



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTONOMA DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**"ACCION VASODILATADORA DE DEHIDROEPIANDROS-
TERONA EN LA AORTA AISLADA DE RATA"**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA**

P R E S E N T A:

MAYRA SILVA MIRANDA



MEXICO, D.F.



2002

**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**



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.

Autorizo a la Dirección General de Estudios de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: Silva Miranda Mayra

FECHA: 04-October-2002

FIRMA: Silva Miranda Mayra

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

H. JURADO ASIGNADO:

Presidente: Q. F. B. Martha Leticia Jiménez Pardo

Vocal: Dr. Andrés Navarrete Castro

Secretario: Dra. Mercedes Perusquía Nava

1er Suplente: M. en C. Alejandro Ortiz Osornio

2º Suplente: Dr. Oscar Armando Pérez Méndez

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Endocrinología de la Reproducción, perteneciente al Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM.

Vo. Bº. DEL ASESOR DEL TEMA:



Dra. Mercedes Perusquía Nava

SUSTENTANTE:



Mayra Silva Miranda

AGRADECIMIENTOS

Le agradezco mucho el apoyo, conocimientos y consejos que no sólo me ayudaron a concretar un sueño, sino que me servirán para que en cada momento de mi vida profesional busque y sea siempre de las mejores. Gracias Dra. Mercedes Perusquía Nava.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas por prestar sus instalaciones en el desarrollo de mi tesis.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, en especial a la Facultad de Química en la cual construí los cimientos de mi futuro y recibí la mejor de las educaciones.

A mis profesores, de los cuales aprendí tantas cosas no solo a nivel académico, gracias por transmitirme sus conocimientos.

A la Biól. Erika Navarrete Monroy por su apoyo técnico en el desarrollo de mi servicio social y esta tesis.

Al Biól. David Barrera Hernández por los consejos que tanto me sirvieron durante mi estancia en el laboratorio. David: eres de las personas que transmiten lo que saben sin miedo a la competencia, estoy realmente agradecida contigo.

A Rosalba Toledo Torres por que juntas aprendimos muchas cosas a nivel académico y personal. Gracias por tu amistad y recuerda que lo importante en la vida es la actitud que tengas frente a ella.

A Irma Rodríguez García por que sin su apoyo me hubiese costado el doble realizar la presente tesis y además, por brindarme lo mejor que tiene: su amistad. Irma, eres de las personas que uno se lleva en el corazón y de las que nunca me voy a olvidar.

A Moisés Antón Castillo, mi compañero de carrera y laboratorio: espero que culminen tus sueños de la mejor manera. Recuerda que las cosas difíciles en la vida son las que más se disfrutan.

A mi compañera de laboratorio Patricia Elizabeth López Bistrain, espero que tu vida personal y profesional sea un éxito. Mucha suerte.

DEDICATORIAS

Hace dos años te prometí esta tesis, pues bien, llego el día. Aunque soy de las personas que necesitan sentir para creer, sé que hoy y siempre estas a mi lado, fue tu promesa y estoy segura de que la cumples. Gracias "abuelito" Felipe.

Existen en mi vida dos personas a las que admiro, respeto, quiero y amo. Esas personas me han ayudado desde el primer día de mi vida y siguen y seguirán haciéndolo. Papás, les quiero agradecer tanto, que esta tesis no es nada comparado con lo mucho que les debo, pero acéptenlo como un pago a sus sacrificios y amor que han depositado en mí. Créanme que cada día lucharé por ser la mejor y por no defraudarlos. Los amo.

A mis hermanos Nelly y Juan porque lo más sagrado que tengo en la vida es mi familia, les prometo que nunca les fallaré.

A mi mejor amiga y confidente, Claudia, le agradezco a Dios que hayas nacido por que sin tí mi vida hubiera sido distinta.

A mi cuñado Noe Díaz, por ese cariño y por el placer de contarte entre mi familia.

A mis sobrinos: Valeria eres ese angelito que me hizo volver a creer que Dios existe, te amo y a mi futuro sobrino(a) que sin importar el sexo que sea, te amo desde el primer día que supe que vendrías al mundo.

Samuel, no tengo palabras para expresarte lo agradecida que estoy contigo por estos años de cariño, comprensión, apoyo y amor, te amo y sabes que siempre lo haré, gracias por estar conmigo.

A mis amigos que tanto quiero y que han hecho de mí una mujer muy feliz: Pedro, Jorge, Rubén, Fernando M, Rafael, Francisco J, Elly, Cristina, Cecilia, Leticia, Andrea, Alejandra y todos los que se me olvidan en este escrito pero jamás en el corazón, nunca les fallaré.

ÍNDICE

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	
A.- Hormonas esteroides y disfunción cardiovascular	2
B.- Dehidroepiandrosterona (DHEA) como agente protector del riesgo cardiovascular	
a) DHEA y su acción en el sistema cardiovascular	4
b) Generalidades de DHEA	7
II. JUSTIFICACIÓN	12
III.- HIPÓTESIS	14
IV.- OBJETIVOS	15
V.- METODOLOGÍA	
A.- Modelo biológico	16
B.- Sistema de registro	17
C.- Comprobación farmacológica de la presencia del endotelio	19
D.- Protocolo experimental	
1. Cuantificación del efecto vasodilatador de DHEA en presencia y ausencia del endotelio vascular	19
2. Comparación de la potencia relajante de DHEA con un estrógeno, un andrógeno y dos derivados 5-reducidos	21
3. Determinación del efecto relajante de DHEA a través de óxido nítrico	21
4. Efecto de cicloheximida y actinomicina D sobre la relajación inducida por DHEA	22

E.- Análisis de los datos	22
F.- Sustancias utilizadas	23
VI.- RESULTADOS	
1. Efecto de DHEA en preparaciones con y sin endotelio	24
2. Comparación de la potencia relajante de DHEA con un estrógeno, un andrógeno y dos derivados 5-reducidos	29
3. Efecto de DHEA en presencia del inhibidor de la óxido nítrico sintetasa (L-NAME)	31
4. Efecto de DHEA en presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas (cicloheximida) y de la transcripción (actinomicina D)	31
VII.- DISCUSIÓN	
a) Potencia y Relación Estructura-Función	34
b) Mecanismo de acción	35
c) Implicaciones fisiológicas	37
VIII.- CONCLUSIONES	39
IX.- REFERENCIAS	40

Los datos de esta tesis fueron parcialmente presentados en:

VII Congreso de Carteles "Lino Díaz de León"

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM, 15 de Junio del 2001.

"Papel del endotelio en el efecto vasodilatador de dehidroepiandrosterona". Silva, M., Navarrete, E. y Perusquía, M.

XLIV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas.

Ciudad de Monterrey, N. L., del 26 al 30 de agosto del 2001.

"Papel del endotelio en el efecto vasodilatador de dehidroepiandrosterona". Silva, M., Navarrete, E. y Perusquía, M.

XLV Congreso Nacional de Ciencias Fisiológicas

Ciudad de Colima, del 8 al 12 de septiembre del 2002.

"Caracterización del efecto vasodilatador de dehidroepiandrosterona". Silva, M., Navarrete, E. y Perusquía, M.

DISTINCIONES:

Finalista del VII Congreso de Carteles."Dr. Lino Díaz de León", realizado en el Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM. 15 de Junio, 2001. Con el trabajo: "Papel del endotelio en el efecto vasodilatador de dehidroepiandrosterona". Silva, M., Navarrete, E. y Perusquía, M.

RESUMEN DE TESIS

"ACCIÓN VASODILATADORA DE DEHIDROEPIANDROSTERONA EN LA AORTA AISLADA DE RATA".

Los estrógenos ejercen un importante efecto "protector" en el sistema cardiovascular, principalmente por inducir vasodilatación. También se ha reportado que algunas progestinas y andrógenos producen un marcado efecto vasodilatador no genómico, endotelio independiente. Por otro lado, el esteroide adrenal, dehidroepiandrosterona (DHEA) ha sido asociado con el aumento de la longevidad y uno de sus principales atributos es disminuir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (ECV). El objetivo de este estudio fue determinar la potencia vasodilatadora de DHEA en relación a la ejercida por sus metabolitos (andrógenos y estrógenos) y caracterizar su tipo de acción. Se utilizaron anillos aórticos de ratas macho adultas y la actividad se registró mediante la técnica de registro isométrico. El efecto de DHEA fue observado en preparaciones con y sin endotelio sobre la contracción inducida por noradrenalina (NA 0.3 μ M), a diferentes concentraciones (3-300 μ M), probadas independientemente y de manera no acumulativa. En forma colateral, se evaluó el efecto de DHEA en presencia del inhibidor de la óxido nítrico sintetasa (L-NAME 10 μ M), de la síntesis de proteínas (cicloheximida 40 μ M) y de la transcripción (actinomicina D 10 μ M). Los resultados obtenidos muestran que DHEA ejerce un efecto vasodilatador rápido (~1 min) y reversible dependiente de la concentración, que no fue diferente en ausencia del endotelio y no modificado por L-NAME, cicloheximida o actinomicina D. La relación de la potencia relajante fue: 5β -DHT \geq DHEA $>$ 5α -DHT $>$ P₄ \geq 17β -E₂ = T₄. Los datos sugieren que la vasodilatación de DHEA es una acción no genómica e independiente del endotelio vascular, no mediada por óxido nítrico. Se concluye que el papel "protector" atribuido a DHEA en el desarrollo de ECV, podría deberse a su capacidad de regular el tono vascular y de transformarse a otros compuestos, que podrían sinergizar o potenciar la acción de su precursor.

I. INTRODUCCIÓN

A. *Hormonas esteroideas y disfunción cardiovascular.*

En la actualidad, uno de los principales problemas de mortalidad mundial lo representan las enfermedades cardiovasculares (ECV). En México, las recientes estadísticas del censo del año 2000, revelaron que la primer causa de muerte en hombres son las ECV, mientras que en las mujeres son la segunda causa de mortalidad, precedida por la Diabetes Mellitus (INEGI/SSA, 2002).

Los datos epidemiológicos han revelado que las ECV son más frecuentes en los hombres que en las mujeres premenopáusicas, aumentándose el riesgo en las mujeres posmenopáusicas. En referencia a lo anterior, se ha reportado que los hombres presentan una alta incidencia de infartos al miocardio y una mayor morbilidad y mortalidad debida a trastornos cardiovasculares que las mujeres, en el rango de 35-75 años de edad (Lerner y Kannel, 1986). También se ha definido que la presión arterial es más elevada en hombres que en mujeres hasta antes de la menopausia, igualando el riesgo en ambos sexos alrededor de los 70-79 años (Wiinberg et al., 1995) e incluso, incrementándose más en las mujeres alrededor de los 60-69 años (Burt et al., 1995).

Por lo anterior, se ha propuesto que existe un claro dimorfismo sexual en el riesgo de presentar ECV, con una estrecha relación entre los niveles de hormonas esteroideas sexuales (Perusquía y Hernández, 1998). Al respecto, la evidencia más contundente de la importancia de las hormonas esteroideas lo representa la menopausia (etapa caracterizada por la disminución drástica de los niveles de estrógenos y progestinas), dado que numerosos datos han demostrado que en

esta etapa aumenta la incidencia de hipertensión arterial, infarto agudo al miocardio, isquemia, etc. (Colditz et al., 1987; Matthews et al., 1989; Sullivan et al., 1990; Williams et al., 1990; Martin y Freeman, 1993; Gilligan et al., 1994; Stampfer et al., 1991; Guetta y Cannon III, 1996). En consecuencia a estos hallazgos, muchas investigaciones se han enfocado al estudio sobre la participación de los estrógenos (esteroides sexuales femeninos) sobre el desarrollo de las ECV, dándole especial atención a la acción de estas hormonas sobre el sistema cardiovascular.

Entre los efectos más relevantes de los estrógenos se encuentran su capacidad de inducir vasodilatación e inhibir el crecimiento vascular (Jiang et al., 1991; Gilligan et al., 1994; Volterrani et al., 1995; Guetta y Cannon III, 1996; Dubey y Jackson, 2001). Así, el agudo efecto vasodilatador de los estrógenos puede ser, en consecuencia, un potencial efecto hipotensor. Lo cual postula una acción "protectora" de los estrógenos sobre el desarrollo de ECV como la hipertensión arterial.

Las progestinas (otro grupo de esteroides femeninos) se han estudiado también por su efecto "benéfico" en el desarrollo de ECV (Barbagallo et al., 2001). Este grupo de hormonas, al igual que los estrógenos, ejercen vasodilatación (Jiang et al., 1992; Perusquía et al., 1996; Glusa et al., 1997; Chan et al., 2001), indicando que los esteroides ováricos son sustancias vasodilatadoras.

Las hormonas sexuales masculinas (andrógenos) también ejercen una acción vasodilatadora *in vitro* (Yue et al., 1995; Costarella et al., 1996; Perusquía et al., 1996; Crews y Khalil, 1999; Honda et al., 1999; Perusquía y Villalón, 1999; Deenadayalu et al., 2001; English et al., 2001; Tep-areenan et al., 2002;

Perusquia, 2002). La potencia vasodilatadora de la testosterona (English et al., 2001) y algunos de sus derivados 5-reducidos (Perusquia et al., 1996; Perusquia y Villalón, 1999) fue mayor a la ejercida por estrógenos y progestinas. Hasta el momento, el esteroide más potente para inducir vasodilatación en la aorta torácica aislada de rata es el andrógeno 5 β -dihidrotestosterona (5 β -DHT) (Perusquia et al., 1996), que también produce una fuerte respuesta vasodepresora en rata descerebrada y desmedulada (Perusquia y Villalón, 2002).

En referencia a lo anterior, se puede concluir que andrógenos, estrógenos y progestinas son sustancias vasoactivas por inducir un agudo efecto vasodilatador. Sin embargo, se le ha dado poca atención al efecto que puedan ejercer los precursores de estos grupos de hormonas esteroideas sobre el tono vascular. En años recientes se le han atribuido efectos beneficios al esteroide adrenal dehidroepiandrosterona (DHEA) en la disminución del riesgo de presentar ECV tanto en humanos (Barret-Connor et al., 1986; Nestler et al., 1988; Mortola y Yen, 1990; Mitchell et al., 1994; Morales et al., 1994; Haffner et al., 1995) como en animales (Gordon et al., 1988; Shafagoj et al., 1992; Hayashi et al., 2000).

B. Dehidroepiandrosterona (DHEA) como agente protector del riesgo cardiovascular.

a) DHEA y su acción en el sistema cardiovascular.

En los últimos años DHEA ha sido el blanco de numerosos estudios por presentar múltiples beneficios que se relacionan con el aumento de la longevidad.

Se ha reportado que esta hormona es capaz de ejercer efectos: anti-obesidad, anti-cáncer, anti-diabetes, anti-parkinson y anti-alzheimer, además de aumentar la actividad del sistema inmunológico y considerarse protector contra ECV, entre tantas y diversas acciones (Barret-Connor et al., 1986; Regelson et al., 1988; Morales et al., 1994; Mortola y Yen, 1990; Khaw, 1996; Yen et al., 1996; Kroboth et al., 1999).

Existen algunos estudios epidemiológicos de las posibles causas de las ECV, uno de los más completos lo representan los estudios realizados por Barret-Connor en una población en Rancho Bernardo, California. En el cual, se reporta que existe una relación entre los niveles bajos de DHEA y de colesterol HDL, con un mayor riesgo de padecer ECV (Barret-Connor et al., 1986; Barret-Connor y Goodman-Gruen, 1991) coincidiendo con Haffner y cols. (1995).

La función precisa mediante la cual DHEA ejerce sus acciones benéficas en el sistema cardiovascular no se conoce aún, pero en los últimos años ha cobrado un interés especial la determinación de dichos mecanismos. Muchas investigaciones señalan que los niveles bajos de colesterol HDL, así como niveles altos de colesterol LDL y de triglicéridos, son parámetros que aumentan el riesgo de padecer ECV (Grodstein et al., 1996; Kang et al., 2002; Shulman, 2002).

Algunos estudios sugieren que los bajos niveles de DHEA y de su éster sulfatado, sulfato de DHEA (SDHEA), en orina y en suero, están relacionados con la mayor incidencia de infartos al miocardio, hipercolesterolemia, aterosclerosis e hipertensión arterial (Barret-Connor et al., 1986; Mitchell et al., 1994; Osorio et al., 2002).

Existen evidencias de que la administración de DHEA en conejos hipercolesterolémicos reduce la aterosclerosis aórtica (Eich et al., 1993) y a largo plazo retarda el progreso de la aterosclerosis coronaria en corazones transplantados de conejos hipercolesterolémicos (Gordon et al., 1988), indicando una posible acción de DHEA sobre la vasculatura, que tiene como consecuencia reducir la formación de placas de colesterol. También existe otro reporte, en conejos ovariectomizados, en los que DHEA tuvo un efecto antiaterosclerótico, donde los autores atribuyen el efecto a la conversión de DHEA hacia andrógenos y estrógenos (Hayashi et al., 2000).

La terapia de reemplazo hormonal con DHEA en mujeres posmenopáusicas, ha mostrado una disminución de triglicéridos y de colesterol LDL y un aumento de colesterol HDL (Lasco et al., 2001), parámetros que como se mencionó, son factores de riesgo para desencadenar una ECV.

En forma contrastante, existen evidencias de que el empleo de terapias con DHEA en animales y humanos, no ejerce ningún efecto benéfico a corto plazo (Art et al., 2001; Yoneyama et al., 1997), sin embargo; no se descarta la posibilidad de que a largo plazo se produzcan efectos benéficos en la salud.

Respecto al efecto directo de DHEA sobre el tono vascular, existen muy pocos estudios; en ratas *in vivo* se observó que DHEA retarda el desarrollo de la hipertensión arterial inducida con dexametasona (Shafagoj et al., 1992), lo cual nos indica un posible efecto vasodilatador. Posteriormente, se comprobó que en el hurón, DHEA puede relajar la vasoconstricción pulmonar producida por hipoxia e incrementar la actividad de canales de K^+ operados por Ca^{2+} en células cultivadas de arteria pulmonar (Farrukh et al., 1998). Barbagallo y cols. (1995) clasificaron al

SDHEA como una hormona vasoactiva, dado que ejerce vasodilatación en anillos aórticos y arteriales aislados de rata, proponiendo que el posible mecanismo de la acción vasodilatadora es a través de la homeostasis del Ca^{2+} . Realmente no existe aún un trabajo que reporte con claridad el mecanismo mediante el cual DHEA ejerce su acción benéfica en el sistema cardiovascular, ni se ha caracterizado aún el efecto vasodilatador de esta hormona y la potencia que ejerce comparada con andrógenos y estrógenos.

b) Generalidades de DHEA.

El sulfato de DHEA (SDHEA) fue aislado por primera vez en orina en el año de 1944 (Munson et al., 1944) y 10 años más tarde, se aisló DHEA de sangre periférica de humanos (Migeon y Plager, 1954). DHEA es un esteroide, precursor de andrógenos y estrógenos, de 19 átomos de carbono con un doble enlace entre los carbonos 5 y 6 ($\Delta 5$) y un grupo hidroxilo en el carbono 3, con el nombre químico: 3 β -hidroxi-5-androsten-17-ona (Fig 1). La mayor parte de DHEA es transformada con rapidez por la adición de un grupo sulfato en el carbono 3, dando lugar al 3 β -sulfato de dehidroepiandrosterona (SDHEA), como se aprecia en la Fig. 1. Dicho proceso se conoce como sulfatación y es realizado por un grupo de enzimas de la familia sulfotransferasas, este proceso ocurre aproximadamente en partes iguales en la suprarrenal y en el hígado (Murray et al., 1994). Este grupo de enzimas han sido caracterizadas en ácidos biliares, hígado humano y glándulas adrenales (Falany et al., 1996). Así, el proceso de sulfatación

le confiere a la molécula mayor solubilidad en medio acuoso y puede ocasionar la pérdida de la función biológica.

DHEA circula libremente en sangre, ya que se une ligeramente a proteínas como albúmina y a la proteína de unión a hormonas esteroideas (SHBG), mientras que SDHEA se une fuertemente a la albúmina (Longcope, 1996).

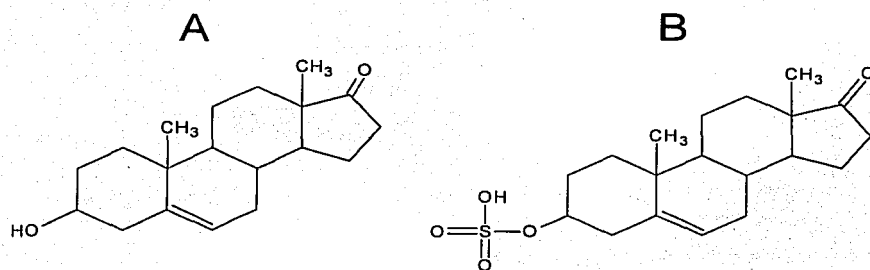


Figura 1. Representación estructural de: A) dehidroepiandrosterona (DHEA) y B) su forma sulfatada, sulfato de dehidroepiandrosterona (SDHEA).

El principal órgano productor de DHEA es la glándula adrenal. En humanos y varios primates, las glándulas adrenales sintetizan y secretan grandes cantidades de DHEA y de SDHEA, que se metabolizan hacia andrógenos y estrógenos activos en tejidos periféricos (Fig 2). Al respecto, se ha reportado la conversión de DHEA hacia andrógenos y estrógenos, en diferentes modelos

biológicos (Parker y Mahesh, 1977; Kalimi y Regelson, 1988; Labrie et al., 1996a; 1996b; Labrie et al., 1997b; LeBlanc et al., 2002; Nawata et al., 2002).

Las concentraciones normales de DHEA se encuentran en un rango de 7 a 31 nmol/L; mientras que las de SDHEA en mujeres son del orden de 3 a 12.7 μ mol/L y en hombres de 2 a 10 μ mol/L (Wilson et al., 1998). En mujeres sanas, la síntesis de DHEA y de SDHEA ocurre casi en su totalidad en la corteza adrenal; mientras que en los hombres los testículos secretan el 5% del SDHEA y del 10 al 25% de DHEA (Kroboth et al., 1999). Aproximadamente el 50% de los andrógenos en los hombres sanos y el 100% de estrógenos en mujeres posmenopáusicas, se derivan de la conversión de DHEA y SDHEA, de ahí su importancia biológica (Labrie et al., 1997b).

Por otra parte, en ratas de ambos sexos se determinó que la cantidad de SDHEA es mayor en cerebro que en plasma u órganos, como: hígado, bazo, testículo, riñón e incluso en adrenales (Corpéchet et al., 1981). Lo cual indica un almacenamiento mayor en cerebro, posiblemente para ejercer algunas funciones prioritarias que aún no se han caracterizado a profundidad y que podrían estar relacionadas con las enfermedades cerebro-vasculares.

En humanos los niveles de DHEA declinan dramáticamente con la edad, alcanzando su nivel sérico máximo alrededor de los 20-25 años (Sulcová et al., 1997; Carlström et al., 1988), observando que después de los 30 años hay una drástica pérdida de esta hormona (Labrie et al., 1997a; Howard, 1996), la cual continúa hasta llegar a niveles casi imperceptibles en la vejez (Fig 3).

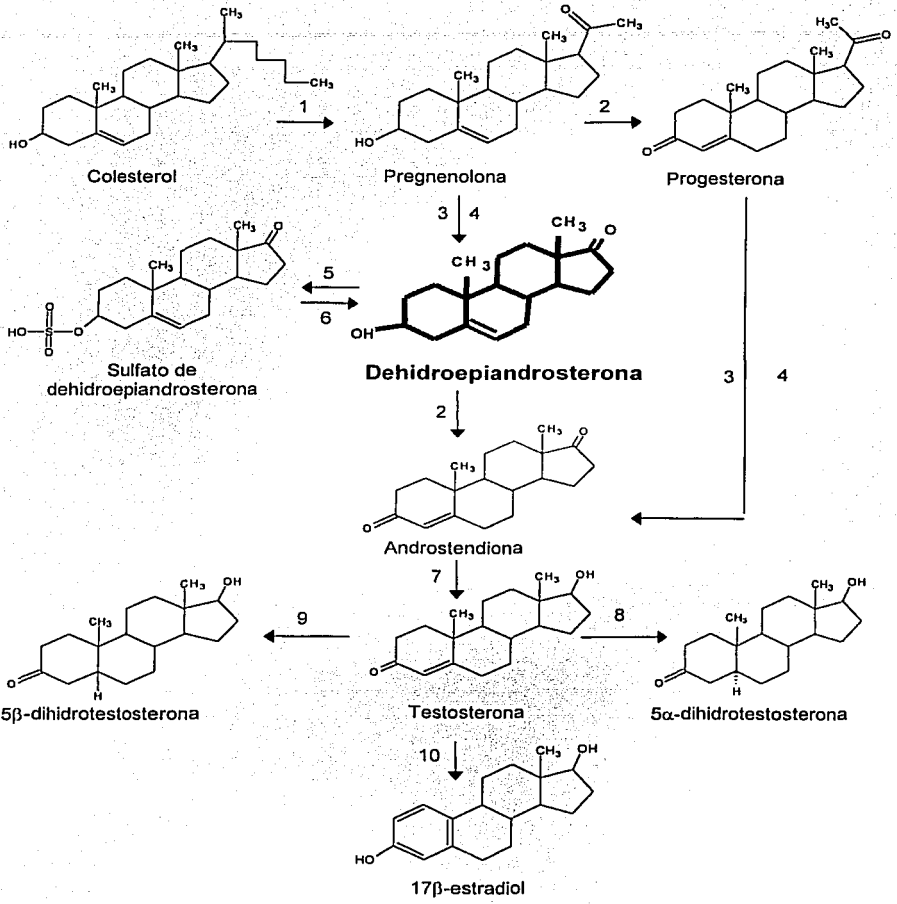


Figura 2. Ruta de biosíntesis de hormonas esteroideas donde se muestra de manera general los productos metabólicos formados a partir de dehidroepiandrosterona. Los números indican las enzimas que catalizan la reacción. 1) 20,22 liasa (P₄₅₀ scc); 2) 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa; 3) 17 α -esteroide hidroxilasa; 4) C₁₇₋₂₀ liasa; 5) sulfatasa; 6) sulfotransferasa; 7) 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa; 8) 5 α -reductasa; 9) 5 β -reductasa y 10) aromataasa (Robel et al., 1999).

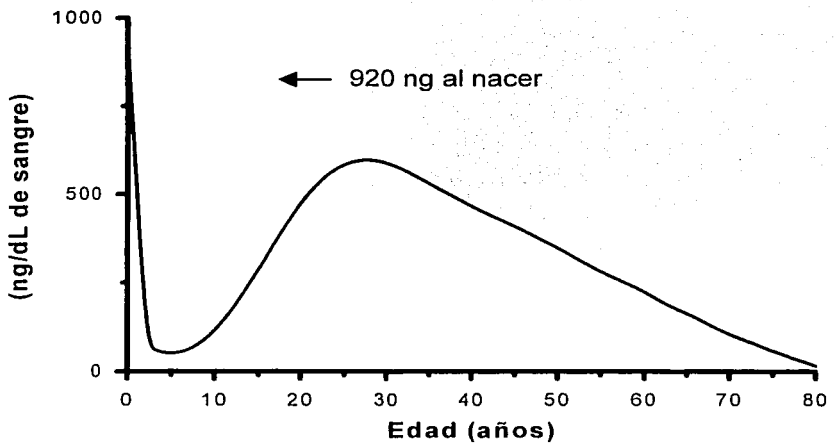


Figura 3. Niveles séricos de DHEA a lo largo de la vida del humano (Gráfica modificada de Howard. J. M., 1996).

II. JUSTIFICACIÓN

En la actualidad, los trastornos que presentan mayores índices de mortalidad son las enfermedades cardiovasculares, tales como: hipertensión arterial, infartos al miocardio e isquemia. En consecuencia, estos padecimientos son un problema de salud pública.

A pesar de que la etiología de los trastornos cardiovasculares es multifactorial, se ha asumido que las hormonas esteroides femeninas (estrógenos y progestinas) juegan un papel preponderante en la regulación del tono vasomotor, confiriéndoles una acción "protectora" sobre el desarrollo de estos padecimientos y uno de sus principales atributos es inducir un agudo efecto vasodilatador. En los últimos años se ha reportado que testosterona y algunos análogos y metabolitos son también capaces de producir vasodilatación. Por otra parte, al intermediario metabólico en la vía para la síntesis de andrógenos y estrógenos, DHEA, se le han conferido varios beneficios por incrementar la longevidad, teniendo la capacidad de reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (ECV) (Regelson et al., 1988; 1990). Sin embargo, el potencial efecto vasodilatador de DHEA ha sido poco explorado y no es claro si DHEA ejerce su efecto vasodilatador directamente o después de su conversión a esteroides vasoactivos (andrógenos y estrógenos).

Por lo anterior, se pretende caracterizar el efecto vasodilatador de esta hormona androgénica (DHEA) sobre el tono de la contracción inducida por noradrenalina en la aorta torácica aislada de rata, determinando su potencia en relación con el conocido efecto vasodilatador que ejercen otros esteroides.

Asimismo, establecer si el efecto es mediado por el endotelio vascular y si la acción es o no a través de la vía clásica de acción de las hormonas esteroideas (acción genómica).

III. HIPÓTESIS

Con base al efecto vasodilatador que ejercen andrógenos y estrógenos, producto del metabolismo de DHEA, se espera encontrar un efecto similar inducido por este precursor. Dado por las similitudes estructurales que comparten estos compuestos, se esperaría también que la acción sea de tipo no genómico e independiente de los factores relajantes del endotelio vascular, como ha sido reportado para sus metabolitos.

IV. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL:

Caracterizar la acción vasodilatadora de DHEA en la aorta torácica aislada de rata.

OBJETIVOS PARTICULARES:

1. Cuantificar el efecto vasodilatador de DHEA a diferentes concentraciones sobre contracciones inducidas por 0.3 μ M de noradrenalina (NA) en presencia y ausencia del endotelio vascular.
2. Comparar la potencia vasodilatadora de DHEA con datos previamente publicados sobre la acción inducida por 17 β -estradiol (17 β -E₂), progesterona (P₄), testosterona (T₄) y sus dihidroderivados 5 α - y 5 β -dihidrotestosterona (5 α - y 5 β -DHT), en la aorta torácica aislada de rata.
3. Determinar si el efecto vasodilatador de DHEA es mediado por óxido nítrico, inhibiendo la enzima responsable de su síntesis.
4. Establecer si la acción vasodilatadora de DHEA es a través de la clásica vía de acción de hormonas esteroideas (genómica), utilizando inhibidores de la transcripción y síntesis de proteínas.

V. MATERIAL Y MÉTODOS

A. Modelo biológico

Para realizar este estudio se emplearon ratas machos adultas de la cepa Wistar, en un intervalo de peso de 220-250 g. Los animales se mantuvieron en condiciones de bioterio: con temperatura constante de $\pm 21^{\circ}\text{C}$, ciclo de 12 h luz/12 h oscuridad, recibiendo alimento Harlan Teklad y agua *ad libitum*.

Las ratas fueron sacrificadas por dislocación cervical. Inmediatamente después, se efectuó una incisión en el tórax, para exponer la aorta torácica descendente y proceder a su disección (Figura 4). La aorta fue limpiada de tejido conectivo y adiposo con la ayuda de material de microcirugía, colocándola en solución Ringer Krebs-Henseleit con la siguiente composición (mM): Glucosa (12.0), NaHCO_3 (24.9), NaCl (119.5), KCl (4.7), KH_2PO_4 (1.18), MgSO_4 (1.18), CaCl_2 (2.5), manteniendo el pH a 7.4 mediante burbujeo constante de una mezcla gaseosa de 95% O_2 /5% CO_2 . Dicho procedimiento se realizó en una caja de petri de doble pared, para conservar la solución a 37°C por medio de un baño recirculador de agua. La aorta fue cortada en anillos de 0.6 a 0.8 mm de longitud. Algunos tejidos fueron usados sin endotelio, para lo cual la aorta fue raspada mecánicamente con un cordón trenzado de nylon, que se introdujo en el lumen de la aorta con movimientos circulares. Los anillos con endotelio intacto fueron manejados cuidadosamente para evitar daño sobre la capa endotelial y conservarla íntegra.

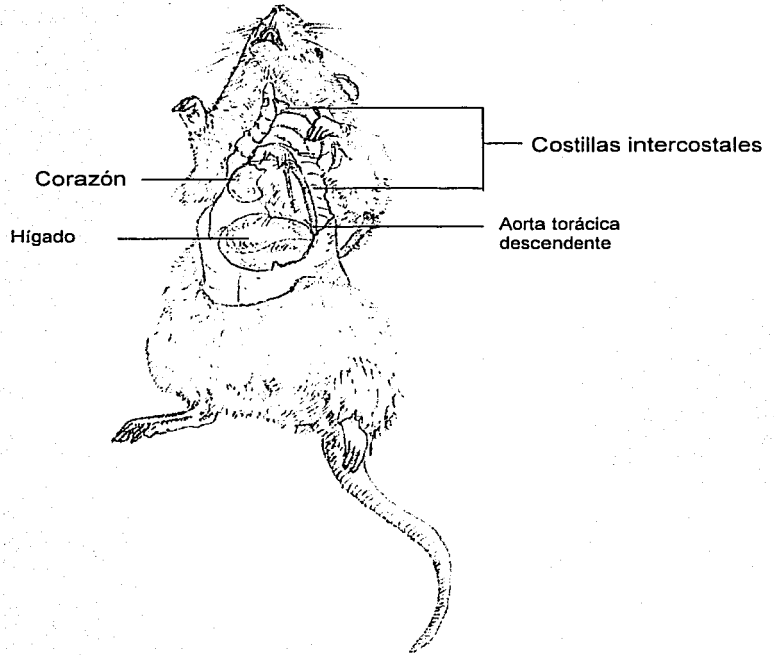


Figura 4. Esquema donde se muestra la ubicación de la aorta torácica descendente en la rata.

B. Sistema de registro

Cada anillo aórtico fue montado de manera horizontal con la ayuda de dos ganchos de acero inoxidable en forma de "L", introducidos al lumen de la aorta. Uno de los ganchos fue fijado a la base de la cámara de incubación para tejido

aislado que contenía 10 mL de la solución Krebs-Henseleit; manteniendo las condiciones de temperatura (37°C) y pH (7.4 con burbujeo continuo con la mezcla gaseosa) constantes. El otro gancho, fue amarrado con un hilo de seda (000) a un transductor de tensión (marca Grass, FT03C), el cual detectó las señales mecánicas del tejido, enviándolas a un polígrafo (marca Grass, 79). Una vez que los anillos fueron montados en el sistema de registro (Fig 5), los tejidos se sometieron a una fuerza de tensión de 1 g (10 mN), lo cual corresponde a 2 cm de desplazamiento de la pajilla.

Los tejidos fueron mantenidos bajo estas condiciones durante 1 h (periodo de estabilización) antes de iniciar el experimento.

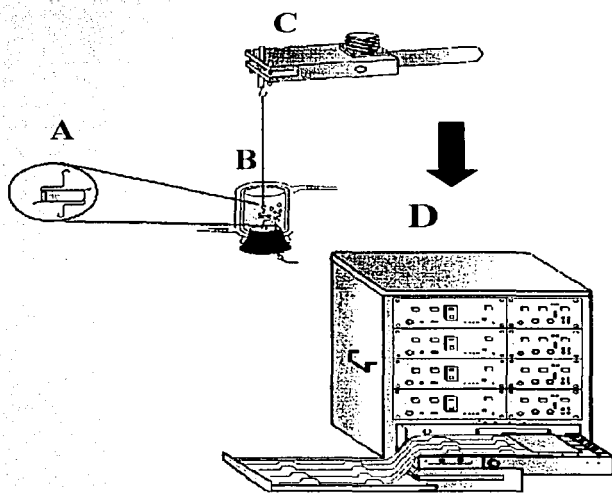


Figura 5. Sistema de registro isométrico horizontal para tejido aislado:
A) anillo aórtico, B) cámara de incubación, C) transductor y D) polígrafo.

C. Comprobación farmacológica de la presencia de endotelio.

Después del periodo de estabilización, se adicionó a la cámara 0.3 μM de noradrenalina (NA), con el objeto de inducir una contracción tónica sostenida y 5 min después se adicionó 20 μM de acetilcolina (ACh); observando su efecto durante 10 min. En las preparaciones raspadas (sin endotelio), la ACh no modificó el tono de la contracción inducida por NA, considerando a estas preparaciones sin endotelio. En contraste, se observó que en las preparaciones sin raspar (con endotelio), la ACh produjo una disminución (relajación) del tono de la contracción inducida por NA, considerando a las preparaciones con endotelio sólo cuando la relajación de ACh fue mayor al 40%. Inmediatamente después de esta determinación, los tejidos fueron lavados mediante recambios de la solución fisiológica.

D. Protocolo experimental.

1. *Cuantificación del efecto vasodilatador de DHEA en presencia y ausencia del endotelio vascular.*

Después de la determinación de la presencia o ausencia del endotelio, las preparaciones fueron divididas en dos grupos: tejidos con endotelio (grupo I) y tejidos sin endotelio (grupo II). Así, los tejidos se dejaron reposar durante 1 h antes de una segunda adición de NA a la misma concentración (0.3 μM). Esta vez la contracción fue registrada durante 30 min con el objeto de observar si el tono de la contracción se mantenía constante durante este tiempo, esta contracción fue

considerada como respuesta control. Pasado este período, se efectuaron tres recambios de la solución Krebs-Henseleit (lavado) contenida en la cámara. Después de 1 h de estabilización se indujo un tercer estímulo con NA 0.3 μ M y 15 min después se procedió a la adición de la hormona dehidroepiandrosterona (DHEA) a diferentes concentraciones (3, 10, 30, 100 y 300 μ M), en forma no acumulativa *i.e.*, sólo una concentración en cada anillo aórtico de los dos diferentes grupos. La respuesta a la adición de cada concentración, fue registrada durante 10 min. Posteriormente, los tejidos fueron lavados con tres recambios de la solución Krebs-Henseleit.

Por último y después de 1 h de reposo, se produjo una última contracción inducida por NA (0.3 μ M), la cual fue registrada durante 30 min para determinar la viabilidad del tejido y la recuperación del mismo al efecto del fármaco. Este protocolo fue realizado tanto en el grupo I como en el grupo II, determinados como se indicó previamente.

La hormona fue disuelta en etanol absoluto y cada concentración fue adicionada al baño de la cámara a un volumen final de 0.1% de etanol. Para lo cual, se hicieron controles previos del efecto del vehículo (etanol 0.1%) sobre la contracción inducida por NA, observando que el vehículo no produce cambios sobre el tono de la contracción en ambos grupos de tejidos.

Cada concentración de DHEA (3, 10, 30, 100 y 300 μ M), fue repetida por lo menos 6 veces; en aortas provenientes de diferentes animales. Estos datos sirvieron para graficar las curvas concentración respuesta de la hormona en

ambos grupos, calculando la pendiente de la recta y las concentraciones inhibitorias (CI) 16, 50 y 84 por el método de Litchfield y Wilcoxon (1949).

2. Comparación de la potencia relajante de DHEA con un estrógeno, un andrógeno y dos derivados 5-reducidos.

Con la finalidad de comparar la potencia vasodilatadora de DHEA con la que ejercen otros esteroides: 17 β -estradiol, progesterona, testosterona y 5 α - y 5 β -DHT, bajo las mismas condiciones experimentales, reportadas previamente (Perusquía et al., 1996; Perusquía y Villalón, 1999), se realizó un análisis de la potencia a la concentración equimolecular de 30 μ M en aorta sin endotelio. Asumiendo un valor de 1.00 para DHEA.

La formula empleada para determinar la potencia fue:

$$\text{Potencia} = \frac{\% \text{ de relajación del esteroide}}{\% \text{ de relajación de DHEA}}$$

3. Determinación del efecto relajante de DHEA a través de óxido nítrico.

Con la finalidad de investigar si el efecto de DHEA es mediado por la producción de óxido nítrico (ON), se realizaron los siguientes experimentos en preparaciones con endotelio. Antes del tratamiento con DHEA (30 min), el tejido fue incubado con 10 μ M de N ω -nitro-L-arginin metil éster (L-NAME), inhibidor de la enzima óxido nítrico sintetasa; observando el efecto de DHEA a la concentración inhibitoria media (CI₅₀= concentración a la cual DHEA produce 50% de relajación

de la contracción de NA) de la hormona y el efecto fue observado durante 10 min. Así, el efecto de la CI_{50} de DHEA fue comparado en presencia y ausencia de L-NAME. Cabe mencionar que la concentración utilizada de L-NAME ($10 \mu M$) bloquea el efecto relajante producido por $20 \mu M$ de ACh, como también ha sido reportado previamente (Bishop-Bailey et al., 1997), garantizándose así, la inhibición de la actividad de la ON sintetasa.

4. Efecto de cicloheximida y actinomicina D sobre la relajación inducida por DHEA.

Con el objeto de dilucidar si el efecto de DHEA es a través de la acción clásica de hormonas esteroides (acción genómica), se emplearon inhibidores de la síntesis de proteínas (cicloheximida $40 \mu M$) y de la transcripción (actinomicina D $10 \mu M$), adicionándolos 45 min antes de la adición de DHEA a la CI_{50} sobre la contracción de NA. Dado que el efecto relajante de DHEA no fue significativamente diferente ($p > 0.1$) en preparaciones sin endotelio. Se decidió realizar los ensayos con cicloheximida y actinomicina D sólo en preparaciones sin endotelio. El efecto fue comparado con la respuesta de DHEA (CI_{50}) en ausencia de estos compuestos.

E. Análisis de los datos

Los datos fueron evaluados midiendo la amplitud (en cm) de la contracción que induce $0.3 \mu M$ de NA (control) y 10 min después (efecto) de la adición del

compuesto. Los efectos fueron presentados como porcentaje de relajación con respecto al control, por la fórmula:

$$\% \text{ relajación} = \frac{\text{Amplitud de la contracción de NA con tratamiento (efecto)} \times 100}{\text{Amplitud de la contracción de NA sin tratamiento (control)}} - 100$$

Cada valor reportado es la media de $n \geq 6 \pm$ error estándar de la media (E. E. M). El análisis comparativo fue efectuado con la prueba de t de *Student*, tomando como valor significativo una $p < 0.05$.

F. Sustancias utilizadas

Todos los compuestos fueron obtenidos de Sigma Chemical Co., St Louis MO., E.U.A.: acetilcolina clorada (ACh, 2-(acetiloxi),N,N,N.-cloruro de trimetiletanamina), noradrenalina hidrociorada (NA, 2-amino-1-(3,3-hidroxifenil) etanol), actinomicina D (diactinomicina), cicloheximida (3-[2-(3, 5-dimetil-2-oxociclohexil-2-hidroxietil]-glutarimida), dehidroepiandrosterona (DHEA, 3 β -hidroxil-5-androsten-17-ona), L-NAME (N ω -nitro-L-arginin metil éster hidrociorado). NA, ACh y L-NAME se disolvieron en agua desionizada; cicloheximida, actinomicina D y DHEA fueron disueltas en etanol absoluto, obtenido de Merck-México, S. A., adicionando un volumen final de 0.1% en 10 mL de la solución Ringer Krebs-Henseleit. NA y actinomicina D se conservaron en oscuridad (frasco ámbar) para evitar su degradación por ser fotosensibles.

VI. RESULTADOS

1. *Efecto de DHEA en preparaciones con y sin endotelio.*

El efecto del vehículo (etanol 0.1%) no modificó significativamente ($p > 0.05$) el tono de la contracción inducida por $0.3 \mu\text{M}$ de NA en los anillos aórticos de ambos grupos (con y sin endotelio), con un porcentaje de relajación de $0.64\% \pm 0.29$ y $0.98\% \pm 0.49$ respectivamente. Sin embargo, la adición de DHEA produjo una disminución del tono de la contracción inducida por NA, mostrando un rápido efecto vasodilatador (~ 1 min), observado inmediatamente después de la adición de la hormona en preparaciones con y sin endotelio. Asimismo, se observó que la contracción fue restablecida en un siguiente estímulo de NA, después de retirar a la hormona mediante el lavado (Fig 6). El efecto vasodilatador de las diferentes concentraciones probadas de DHEA fue significativamente diferente ($p < 0.05$) respecto al efecto del vehículo (etanol 0.1%) para todas las concentraciones probadas (Tabla 1), mostrando un comportamiento lineal dependiente de la concentración, sin diferencia significativa entre la presencia y ausencia de endotelio en la aorta (Fig 7).

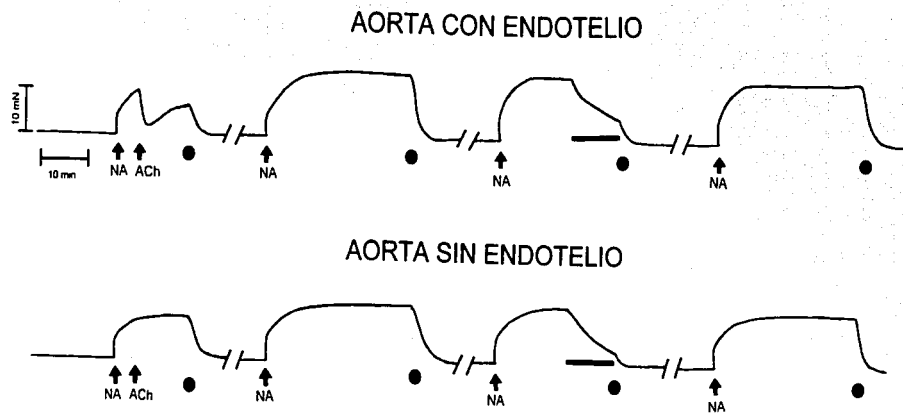


Figura 6. Trazos típicos de la contracción inducida por $0.3 \mu\text{M}$ de noradrenalina (NA) en la aorta torácica aislada de rata, donde se muestra la presencia de endotelio por la relajación inducida por $20 \mu\text{M}$ de acetilcolina (ACh) y la falta del efecto de ACh en la aorta sin endotelio. El tono de la contracción se ve disminuido por la adición de DHEA ($300 \mu\text{M}$); la barra horizontal representa el tiempo de incubación de la hormona, los círculos cerrados representan el recambio de la solución (lavado). Nótese que la contracción de NA es recuperada cuando DHEA es retirada del tejido.

Tabla 1. Valores obtenidos del efecto vasodilatador de dehidroepiandrosterona sobre la contracción inducida por 0.3 μ M de noradrenalina en aorta aislada de rata, evaluados 10 min después de la adición de la hormona.

CONCENTRACIÓN (μ M)	PORCENTAJE DE RELAJACIÓN n = 6 \pm E. E. M.	
	CON ENDOTELIO	SIN ENDOTELIO
3	4.02 \pm 1.32	5.54 \pm 0.63
10	10.90 \pm 1.32	9.75 \pm 0.63
30	33.52 \pm 2.36	30.09 \pm 0.23
100	52.40 \pm 1.60	50.91 \pm 2.62
300	79.19 \pm 2.24	79.89 \pm 1.79

Los valores para cada concentración no fueron significativamente diferentes cuando se compararon ambos grupos (con y sin endotelio).

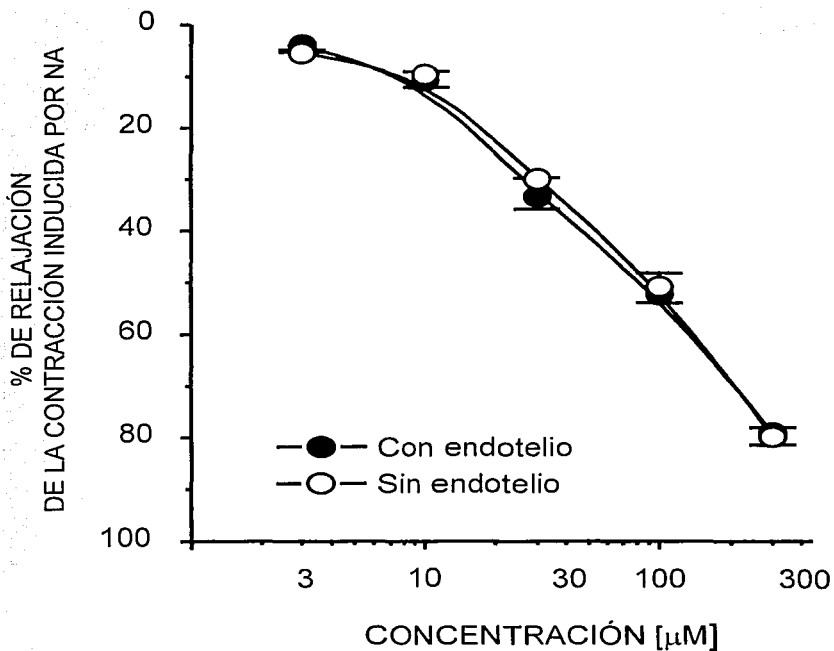


Figura 7. Curva concentración-respuesta de dehidroepiandrosterona (DHEA) sobre la contracción inducida por $0.3 \mu\text{M}$ de noradrenalina (NA) en la aorta torácica aislada de rata con endotelio y sin endotelio. Cada punto representa la media de 6 experimentos \pm E. E. M. Nótese, que el comportamiento de las curvas no fue significativamente diferente.

Con los datos se obtuvo la pendiente de la recta de cada curva y se determinaron las concentraciones inhibitorias (CI) 16, 50 y 84, con los límites de confianza para la CI₅₀ por el método acordado (Litchfield y Wilcoxon, 1949). Ver Tabla 2.

Tabla 2. Concentraciones inhibitorias (CI) del efecto vasodilatador de dehidroepiandrosterona (DHEA) sobre la contracción inducida por NA en aorta aislada de rata.

PREPARACIÓN	CI ₁₆ (μ M)	CI ₅₀ (μ M)	CI ₈₄ (μ M)	Límites de confianza de la CI ₅₀ Inferior- Superior	Pendiente de la recta de la CI ₅₀
CON ENDOTELIO	9.20	71.10	549.64*	25.28 – 199.99	38.28
SIN ENDOTELIO	9.51	75.18	594.10*	26.43 – 213.87	37.87

*Valor teórico obtenido por extrapolación de la recta. La pendiente de ambas curvas no fue diferente significativamente.

2. Comparación de la potencia relajante de DHEA con un estrógeno, un andrógeno y dos derivados 5-reducidos.

Con el objeto de comparar la eficacia de DHEA con algunos otros esteroides como: 17β -estradiol (17β -E₂), progesterona (P₄), testosterona (T₄) y sus dihidroderivados 5α - y 5β -dihidrotestosterona (5α - y 5β -DHT), obtenidos en trabajos previos (Perusquía et al., 1996; Perusquía y Villalón, 1999) bajo las mismas condiciones experimentales a la concentración equimolecular de 30 μ M, se hizo un análisis de potencia. Así, esta comparación mostró que con excepción de 5β -DHT, los demás esteroides fueron menos potentes que DHEA para producir vasorelajación (Tabla 3).

La relación de potencia fue: 5β -DHT \geq DHEA > 5α -DHT > P₄ \geq 17β -E₂ = T₄. DHEA mostró un agudo efecto vasodilatador, sólo superado por 5β -DHT, siendo 0.61 veces mayor que 17β -E₂ y T₄.

Tabla 3. Comparación de la potencia vasodilatadora de estrógenos, andrógenos y su precursor (DHEA) sobre la contracción inducida por NA (0.3 μ M) en aorta torácica de rata sin endotelio a la concentración equimolecular de 30 μ M.

ESTEROIDE [30 μ M]	% DE RELAJACIÓN $n \geq 6 \pm$ D. E. M.	POTENCIA*	REFERENCIA
DHEA	30.09 \pm 0.57	1.00	Presentes datos.
17 β -E ₂	18.4 \pm 0.40	0.61	Perusquía y Villalón, 1999.
T ₄	18.41 \pm 3.59	0.61	Perusquía et al., 1996.
P ₄	20.20 \pm 5.17	0.67	Perusquía et al., 1996.
5 α -DHT	23.59 \pm 6.86	0.78	Perusquía et al., 1996.
5 β -DHT	33.29 \pm 2.52	1.11	Perusquía et al., 1996.

* Potencia evaluada por la fórmula: % de relajación del esteroide / % de relajación de DHEA. Asumiendo un valor de 1.00 para DHEA.

3. Efecto de DHEA en presencia del inhibidor de la óxido nítrico sintetasa (L-NAME).

La incubación del tejido con L-NAME (10 μ M) no modificó significativamente ($p > 0.05$) la relajación inducida por DHEA a la CI_{50} (71.10 μ M) en aorta torácica de rata con endotelio, mostrando que el efecto vasodilatador de DHEA no es dependiente de ON (Fig 8 y 9).

4. Efecto de DHEA en presencia de inhibidores de la síntesis de proteínas (cicloheximida) y de la transcripción (actinomicina D).

Para determinar si DHEA ejerce su acción vasodilatadora mediante la vía clásica de hormonas esteroideas (acción genómica), los tejidos fueron incubados con el inhibidor de la síntesis de proteínas (cicloheximida 40 μ M), observando que el pretratamiento con este compuesto no modifica significativamente ($p > 0.1$) la relajación inducida por DHEA a la CI_{50} en aorta sin endotelio como puede apreciarse en la Fig 8 y 9.

En el caso del inhibidor de la transcripción (actinomicina D 10 μ M) el pretratamiento con este agente tampoco modificó significativamente ($p > 0.1$) la relajación inducida por DHEA a su CI_{50} en aorta sin endotelio, ver Fig 8 y 9.

Cabe recordar que estos pretratamientos únicamente se realizaron en aorta sin endotelio, dado que no existe diferencia significativa en la vasodilatación inducida por DHEA en presencia o ausencia del endotelio, ver Tabla 1 y Fig 7.

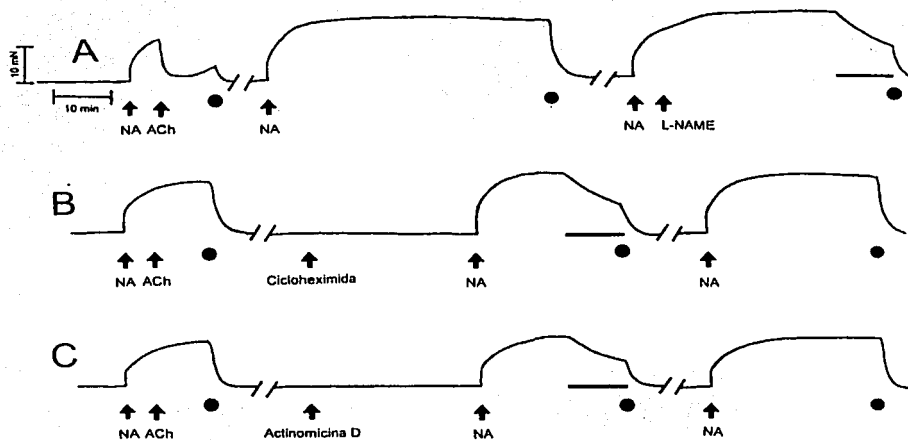


Figura 8. La vasodilatación inducida por DHEA a la CI_{50} ($71.10\mu M$) sobre la contracción inducida por $0.3\mu M$ de noradrenalina (NA), no fue bloqueada por el inhibidor de la enzima óxido nítrico sintetasa (L-NAME $10\mu M$) en aorta con endotelio (A). En el caso del inhibidor de la síntesis de proteínas (cicloheximida $40\mu M$), éste no afectó la relajación inducida por DHEA en aorta sin endotelio (B) a la CI_{50} ($75.18\mu M$). La incubación con el inhibidor de la transcripción (actinomicina D $10\mu M$) no modificó la relajación inducida por DHEA en aorta sin endotelio (C). La barra negra representa el tiempo de incubación de DHEA. Los círculos cerrados representan el recambio de la solución (lavado). Nótese que la contracción de NA es recuperada cuando DHEA y los agentes de cada tratamiento son retirados del tejido. El efecto relajante de acetilcolina (ACh $20\mu M$) se observa solamente en las preparaciones con endotelio (A).

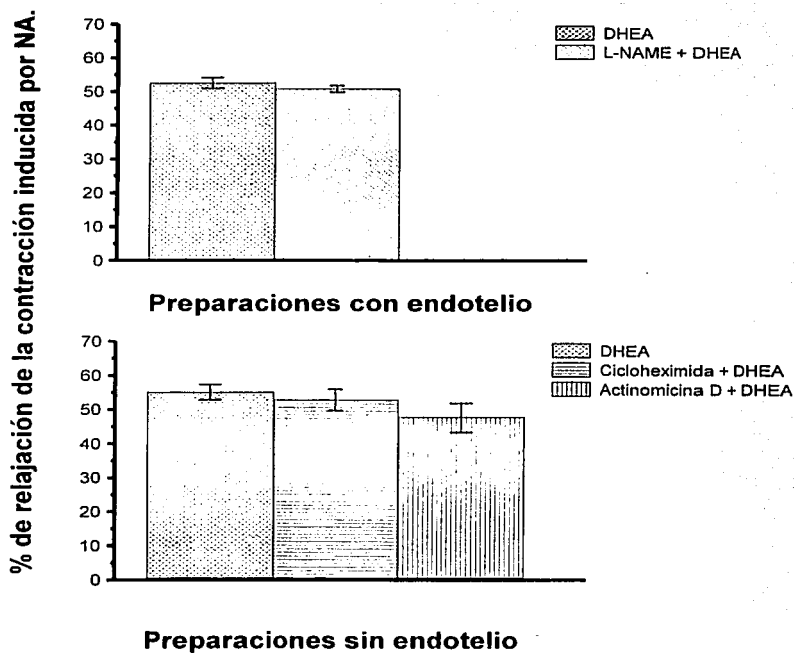


Figura 9. Comparación del efecto de DHEA a la concentración inhibitoria 50 ($CI_{50} = 71.10 \mu\text{M}$ con endotelio y $75.18 \mu\text{M}$ sin endotelio) sobre la contracción inducida por $0.3 \mu\text{M}$ de NA en presencia de inhibidores de la enzima óxido nítrico sintetasa (L-NAME $10 \mu\text{M}$), de la transcripción (actinomicina $10 \mu\text{M}$) y de la síntesis de proteínas (cicloheximida $40 \mu\text{M}$). El efecto relajante de DHEA no fue diferente significativamente ($p > 0.1$) con respecto a los diferentes tratamientos. Cada barra representa la media $n = 6 \pm E. E. M.$

VII. DISCUSIÓN

Los presentes datos muestran que DHEA ejerce un agudo efecto vasodilatador, dependiente de la concentración, sobre la contracción inducida por NA en la aorta torácica aislada de rata. Lo anterior concuerda con la acción vasodilatadora atribuida a esta hormona en la vasculatura del hurón (Farrukh et al., 1998). Asimismo, el efecto fue observado inmediatamente después de la adición de DHEA (~ 1 min), lo cual garantiza que es un efecto producido por DHEA antes de la conversión a otros compuestos.

a) *Potencia y Relación Estructura-Función*

En este estudio se observó un agudo efecto vasodilatador producido por DHEA que resultó ser más potente que 17β -E₂, P₄, T₄ y 5 α -DHT. La relación de potencia indica que existe una relación entre la estructura química de la molécula y el efecto relajante ejercido, ya que la configuración 3 β -hidroxi- Δ 5 de DHEA hace que la molécula sea más potente que cuando presenta la configuración Δ 4-3ceto; como para P₄ y T₄. Por otro lado, la aromatización del anillo A, cuando se transforma a estrógenos, la hace menos eficaz, mostrado por la baja potencia de 17β -E₂, no sólo a la concentración comparada en este análisis, sino a concentraciones mucho mayores (Perusquía y Villalón, 1999). Sin embargo, la eliminación del doble enlace en el carbono 4 y la reducción del carbono 5, puede aumentar la potencia, siendo más eficaz cuando la configuración es 5 β /*cis*, como es el caso del dihidroderivado de T₄, 5 β -DHT, que presenta una actividad óptima en este análisis y en trabajos previos (Perusquía et al., 1996; Perusquía, 2002).

b) Mecanismo de acción

El efecto relajante de DHEA fue observado en preparaciones con y sin endotelio, mostrando que no hay diferencia significativa en el efecto relajante de DHEA en presencia o ausencia del endotelio vascular. Esta evidencia muestra que el efecto vasodilatador de DHEA en la aorta aislada de rata es independiente del endotelio vascular. Además, considerando que el endotelio de la microvasculatura adyacente a la aorta pudiera influir en la vasodilatación de DHEA, la aorta con endotelio fue incubada con el inhibidor de la enzima ON sintetasa (L-NAME), antes de la adición de DHEA, encontrando que no existe diferencia en presencia o ausencia de L-NAME. Lo anterior nos confirma que la relajación inducida por DHEA es independiente del endotelio vascular y de la liberación de ON. Existen evidencias de que el mecanismo de la acción vasodilatadora de estrógenos, andrógenos y progestinas es independiente del endotelio vascular (Salas et al., 1994; Jiang et al., 1991; Jiang et al., 1992; Perusquía et al., 1996; Perusquía y Villalón, 1999; Yue et al., 1995; Teoh et al., 2000). Sin embargo, la controversia existe por un estudio reciente que postuló que DHEA activa la producción de ON en células endoteliales (Liu y Dillon, 2002). Por lo tanto, la participación de los factores relajantes derivados del endotelio deberán continuarse estudiándose en el efecto vasodilatador de DHEA, aunque nuestros experimentos descartan categóricamente su participación.

Por otro lado, el efecto vasodilatador de DHEA no fue bloqueado por los inhibidores de la transcripción y de la síntesis de proteínas. Proponiendo que la acción **no** es a través del mecanismo clásico de la acción de hormonas esteroides;

por interacción de DHEA con receptores intracelulares específicos de hormonas esteroides, sugiriendo que el efecto vasodilatador de DHEA se lleva a cabo por un mecanismo de acción no genómico. A este respecto, se ha reportado que la inhibición de la proliferación de las células vasculares humanas por DHEA no es bloqueado por antagonistas de los receptores de estrógenos y andrógenos, con una afinidad mínima de DHEA a estos receptores intracelulares, mostrando que estos receptores no están involucrados en la acción de DHEA (Williams et al., 2002), asimismo; los esfuerzos para aislar un receptor intracelular para DHEA han fallado (Kawai et al., 1995; Meikle et al., 1992; Okabe et al., 1995; Kalimi y Regelson, 1988). Otro argumento que apoya la acción no genómica es el hecho de que el efecto es inmediato y desaparece cuando DHEA se retira del tejido.

El preciso mecanismo de acción no genómico de DHEA no ha sido establecido. Sin embargo, un estudio previo del efecto de este esteroide sobre las corrientes de potasio en células cultivadas y aisladas de arteria pulmonar ha propuesto que DHEA es un activador de los canales de potasio relacionados a los canales de calcio (K_{Ca}) en la vasculatura pulmonar del hurón (Farrukh et al., 1998). Por otro lado, en un trabajo previo se ha hipotetizado que DHEA activa la producción de ON en células endoteliales por un receptor membranal específico acoplado a la proteína G (Liu y Dillon, 2002). Sin embargo, este postulado está aún en consideración, debido a que el estudio no aisló o caracterizó el supuesto receptor membranal.

c) Implicaciones fisiológicas

DHEA y su éster sulfatado (SDHEA) son los productos más abundantes de la corteza adrenal y los niveles séricos declinan drásticamente después de los 30 años en ambos sexos (Carlström et al., 1988; Sulcová et al., 1997). El exacto papel fisiológico de DHEA es desconocido, pero debido a los múltiples beneficios que se le han atribuido a esta hormona, entre los que se encuentran los beneficios cardiovasculares, esta hormona ha provocado un gran interés en la comunidad científica. Puntualmente, en el sistema cardiovascular y dado a que DHEA es enzimáticamente metabolizada a andrógenos y estrógenos, no es claro si DHEA ejerce directamente el efecto relajante o si el beneficio se presenta después de la conversión. hacia esteroides masculinos y femeninos, los cuales han sido considerados como protectores del sistema vascular por inducir vasodilatación. Los presentes datos muestran que el esteroide adrenal, DHEA, produce *per se* un efecto vasodilatador, por el corto tiempo en el que se observa el efecto y que es aún más potente que el inducido por varios de sus derivados. Así, el efecto vasodilatador de DHEA podría ser potenciado y/o sinergizado con el de sus metabolitos. Por lo que, se infiere que la deficiencia de DHEA, particularmente en los hombres, con la consecuente disminución en la síntesis de esteroides sexuales, implica una falla en la regulación del tono vasomotor y por ende, el individuo es susceptible a problemas vasculares como la hipertensión arterial. De tal manera que esta hormona juega un papel central en la regulación del sistema cardiovascular, impidiendo la vasoconstricción.

En resumen, DHEA, una hormona producida endogenamente, induce vasorelajación en la aorta torácica aislada de rata por un mecanismo no genómico

e independiente del endotelio vascular. Por los escasos datos sobre la caracterización del efecto de DHEA sobre la circulación sistémica, los presentes resultados contribuyen al conocimiento de la acción relajante de esta hormona en el músculo liso vascular.

VIII. CONCLUSIONES

- 1) DHEA ejerce un agudo efecto vasodilatador dependiente de la concentración, en la aorta torácica aislada de rata. Por el corto tiempo en el que se observa el efecto se descarta que la vasodilatación sea producida por sus derivados.
- 2) La configuración 3β -hidroxi- $\Delta 5$ de DHEA es mejor que la configuración $\Delta 4$ -3ceto para inducir vasorelajación. Sin embargo, la potencia se optimiza si el compuesto es 5β -reducido.
- 3) El efecto vasodilatador de DHEA no es mediado a través del clásico mecanismo de unión al receptor intracelular de esteroides, relacionado con las vías de transducción. Postulando que la vasodilatación de DHEA es un efecto de tipo no-genómico.
- 4) La modificación de la producción de óxido nítrico no está involucrada en el efecto no-genómico de DHEA para inducir vasodilatación y parece ser un efecto independiente del endotelio vascular.
- 5) El papel "protector" atribuido a DHEA en el desarrollo de ECV, podría deberse a su capacidad de regular el tono vascular y de transformarse a otros compuestos que podrían sinergizar o potenciar la acción de su precursor.

IX. REFERENCIAS

- Arlt, W., Callies, F., Koehler, I., Van Vlijmen, J., Fassnacht, M., Strasburger, C., Seibel, M., Huebler, D., Ernst, M., Oettel, M., Reincke, M., Schulte, H., Allolio, B. (2001). Dehydroepiandrosterone supplementation healthy with an age-related decline of dehydroepiandrosterone secretion. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86: 4686-4692.
- Barbagallo, M., Shan, J., Pang, P., Resnick, L. (1995). Effects of dehydroepiandrosterone sulfate on cellular responsiveness and vascular contractility. *Hypertension.* 26: 1065-1069.
- Barbagallo, M., Dominguez, L., Licata, G., Shan, J., Bing, L., Karpinski, EE., Pang, P., Resnik, L. (2001). Vascular effects of progesterone. Role of cellular calcium regulation. *Hypertension.* 37: 142-152.
- Barret-Connor, E., Khaw, K., Yen, S. (1986). A prospective study of dehydroepiandrosterone sulfate, mortality and cardiovascular disease. *New. Engl. J. Med.* 315: 1519-1524.
- Barret-Connor, E., Goodman-Gruen, D. (1991). The epidemiology of DHEAS and cardiovascular disease. *Am. J. Physiol.* 261: L156-L163.
- Bishop-Bailey, D., Larkin, S., Warner, TD., Chen, G., Mitchell, J. (1997). Characterization of the induction of nitric oxide synthase and cyclo-oxygenase in rat aorta in organ culture. *Br. J. Pharmacol.* 121: 125-133.
- Burt, V., Whelton, P., Brown, C., Cutler, J., Higgins, M., Horan, M., Labarthe, D. (1995). Prevalence of hypertension in the US adult population. *Hypertension.* 25: 305-313.
- Carlström, K., Brody, S., Lunell, N-O, Lagrelius, A., Möllerström, G., Pousette, A., Rannevik, G., Stege, R., Von Schoultz, B. (1988). Dehydroepiandrosterone sulphate and dehydroepiandrosterone in serum: differences related to age and sex. *Maturitas.* 10: 297-306.
- Chan, H., Yao, X., Tsang, S., Chan, F., Lau, C., Huang, Y. (2001). Different role endothelium/nitric oxide in 17 β -estradiol-and progesterone-induced relaxation in rat arteries. *Life. Sci.* 69: 1609-1617.

- Colditz, G., Willett, W., Stampfer, M., Rosner, B., Speizer, F., Hennekens, C. (1987). Menopause and risk of coronary heart disease in women. *New England J. Med.* 316: 1105-1110.
- Corpéchet, C., Robel, P., Axelson, M., Sjövall, J., Baulieu, E-E. (1981). Characterization and measurement of dehydroepiandrosterone sulphate in rat brain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 78:4704-4707.
- Costarella, C., Stallone, J., Rutecki, W., Whittier, F. (1996). Testosterone causes direct relaxation of rat thoracic aorta. *J Pharmacol. Exp. Ther.* 277: 34-39.
- Crews, JK., Khalil, RA. (1999). Antagonistic effects of 17β -estradiol, progesterone and testosterone on Ca^{2+} entry mechanisms of coronary vasoconstriction. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 19: 1034-1040.
- Deenadayalu, V., White, RE., Stallone, JN., Gao, X., Garcia, AJ. (2001). Testosterone relaxes coronary arteries by opening the large-conductance, calcium-activated potassium channel. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 281: H1720-H1727.
- Dubey, R., Jackson, E. (2001). Genome and hormones: Gender differences in physiology invited review: Cardiovascular protective effects of 17β -estradiol metabolites. *J. Appl. Physiol.* 91: 1868-1883.
- Eich, D., Nestler, J., Johnson, D., Dworkin, G., Daijin Ko., Wechsler, A., Hess, M. (1993). Inhibition of accelerated coronary atherosclerosis with dehydroepiandrosterone in the heterotopic rabbit model of cardiac transplantation. *Circulation.* 87: 261-269.
- English, KM., Jones, RD., Jones, TH., Morice, AH., Channer, KS. (2001). Gender differences in the vasomotor effects of different steroid hormones in rat pulmonary and coronary arteries. *Horm. Metab. Res.* 33: 645-652.
- Falany, C., Comer, K., Dooley, T., Glatt, H. (1996). Human dehydroepiandrosterone sulfotransferase. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 774: 59-72.

- Farrukh, I., Peng, W., Orlinska, U., Hoidal, J. (1998). Effects of dehydroepiandrosterone on hypoxic pulmonary vasoconstriction: a Ca^{2+} -activated K^{+} -channel opener. *Am. J. Physiol.* 274: L186-L195.
- Gilligan, D., Quyyumi, A., Cannon, R. (1994). Effects of physiological levels of estrogen on coronary vasomotor function in postmenopausal women. *Circulation.* 89: 2545-2551.
- Glusa, E., Gräser, T., Wagner, S., Oettel, M. (1997). Mechanisms of relaxation of rat aorta in response to progesterone and synthetic progestins. *Maturitas.* 28: 181-191.
- Gordon, G., Bush, D., Weisman, H. (1988). Reduction of atherosclerosis by administration of dehydroepiandrosterone: A study in the hypercholesterolemic New Zealand white rabbit with aortic intimal injury. *J. Clin. Invest.* 82: 712-720.
- Grodstein, F., Stampfer, M., Manson, J., Colditz, G., Willett, W., Rosner, B., Speizer, F., Hennekens, C. (1996). Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease. *N. Engl. J. Med.* 335: 453-461.
- Guetta, V., Cannon III, R. (1996). Cardiovascular effects of estrogen and lipid-lowering therapies in postmenopausal women. *Circulation.* 93: 1928-1937.
- Haffner, S., Newcomb, P., Marcus, P., Klein, B., Klein, R. (1995). Relation of sex hormones and dehydroepiandrosterone sulfate (DHEA-SO_4) to cardiovascular risk factors in postmenopausal women. *Am. J. Epidemiol.* 142: 925-934.
- Hayashi, T., Esaki, T., Muto, E., Kano, H., Asai, Y., Thakur, N., Sumi, D., Jayachandran, M., Iguchi, A. (2000). Dehydroepiandrosterone retards atherosclerosis formation through its conversion to estrogen: The possible role of nitric oxide. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 20: 782-792.
- Honda, H., Unemoto, T., Kogo, H. (1999). Different mechanisms for testosterone induced relaxation of aorta between normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 34: 1232-1236.

- Howard, J. M. (1996). Dehydroepiandrosterone, melatonin, & testosterone in human evolution. Tomado de <http://gator.naples.net/~nfn03605/dheamela.htm>
- INEGI/SSA. (2000). Estadísticas de mortalidad en mujeres y hombres, elaborado a partir de la base de datos de defunciones.
- Jiang, C., Sarrel, P., Lindsay, D., Poole-Wilson, P., Collins, P. (1991). Endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery by 17 β -estradiol *in vitro*. *Br. J. Pharmacol.* 104: 1033-1037.
- Jiang, C., Sarrel, P., Lindsay, D., Poole-Wilson, P., Collins, P. (1992). Progesterone induces endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery *in vitro*. *Eur. J. Pharmacol.* 211: 163-167.
- Kalimi, M., Regelson, W. (1988). Physiocochemical characterization of [3 H] DHEA binding in rat liver. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 156: 22-29.
- Kang, S., Jang, Y., Kim, JY., Chung, N., Cho, SY., Chae, JS., Lee, JH. (2002). Effects of oral administration of testosterone on brachial arterial vasoreactivity in men with coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* 89: 862-864.
- Kawai, S., Yahata, N., Nishida, S., Nagai, K., Mizushima, Y. (1995). Dehydroepiandrosterone inhibits B16 mouse melanoma cell growth by induction of differentiation. *Anticancer. Res.* 15: 427-431.
- Khaw, K. (1996). Dehydroepiandrosterone, dehydroepiandrosterone sulphate and cardiovascular disease. *J. Endocrinol.* 150: S149-S153.
- Kroboth, P., Salek, F., Pittenger, A., Fabian, T., Frye, R. (1999). DHEA and DHEA-S: A review. *J. Clin. Pharmacol.* 39: 327-348.
- Labrie, F., Bélanger, A., Simard, J., Luu-The, V., Labrie, C. (1996a). DHEA and peripheral androgen and estrogen formation: Intracrinology. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 774: 17-28.

- Labrie, C., Bélanger, A., Labrie, F. (1996b). High bioavailability of dehydroepiandrosterone administered percutaneously in the rat. *J. Endocrinol.* 150: S107-S118.
- Labrie, F., Bélanger, A., Cusan, L., Gómez, JL., Candas, B. (1997a). Marked decline in serum concentrations of adrenal C19 sex steroid precursors and conjugated androgen metabolites during aging. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82: 2396-2402.
- Labrie, F., Bélanger, A., Cusan, L., Candas, B. (1997b). Physiological changes in dehydroepiandrosterone are not reflected by serum levels of active androgens and estrogens but of their metabolites: *Intracrinology*. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82: 2403-2409.
- Lasco, A., Morabito, N., Gaudio, A., Morini, E., Trifiletti, A., Basile, G., Nicita-Mauro, Cucinotta, D. (2001). Metabolic effects of dehydroepiandrosterone replacement therapy in postmenopausal women. *Eur. J. Endocrinol.* 145: 457-461.
- LeBlanc, M., Labrie, C., Bélanger, A., Candas, B., Labrie, F. (2002). Pharmacokinetics of oral dehydroepiandrosterone (DHEA) in the ovariectomised cynomolgus monkey. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 81: 159-164.
- Lerner, D., Kannel, W. (1986). Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: A 26-year follow-up of the Framingham population. *Am. Heart. J.* 11: 383-390.
- Litchfield, J. T., Wilcoxon, F. A. (1949). A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 96: 99-113.
- Liu, D., Dillon, J. (2002). Dehydroepiandrosterone activates endothelial cell nitric-oxide synthase by a specific plasma membrane receptor coupled to Galpha (i2-3). *J. Biol. Chem.* 277: 21379-21388.
- Longcope, C. (1996). Metabolism of dehydroepiandrosterone. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 774: 143-148.

- Martin, K., Freeman, M. (1993). Postmenopausal hormone-replacement therapy. *New. Engl. J. Med.* 328: 1115-1117.
- Matthews, K., Meilahn, E., Kuller, L., Kelsey, S., Caggiula., Wing, R. (1989). Menopause and risk factors for coronary and heart disease. *N. Engl. J. Med.* 321: 641-646.
- Meikle, A., Dorchuck, R., Araneo, B., Stringham, J., Evans, T., Spruance, S., Daynes, R. (1992). The presence of a dehydroepiandrosterone-specific receptor binding complex in murine T cells. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 42: 293-304.
- Migeon, C., Plager, J. (1954). Identification and isolation of dehydroisoandrosterone from peripheral human plasma. *J. Biol. Chem.* 209: 767-772.
- Mitchell, L., Sprecher, D., Borecki, I., Rice, T., Laskarzewski, P., Rao, D. (1994). Evidence for an association between dehydroepiandrosterone sulfate and nonfatal premature myocardial infarction in males. *Circulation.* 89: 89-93.
- Morales, A., Nolan, J., Nelson, J., Yen, S. (1994). Effects of replacement dose of dehydroepiandrosterone in men and women of advancing age. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 78: 1360-1367.
- Mortola, J., Yen, S. (1990). The effects of oral dehydroepiandrosterone on endocrine-metabolic parameters in postmenopausal women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 71: 696-704.
- Munson, P., Gallagher, T., Koch, F. (1944). Isolation of dehydroepiandrosterone sulfate from normal male urine. *J. Biol. Chem.* 152: 67-77.
- Murray, R., Mayes, P., Granner, D., Rodwell, V. (1994). *Bioquímica de Harper. Manual Moderno, 13ª edición.*
- Nawata, H., Yanase, T., Goto, K., Okabe, T., Ashida, K. (2002). Mechanism of action of anti-aging DHEA-S and the replacement of DHEA-S. *Mech. Ageing. Dev.* 123: 1101-1106.

- Nestler, J., Barlascini, C., Clore, J., Blackard, W. (1988). Dehydroepiandrosterone reduces serum low density lipoprotein levels and body fat does not alter insulin sensitivity in normal men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 66: 57-61.
- Okabe, TT., Haji, M., Takayanagi, R., Adachi, M, Imasaki, K., Kurimoto, F., Watanabe, T., Nawata, H. (1995). Up-regulation of high-affinity dehydroepiandrosterone binding activity by dehydroepiandrosterone in activated human T lymphocytes. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* 80: 2993-2996.
- Osorio, A., Gutiérrez, MA., Ortega, E., Ruiz-Requena, E. (2002). Dehydroepiandrosterone sulfate and growth axis hormones in patients with ischemic heart disease. *Horm. Res.* 57: 165-169.
- Parker, C. Mahesh, V. (1977). Dehydroepiandrosterone (DHA) induced precocious ovulation: correlative changes in blood steroids, gonadotropins and cytosol estradiol receptors of anterior pituitary gland and hypothalamus. *J. Steroid. Biochem.* 8: 173-177.
- Perusquía, M., Hernández, R., Morales, M., Campos, M., Villalón, C. (1996). Role of endothelium in the vasodilating effects of progestins and androgens on the rat thoracic aorta. *Gen. Pharmacol.* 27: 181-185.
- Perusquía, M., Hernández, R. (1998). Enfermedades cardiovasculares y hormonas esteroides. *Ciencia y Desarrollo.* 138: 19-23.
- Perusquía, M., Villalón, CM. (1999). Possible role of Ca^{2+} channels in the vasodilating effects of 5β -dihydrotestosterone in rat aorta. *Eur. J. Pharmacol.* 371: 169-178.
- Perusquía, M., Villalón, CM. (2002). The vasodepressor effect of androgens in pithed rats: potential role of calcium channels. *Steroids.* 67(13-14): 1027-1034.
- Perusquía, M. (2002). Mini-review: Androgen-induced vasorelaxation: a potential vascular protective effects. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes (En prensa).*

- Regelson, W., Loria, R., Kalimi, M. (1988). Hormonal intervention: "buffer hormones" or "state dependency". The role of dehydroepiandrosterone (DHEA), thyroid hormone, estrogen and hypophysectomy in aging. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 521: 260-273.
- Regelson, W., Kalimi, M., Loria, R. (1990). Dehydroepiandrosterone (DHEA): The precursor steroid. Introductory remarks. In: Kalim, M., Regelson, W. (Eds), *The biologic role of dehydroepiandrosterone (DHEA)*. Walter de Gruyter/New York, pp. 1-6.
- Robel, P., Schumacher, M., Baulieu, E-E. (1999). Neurosteroids: from definition and biochemistry to physiopathologic function. *Contemporary Endocrinology: Neurosteroids: A new regulation function in the nervous system*. Human Press. Chapter 1: 1-26.
- Salas, E., López, M., Villaroya, M., Sánchez-García, P., De Pascual, R., Dixon, W., García, A. (1994). Endothelium-independent relaxation by 17- α -estradiol of pig coronary arteries. *Eur. J. Pharmacol.* 258: 47-55.
- Shafagoj, Y., Opuku, J., Qureshi, D., Regelson, W., Kalimi, M. (1992). Dehydroepiandrosterone prevents dexamethasone-induced hypertension in rats. *Am. J. Physiol.* 203: E210-E213.
- Shulman, L. (2002). Effects of progestins in different hormone replacement therapy formulations on estrogen-induced lipid changes in postmenopausal women. *Am. J. Cardiol.* 89: 47E-55E.
- Stampfer, M., Colditz, G., Willett, W., Manson, J., Rosner, B., Speizer, F., Hennekens, C. (1991). Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. *New. Engl. J. Med.* 325: 756-762.
- Sulcová, J., Hill, M., Hampl, R., Stárka, L. (1997). Age and sex differences in serum levels of unconjugated dehydroepiandrosterone and its sulphate in normal subjects. *J. Endocrinol.* 154: 57-62.
- Sullivan, Y., Zwaag, R., Lemp, G., Hughes, J., Maddock, V., Kroetz, F., Ramanathan, K., Mirvis, D. (1990). Postmenopausal estrogen use coronary atherosclerosis. *Ann. Inn. Med.* 108: 358-363.

- Teoh, H., Quan, A., Man, RY. (2000). Acute impairment of relaxation by low levels of testosterone in porcine coronary arteries. *Cardiovasc. Res.* 45: 1010-1018.
- Tep-areenan, P., Kendall, D., Randall, M. (2002). Testosterone-induced vasorelaxation in the rat mesenteric arterial bed is mediated predominantly via potassium channels. *Br. J. Pharmacol.* 135: 735-740.
- Volterrani, M., Rosano, G., Coats, A., Beale, C., Collins, P. (1995). Estrogen acutely increases peripheral blood flow in postmenopausal women. *Am. J. Med.* 99: 119-122.
- Wiinberg, N., Hoegholm, A., Christensen, H., Bang, L., Mikkelsen, K., Nielsen, P., Svendsen, T., Kampmann, J., Madsen, N., Bentzon, M. (1995). 24-h Ambulatory blood pressure in 352 normal Danish subjects, related to age and gender. *Am. J. Hypertens.* 8: 978-986.
- Williams, J., Adams, M., Klopfenstein, S. (1990). Estrogen modulates responses of atherosclerotic coronary arteries. *Circulation.* 81: 1680-1687.
- Williams, MR., Ling, S., Dawood, T., Hashimura, K., Dai, A., Li, H., Liu, JP., Funder, JW., Sudhir, K., Komesaroff, PA. (2002). Dehydroepiandrosterone inhibits human vascular smooth muscle cell proliferation independent of ARs and ERs. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87: 176-181.
- Wilson, J., Foster, D., Kronenberg, H., Larson, P. (1998). *Williams textbook of endocrinology.* W. B. Saunders Company. 9th edition. Reference values.
- Yen, S., Morales, A., Khorram, O. (1996). Replacement of DHEA in aging men and women. Potential remedial effects. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 774: 128-142.
- Yue, P., Chatterjee, K., Beale, C., Poole-Wilson, Collins, P. (1995). Testosterone relaxes rabbit coronary arteries and aorta. *Circulation.* 91: 1154-1163.
- Yoneyama, A., Kamiya, Y., Kawaguchi, M., Fujinami, T. (1997). Effects of dehydroepiandrosterone on proliferation of human aortic smooth muscle cells. *Life. Sci.* 60: 833-838.