 h a 9 °C en presencia de TES (20 nM, 40 nM), o de TES-BSA (40 nM, un complejo macromolecular impermeable). En otra serie de experimentos se agregó flutamida (10 µM, antagonista del RA) 30 min antes de adicionar la testosterona. Como control para cada experimento se utilizaron tejidos que sólo fueron almacenados en solución de Krebs-Ringer durante 48 h a 9 °C.

Una vez transcurridas, las 48 h, cada segmento traqueal se colocó en una cámara de órganos aislados (de 10 ml de capacidad) que contenía 5 ml de la solución Krebs-Ringer. Las preparaciones se mantuvieron a 37 °C y se burbujearon

continuamente con 5 % CO₂ y 95 % O₂ a un pH de 7.4. Cada segmento traqueal se sujetó a un transductor de fuerza isométrica modelo FT03 (Grass Instruments, West Warwick, RI, USA) conectado a un sistema amplificador de señales Cyberamp 380 (Axon Instruments, Foster City, C.A, EUA) y a una interfaz análogo-digital Digitada 1440 A (Axon Instruments). Los registros se almacenaron en una computadora y se analizaron con el software AxoScope versión 10.2 (Axon Instruments, Foster City. CA, EUA).

Los segmentos traqueales se calibraron a una tensión inicial de 1 g durante 45 min. Con el propósito de normalizar las respuestas de contracción y lograr la aclimatación de los tejidos, éstos se estimularon tres veces con KCl 60 mM durante 30 min o hasta alcanzar la respuesta máxima de contracción.

A continuación, los tejidos traqueales fueron estimulados con His (10 µM) y cuando se alcanzó la respuesta máxima de contracción, se realizó una curva concentración-respuesta a salbutamol (1, 3.2, 10, 32, 100, 320 y 1000 nM). Además, algunos tejidos fueron tratados por 15 min antes de agregar salbutamol, con ICI 118,551, un antagonista selectivo del receptor adrenérgico β₂ (1, 3.2, 10, 32 y 100 nM). La contracción obtenida con el estímulo de His se consideró como el 100 % de la respuesta.

En otro grupo de experimentos, se obtuvieron tejidos traqueales que fueron colocados en las cámaras de órganos aislados el mismo día de la disección. Posterior a las tres estimuciones con KCl, se estimularon con TES (20 o 40 nM) durante 15 min y después fueron lavados con solución de Krebs-Ringer, para después ser sometidos al protocolo de contracción con His y relajación con salbutamol. De igual manera, otros tejidos traqueales permanecieron en la presencia de TES (20 o 40 nM) durante todo el procedimiento (aproximadamente 60 min).

4.1 Fármacos

Testosterona (17 β -hidroxi-4-androstene-3-ona), testosterona-BSA, histamina, salbutamol, ICI 118,551, flutamida. Todos estos fármacos fueron comprados de Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, USA). La testosterona y flutamida se diluyeron en etanol, el porcentaje más alto utilizado fue de 0.1 % v/v del vehículo. TES-BSA fue diluida en buffer de fosfatos.

4.2 Análisis estadístico

Las curvas concentración-respuesta de salbutamol fueron evaluadas por la concentración inhibidora 50 (CI₅₀) y por la respuesta máxima de relajación. Para evaluar la CI₅₀ de cada curva concentración-respuesta se calculó por medio de una regresión lineal, el logaritmo de la concentración vs el logaritmo del porcentaje de respuesta usando el software ED50 plus v1.0. Estos datos fueron analizados mediante un análisis de varianza unidireccional (ANOVA) seguido de una prueba de Dunnett. Los análisis de K_B (constante de disociación) y pA₂ para el antagonista ICI 118,551 se realizaron en una hoja de cálculo de Excel mediante la ecuación de Schild [Jankovic et al.1999]. En todos los experimentos, cada valor de “n” corresponde a un animal diferente. Los datos se expresan como la media \pm el error estándar de la media (ESM). La significancia estadística se estableció en p <0.05. Se utilizó el programa Origin Pro para la elaboración de las gráficas.

4.3 Método de Schild.

Para evaluar la posible regulación positiva del AR β_2 por la incubación de TES (48 h) se utilizó la herramienta farmacológica pA₂. Este parámetro se obtuvo a través del método de Schild.

El método de Schild se basa en el antagonismo competitivo, lo que significa que el agonista (salbutamol) y el antagonista (ICI 118,551) compiten por los receptores libres de acuerdo con la ley de acción de masas, y que en equilibrio el número de

combinaciones agonista-receptor es igual al número de disociaciones agonista-receptor y de manera similar para el antagonista [Schild, 1949]. Los dos fármacos compiten entre sí, ya que el receptor sólo puede captar una molécula cada vez. A una concentración determinada de agonista, el grado de ocupación disminuirá en presencia del antagonista. Sin embargo, como ambos compiten entre sí, se puede restablecer la ocupación aumentando la concentración del agonista. Un análisis teórico muy sencillo (figura 9) permite predecir que, en presencia de una concentración fija del antagonista, la curva de concentración-efecto logarítmica del agonista se desplazará a la derecha, sin que varíe la pendiente ni el efecto máximo; este es el signo distintivo del antagonismo competitivo. El desplazamiento se expresa en forma de proporción de la concentración, para restablecer un grado de respuesta determinado se debe aumentar una proporción definida del agonista en presencia del antagonista [Rang y Dale, 2008].

Para ello nosotros realizamos curvas concentración-respuesta del agonista (salbutamol) solo e incubado previamente con el antagonista (ICI 118,551) a diferentes concentraciones ((1, 3.2, 10, 32 y 100 nM). Posteriormente, se calculó la CI_{50} (para mayor detalle ir a sección 4.2). La proporción de dosis (r) se obtuvo con la siguiente ecuación:

$$r = (CI_{50a}/CI_{50c})$$

Donde CI_{50a} es la CI_{50} del agonista en presencia del antagonista y CI_{50c} es la CI_{50} del agonista en ausencia del antagonista.

A continuación, se realizó una curva $\text{Log}(r - 1)$ vs la concentración de ICI 118,551 (véase en figura 9), y con ayuda del gráfico se calculó la constante de disociación (K_B), el punto en la gráfica donde la recta intersecta en el eje de las abscisas. [Jankoviæ *et al.*, 1999].

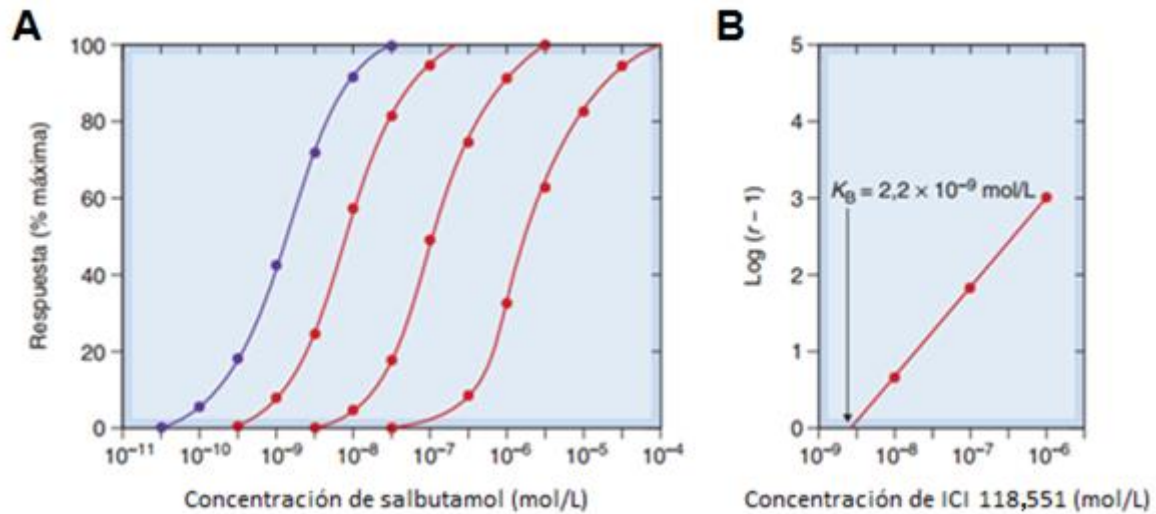


Figura 8. Método de Schild, antagonismo competitivo de salbutamol e ICI 118,551. A) Curvas de concentración-respuesta a diferentes concentraciones de ICI 118,551. Obsérvese el desplazamiento progresivo a la derecha sin que se modifique la pendiente o la respuesta máxima. B) Gráfica de Schild. La constante de disociación (K_B) de un fármaco, en este caso un agonista adrenérgico está determinada por el punto de intersección con el eje de abscisas. Modificada de Rang y Dale 2008.

El valor de pA_2 , que se define el logaritmo negativo de la concentración molar de un antagonista lo que produciría un cambio de 2 veces en la curva de respuesta a la concentración para un agonista. Cuando obtenemos una K_B menor se dice que se tiene una mayor actividad de los receptores, es decir, se necesitará menor cantidad del agonista para llegar a un mismo efecto.

5. Resultados

5.1. La exposición crónica a la testosterona aumenta la relajación inducida por salbutamol en el músculo liso de la vía aérea.

La administración de salbutamol al tejido traqueal en condiciones controles indujo una respuesta de relajación que fue dependiente de la concentración utilizada (1, 3.2, 10, 32, 100, 320 y 1000 nM) como se observa en la figura 9A. La incubación por 48 h con 20 y 40 nM de TES, produjo un desplazamiento a la izquierda de la curva concentración-respuesta a salbutamol, mostrando diferencias

significativas en la CI_{50} (potencia) y en la respuesta de relajación máxima (eficacia) cuando se comparó con respecto al control (figura 9B). Estos resultados sugieren que la TES pudiera ejercer un efecto genómico sobre alguno o algunos de los mecanismos de relajación inducidos por el salbutamol, debido al tiempo de exposición del tejido traqueal al andrógeno.

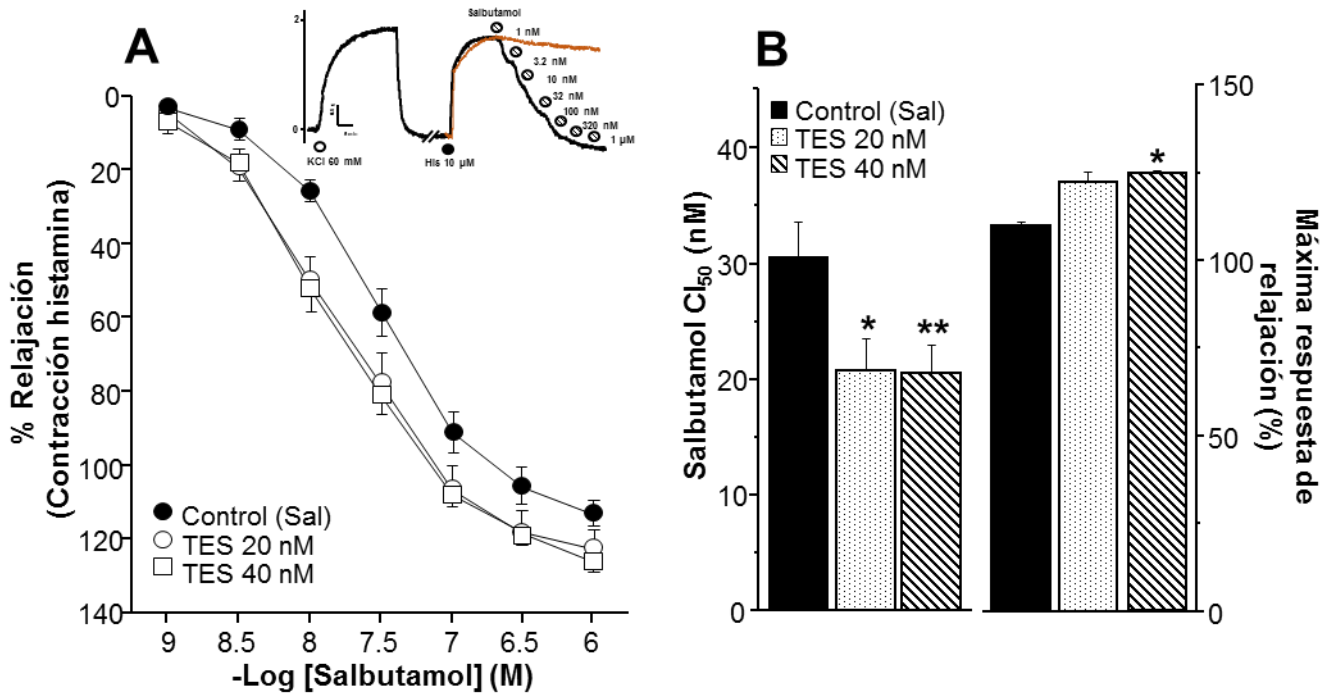


Figura 9. Efecto de la testosterona (TES, 20 y 40 nM, 48 h) sobre la relajación inducida por salbutamol (Sal) en anillos traqueales de cobayo. A) La TES 20 y 40 nM genera un desplazamiento a la izquierda y potencia la respuesta de relajación en una curva concentración respuesta a salbutamol. B) Análisis estadístico de la concentración inhibidora 50 (CI_{50}) y de la respuesta máxima de relajación. Las barras representan la media más el error estándar de la media (ESM). Se utilizó un análisis de varianza seguido de una prueba de Dunnett. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, $n=5$. Sal= salbutamol.

Por otro lado, exposición aguda a 20 o 40 nM de TES durante 15 o 60 min no modificó la curva de concentración-respuesta a salbutamol (figura 10A, $n = 7$): En este sentido, ni la CI_{50} ni la respuesta máxima fueron diferentes de los parámetros encontrados en el grupo control (figura 10B). Estos hallazgos apoyan la idea de que el fenómeno de potenciación en la relajación inducida por salbutamol es mediado por una acción genómica.

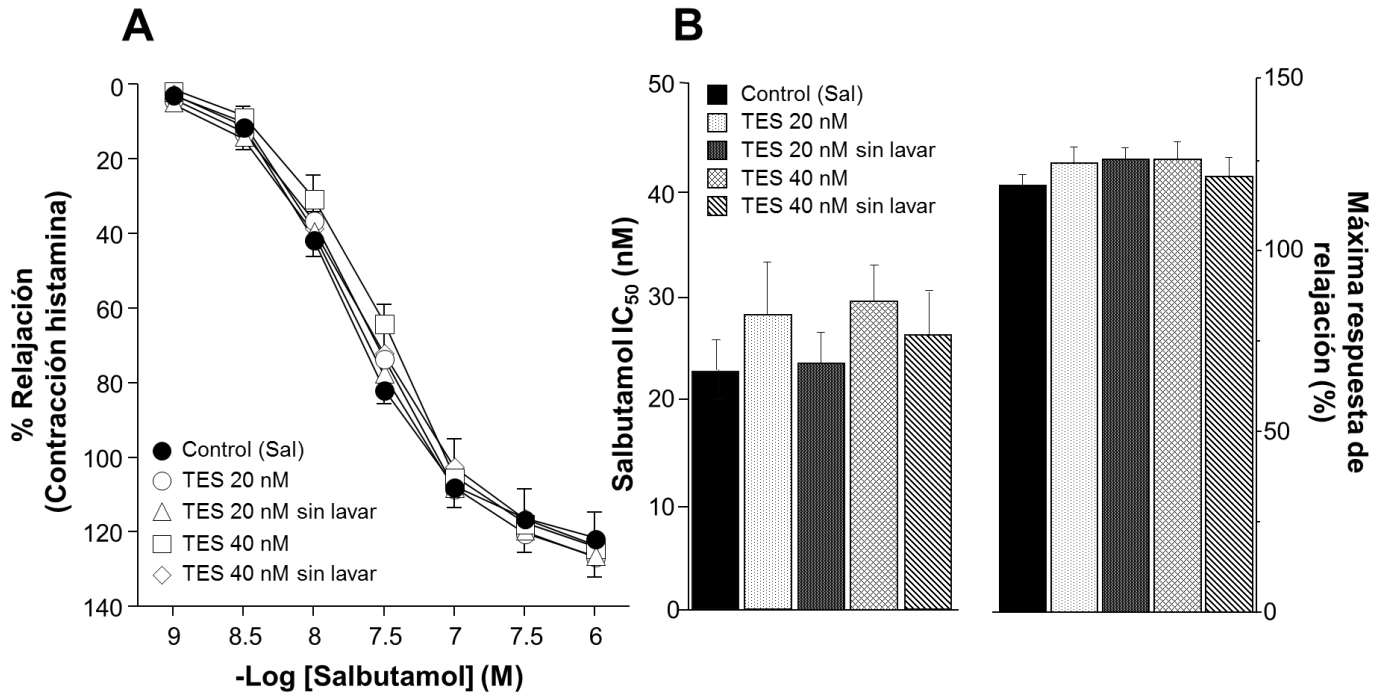


Figura 10. Exposición aguda de testosterona (TES 15 y 60 min) no ejerce un efecto de potenciación sobre la relajación inducida por salbutamol en anillos traqueales de cobayo. A) La TES 20 y 40 nM adicionada de manera aguda no modifica la curva concentración respuesta a salbutamol. B) Análisis estadístico de la concentración inhibidora 50 (CI₅₀) y de la respuesta máxima de relajación. Las barras representan la media más el error estándar de la media (ESM). Se utilizó un análisis de varianza seguido de una prueba de Dunnett, n=7. Sal= salbutamol.

5.2 El efecto de potenciación es mediado por una vía genómica.

De manera interesante, cuando los tejidos fueron incubados por 48 h con flutamida 10 μ M (un antagonista del RA) y con TES 40 nM no se produjo modificación en la curva concentración-respuesta a salbutamol, es decir no se obtuvieron diferencias significativas en la CI₅₀ ni en la respuesta máxima de relajación (figura 11B). Debido que uno de los criterios para definir un efecto genómico es la activación del RA, estos resultados confirman que la TES potencia la relajación inducida por salbutamol en el MLVA de cobayo por la acción de un efecto genómico.

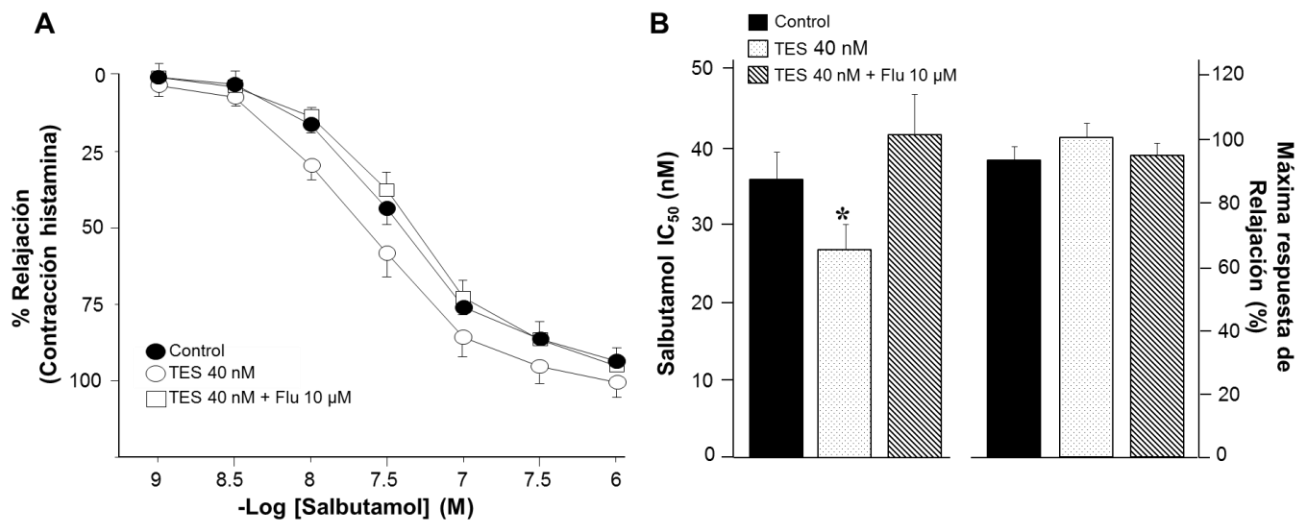


Figura 11. Efecto de la flutamida (Flu 10 μ M) sobre la potenciación de la relajación inducida por salbutamol en anillos traqueales de cobayo. A) La TES 40 nM genera un desplazamiento a la izquierda y potencia la respuesta de relajación a una curva concentración respuesta a salbutamol y la Flu (10 μ M) anula la potenciación. B) Análisis estadístico de la concentración inhibidora 50 (IC_{50}) y la respuesta máxima de relajación. Las barras representan la media más el error estándar de la media (ESM). Se utilizó un análisis de varianza seguido de una prueba de Dunnett. * $p < 0.05$, $n=5$.

Con el propósito de complementar los resultados anteriores se realizaron experimentos con TES-BSA, un complejo molecular que no es capaz de permear la membrana plásmática. La incubación de TES-BSA 40 nM por 48 h no produjo una modificación en la curva concentración respuesta al salbutamol respecto al control (figura 12A). En este sentido el análisis de la IC_{50} y de la respuesta máxima no arrojó diferencias significativas cuando se compararon el grupo control y el grupo incubado 48 h con TES-BSA 40 nM. Estos resultados confirman que el efecto de potenciación de TES sobre los mecanismos de relajación del salbutamol en MLVA involucra la unión de este andrógeno con su receptor citoplasmático para la posterior regulación de la transcripción génica, es decir se trata de un efecto puramente genómico.

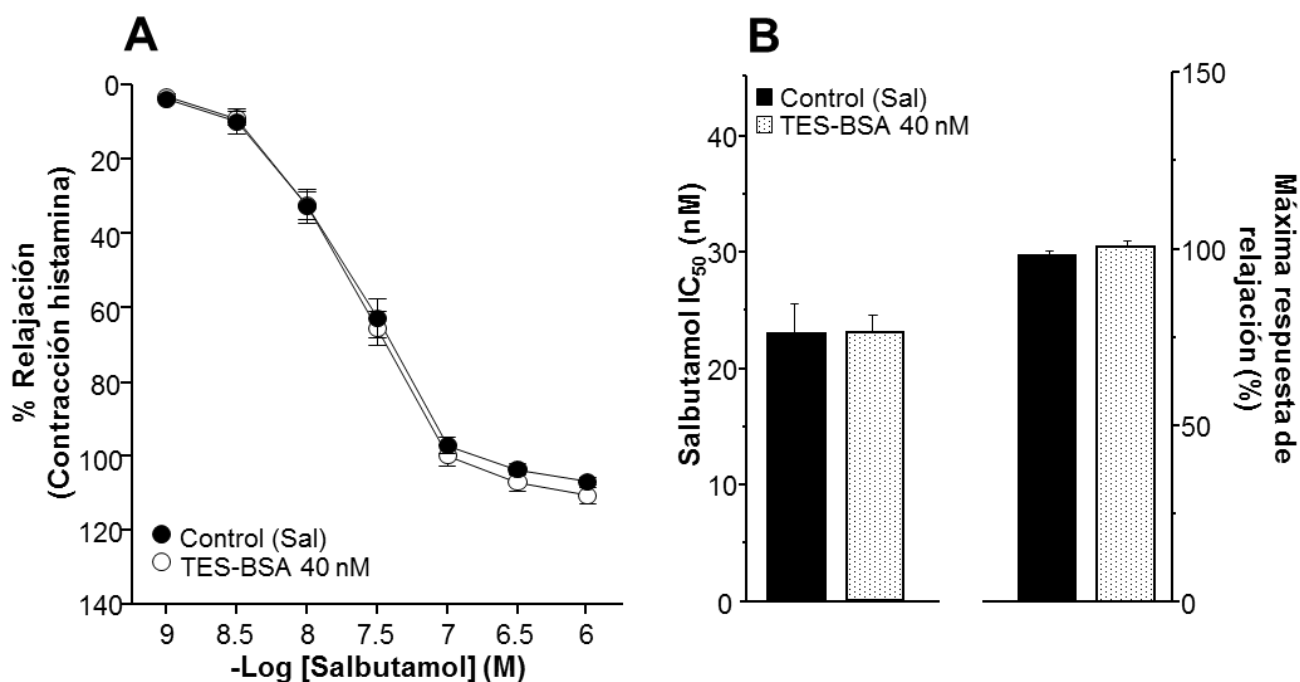


Figura 12. Efecto de la testosterona conjugada con albúmina sérica bovina (TES-BSA 40 nM, 48 h) sobre la relajación inducida por salbutamol en anillos traqueales de cobayo. A) La TES-BSA 40 nM durante 48 h no modifica la curva concentración respuesta a salbutamol. B) Análisis estadístico de la concentración inhibidora 50 (IC_{50}) y de la respuesta máxima de relajación. Las barras representan la media más el error estándar de la media (ESM). Para el análisis estadístico se realizó una prueba t de Student, $n=4$. Sal= salbutamol.

5.3 La testosterona induce una regulación positiva del receptor adrenérgico β_2 favoreciendo la respuesta del salbutamol en el músculo liso de la vía aérea de cobayo.

Con el propósito de explorar una posible regulación del receptor adrenérgico β_2 (el primer efector en los mecanismos de relajación inducidos por salbutamol) mediada por la TES y el consecuente incremento en la respuesta de relajación al salbutamol, los anillos traqueales de cobayo fueron tratados con diferentes concentraciones de ICI 118,551, un antagonista específico del receptor adrenérgico β_2 (1, 3.2, 10, 32, y 100 nM).

El uso de este antagonista (de manera concentración dependiente) en anillos traqueales controles (no tratados con TES) desplazó a la derecha la curva

concentración-respuesta a salbutamol (figura 13A). De la misma forma que en los experimentos anteriores, el tratamiento con TES desplazó hacia la izquierda la curva acumulativa de salbutamol ($CI_{50} = 25.6 \pm 5.4$ nM, $n = 7$, figura 13B) comparada con el grupo sin TES ($CI_{50} = 39.9 \pm 3.1$ nM, $p = 0.05$, $n = 6$, figura 13A). Sin embargo, ICI 118,551 también desplazó las curvas de los tejidos tratados con TES a la derecha en una manera dependiente a la concentración. Esto quiere decir que en ambos casos (tejidos controles y tejidos tratados con TES) se necesitó una mayor concentración de salbutamol para obtener la misma respuesta de relajación que el control cuando se añadió ICI 118,551 a la preparación de anillos traqueales. En este sentido, se utilizó el valor de pA_2 para comparar el efecto de ICI 118,551 en el grupo control contra el grupo tratado con TES. El valor de pA_2 obtenido con la ecuación de Schild, se observó disminuido con la incubación de TES durante 48 h (figura 13C); es decir, la concentración requerida de ICI 118,551 para ocupar el 50 % de los receptores adrenérgicos β_2 disponibles en la membrana del músculo liso fue menor. El parámetro pA_2 evalúa indirectamente el valor de la afinidad del antagonista por los receptores y, en este estudio, provee información sobre el papel del receptor adrenérgico β_2 en el aumento de la respuesta del salbutamol. Con la finalidad de presentar una mejor comparación, se transformó el valor de pA_2 mediante su logaritmo negativo a la constante de disociación (K_B). El valor de K_B para los tejidos tratados con TES fue menor (3.4 ± 0.7 nM) que para el grupo control (10.4 ± 4.1 nM), corroborando un aumento en la funcionalidad del receptor adrenérgico β_2 en músculo liso de las vías aéreas.

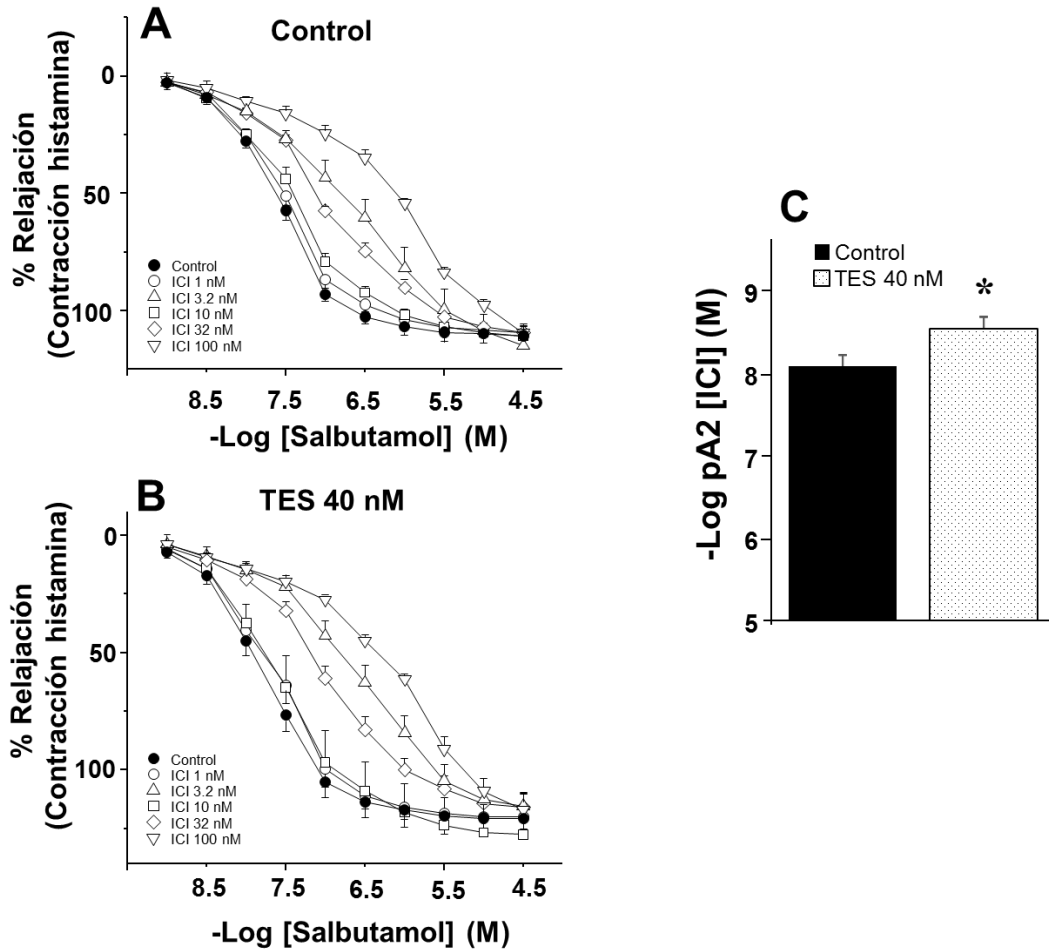


Figura 13. Efecto de la testosterona (TES 40 nM) sobre el valor pA2 de ICI 118,551 en anillos traqueales de cobayo. A) El ICI 118,551 (ICI) un antagonista selectivo de receptor adrenérgico β_2 , genera un desplazamiento a la derecha en la respuesta de relajación a una curva concentración respuesta a salbutamol, este desplazamiento depende de la concentración de ICI (1, 3.2, 10, 32 y 100 nM). B) La incubación de TES genera un desplazamiento a la izquierda en la curva concentración respuesta a salbutamol en comparación con la curva sin TES. ICI también desplaza la curva concentración-respuesta a salbutamol hacia la derecha de manera dependiente de la concentración cuando los tejidos son tratados con TES. Con los valores IC_{50} de cada curva en A y B, se calculó el valor de pA2. C) los valores de pA2 se obtuvieron con la ecuación de Schild; Este valor es una medida indirecta de la afinidad del antagonista por sus receptores y, en este estudio, proporciona información sobre el papel del receptor adrenérgico β_2 en la respuesta aumentada de salbutamol. La gráfica de barras ilustra que el valor de pA2 fue significativamente menor ($p < 0.05$) para los tejidos tratados con TES en comparación con el grupo control sin la presencia del andrógeno. Las barras representan la media más el error estándar de la media (ESM). Se utilizó un análisis de varianza seguido de prueba t de Student $*p < 0.05$, $n=7$ experimentos incubados con TES 40 nM por 48 h, $n=6$ experimentos control.

6. Discusión

Se han postulado distintos mecanismos por medio de los cuales los andrógenos pueden ejercer un papel protector contra los síntomas del asma en varones. Inicialmente, y durante mucho tiempo ha permanecido la idea que

sugiere que el incremento en la producción de andrógenos como la TES durante la adolescencia favorece el ensanchamiento de la caja torácica y promueve un mayor calibre de la vía aéreas [Hoffstein, 1986]. Evidencia más reciente ha mostrado que los andrógenos poseen efectos anti-inflamatorios a través de la inhibición de la diferenciación de las ILC2 y de las células CD4+, responsables de la inflamación alérgica, así como por la reducción de la síntesis de la IL-17 responsable de la inflamación neutrofílica [Laffont *et al.*, 2017; Fuseini *et al.*, 2017; Yung *et al.*, 2018]. Adicionalmente, se ha reportado que la TES en concentraciones fisiológicas interfiere con la señalización del receptor de IP₃, contribuyendo a la hiporreactividad de la vía aérea ante la respuesta a agonistas broncoconstrictores que actúan a través de la vía PLC_β-IP₃ [Montaño *et al.*, 2018]. De acuerdo con todos estos hallazgos, los síntomas del asma como la broncoconstricción exagerada, no serían tan severos en varones jóvenes.

Nuestros resultados indican que la exposición crónica a concentraciones nanomolares de TES en MLVA de cobayo induce a una regulación positiva del receptor adrenérgico β₂ y, por lo tanto, un aumento en las respuestas de relajación inducidas por salbutamol (figura 9) que fue anulado por la flutamida (antagonista del receptor a andrógenos) (figura 11). El hecho de que la flutamida anuló la potenciación en la relajación inducida por salbutamol sustenta de manera muy convincente que el fenómeno observado en este trabajo es a través de un efecto genómico. Cabe mencionar que para definir un efecto como genómico, se requieren tiempos largos de exposición a la hormona (h-días) y la activación del RA que conduce a la transcripción y síntesis de proteínas. Por otro lado, es bien conocido que la molécula lípida de TES puede unirse a proteínas de la membrana plasmática, como el L-VDCC [Scragg *et al.*, 2007], que podrían tener injerencia en el fenómeno de relajación observado. Con la finalidad de descartar algún componente no genómico, utilizamos TES-BSA, una herramienta farmacológica que no es capaz de permear la membrana celular. En este sentido, la incubación de los tejidos durante 48 h con TES-BSA no tuvo ningún efecto sobre la relajación inducida por salbutamol (figura 12) y la exposición aguda a TES

tampoco modificó esta respuesta (figura 10). Todos estos hallazgos corroboran que la TES ejerce un efecto genómico sobre alguno o algunos de los mecanismos de relajación inducidos por el salbutamol.

El primer efector de la vía de señalización adrenérgica activada por catecolaminas endógenas o agonistas sintéticos como el salbutamol es el propio receptor adrenérgico, en este caso particular el $AR\beta_2$ [Johnson, 2006]. El efecto de los andrógenos sobre los receptores adrenérgicos β y su señalización en otros tejidos, tales como el músculo cardíaco y el músculo liso vascular, ya ha sido documentado. En tejido cardíaco de rata, la TES mejora el rendimiento del miocardio al regular positivamente la expresión de $AR\beta_2$, y este efecto fue anulado por la flutamida, lo que corrobora una acción genómica del andrógeno [Sun *et al.*, 2011]. Mientras tanto, en el músculo liso aórtico de rata, la TES disminuye la vasorelajación inducida por Iso sin modificación de la expresión del $AR\beta_2$. Sin embargo, en este trabajo, la TES disminuyó la expresión de la adenilil ciclasa (AC). Como se expuso en la introducción, la AC es una enzima efectora que se activa posterior a la estimulación del $AR\beta_2$. En este caso, la disminución de la AC fue la responsable de la vasorelajación adrenérgica β disminuida [Lopez-Canales *et al.*, 2018].

En lo que respecta al músculo liso de la vía aérea, se ha reportado que la exposición del tejido traqueal de bovino a una alta concentración de 5α -dihidrotestosterona (100 μM) aumenta la relajación inducida por salbutamol, sin interferir con la funcionalidad del $AR\beta_2$ [Bordallo *et al.*, 2008]. Este fenómeno observado bien pudiera deberse a una acción no específica relacionada con la alta concentración del andrógeno probado, una concentración difícil de encontrar en la fisiología. En un trabajo similar realizado con la preparación de bronquio de cerdo, la TES (40 μM) aumentó la relajación inducida por Iso en aproximadamente 6.7 veces. Los autores de este trabajo propusieron que esta respuesta estaba mediada por la inhibición de la COMT o la captación extraneuronal de

catecolaminas [Foster *et al.*, 1983]. Aparentemente, esta acción androgénica en MLVA debería estar compuesta por un efecto no genómico.

En este trabajo de tesis, encontramos que la exposición crónica de TES a concentraciones nanomolares favorecen la relajación inducida por salbutamol del MLVA precontraído con His. Este efecto no se debe a una acción rápida (no genómica), dado que las exposiciones breves a TES durante 15 o 60 min no modificaron la respuesta de relajación del salbutamol (figura 10).

Por otro lado, se ha documentado que la TES puede activar diversas proteínas de membrana como el GPRC6A, un miembro de la familia de receptores acoplados a proteínas G huérfanos de clase C [Pi *et al.*, 2015] y ZIP9, un transportador de zinc de la familia ZIP [Berg *et al.*, 2014]. Ambos tipos de receptores pueden activar proteínas G, como Gs, Gi y/o Gq11 en respuesta a la estimulación por la TES. Además, las proteínas cinasas 1 y 2 reguladas por señalización extracelular (ERK 1/2) también son susceptibles a la acción de esta hormona, participando en muchos procesos de fosforilación. La respuesta final a la estimulación androgénica de estos receptores depende en gran medida del tipo celular [Clemmensen *et al.*, 2014; Thomas *et al.*, 2018]. En este sentido, nosotros encontramos que la exposición crónica del MLVA a TES-BSA no alteró la relajación inducida por salbutamol, descartando la posibilidad de que la TES actúe sobre los receptores de la membrana mencionados anteriormente (figura 12).

La vía de señalización del AR β_2 involucra posterior a su estimulación, la activación de la AC que induce la formación de AMPc. Este segundo mensajero es el encargado de inducir la activación de la PKA, que fosforila diversas proteínas, incluyendo a los canales de K⁺ [Wang *et al.*, 2019]. Se ha reportado que los canales de K⁺ están involucrados en la relajación del MLVA [Knox *et al.*, 1995]. Estas proteínas permiten el influjo de iones K⁺ a la célula del MLVA, promoviendo la hiperpolarización de la membrana y el cierre de canales de Ca²⁺ como los L-VDCCs. Finalmente, la disminución en la [Ca²⁺]_i favorece la relajación del MLVA

[Johnson, 2006]. Dado que tanto la AC como los canales de K^+ son efectores en la vía de señalización adrenérgica estimulada por el salbutamol [Campos-Bedolla *et al.*, 2006], es posible que la TES pudiera ejercer un efecto sobre estas proteínas para potenciar la relajación del MLVA. Estos postulados, no se incluyen en este trabajo de tesis; sin embargo, ya han sido considerados para su exploración en el laboratorio de Investigación en Asma.

Debido a que la TES induce acciones genómicas relacionadas con los aumentos en la relajación de MLVA inducida por salbutamol, exploramos si existe una regulación positiva del $AR\beta_2$ (el primer efector involucrado en este fenómeno). En este contexto, encontramos que la funcionalidad $AR\beta_2$ se encuentra aumentada debido a la TES, ya que nuestros resultados demuestran que el valor de pA_2 es menor después de la exposición crónica del MLVA a esta hormona (figura 12). Sin embargo, la funcionalidad aumentada del $AR\beta_2$ inducida por la TES también podría explicarse si la exposición crónica a concentraciones nanomolares de este andrógeno tuviera un efecto inhibitor sobre la COMT o sobre la captación extraneuronal de catecolaminas, aunque esta suposición requiere de una investigación más profunda.

El laboratorio de Investigación en Asma ha reportado efectos no genómicos de la TES, sobre los L-VDCC, receptores de inositol trifosfato y SOCC en MLVA [Montaño *et al.*, 2014; Perusquía *et al.*, 2015; Montaño *et al.*, 2018]. En este sentido, es posible que estas proteínas pudieran ser también un blanco de los efectos genómicos de la TES; y de forma interesante, este andrógeno podría ejercer una regulación negativa de estos canales, contribuyendo a la disminución del acople excitación-contracción acoplado en este tejido. Sin embargo, esta hipótesis requiere más investigación.

Finalmente, se ha documentado ampliamente que las concentraciones plasmáticas de los andrógenos tienen un papel importante en la gravedad de los síntomas del asma, que disminuyen cuando los niños asmáticos alcanzan la

pubertad (10 a 14 años). Por el contrario, los síntomas empeoran en niñas de la misma edad [de Marco *et al.*, 2000; Townsend *et al.*, 2012; Zannolli *et al.*, 1997]. Por lo tanto, altas concentraciones plasmáticas de TES (6–50 nM) en adolescentes están probablemente relacionadas con un estado asmático disminuido [Canguven *et al.*, 2011; Muller *et al.*, 2011; Townsend *et al.*, 2012]. Esta tendencia prevalece durante toda la vida del hombre y disminuye en la vejez. De manera inversa en las mujeres los casos de asma se mantienen elevados durante la vida adulta. Por lo tanto, la funcionalidad aumentada del AR β_2 por la TES podría contribuir a la mejora de salud en varones asmáticos durante la adolescencia.

7. Conclusiones

Nuestros resultados muestran que la exposición crónica del MLVA a concentraciones fisiológicas de TES produce una potenciación de la relajación inducida por salbutamol y promueve la regulación positiva del AR β_2 . Estos resultados suponen un mecanismo adicional para explicar porque se presenta una menor incidencia de asma en los hombres en las etapas de la pubertad y adultez temprana. Las catecolaminas endógenas junto con la regulación positiva del AR β_2 podrían favorecer un mayor calibre de las vías respiratorias, es decir un tono del MLVA más relajado. Asimismo, estos resultados sugieren que los hombres con asma pudieran presentar una mejor respuesta al tratamiento con agonistas adrenérgicos β_2 .

8. Perspectivas

- Corroborar con técnicas de biología molecular (PCR y Western Blot) si existe un aumento en la expresión del AR β_2 inducido por la acción genómica de la TES.
- Investigar si la TES ejerce un efecto genómico sobre los canales de potasio, últimos efectores de la vía de señalización del AR β_2 implicados en la relajación del MLVA.

- Estudiar si la TES, favorece la relajación del MLVA inducida por teofilina (experimentos preliminares así lo sugieren), otro fármaco utilizado en la clínica para el tratamiento del asma.
- Explorar si la posible potenciación de la relajación inducida por teofilina debido a la incubación de TES es vía un efecto genómico.
- Investigar si la TES ejerce un efecto de regulación sobre la fosfodiesterasa 4 (PDE4), el primer efector blanco de la teofilina.
- Estudiar si la TES, favorece el incremento de corrientes de potasio inducidas por teofilina.

9. Bibliografía

Amrani, Y., & Bradding, P. (2017). β_2 -Adrenoceptor Function in Asthma. In *Advances in Immunology*, 136(1), 1-29. <https://doi.org/10.1016/bs.ai.2017.06.003>

Barnes, P. J. (1986). Endogenous catecholamines and asthma. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 77(6), 791–795. [https://doi.org/10.1016/0091-6749\(86\)90375-1](https://doi.org/10.1016/0091-6749(86)90375-1)

Bazán-Perkins, B., Flores-Soto, E., Barajas-López, C., & Montaña, L. M. (2003). Role of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content in Ca^{2+} entry of bovine airway smooth muscle cells. *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 368(4), 277–283. <https://doi.org/10.1007/s00210-003-0806-4>

Berg, A. H., Rice, C. D., Rahman, S., Dong, J., & Thomas, P. (2014). Identification and characterization of membrane androgen receptors in the ZIP9 zinc transporter subfamily: I discovery in female atlantic croaker and evidence ZIP9 mediates testosterone-induced apoptosis of ovarian follicle cells. *Endocrinology*, 155, 4237-4249. <https://doi.org/10.1210/en.2014-1198>

Bordallo, J., García de Boto, M. J., 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. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2008.10.039>

Burger, H. G. (2002). Androgen production in women. *Fertility and Sterility*, 77(4), 3–5. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(02\)02985-0](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(02)02985-0)

Callou de Sá, E. Q., Feijó de Sá, F. C, Guedes, A. D., & Therezinha leda do, V. N. (2009). Serum testosterone and cardiovascular disease in men. *Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia*, 53(9), 915–922. <https://doi.org/10.1590/s0004-27302009000800004>

Campos-Bedolla, P., Vargas, M. H., Calixto, E., Segura, P., Mendoza-Patiño, N., Figueroa, A., Flores-Soto, E., Barajas-López, C., & Montañó, L. M. (2006). α -Methyl-5-HT, a 5-HT₂ receptor agonist, stimulates β_2 -adrenoceptors in guinea pig airway smooth muscle. *Pharmacological Research*, 54(6), 468–473. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2006.09.006>

Canguven, O., & Albayrak, S. (2011). Do low testosterone levels contribute to the pathogenesis of asthma? *Medical Hypotheses*, 76(4), 585–588. <https://doi.org/10.1016/j.mehy.2011.01.006>

Carbajal-García, A., Reyes-García, J., & Montañó, L. M. (2020). Androgen effects on the adrenergic system of the vascular, airway, and cardiac myocytes and their relevance in pathological processes. *International Journal of Endocrinology*, 1-25. <https://doi.org/10.1155/2020/8849641>

Chesné, J., Braza, F., Mahay, G., Brouard, S., Aronica, M., & Magnan, A. (2014). IL-17 in severe asthma. Where do we stand? *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 190(10), 1094–1101. <https://doi.org/10.1164/rccm.201405-0859PP>

- Clemmensen, C., Smajilovic, S., Wellendorph, P., & Bräuner-Osborne, H. (2014). The GPCR, class C, group 6, subtype A (GPRC6A) receptor: from cloning to physiological function. *British Journal of Pharmacology*, 171(5), 1129–1141. <https://doi.org/10.1111/bph.12365>
- Croisant, S. (2014). Epidemiology of asthma: prevalence and burden of disease. *Advances in experimental medicine and biology*, 795, 17-30. <https://doi.org/10.1007/978-1-4614-8603-9>
- Darveaux, J. I., & Lemanske, R. F. (2014). Infection Related Asthma. *Allergy and Clinical Immunology: In Practice*, 2(6), 658-663. <https://doi.org/10.1016/j.jaip.2014.09.011>
- De Marco, R., Locatelli, F., Sunyer, J., & Burney, P. (2000). Differences in incidence of reported asthma related to age in men and women: A retrospective analysis of the data of the European Respiratory Health Survey. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 162(1), 68–74. <https://doi.org/10.1164/ajrccm.162.1.9907008>
- Delmotte, P., Ressmeyer, A., Bai, Y., Sanderson, M. J. (2010). Mechanisms of airway smooth muscle relaxation induced by beta2 -adrenergic agonists. *Frontiers in Bioscience-Landmark*, 750-64. <https://doi.org/10.2741/3644>
- Djukanovic, R., Roche, W. R., Wilson, J. W., Beasley, C. R., Twentyman, O. P., Howarth, R. H., & Holgate, S. T. (1990). Mucosal inflammation in asthma. *The American Review of Respiratory Disease*, 142, 434–457. <https://doi.org/10.1164/ajrccm/142.2.434>.
- Espinoza, J., Montaña, L. M., & Perusquía, M. (2013). Nongenomic bronchodilating action elicited by dehydroepiandrosterone (DHEA) in a guinea pig asthma model. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 138, 174–182. <https://doi.org/10.1016/j.jsbmb.2013.05.009>

- Evasovic, J. M., & Singer, C. A. (2019). Regulation of IL-17A and implications for TGF- β 1 comodulation of airway smooth muscle remodeling in severe asthma. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology*, 316(5), L843–L868. <https://doi.org/10.1152/ajplung.00416.2018>
- Fahy, J. V. (2015). Type 2 inflammation in asthma – present in most, absent in. *Nature Reviews Immunology*, 15(1), 57–65. <https://doi.org/10.1038/nri3786>
- Flores-Soto, E., Reyes-García, J., Carbajal-García, A., Campuzano-González, E., Perusquía, M., Sommer, B., & Montaña, L. M. (2017). Sex steroids effects on guinea pig airway smooth muscle tone and intracellular Ca²⁺ basal levels. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 439, 444–456. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2016.10.004>
- Foster, P. S., Goldie, R. G., & Paterson, J. W. (1983). Effect of steroids on β -adrenoceptor-mediated relaxation of pig bronchus. *British Journal of Pharmacology*, 0521, 441–445. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1983.tb09409.x>
- Fuseini, H., & Newcomb, D.C. (2017). Mechanisms driving gender differences in asthma. *Current Allergy and Asthma Reports*, 17, 19. <https://doi.org/10.1007/s11882-017-0686-1>
- Fuseini, H., Yung, J. A., Cephus, J. Y., Zhang, J., Goleniewska, K., Poloshukin, V. V., Peebles Jr., R. S., & Newcomb, D. C. (2018). Testosterone decreases house dust mite-induced type 2 and IL-17A-mediated airway inflammation. *Journal of Immunology*, 201(7), 1843–1854. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1800293>
- Galli, S. J., Tsai, M., & Piliponsky, A. M. (2008). The development of allergic inflammation. *Nature Medicine*, 454(7203), 445–454. <https://doi.org/10.1038/nature07204>

- GINA. (2020). Global strategy for asthma management and prevention. *Global Initiative for Asthma*, 36(6), 685–704. [https://doi.org/10.1016/S0335-7457\(96\)80056-6](https://doi.org/10.1016/S0335-7457(96)80056-6)
- Hirota, S., Helli, P., & Janssen, L. J. (2007). Ionic mechanisms and Ca²⁺ handling in airway smooth muscle. *European Respiratory Journal*, 30, 114–133. <https://doi.org/10.1183/09031936.00147706>
- Hoffstein V. (1986). Relationship between lung volume , maximal expiratory flow , forced expiratory volume in one second , and tracheal area in normal men and women. *The American Review of Respiratory Disease*, 134(5), 956-961. <https://doi.org/10.1164/arrd.1986.134.5.956>
- Holgate, S. T. (2012). Innate and adaptive immune responses in asthma. *Nature Medicine*, 18(5), 673–683. <https://doi.org/10.1038/nm.2731>
- Jankoviæ, S. M., Milovanović, D. R., & Jankoviæ, S. V. (1999). Schild's equation and the best estimate of pA₂ value and dissociation constant of an antagonist. *Croatian Medical Journal*, 40(1), 67–70. <http://doi.org/1999/40/1/9933898>
- Johnson, M. (2006). Molecular mechanisms of β₂-adrenergic receptor function, response, and regulation. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 117, 18–24. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2005.11.012>
- Knox, A. J., & Tattersfield, A. E. (1995). Airway smooth muscle relaxation. *Thorax*, 50, 894–901. <https://doi.org/10.1136/thx.50.8.894>
- Kouloumenta, V., Hatziefthimiou, A., Paraskeva, E., Gourgoulialis, K., & Molyvdas, P. A. (2006). Non-genomic effect of testosterone on airway smooth muscle. *British Journal of Pharmacology*, 149(8), 1083–1091. <https://doi.org/10.1038/sj.bjp.0706936>
- Laffont, S., Blanquart, E., Savignac, M., Cénac, C., Laverny, G., Metzger, D., Girard, J. P., Belz, G. T., Pelletier, L., Seillet, C., & Guéry, J. C. (2017).

- Androgen signaling negatively controls group 2 innate lymphoid cells. *Journal of Experimental Medicine*, 214(6), 1581–1592. <https://doi.org/10.1084/jem.20161807>
- Lam, M., Lamanna, E., & Bourke, J. E. (2019). Regulation of airway smooth muscle contraction in health and disease. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1124, 381-422. <https://doi.org/10.1007/978-981-13-5895-1>
- Lambrecht, B. N., & Hammad, H. (2015). The immunology of asthma. *Nature Immunology*, 16(1), 45-56. <https://doi.org/10.1038/ni.3049>
- Lichten, L. A., & Cousins, R. J. (2009). Mammalian zinc transporters: nutritional and physiologic regulation. *Annual Review of Nutrition*, 29, 153–176. <https://doi.org/10.1146/annurev-nutr-033009-083312>
- López-Canales, O., Castillo-Hernández, M. del C., Vargas-Robles, H., Rios, A., López-Canales, J., & Escalante, B. (2018). Androgens mediate β -adrenergic vasorelaxation impairment using adenylyl cyclase. *Journal of Cardiovascular Pharmacology*, 71(3), 147–154. <https://doi.org/10.1097/FJC.0000000000000555>
- Lucas-Herald, A. K., Alves-Lopes, R., Montezano, A. C., Ahmed, S. F., & Touyz, R. M. (2017). Genomic and non-genomic effects of androgens in the cardiovascular system: clinical implications. *Clinical Science*, 131(13), 1405–1418. <https://doi.org/10.1042/CS20170090>
- Martinez-Gonzalez, I., Steer, C. A., & Takei, F. (2015). Lung ILC2s link innate and adaptive responses in allergic inflammation. *Trends in Immunology*, 36(3), 189–195. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.01.005>
- Montaño, L. M., Cruz-Valderrama, J. E., Figueroa, A., Flores-Soto, E., García-Hernández, L. M., Carbajal, V., Segura, P., Méndez, C., Díaz, V., & Barajas-López, C. (2011). Characterization of P2Y receptors mediating ATP induced relaxation in guinea pig airway smooth muscle: involvement of prostaglandins

and K⁺ channels. *Pflugers Archiv - European Journal of Physiology*, 462(4), 573–585. <https://doi.org/10.1007/s00424-011-0997-3>

Montaño, L. M., Espinoza, J., Flores-Soto, E., Chávez, J., & Perusquía, M. (2014). Androgens are bronchoactive drugs that act by relaxing airway smooth muscle and preventing bronchospasm. *Journal of Endocrinology*, 222(1), 1–13. <https://doi.org/10.1530/JOE-14-0074>

Montaño, L. M., Flores-Soto, E., Reyes-García, J., Díaz-Hernández, V., Carbajal-García, A., Campuzano-González, E., Ramírez-Salinas, G. L., Velasco-Velázquez, M. A., & Sommer, B. (2018). Testosterone induces hyporesponsiveness by interfering with IP₃ receptors in guinea pig airway smooth muscle. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 473, 17–30. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2017.12.010>

Muller, D. C., Giles, G. G., Bassett, J., Morris, H. A., Manning, J. T., Hopper, J. L., English, D. R., & Severi, G. (2011). Second to fourth digit ratio (2D:4D) and concentrations of circulating sex hormones in adulthood. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 9, 1–11. <https://doi.org/10.1186/1477-7827-9-57>

Perusquía, M., Flores-Soto, E., Sommer, B., Campuzano-González, E., Martínez-Villa, I., Martínez-Banderas, A. I., & Montaño, L. M. (2015). Testosterone-induced relaxation involves L-type and store-operated Ca²⁺ channels blockade, and PGE₂ in guinea pig airway smooth muscle. *Pflugers Archiv - European Journal of Physiology*, 467(4), 767–777. <https://doi.org/10.1007/s00424-014-1534-y>

Philipp, M., & Hein, L. (2004). *Adrenergic receptor knockout mice: distinct functions of 9 receptor subtypes*. *Pharmacology & Therapeutics*, 101, 65–74. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2003.10.004>

Pi, M., Kapoor, K., Wu, Y., Ye, R., Senogles, S. E., Nishimoto, S. K., Hwang, D., Miller, D. D., Narayanan, R., Smith, J. C., Baudry, J., & Quarles, L. D. (2015).

Structural and functional evidence for testosterone activation of GPRC6A in peripheral tissues. Molecular Endocrinology, 29, 1759–1773. <https://doi.org/10.1210/me.2015-1161>

Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M. & Flower R. J. (2008). *Rand y Dale Farmacología (sexta edición). Elseviser, 16-22,430.*

Ressmeyer, A. R., Bai, Y., Delmotte, P., Uy, K. F., Thistlethwaite, P., Fraire, A., Sato, O., Ikebe, M., & Sanderson, M. J. (2010). Human airway contraction and formoterol-induced relaxation is determined by Ca^{2+} oscillations and Ca^{2+} sensitivity. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology, 43(2)*, 179–191. <https://doi.org/10.1165/rcmb.2009-0222OC>

Reyes-Garcia, J., Flores-Soto, E., Carbajal-Garcia, A., Sommer, B., & Montaña, L. M. (2018). Maintenance of intracellular Ca^{2+} basal concentration in airway smooth muscle. *International Journal of Molecular Medicine, 42(6)*, 2998–3008. <https://doi.org/10.3892/ijmm.2018.3910>

Salt, P. J. (1972). Inhibition of noradrenaline uptake₂ in the isolated rat heart by steroids, clonidine and methoxylated phenylethylamines. *European Journal of Pharmacology, 20(3)*, 329–340. [https://doi.org/10.1016/0014-2999\(72\)90194-X](https://doi.org/10.1016/0014-2999(72)90194-X)

Schild, H. (1949). pA_x and competitive drug antagonism. *British Journal of Pharmacology, 4*, 277-280. <https://doi.org/10.1111/j.1476-5381.1949.tb00548.x>

Scragg, J. L., Dallas, M. L., & Peers, C. (2007). Molecular requirements for L-type Ca^{2+} channel blockade by testosterone. *Cell Calcium, 42*, 11–15. <https://doi.org/10.1016/j.ceca.2006.11.003>

Sun, J., Fu, L., Tang, X., Han, Y., Ma, D., Cao, J., Kang, N., & Ji, H. (2011). Testosterone modulation of cardiac β -adrenergic signals in a rat model of

heart failure. *General and Comparative Endocrinology*, 172, 518–525.
<https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2011.04.019>

Thomas, P., Converse, A., & Berg, H. A. (2018). ZIP9, a novel membrane androgen receptor and zinc transporter protein. *General and Comparative Endocrinology*, 257, 130–136. <https://doi.org/10.1016/j.ygcen.2017.04.016>

Townsend, E. A., Miller, V. M., & Prakash, Y. S. (2012). Sex differences and sex steroids in lung health and disease. *Endocrine Reviews*, 33, 1-47.
<https://doi.org/10.1210/er.2010-0031>

Voet, D., Voet J. G., & Pratt, C. W. (2016) Fundamentos de bioquímica, la vida a nivel molecular (cuarta edición). *Editorial Médica Panamericana*, 703.

Wang, Z. W., & Kotlikoff, M. I. & Kotlikoff, I. (2019). Activation of K_{Ca} channels in airway smooth muscle cells by endogenous protein kinase A. *American Journal of Physiology*, 271, L100-L105. <https://doi.org/10.1152/ajplung.1996.271.1.L100>

Yung, J. A., Fuseini, H., & Newcomb, D. C. (2018). Hormones, sex, and asthma. *Annals of Allergy, Asthma and Immunology*, 120(5), 488–494.
<https://doi.org/10.1016/j.anai.2018.01.016>

Zannolli, R., & Morgese, G. (1997). Does puberty interfere with asthma? *Medical Hypotheses*, 48(1), 27–32. [https://doi.org/10.1016/S0306-9877\(97\)90020-7](https://doi.org/10.1016/S0306-9877(97)90020-7)

Zarazúa, A., González-Arenas, A., Ramírez-Vélez, G., Bazán-Perkins, B., Guerra-Araiza, C., & Campos-Lara, M. G. (2016). Sexual dimorphism in the regulation of estrogen, progesterone, and androgen receptors by sex steroids in the rat airway smooth muscle cells. *International Journal of Endocrinology*, 2016, 1-11. <https://doi.org/10.1155/2016/8423192>

10. Anexos



Testosterone augments β_2 adrenergic receptor genomic transcription increasing salbutamol relaxation in airway smooth muscle



Abril Carbajal-García^a, Jorge Reyes-García^a, María F. Casas-Hernández^a, Edgar Flores-Soto^a, Verónica Díaz-Hernández^b, Héctor Solís-Chagoyán^c, Bettina Sommer^d, Luis M. Montaña^{a,*}

^a Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, México

^b Departamento de Embriología, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, CDMX, México

^c Laboratorio de Neurofarmacología, Instituto Nacional de Psiquiatría Ramón de la Fuente Muñiz, CDMX, México

^d Departamento de Investigación en Hiperreactividad Bronquial, Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias Ismael Cosío Villegas, CDMX, México

ARTICLE INFO

Keywords:

Airway smooth muscle

Testosterone

β_2 -AR

Relaxation

K⁺ channels

ABSTRACT

Androgens in asthmatic men may be linked to asthma severity, acting via nongenomic and genomic effects. This ailment affects boys more than girls during infancy, and this proportion reverses in puberty. Plasmatic androgen concentration in young men increases at this age and might be related to lower asthma symptoms. Nongenomic actions occur in a brief period and are independent of the androgen receptor (AR), while genomic effects depend on AR, take hours-days and are modified by transcription or protein synthesis inhibitors. Guinea pig tracheas chronic incubation with testosterone (TES, 40 nM, 48 h) potentiates salbutamol-induced relaxation, an effect that was reversed by flutamide, not observed when tissues were pre-incubated with TES-bovine serum albumin (TES-BSA) nor when tissues were preincubated with TES for 15–60 min. In tracheal myocytes, TES chronic incubation increases salbutamol-induced K⁺ currents (IK⁺), an effect that was also reversed by flutamide, actinomycin D and cycloheximide and not seen with TES-BSA. The increment in IK⁺ was blocked by 4-aminopyridine and iberiotoxin, indicating that delayed rectifier K⁺ and high-conductance Ca²⁺ activated K⁺ channels were involved in the TES potentiation effect. Immunofluorescence studies showed that chronic TES augmented the β_2 adrenergic receptor (β_2 -AR) expression in ASM and this finding was corroborated by q-PCR and Western blot assays. β_2 -AR affinity for salbutamol after TES incubation was increased. In conclusion, chronic exposure to physiological TES concentration of the guinea pig ASM promotes β_2 -AR upregulation favoring β_2 adrenergic responses and probably limiting the severity of the asthmatic exacerbations in teenage boys and men.

1. Introduction

In men, approximately 95% of testosterone (TES), the principal sex hormone, is produced by the testes and secreted by the Leydig cells (Lucas-Herald et al., 2017) to maintain a plasmatic concentration of 5–50 nM (Muller et al., 2011; Townsend et al., 2012); this androgen results in nongenomic and genomic actions. In general, androgen nongenomic actions in airway smooth muscle (ASM) occur in a brief period (seconds to minutes) independently of the androgen receptor (AR) occupancy by these male sex steroids, are not modified by synthesis or transcription inhibitors, and do not depend on a functional nucleus (Espinoza et al., 2013; Flores-Soto et al., 2017; Montaña et al., 2018).

In ASM, *nongenomic* actions of androgens were initially studied in

precontracted rabbit tracheal smooth muscle that was relaxed by TES in an epithelium-dependent way related to nitric oxide. Furthermore, this androgen effect was characterized as nongenomic because flutamide, an AR antagonist, and actinomycin D, a DNA transcription inhibitor, did not change it. Additionally, non-permeant TES-bovine serum albumin (BSA-TES) also diminished the contraction induced by a cholinergic agonist (Kouloumenta et al., 2006). Shortly thereafter, androgens were found to relax precontracted guinea pig and bovine tracheal smooth muscle in an epithelium-independent way, through blocking membranar L-type voltage dependent Ca²⁺ channels (Bordallo et al., 2008). Recently, our group showed that in guinea pig tracheal smooth muscle, TES-induced relaxation is concentration dependent; TES blocks L-type voltage-dependent Ca²⁺ channels (Montaña et al., 2014; Perusquía et al., 2015) and inositol triphosphate receptors located in

* Corresponding author. Departamento de Farmacología, Edificio de Investigación, sexto piso, Laboratorio de Investigación en Asma, Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad Universitaria, CP 04510, Ciudad de México, México.

E-mail address: lmr@unam.mx (L.M. Montaña).

<https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110801>

Received 27 November 2019; Received in revised form 12 February 2020; Accepted 23 March 2020

Available online 08 April 2020

0303-7207/ © 2020 Elsevier B.V. All rights reserved.

the sarcoplasmic reticulum (Montaño et al., 2018) at physiological nanomolar concentrations. Meanwhile, at micromolar (supraphysiological) levels, which probably produce non-specific effects, it blocks capacitative Ca^{2+} entry through store-operated Ca^{2+} channels activated by sarcoplasmic reticulum- Ca^{2+} depletion, induces PGE_2 synthesis (Flores-Soto et al., 2017; Perusquía et al., 2015), and decreases ASM tension at rest and intracellular basal Ca^{2+} concentration by blocking L-type voltage-dependent Ca^{2+} channels and transient receptor potential canonical 3 (Flores-Soto et al., 2017). Furthermore, **nongenomic** relaxation induced by androgens in ASM does not depend on K^+ channels opening since increasing tetraethylammonium chloride concentrations, a non-selective K^+ channel blocker, did not affect it (Montaño et al., 2014). Moreover, 100 μM of 5 α -dihydrotestosterone (a reduced metabolite of TES) at a supraphysiological concentration, was reported to potentiate the relaxation induced by salbutamol in bovine tracheal ASM, and this response was not related to an androgen interaction with the β_2 adrenergic receptor (Bordallo et al., 2008). Although the authors do not define the mechanisms involved in androgen-induced salbutamol potentiation, it may be related to a non-specific effect due to the high androgen concentration used. In a previous study in pig bronchus, it was found that 40 μM of TES caused 6.7-fold potentiation of isoprenaline-induced relaxation. These authors concluded that the TES-induced increment in the potency of catecholamines could be related to the inhibition of catechol-O-methyl transferase (COMT) or extraneuronal uptake (Foster et al., 1983). In this context, a study in the isolated rat heart, reported that TES, at micromolar concentrations, was a potent and selective inhibitor of the extraneuronal uptake₂ for catecholamines (Salt, 1972). Therefore, a possible explanation of the potentiation in the salbutamol-induced relaxation produced by 100 μM of 5 α -dihydrotestosterone in the bovine tracheal ASM could be related to the inhibition of the uptake₂ and COMT in this tissue.

Meanwhile, **genomic** actions imply TES permeation through the cell membrane into the cytosol where the AR is located. This receptor has been found in several smooth muscles, including ASM (Zarazua et al., 2016). TES binds to the AR, inducing its dissociation from its chaperone proteins and forming a complex that transfers to the nucleus to begin gene transcription and later protein synthesis, which occurs in hours (Lucas-Herald et al., 2017). At nanomolar concentrations, androgen **genomic** actions in airways have been scantily investigated, and research mainly focuses on airway inflammation since TES negatively regulates type 2 inflammation carried out by group 2 innate lymphoid cells (ILC2s) and CD4^+ Th2 cells (Th2) (Fuseini et al., 2018; Laffont et al., 2017). In asthmatic patients, these lymphocytes participate in allergic airway inflammation mediated by eosinophils, basophils, mast cells, macrophages, increased atopy (augmented immunoglobulin E, IgE), hyperresponsiveness, and remodeling of the airways (Fahy, 2015; Lambrecht and Hammad, 2015; Yung et al., 2018). Nevertheless, not all asthmatic patients have type 2 airway inflammation. Some have IL-17A mediated neutrophil inflammation with mucus production (de Marco et al., 2000; Evasovic and Singer, 2019; Yung et al., 2018), and this cytokine expression is decreased by nanomolar TES concentration, consequently reducing them (Fuseini and Newcomb, 2017; Fuseini et al., 2018). Recently, it was found that AR activation mediates the regulation of intracellular Ca^{2+} increment induced by pro-inflammatory cytokines in human ASM (Kalidhindi et al., 2019).

Since previous studies using supraphysiological concentrations of androgens evidencing their **nongenomic** actions showed that augmented response to β_2 adrenergic agonists was dependent on inhibition of COMT/or extraneuronal uptake and did not include the β_2 adrenergic participation, herein we aimed to explore **genomic** actions induced by TES at nanomolar concentrations on the expression of β_2 adrenergic receptor and its functionality in ASM. Additionally, it is well known that the activation of the β_2 adrenergic receptor in ASM favors opening probability of different K^+ channels contributing to tissue hyperpolarization and relaxation (Campos-Bedolla et al., 2006; Johnson, 1998; Tanaka et al., 2003). Therefore, we also studied the

effect of TES on salbutamol-induced K^+ currents and defined the K^+ channels involved.

2. Methods

2.1. Experimental animals

Healthy male Hartley guinea pigs weighing between 350 and 400 g were used. Animals were bred in our institutional animal facilities with standard conditions: filtered conditioned air, 21 ± 1 °C, 50–70% humidity and sterilized bed. They were fed with Harlan® pellets and sterilized water ad libitum. The Scientific and Bioethics committees of the Facultad de Medicina, Universidad Nacional Autónoma de México approved the experimental protocol. The Guiding Principles for the Care and Use of Vertebrate Animals in Research and Training published by the American Physiological Society and the National Institutes of Health Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) were followed during the experimental proceedings as well as the Mexican National Laws on Animal Protection and the General Health Law Related to Health Research (NOM-062-Z00-1999).

2.2. Airway smooth muscle contraction experiments

Animals were deeply anesthetized with pentobarbital sodium (35 mg/kg, i.p.) and exsanguinated afterward. After carefully dissecting the trachea free of connective tissue, eight rings were obtained. Each ring was placed in a 2-ml Eppendorf tube containing 1 ml of Krebs solution (in mM): 118 NaCl, 25 NaHCO_3 , 4.6 KCl, 1.2 KH_2PO_4 , 1.2 MgSO_4 , 11 glucose, and 2 CaCl_2 , saturated with 30 min continuous bubbling with 5% CO_2 in oxygen to maintain pH at 7.4. Some tissues were added with 20 or 40 nM of TES, and all tubes were sealed and placed at 9 °C for 48 h. Another set of tissues was incubated with either 40 nM of TES-BSA, an impermeable macromolecular complex or 10 μM of flutamide (an AR antagonist), under the same condition. The purpose of this procedure was to lower tissue metabolism and allow tissue preservation. Interestingly, it has been demonstrated that in Chinese hamster ovary cell monolayers, cold shock (around 0 °C) for 20 min reduces the protein synthetic capacity by 84% and this effect was completely reversed after maintaining the cells at 28 °C for 20 min. Furthermore, transcription and translation processes were not affected by this procedure (Stapulionis et al., 1997). Therefore, our tissues incubated at 9 °C during 48 h, should have a proper protein synthetic rate (higher than 16%). Afterward, each ring was hung in a 5 ml organ bath with Krebs solution at 37 °C, and continuously bubbled with 5% CO_2 in oxygen. Tracheal rings were tied with silk thread to an isometric force transducer (model FT03; Grass Instruments, West Warwick, RI, USA) that was connected to a signal conditioner (CyberAmp 380, Axon Instruments, Foster City, CA, USA) and an analog-to-digital interface (Digidata 1440A; Axon). Preparations were set at a resting tension of 1 g for 60 min at the beginning of the experiment. After this period, tissues were conditioned, and contractile apparatus optimized by three consecutive KCl stimulations of 60 mM; this procedure lasted for approximately 4 h. Tissues not chronically exposed to TES were incubated with this androgen (20 or 40 nM) for 15 min, while others remained in the presence of TES during the whole experiment (60 min). All tissues were pre-contracted with 10 μM of histamine, and once the maximal contraction was reached, a cumulative concentration-response curve with salbutamol (1 nM–1 μM) was made. Some tissues were incubated during 15 min with ICI-118.551, a selective antagonist of β_2 adrenergic receptor (1, 3.2, 10, 32, and 100 nM), before the cumulative concentration-response curve with salbutamol.

2.3. Patch-clamp studies

Guinea pig tracheas free of epithelium and connective tissues, were

placed in 5 ml of Hanks solution containing 2 mg of cysteine and 0.04 U/ml papain to isolate myocytes; pH was adjusted to 7.4 with 1 M of NaHCO_3 , and preparations were incubated for 10 min at 37 °C. Leibovitz's solution was used to dispose of enzyme excess, and myocytes were then placed in solution with 5 mg/ml of collagenase type I for ~10 min at 37 °C. Tissue was gently dispersed by mechanical agitation until detached cells were observed, and Leibovitz's solution was used to stop enzymatic activity. Cells were then centrifuged at 600 rpm and 20 °C for 5 min, and the supernatant was discarded. This last step was repeated once. After re-suspending the cell pellet in minimum essential medium containing 5% fetal bovine serum, 2 mM of L-glutamine, 10 U/ml of penicillin, 10 µg/ml of streptomycin, and 15 mM of glucose, cells were cultured by plating them on rounded cover slips coated with sterile rat tail collagen placed in a 6 multi-well box, and some wells were added with 40 nM of TES or 3.2 µM of flutamide, an antagonist of the AR, 30 min before 40 nM of TES and grown at 37 °C in a 5% CO_2 in oxygen for 48 h. Other wells were incubated with 40 nM of TES-BSA that contains between 20 and 30 mol of TES per mol of BSA, and solutions were made considering 20 mol of TES. Additionally, some cells were allowed to grow for 24 h before adding 40 µM of cycloheximide (a protein synthesis inhibitor) or 10 µM of actinomycin D (a transcription inhibitor) for 30 min; afterward, 40 nM of TES was added for 48 h.

Cells settled down at the bottom of a 0.7 ml cover glass submerged in a chamber that was perfused by gravity (1.5–2.0 ml/min) with an external solution containing in mM: 130 NaCl, 1 CaCl_2 , 0.5 MgCl_2 , 3 NaHCO_3 , 1.2 KH_2PO_4 , 5 KCl, 0.1 niflumic (to block Cl^- currents), 10 glucose, 10 HEPES, and, pH 7.4, adjusted with NaOH. All experiments were performed at room temperature (~21 °C).

Depolarizing voltage steps (voltage clamp) activated K^+ currents (IK^+), which were recorded using the whole cell configuration through an Axopatch 200A amplifier (Axon Instruments). A horizontal micropipette puller (P-87, Sutter Instruments Co., Novato, CA) was used to make patch pipettes with 1B200F-6 glass (Word Precision Instruments, Sarasota, FL) that had a resistance between 2 and 4 MΩ. The internal solution was constituted by (mM): 5 NaCl, 140 K^+ gluconate, 5 ATP, 0.1 GTP, 5 HEPES, 1 EGTA, and 0.1 leupeptine, adjusted to pH 7.3 with KOH. Currents filtered at 1–5 KHz, digitized (Digidata 1440A, Axon) at 10 KHz, were analyzed through specialized software (pClamp v10.2, Axon).

All cells received a step depolarization protocol from –60 to +50 mV in 10-mV increments from a holding potential of –60 mV during 100 ms, 1 Hz. These stimulations produced a voltage-dependent outward IK^+ . After the control protocol, myocytes in each experimental group were perfused with different salbutamol concentrations (1, 10, 100, or 1000 nM) and received the same step depolarization protocol. To characterize the K^+ channels involved in these phenomena, myocytes were perfused with 3 mM of 4-aminopyridine (4-AP, a delayed rectifier K^+ channels blocker) or 100 nM of iberiotoxin (IBTX, a specific blocker of the high-conductance Ca^{2+} activated K^+ channels). Changes in the currents were evaluated as maximal current peak to each voltage tested.

2.4. Double immunofluorescence

Guinea pig tracheal tissues incubated with and without 40 nM of TES for 48 h at 9 °C as in organ bath experiments were fixed in 4% paraformaldehyde in sodium phosphate buffer (PBS) for 4 h and dehydrated with 30% sucrose/PBS until their inclusion in O.C.T. compound (Tissue Tek, CA, USA) and frozen at –60 °C. Cryosections transferred into PBS and permeabilized with 0.5% Triton in PBS were 20-µm thick. Nonspecific binding was blocked by adding 10% horse serum on the slices for 30 min. Afterward, slices were incubated with the following primary rabbit antibodies: anti- β_2 adrenergic receptor (β_2 -AR, Creative Diagnostics, DPABH-26262, NY, USA), dilution 1:50, and an antibody against the most abundant isoform in ASM (Birrell et al., 2015), anti-adenylyl cyclase 6, (Genetex, GTX47798, CA, USA),

dilution 1:100, overnight at 4 °C. The secondary antibody Alexa488 donkey anti-rabbit immunoglobulin G (IgG, Life Technologies, CA, USA) was incubated (1:200) for 30 min. The next primary antibody, mouse anti- α -actin (Santa Cruz Biotechnology, Cat. no. sc-58669, TX, USA), dilution 1:250 was applied. The secondary antibody Alexa Fluor 555 donkey anti-mouse (Life Technologies, CA, USA), dilution 1: 400 was used. 4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI, Life Technologies) was used to counterstain the nuclei. Slides were cover-slipped with fluoromount aqueous mounting medium (Sigma, MO, USA). Negative controls received no primary antibodies (β_2 -AR and adenylyl cyclase 6) and no fluorescence signal was obtained. A confocal microscope A1R + STORM, (Nikon, Japan) was used to observe immunofluorescence. Merged images were constructed for displaying purposes, in which the β_2 -AR and adenylyl cyclase 6 were green, α -actin was red and nuclei blue.

2.5. mRNA extraction and quantitative PCR for β_2 adrenergic receptor

Guinea pig tracheas were obtained and placed in cold RNAase-free Krebs solution, and the esophagus was carefully removed using a stereoscopic microscope (SMZ-10 Nikon, Japan). Each trachea was placed in a 2-ml Eppendorf tube free of RNAase containing 1.5 ml of Krebs solution. Some tracheas were incubated during 48 h with 40 nM of TES at 9 °C as described in organ bath experiments. Afterward, tracheas placed in cold RNAase-free Krebs solution were dissected free of connective tissue and cartilage to obtain smooth muscle and epithelium. Each tissue was separately placed in 200 µl of Trizol in an RNAase-free 1.5-ml Eppendorf tube on ice. Total RNA was purified through Direct-zol RNA Miniprep Kit (Zymo, CA, USA) and DNA contamination was prevented with DNase I treatment (in column) (Zymo) and eluted with RNAase-free water. Total RNA concentration was measured with a NanoDrop 2000 spectrophotometer (Thermo Scientific, Barrington, IL, USA). To assess RNA purity, the absorbance ratios 260:230 nm and 260:280 nm, in which a 1.8 ratio was appropriate for proceeding with cDNA synthesis, were used.

Total RNA was reverse-transcribed to cDNA using a SuperScript VILO cDNA synthesis kit (Life Technologies) and stored at –20 °C for later use. Quantitative polymerase chain reactions (qPCR) were performed in a StepOne Real-Time PCR system (Foster City CA, USA). A final volume of 20 µl of PCR reaction was employed, containing 4 µl of water, 10 µl of 2X TaqMan Gene Expression Master Mix (Life Technologies), 5 µl of diluted cDNA, and 1 µl of 20X mix PCR assay of specific probe for β_2 -AR. Negative controls were prepared without template. Custom TaqMan gene expression assays (ThermoFisher Scientific, CA, USA) are shown in Table 1. Cycling conditions in the first phase were 2 min at 50 °C and 10 min at 95 °C, while for the second phase, these were 15 s at 95 °C and 1 min at 60 °C during 40 cycles. A series of normalizing genes (cofilin, clathrin heavy chain-like 1, peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B) was tested on the samples for their

Table 1
Custom TAQMAN gene expression assays.

GENE	Sequence of primers and probe
COFILIN 1	Fw: GCCAGACGGTGGACGAC Rv: GTCTTGTCTGGTAGCATCTTGA Pr: CCTACGGCCACTTTG
PPIB	Fw: CCAGGGCGGAGACTTCAC Rv: CGCTCGCCATAAATGCTCTTG Pr: CCTGTGCCATCTCCTC
CLATHRIN	Fw: ACTGTTCCCATGAACCTACTC Rv: TGTCTTCTTCTTCAACACAGACTGACA Pr: TTGACGCCAATAATCC
β_2-AR	Fw: CAAAAGCAGCTCCAGAAGATTGAC Rv: CTGCTCCACCTGGCTGAG Pr: ATCGGCCCTCAGATCT

PPIB: peptidyl-prolyl cis-trans isomerase B. β_2 -AR: β_2 adrenergic receptor.

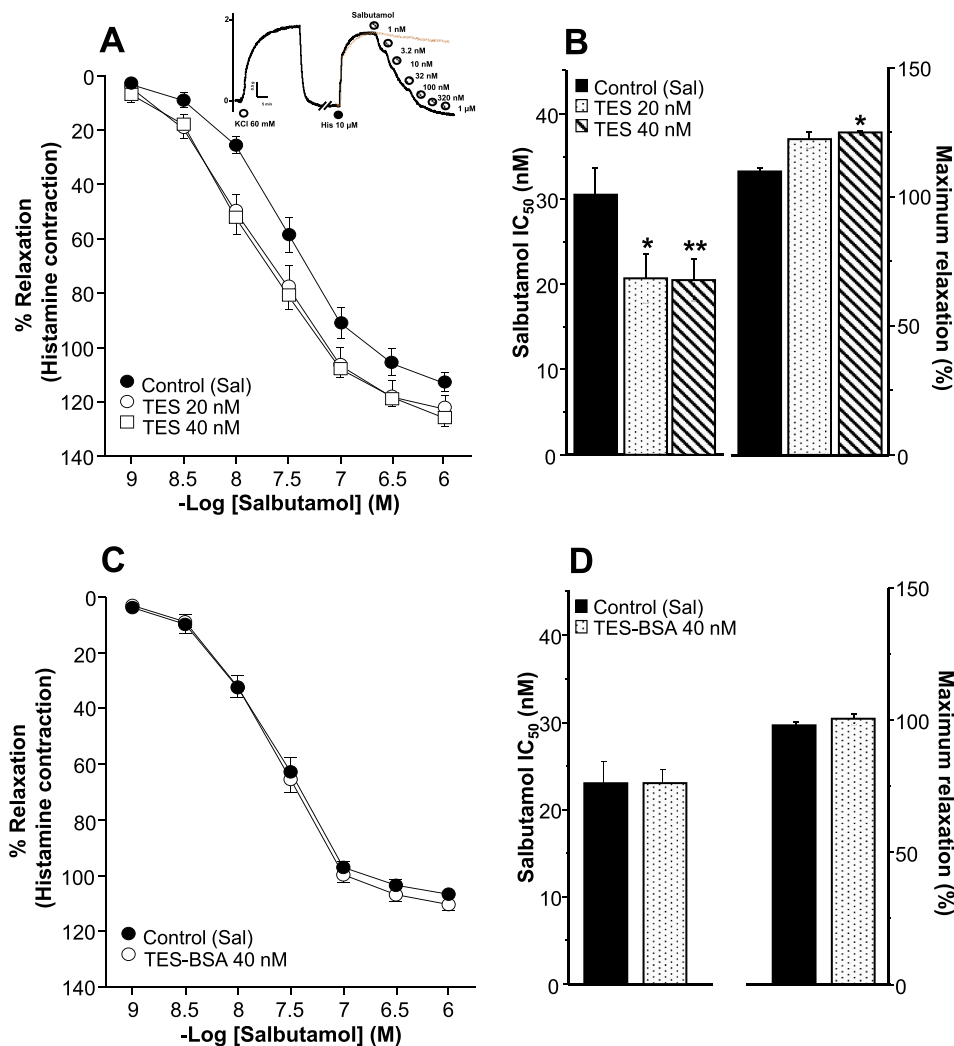


Fig. 1. Testosterone (TES) incubated for 48 h potentiates guinea pig tracheal smooth muscle relaxation induced by salbutamol, while testosterone conjugated with bovine serum albumin (TES-BSA) during the same period does not, suggesting the genomic nature of the phenomenon. **A)** Salbutamol (Sal) cumulative concentration curve relaxes histamine (10 μ M) pre-contracted tissues. When pre-incubated with TES (20 or 40 nM, $n = 5$) for 48 h, the concentration-response curve to salbutamol had a leftward shift for both TES concentrations. Inset in this figure illustrates original traces showing the Sal cumulative concentration curve; orange trace depicts sustained contraction induced by histamine (control). **B)** Bar graphs showing that TES, at both concentrations tested, significantly diminished the Sal inhibitory concentration 50% (IC₅₀, left panel). Maximal response (right panel) to Sal was only significantly different for the highest TES concentration used. **C)** Sal cumulative concentration curve induced relaxation was not modified by TES-BSA, $n = 4$. **D)** Bar graphs illustrating no differences in Sal responses between control and TES-BSA treated tissues. Symbols and bars depict mean \pm S.E.M., * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. One-way analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparison test was used for TES experiments and paired Student t -test for TES-BSA experiments.

stable expression in airway smooth muscle, and eventually cofilin was designated as a housekeeping gene for normalization. The $2^{-\Delta\Delta CT}$ method was employed to analyze β_2 -AR gene expression (Livak and Schmittgen, 2001).

2.6. Western blot for β_2 adrenergic receptor

The relative expression of the β_2 -AR and β -actin as loading control were evaluated by Western blot in guinea pig ASM with and without 40 nM of TES for 48 h or 10 μ M of flutamide 30 min before TES incubation. Tissues were finely cut and cell lysis was performed by sonication using RIPA lysis buffer containing (in mM): 50 Tris (pH 7.5), 0.5 EDTA, 1% Nonidet™ P40, 1 PMSF, 0.5 sodium orthovanadate; protease inhibitors (20 μ g/ml each): aprotinin, leupeptin, and pepstatin. The total protein concentration was quantified by the Lowry method. Total proteins (10 μ g) were separated by one-dimensional electrophoresis, transferred to polyvinylidene difluoride (PVDF) membranes and detected by Western blot and chemiluminescence. All membranes were blocked with the commercial Odyssey Blocking Buffer in tris-buffered saline (TBS, LI-COR, NE, USA) for 1 h. Expression of the β_2 -AR was evaluated by incubating the membranes overnight with a polyclonal primary antibody raised in rabbit (concentration 1:100; Creative Diagnostics) and afterward, for 1.5 h with a peroxidase-coupled donkey anti-rabbit secondary antibody (concentration 1:15000; Jackson). After membrane stripping using the Re-blot plus-mild solution (Millipore, MA, USA), β -actin was detected with a monoclonal (clone AC-40) primary antibody raised in mouse (1:500; Sigma, St.

Louis, MO, USA) and a peroxidase-coupled rabbit anti-mouse secondary antibody (1:10000; Jackson, PA). The chemiluminescent signal was detected with the imaging system (ChemiDoc™ MP, BIO-RAD, CA, USA) and images were acquired with the Image Lab software (version 5.2.1; BIO-RAD). Antibody specificity control was assessed omitting the incubation with the anti- β_2 -AR antibody. In all cases, the optical density was normalized to the loading control to quantify the ratio of β_2 -adrenergic receptor/ β -actin.

2.7. Drugs and chemicals

Testosterone (17 β -hydroxy-4-androsten-3-one, TES), testosterone 3-(O-carboximethyl) oxime: BSA, histamine, salbutamol, ICI-118.551, actinomycin D, cycloheximide, flutamide were all purchased from Sigma Chem. Co. (St. Louis, MO, USA), iberiotoxin was purchased from Enzo Life Sciences (Farmingdale, NY, USA) and 4-aminopyridine from Research Chemical LTD (Word Hill, MA, USA). TES, cycloheximide, and flutamide were diluted in absolute ethanol and the highest percentage used was 0.1% v/v of vehicle. Actinomycin was diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO).

2.8. Statistical analysis

In tracheal smooth muscle, salbutamol concentration response curves were evaluated by the inhibitory concentration 50% (IC₅₀) and maximum relaxation. Each cumulative concentration-response curve was used to evaluate the IC₅₀ that was calculated by straight-line

regression as $-\log [M]$ using the ED_{50} plus v1.0 software. These data were analyzed by a one-way analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparison test. By analyzing data in an Excel spreadsheet, Schild's equation was used to calculate dissociation constant (K_D) and pA_2 values for ICI-118.551 (Jankovic et al., 1999). In patch clamp experiments, IK^+ at each voltage step was analyzed by a one-way analysis of variance followed by Dunnett's, Student-Newman-Keuls multiple comparison tests or non-paired student t-test. Western blot was also analyzed by one-way analysis of variance followed by Dunnett's comparison test. In all experiments, each "n" value corresponds to a different animal. In the manuscript and figures, data are expressed as mean \pm S.E.M. Statistical significance was set at $p < 0.05$ bimarginally.

3. Results

3.1. Chronic exposure to testosterone augments salbutamol-induced airway smooth muscle relaxation

Guinea pig tracheal rings incubated for 48 h at 9 °C had a KCl response (1.9 ± 0.14 g, $n = 15$) similar to those tissues not subjected to this maneuver (1.7 ± 0.15 g, $n = 15$), suggesting that this procedure does not affect the contractile apparatus. Tracheal rings (sham control) precontracted with histamine relaxed to salbutamol in a concentration-dependent way. Contrastingly, tissues preincubated with 20 or 40 nM of TES for 48 h, showed a leftward shift of the salbutamol cumulative concentration response curve (Fig. 1A, $n = 5$). IC_{50} salbutamol values, the concentration required to obtain 50% relaxation, for both TES concentrations used were significantly lower than IC_{50} from the sham group, and maximum response was only significantly different for the TES 40 nM group (Fig. 1B). TES-BSA, an impermeable macromolecular complex, showed no modification in the relaxation induced by salbutamol (Fig. 1C, D, $n = 4$). This TES-induced increase in the relaxation produced by salbutamol was abolished by incubation with 10 μ M of flutamide (Fig. 2, $n = 6$). On the other hand, acute exposure to 20 or 40 nM of TES for 15 or 60 min did not modify the concentration response curve to salbutamol (Fig. 3A, $n = 7$), neither IC_{50} nor maximum response were different from sham group (Fig. 3B). These results strongly suggest that increased salbutamol responses are related to chronic exposure to TES, probably involving a genomic pathway.

3.2. Testosterone increases salbutamol-induced K^+ currents in airway myocytes through a genomic effect

In airway myocytes, depolarizing pulses provoke voltage-dependent outward K^+ currents (IK^+). Cells perfused with increasing concentrations of salbutamol (1–1000 nM) showed a concentration-dependent increment in IK^+ (Fig. 4A). Myocytes previously incubated with TES

40 nM for 48 h, displayed even higher IK^+ in response to salbutamol perfusion (Fig. 4B). Flutamide lowered the IK^+ increment produced by TES in the salbutamol-induced K^+ current (Fig. 4C). Fig. 4D illustrates that TES incubation significantly increases IK^+ induced by depolarizing pulses from -10 mV ahead; this effect was ablated by flutamide. The addition of salbutamol at different concentrations augmented the depolarizing step-induced IK^+ that was significantly further increased by TES from -20 or 0 mV ahead and this effect was reverted by flutamide (Fig. 4E–H). The genomic nature of the TES-induced increment of IK^+ was further confirmed because myocytes incubation with TES-BSA, an impermeable macromolecular complex, showed no modification of the IK^+ induced by depolarization pulses or increasing salbutamol concentrations (Fig. 5A–G). Additionally, actinomycin D, a transcription inhibitor, and cycloheximide, a protein synthesis inhibitor, also diminished the IK^+ increment produced by TES in the salbutamol-induced K^+ current (Figs. 6C and 7C). Figs. 6D and 7D show that these inhibitors revert TES-induced increases in IK^+ induced by depolarizing pulses from 30 mV or 10 mV ahead, respectively. Additionally, actinomycin D and cycloheximide inhibit the effect of TES on the salbutamol induced increment of IK^+ (Fig. 6E–H, 7E–H). These results highlight the genomic nature of the TES-induced increment of IK^+ .

The TES increase in IK^+ induced by depolarizing pulses was blocked by 4-AP, a delayed rectifier K^+ channel blocker, from 0 mV ahead, indicating that TES is augmenting the expression of these channels (Fig. 8A). In this context, the androgen increment in the IK^+ induced by salbutamol was blocked by 4-AP and by IBTX, a specific blocker of the high-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels, indicating that both K^+ channels were involved in the TES potentiation effect (Fig. 8B). Conceivably, the expression of these channels is also augmented by TES.

3.3. Testosterone chronic incubation induces β_2 adrenergic receptor (β_2 -AR) upregulation in airway smooth muscle

Immunofluorescence studies showed that TES 40 nM incubation for 48 h augmented the β_2 -AR expression in this tissue (Fig. 9A–B). No fluorescence was detected in negative controls without primary antibody, corroborating its specificity against the β_2 -AR (Fig. 9C). Smooth muscle α actin was also detected to confirm the co-localization of the β_2 -AR in the airway smooth muscle (Fig. 9A and B, last panel). Additionally, the β_2 -AR mRNA expression was significantly increased by TES incubation (Fig. 10A) as well as the protein presence, which was reverted by flutamide (Fig. 10B), confirming that chronic TES exposure promotes β_2 -AR upregulation through a genomic action. Moreover, immunofluorescence for adenylyl cyclase 6 in tissues with and without TES incubation did not show any differences (Supplementary Fig. 1).

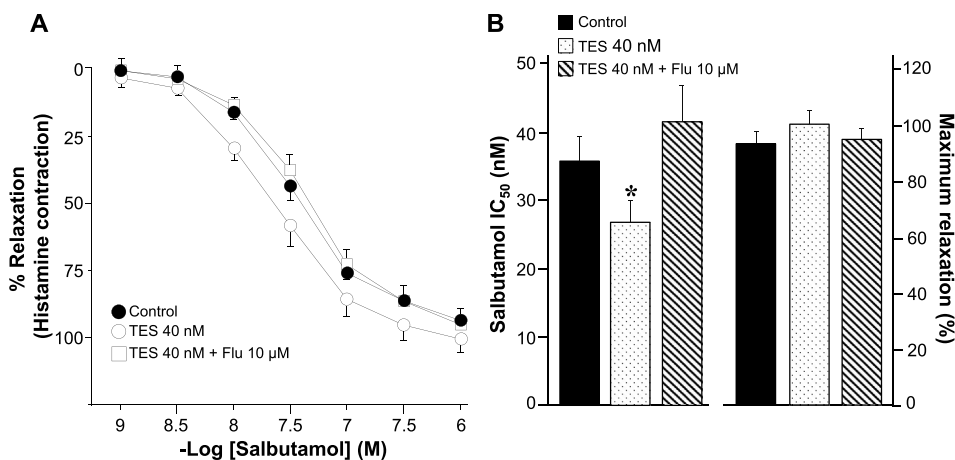


Fig. 2. Testosterone (TES) induced potentiation of the salbutamol relaxing response was abolished by the blockade of the androgen receptor in guinea pig tracheal preparations. A) Salbutamol cumulative concentration curve relaxes histamine (10 μ M) pre-contracted tissues. When pre-incubated with TES (40 nM, $n = 6$) for 48 h, the concentration response curve to salbutamol had a leftward shift. This TES effect was abolished by incubation with 10 μ M of flutamide (Flu, an antagonist of the AR) before TES. B) Bar graphs showing that TES diminishes salbutamol IC_{50} and that this effect is reversed by Flu. Maximum relaxation was not modified by any treatment. Symbols and bars depict mean \pm S.E.M., * $p < 0.05$.

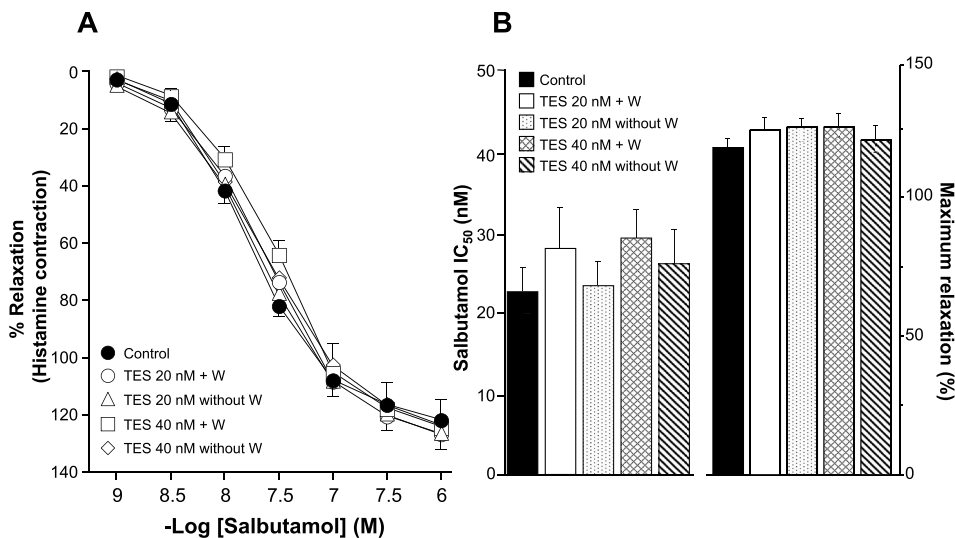


Fig. 3. Testosterone (TES) pre-incubated for 15 or 60 min does not modify the relaxation induced by salbutamol (Sal) in guinea pig tracheal preparations. **A)** Sal cumulative concentration curve was not altered by TES 20 or 40 nM 15 min pre-incubation washed (W) before Sal addition, nor when TES was always present during the curve (without W, 60 min), completing 1h incubation. **B)** Bar graphs illustrating that TES, at both concentrations and incubation times tested, did not modify the Sal inhibitory concentration 50% (IC₅₀, left panel). Maximal response (right panel) to Sal was also not modified in any of the experimental procedures. Symbols and bars depict mean \pm S.E.M., $n = 7$.

3.4. Testosterone induced upregulation of the β_2 -AR favors salbutamol response in airway smooth muscle

To explore whether a modified β_2 -AR function mediates the TES increment in the salbutamol response, guinea pig tracheal rings received different concentrations of ICI-118.551, a specific β_2 -AR antagonist (1, 3.2, 10, 32, and 100 nM). This antagonist concentration-dependently shifted salbutamol response curves to the right (Fig. 11A). TES incubation shifted the salbutamol cumulative curve to the left (IC₅₀ = 25.6 \pm 5.4 nM, $n = 7$, Fig. 11B) as compared with the curve without TES (IC₅₀ = 39.9 \pm 3.1 nM, $p = 0.05$, $n = 6$). ICI also shifted this concentration curve to the right in a concentration-dependent fashion. pA₂ value obtained with the Schild's equation, was reduced with TES incubation during 48 h (Fig. 11C), i.e., the concentrations required for ICI to occupy 50% of the β_2 -AR available at the smooth muscle membrane was lower. This value is an indirect measure of an antagonist's affinity for its receptors and, in this study, provides information about the role of the β_2 -AR on the augmented salbutamol response. Therefore, the -log pA₂ value transformed to K_B, the dissociation constant, was 10.4 \pm 4.1 nM for the control group vs 3.4 \pm 0.7 nM for the TES group. The K_B value for TES treated tissue was lower, corroborating an augmented β_2 -AR expression in airway smooth muscle.

4. Discussion

Our results indicate that chronic exposure to nanomolar TES concentrations in guinea pig ASM induces augmented β_2 -AR expression and therefore an increase in the relaxing responses to salbutamol that was abolished by flutamide. Furthermore, TES-BSA had no effect on the relaxation induced by salbutamol, and acute exposure to TES also did not modify this response. In myocytes, this chronic androgen exposure increases salbutamol-induced IK⁺, and this increment was eliminated by flutamide, actinomycin D, and cycloheximide. Contrastingly, TES-BSA did not modify the salbutamol-induced IK⁺.

The effect of androgens on β adrenergic receptors in other tissues, such as cardiac and vascular muscles has been explored. In rat cardiac tissues, TES improves the myocardial performance by upregulating the expression of β_2 -AR, and this effect was annulled by flutamide, suggesting a genomic action of the androgen (Sun et al., 2011). Meanwhile, in rat aortic smooth muscle, TES impairs the β adrenergic vasorelaxation without modification of the β_2 -AR expression. In this case, TES diminished the expression of adenylyl cyclase, which was responsible for the diminished β adrenergic vasorelaxation (Lopez-Canales et al., 2018). In ASM, we did not find any modification of the adenylyl

cyclase-6 expression in tissues chronically exposed to TES, ruling out its participation in the augmented salbutamol response induced by TES (Supplementary Fig. 1).

In bovine airway smooth muscle, it has been reported that acute exposure to a high concentration of 5 α -dihydrotestosterone (100 μ M) increases the salbutamol relaxation without affecting the β_2 -AR (Bordallo et al., 2008), and this effect might be due to a non-specific action related to the high androgen concentration tested. In this context, in pig bronchus, 40 μ M of TES augmented the isoprenaline-induced relaxation by approximately 6.7-fold, and this response was related to the inhibition of COMT or extraneuronal catecholamine uptake (Foster et al., 1983). Seemingly, this androgen action on ASM should be related to a nongenomic effect.

In this work, we found that chronic exposure to nanomolar TES concentrations favors salbutamol-induced relaxation of the histamine-precontracted ASM. This effect is not due to a nongenomic rapid action, since brief exposures to TES for 15 or 60 min did not modify the relaxing salbutamol responses (Fig. 3).

On the other hand, it has been documented that TES can activate diverse membrane proteins such as GPRC6A, a class C orphan G protein-coupled receptor family member (Pi et al., 2015), and ZIP9, a zinc transporter from the ZIP family (Berg et al., 2014). These receptors can activate G proteins, such as G_s, G_i, and/or G_{q11}, triggering signaling pathways due to TES stimulation. Furthermore, extracellular-signal-regulated kinases 1 and 2 are also activated, participating in many phosphorylation processes. The final response to androgen stimulation of these receptors depends on the cellular type (Clemmensen et al., 2014; Thomas et al., 2018). In this regard, we found that chronic exposure of ASM to TES-BSA did not alter salbutamol-induced relaxation, discarding the possibility of TES acting on the previously mentioned membrane receptors (Fig. 1C).

The K⁺ channels have been reported to be involved in ASM relaxation (Campos-Bedolla et al., 2008; Huang et al., 1993; Jones et al., 1990). Because TES augmented salbutamol-induced ASM relaxation, we explored the effects of TES on these channels. Chronic exposure of tracheal myocytes to TES produced an increase of the IK⁺ induced by depolarizing pulses as well as the salbutamol-induced IK⁺. Both effects were abolished by flutamide (Fig. 4), actinomycin D (Fig. 6), and cycloheximide (Fig. 7). These results strongly suggest that the augmented salbutamol-induced IK⁺ by TES is due to a genomic action. While, it is possible that membrane receptors activated by TES could be involved in this phenomenon, TES-BSA did not modify the salbutamol-induced IK⁺ currents, ruling out their participation (Fig. 5).

Meanwhile, β_2 -AR activation induces ASM relaxation through adenylyl cyclase-cAMP pathways, including diverse K⁺ channels, by

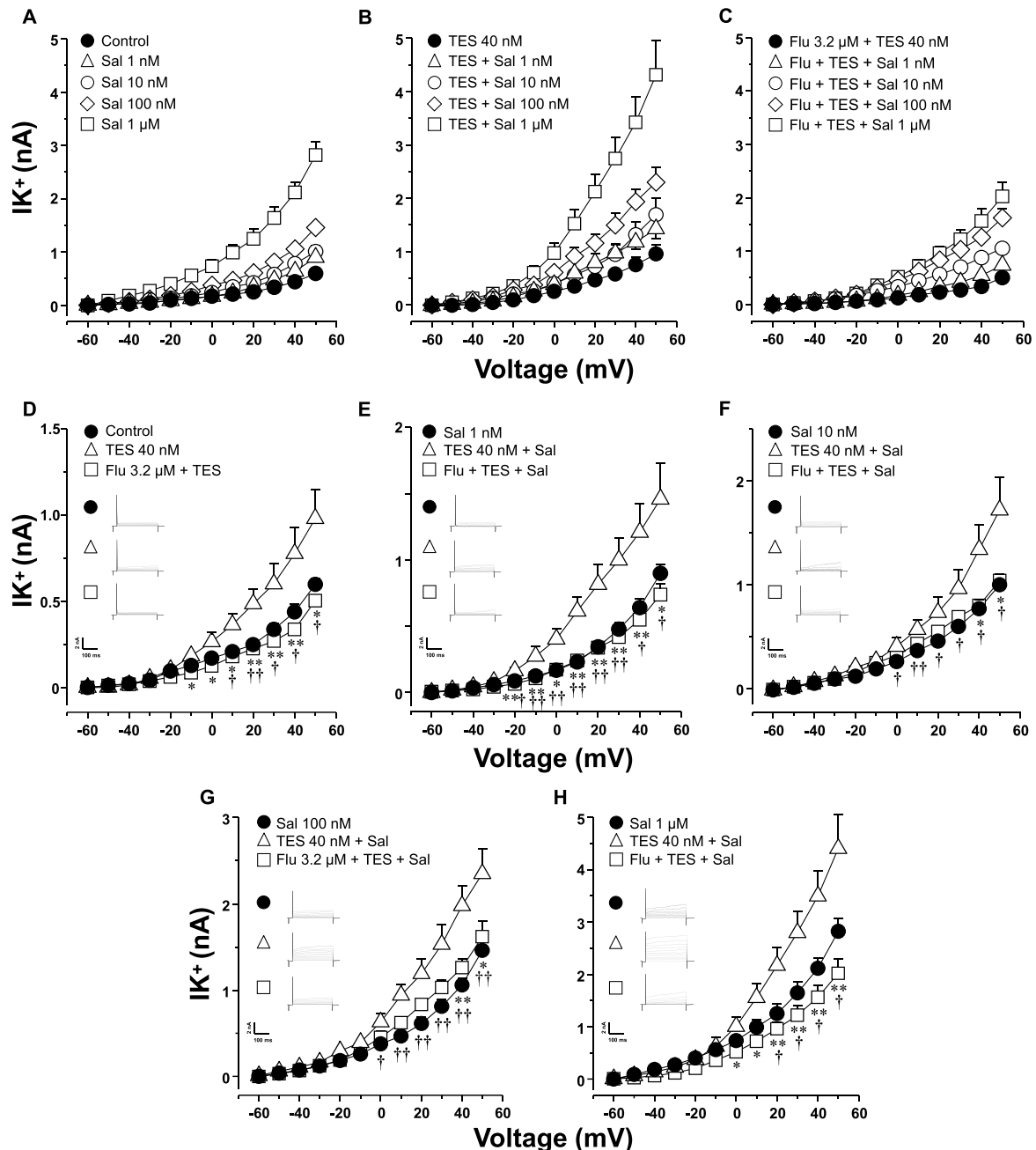


Fig. 4. Testosterone (TES, 40 nM) incubated for 48 h augmented K^+ outward currents (IK^+) induced by salbutamol in guinea pig tracheal myocytes through a genomic action. Cells received a step depolarization protocol from -60 to $+50$ mV in 10 mV increments from a holding potential of -60 mV during 100 ms, 1 Hz. These stimulations produced a voltage-dependent outward IK^+ . **A)** Myocytes perfused with different concentrations of salbutamol (Sal) showed a concentration-dependent increase in IK^+ , $n = 9$. **B)** Myocytes incubated with TES showed a higher IK^+ , $n = 8$, while **C)** illustrates that this effect was abolished by flutamide (Flu, $n = 7$). Figures **D, E, F, G** and **H)** illustrate statistical analysis of each Sal concentration used, including experiments with Flu. As can be seen in all these figures, Flu reverses TES effect on salbutamol increase of the IK^+ . Notice that TES alone induces a significant increment of the IK^+ which was annulled by Flu. These results clearly demonstrate a genomic effect of TES on airway smooth muscle. Insets show original recordings. Please notice that in figures **D-H)**, different Y-axis scales are used in order to clearly show statistical significances. Symbols represent mean \pm S.E.M. In figure **D)**, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ by comparing Flu + TES (\square) vs TES groups (Δ) and $\dagger p < 0.05$, $\dagger\dagger p < 0.01$ when comparing Control (\bullet) vs TES (Δ) groups. For the remaining figures (**E-H)** * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparing Flu + TES + Sal (\square) vs TES + Sal (Δ) groups and $\dagger p < 0.05$, $\dagger\dagger p < 0.01$ comparing Sal (\bullet) vs TES + Sal (Δ) groups.

producing membrane hyperpolarization (Campos-Bedolla et al., 2006; Chavez et al., 2007; Huang et al., 1993; Johnson, 1998; Jones et al., 1990; Tanaka et al., 2003). In this tissue, the main K^+ channels are the Ca^{2+} activated K^+ channels (K_{Ca}) and the voltage-dependent delayed rectifier K^+ channels (K_V) (Adda et al., 1996; Boyle et al., 1992; Montañó et al., 2011).

The K_{Ca} are mainly activated by increases in intracellular Ca^{2+} concentration and through the cAMP-PKA signaling pathway (Wang and Kotlikoff, 1996) and have been classified in three subfamilies: those of high conductance (BK_{Ca} , MaxiK, $K_{Ca1.1}$), intermediate conductance (IK_{Ca} , $K_{Ca3.1}$), and low conductance (SK_{Ca} , $K_{Ca2.1}$, 2.2 and 2.3) (Feletou, 2009). BK_{Ca} have been characterized as the most important

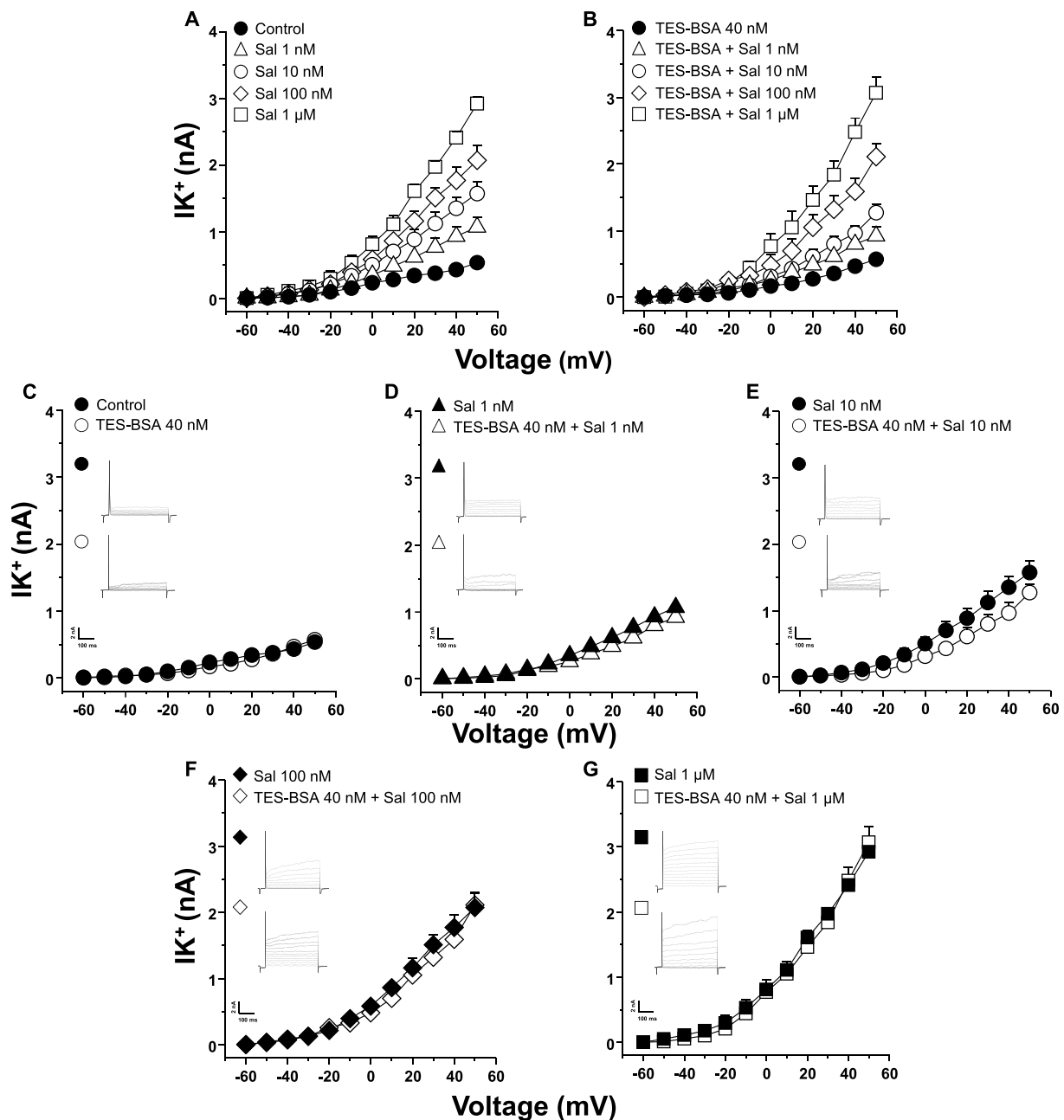


Fig. 5. Tracheal guinea pig myocytes incubation with testosterone conjugated with bovine serum albumin (TES-BSA) during 48 h has no effect on the IK^+ induced by salbutamol (Sal) corroborating the genomic nature of the phenomenon. A) Myocytes perfused with increasing concentrations of Sal showed a concentration-dependent augmentation in IK^+ , $n = 6$. B) Myocytes incubated with TES-BSA, showed no changes in IK^+ compared with the group without TES, $n = 5$. Figures C, D, E, F and G illustrate statistical analysis of each Sal concentration used in TES-BSA experiments. Symbols represent mean \pm S.E.M.

channels in bronchorelaxation induced by 5-HT and ATP (Campos-Bedolla et al., 2008; Montañó et al., 2011). Since IBTX partially blocked the TES-induced increment in IK^+ induced by salbutamol (Fig. 8B), the role of BK_{Ca} in this phenomenon is demonstrated. Furthermore, because this TES increment was reverted by flutamide (Fig. 4), an augmented expression of these channels is highlighted.

Meanwhile, K_V in ASM have been characterized as $K_{V1.2}$ and $K_{V1.5}$ and are blocked by 4-AP (Adda et al., 1996). Recently, the presence of $K_{V7.5}$ in human ASM was proposed (Brueggemann et al., 2018). Our results showed that this blocker completely reversed TES increase in the IK^+ induced by increasing voltage pulses (Fig. 8A). These results imply that this androgen is upregulating the K_V channels in this tissue. Notwithstanding, in the TES potentiation of the salbutamol-induced IK , K_V are also involved, since 4-AP partially abolished this current (Fig. 8B).

However, the role of $K_{V7.5}$ in both phenomena is questionable since this channel is not affected by 4-AP (Khammy et al., 2018).

Because TES induces genomic actions related to the increases in salbutamol-induced ASM relaxation and IK^+ , we explored whether an upregulation of the β_2 -AR was involved. In this context, we found that this receptor expression was enhanced in ASM chronically exposed to TES, which was confirmed by immunofluorescence image (Fig. 9), Western blot, and qPCR (Fig. 10). Augmented β_2 -AR functionality was corroborated because pA2 value was lower after chronic TES exposure (Fig. 11). Nevertheless, this upregulation and functionality of the β_2 -AR induced by TES may also be improved if chronic exposure at nanomolar concentrations of this androgen has an inhibitory effect on COMT or extraneuronal catecholamine uptake, although this assumption requires further research. Contrastingly, TES nongenomic effects on the L-type

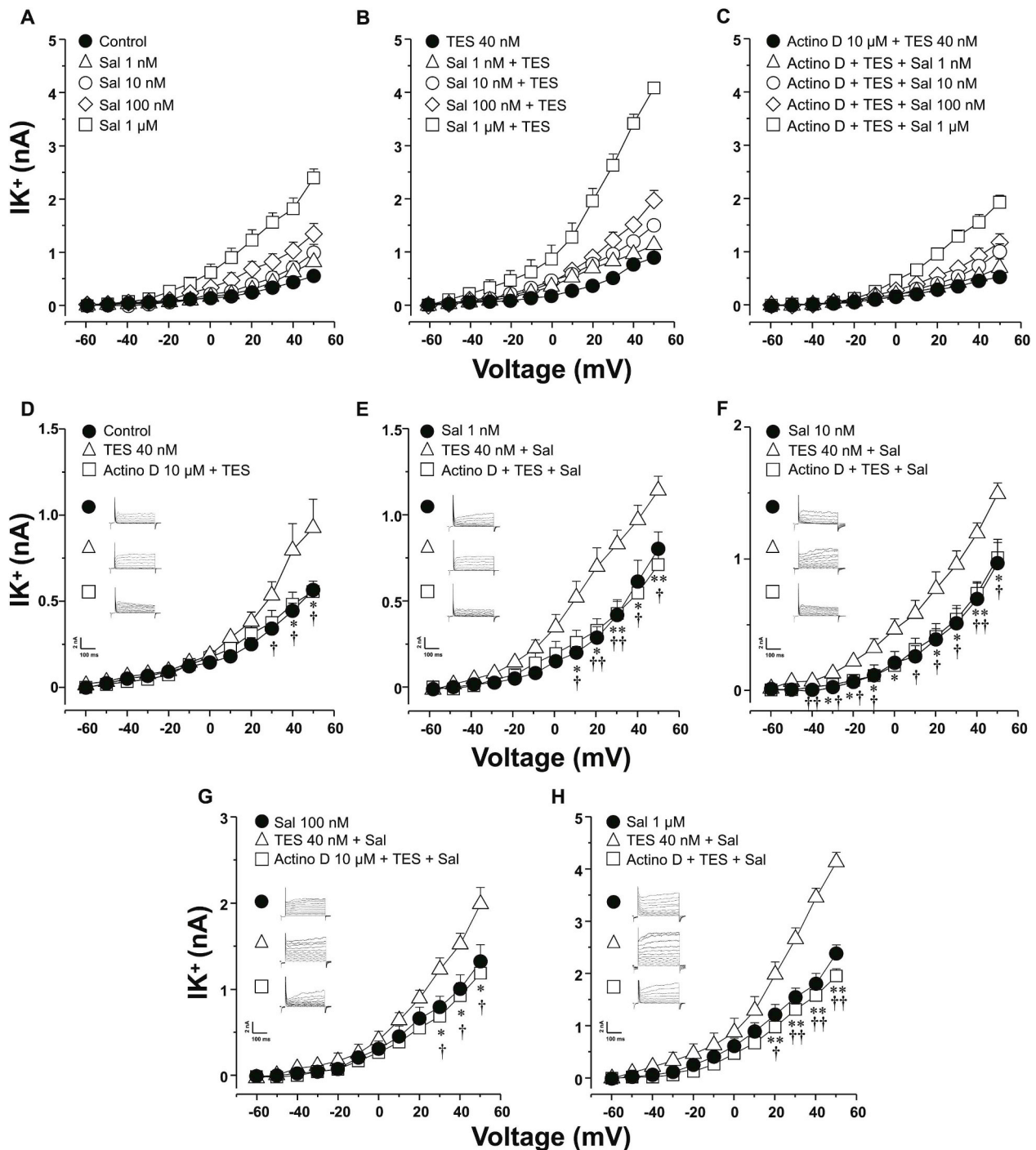


Fig. 6. Actinomycin D annulled testosterone (TES, 40 nM for 48 h) augmented IK^+ induced by salbutamol (Sal) confirming a genomic action. **A)** Different concentrations of Sal perfusion to tracheal myocytes, showed a concentration-dependent rise in IK^+ . **B)** Myocytes incubated with TES showed a higher IK^+ , while **C)** illustrates that this effect was abolished by actinomycin D (Actin D, a transcription inhibitor) preincubation for 30 min before TES. Figures D, E, F, G and H illustrate statistical analysis of each salbutamol concentration used, including experiments with Actin D. As can be seen in all these figures Actin D reverses TES effect on salbutamol increase of the IK^+ . Notice in figure D that TES alone induces a significant increment of the IK^+ which was annulled by Actin D. These results further demonstrate a genomic effect of TES on airway smooth muscle. Insets show original recordings. Please notice that in figures D-H, different Y-axis scales are used in order to clearly show statistical significances. Symbols represent mean \pm S.E.M. In figure D, * $p < 0.05$ comparing Actino D + TES (\square) vs TES groups (Δ) and † $p < 0.05$ comparing Control (\bullet) vs TES (Δ) groups. For the remaining figures (E-H) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparing Actino D + TES + Sal (\square) vs TES + Sal (Δ) groups, † $p < 0.05$, †† $p < 0.01$ comparing Sal (\bullet) vs TES + Sal (Δ) groups, $n = 6$.

voltage-dependent Ca^{2+} channels, inositol triphosphate receptors, and store-operated Ca^{2+} channels already found in ASM (Montaño et al., 2014, 2018; Perusquía et al., 2015) might also be a target for the TES chronic effects most probably inducing a downregulation of these proteins and therefore contributing to the decrease of the excitation

contraction coupling of this tissue. Nevertheless, this hypothesis warrants more investigation.

It has been extensively documented that plasmatic androgen concentrations, play an important role in asthma symptom severity that decrease when young asthmatic boys reach puberty. Contrastingly,

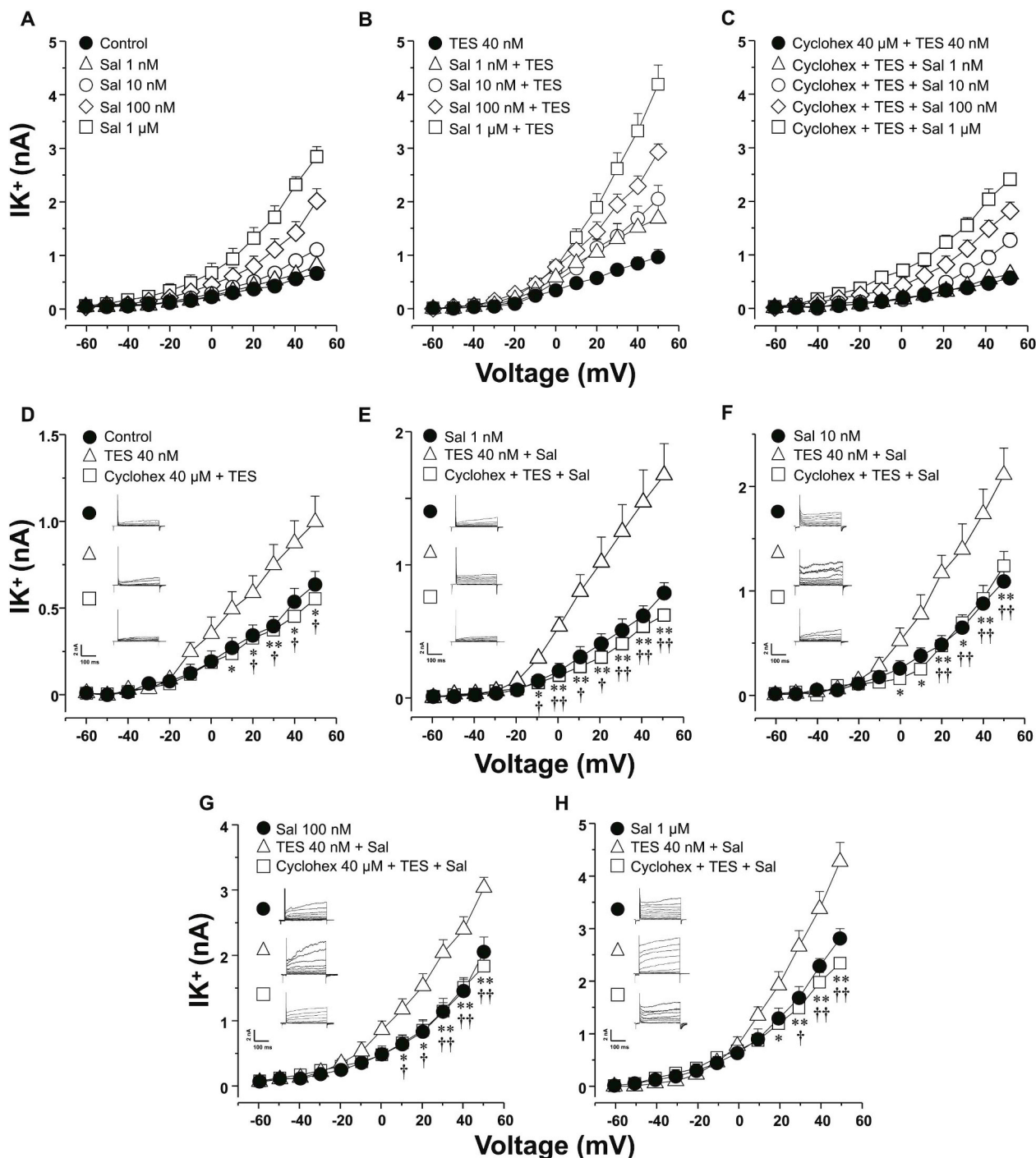


Fig. 7. Cycloheximide abolished testosterone (TES, 40 nM for 48 h) augmented IK^+ induced by salbutamol (Sal) through a genomic action. **A)** Different concentrations of Sal perfusion to tracheal myocytes, showed a concentration-dependent rise in IK^+ . **B)** Myocytes incubated with TES showed a higher IK^+ , while **C)** illustrates that this effect was abolished by cycloheximide (Cyclohex, a protein synthesis inhibitor) preincubation for 30 min before TES. Figures **D, E, F, G** and **H)** illustrate statistical analysis of each Sal concentration used, including experiments with Cyclohex. As can be seen in all these figures, Cyclohex reverses TES effect on salbutamol increase of the IK^+ . Notice that TES alone induces a significant increment of the IK^+ which was annulated by Cyclohex (**D**). These results also demonstrate a genomic effect of TES on airway smooth muscle. Insets show original recordings. Please notice that in figures **D-H**, different Y-axis scales are used in order to clearly show statistical significances. Symbols represent mean \pm S.E.M., $n = 6$. In figure **D**, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparing Cyclohex + TES (\square) vs TES groups (Δ) and $\dagger p < 0.05$ comparing Control (\bullet) vs TES (Δ) groups. For the remaining figures (**E-H**) * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparing Cyclohex + TES + Sal (\square) vs TES + Sal (Δ) groups, $\dagger p < 0.05$, $\dagger\dagger p < 0.01$ comparing Sal (\bullet) vs TES + Sal (Δ) groups.

symptoms worsen in girls of the same age (de Marco et al., 2000; Townsend et al., 2012; Zannoli and Morgese, 1997). Therefore, higher TES plasmatic concentrations (6–50 nM) in teenage boys are probably related to lower asthmatic state (Canguven and Albayrak, 2011; Muller

et al., 2011; Townsend et al., 2012). This tendency prevails during the men lifetime and decreases in old age. Thus, the augmented expression of the β_2 -AR by TES may contribute to this enhanced health state in males.

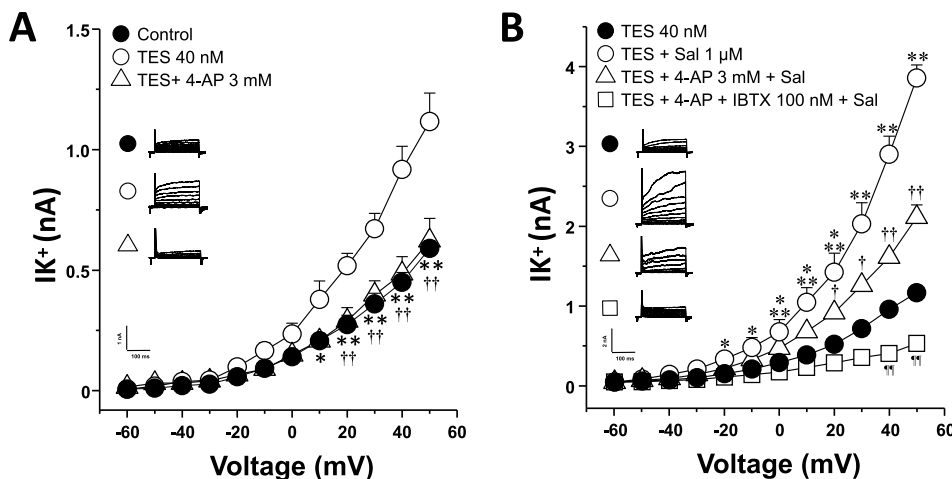


Fig. 8. Voltage dependent delayed rectifier K^+ and Ca^{2+} activated K^+ channels are the main proteins involved in the testosterone (TES, 40 nM for 48 h) augmented IK^+ induced by depolarizing pulses and by salbutamol (Sal) in guinea pig tracheal myocytes. **A)** The TES increase in IK^+ induced by depolarizing pulses was blocked by 4-aminopyridine (4-AP, $n = 6$), a delayed rectifier K^+ channels blocker. **B)** The androgen increase in the IK^+ induced by Sal was abolished by 4-AP and iberiotoxin (IBTX, $n = 8$), a specific blocker of the high-conductance Ca^{2+} activated K^+ channels. These results indicate that TES is augmenting the expression of both channels. Symbols represent mean \pm S.E.M. In figure A, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ comparing TES+4-AP (Δ) vs TES (o) groups. †† $p < 0.01$, comparing Control (\bullet) vs TES (o) group. In figure B, at -20 mV, * $p < 0.05$ when comparing TES + Sal (o) vs TES+4-AP + IBTX + Sal (\square) (o) vs TES+4-AP + IBTX + Sal (\square) (o) vs TES (o) vs TES+4-AP + Sal (Δ) and TES (\bullet) groups. At 0 mV, * $p < 0.05$ when comparing TES + Sal (o) vs TES (\bullet) group and ** $p < 0.01$ comparing TES + Sal (o) vs TES+4-AP + IBTX + Sal (\square). At 10 mV, * $p < 0.05$ comparing TES + Sal (o) vs TES+4-AP + Sal (Δ) and ** $p < 0.01$ comparing TES + Sal (o) vs TES+4-AP + IBTX + Sal (\square) and TES (\bullet) groups. At 20 mV, * $p < 0.05$ comparing TES + Sal (o) vs TES+4-AP + Sal (Δ) and ** $p < 0.01$ comparing TES + Sal (o) vs TES+4-AP + IBTX + Sal (\square) and TES (\bullet) groups. † $p < 0.05$, comparing TES+4-AP + Sal (Δ) vs TES (\bullet) group. At 30 mV, ** $p < 0.01$ comparing TES + Sal (o) vs TES+4-AP + Sal (Δ), TES (\bullet) and TES+4-AP + IBTX + Sal (\square) groups. † $p < 0.05$, comparing TES+4-AP + Sal (Δ) vs TES (\bullet) group. At 40 mV, ** $p < 0.01$ comparing TES + Sal (o) vs TES+4-AP + Sal (Δ), TES (\bullet) and TES+4-AP + IBTX + Sal (\square) groups. †† $p < 0.01$, comparing TES+4-AP + Sal (Δ) vs TES (\bullet) group and ††† $p < 0.01$ between TES (\bullet) vs TES+4-AP + IBTX + Sal (\square) group. At 50 mV, ** $p < 0.01$ comparing TES + Sal (o) vs TES+4-AP + Sal (Δ), TES (\bullet) and TES+4-AP + IBTX + Sal (\square) groups. †† $p < 0.01$, comparing TES+4-AP + Sal (Δ) vs TES (\bullet) group and ††† $p < 0.01$ between TES (\bullet) vs TES+4-AP + IBTX + Sal (\square) group. In Figure A, one-way analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparison test was used and in B one-way analysis of variance followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test.

group. At -10 mV, * $p < 0.05$ comparing TES + Sal (o) vs TES+4-AP + IBTX + Sal (\square) and TES (\bullet) groups. At 0 mV, * $p < 0.05$ when comparing TES + Sal (o) vs TES (\bullet) group and ** $p < 0.01$ comparing TES + Sal (o) vs TES+4-AP + IBTX + Sal (\square). At 10 mV, * $p < 0.05$ comparing TES + Sal (o) vs TES+4-AP + Sal (Δ) and ** $p < 0.01$ comparing TES + Sal (o) vs TES+4-AP + IBTX + Sal (\square) and TES (\bullet) groups. At 20 mV, * $p < 0.05$ comparing TES + Sal (o) vs TES+4-AP + Sal (Δ) and ** $p < 0.01$ comparing TES + Sal (o) vs TES+4-AP + IBTX + Sal (\square) and TES (\bullet) groups. † $p < 0.05$, comparing TES+4-AP + Sal (Δ) vs TES (\bullet) group. At 30 mV, ** $p < 0.01$ comparing TES + Sal (o) vs TES+4-AP + Sal (Δ), TES (\bullet) and TES+4-AP + IBTX + Sal (\square) groups. † $p < 0.05$, comparing TES+4-AP + Sal (Δ) vs TES (\bullet) group. At 40 mV, ** $p < 0.01$ comparing TES + Sal (o) vs TES+4-AP + Sal (Δ), TES (\bullet) and TES+4-AP + IBTX + Sal (\square) groups. †† $p < 0.01$, comparing TES+4-AP + Sal (Δ) vs TES (\bullet) group and ††† $p < 0.01$ between TES (\bullet) vs TES+4-AP + IBTX + Sal (\square) group. At 50 mV, ** $p < 0.01$ comparing TES + Sal (o) vs TES+4-AP + Sal (Δ), TES (\bullet) and TES+4-AP + IBTX + Sal (\square) groups. †† $p < 0.01$, comparing TES+4-AP + Sal (Δ) vs TES (\bullet) group and ††† $p < 0.01$ between TES (\bullet) vs TES+4-AP + IBTX + Sal (\square) group. In Figure A, one-way analysis of variance followed by Dunnett's multiple comparison test was used and in B one-way analysis of variance followed by Student-Newman-Keuls multiple comparison test.

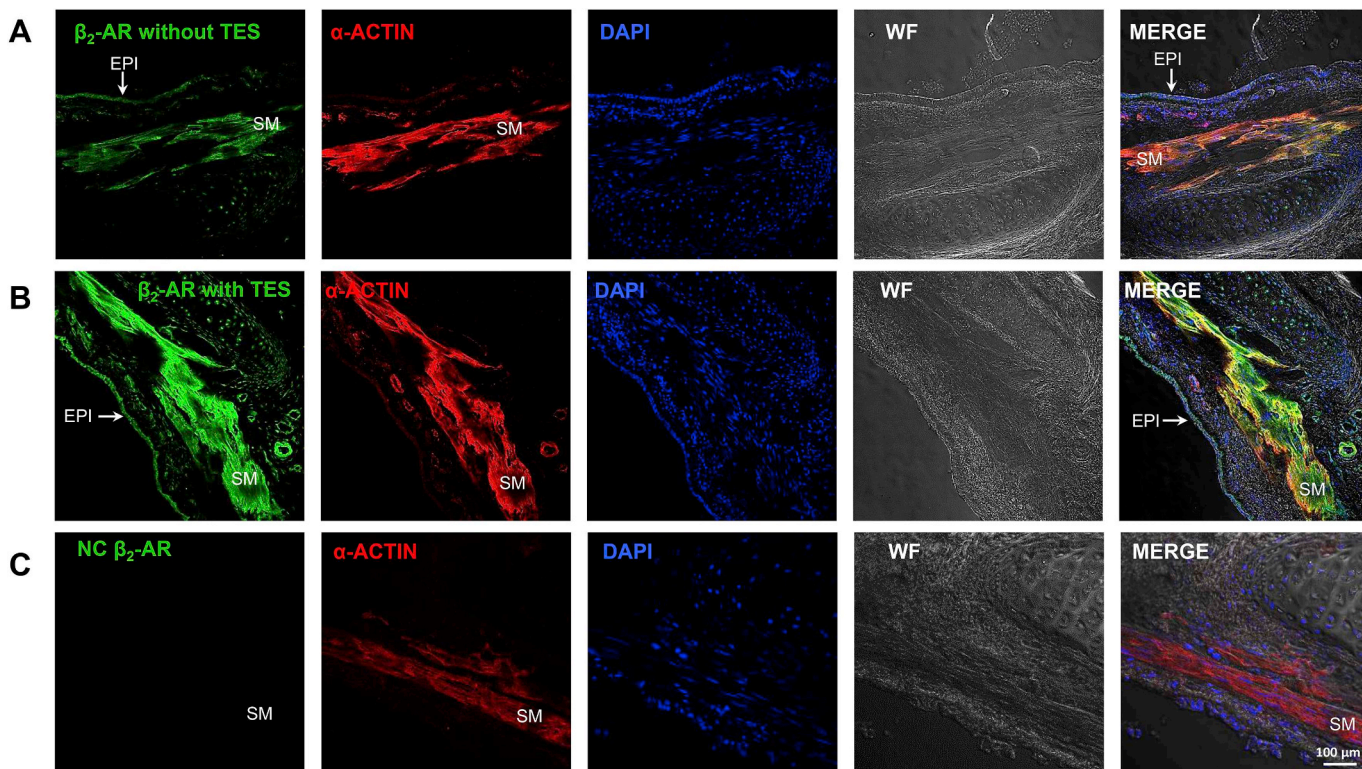


Fig. 9. The testosterone (TES) induced genomic effect on salbutamol response increase is related to β_2 adrenergic receptor (β_2 -AR) upregulation in guinea pig airway smooth muscle. The first column illustrates immunofluorescence for the β_2 -AR in guinea pig tracheal preparation and is depicted in green on airway smooth muscle in tissues without **(A)** and with **(B)** 40 nM of TES incubation for 48 h. Notice the increment in the fluorescence when tissues were exposed to TES. **C)** The absence of the primary antibody for the β_2 -AR showed no fluorescence (NC = negative control). Smooth muscle α -actin (red) is depicted in the second column and the third column illustrates cell nuclei (blue). The fourth column presents white field (WF). Last column shows merged images of the former four panels. Notice that the yellow color implies co-localization of the β_2 -AR and α -actin, increased in **B** merged image. EPI = epithelium, SM = smooth muscle.

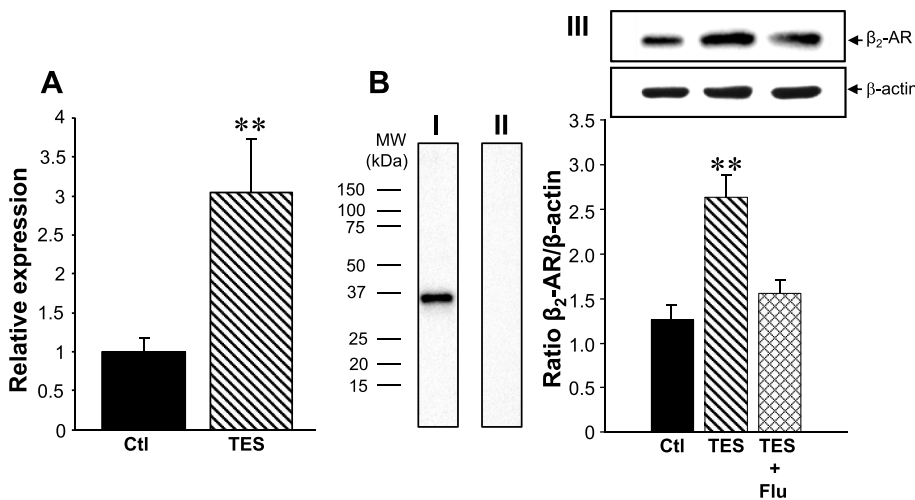


Fig. 10. Testosterone (TES, 40 nM for 48 h) increases β_2 -adrenergic receptor (β_2 -AR) in guinea pig tracheal smooth muscle. **A)** Bar graph illustrating the relative expression of β_2 -AR mRNA as detected by qPCR analyzed with the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method and its significant increase induced by TES, $n = 4$. **B)** Western blot analysis of β_2 -AR expression; (I) shows the blot illustrating one band around 37 kDa corresponding to β_2 -AR and (II) the negative control without antibody. **(III)** Densitometry results illustrating that the β_2 -AR expression is augmented by TES and reduced with flutamide pre-treatment 30 min before TES. A representative Western blot is included at the top of the bar graph. ** $p < 0.01$, $n = 3$. Bars represent mean \pm S.E.M. Ctl = control.

5. Conclusions

Our results show that chronic ASM exposure to a physiological TES concentration (nanomolar) promotes β_2 -AR, K_v , and K_{Ca} upregulation and consequently favors the response to β_2 adrenergic agonists, extensively used as bronchodilators in asthma.

Funding

This study was partly supported by grants from Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), Universidad Nacional Autónoma de México IN204319 and Consejo Nacional de Ciencia y

Tecnología, México 137725 to LM Montañó and IN209520 to V Díaz-Hernández.

CRediT authorship contribution statement

Abril Carbajal-García: Methodology, Data curation, Formal analysis. **Jorge Reyes-García:** Methodology, Data curation, Formal analysis. **María F. Casas-Hernández:** Methodology, Data curation, Formal analysis. **Edgar Flores-Soto:** Conceptualization. **Verónica Díaz-Hernández:** Methodology, Data curation, Formal analysis. **Héctor Solís-Chagoyán:** Methodology. **Bettina Sommer:** Writing - original draft. **Luis M. Montañó:** Supervision, Resources, Validation, Formal

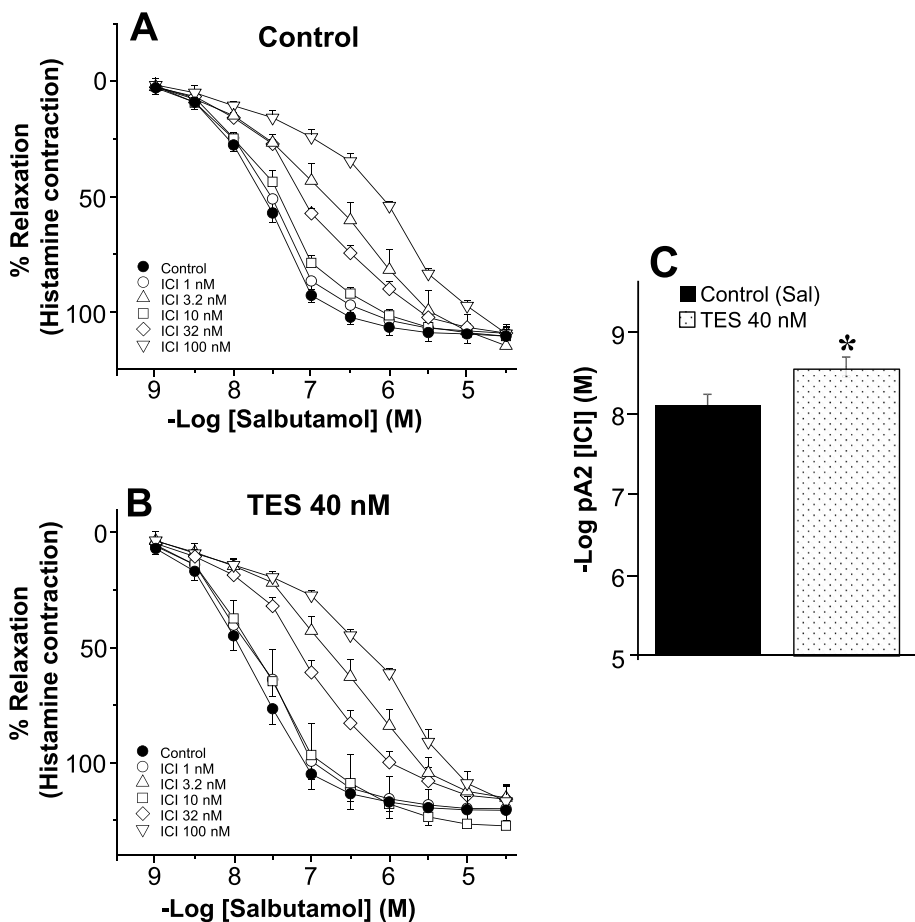


Fig. 11. Testosterone (TES, 40 nM for 48 h) decreases ICI 118.551 pA2 value in guinea pig airway smooth muscle, implying the augmented β_2 -AR expression which mediates the increased salbutamol (Sal) relaxation. **A)** Salbutamol cumulative concentration curve showed a rightward shift when ICI 118.551 (ICI), a selective β_2 -AR antagonist, was added; this displacement was ICI concentration dependent (1, 3.2, 10, 32 and 100 nM). **B)** TES incubation shifted the Sal cumulative concentration curve to the left ($IC_{50} = 25.6 \pm 5.4$ nM, $n = 7$) as compared with the curve without TES ($IC_{50} = 39.9 \pm 3.1$ nM, $p = 0.05$, $n = 6$). ICI also shifted the Sal concentration curve to the right in a concentration dependent fashion. With the IC_{50} values of each curve in A and B, the pA2 value was calculated. **C)** pA2 values were obtained with the Schild's equation; this value is an indirect measure of antagonist's affinity for its receptors and in this study, provides information about the role of the β_2 -AR on the augmented Sal response. The bar graph illustrates that pA2 value was significantly lower ($p < 0.05$) for TES treated tissues when compared with the control (Sal) group without androgen. Symbols and bars represent mean \pm S.E.M. * $p < 0.05$.

analysis, Writing - review & editing.

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no conflict of interest or financial relationships that may have influenced the study.

Acknowledgments

This paper's publication is required for the accomplishment of the Ph.D. degree from Abril Carbajal García who is grateful to the Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México, for the instruction received during her studies. She received a fellowship from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, Mexico (CONACYT, application # 2018-000068-02NACF-17950; CVU 826027). Jorge Reyes-García is grateful to Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM for the support to obtain a CONACYT (EPE 2018–2019) fellowship. The authors acknowledge Alejandro Marmolejo and Miguel Tapia Rodríguez for their technical assistance.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.mce.2020.110801>.

References

- Adda, S., Fleischmann, B.K., Freedman, B.D., Yu, M., Hay, D.W., Kotlikoff, M.I., 1996. Expression and function of voltage-dependent potassium channel genes in human airway smooth muscle. *J. Biol. Chem.* 271, 13239–13243.
- Berg, A.H., Rice, C.D., Rahman, M.S., Dong, J., Thomas, P., 2014. Identification and characterization of membrane androgen receptors in the ZIP9 zinc transporter subfamily: I. Discovery in female atlantic croaker and evidence ZIP9 mediates testosterone-induced apoptosis of ovarian follicle cells. *Endocrinology* 155, 4237–4249.
- Birrell, M.A., Bonvini, S.J., Wortley, M.A., Buckley, J., Yew-Booth, L., Maher, S.A., Dale, N., Dubuis, E.D., Belvisi, M.G., 2015. The role of adenylyl cyclase isoform 6 in β -adrenoceptor signalling in murine airways. *Br. J. Pharmacol.* 172, 131–141.
- Bordallo, J., de Boto, M.J., Meana, C., Velasco, L., Bordallo, C., Suarez, L., Cantabrana, B., Sanchez, 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. *Eur. J. Pharmacol.* 601, 154–162.
- Boyle, J.P., Tomasic, M., Kotlikoff, M.I., 1992. Delayed rectifier potassium channels in canine and porcine airway smooth muscle cells. *J. Physiol.* 447, 329–350.
- Brueggemann, L.I., Cribbs, L.L., Schwartz, J., Wang, M., Kouta, A., Byron, K.L., 2018. Mechanisms of PKA-dependent potentiation of Kv7.5 channel activity in human airway smooth muscle cells. *Int. J. Mol. Sci.* 19.
- Campos-Bedolla, P., Vargas, M.H., Calixto, E., Segura, P., Mendoza-Patino, N., Figueroa, A., Flores-Soto, E., Barajas-Lopez, C., Montaño, L.M., 2006. α -methyl-5-HT₂ receptor agonist, stimulates β_2 -adrenoceptors in Guinea pig airway smooth muscle. *Pharmacol. Res.* 54, 468–473.
- Campos-Bedolla, P., Vargas, M.H., Segura, P., Carbajal, V., Calixto, E., Figueroa, A., Flores-Soto, E., Barajas-Lopez, C., Mendoza-Patino, N., Montaño, L.M., 2008. Airway smooth muscle relaxation induced by 5-HT_{2A} receptors: role of Na⁺/K⁺-ATPase pump and Ca²⁺-activated K⁺ channels. *Life Sci.* 83, 438–446.
- Canguen, O., Albayrak, S., 2011. Do low testosterone levels contribute to the pathogenesis of asthma? *Med. Hypotheses* 76, 585–588.
- Clemmensen, C., Smajilovic, S., Wellendorph, P., Brauner-Osborne, H., 2014. The GPCR, class C, group 6, subtype A (GPCR6A) receptor: from cloning to physiological function. *Br. J. Pharmacol.* 171, 1129–1141.
- Chavez, J., Segura, P., Vargas, M.H., Arreola, J.L., Flores-Soto, E., Montaño, L.M., 2007. Paradoxical effect of salbutamol in a model of acute organophosphates intoxication in Guinea pigs: role of substance P release. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 292, L915–L923.
- de Marco, R., Locatelli, F., Sunyer, J., Burney, P., 2000. Differences in incidence of reported asthma related to age in men and women. A retrospective analysis of the data of the European Respiratory Health Survey. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 162, 68–74.
- Espinoza, J., Montaño, L.M., Perusquia, M., 2013. Nongenomic bronchodilating action elicited by dehydroepiandrosterone (DHEA) in a Guinea pig asthma model. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 138, 174–182.
- Evasovic, J.M., Singer, C.A., 2019. Regulation of IL-17A and implications for TGF- β 1 co-modulation of airway smooth muscle remodeling in severe asthma. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 316, 843–868.
- Fahy, J.V., 2015. Type 2 inflammation in asthma—present in most, absent in many. *Nat. Rev. Immunol.* 15, 57–65.
- Feletou, M., 2009. Calcium-activated potassium channels and endothelial dysfunction: therapeutic options? *Br. J. Pharmacol.* 156, 545–562.
- Flores-Soto, E., Reyes-García, J., Carbajal-García, A., Campuzano-Gonzalez, E., Perusquia, M., Sommer, B., Montaño, L.M., 2017. Sex steroids effects on Guinea pig airway smooth muscle tone and intracellular Ca²⁺ basal levels. *Mol. Cell. Endocrinol.* 439, 444–456.
- Foster, P.S., Goldie, R.G., Paterson, J.W., 1983. Effect of steroids on β -adrenoceptor-mediated relaxation of pig bronchus. *Br. J. Pharmacol.* 78, 441–445.
- Fuseini, H., Newcomb, D.C., 2017. Mechanisms driving gender differences in asthma. *Curr. Allergy Asthma Rep.* 17, 19.
- Fuseini, H., Yung, J.A., Cephus, J.Y., Zhang, J., Goleniewska, K., Polosukhin, V.V., Peebles Jr., R.S., Newcomb, D.C., 2018. Testosterone decreases house dust mite-induced type 2 and IL-17A-mediated airway inflammation. *J. Immunol.* 201, 1843–1854.
- Huang, J.C., Garcia, M.L., Reuben, J.P., Kacsorowski, G.J., 1993. Inhibition of β -adrenoceptor agonist relaxation of airway smooth muscle by Ca²⁺-activated K⁺ channel blockers. *Eur. J. Pharmacol.* 235, 37–43.
- Jankovic, S.M., Milovanovic, D.R., Jankovic, S.V., 1999. Schild's equation and the best estimate of pA2 value and dissociation constant of an antagonist. *Croat. Med. J.* 40, 67–70.
- Johnson, M., 1998. The β -adrenoceptor. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 158, S146–S153.
- Jones, T.R., Charette, L., Garcia, M.L., Kaczorowski, G.J., 1990. Selective inhibition of relaxation of Guinea-pig trachea by charybdotoxin, a potent Ca²⁺-activated K⁺ channel inhibitor. *J. Pharmacol. Exp. Therapeut.* 255, 697–706.
- Kalidhindi, R.S.R., Katragadda, R., Beauchamp, K.L., Pabelick, C.M., Prakash, Y.S., Sathish, V., 2019. Androgen receptor-mediated regulation of intracellular calcium in human airway smooth muscle cells. *Cell. Physiol. Biochem.* 53, 215–228.
- Khammy, M.M., Kim, S., Bentzen, B.H., Lee, S., Choi, I., Aalkjaer, C., Jepps, T.A., 2018. 4-Aminopyridine: a pan voltage-gated potassium channel inhibitor that enhances Kv 7.4 currents and inhibits noradrenaline-mediated contraction of rat mesenteric small arteries. *Br. J. Pharmacol.* 175, 501–516.
- Kouloumenta, V., Hatziefthimiou, A., Paraskeva, E., Gourgoulianis, K., Molyvdas, P.A., 2006. Non-genomic effect of testosterone on airway smooth muscle. *Br. J. Pharmacol.* 149, 1083–1091.
- Laffont, S., Blanquart, E., Savignac, M., Cenac, C., Laverny, G., Metzger, D., Girard, J.P., Belz, G.T., Pelletier, L., Seillet, C., Guery, J.C., 2017. Androgen signaling negatively controls group 2 innate lymphoid cells. *J. Exp. Med.* 214, 1581–1592.
- Lambrecht, B.N., Hammad, H., 2015. The immunology of asthma. *Nat. Immunol.* 16, 45–56.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{- $\Delta\Delta$ CT} Method. *Methods* 25, 402–408.
- Lopez-Canales, O., Castillo-Hernandez, M.D.C., Vargas-Robles, H., Rios, A., Lopez-Canales, J., Escalante, B., 2018. Androgens mediate β -adrenergic vasorelaxation impairment using adenylyl Cyclase. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 71, 147–154.
- Lucas-Herald, A.K., Alves-Lopes, R., Montezano, A.C., Ahmed, S.F., Touyz, R.M., 2017. Genomic and non-genomic effects of androgens in the cardiovascular system: clinical implications. *Clin. Sci.* 131, 1405–1418.
- Montaño, L.M., Cruz-Valderrama, J.E., Figueroa, A., Flores-Soto, E., Garcia-Hernandez, L.M., Carbajal, V., Segura, P., Mendez, C., Diaz, V., Barajas-Lopez, C., 2011. Characterization of P2Y receptors mediating ATP induced relaxation in Guinea pig airway smooth muscle: involvement of prostaglandins and K⁺ channels. *Pflügers Archiv* 462, 573–585.
- Montaño, L.M., Espinoza, J., Flores-Soto, E., Chavez, J., Perusquia, M., 2014. Androgens are bronchoactive drugs that act by relaxing airway smooth muscle and preventing bronchospasm. *J. Endocrinol.* 222, 1–13.
- Montaño, L.M., Flores-Soto, E., Reyes-García, J., Diaz-Hernandez, V., Carbajal-García, A., Campuzano-Gonzalez, E., Ramirez-Salinas, G.L., Velasco-Velazquez, M.A., Sommer, B., 2018. Testosterone induces hyporesponsiveness by interfering with IP₃ receptors in Guinea pig airway smooth muscle. *Mol. Cell. Endocrinol.* 473, 37–30.
- Muller, D.C., Giles, G.G., Bassett, J., Morris, H.A., Manning, J.T., Hopper, J.L., English, D.R., Severi, G., 2011. Second to fourth digit ratio (2D:4D) and concentrations of circulating sex hormones in adulthood. *Reprod. Biol. Endocrinol.* 9, 57.
- Perusquia, M., Flores-Soto, E., Sommer, B., Campuzano-Gonzalez, E., Martinez-Villa, I., Martínez-Banderas, A.I., Montaño, L.M., 2015. Testosterone-induced relaxation involves L-type and store-operated Ca²⁺ channels blockade, and PGE₂ in Guinea pig airway smooth muscle. *Pflügers Archiv* 467, 767–777.
- Pi, M., Kapoor, K., Wu, Y., Ye, R., Senogles, S.E., Nishimoto, S.K., Hwang, D.J., Miller, D.D., Narayanan, R., Smith, J.C., Baudry, J., Quarles, L.D., 2015. Structural and functional evidence for testosterone activation of GPR6A in peripheral tissues. *Mol. Endocrinol.* 29, 1759–1773.
- Salt, P.J., 1972. Inhibition of noradrenaline uptake 2 in the isolated rat heart by steroids, clonidine and methoxylated phenylethylamines. *Eur. J. Pharmacol.* 20, 329–340.
- Stapulis, R., Kolli, S., Deutscher, M.P., 1997. Efficient mammalian protein synthesis requires an intact F-actin system. *J. Biol. Chem.* 272, 24980–24986.
- Sun, J., Fu, L., Tang, X., Han, Y., Ma, D., Cao, J., Kang, N., Ji, H., 2011. Testosterone modulation of cardiac β -adrenergic signals in a rat model of heart failure. *Gen. Comp. Endocrinol.* 172, 518–525.
- Tanaka, Y., Yamashita, Y., Yamaki, F., Horinouchi, T., Shigenobu, K., Koike, K., 2003. MaxiK channel mediates β_2 -adrenoceptor-activated relaxation to isoprenaline through cAMP-dependent and -independent mechanisms in Guinea-pig tracheal smooth muscle. *J. Smooth Muscle Res.* 39, 205–219.
- Thomas, P., Converse, A., Berg, H.A., 2018. ZIP9, a novel membrane androgen receptor and zinc transporter protein. *Gen. Comp. Endocrinol.* 257, 130–136.
- Townsend, E.A., Miller, V.M., Prakash, Y.S., 2012. Sex differences and sex steroids in lung health and disease. *Endocr. Rev.* 33, 1–47.
- Wang, Z.W., Kotlikoff, M.I., 1996. Activation of KCa channels in airway smooth muscle cells by endogenous protein kinase A. *Am. J. Physiol.* 271, L100–L105.
- Yung, J.A., Fuseini, H., Newcomb, D.C., 2018. Hormones, sex, and asthma. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 120, 488–494.
- Zannolli, R., Morgese, G., 1997. Does puberty interfere with asthma? *Med. Hypotheses* 48, 27–32.
- Zarazua, A., Gonzalez-Arenas, A., Ramirez-Velez, G., Bazan-Perkins, B., Guerra-Araiza, C., Campos-Lara, M.G., 2016. Sexual dimorphism in the regulation of estrogen, progesterone, and androgen receptors by sex steroids in the rat airway smooth muscle cells. *Internet J. Endocrinol.* 2016, 8423192.