



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
"ZARAGOZA"

"ESTUDIO SOBRE EL MECANISMO DE ACCIÓN DEL AGUDO
EFECTO VASODILATADOR DE LAS HORMONAS ESTEROIDES EN
LA ARTERIA UMBILICAL HUMANA"

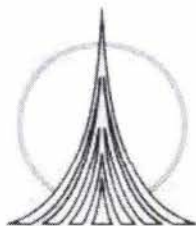
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA:
JOEL GARCÍA DÍAZ

DIRECTOR DE TESIS: DRA. MERCEDES PERUSQUÍA NAVA

ASESOR DE TESIS: M en C. ÁNGEL GARCÍA SÁNCHEZ



MÉXICO, DF.

2004.



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.

LUGAR DONDE SE DESARROLLÓ LA TESIS

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

APOYO RECIBIDO

La presente Tesis fue financiada por la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), mediante el Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT), proyecto IN221102-2: “Efecto de andrógenos sobre la actividad contráctil del miometrio y la arteria umbilical del humano”.

AGRADECIMIENTOS

A mi Directora de Tesis, la Dra. Mercedes Perusquía Nava, por abrirme las puertas de su laboratorio, habiendo depositado su confianza en mí para compartir su conocimiento y su tiempo, conduciéndome con paciencia y dedicación hasta la culminación de este proyecto.

A mi Asesor de Tesis, el M en C. Ángel García Sánchez, por haber sido parte fundamental de mi formación profesional, por su apoyo incondicional y su completa disposición para brindarme sus valiosas observaciones durante la realización de la presente Tesis.

Al Dr. Jaime Eduardo Calixto González, por el compromiso demostrado en su invaluable apoyo académico, sin escatimar tiempo y dedicación, así como por el apoyo brindado en la obtención de las muestras utilizadas.

Al M en C. Jaime Jasso-Kamel, por su oportuna colaboración en la obtención de las muestras necesarias para finalizar la fase experimental.

A la Bióloga Erika Navarrete Monroy, por su asesoría técnica, académica y logística y por haber forjado en mí la disciplina necesaria para la realización de este proyecto.

A Irma Rodríguez García, por su apoyo técnico y administrativo y sus valiosos consejos que hicieron de mí una mejor persona.

A mis compañeros de laboratorio: David Barrera Hernández, Moisés Antón Castillo, Rosalba Toledo Torres, Patricia Elizabeth López Bistrain, Leonardo Alejandro Santana Álvarez y Juana Trejo González, por haberme permitido realizar mi Tesis dentro de un ambiente de colaboración y compañerismo.

A Guadalupe Ruiz Rentería, Azucena Ayala Pichardo e Isabel Reyes Hernández, por su disposición y calidad humana al brindarme su apoyo.

Al Hospital General de Zona # 98 del IMSS, por las facilidades otorgadas para la obtención de los cordones umbilicales utilizados en este proyecto.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA), por la beca otorgada para la realización de la presente Tesis.

Al Instituto de Investigaciones Biomédicas, por las instalaciones y servicios utilizados durante la realización del proyecto.

A la Facultad de Estudios Superiores “Zaragoza”, por ser la cuna de mi formación profesional y humana.

A la Universidad Nacional Autónoma de México, por permitirme el honor de formar parte de su comunidad.

DEDICATORIAS

A mis padres, José García Luna y Guadalupe Díaz Linas, con todo mi amor, respeto y agradecimiento, esto es la culminación de un sueño que no hubiera sido posible sin ustedes. Papá: eres el mejor ejemplo de como un hombre puede superarse. Mamá: gracias por permitirme ser tu amigo antes que tu hijo.

A mis hermanos: Alfredo, José, Juan, Silvia, Guadalupe, Margarita y en especial a Eugenio, gracias por su cariño y su apoyo en todo momento. Son la mejor familia que pude haber tenido.

A mis sobrinos: Rocío, Sara, Oscar, Imelda, Alfonso, Noemí, Ana, Heriberto, José Carlos, Ángel, Hugo, José Guadalupe, Estefanía, Roberto, Montserrat y al recién angelito. Gracias a todos ellos por su cariño y por recordarme al niño que nunca dejamos de ser. Luchen por alcanzar sus sueños, aún por lejanos que parezcan.

A mis amigos: Ianet, Maribel, Araceli, Víctor, Alejandro, Eduardo, Octavio, Cesar, Cecilia, Ada, Elizabeth, Leonardo, Juana Rocío y Juan Manuel. La vida me regalo el placer de conocerlos, sirva hoy esta mención para compartir mi alegría y agradecerles su amistad.

Perla, gracias por todo lo que dejaste en mi alma, es un mar donde me sumerjo para extraer la fuerza que me heredaste. Mucho de lo que hoy soy se debe a ti.

Mi ángel medieval, gracias por atreverte a vivir a mi lado. No concibo mi existencia sin ti y no hay más verdad que tu sonrisa en mi mente. Gracias a ti, el mundo es hoy de color azul de medianoche. TE AMO, más de lo que las palabras puedan expresar.

*“Sería muy poco el atractivo que nos ofrece el conocimiento
si no hubiera que vencer tantos obstáculos,
tanto pudor, para alcanzarlo.”*

Friedrich Nietzsche

Los datos de la presente Tesis fueron parcialmente presentados en:

X Congreso de Carteles "Dr. Lino Díaz de León".

Instituto de Investigaciones Biomédicas, UNAM., 18 de Junio del 2004. **"Participación de los canales de K^+ y Ca^{2+} en el efecto vasodilatador de esteroides sexuales en la arteria umbilical humana"**. García J, Navarrete E y Perusquía M.

ÍNDICE

1.	RESUMEN	1
2.	INTRODUCCIÓN	2
	2.1. Generalidades	2
	2.2. Acción de los esteroides en el sistema cardiovascular	3
	2.3. Efecto vasodilatador de los estrógenos.	4
	2.4. Efecto vasodilatador de las progestinas.	5
	2.5. Efecto vasodilatador de los andrógenos.	7
	2.6. Mecanismo de acción del efecto vasodilatador de los diferentes grupos de esteroides sexuales.	10
	2.7. Regulación del tono vasomotor del cordón umbilical	12
	2.8. Efecto de los esteroides sexuales en los vasos sanguíneos del cordón umbilical	15
3.	JUSTIFICACIÓN	18
4.	HIPÓTESIS	19
5.	OBJETIVOS	20
6.	MATERIAL Y MÉTODOS	22
	6.1. Población de estudio, criterios de inclusión y exclusión.	22
	6.2. Colecta de las muestras de estudio.	22
	6.3. Disección y montaje de la arteria umbilical humana.	23
	6.4. Sistema de registro de la actividad contráctil de la arteria umbilical humana.	24
	6.5. Protocolo experimental.	26

a) Efecto de los bloqueadores de los canales de K ⁺ en la vasorelajación inducida por las hormonas esteroides sobre la contracción inducida por KCl 40 mM.	26
b) Caracterización de la respuesta contráctil a 5-HT.	28
c) Efecto vasorelajante de las hormonas esteroides sobre la contracción inducida por 5-HT.	29
d) Prevención de la contracción de Ca ²⁺ en tejido despolarizado por hormonas esteroides.	30
6.6. Evaluación y Análisis Estadístico.	31
6.7. Compuestos.	32
7. RESULTADOS	33
7.1. Efecto de los bloqueadores de los canales de K ⁺ en la vasorelajación inducida por las hormonas esteroides sobre la contracción con 40 mM.	33
7.2. Caracterización de la respuesta contráctil a 5-HT.	35
7.3. Efecto vasorelajante de las hormonas esteroides sobre la contracción inducida por 5-HT.	38
7.4. Comparación del efecto vasorelajante de los esteroides sobre la contracción inducida por KCl 40 mM vs. la contracción inducida por 5-HT 10 μM.	41
7.5. Efecto de los esteroides sobre la contracción de CaCl ₂ en arteria despolarizada.	44

8.	DISCUSIÓN	46
	8.1. General.	46
	8.2. Mecanismo de acción.	47
	8.3. Potencia.	52
	8.3. Implicaciones fisiológicas.	53
9.	CONCLUSIONES	55
10.	REFERENCIAS	56
	ANEXO	71

1. RESUMEN

Se ha reportado un agudo efecto vasodilatador producido por estrógenos, progestinas y andrógenos en diferentes lechos vasculares de varias especies de animales experimentales, mientras que en la vasculatura humana existen pocos datos sobre su efecto vasodilatador. En consecuencia, el mecanismo de la acción vasodilatadora que producen los esteroides es aún incierto. Los datos disponibles enmarcan dos propuestas importantes para explicar la acción vasodilatadora de los esteroides: (i) una activación de los canales de K^+ y/o (ii) una inactivación de los canales de Ca^{2+} . Por lo anterior, el presente proyecto pretende esclarecer la participación tanto de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} (K_{Ca}), operados por voltaje (K_V) y sensibles al ATP (K_{ATP}) como de los canales de Ca^{2+} operados por voltaje (CCOV) y operados por receptor (CCOR) en la acción vasodilatadora que los esteroides inducen sobre el tono vasomotor de la arteria umbilical humana. Se utilizaron anillos arteriales provenientes de cordones umbilicales obtenidos de partos transvaginales de embarazos normales a término y la actividad contráctil se registró mediante la técnica isométrica convencional para tejido aislado. Se registró una contracción tónica sostenida inducida por KCl 40 mM y la respuesta relajante que inducen diferentes esteroides, a la concentración equimolecular de 120 μ M, fue evaluada en presencia de los bloqueadores de los canales de K^+ : tetraetilamonio (TEA), 4-aminopiridina (4-AP) y glibenclamida (Gly), adicionados cada uno por separado. Los esteroides de estudio (dehidroepiandrosterona, DHEA; progesterona, P_4 ; testosterona, T_4 ; 5α -dihidrotestosterona, 5α -DHT y 5β -dihidrotestosterona, 5β -DHT) fueron elegidos con base a su potente efecto vasodilatador reportado en trabajos previos. Por otra parte, se caracterizó la respuesta contráctil a serotonina (5-HT) y se determinó la concentración de 10 μ M como la óptima para desplegar una contracción tónica sostenida. Sobre dicha contracción, se analizó la respuesta inhibitoria producida por las diferentes hormonas esteroides a 120 μ M (probadas por separado y de forma no acumulativa). En otros tejidos, previamente despolarizados con KCl 40 mM en medio libre de Ca^{2+} , se adicionaron diferentes concentraciones (6, 12, 60 y 120 μ M) de 5β DHT, 10 min antes de inducir una contracción con $CaCl_2$ 2.5 mM. Los resultados mostraron que: i) las hormonas esteroides fueron capaces de vasodilatar diferentes tipos de contracturas, estableciéndose ordenes de potencia tanto para la contractura de KCl: 5β -DHT > DHEA > T_4 > P_4 > 5α -DHT, como para la contractura de 5-HT: DHEA \geq 5β -DHT > P_4 \geq T_4 > 5α -DHT. Este análisis mostró que la contracción a KCl es más sensible al efecto vasodilatador de las hormonas. ii) el efecto vasodilatador de los esteroides probados no fue inhibido por ninguno de los bloqueadores de los canales de K^+ y iii) 5β -DHT a 120 μ M abolió fuertemente (95.28 ± 5.76 %) la contracción inducida por $CaCl_2$ 2.5 mM en tejidos despolarizados. Los resultados del presente estudio muestran que las hormonas esteroides son sustancias vasoactivas al inhibir los diferentes tipos de contracturas (KCl, 5-HT y $CaCl_2$) en la arteria umbilical humana. En este estudio se descarta la participación de los canales de K^+ en el modo de la acción vasodilatadora de esteroides y los datos sugieren que el mecanismo de acción es sustentado por una acción Ca^{2+} antagónica, principalmente a través del bloqueo de los CCOV. Por otra parte, la elevada potencia vasorelajante de DHEA y en particular de 5β -DHT, proponen a la configuración 3β -hidroxi- Δ^5 y a la 5β reducción, respectivamente, como las estructuras de mayor eficacia vasorelajante. Estos hallazgos permitirán contribuir al conocimiento de la acción vasodilatadora de las hormonas esteroides en la fisiología del embarazo, con beneficio directo en la reducción de la mortalidad perinatal.

2. INTRODUCCIÓN

2.1. Generalidades.

Las hormonas esteroides son lípidos insaponificables derivados del colesterol, basados en un esqueleto de cuatro anillos de carbono fusionados (A, B, C y D), denominado ciclopentanoperhidrofenantreno (Fig. 2.1). Difieren entre sí, por el tipo, número, localización y configuración (α o β) de sus grupos funcionales sustituyentes y la posición de sus dobles enlaces. Los principales puntos de sustitución son el C3 del anillo A, el C11 del anillo C y el C17 del anillo D (Lehninger, 1995). Se encuentran clasificados en cinco categorías: progestinas, glucocorticoides y mineralocorticoides con 21 átomos de C, andrógenos con 19 y estrógenos con 18 (Voet et al., 2002).

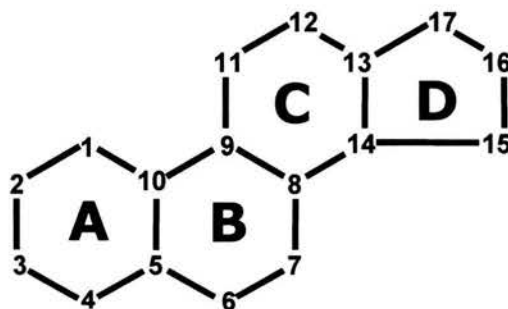


Figura 2.1. Estructura del ciclopentanoperhidrofenantreno, esqueleto básico de todas las hormonas esteroides.

Aún cuando los diferentes grupos de hormonas esteroides son estructuralmente similares, desde el punto de vista fisiológico, sus acciones biológicas son muy variadas e incluyen principalmente: la modulación del metabolismo (carbohidratos, proteínas y lípidos), la conservación del equilibrio de líquidos y electrolitos y el desarrollo de las características sexuales secundarias propias de cada género. En el caso de la mujer, regulan procesos muy importantes como la ovulación, el ciclo menstrual, el embarazo, el parto y la lactancia (Schmidt y Thews, 1993; Voet et al., 2002). Además, participan en diversos procesos en los sistemas: genital, inmunitario, muscular, óseo, endocrino, nervioso y cardiovascular, (Laguna y Piña, 2001; Voet et al., 2002).

2.2. Acción de los esteroides sexuales en el sistema cardiovascular.

Referente a la participación de las hormonas esteroides en el sistema cardiovascular, la conexión existente son los estudios epidemiológicos sobre las enfermedades cardiovasculares (ECV), estos padecimientos se han convertido en uno de los principales problemas de salud más comunes en la población mundial. Se ha reportado que la incidencia de las ECV es mayor en hombres entre 30 a 50 años de edad, comparada con mujeres de la misma edad (Wingard et al., 1983; Levy y Kannel, 1988; Farhat et al., 1996; Jousilahti et al., 1999). En las mujeres, la incidencia de ECV es mayor en el período posmenopáusico que antes de la menopausia (Kannel et al., 1976; Lerner y Kanel, 1986; Wittemen et al., 1989). Asimismo, también ha sido reportado que la terapia de reemplazamiento hormonal, con estrógenos y progestinas, en mujeres posmenopáusicas reduce (aproximadamente 50%) la morbilidad y mortalidad causada por estos padecimientos (Henderson et al., 1991; Grady et al., 1992; Ettinger et al., 1996;

Barret-Connor, 1998). Así, las evidencias anteriores señalan un claro dimorfismo sexual, dirigido a un efecto benéfico de los estrógenos sobre el desarrollo de ECV y dando lugar a la creciente investigación sobre su acción cardioprotectora.

Es evidente el efecto preventivo de los estrógenos (esteroides sexuales femeninos) sobre los factores de riesgos cardiovasculares, ya que estas hormonas mejoran el perfil de las lipoproteínas circulantes (Stevenson, 1996), el metabolismo de los carbohidratos (Godsland et al., 1993), la coagulación y el sistema fibrinolítico (Bar et al., 1993; Lindoff et al., 1996). Además, reducen la oxidación lipoproteica (Rifici y Khachadurian, 1992), las lesiones ateroscleróticas (Van der Mooren et al., 1998) y la acumulación intravascular de colágeno (Beldekas et al., 1981). El 17β -estradiol (17β -E₂) ha sido el estrógeno más estudiado y sus dos principales efectos cardiovasculares son: la inhibición del crecimiento vascular y la modulación del tono vasomotor (Dubey y Jakson, 2001).

2.3. Efecto vasodilatador de los estrógenos.

En cuanto a la modulación del tono vascular por parte del 17β -E₂, existe un gran número de estudios *in vivo* e *in vitro* que describen la vasodilatación producida por este esteroide en diferentes lechos vasculares de animales experimentales como: la rata (Shan et al., 1994; McNeill et al., 1996; Wellman et al., 1996; Freay et al., 1997; Kitazawa et al., 1997; Le Tran et al., 1997; Vedernikov et al., 1997; Kakucs et al., 1998; Browne et al., 1999; Crews y Khalil, 1999b; Geary et al., 2000b; Shaw et al., 2000, 2001; English et

al., 2001; Chan et al., 2001; Costa Sampaio Moura y Marcondes, 2001; Tep-areenan et al., 2001, 2003b; Abou-Mohamed et al., 2003; Tsang et al., 2003), el ratón (Geary et al., 2000a), el conejo (Gisclard et al., 1988; Jiang et al., 1991, 1992a; Collins et al., 1994; Ogata et al., 1996; Salom et al., 2001, 2002), el cerdo (Han et al., 1995; White et al., 1995; Bell et al., 1995; Darkow et al., 1997; Crews y Khalil, 1999a; Murphy y Khalil, 1999; Teoh et al., 1999, 2000; Bracamonte et al., 2002), la vaca (Kalanic et al., 2000) y la oveja (Magness y Rosenfeld, 1989; Van Buren, 1992; Rosenfeld et al., 2002).

Con respecto a la vasculatura humana, se ha reportado el efecto vasodilatador del 17β -E₂ en preparaciones *in vitro* de arteria coronaria (Mugge et al., 1993; Chester et al., 1995), omental (Belfort et al., 1996) y mamaria (Mugge et al., 1997). También, se ha descrito que 17β -E₂, estrona y estriol inducen vasodilatación en la arteria y vena umbilical (Silva de Sá y Meirelles, 1977; Du et al., 1999; Fausett et al., 1999).

2.4. Efecto vasodilatador de las progestinas.

Con respecto a las progestinas, la vasodilatación producida por esta serie de esteroides ha sido menos estudiada. El efecto vasodilatador que induce la progesterona (P₄) ha sido documentado en diferentes preparaciones vasculares de animales experimentales tanto *in vivo* como *in vitro*: en la rata (Huyton y Leathard, 1991; Perusquía et al., 1996; Glusa et al., 1997; Kakucs et al., 1998; Crews y Khalil, 1999b; Teoh y Man, 1999; Mukerji et al., 2000a, 2000b; Barbagallo et al., 2001; Chan et al., 2001; Costa Sampaio Moura y Marcondes, 2001; English et al., 2001; Zhang et al., 2002), el

cerdo (Crews y Khalil, 1999a; Murphy y Khalil, 1999; Molinari et al., 2001), el conejo (Jiang et al., 1992b; Li et al., 2001), el perro (Miller y Vanhoutte, 1991) y el mono rhesus (Minshall et al., 2002). En el humano, la progesterona ha mostrado un efecto vasorelajante en arterias omentales (Belfort et al., 1996), placentarias (Omar et al., 1995; Ramírez et al., 1998) y umbilicales (Omar et al., 1995; Ramírez et al., 1998; Fausett et al., 1999; Toledo et al., 2003).

En relación al efecto que pueden causar otras progestinas, derivadas de P_4 , existen muy escasas evidencias experimentales. La pregnanolona, un derivado 5β -reducido de la P_4 , puede causar disminución del tono vascular de la aorta torácica de rata (Perusquía et al., 1996). Así, también otros productos 5-reducidos de la P_4 , como pregnandiona, alopregndiona, pregnanolona y alopregnanolona actúan como vasodilatadores de arterias umbilicales y placentarias humanas (Ramírez et al., 1998; Toledo et al., 2003).

En cuanto a las progestinas sintéticas, particularmente las que son usadas en la terapia de reemplazamiento hormonal, las evidencias experimentales sobre un efecto vasodilatador producido por estos compuestos son aún más escasas. Se ha reportado que el acetato de noretisterona y el acetato de clormadinona (Glusa et al., 1997), la noretisterona y sus metabolitos 5α -reducidos: 5α -noretisterona, $3\alpha,5\alpha$ -noretisterona y $3\beta,5\alpha$ -noretisterona (Perusquía et al., 2003), inducen vasodilatación en la aorta torácica de rata. También se ha documentado que levonorgestrol, 3-ceto-desogestrol y gestodeno presentan la capacidad de vasodilatar la vena yugular de conejo (Herkert et al., 2000).

2.5. Efecto vasodilatador de los andrógenos.

El estudio de la influencia de los andrógenos en el sistema cardiovascular ha sido poco explorado. Algunas observaciones le confirieron a la testosterona (T_4) un efecto perjudicial sobre el sistema cardiovascular; por el hecho de que la incidencia de ECV es mayor en hombres entre 30 a 50 años de edad, comparada con mujeres de la misma edad (Wingard et al., 1983; Levy y Kannel, 1988; Farhat et al., 1996; Jousilahti et al., 1999). De manera controversial, se ha asociado a la hipotestosteronemia con el incremento en los factores de riesgo cardiovasculares como: la hipertensión, diabetes, obesidad, etc. (Khaw y Barret-Connor, 1991; English et al., 1997). Aunado a lo anterior, se ha reportado que pacientes con ECV presentan hipotestosteronemia (Phillips et al., 1994; Alexandersen et al., 1996; English et al., 2000b).

Aunado a las evidencias mencionadas, varios estudios han mostrado que la administración de T_4 mejora la perfusión cerebral (Azad et al., 2003) y disminuye la presión arterial en hombres hipogonadales (Zitzmann et al., 2002). En cuanto a los efectos de la terapia con T_4 en hombres con ECV, se ha reportado, desde la década de 1940, los beneficios de la administración de T_4 en pacientes con angina de pecho (Hamm, 1942; Walker, 1942; Levine y Likoff, 1943; Sigler y Tulgan, 1943; Lesser, 1946). Algunos estudios clínicos han reportado la disminución de los síntomas de angina pecho e isquemia, tanto con el tratamiento crónico (Jaffe, 1977; Wu y Weng, 1993; English et al., 2000a), como con la administración aguda de T_4 (Webb et al., 1999a; Rosano et al., 1997, 1999; Thompson et al., 2002).

En los últimos años, se le ha dado atención a los estudios directos del potencial efecto vasodilatador de los andrógenos sobre la vasculatura, observándose una marcada vasodilatación provocada por T_4 en la vasculatura *in vivo* e *in vitro* de la rata (Perusquía et al., 1996; Costarella et al., 1996; Crews y Khalil, 1999b; Honda et al., 1999; Geary et al., 2000b; Ding y Stallone, 2001; English et al., 2001; Tep-areenan et al., 2002, 2003a; Jones et al., 2002), el cerdo (Farhat et al., 1996; Crews y Khalil, 1999a; Murphy y Khalil, 1999; Quan et al., 1999; Deenadayalu et al., 2001), el conejo (Mosranova et al., 1994, Yue et al., 1995; Won et al., 2003), el perro (Chou et al., 1996) y el mono (Adams et al., 1995). Por otra parte, se ha observado que los análogos de la T_4 ; el hemisuccinato de T_4 y el enantato de T_4 , inducen vasodilatación en la aorta de rata (Ding y Stallone, 2001) y conejo (Yue et al., 1995).

En forma colateral, se ha reportado que la T_4 puede inducir vasodilatación en lechos vasculares humanos, como la arteria braquial de hombres con ECV (Ong et al., 2000; Kang et al., 2002), castrados (Herman et al., 1997), transexuales (McCrohon et al., 1997) y en mujeres posmenopáusicas (Worboys et al., 2001). En cuanto a estudios *in vitro* en vasculatura humana con T_4 , las evidencias son extremadamente exiguas. Se ha reportado que la T_4 induce vasodilatación en la arteria umbilical humana (AUH) (Fausett et al., 1999; Toledo et al., 2003). Además, estudios *in vivo* en pacientes con ECV, muestran que la administración de T_4 reduce la presión sanguínea e incrementa el diámetro y el flujo sanguíneo coronario (Beale et al., 1997; Webb et al., 1999b; Rosano et al., 1997, 1999; Ong et al., 2000; Worboys et al., 2001; Kang et al., 2002).

Por otra parte, existen muy pocos hallazgos relacionados con el efecto que otros andrógenos puedan causar sobre el tono vasomotor. Estos reportes muestran que el precursor 3β -hidroxi- Δ^5 - de los andrógenos, dehidroepiandrosterona (DHEA), induce vasodilatación en la aorta torácica de rata (Gupte et al; 2002a; Perusquía y Calixto, 2003), la arteria pulmonar del hurón (Farrukh et al., 1998) y la AUH (Toledo et al., 2003). Además, su derivado sulfatado, el sulfato de dehidroepiandrosterona (SDHEA), también produce vasodilatación en la arteria caudal de rata (Barbagallo et al., 1995) y la arteria oftálmica humana (Hata et al., 1995). En mujeres embarazadas se ha observado incremento del flujo sanguíneo y disminución del índice de pulsatilidad en la arteria uterina y la arteria cerebral media fetal (Revisado por Perusquía y Calixto, 2003).

En cuanto a los metabolitos 5-reducidos de la T_4 , la 5α -dihidrotestosterona (5α -DHT) induce vasorelajación en la aorta torácica de rata (Perusquía et al., 1996) y la arteria coronaria de cerdo (Deenadalayu et al., 2001). En forma notable, su isómero 5β -reducido, la 5β -dihidrotestosterona (5β -DHT), resultó más potente para vasorelajar la aorta torácica de rata, incluso con una mayor potencia que la inducida por 17β - E_2 y P_4 (Perusquía y Villalón, 1999), confirmando su fuerte acción vasodilatadora al disminuir la presión arterial en modelos experimentales *in vivo* (Perusquía y Villalón, 2002). La notable potencia vasodilatadora de 5β -DHT respecto a 5α -DHT, se observa también en la vasodilatación producida sobre la AUH precontraída con KCl (Toledo et al., 2003). Aunado a esto, la androsterona y la eticolanolona son también capaces de producir vasorelajación en la aorta de rata (Ding y Stallone, 2001).

2.6. Mecanismo de acción del efecto vasodilatador de los diferentes grupos de esteroides sexuales.

Las evidencias disponibles han mostrado la capacidad de varios grupos de esteroides (estrógenos, progestinas y andrógenos) para inducir un efecto vasodilatador. Sin embargo, el mecanismo preciso de la acción vasodilatadora que ejercen las hormonas esteroides no ha quedado esclarecido y existen tres hipótesis importantes para explicar dicho evento:

a) una acción indirecta sobre la célula del músculo liso vascular (CMLV), a través de la liberación de factores relajantes derivados del endotelio, como óxido nítrico y prostaglandinas (Miller et al. 1988; Gisclard et al., 1988; Miller y Vanhoutte, 1991; Van Buren et al., 1992; Collins et al., 1994; Bell et al., 1995; Wellman et al., 1996; Darkow et al., 1997; Geary et al., 2000a, 2000b; Molinari et al., 2000; Costa Sampaio Moura y Marcondes, 2001; Chan et al., 2001; Bracamonte et al., 2002).

b) una acción Ca^{2+} antagónica, disminuyendo el influjo de Ca^{2+} extracelular mediante el bloqueo de canales de Ca^{2+} operados por voltaje (CCOV) y/o operados por receptor (CCOR), con la consecuente disminución de la concentración intracelular de Ca^{2+} provocando así, relajación de la CMLV (Jiang et al., 1992a, 1992b; Shan et al., 1994; Zhang et al., 1994; Han et al., 1995; Nakajima et al., 1995, 1999; Sheldon y Argentieri, 1995; Lippert et al., 1996; Ogata et al., 1996; Freay et al., 1997; Glusa et al., 1997; Kitazawa et al., 1997; Browne et al., 1999; Crews y Khalil, 1999a, 1999b; Murphy y Khalil,

1999; Perusquía y Villalón, 1999, 2002; Herkert et al., 2000; Barbagallo et al., 2001; Li et al., 2001; Salom et al., 2001, 2002; Shaw et al., 2001; English et al., 2002; Gupte et al., 2002b; Jones et al., 2002; Minshall et al., 2002; Zhang et al., 2002; Perusquía et al., 2003; Tep-areenan et al., 2003a, 2003b; Scragg et al., 2004).

c) una acción agonista sobre los canales de K^+ , incrementando el eflujo de K^+ intracelular, mediante la apertura de los canales de K^+ : activados por Ca^{2+} (K_{Ca}), operados por voltaje (K_V) y sensibles al ATP (K_{ATP}); repolarizando el potencial de membrana de la CMLV y provocando el cierre de los CCOV y CCOR, con la consecuente disminución en la entrada de Ca^{2+} extracelular. A este respecto, se ha propuesto que el 17β -E₂ (White et al., 1995; Wellman et al., 1996; Darkow et al., 1997; White et al., 2002; Bracamonte et al., 2002; Tsang et al., 2003; Abou-Mohamed et al., 2003; Tep-areenan et al. 2003b), P₄ (Jacob y White, 2000; Mujerki et al., 2000a, 2000b), T₄ (Yue et al., 1995; Deenadalayu et al., 2001; Tep-areenan et al., 2002, 2003a) y DHEA (Farrukh et al., 1998) pueden activar los K_{Ca} . Por otra parte, también se ha planteado que el 17β -E₂ (Rosenfeld et al., 2002; Tsang et al., 2003; Tep-areenan et al., 2003b), T₄ (Ding y Stallone, 2001; Won et al., 2003) y DHEA (Gupte et al., 2002a) posiblemente también activen a los K_V . En forma colateral, algunos otros autores han sugerido que la T₄ actúa sobre los K_{ATP} (Yue et al., 1995; Chou et al., 1996; Honda et al., 1999).

Las hipótesis anteriores, no establecen cual es el mecanismo preciso de la acción vasodilatadora de los esteroides en la membrana de la CMLV y se desconoce si son eventos conectados entre sí y sinergizados o independientes cada uno de ellos. Por otro lado, la mayoría de estos estudios han sido realizados en la vasculatura de animales experimentales y la vasculatura humana ha quedado relegada.

2.7. Regulación del tono vasomotor del cordón umbilical.

Los vasos sanguíneos del cordón umbilical (CU) resultan ser una preparación disponible para el estudio de agentes vasoactivos en la vasculatura humana; además, constituyen una importante conexión en la madre y el feto y presentan características singulares que resaltan su importancia como modelo biológico.

El CU se forma durante las primeras cinco semanas de gestación, como una fusión del saco vitelino y la alantoides. Se extiende generalmente desde el centro de la placenta (placa coriónica) hasta el uraco fetal. Es un tejido helicoidal de color blanco mate, revestido de una sola capa de células epiteliales derivadas del corión, conteniendo un tejido conectivo mucoide denominado "*gelatina de Wharton*" (Spivack, 1946), donde se encuentran embebidos los vasos sanguíneos. El diámetro del CU varía de 0.8 a 2.0 cm, con una longitud promedio de 55 cm.

Los vasos sanguíneos del CU consisten en una vena y dos arterias. Las arterias umbilicales (AU) poseen un calibre menor y una masa muscular mayor en comparación a la vena umbilical, características que permiten su distinción morfológica durante la disección (Fig. 2.2). Las AU son vasos de conducción, que a diferencia de la mayor parte de las arterias del mismo calibre, poseen una túnica media formada por dos gruesas capas musculares; una circular externa y una longitudinal interna.

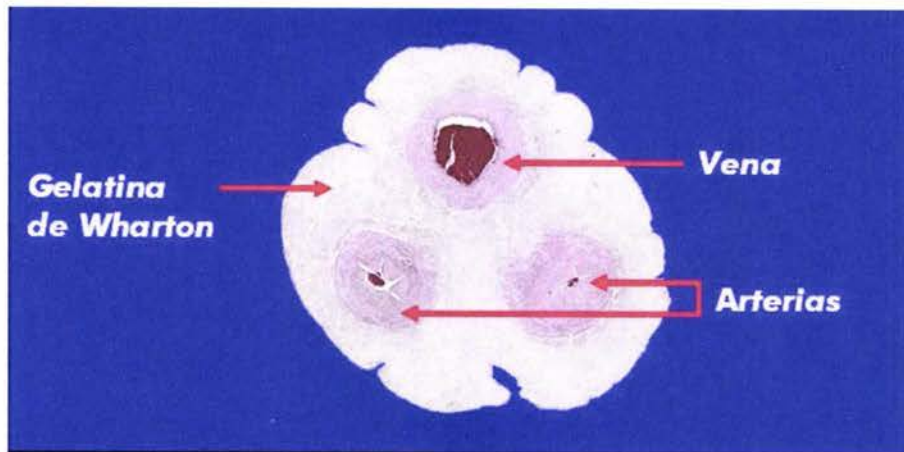


Figura 2.2. Corte histológico de cordón umbilical humano (no depletado), donde se observan los principales constituyentes de este tejido: a) vena, b) arterias y c) gelatina de Wharton. Nótese el mayor calibre y menor masa muscular de la vena con respecto a las arterias, características muy importantes para su identificación morfológica.

En la mayoría de los lechos vasculares sistémicos, las arterias de conducción contribuyen poco a la resistencia vascular de la circulación sanguínea, siendo las arterias de resistencia las que controlan el flujo de sangre del órgano. Sin embargo, en el CU, las AU son excepcionalmente largas y la resistencia de la circulación microplacentaria es

sumamente baja (Adamson et al., 1998). Por consiguiente, las AU pueden contribuir más a la resistencia vascular en la circulación fetoplacentaria.

Por otra parte, los vasos sanguíneos del CU poseen una característica peculiar, muy importante para el desarrollo de este trabajo experimental, debido a que son tejidos **carentes de inervación** (Spivack, 1946; Reilly y Russell, 1977; Fox y Khong, 1990). Esta característica hace de este tipo de vasos una preparación “**miogénica**”, que resulta de gran interés para descartar algunos factores que puedan estar involucrados en la acción de fármacos vasoactivos; e.g., la influencia del sistema nervioso. Así, esta preparación permite excluir que el efecto inducido por el fármaco (esteroide) sea consecuencia de una acción indirecta, a través de la liberación de neurotransmisores.

Es importante considerar, que además de las características peculiares de los vasos sanguíneos umbilicales, existen otros puntos que hacen a estos vasos de gran importancia. El crecimiento y desarrollo fetal depende en gran medida de una buena circulación fetoplacentaria, que asegure un adecuado intercambio entre los compartimientos materno y fetal. Así, una vasoconstricción mecánica o inducida por diversos agentes contráctiles, humorales o endoteliales, en conjunción con una deficiencia en la producción de agentes vasodilatadores humorales (como podrían ser las hormonas esteroides) o endoteliales, provocaría deficiencia en la circulación fetoplacentaria. La condición anterior sería reflejada en nacimientos con productos de bajo peso (desnutrición), malformaciones y complicaciones en diferentes sistemas (cardiovascular, respiratorio, nervioso, etc.).

2.8. Efecto de los esteroides sexuales en los vasos sanguíneos del cordón umbilical.

En las últimas décadas se ha observado que la muerte fetal humana es seguida de una caída de los niveles de estrógenos, disminuyendo el flujo sanguíneo uteroplacentario. Por otro lado, se ha encontrado que la anencefalia fetal presenta una severa reducción de la producción de estrógenos placentarios, sobre todo de estriol. Además, algunos de los trastornos maternos asociados con la disminución del flujo sanguíneo uteroplacentario (preeclampsia, hipertensión y diabetes) han sido relacionados con la disminución en la formación de DHEA por las glándulas suprarrenales fetales (Karck y Breckwoldt, 1996).

Son contadas las evidencias experimentales sobre el efecto vasodilatador de los esteroides sexuales en la AUH. Se ha descrito que el 17β -E₂, la estrona y el estriol, inducen vasodilatación sobre el tono vascular de la AUH (Silva de Sá y Meirelles, 1977; Du et al., 1999; Fausett et al., 1999). También, la progesterona, pregnandiona, alopregnanolona y alopregnandiona actúan como vasodilatadores de arterias y venas umbilicales (Omar et al., 1995; Ramírez et al., 1998; Fausett et al., 1999). Referente a los andrógenos, existe un trabajo que reporta un tenue efecto vasodilatador de T₄ en la AUH (Fausett et al., 1999). Sin embargo, datos recientes de nuestro laboratorio (Toledo et al., 2003) han caracterizado el efecto vasodilatador producido por una serie progestinas (P₄, pregnanolona y alopregnanolona) y andrógenos (DHEA, T₄, 5 α -DHT y 5 β -DHT) sobre la AUH precontraída con KCl (Fig. 2.3), la vasodilatación producida por la mayoría de estos esteroides resalta la alta potencia relajante de los andrógenos.

Con base a los resultados mencionados, se seleccionaron los esteroides con mayor potencia vasodilatadora (5β -DHT, DHEA, T_4 , P_4 y 5α -DHT), para ser utilizados en el presente proyecto.

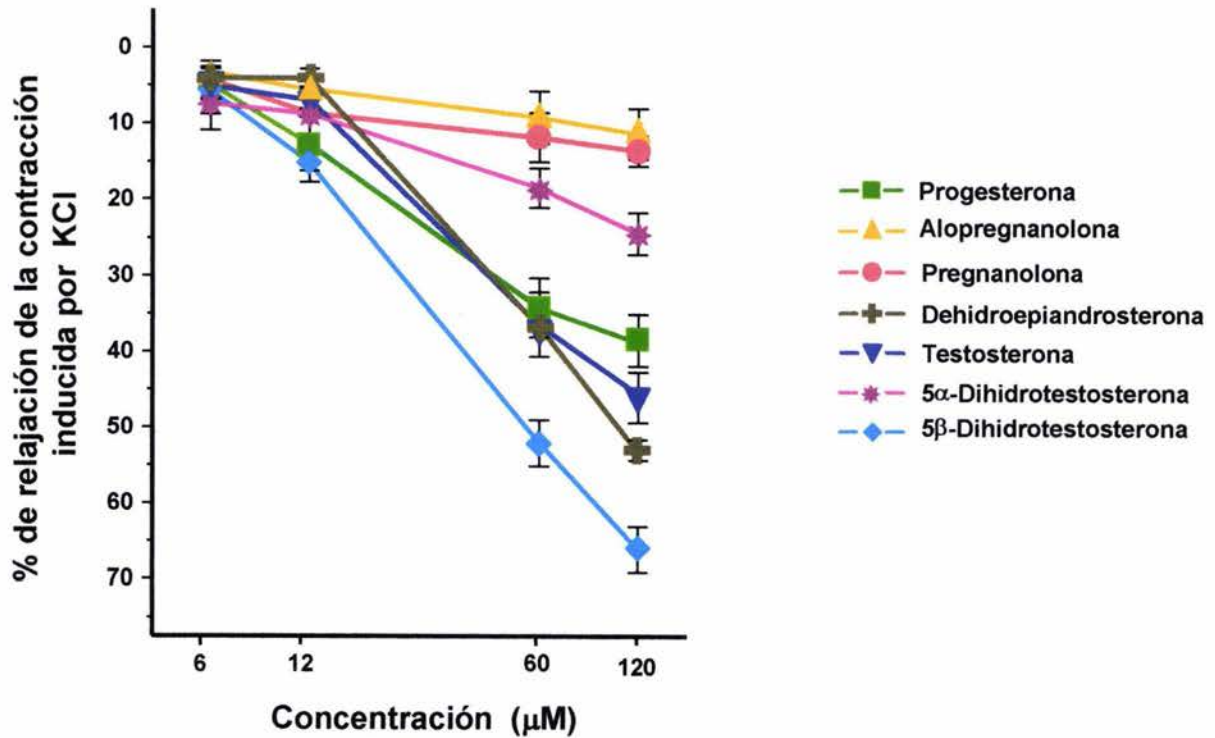


Figura 2.3. Curvas concentración-respuesta del efecto relajante de una serie de progestinas y andrógenos sobre la AUH contraída con KCl 40 mM. Los símbolos representan los valores de las medias ($n = 6 \pm EEM$). Tomado y modificado de Toledo et al., 2003.

La capacidad de los esteroides para inducir vasodilatación en la AUH indica que, los esteroides sexuales femeninos y masculinos pueden estar regulando la circulación fetoplacentaria y que estas hormonas son, por ende, sintetizadas en la unidad fetoplacentaria (Diczfalusy, 1969). Aún cuando el metabolismo de estos compuestos, en particular de los andrógenos, no ha sido caracterizado por completo en la unidad fetoplacentaria, se sabe que en la mujer las concentraciones plasmáticas de T_4 y su precursor, la androstendiona, se incrementan durante el embarazo (Mizuno et al., 1968; Bammann et al., 1980; Troisi et al., 2003). Por otra parte, se ha encontrado que el pulmón y el tracto gastrointestinal del feto producen metabolitos 5α -reducidos de T_4 (Benagiano et al., 1968; Mancuso et al., 1968), mientras que en el hígado fetal la conversión es hacia metabolitos 5β -reducidos (Parsons et al., 1970; Charbonneau y The, 2001). Con estos hallazgos se aprecia que existe un metabolismo muy activo de los esteroides en la unidad fetoplacentaria; lo cual, aunado a su efecto vasodilatador, en diversos modelos experimentales, permite considerar a los andrógenos como sustancias vasoactivas y no sólo como metabolitos intermediarios para la síntesis de estrógenos.

3. JUSTIFICACIÓN

Los esteroides sexuales pueden ser considerados como sustancias vasoactivas por inducir vasodilatación en diferentes lechos vasculares. Sin embargo, son escasos los reportes con respecto al efecto que las hormonas esteroides pudieran ejercer sobre la vasculatura humana. Además, el mecanismo de su acción vasodilatadora es aún incierto.

Los datos disponibles revelan que los esteroides podrían estar involucrados en la modificación de las corrientes de algunos iones en la membrana de la célula vascular para ejercer su efecto vasodilatador. Existen dos propuestas importantes para la explicación de la acción vasodilatadora de los esteroides: (i) una activación de los canales de K^+ y/o (ii) una inactivación de los canales de Ca^{2+} . Por lo anterior, el presente proyecto pretende esclarecer la participación de los canales de K^+ (activados por Ca^{2+} , operados por voltaje y sensibles al ATP) y de los canales de Ca^{2+} (operados por voltaje y por receptor) en la acción de los esteroides con mayor potencia vasodilatadora en la arteria umbilical humana.

Los resultados permitirán contribuir al conocimiento de la acción de las hormonas esteroides sobre la vasculatura y la fisiología del control del flujo sanguíneo entre la unidad fetoplacentaria, con beneficio directo en la disminución de la mortalidad perinatal.

4. HIPÓTESIS

- I. Con base a la propuesta de que algunos esteroides sexuales pueden producir activación de los canales de K^+ para producir relajación en la vasculatura de animales experimentales, es posible que la acción vasodilatadora de los esteroides en la arteria umbilical humana, sea bloqueada por algunos antagonistas de los canales de K^+ (activados por Ca^{2+} , operados por voltaje y sensibles al ATP).

- II. Los reportes existentes han mostrado que el efecto relajante de algunos esteroides, en diferentes tipos de músculo liso, es el resultado de una inactivación de los canales de Ca^{2+} operados por voltaje. Por lo cuál, es posible que la contracción inducida por KCl sea más sensible que la de serotonina (5-HT) al efecto relajante de los esteroides. Asimismo, se postula un fuerte efecto antagónico de los esteroides sobre las contracciones de $CaCl_2$ en tejidos despolarizados.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General:

Contribuir al conocimiento del mecanismo de acción del efecto vasodilatador inducido por esteroides 3β -hidroxi- $\Delta 5$, $\Delta 4$ -3ceto y 5-reducidos sobre el músculo liso vascular humano (arteria umbilical), determinando su posible regulación vasomotora durante el embarazo.

5.2. Objetivos Específicos:

- 1) Estudiar la posible participación de diferentes tipos de canales de K^+ (activados por Ca^{2+} , operados por voltaje y sensibles al ATP), en el modo de la acción vasodilatadora que inducen los esteroides probados, usando los bloqueadores específicos de los canales de K^+ mencionados (tetraetilamonio, 4-aminopiridina y glibenclamida, respectivamente).
- 2) Determinar la proporción en la que participan los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje y a receptor, en el efecto vasodilatador producido por una serie de hormonas esteroides (DHEA, P_4 , T_4 , 5α -DHT y 5β -DHT), evaluando la sensibilidad de las contracciones inducidas por KCl 40 mM y 5-HT 10 μ M en la arteria umbilical humana, al efecto vasodilatador de cada esteroide a una concentración equimolecular (120 μ M).

- 3)** Evaluar la implicación particular de los canales de Ca^{2+} sensibles a voltaje en el efecto vasodilatador de los esteroides, estableciendo su posible acción Ca^{2+} antagónica, sobre la contractura de CaCl_2 2.5 mM en preparaciones despolarizadas.

6. MATERIAL Y MÉTODOS

6.1. Población de estudio, criterios de inclusión y exclusión

El presente estudio fue aprobado por el Comité de Ética del Hospital de la Mujer, SSA (Departamento de Enseñanza Médica), ver aprobación anexa. Las muestras (60 segmentos de cordón umbilical) fueron obtenidas del Hospital General de Zona No. 58 del IMSS.

Se utilizaron cordones umbilicales humanos, obtenidos de partos transvaginales a término (38-40 semanas de gestación), provenientes de mujeres sanas en edad reproductiva (18-35 años). Ninguna de las pacientes presentó enfermedades crónicas (preclampsia, eclampsia, diabetes, etc.) o tratamiento hormonal; i.e., se rechazaron aquellas muestras provenientes de partos con aplicación de agentes uterotónicos o úterorelajantes. También fueron descartados los cordones con meconio, deformaciones (nudos) o sangre coagulada dentro de los vasos sanguíneos.

6.2. Colecta de las muestras de estudio

Los cordones umbilicales fueron colectados en el quirófano del hospital después del nacimiento, cortando un segmento de aproximadamente 15 cm de longitud de la región proximal a la placenta. Inmediatamente, los segmentos fueron depletados del contenido de sangre por gravedad y depositados, para su traslado al laboratorio, en un termo que contenía una solución fría (4°C) de Ringer de bajo Ca^{2+} , con la siguiente composición

(en mM): NaHCO₃ 84, NaCl 110, KCl 5, KH₂PO₄ 0.5, NaH₂PO₄ 0.5, MgCl₂ 2, EDTA 0.49, CaCl₂ 0.16, glucosa 10, HEPES 10 y Taurina 10, con un pH de 6.9. En el laboratorio, las muestras fueron refrigeradas durante 24 y 48 h antes de iniciar los experimentos.

6.3. Disección y montaje de la arteria umbilical humana.

Para su disección, las muestras fueron colocadas en una caja de petri con solución Ringer de bajo Ca²⁺ a 4°C, realizándose los recambios necesarios para eliminar la sangre remanente y mantener la temperatura de 4°C.

La disección de los vasos umbilicales (arterias y vena) fue realizada cuidadosamente removiendo la gelatina de Wharton, con ayuda de material de microcirugía. Las arterias fueron distinguidas morfológicamente de la vena, en virtud de que las arterias poseen una capa muscular de mayor grosor y un calibre menor (Spivack, 1946).

Una vez disecadas las arterias, estas fueron cambiadas de solución y temperatura; colocándolas en una caja de petri de doble pared que contenía solución Ringer Krebs-Henseleit con la siguiente composición (en mM): NaHCO₃ 24.9, NaCl 119.5, KCl 4.7, KH₂PO₄ 1.18, MgSO₄ 1.18, CaCl₂ 2.5 y glucosa 12.0, con burbujeo constante de una mezcla gaseosa de 5% CO₂ y 95% O₂ para estabilizar el pH a 7.4, manteniendo la temperatura a 37°C, mediante un baño recirculador de agua (Haake, D1) conectado a la caja de petri.

6.4 Sistema de registro de la actividad contráctil de la arteria umbilical humana.

Las arterias fueron divididas en anillos de aproximadamente 1 cm de longitud y fueron suspendidos con ayuda de 2 ganchos de acero inoxidable en forma de "L", los cuáles fueron introducidos a través del lumen de manera contrapuesta. Uno de los ganchos fue fijado al piso de una cámara de incubación y el otro fue atado a un transductor isométrico de fuerza (Grass Instrument Co., Quincy, Mass., USA., modelo FT03C), utilizando hilo de seda (000). La cámara de incubación para órgano aislado, donde se colocaron los anillos arteriales, contenía 10 mL de solución Ringer Krebs-Henseleit a 37°C con un pH de 7.4 y burbujeo constante de 5% de CO₂ en O₂. Los transductores fueron conectados a un polígrafo (Grass Instrument Co., Quincy, Mass., USA., modelo 79) de 4 canales, para registrar la señal mecánica de la contracción de los tejidos (Fig. 6.1).

En las condiciones antes descritas, los tejidos fueron sometidos a una fuerza de tensión de 20 mN (2.0 g de tensión = 4 cm de desplazamiento de la pajilla). Después de mantener dicha tensión, durante un período aproximado de 10 min, la línea basal fue ajustada. Los anillos arteriales fueron estabilizados a la tensión sometida durante 2 h (período de estabilización).

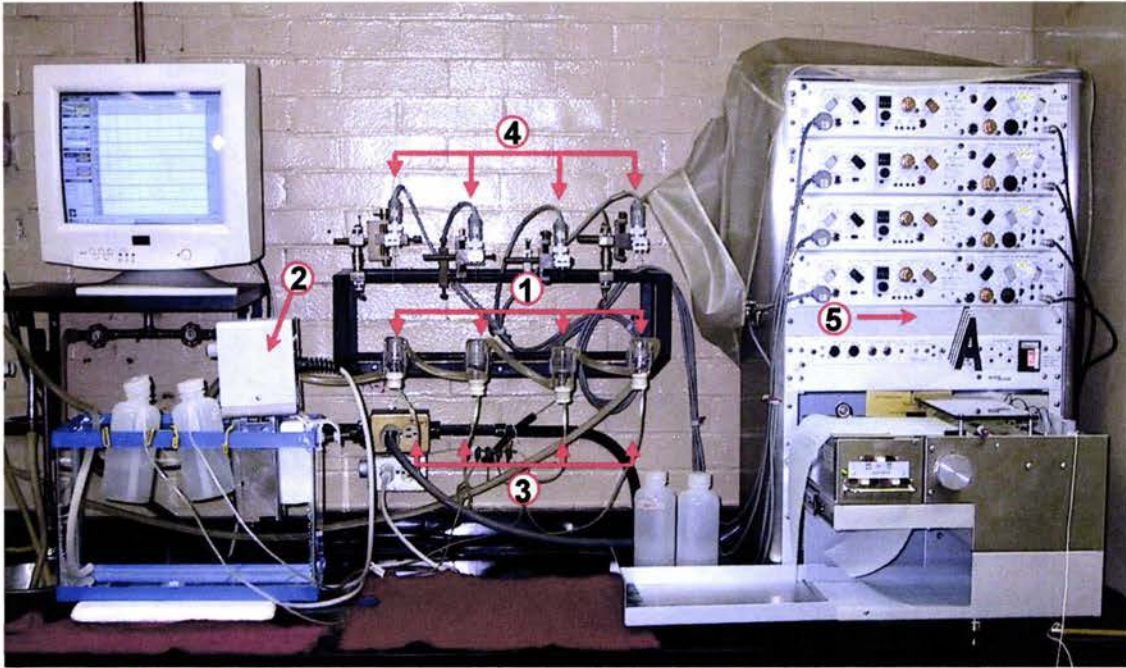


Figura. 6.1. Sistema de registro isométrico para tejido aislado, mostrando: 1) cámaras de incubación donde se mantiene al tejido, 2) baño recirculador de agua para mantener una temperatura constante de 37°C, 3) suministro de aeración de la mezcla gaseosa 5% CO₂ y 95% O₂, 4) transductores de tensión y 5) polígrafo.

La respuesta del tejido fue determinada inicialmente por repetida exposición (por lo menos dos veces) a Ringer contracturante de KCl 40 mM, obtenido por sustitución equimolecular de NaCl (79.5 mM) por KCl (40 mM) o bien por serotonina (5-HT) a diferentes concentraciones (0.1-10 μ M). La solución fue cambiada a intervalos de 15 min, dejando reposar al tejido por lo menos 1 h entre los estímulos de KCl o 5-HT. La segunda respuesta fue usada como una referencia de la estandarización de las contracciones inducidas por los agentes estudiados. Las preparaciones que desarrollaron una tensión de menos de 1 g fueron descartadas.

6.5 Protocolo experimental

a) Efecto de los bloqueadores de los canales de K^+ en la vasorelajación inducida por las hormonas esteroideas sobre la contracción provocada por KCl 40 mM.

Una vez estandarizada la respuesta contráctil a KCl 40 mM se procedió a realizar los experimentos. La contracción a KCl fue mantenida durante 70 min (respuesta control) e inmediatamente se realizó el recambio de la solución con Ringer Krebs-Henseleit en su composición original (lavado). Cuando la línea basal regresó a su posición original, los tejidos se dejaron reposar 1 h antes de inducir otra contracción a KCl. Después de 10 min de inducida la subsecuente contracción de KCl, los tejidos fueron incubados por 30 min con los bloqueadores de los canales de K^+ : tetraetilamonio (TEA) 1 mM (bloqueador de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} ; K_{Ca}), 4-aminopiridina (4-AP) 1mM (bloqueador de los canales de K^+ dependientes de voltaje; K_V) o glibenclamida (Gly) 10 μ M (bloqueador de los canales de K^+ sensibles a ATP; K_{ATP}). Cada bloqueador fue adicionado por separado en diferentes preparaciones.

Las concentraciones usadas de los bloqueadores de los canales de K^+ fueron elegidas en base a estudios previos (Tabla 5.1) que garantizan el bloqueo de cada tipo de canal de K^+ en tejido aislado (Nelson y Quayle, 1995). En el caso de 4-AP, se ha reportado que concentraciones mayores a 5 mM pueden además de antagonizar los canales K_V , bloquear también los canales K_{Ca} (Nelson y Quayle, 1995). Otro estudio ha reportado que 5 mM de 4-AP puede producir alcalinización del medio intracelular (Petrova-Kirova et al.,

2000) y liberación de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico. Con la finalidad de evitar todos estos inconvenientes, se decidió utilizar 1 mM de 4-AP para garantizar el bloqueo exclusivo de K_V .

Tabla 6.1. Concentraciones usadas de los bloqueadores de canales de K^+ en diferentes preparaciones de músculo liso vascular aislado.

AGENTE	ACCIÓN FARMACOLÓGICA	REFERENCIAS
Glibenclamida (Gly). 10 μM	Bloqueador de los canales de K^+ sensibles a ATP (K_{ATP}).	Yue et al., 1995; Tiritilli et al., 1995; Chou et al., 1996; Mukerji et al., 2000b; Michelakis et al., 2001; Ding y Stallone, 2001; Salom et al., 2001, 2002; Gupte et al., 2002a; Tep-areenan et al., 2003a, 2003b.
4-aminopiridina (4-AP). 1 mM	Bloqueador de los canales de K^+ activados por voltaje (K_V).	Honda et al., 1999; Lovren y Triggle, 2000; Mukerji et al., 2000b; Tep-areenan et al., 2002, 2003a, 2003b; Tsang et al., 2003; Won et al., 2003.
Tetraetilamonio (TEA). 1 mM	Bloqueador de los canales de K^+ activados por Ca^{2+} (K_{Ca}).	Bychkov et al., 1998; Honda et al., 1999; Lovren y Triggle, 2000; Mukerji et al., 2000b; Ding y Stallone, 2001; Deenadalayu et al., 2001; Abou-Mohamed et al., 2003; Milesi et al., 2003; Won et al., 2003.

Las concentraciones usadas en las diferentes publicaciones están basadas en los rangos reportados en la revisión de Nelson y Quayle (1995).

Después del tiempo de incubación con el agente bloqueador, se adicionaron las hormonas (cada una por separado) a la concentración de 120 μM , que induce la relajación máxima (R_{max}) sobre la contractura de KCl (Toledo et al., 2003). El efecto de cada esteroide fue registrado durante 30 min. La respuesta inhibitoria que producen los esteroides sobre la contracción de KCl fue comparada en ausencia y presencia de cada uno de los diferentes antagonistas de los canales de K^+ . Finalmente, después de lavar los tejidos y dejarlos recuperarse por 1 h, se verificó la viabilidad de éstos y la recuperación de la contracción con una última adición de KCl, que fue mantenida durante 40 min (estímulo de recuperación).

b) Caracterización de la respuesta contráctil a 5-HT.

En un grupo de preparaciones, se determinó la fuerza contráctil de los anillos arteriales a 5-HT. Este agente fue aplicado a diferentes concentraciones (0.1, 0.5, 1.0 y 10 μM , cada una por separado) para establecer la concentración de 5-HT que produce una contracción tónica sostenida durante al menos 40 min. Posteriormente, se realizaron 3 recambios de la solución Ringer Krebs-Henseleit (lavado) y cuando la línea basal regresó a su posición original, se repitió la contracción a 5-HT después de 60 min. De esta manera se observó, tanto la reproducibilidad del fenómeno como la viabilidad del tejido.

Las diferentes concentraciones de 5-HT permitieron determinar que la respuesta provocada a la concentración de 10 μM , induce una contracción tónica sostenida durante al menos 40 min. Con este análisis fue posible establecer la concentración a la cual 5-HT induce una contracción estable para el desarrollo del siguiente protocolo experimental.

c) Efecto vasorelajante de las hormonas esteroides sobre la contracción inducida por 5-HT.

Los anillos aórticos fueron contraídos con 5-HT 10 μ M durante 40 min (estímulo control). Después de este tiempo se realizaron 3 recambios de la solución Ringer Krebs-Henseleit (lavado). En un segundo estímulo de 5-HT 10 μ M, realizado 1 h posterior al lavado, cada uno de los esteroides fueron probados por separado. Los esteroides fueron elegidos con base a datos previos del laboratorio (Toledo et al., 2003), donde se determinó su alta potencia relajante sobre la contracción inducida por KCl 40 mM en la AUH. Los esteroides fueron adicionados a la concentración (120 μ M), que induce la R_{max} observada previamente (Toledo et al., 2003). La adición de cada esteroide fue realizada 10 min después de iniciada la contracción a 5-HT. El efecto de las hormonas fue registrado durante 30 min y evaluado en términos de porcentaje de inhibición de la contracción inducida por 5-HT. Los tejidos fueron lavados con solución Ringer Krebs-Henseleit por lo menos 3 veces y cuando la línea basal regresó a su posición original, se dejó reposar al tejido durante 1 h antes de provocar la última respuesta a 5-HT 10 μ M, la cuál fue registrada durante 40 min para verificar la viabilidad del tejido y recuperación de la contracción inducida por 5-HT.

El porcentaje de inhibición que induce cada uno de los esteroides estudiados sobre la contracción de 5-HT fue comparado con el porcentaje de inhibición, previamente determinado (Toledo et al., 2003), que producen sobre la contracción inducida por KCl.

d) Prevención de la contracción de Ca^{2+} en tejido despolarizado por hormonas esteroides.

En otros experimentos, los anillos arteriales fueron despolarizados con solución KCl 40 mM libre de Ca^{2+} ($\text{Ca}^{2+}\emptyset$) y 2.0 mM de EGTA. Esta solución ($\text{K}^+-\text{Ca}^{2+}\emptyset$) produjo una contracción fásica por ausencia de Ca^{2+} extracelular, regresando al valor basal (~ 20 min). Así, los tejidos se dejaron reposar 1 h, antes de inducir una contracción tónica sostenida por adición de CaCl_2 2.5 mM, la cual fue registrada durante 30 min. Una vez estandarizada la respuesta a CaCl_2 , los tejidos fueron incubados, durante el período de reposo, con 5β -DHT (el esteroide de mayor potencia vasodilatadora) a diferentes concentraciones (6, 12, 60 y 120 μM , cada una por separado) 10 min antes de la adición de CaCl_2 2.5 mM, registrando la contracción durante 30 min (en presencia del esteroide). Finalmente, después de lavar los tejidos con la solución $\text{K}^+-\text{Ca}^{2+}\emptyset$ y dejarlos recuperarse por 1 h, se verificó la viabilidad de éstos y la recuperación de la contracción con una última adición de CaCl_2 2.5 mM, registrada durante 30 min.

La amplitud de la contracción de CaCl_2 con el tratamiento del esteroide fue comparada con la amplitud de la contracción previa a CaCl_2 (respuesta control = 100%) y los valores fueron reportados en términos de porcentaje de inhibición. Con la media de cada concentración se construyó la curva concentración-respuesta de 5β -DHT, obteniendo la concentración inhibitoria media (CI_{50} : concentración del esteroide a la cual se produce el 50% de inhibición de la contracción inducida con CaCl_2) de acuerdo al método de Litchfield y Wilcoxon (1949).

6.6. Evaluación y Análisis Estadístico

La cuantificación de la pérdida del tono de las contracciones inducidas por 5-HT a las diferentes concentraciones, se realizó midiendo la amplitud de la contracción en su punto máximo (A1) y a los 30 min después de iniciada la contracción (A2), obteniendo el porcentaje de pérdida de tono de acuerdo a la siguiente relación:

$$\% \text{ de pérdida del tono} = \frac{A2 \text{ (cm)} \times 100}{A1 \text{ (cm)}} - 100$$

Este mismo análisis fue realizado para el efecto de los esteroides sobre la contracción inducida por KCl en ausencia y presencia de los diferentes bloqueadores de los canales de K⁺, y sobre la contracción de 5-HT 10 μM; donde A1 es la amplitud de la contracción ante de la adición del esteroide y A2 es la amplitud de la contracción a los 30 min después de la adición del esteroide.

En los experimentos donde el tejido fue incubado con el esteroide antes de la contracción de CaCl₂ en anillos arteriales despolarizados, A1 es la amplitud de la respuesta previa con CaCl₂ (control) y A2 es la amplitud de la contracción de CaCl₂ en presencia del esteroide.

La evaluación de cada prueba fue una media de n = 6 experimentos ± desviación estándar (DEM), donde la “n” significa una muestra de diferente paciente. Los datos fueron comparados de acuerdo a la prueba t de “*student*” no pareada para los diferentes tratamientos, considerando valores significativamente diferentes cuando

$p < 0.05$. Las pruebas estadísticas y las gráficas fueron realizadas usando el software Microcal Origin, versión 7.0.

6.7. Compuestos

Todos los compuestos utilizados fueron obtenidos de Sigma Chemical Co. St. Louis Mo. USA: 17β -hidroxi-4-androsten-3-ona (testosterona; T_4), 17β -hidroxi- 5β -androstan-3-ona (5β -dihidrotestosterona; 5β -DHT), 17β -hidroxi- 5α -androstan-3-ona (5α -dihidrotestosterona; 5α -DHT), 4-pregnen-3,20-diona (progesterona; P_4), 3β -hidroxi-5-androsten-17-ona (dehidroepiandrosterona; DHEA), cloruro de tetraetilamonio (TEA), 4-piridinamina (4-aminopiridina; 4-AP), 5-cloro-N-[2-[4-[[[(ciclohexilamino)carbonil]amino]sulfonil]fenil]etil]-2-metoxibenzamida (glibenclamida; Gly) y 3-(2-aminoetil)-1H-indol-5-ol (serotonina, 5-hidroxitriptamina; 5-HT). Con excepción de TEA, 4-AP y 5-HT, disueltos en agua bidestilada, los demás compuestos fueron disueltos en etanol absoluto (Merck-México, S.A.) y aplicados a un volumen final de 0.1% v/v en 10 mL de la solución Ringer Krebs-Henseleit, que corresponde a 17.14 mM.

7. RESULTADOS

7.1. Efecto de los bloqueadores de los canales de K^+ en la vasorelajación inducida por las hormonas esteroides sobre la contracción con KCl 40 mM.

El efecto vasodilatador que provocaron los diferentes esteroides a la concentración de 120 μ M sobre la contracción inducida por KCl 40 mM, no fue modificado por la presencia de los diferentes bloqueadores de los canales de K^+ (TEA, 4-AP o Gly), mostrando que estos bloqueadores son incapaces de antagonizar la vasodilatación ejercida por los esteroides (Fig. 7.1).

Esteroides 120 μ M	Porcentaje de Relajación de la contracción inducida con 40 mM de KCl n = 6 \pm DEM			
	Control	TEA 1 mM	Gly 10 μ M	4-AP 1 mM
P ₄	38.87 \pm 3.83	36.24 \pm 2.10	37.99 \pm 3.01	37.20 \pm 1.18
DHEA	53.31 \pm 3.29	50.11 \pm 3.53	51.29 \pm 2.23	51.34 \pm 2.55
T ₄	46.33 \pm 3.57	49.71 \pm 2.67	43.84 \pm 3.21	46.95 \pm 3.34
5 α -DHT	24.46 \pm 2.72	25.19 \pm 1.97	23.96 \pm 2.93	23.14 \pm 2.36
5 β -DHT	65.32 \pm 3.23	65.02 \pm 3.64	63.77 \pm 2.43	63.20 \pm 3.49

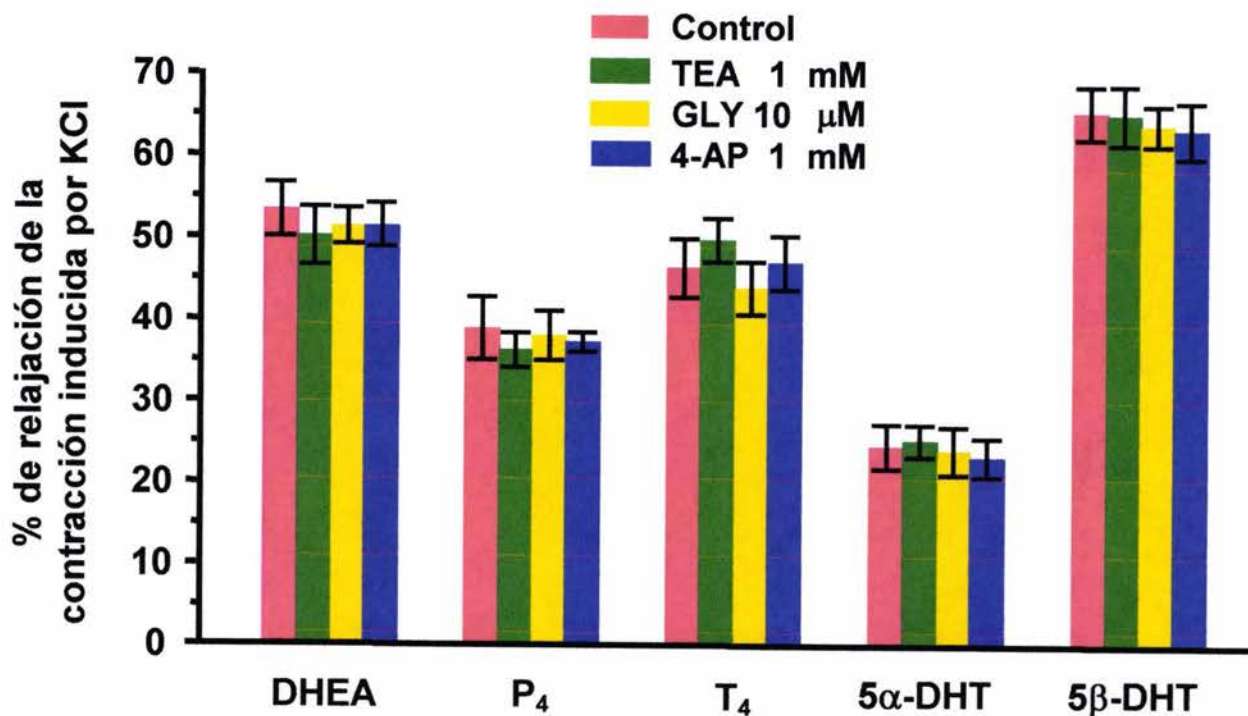


Figura 7.1. Comparación del efecto relajante de los diferentes esteroides sobre la contracción inducida por KCl 40 mM, en presencia y ausencia de los diferentes inhibidores de los canales de K⁺: TEA (tetraetilamonio), GLY (glibenclamida) y 4-AP (4-aminopiridina). La relajación de cada esteroide no fue diferente ($p > 0.05$) en presencia de cada antagonista. Cada barra representa la media de $n = 6 \pm$ DEM.

7.2. Caracterización de la respuesta contráctil a 5-HT.

El tiempo que se mantiene sostenido el tono de la contracción producida por 5-HT en la arteria umbilical humana (AUH) es dependiente de la concentración, siendo 10 μM la concentración que produce una contracción tónica sostenida durante más de 30 min, con sólo una variación no significativa de 0.82 ± 1.02 % de pérdida del tono a los 30 min (Fig. 7.2). En las concentraciones inferiores (0.1, 0.5 y 1.0 μM), además de la pérdida del tono, se observó la presencia de pequeñas contracciones fásicas, oscilaciones, sobre el tono de la contracción inducida con 5-HT, que fueron disminuyendo proporcionalmente al aumentar la concentración, mostrando que el tono de la contracción se mantiene constante sólo a la concentración de 10 μM (Fig. 7.3). Este dato permitió la elección de la aplicación de 10 μM de 5-HT para el desarrollo de los subsecuentes protocolos.

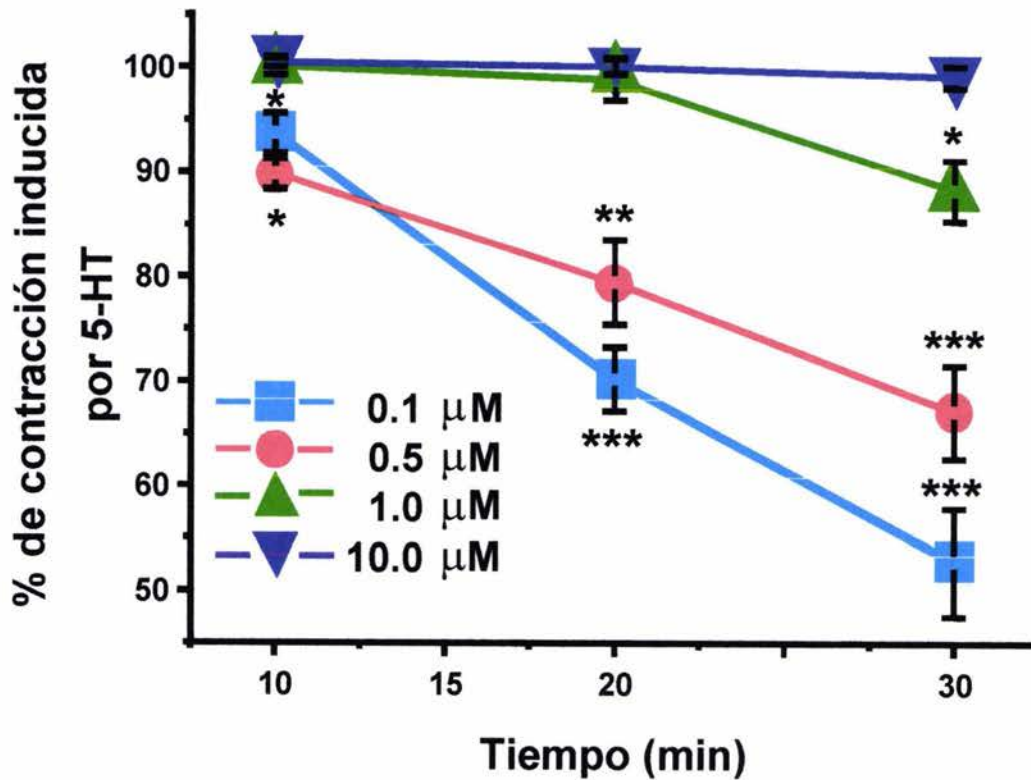


Figura. 7.2. Curso temporal del tono sostenido de la contracción inducida por 5-HT a diferentes concentraciones (0.1, 1.0, 0.5, 10.0 μM) en la AUH. Diferencia significativa *p < 0.05, **p < 0.005, ***p < 0.0005 comparando con 5-HT 10 μM. Cada símbolo representa la media de n = 6 ± DEM.

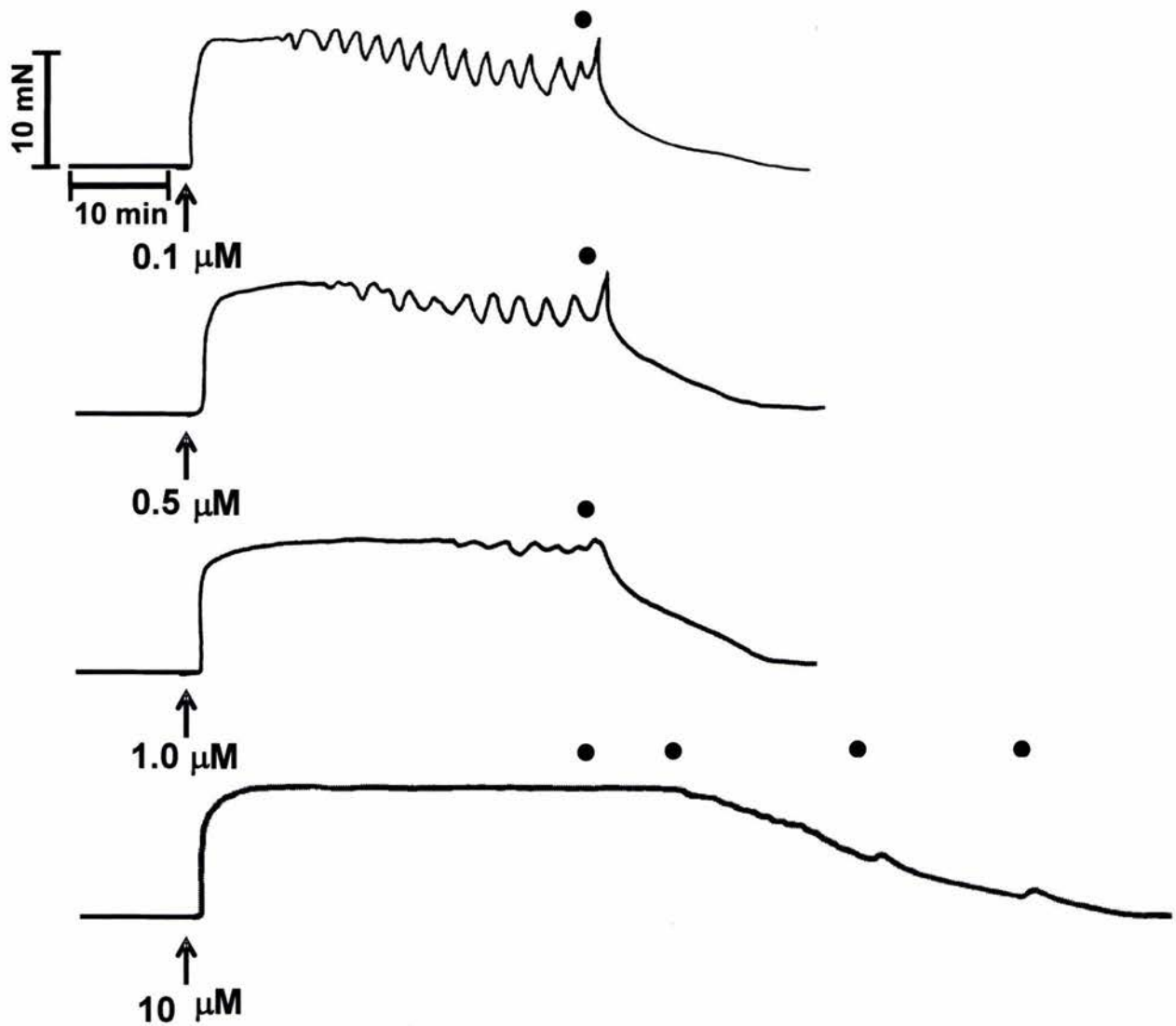


Figura. 7.3. Registros típicos de la contracción inducida por 5-HT en la AUH a diferentes concentraciones. Las flechas indican el momento de la adición de 5-HT, los círculos cerrados representan el recambio de la solución (lavado).

7.3. Efecto vasorelajante de las hormonas esteroides sobre la contracción inducida por 5-HT.

El vehículo (etanol 0.1%) utilizado para disolver las hormonas esteroides no modificó significativamente ($p > 0.0005$) el tono de la contracción inducida por 5-HT a 10 μM . En contraste, las diferentes hormonas esteroides, adicionadas a 120 μM cada una (R_{max} observada sobre la contractura de KCl 40 mM), producen un efecto relajante por disminuir el tono de la contracción que induce 10 μM de 5-HT, el cuál fue significativamente diferente ($p < 0.0005$) con respecto al efecto que produce el vehículo. La potencia vasodilatadora fue diferente para cada hormona: las más eficaces fueron DHEA y 5 β -DHT, con 43.09 ± 3.07 y 41.06 ± 3.46 % de relajación respectivamente, mientras que la T₄ y la P₄ resultaron de eficacia similar con 30.83 ± 3.08 y 32.45 ± 3.56 % de relajación respectivamente. Los datos mostraron que 5 α -DHT fue el esteroide de menor eficacia para producir vasorelajación, con 21.93 ± 1.56 % de inhibición (Fig. 7.4). Estos resultados permitieron establecer una relación de potencia: **DHEA \geq 5 β -DHT > P₄ \geq T₄ > 5 α -DHT.**

El efecto vasorelajante de cada esteroide sobre la contracción de 5-HT fue inmediato (~ 2 min) a la adición de los compuestos y la contracción de 5-HT fue recuperada en el subsecuente estímulo de 5-HT, después de retirar al esteroide del tejido mediante lavados (Fig. 7.5A).

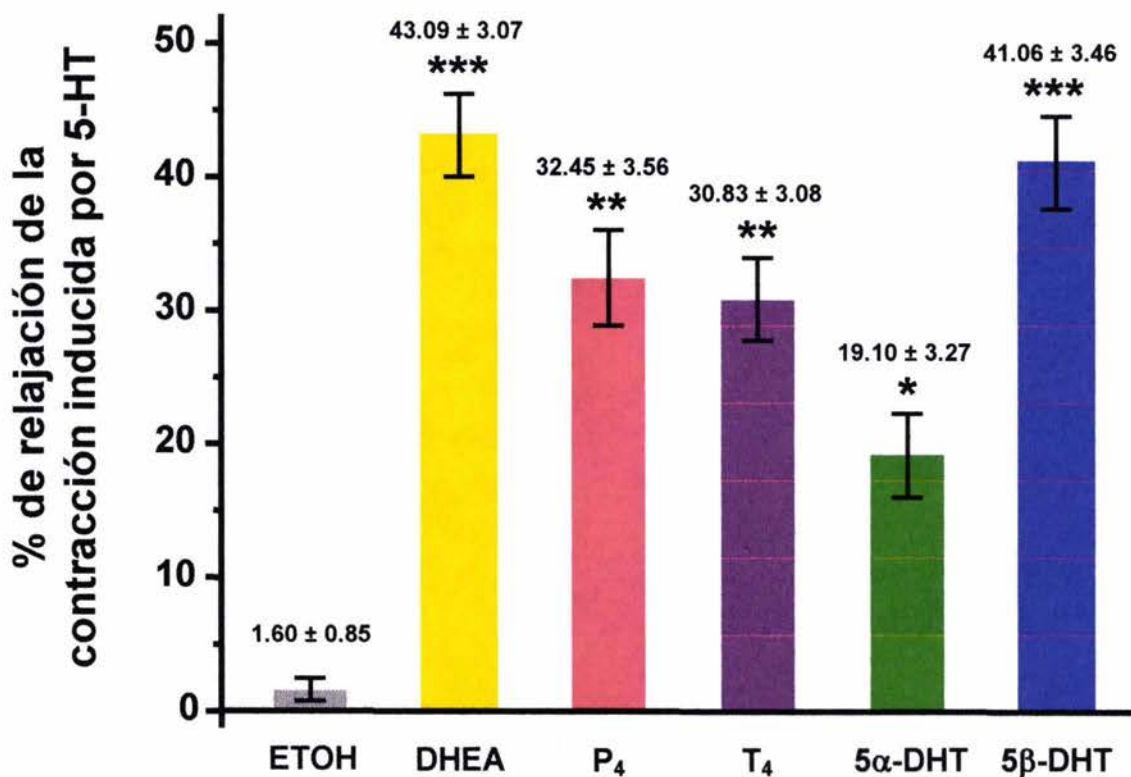


Figura 7.4. Porcentaje de relajación producido por los diferentes esteroides a la concentración equimolecular de 120 μ M sobre la contracción de 5-HT 10 μ M en la AUH. Diferencia significativa * $p < 0.0005$, ** $p < 0.00005$ *** $p < 0.000005$ vs. etanol (ETOH 0.1%). Cada barra representa la media de $n = 6 \pm$ DEM.

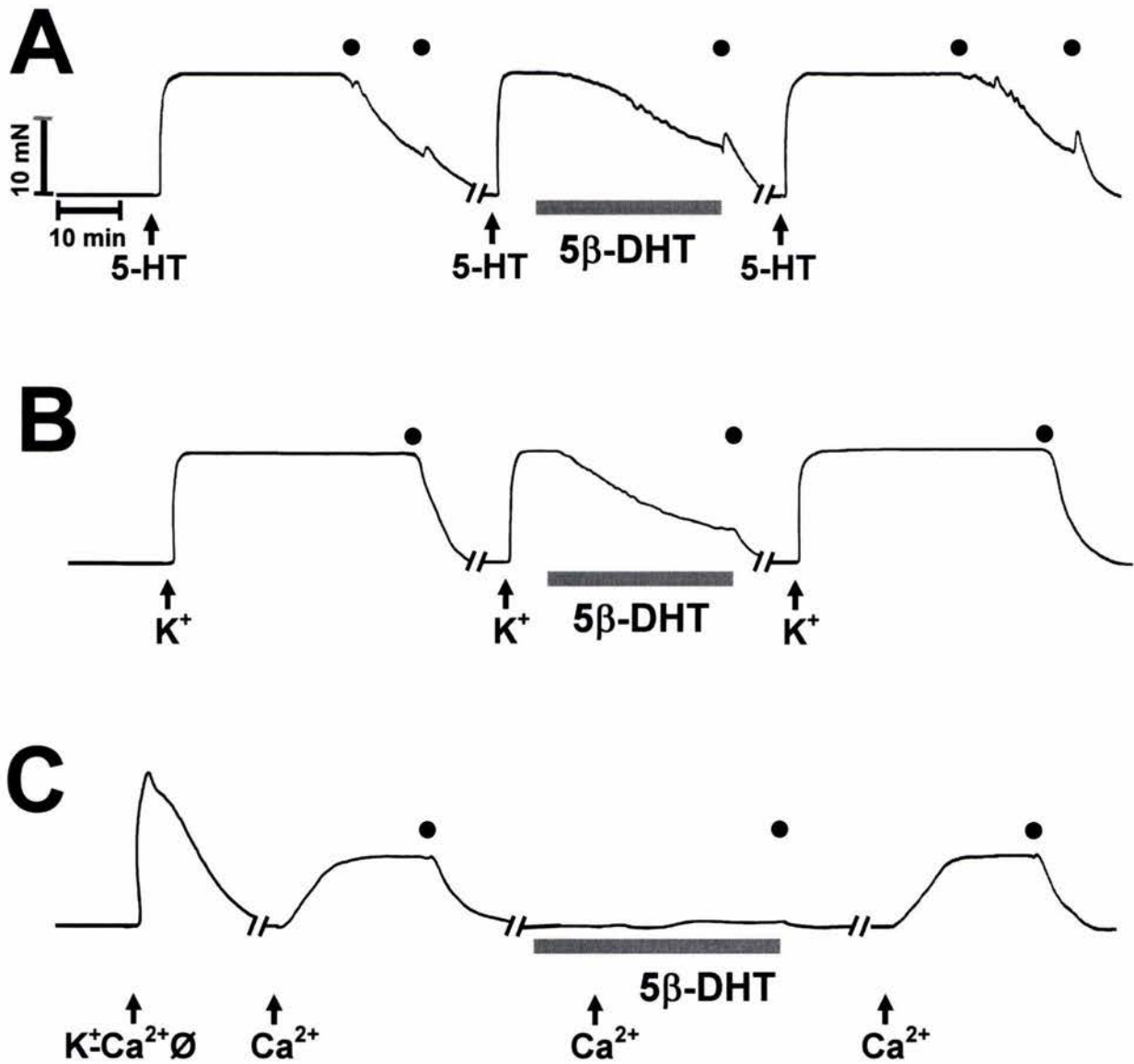


Figura. 7.5. Registros típicos del tono vascular de la AUH que muestran la contracción inducida por: **A)** 10 μM de serotonina (5-HT), **B)** 40 mM de KCl (K^+) y **C)** 2.5 mM de CaCl_2 (Ca^{2+}) en tejidos previamente despolarizados por $\text{K}-\text{Ca}^{2+}\emptyset$ (Ringer despolarizante KCl 40 mM libre de Ca^{2+}). La adición de 120 μM de 5 β -DHT (5 β -dihidrotestosterona) es capaz de inhibir cada una de las contracciones antes mencionadas. Las flechas indican el momento de la adición del agente vasoconstrictor. La línea gris indica el tiempo de incubación del andrógeno y los círculos cerrados representan el recambio de la solución (lavado).

7.4. Comparación del efecto vasorelajante de los esteroides sobre la contracción inducida por KCl 40 mM vs. la contracción inducida por 5-HT 10 μ M.

Se realizó la comparación de los porcentajes de relajación provocada por las hormonas esteroides, tanto sobre la contractura de KCl 40 mM como sobre la contractura de 5-HT 10 μ M. Esta comparación fue realizada con la finalidad de determinar la sensibilidad de los dos tipos de contracciones al efecto vasodilatador de las hormonas esteroides. Los resultados obtenidos para el efecto relajante de los esteroides sobre la contracción de KCl 40 mM fueron tomados de un trabajo previo en nuestro laboratorio (Toledo et al., 2003), para ser comparados con los datos de la presente Tesis. La contracción inducida por KCl 40 mM resultó más sensible al efecto vasodilatador de cada esteroide (Fig. 7.5B) ya que como se muestra, el efecto de todos los esteroides probados fue significativamente mayor ($p < 0.05$) sobre la contracción inducida por KCl, observándose que la diferencia fue más acentuada para DHEA, T_4 y 5β -DHT (Tabla 7.1 y Fig. 7.6) y por ende la potencia vasodilatadora de 5β -DHT, resultó drásticamente disminuida sobre la contractura de 5-HT (Fig 7.6).

La relación de potencia del efecto vasodilatador de los esteroides en las contracciones inducidas por los dos diferentes agentes contráctiles se obtuvo en relación al efecto del precursor DHEA. 5β -DHT resultó ser el andrógeno más potente para relajar la contracción inducida por KCl 40 mM, con una potencia de 1.22, seguido de DHEA y después se encuentran T_4 y P_4 , con una potencia de 0.87 y 0.73 respectivamente, finalmente 5α -DHT, con un valor de 0.45, fue el esteroide con menor potencia vasodilatadora. En el caso de la potencia que estos esteroides ejercen sobre la

contractura inducida por 5-HT 10 μ M, DHEA fue el esteroide más potente, seguido de 5 β -DHT con un valor de 0.95, P₄ y T₄ mostraron una potencia muy similar con valores de 0.75 y 0.71 respectivamente, de nueva cuenta 5 α -DHT mostró ser el esteroide con menor potencia vasodilatadora con un valor de 0.44 (Tabla 7.1).

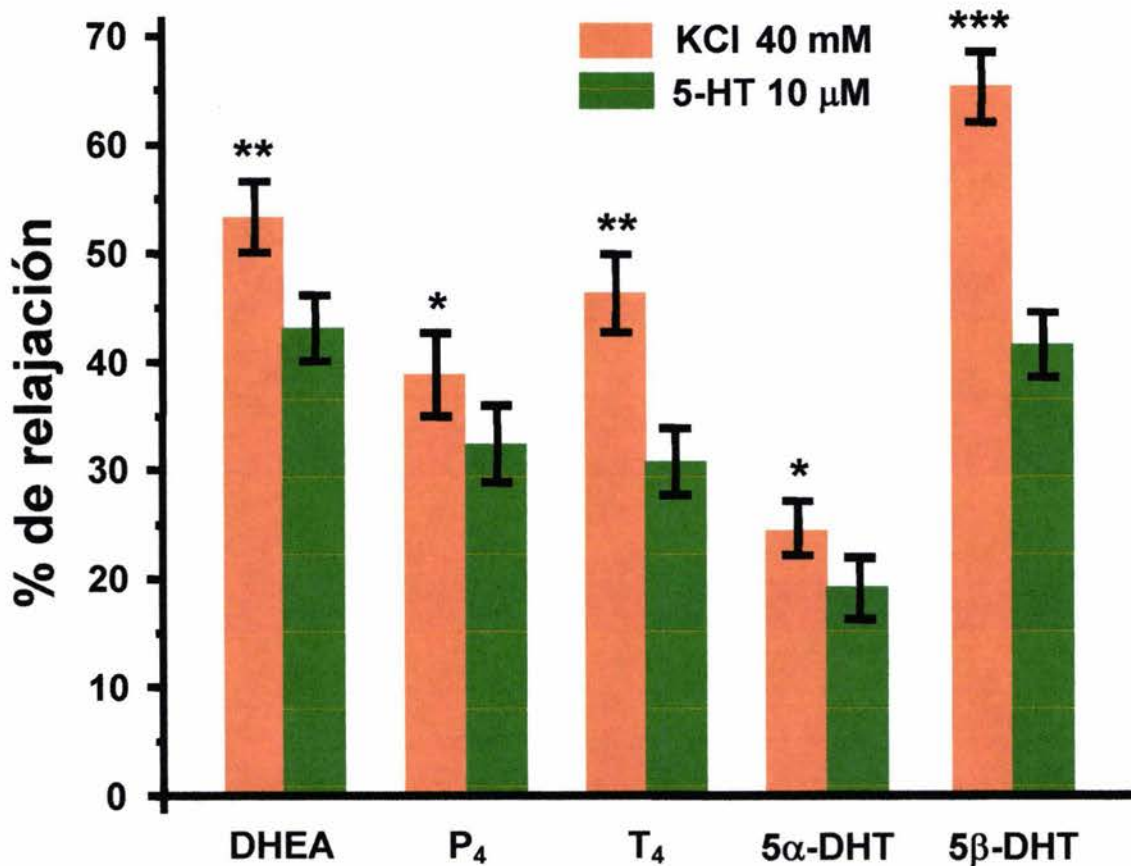



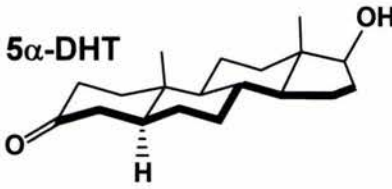



Figura. 7.6. Comparación del efecto vasodilatador de los diferentes esteroides sobre la contracción inducida por KCl 40 mM vs. 5-HT 10 μ M, en la AUH. El efecto vasodilatador de los esteroides fue significativamente mayor sobre la contracción a KCl, * $p < 0.05$, ** $p < 0.0005$, *** $p < 0.000005$. Cada barra representa la media de $n = 6 \pm$ DEM.

Tabla 7.1. Efecto relajante de los diferentes esteroides sobre la contractura de KCl 40 mM y 5-HT 10 μ M, en la AUH.

ESTEROIDE (120 μ M)	% DE RELAJACIÓN n = 6 \pm DEM sobre la contractura de		RELACION DE POTENCIA \square sobre la contractura de	
	KCl 40 mM	5-HT 10 μ M	KCl	5-HT
DHEA 	53.31 \pm 3.29 **	43.09 \pm 3.07	1.0	1.0
P ₄ 	38.87 \pm 3.83 *	32.45 \pm 3.56	0.73	0.75
T ₄ 	46.33 \pm 3.57 **	30.83 \pm 3.08	0.87	0.71
5 α -DHT 	24.46 \pm 2.72 *	19.10 \pm 3.27	0.45	0.44
5 β -DHT 	65.32 \pm 3.23 ***	41.06 \pm 3.46	1.22	0.95

\square La potencia fue evaluada por la fórmula: % de relajación del esteroide de prueba / % de relajación de DHEA, asumiendo un valor de 1.0 para DHEA. La contractura de KCl fue significativamente mayor al efecto vasodilatador de las hormonas esteroides, *p < 0.05, **p < 0.0005, ***p < 0.000005.

Con los datos obtenidos se estableció la siguiente relación de potencia:

Contracción de KCl: 5β -DHT > DHEA > T₄ > P₄ > 5 α -DHT

Contracción de 5-HT: DHEA \geq 5 β -DHT > P₄ \geq T₄ > 5 α -DHT

7.5. Efecto de los esteroides sobre la contracción de CaCl₂ en arteria despolarizada.

Los datos mostraron que el esteroide de mayor potencia para relajar la contractura de KCl, 5 β -DHT a 120 μ M, es capaz de antagonizar la contracción inducida por CaCl₂ 2.5 mM en anillos arteriales despolarizados (Fig. 7.5C), en forma lineal dependiente de la concentración (Fig. 7.7). El valor de la CI₅₀ fue de 33.33 μ M. La comparación de la eficacia de 5 β -DHT a 120 μ M sobre los diferentes agentes contráctiles (5-HT, KCl y CaCl₂) mostró que este andrógeno es marcadamente más potente para antagonizar la contractura de CaCl₂ (95.28 ± 5.76 %; n = 6) que la de KCl (65.32 ± 3.26 %; n = 6) y la de 5-HT (41.06 ± 3.46 %; n = 6). Cabe mencionar que el antagonismo que ejerce dicho andrógeno sobre la contracción de CaCl₂ fue revertido después de retirar al esteroide del tejido mediante el lavado (Fig. 7.5C).

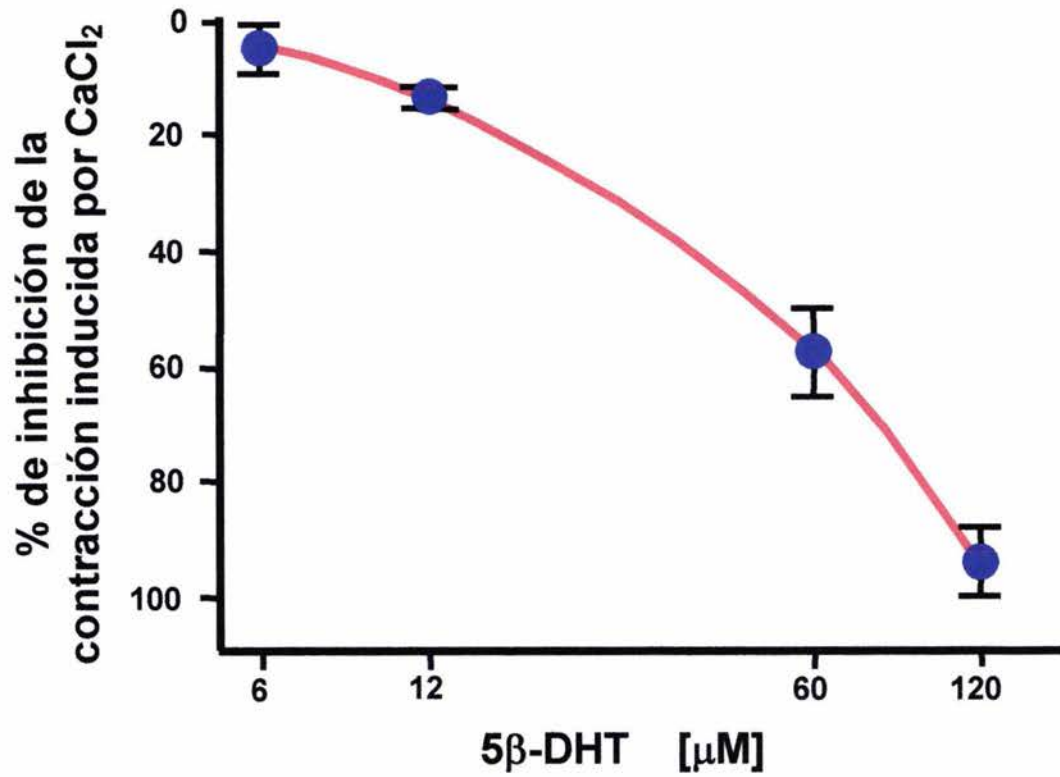


Figura 7.7. Prevención de la contracción inducida con CaCl₂ 2.5 mM por diferentes concentraciones de 5β-DHT en AUH despolarizada. Cada punto representa la media de $n > 4 \pm \text{DEM}$.

8. DISCUSIÓN

8.1. General.

Los diferentes esteroides utilizados en este estudio (DHEA, P4, T4, 5 α -DHT y 5 β -DHT) fueron seleccionados por ser los esteroides de mayor potencia para relajar la arteria umbilical humana (AUH) contraída con KCl (Toledo et al., 2003). El efecto inhibitorio que inducen sobre otro tipo de contracciones (5-HT y CaCl₂) comprueba que este grupo de esteroides son sustancias vasoactivas por inhibir la vasoconstricción producida por diferentes agentes.

La rapidez del efecto y la reversión del mismo, después de un lavado, muestra que los esteroides inducen vasodilatación por una vía independiente a la acción genómica. Resultados anteriores muestran que el efecto vasodilatador que inducen sobre la AUH, no es bloqueado por antihormonas (antiprogestina y antiandrógeno) o inhibidores de la transcripción y síntesis de proteínas (Toledo et al., 2003). Apoyando categóricamente que la vasodilatación ejercida por los esteroides es un efecto de tipo nongenómico. Además, otro hecho que reafirma lo anterior, es la baja o nula afinidad del esteroide de mayor potencia vasodilatadora, 5 β -DHT, al receptor intracelular de andrógenos (RA). En marcado contraste, su isómero 5 α -reducido, 5 α -DHT, quien es el andrógeno de mayor afinidad al RA (Deslypere et al., 1992), fue el menos efectivo para inducir vasodilatación. Por lo tanto, el agudo efecto vasodilatador de 5 β -DHT, no es mediado por RA y es la prueba contundente de que los receptores intracelulares a esteroides y las vías de transcripción no participan en la vasodilatación que ejercen los esteroides.

8.2. Mecanismo de acción.

Una vez caracterizado el efecto vasodilatador producido por los esteroides en la AUH como un fenómeno de tipo nongenómico, el siguiente paso es discernir entre las hipótesis disponibles que intentan explicar dicha acción.

Por principio, la participación del endotelio en este efecto vasodilatador resulta aún muy controversial. En contraparte a los trabajos que apoyan un efecto vasodilatador dependiente del endotelio, hay estudios que sólo atribuyen al endotelio una contribución parcial (principalmente del óxido nítrico) en el efecto vasodilatador de los esteroides (Chou et al., 1996; Costarella et al., 1996; Honda et al., 1999; Ding y Stallone, 2001; Li et al., 2001; Rosenfeld et al., 2002; Tep-areenan et al., 2002, 2003a, 2003b; Abou-Mohamed et al., 2003), mientras que otros postulan un efecto vasodilatador independiente del endotelio (Jiang et al., 1991, 1992b; Yue et al., 1995; Perusquía et al., 1996; Glusa et al., 1997; Mugge et al., 1997; Teoh et al., 1999; Herkert et al., 2000; Shaw et al., 2000; Salom et al., 2001, 2002; Jones et al., 2002; Perusquía y Calixto, 2003; Tsang et al., 2003). Por lo cual, no es posible descartar de manera categórica la participación del endotelio en la vasodilatación inducida por los esteroides. Sin embargo, las evidencias de nuestro grupo de trabajo revelan que el efecto vasodilatador de una serie de andrógenos (T_4 , 5α -DHT y 5β -DHT) y P_4 , sobre la AUH precontraída con KCl, no fue bloqueado por el inhibidor de la oxido nítrico sintetasa, L-NAME (Toledo et al., 2003), descartando la participación del óxido nítrico endotelial como intermediario en la vasodilatación que producen los esteroides.

Aunado a lo anterior, se ha sugerido que el endotelio vascular no juega un papel importante en la regulación del tono vasomotor de la AUH y los reportes que apoyan esta propuesta muestran una pobre respuesta de este vaso a la acción de noradrenalina (Gokhale et al., 1966; Altura et al., 1972; White et al., 1989), acetilcolina (Van de Voorde, 1987) y de óxido nítrico (Chaudhuri et al., 1991). Un reporte notable es que la vasodilatación inducida por el ionóforo de Ca^{2+} A23187 y acetilcolina en la AUH, es independiente del endotelio (Xie y Triggle, 1994; Tiritilli, 2000).

La identificación de los canales de K^+ en la AUH ha mostrado la presencia de K_V y K_{Ca} (Milesi et al., 2003). Con respecto al posible efecto agonista de los esteroides sobre los diferentes tipos de canales de K^+ , los resultados del presente estudio muestran la incapacidad de los antagonistas de los canales de K^+ para bloquear el efecto vasodilatador de los esteroides, descartando su interacción con los canales de K^+ . Este hallazgo está en desacuerdo con trabajos previos que postulan a los K_{ATP} como el blanco de la acción de los esteroides (Chou et al., 1996; Honda et al., 1999), algunos otros reportan que los esteroides modulan a los K_V (Ding y Stallone, 2001; Gupte et al., 2002a; Won et al., 2003), pero la gran mayoría apunta hacia la activación de los K_{Ca} como el mecanismo responsable del efecto vasodilatador producido por los esteroides (Yue et al., 1995; White et al., 1995; Darkow et al., 1997; Farrukh et al., 1998; Jacob y White, 2000; Mujerki et al., 2000b; Deenadalayu et al., 2001; Tep-areenan et al., 2002, 2003a, 2003b; Tsang et al., 2003; White et al., 2002). Además, estudios electrofisiológicos, utilizando la técnica de “patch-clamp”, han reportado que el $17\beta\text{-E}_2$, P_4 , T_4 y DHEA activan la corriente de los K_{Ca} (White et al., 2002; Jacob y White, 2000; Deenadalayu et al., 2001; Farrukh et al., 1998) y los K_V (Gupte et al., 2002a) y que la $5\alpha\text{-DHT}$ incrementa la corriente total de K^+ en

miocitos coronarios de conejo (Carnes y Dech, 2002). Sin embargo, las concentraciones de los esteroides utilizados en la mayoría de estos estudios (Farrukh et al., 1998; Jacob y White, 2000; Carnes y Dech, 2002) se encuentran en el rango μM , lo cual representa concentraciones muy altas para experimentos donde se evalúan las corrientes iónicas de una célula. Tal es el caso del tenue efecto mostrado por $5\beta\text{-DHT}$ sobre la corriente total de K^+ en células aisladas de aorta de rata; observándose sólo a la concentración de $100 \mu\text{M}$ como un ligero incremento de estas corrientes (Calixto et al., 2004). Es importante considerar que los esteroides pueden modificar las corrientes de Ca^{2+} de los canales de Ca^{2+} cuando son aplicados a concentraciones nM (Shan et al., 1994; Sheldon y Argentieri, 1995; Gupte et al., 2002b; Scragg et al., 2004). Por nuestra parte, los resultados del presente estudio evidencian que los antagonistas de los diferentes tipos de canales de K^+ no bloquean el efecto de vasodilatador de los esteroides descartando la participación de los canales de K^+ en el efecto vasodilatador de las hormonas esteroides sobre la AUH. Este hecho resalta que las propuestas sobre la participación de los canales de K^+ no son contundentemente apoyadas, al menos, en este tipo de vaso sanguíneo (AUH). Por tal motivo, las evidencias existentes sobre la interacción de los esteroides con canales de K^+ habrán de tomarse con reserva.

Debido a que la interacción de los esteroides con los canales de K^+ de la AUH ha quedado excluida, la posibilidad a ser discutida es que el efecto vasodilatador de los esteroides involucra una interacción con los canales de Ca^{2+} . A este respecto, la AUH es el único vaso en los mamíferos que no cuenta con inervación autónoma (Spivack, 1946; Reilly y Russell, 1977; Fox y Khong, 1990). Así, el tono vascular de la AUH, que modula la circulación fetoplacentaria, es regulado por mediadores locales; tales como

prostaglandinas y 5-HT o algunos iones como K^+ y Ca^{2+} (Ranking et al., 1979; Haugen et al., 1991).

Las respuestas contráctiles a 5-HT y KCl en la AUH son explicadas por dos diferentes mecanismos: (i) 5-HT produce contracción por influjo de Ca^{2+} del medio extracelular a través de los canales de Ca^{2+} operados por receptor (CCOR) y liberación de los reservorios intracelulares. (ii) La respuesta contráctil producida por KCl es principalmente debida al influjo de Ca^{2+} extracelular vía los canales de Ca^{2+} operados por voltaje (CCOV), relacionados a la despolarización membranal (Marin et al., 1990; Salom et al., 1990; Dogan et al., 1991; Wylam et al., 1993; Tufan et al., 2003).

En este estudio se observó que la contracción de 5-HT fue menos sensible que la de KCl al efecto vasodilatador de los esteroides. Ante este hecho, es importante considerar que la contracción, dependiente de la concentración, a 5-HT en la AUH, es vía la activación de su propio receptor membranal; 5-HT_{1B} y particularmente 5-HT_{2A} (Lovren et al., 1999). La interacción "5-HT-receptor" produce un incremento de la entrada de Ca^{2+} a través de los CCOR, aunque también se ha publicado que los CCOV o la liberación de Ca^{2+} intracelular pueden participar en este evento (Maggi et al., 1983; Kalkman et al., 1984; Tufan et al., 2003). Todos estos datos en conjunto señalan que los esteroides actúan principalmente sobre los CCOV y que los CCOR participan sólo en parte. En este trabajo fue posible proponer la participación de ambos tipos de canales, CCOV y CCOR, en el efecto vasodilatador de los esteroides; siendo de alrededor de un 60% para los CCOV, contra aproximadamente 40 % para los CCOR. Para confirmar lo anterior, se tiene la evidencia del abrumador efecto inhibitorio de 5 β -DHT (95.28 %), sobre la contractura de

CaCl₂ en tejidos despolarizados, donde la única vía de entrada de Ca²⁺ es a través de los CCOV. Nosotros no descartamos la posibilidad de que los esteroides puedan estar involucrados, al menos en parte, en la inhibición de la liberación de Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico; así estudios posteriores deberán explorar esta posibilidad.

La propuesta de un efecto Ca²⁺ antagónico de los esteroides, por disminución de la entrada de Ca²⁺ vía CCOV concuerda con los resultados de otros estudios en diferentes vasos de animales experimentales (Shan et al., 1994; Han et al., 1995; Ogata et al., 1996; Lippert et al., 1996; Glusa et al., 1997; Crews y Khalil, 1999a, 1999b; Murphy y Khalil, 1999, Perusquía y Villalón, 1999, 2002; Barbagallo et al., 2001; Li et al., 2001; Salom et al., 2001, 2002; English et al., 2002; Jones et al., 2002; Zhang et al., 2002; Scragg et al., 2004), de donde se infiere un mayor efecto inhibitorio de los esteroides sobre los CCOV, sin descartar la acción sobre los CCOR.

Para apoyar más esta aseveración, existen estudios directos sobre células de músculo liso vascular (CMLV) con la técnica electrofisiológica de “patch-clamp”, que han mostrado la inactivación de las corrientes de Ca²⁺ tipo L (dependientes de voltaje) por el 17β-E₂ (Jiang et al., 1992a; Shan et al., 1994; Zhang et al., 1994; Nakajima et al., 1995, 1999; Sheldon y Argentieri, 1995) y la P₄ (Barbagallo et al., 2001; Zhang et al., 2002). En cuanto a los andrógenos, hay un reporte del bloqueo provocado por la epiandrosterona en los canales de Ca²⁺ tipo L en miocitos coronarios de rata (Gupte et al., 2002b) y finalmente, un trabajo reciente reporta que la T₄ bloquea los canales de Ca²⁺ tipo L en miocitos de la línea A7r5 de la aorta de rata y en células de la línea HEK 293 transfectadas

con la subunidad α_{1C} del canal de Ca^{2+} tipo L cardiovascular humano (Scragg et al., 2004).

8.3. Potencia.

El análisis de la relación de potencia del efecto vasodilatador producido por los diferentes esteroides sobre la contractura de KCl y 5-HT, muestra una correlación entre la estructura química y el efecto relajante desplegado por cada tipo de esteroide. En ambas contracturas se observa que los compuestos más potentes son DHEA y 5β -DHT. Así, DHEA, una molécula con estructura 3β -hidroxi- $\Delta 5$, es más potente que compuestos con estructura $\Delta 4,3$ ceto como T_4 y P_4 , los cuales poseen una potencia intermedia en ambas contracturas. Estas observaciones concuerdan con la comparación realizada en aorta de rata contraída con noradrenalina; donde DHEA resultó ser más potente que T_4 y P_4 a la concentración de $30 \mu\text{M}$ (Silva, 2002).

Tomando en cuenta que la T_4 sufre la reducción del doble enlace del anillo A y el hidrógeno del C5 presenta una orientación $\alpha/trans$, se obtiene el esteroide menos potente, 5α -DHT. En marcado contraste, el isómero β/cis , 5β -DHT, mostró una alta potencia para relajar la contractura de KCl y 5-HT. Esta correlación entre la diferente conformación de ambos andrógenos (5α -DHT y 5β -DHT) y su eficacia vasodilatadora, nos lleva a la conclusión de que la conformación $5\beta/cis$ es necesaria para un agudo efecto vasodilatador. En apoyo a lo anterior, sobre la fuerte potencia de 5β -DHT, también se ha mostrado que este 5β -metabolito induce un fuerte efecto vasodilatador (Perusquía et al., 1996; Perusquía y Villalón, 1999) e hipotensor (Perusquía y Villalón, 2002) en la rata. La

diferencia estructural entre la configuración $\alpha/trans$ y β/cis en el C5, puede explicarse en virtud de que en la configuración 5β se observa una marcada flexión del anillo A con respecto a los demás anillos del sistema esteroidal (ver tabla 7.1), lo cual posiblemente puede ofrecer una mayor interacción con el potencial sitio de interacción membranal, el CCOV, para ejercer su acción vasorelajante (revisado por Perusquía, 2003).

Aunque el efecto vasodilatador de 5β -DHT se vio disminuido sobre la contractura de 5-HT, éste andrógeno conservó una potencia cercana al esteroide más efectivo en esta situación, DHEA. Cuando el doble enlace en el C5-C6 de DHEA se isomeriza al C4-C5 y se pierde el grupo ceto en el C17, como ocurre en compuestos $\Delta^4,3$ ceto como T_4 y P_4 , se reduce la potencia vasodilatadora de la molécula y cuando la T_4 es reducida hacia la configuración $5\alpha/trans$, 5α -DHT, la potencia es drásticamente abatida.

8.4. Implicaciones fisiológicas.

Los resultados del presente estudio muestran que las hormonas esteroides son sustancias vasoactivas en la AUH, por inhibir las diferentes contracturas (5-HT, KCl y $CaCl_2$) inducidas en este vaso. Por tal razón, es posible especular sobre el potencial efecto modulador de estos compuestos sobre el tono vasomotor de la circulación fetoplacentaria, contribuyendo a mantener un adecuado intercambio entre los compartimientos materno y fetal, el cual puede verse comprometido en caso de producirse una vasoconstricción; ya sea por el aumento de agentes vasoconstrictores o bien por la deficiencia de compuestos vasorelajantes (como las hormonas esteroides). Así, la vasoconstricción de los vasos sanguíneos umbilicales se ve reflejada en productos con

bajo peso, malformaciones o complicaciones en diferentes sistemas, llegando incluso a provocar la muerte del neonato. Por lo cual, las hormonas esteroides tendrían un papel fundamental para el óptimo crecimiento y desarrollo del feto, produciendo vasodilatación y por ende, liberando la respuesta vasoconstrictora, contribuyendo de esta manera a disminuir la mortalidad perinatal. Asimismo, esta nueva acción vasodilatadora de los esteroides podría estar involucrada en la fisiología del embarazo, ya que este estado es asociado con muchas adaptaciones cardiovasculares, como el incremento del volumen sanguíneo y del ritmo cardíaco y la disminución de la presión arterial (De Swiet, 1991).

Con la ausencia de inervación de la AUH, otros mecanismos pueden estar regulando el flujo sanguíneo arterial y placentario y la acción vasoreguladora de los esteroides resulta de gran valor por ser una modulación miogénica y no neurogénica. En forma colateral, se abre la posibilidad de desarrollar nuevos fármacos vasodilatadores y vasodepresores que contribuyan al tratamiento de patologías como la preeclampsia, disminuyendo la incidencia de problemas perinatales.

9. CONCLUSIONES

Las hormonas esteroideas: DHEA, P4, T4, 5 α -DHT y 5 β -DHT son sustancias vasoactivas al inhibir el efecto vasoconstrictor de diferentes agentes en la AUH.

La incapacidad de los antagonistas de los canales de K⁺ para bloquear el efecto vasodilatador producido por los esteroideos sexuales en la AUH, descarta a la activación de los canales de K⁺ en el mecanismo de la acción vasodilatadora de estos compuestos.

La mayor sensibilidad de la contractura de KCl con respecto a la de 5-HT, al efecto vasodilatador de las hormonas esteroideas, establece que la vasorelajación producida por estos compuestos presenta mayor afinidad a la inactivación de los CCOV; sin embargo, no se descarta la afinidad, aunque en menor proporción, a los CCOR.

La contundente inhibición de la contractura de CaCl₂ producida por 5 β -DHT en el tejido previamente despolarizado, confirma la acción Ca²⁺ antagónica, por bloqueo de la entrada de Ca²⁺ a través de los CCOV.

La marcada potencia vasorelajante de 5 β -DHT, con respecto a los otros esteroideos, establece que la configuración 5 β /*cis* es necesaria para optimizar el efecto vasodilatador de los esteroideos.

10. REFERENCIAS

- Abou-Mohamed G, Elmarakby A, Carrier GO, Catravas JD, Caldwell RW, White RE. 2003. Estradiol relaxes rat aorta via endothelium-dependent and -independent mechanisms. *Pharmacology*. 69: 20-26.
- Adams MR, Williams JK, Kaplan JR. 1995. Effects of androgens on coronary artery atherosclerosis and atherosclerosis-related impairment of vascular responsiveness. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 15: 562-570.
- Adamson SL, Myatt L, Byrne BM. 1998. Regulation of umbilical blood flow. En: *Fetal and neonatal physiology*. Polin R.A. (ed). Saunders. Philadelphia. USA. 267p.
- Alexandersen P, Haarbo J, Christiansen C. 1996. The relationship of natural androgens to coronary heart disease in males: a review. *Atherosclerosis*. 125: 1-13.
- Altura BM, Malaviya D, Reich CF, Orkin LR. 1972. Effects of vasoactive agents on isolated human umbilical arteries and veins. *Am J Physiol*. 222: 345-355.
- Azad N, Pitale S, Barnes E, Friedman N. 2003. Testosterone treatment enhances regional brain perfusion in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab*. 88: 3064-3068.
- Bammann BL, Coulam CB, Jiang N. 1980. Total and free testosterone during pregnancy. *Am J Obstet Gynecol*. 137: 293-298.
- Bar J, Tepper R, Fuchs J, Pardo Y, Goldberger S, Ovadia J. 1993. The effect of estrogen replacement therapy on platelet aggregation and adenosine triphosphate release in postmenopausal women. *Obstet Gynecol*. 81: 261-264.
- Barbagallo M, Shan J, Pang PT, Resnick LM. 1995. Effects of dehydroepiandrosterone sulfate on cellular calcium responsiveness and vascular contractility. *Hypertension*. 26: 1065-1069.
- Barbagallo M, Dominguez LJ, Licata G, Shan J, Bing L, Karpiski E, Pang PT, Resnick LM. 2001. Vascular effects of progesterone: role of cellular calcium regulation. *Hypertension*. 37: 142-147.
- Barrett-Connor E. 1998. Hormone replacement therapy. *BMJ*. 317: 457-461.
- Beale C, Rosano GM, Sontag P, Collins P. 1997. Effect of testosterone on coronary blood flow velocity to acetylcholine in men with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. [Suppl] 29: 373A.
- Beldekas JC, Smith B, Gerstenfeld LC, Sonenshein GE, Franzblau C. 1981. Effects of 17 β -estradiol on the biosynthesis of collagen in cultured bovine aortic smooth

muscle cells. *Biochemistry*. 20: 2162-2167.

- Belfort MA, Saade GR, Suresh M, Vedernikov YP. 1996. Effects of estradiol-17beta and progesterone on isolated human omental artery from premenopausal nonpregnant women and from normotensive and preeclamptic pregnant women. *Am J Obstet Gynecol*. 174: 246-53.
- Bell DR, Rensberger HJ, Koritnik DR, Koshy A. 1995. Estrogen pretreatment directly potentiates endothelium-dependent vasorelaxation of porcine coronary arteries. *Am J Physiol: Heart Circ Physiol*. 268: 377-383.
- Benagiano G, Mancuso S, Mancuso FP, Wiqvist N, Diczfalusy E. 1968. Studies on the metabolism of C-19 steroids in the human foeto-placental unit. *Acta Endocrinol*. 57: 187-207.
- Bracamonte MP, Jayachandran M, Rud KS, Miller VM. 2002. Acute effects of 17 β -estradiol on femoral veins from adult gonadally intact and ovariectomized female pigs. *Am J Physiol: Heart Circ Physiol*. 283: 2389–2396.
- Browne M, Connolley C, Docherty JR. 1999. Vascular actions of 17 β -oestradiol in rat aorta and mesenteric artery. *J Auton Pharmacol*. 19: 291-299.
- Bychkov R, Gollasch M, Steinke T, Ried C, Luft FC, Haller H. 1998. Calcium-activated potassium channels and nitrate-induced vasodilation in human coronary arteries. *J Pharmacol Exp Ther*. 285: 293-298.
- Calixto E, Montaña LM, Perusquía M. 2004. Efecto de 5 β -dihidrotestosterona sobre las corrientes de K⁺ en miocitos aislados de aorta torácica de rata. Presentado en: X Congreso de carteles “Dr. Lino Díaz de León”. Instituto de Investigaciones Biomédicas. UNAM.
- Carnes CA, Dech SJ. 2002. Effects of dihydrotestosterone on cardiac inward rectifier K⁺ current. *Int J Androl*. 25: 210-214.
- Chan HY, Yao X, Tsang SY, Chan FL, Lau C, Huang Y. 2001. Different role of endothelium/nitric oxide in 17 β -estradiol-and progesterone-induced relaxation in rat arteries. *Life Sci*. 69: 1609-1617.
- Chaudhuri G, Buga GM, Gold ME, Wood KS, Ignarro LJ. 1991. Characterization and actions of human umbilical endothelium derived relaxing factor. *Br J Pharmacol*. 102: 331-336.
- Charbonneau A, The VL. 2001. Genomic organization of a human 5 β -reductase and its pseudogene and substrate selectivity of the expressed enzyme. *Biochim Biophys Acta*. 1517: 228-235.
- Chester AH, Jiang C, Borland JA, Yacoub MH, Collins P. 1995. Oestrogen relaxes human epicardial coronary arteries through non-endothelium-dependent mechanisms.

Coron Artery Dis. 6: 417-422.

- Chou TM, Shudir K, Hutchinson SJ, Ko E, Amidon TM, Collins P, Chatterjee K. 1996. Testosterone induces dilation of canine coronary conductance and resistance arteries in vivo. *Circulation*. 94: 2614-2619.
- Collins P, Shay J, Jiang C, Moss J. 1994. Nitric oxide accounts for dose-dependent estrogen-mediated coronary relaxation after acute estrogen withdrawal. *Circulation*. 90: 1964-1968.
- Costa Sampaio Moura MJ, Marcondes FK. 2001. Influence of estradiol and progesterone on the sensitivity of rat thoracic aorta to noradrenaline. *Life Sci*. 68: 881-888.
- Costarella CE, Stallone JN, Rutecki GW, Whittier FC. 1996. Testosterone causes direct relaxation of rat thoracic aorta. *J Pharmacol Exp Ther*. 277: 34-39.
- Crews JK, Khalil RA. 1999a. Antagonistic effects of 17 β -estradiol, progesterone, and testosterone on Ca²⁺ entry mechanisms of coronary vasoconstriction. *Arterioscler. Thromb Vasc Biol*. 19: 1034-1040.
- Crews JK, Khalil RA. 1999b. Gender-specific inhibition of Ca²⁺ entry mechanisms of arterial vasoconstriction by sex hormones. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 26: 707-715.
- Darkow DJ, Lu L, White RE. 1997. Estrogen relaxation of coronary artery smooth muscle is mediated by nitric oxide and cGMP. *Am J Physiol: Heart Circ Physiol*. 272: 2765-2773.
- De Swiet M. 1991. The cardiovascular system. En: *Clinical physiology in obstetrics*. Chamberline G., Broughton-Piplang F. (eds). Oxford, UK: Backwell. 338p.
- Deenadayalu V, White RE, Stallone JN, Gao X, García AJ. 2001. Testosterone relaxes coronary arteries by opening the large-conductance, calcium-activated potassium channel. *Am J Physiol: Heart Circ Physiol*. 281: 1720-1277.
- Deslypere JP, Young M, Wilson JD, McPhaul MJ. 1992. Testosterone and 5 α -dihydrotestosterone interact differently with the androgen receptor to enhance transcription of the MMTV-CAT reporter gene. *Mol Cell Endocrinol*. 88: 15-22.
- Diczfalusy E. 1969. Steroid metabolism in the foeto-placental unit. *Excerpta Med Int Congr Ser*. 183: 65-109.
- Ding AQ, Stallone JN. 2001. Testosterone-induced relaxation of rat aorta is androgen structure specific and involves K⁺ channel activation. *J Appl Physiol*. 91: 2742-2750.
- Dogan N, Cicek E, Cenik AG, Singirik E, Kilic M, Ozcan AS. 1991. 5-Hydroxytryptamine-induced contraction of human isolated umbilical artery and its dependence on

cellular and extracellular Ca^{2+} . Arch Int Pharmacodyn Ther. 312: 79-85.

- Du Z, Sun M, Wang B, Qi Y, Ge Q. 1999. The effects of sex hormones on blood vessels. Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao. 21: 282-287.
- Dubey RK y Jackson EK. 2001. Genome and Hormones: Gender differences in physiology invited review: Cardiovascular protective effects of 17β -estradiol metabolites. J Appl Physiol. 91: 1868-1883.
- English KM, Steeds R, Jones TH, Channer KS. 1997. Testosterone and coronary heart disease: is there a link?. Q J Med. 90: 787-791.
- English KM, Steeds R, Jones TH, Diver MJ, Channer KS. 2000a. Low-dose transdermal testosterone therapy improves angina threshold in men with chronic stable angina: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. Circulation. 102: 1906-1911.
- English KM, Mandour O, Steeds RP, Diver MJ, Jones TH, Channer KS. 2000b. Men with coronary artery disease have lower levels of androgens than men with normal coronary angiograms. Eur Heart J. 21: 890-894.
- English KM, 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.
- English KM, Jones TH, Morice AH, Channer KS. 2002. Testosterone act as a coronary vasodilator by a calcium antagonistic action. J Endocrinol Investig. 25: 455-458.
- Ettinger B, Friedman GD, Bush T, Queensberry CP. 1996. Reduces mortality associated with long-term postmenopausal estrogen therapy. Obstet Gynecol. 87: 6-12.
- Farhat MY, Lavigne MC, Ramwell PW. 1996. The vascular protective effects of estrogen. FASEB J. 10: 615-614.
- Farrukh IM, Peng W, Orlinska U, Hoidal J. 1998. Effect of dehydroepiandrosterone on hypoxic pulmonary vasoconstriction: a Ca^{2+} -activated K^{+} -channel opener. Am J Physiol: Lung Cell Mol Physiol. 274: 186-195.
- Fausett MB, Belfort MA, Nanda R, Saade GR, Vedernikov Y. 1999. The effects of sex steroids on human umbilical artery and vein. J Soc Gynecol Invest. 6: 27-31.
- Fox SB, Khong TY. 1990. Lack of innervation of human umbilical cord: an immunohistological and histochemical study. Placenta. 11: 59-62.
- Freay AD, Curtis SW, Korach KS, Rubanyi GM. 1997. Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by estrogen in depolarized rat and mouse aorta: role of nuclear estrogen receptor and Ca^{2+} uptake. Circ Res. 81: 242-248.
- Geary GG, Krause DN, Duckles SP. 2000a. Estrogen reduces mouse cerebral artery tone

- trough endothelial NOS- and cyclooxygenase-dependent mechanism. *Am J Physiol: Heart Circ Physiol.* 279: 511-519.
- Geary GG, Krause DN, Duckles SP. 2000b. Gonadal hormones affect diameter of male rat cerebral arteries trough endothelium-dependent mechanism. *Am J Physiol: Heart Circ Physiol.* 279: 610-618.
- Gisclard V, Miller VM, Vanhoutte PM. 1988. Effect of 17 β -estradiol on endothelium-dependent responses in the rabbit. *J Pharmacol Exp Ther.* 244: 19-22.
- Glusa E, Graser T, Wagner S, Oettel M. 1997. Mechanisms of relaxation of rat aorta in response to progesterone and synthetic progestins. *Maturitas.* 28: 181-191.
- Godsland LF, Gangar K, Walton C, Cust MP, Whitehead MI, Wynn V, Stevenson JC. 1993. Insulin resistance, secretion, and elimination in postmenopausal women receiving oral or transdermal hormone replacement therapy. *Metabolism.* 42: 846-853.
- Gokhale SD, Gulati OD, Kelkar LV, Kelkar VV. 1966. Effect of some drugs on human umbilical artery in vitro. *Br J Pharmacol Chemother.* 27: 332-339.
- Grady D, Rubin SM, Petitti DB. 1992. Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. *Ann Intern Med.* 117: 1016-1037.
- Gupte SA, Li K, Okada T, Sato K, Oka M. 2002a. Inhibitors of pentose phosphate pathway cause vasodilation: Involvement of voltage-gated potassium channels. *J Pharmacol Exp Ther.* 301: 299-305.
- Gupte SA, Tateyama M, Okada T, Oka M, Ochi R. 2002b. Testosterone precursor, blocks L-type calcium channels of ventricular myocytes and inhibits myocardial contractility. *J Mol Cell Cardiol.* 34: 679-688.
- Hamm L. 1942. Testosterone propionate in the treatment of angina pectoris. *J Clin Endocrinol.* 2: 325-328.
- Han SZ, Karaki H, Ouchi Y, Akishita M, Orimo H. 1995. 17 β -estradiol inhibits Ca²⁺ influx and Ca²⁺ release induced by thromboxane A₂ in porcine coronary artery. *Circulation.* 91: 2649-2626.
- Hata T, Hashimoto M, Senoh D, Hata K, Kitao M, Masumura S. 1995. Effect of dehydroepiandrosterone sulfate on ophthalmic artery flow velocity waveforms in full-term pregnant women. *Am J Perinatol.* 12:135-137.
- Haugen G, Bjoro K, Stray-Pedersen S. 1991. Vasoactive effects of intra- and extravascular serotonin, PGE₂ and PGF₂ alpha in human umbilical arteries. *Gynecol Obstet Invest.* 31: 208-212.
- Henderson BE, Paganini-Hill C, Ross RK. 1991. Decreased mortality in user of estrogen

replacement therapy. *Arch Intern Med.* 151: 75-78.

Herkert O, Kuhl H, Busse R, Schini-Kerth VB. 2000. The progestin levonorgestrel induces endothelium-independent relaxation of rabbit jugular vein via inhibition of calcium entry and protein kinase C: role of cyclic AMP. *Br J Pharmacol.* 130: 1911-1918.

Herman SM, Robinson JC, McCredie RJ, Adams MR, Boyer MJ, Celermajer DS. 1997. Androgen deprivation is associated with enhanced endothelium-dependent dilation in adult men. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 17: 2004-2009.

Honda H, Unemoto T, Kogo H. 1999. Different mechanism for testosterone-induced relaxation of aorta between normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 34: 1232-1236.

Huyton C, Leathard HL. 1991. Effects of progesterone on contractility of rat isolated vascular smooth muscle. *J Physiol.* 438: 23-32.

Jacob MK, White RE. 2000. Diazepam, γ -aminobutyric acid, and progesterone open K^+ channels in myocytes from coronary arteries. *Eur J Pharmacol.* 403: 209-219.

Jaffe MD. 1977. Effect of testosterone cypionate on post-exercise ST segment depression. *Br Heart J.* 39: 1217-1222.

Jiang CW, Sarrel PM, Lindsay DC, Poole-Wilson PA, Collins P. 1991. Endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery by 17β -estradiol in vitro. *Br J Pharmacol.* 104:1033-1037.

Jiang CW, Poole-Wilson PA, Sarrel PM, Mochizuki S, Collins P, Macleod KT. 1992a. Effect of 17β -oestradiol on contraction, Ca^{2+} current and intracellular free Ca^{2+} in guinea-pig isolated cardiac myocytes. *Br J Pharmacol.* 106: 739-745.

Jiang CW, Sarrel PM, Lindsay DC, Poole-Wilson PA, Collins P. 1992b. Progesterone induces endothelium-independent relaxation of rabbit coronary artery in vitro. *Eur J Pharmacol.* 211:163-167.

Jones RD, English KM, Pugh PJ, Morice AH, Jones TH, Channer KS. 2002. Pulmonary vasodilatory action of testosterone: evidence of a calcium antagonistic action. *J Cardiovasc Pharmacol.* 39: 814-823.

Jousilahti P, Vartiainen E, Tuomilehto J, Puska P. 1999. Sex, age, cardiovascular risk factors, and coronary heart disease: a prospective follow-up study of 14786 middle-aged men and women in Finland. *Circulation.* 99: 1165-1172.

Kakucs R, Várbiro S, Székács B, Nádasy G, Ács N, Monos E. 1998. Direct relaxing effect of estradiol- 17β and progesterone on rat saphenous artery. *Microvasc Res.* 56: 139-143.

Kalanic JDJ, Ramírez RJ, Einzig S, Neal WA, Omar HA. 2000. Estrogen-induced relaxation

- in bovine coronary arteries in vitro: evidence for a new mechanism. *West Va Med J.* 96: 617-621.
- Kalkman HO, Timmermans PB, Van Zwieten PA. 1984. The vasopressor response to serotonin (5-HT) in rats; its dependency upon extracellular calcium. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 268: 232-241.
- Kang SM, Jang Y, Kim JY, Chung N, Cho SY, Chae JS, Lee JH. 2002. Effect of oral administration of testosterone on brachial arterial vasoreactivity in men with coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 89: 862-864.
- Kannel WB, Hjortland MC, McNamara PM, Gordon T. 1976. Menopause and risk of cardiovascular disease. *Ann Intern Med.* 85: 447-452.
- Karck U, Breckwoldt M. 1996. Functions of the placenta. En: *Comprehensive human physiology: from cellular mechanisms to integration.* Greger R., Windhorst U. (eds). Springer-Verlag Berlin. New York. USA. 2305p.
- Khaw KT, Barrett-Connor E. 1991. Endogenous sex hormones, high density lipoprotein cholesterol, and other lipoprotein fractions in men. *Arterioscler Thromb.* 11: 489-494.
- Kitazawa T, Hamada E, Kitazawa K, Gaznabi KM. 1997. Non-genomic mechanism of 17 β -oestradiol-induced inhibition of contraction in mammalian vascular smooth muscle. *J Physiol.* 449: 497-511.
- Laguna J, Piña E. 2001. *Bioquímica de Laguna.* 5ª Ed. El Manual Moderno. DF. México. 749p.
- Le Tran Y, Fung A, Forster C. 1997. Role of gender and vascular endothelium in rat aorta response to 17 β -estradiol. *Can J Physiol Pharmacol.* 75: 1393-1397.
- Lehninger AL. 1995. *Biochemistry.* Worth Publishers, Inc. New York. USA. 1104p.
- Lerner DJ, Kannel WB. 1986. Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: a 26-year follow-up of the Framingham population. *Am J Cardiol.* 111: 383-390.
- Lesser MA. 1946. Testosterone propionate therapy in one hundred cases of angina pectoris. *J Clin Endocrinol.* 6: 549-557.
- Levine SA, Likoff WB. 1943. The therapeutic value of testosterone propionate in angina pectoris. *N Engl J Med.* 229: 770-772.
- Levy D, Kannel WB. 1988. Cardiovascular risk: news insights for Framingham. *Am Heart J.* 116: 266-272.
- Li HF, Zheng TZ, Li W, Qu SY, Zhang CL. 2001. Effect of progesterone on the contractile

- response of isolated pulmonary artery in rabbits. *Can J Physiol Pharmacol.* 79: 545-550.
- Litchfield JT, Wilcoxon F. 1949. A simplified method of evaluating dose-effect experiments. *J Pharmacol Exp Ther.* 96: 99-113.
- Lindoff C, Peterson F, Lecander I, Martinsson G, Astedt B. 1996. Transdermal estrogen replacement therapy: beneficial effects on hemodynamic risk factors for cardiovascular disease. *Maturitas.* 24: 43-50.
- Lippert TH, Seeger H, Mueck AO, Hanke H, Haasis R. 1996. Effect of 17 β -estradiol, progestrone and progestogens on calcium influx in cell culture of human vessels. *Menopause.* 3: 33-37.
- Lovren F, Li XF, Lytton J, Triggle C. 1999. Functional characterization and m-RNA expression of 5-HT receptors mediating contraction in human umbilical artery. *Br J Pharmacol.* 127: 1247-1255.
- Lovren F, Triggle C. 2000. Nitric oxide and nitroprusside-induced relaxation of the human umbilical artery. *Br J Pharmacol.* 131: 521-529.
- Maggi CA, Manzini S, Meli A. 1983. Contribution of cellular and extracellular Ca²⁺ during 5-hydroxytryptamine-induced contractions of rabbit ear artery. *Eur J Pharmacol.* 94: 251-260.
- Magness RR, Rosenfeld CR. 1989. Local and systemic estradiol-17beta: effects on uterine and systemic vasodilation. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 256: 536-542.
- Mancuso S, Benagiano G, Dell' Acqua S, Shapiro M, Wiqvist N, Diczfalusy E. 1968. Studies on the metabolism of C-19 steroids in the human foeto-placental unit. Aromatization and hydroxylation products formed by preivable fetuses perfused with androstenedione and testosterone. *Acta Endocrinol.* 57: 208-227.
- Marin J, Reviriego J, Fernandez-Alfonso MS, Guerra P. 1990. Effect of nifedipine in arterial vasculature of human placenta. *Gen Pharmacol.* 21: 629-633.
- McCrohon JA, Walters WA, Robinson JC, McCredie RJ, Turner L, Adams MR, Handelsman DJ, Celermajor DS. 1997. Arterial reactivity is enhanced in genetic males taking high dose estrogens. *J Am Coll Cardiol.* 29: 1432-1436.
- McNeill AM, Duckles SP, Krause DN. 1996. Relaxant effects of 17 β -estradiol in the rat artery are greater in females than males. *Eur J Pharmacol.* 308: 305-309.
- Michelakis ED, Weir EK, Wu X, Nsair A, Waite R, Hashimoto K, Puttagunta L, Gunther Knaus H, Archer SL. 2001. Potassium channels regulate tone in rat pulmonary veins. *Am J Physiol: Lung Cell Mol Physiol.* 280: 1138-1147.
- Milesi V, Raingo J, Rebolledo A, Grassi de Gende AO. 2003. Potassium channels in

human umbilical artery cells. *J Soc Gynecol Investig.* 10: 341-346.

- Miller VM, Gisclard V, Vanhoutte PM. 1988. Modulation of endothelium-dependent and vascular smooth muscle responses by oestrogens. *Phlebology.* 224: 19-22.
- Miller VM, Vanhoutte PM. 1991. Progesterone and modulation of endothelium-dependent responses in canine coronary arteries. *Am J Physiol: Regulatory Integrative Comp Physiol.* 261: 1022-1027.
- Minshall RD, Pavcnik D, Browne DL, Hermsmeyer K. 2002. Nongenomic vasodilator action of progesterone on primate coronary arteries. *J Appl Physiol.* 92: 701-708.
- Mizuno M, Lobotsky J, Lloyd CW, Kobayashi T, Murasawa Y. 1968. Plasma androstenedione and testosterone during pregnancy and in the newborn. *J Clin Endocrinol Metab.* 28: 1133-1142.
- Molinari C, Battaglia A, Grossini E, Mary DA, Stoker JB, Surico N, Vacca G. 2001. The effects of progesterone on coronary blood flow in anaesthetized pigs. *Exp Physiol.* 86: 101-108.
- Mosranova A, Stecova A, Huzulakova I, Motesika M. 1994. The influence of one month sex hormones administration on the isolated rabbit vessels reactivity. *Acta Physiol Hung.* 82: 251-256.
- Mugge A, Riedel M, Barton M, Kuhn M, Lichtlen PR. 1993. Endothelium independent relaxation of human coronary arteries by 17 β -estradiol in vitro. *Cardiovasc Res.* 27: 1939-1942.
- Mugge A, Barton M, Fieguth HG, Riedel M. 1997. Contractile responses to histamine, serotonin, and angiotensin II are impaired by 17 β -oestradiol in human internal mammary arteries in vitro. *Pharmacology.* 54: 162-168.
- Mukerji MS, Leathard HL, Huddart H. 2000a. The effect of progesterone on spontaneous and agonist-evoked contractions of the rat aorta and portal vein. *J Pharm Pharmacol.* 52: 843-849.
- Mukerji MS, Leathard HL, Huddart H. 2000b. The effect of potassium channel blockers on progesterone-induced suppression of rat portal vein contractility. *J Pharm Pharmacol.* 52: 983-990.
- Murphy JG, Khalil RA. 1999. Decreased [Ca²⁺]_i during inhibition of coronary smooth muscle contraction by 17 β -estradiol, progesterone, and testosterone. *J Pharmacol Exp Ther.* 291: 44-52.
- Nakajima T, Kitazawa T, Hamada E, Hazama H, Omata M, Kurachi Y. 1995. 17 β -Estradiol inhibits the voltage-dependent L-type Ca²⁺ currents in aortic smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.* 294: 625-635.

- Nakajima T, Iwasawa K, Oonuma H, Morita T, Goto A, Wang Y, Hazama H. 1999. Antiarrhythmic effect and its underlying ionic mechanism of 17 β -estradiol in cardiac myocytes. *Br J Pharmacol.* 127: 429-440.
- Nelson MT, Quayle JM. 1995. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol: Cell Physiol.* 268: 799-822.
- Ogata R, Inoue Y, Nakano H, Ito Y, Kitamura K. 1996. Oestradiol-induced relaxation of rabbit basilar artery by inhibition of voltage-dependent Ca²⁺ Channels through GTP-binding protein. *Br J Pharmacol.* 117: 351-359.
- Omar HA, Ramírez R, Gibson M. 1995. Properties of a progesterone-induced relaxation in human placental arteries and veins. *J Clin Endocrinol Metab.* 80: 370-373.
- Ong PJ, Patrizi G, Chong WC, Webb CM, Hayward CS, Collins P. 2000. Testosterone enhances flow-mediated brachial artery reactivity in men with coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 85: 269-272.
- Parsons IC. 1970. The metabolism of testosterone by early chick embryonic blastoderm. *Steroids.* 16: 59-65.
- Perusquía M, Hernández R, Morales MA, Campos MG, Villalón CM. 1996. Role of endothelium in the vasodilating effect of progestins and androgens on the rat thoracic aorta. *Gen Pharmacol.* 27: 181-185.
- Perusquía M, Villalón CM. 1999. Possible role of Ca²⁺ channels in the vasodilating effect of 5 β -dihydrotestosterone in the rat aorta. *Eur J Pharmacol.* 371: 169-178.
- Perusquía M, Villalón CM. 2002. The vasodepressor effect of androgens in the pithed rats: potential role of calcium channels. *Steroids.* 67: 1021-1028.
- Perusquía M, Villalón CM, Navarrete E, García GA, Pérez-Palacios G, Lemus AE. 2003. Vasodilating effect of norethisterone and its 5 α -metabolites: a novel nongenomic action. *Eur J Pharmacol.* 475: 161-169.
- Perusquía M. 2003. Androgen-induced vasorelaxation: a potential vascular protective effect. *Exp Clin Endocrinol Diabetes.* 111: 55-59.
- Perusquía M, Calixto E. 2003. Nongenomic action of dehydroepiandrosterone on vascular tone and uterine contractility. En: *Recent Research Development in Life Sciences.* A. Gayathri (ed). Research Signpost. India. 1: 143-152.
- Petrova-Kirova P, Gagov H, Krien U, Duridanova D, Noack T, Shubert R. 2000. 4-aminopyridine effects rat arterial smooth muscle BK_{Ca} currents by changing intracellular pH. *Br J Pharmacol.* 131: 1643-1650.
- Phillips GB, Pinkernell BH, Jing TY. 1994. The association of hypotestosteronemia with

coronary artery disease in men. *Arterioscler Thromb.* 14: 701-706.

- Quan A, Teoh H, Man RY. 1999. Acute exposure to a low level of testosterone impairs relaxation in porcine coronary arteries. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 26: 830-832.
- Ramírez RJ, Gibson M, Kalenic J, Einzig S, Omar HA. 1998. In vitro vascular relaxation to progesterone and its metabolites in human umbilical and placental blood vessels. *J Matern Fetal Invest.* 8: 61-65.
- Rankin JH, McLaughlin MK. 1979. The regulation of the placental blood flows. *J Dev Physiol.* 1: 3-30.
- Reilly FD, Russell PT. 1977. Neurohistochemical evidence supporting an absence of adrenergic and cholinergic innervation in the human placenta and umbilical cord. *Anatomical Record.* 188: 277-286.
- Rifici VA, Khachadurian AK. 1992. The inhibition of low-density lipoprotein oxidation by 17 β -estradiol. *Metabolism.* 41: 1110-1114.
- Rosano GM, Caixeta AM, Chierchia S, Arie S, Lopez-Hidalgo M, Pereira WI, Leonardo F, Webb CM, Pileggi F, Collins P. 1997. Short-term anti-ischemic effect of 17 β -estradiol in postmenopausal women with coronary artery disease. *Circulation.* 96: 2837-2841.
- Rosano GM, Leonardo F, Pagnotta P, Pelliccia F, Panina G, Secretan E, Della MP, Bonfigli B, Volpe M, Chierchia SL. 1999. Acute anti-ischaemic effect of testosterone in men with coronary artery disease. *Circulation.* 99: 1666-1670.
- Rosenfeld CR, Roy T, Cox BE. 2002. Mechanisms modulating estrogen-induced uterine vasodilation. *Vasc Pharmacol.* 38: 115–125.
- Salom JB, Campos V, Perales A, Torregrosa G, Miranda FJ, Alabadi JA, Alborch E. 1990. Effects of calcium entry blockers on KCl- and 5-hydroxytryptamine-induced contractions of human umbilical arteries. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 304: 219-231.
- Salom JB, Burguete MC, Pérez-Asensio FJ, Centeno JM, Torregrosa G, Alborch E. 2001. Relaxant effects of 17 β -estradiol in cerebral arteries through Ca²⁺ entry inhibition. *J Cereb Blood Flow Metab.* 21: 422-429.
- Salom JB, Burguete MC, Pérez-Asensio FJ, Centeno JM, Torregrosa G, Alborch E. 2002. Acute relaxant effects of 17 β -estradiol through non-genomic mechanism in rabbit carotid artery. *Steroids.* 67: 339-346.
- Scragg JL, Jones RD, Channer KS, Jones TH, Peers C. 2004. Testosterone is a potent inhibitor of L-type Ca²⁺ channels. *Biochem Biophys Res Commun.* 318: 503-506.
- Shan J, Resnick LM, Liu Q Y, Wu XC, Barbagallo M, Pang KT. 1994. Vascular effects of

17 β -estradiol in male Sprague-Dawley rats. *Am J Physiol: Heart Circ Physiol.* 266: 967-973.

Shaw L, Taggart MJ, Austin C. 2000. Mechanism of 17 β -oestradiol induced vasodilation in isolated pressurized rat small arteries. *Br J Pharmacol.* 129: 555-565.

Shaw L, Taggart MJ, Austin C. 2001. Effects of the oestrous cycle and gender on acute vasodilatory responses of isolated pressurized rat mesenteric arteries to 17 β -oestradiol. *Br J Pharmacol.* 132: 1055-1062.

Sheldon JH, Argentieri TM. 1995. Acute administration of 17 β -estradiol inhibits calcium currents in isolated guinea pig detrusor myocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 274: 723-729.

Sigler LH, Tulgan J. 1943. Treatment of angina pectoris by testosterone propionate. *N.Y. State J Med.* 43: 1424-1428.

Silva M. 2002. Acción vasodilatadora de dehidroepiandrosterona en la aorta de rata. Tesis de Licenciatura. Facultad de Química. UNAM. México. 48p.

Silva de Sá MF, Meirelles RS. 1977. Vasodilating effect of estrogen on the human umbilical artery. *Gynecol Invest.* 8: 307-313.

Spivack M. 1946. The anatomic peculiarities of the human umbilical cord and their clinical significance. *Am J Obstet Gynecol.* 52: 387-40.

Schmidt RF, Thews G. 1993. *Fisiología Humana.* 24^a Ed. Interamericana McGraw-Hill. Madrid. España. 906p.

Stevenson JC. 1996. Are changes in lipoproteins during HTR important? *Br J Obstet Gynaecol.* 103: 39-43.

Teoh H, Man RK. 1999. Progesterone modulates estradiol actions: acute effects at physiological concentrations. *Eur J Pharmacol.* 378: 57-62.

Teoh H, Leung SW, Man RY. 1999. Short-term exposure to physiological levels of 17 β -estradiol enhances endothelium-independent relaxation in porcine coronary arteries. *Cardiovasc Res.* 42: 224-231.

Teoh H, Quan A, Leung SW, Man RY. 2000. Differential effects of 17 β -estradiol and testosterone on the contractile responses of porcine coronary arteries. *Br J Pharmacol.* 129: 1301-1308.

Tep-areenan P, Kendall DA, Randall MD. 2001. Vasorelaxation to 17 β -oestradiol in the rat isolated mesenteric arterial bed. *Br J Pharmacol.* 133: 112-118.

Tep-areenan P, Kendall DA, Randall MD. 2002. Testosterone-induced vasorelaxation in a rat mesenteric arterial bed is mediated predominantly via potassium channels. *Br J*

Pharmacol. 135: 735-740.

- Tep-areenan P, Kendall DA, Randall MD. 2003a. Mechanism of vasorelaxation to testosterone in the rat aorta. *Eur J Pharmacol.* 465: 125-132.
- Tep-areenan P, Kendall DA, Randall MD. 2003b. Mechanism of vasorelaxation to 17 β -estradiol in rat arteries. *Eur J Pharmacol.* 476: 139-149.
- Thompson PD, Ahlberg AW, Moyna NM, Duncan B, Ferraro-Borgida M, White CM, McGill CC, Heller GV. 2002. Effect of intravenous testosterone on myocardial ischemia in men with coronary heart disease. *Am Heart J.* 143: 249-256.
- Tiritilli A, Levy P, Haïat R. 1995. Effects of nicorandil, a potassium agonist, on the human umbilical artery: role of the vascular endothelium. *Arch Mal Coeur Vaiss.* 88: 1095-1099.
- Tiritilli A. 2000. 5-hydroxytryptamine induces vasoconstriction of the human umbilical artery: Effects of hypoxia and nicorandil. *Gynecol Obstet Invest.* 50: 77-83.
- Toledo R, Navarrete E, González L, Perusquía M. 2003. Caracterización del efecto vasodilatador de progestinas y andrógenos en la arteria umbilical humana *in vitro*. Presentado en: XVIII Reunión anual de la AIBIR. Sección de carteles. 217p.
- Troisi R, Potischman N, Roberts JM, Harger G, Markovic N, Cole B, Lykins D, Siiteri P, Hoover RN. 2003. Correlation of serum hormone concentrations in maternal and umbilical cord samples. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prev.* 12: 452-456.
- Tsang SY, Yao X, Chan HY, Wong CM, Chen ZY, Au CI, Huang Y. 2003. Contribution of K⁺ channels to relaxation induced by 17 β -estradiol but not by progesterone in isolated rat mesenteric artery rings. *J Cardiovasc Pharmacol.* 41: 4-13.
- Tufan H, Ayan-Polat B, Tecder-Ünal M, Polat G, Kayhan Z, Ögü E. 2003. Contractile responses of the human umbilical artery to KCl and serotonin in Ca-free medium and the effects of levromakalim. *Life Sci.* 72: 1321-1329.
- Van Buren G, Yang D, Clark KE. 1992. Estrogen-induced uterine vasodilation is antagonized by L-nitroarginine methyl ester, an inhibitor of nitric oxide sintesis. *Am J Obstet Gynecol.* 16: 828-833.
- Van de Voorde J, Vanderstichele H, Leuden I. 1987. Release of endothelium-derived relaxing factor from human umbilical vessels. *Circ Res.* 60: 517-522.
- Van der Mooren MJ, Mijatovic V, Van Baal WM, Stehouwer CD. 1998. Hormone replacement therapy in postmenopausal women with specific risk factors for coronary artery disease. *Maturitas.* 30: 27-36.
- Vedernikov YP, Liao QP, Jain V, Saade GR, Chwalisz K, Garfield RE. 1997. Effect of chronic treatment with 17 β -estradiol and progesterone on endothelium-dependent

and endothelium-independent relaxation in isolated aortic rings from ovariectomised rats. *Am J Obstet Gynecol.* 176: 603-608.

Voet D, Voet J G, Pratt CW. 2002. *Fundamentals of Biochemistry.* 2^a Ed. John Wiley & Sons, Inc. New York. USA. 931p

Walker TC. 1942. The use of testosterone propionate and estrogenic substance in the treatment of essential hypertension, angina pectoris and peripheral vascular. *J Clin Endocrinol.* 2: 560-568.

Webb CM, Adamson DL, De Zeigler D, Collins P. 1999a. Effect of acute testosterone on myocardial ischaemia in men with coronary artery disease. *Am J Cardiol.* 83: 437-439.

Webb CM, McNeill JG, Hayward CS, De Zeigler D, Collins P. 1999b. Effects of testosterone on coronary vasomotor regulation in men with coronary heart disease. *Circulation.* 100: 1690-1696.

Wellman GC, Bonev AD, Nelson MT, Brayden JE. 1996. Gender differences in coronary artery diameter involve estrogen, nitric oxide, and Ca²⁺-dependent K⁺ channels. *Circ Res.* 79: 1024-1030.

White RE, Darkow DJ, Falvo JL. 1995. Estrogen relaxes coronary arteries by opening BK_{Ca} Channels through a CGMP-dependent mechanism. *Circ Res.* 77: 936-942.

White RE, Han G, Maunz M, Dimitropoulou O, El-Mowafy AM, Barlow R S, Catravas J D, Snead C, Carrier G O, Zhu S, Yu X. 2002. Endothelium-independent effect of estrogen on Ca²⁺-activated K⁺ channels in human coronary artery smooth muscle cells. *Cardiovasc Res.* 53: 650-661.

White RP. 1989. Pharmacodynamic study of maturation and closure of human umbilical arteries. *Am J Obstet Gynecol.* 160: 229-234.

Wingard DL, Suarez L, Barret-Connor E. 1983. The sex differential in mortality from all causes and ischaemic heart disease. *Circulation.* 100: 1690-1696.

Wittemen J, Grobbee D, Kof F, Hofman A, Valkenburg H, Barrett-Connor. 1989. Increased risk of atherosclerosis in women after the menopause. *Br Med J.* 298: 642-644.

Won E, Won J, Kwon S, Lee Y, Nam T, Ahn D. 2003. Testosterone causes simultaneous decrease of [Ca²⁺]_i and tension in rabbit coronary arteries: by opening voltage dependent potassium channels. *Yonsei Med J.* 44: 1027-1033.

Worboys S, Kotsopoulos L, Teede H, McGrath B, David SR. 2001. Evidence that parental testosterone therapy may improve endothelium-dependent and independent vasodilation in postmenopausal women already receiving estrogen. *J Clin Endocrinol Metab.* 88: 158-161.

- Wu SZ, Weng XZ. 1993. Therapeutic effects of an androgenic preparation on myocardial ischemia and cardiac function in 62 elderly male coronary heart disease patients. *Chin Med J*. 106: 415-418.
- Wylam ME, Samsel RW, Shumacker PT, Umans JG. 1993. Extracellular calcium and intrinsic tone in the human umbilical artery. *J Pharmacol Exp Ther*. 266: 1475-1481.
- Xie H, Triggle CR. 1994. Endothelium-independent relaxations to acetylcholine and A23187 in the human umbilical artery. *J Pharmacol Exp Ther*. 266: 1475-1481.
- Yue P, Chatterjee K, Beale C, Poole-Wilson PA, Collins P. 1995. Testosterone relaxes rabbit coronary arteries and aorta. *Circulation*. 91: 1154-1160.
- Zhang F, Ram LJ, Standley PR, Sowers JR. 1994. 17β -estradiol attenuates voltage-dependent Ca^{2+} currents in A7r5 vascular smooth muscle cell line. *Am J Physiol: Cell Physiol*. 266: 975-980.
- Zhang M, Benishin CG, Pang PK. 2002. Rapid inhibition of the contraction of rat tail artery by progesterone is mediated by inhibition of calcium currents. *J Pharm Pharmacol*. 54: 1667-1674.
- Zitzmann M, Brune M, Nieschlag E. 2002. Vascular reactivity in hypogonadal men is reduced by androgen substitution. *J Clin Endocrinol Metab*. 87: 5030-5037.

I. ANEXO



**DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA
HOSPITAL DE LA MUJER**

Prolongación de Díaz Mirón No. 374
Col. Sto. Tomás C.P. 11340 México, D.F.
Delegación Miguel Hidalgo Tels.: 341-19-09 341-11-00

397

México, D.F., A 30 de Mayo de 1997.

C. DR. ARMANDO JUAREZ BENGUA.
P r e s e n t e .-

En relación a su solicitud, me permito comunicarle que a través del Comité de Etica de este Hospital y el Departamento de Enseñanza, previo análisis a su protocolo de Investigación denominado "ACCION DE ESTEROIDES DELTA 4 - 3- CETO Y 5 - REDUCIDOS SOBRE LA ACTIVIDAD CONTRACTIL DEL MIOMETRIO Y LA ARTERIA UMBILICAL", - bajo la supervisión de la Dra. Mercedes Perusquía Nava, Investigador del Instituto de Investigación Biomédica de la Universidad Nacional Autónoma de México, ha sido aprobado para llevarse a cabo con las pacientes de esta Institución.

Sin otro particular, hago propia la ocasión para enviarle un -- afectuoso y cordial saludo.

ATENTAMENTE,

DR. LUIS ENRIQUE BATRES MACIEL
JEFE DEL DEPARTAMENTO.

S. S. A.
"HOSPITAL DE LA MUJER"
DEPTO. DE ENSEÑANZA MEDICA

LEBM/asm.

Anuencia del comité de ética para la toma de muestras de cordón umbilical humano, para la realización del presente proyecto.