



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Facultad de Ciencias Biológicas

**“INFLUENCIA DE LAS HORMONAS SEXUALES  
EN UN PERIODO DE ISQUEMIA-REPERFUSIÓN MIOCÁRDICA  
EN LA RATA HIPERTRIGLICERIDEMICA”**

## T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
**MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
BIOLOGIA EXPERIMENTAL**

P R E S E N T A

**NATALIA ISMENE PAVÓN MARTÍNEZ**

DIRECTORA DE TESIS: DRA, GUADALUPE DEL CARMEN BAÑOS  
MARHABER



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.

COPIA DE LA CARTA QUE LA  
COORDINACION ENVIA AL  
DIRECTOR GENERAL  
DE ADMINISTRACION  
ESCOLAR SEÑALANDO  
EL JURADO DESIGNADO  
POR EL COMITÉ ACADÉMICO

TESIS APOYADA POR EL PROYECTO  
CONACYT No. 34467-M

## DEDICATORIAS

- Señor eterno porque te amo, creo y confío en ti, gracias:

***“Los cielos cuentan la gloria de Dios, la obra de sus manos anuncia el firmamento; el día al día comunica el mensaje, y la noche a la noche transmite la noticia. No es un mensaje, no hay palabras, ni su voz se puede oír; mas por toda la tierra se adivinan los rasgos, y sus giros hasta el confín del mundo”*** (Salmo 19).

- A mis Padres: por su amor, sus enseñanzas, sus esfuerzos y trabajo, he aquí uno más de los frutos de su esfuerzo, con todo mi amor.

- Alejandro: querido esposo por tu cariño, comprensión y apoyo incondicional

- A mis hermanos; porque han sido mi constante motivación para hacer mi mejor esfuerzo y no desanimarme en los momentos más difíciles:

Bebecita por tus travesuras y perenne inocencia

Juan por tus ganas de hacer y aprender un millón de cosas más

Amaya porque cada día das lo mejor de ti y eres hija de la luz

Maicen por tu risa contagiosa y tu cariño

Jonasín por tus bromas y críticas constructivas

Y porque finalmente en unas líneas no puedo describir lo maravillosos que son

- A mi familia política especialmente Chava, Nancy, Doña Angélica; por el interés y apoyo brindado
- A mis amigos y compañeros de Bioquímica, especialmente Flaco (Eduardo), Luis (mano) y Mohammed, por sus consejos, críticas y apoyo incondicional no sólo en este trabajo sino en todo momento.
- A mis amigos Linda y Neto Custodio (así como sus señores Papás), César, Chio, Clau, Eva, Laura, Gaby, Beto y todos aquellos de los que la distancia y el tiempo me separan
- Dra. Mac Carthy especialmente por su calidez humana, por la dirección profesional y tiempo dedicado
- Dra. Paredes.- por su paciencia, dedicación, tiempo y apoyo incuestionables
- A mi jurado:
  - Dr. Ignacio Camacho Arroyo
  - Dra. Aurora de la Peña
  - Dra. Verónica Guarner
  - Por su apoyo y valiosos conocimientos

ÍNDICE	5
RESUMEN	7
INTRODUCCIÓN	10
ANTECEDENTES	
- El modelo de rata Hipertrigliceridémica	12
- Estrés oxidativo (isquemia-reperfusión)	13
- Influencia del género	17
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	20
HIPÓTESIS	21
OBJETIVO	21
METODOLOGÍA	
- Animales de experimentación	22
- Inducción de la hipertrigliceridemia	23
- Tratamiento hormonal	23
- Presión sanguínea	23
- Frotis vaginal	24
- Castración	24
- Ooforectomía	25
- Isquemia-reperfusión miocárdica	25
- Determinación de enzimas	27
- Medición de hormonas	27
RESULTADOS	
- Peso corporal y Presión	28
- Frecuencia Cardíaca	37
- Incidencia de arritmias	41
- Enzimas marcadoras de daño miocárdico	46
- Grasa retroperitoneal	54
- Aspecto macroscópico del útero	58

- Peso del útero	60
- Frotis vaginal	61
- Concentracion de hormonas	63
DISCUSIÓN	65
CONCLUSIONES	78
REFERENCIAS	79

## RESUMEN

En estudios epidemiológicos se ha demostrado que el género influye en la sobrevivencia de pacientes con problemas cardiovasculares, atribuyéndose al estradiol el papel de agente protector contra estas enfermedades, debido a sus propiedades antioxidantes, aun cuando el mecanismo no ha sido elucidado completamente. El daño por isquemia y reperfusión se produce principalmente por una sobrecarga de calcio intracelular y la producción de radicales libres, proveyéndonos de un buen modelo para el estudio del estrés oxidativo relacionado con el sistema cardiovascular. Los objetivos de este trabajo fueron dilucidar el papel que desempeña el estradiol como posible cardioprotector y la testosterona como modulador en ratas hipertriglicéridémicas (HTG) sometidas a un período de isquemia y reperfusión en el miocardio.

Se utilizaron ratas Wistar recién destetadas de uno y otro sexo. Los grupos control (CTRL) recibieron agua y los HTG sacarosa al 30% en el agua de bebida y ambos recibieron alimento comercial para roedores durante 20 semanas. Se dividieron en 4 grupos, subdivididos en HTG y CTRL: Grupo 1 ratas intactas, Grupo 2 ratas castradas (Cast) y ooforectomizadas (Oofo), Grupo 3 ratas castradas que recibieron las hormonas correspondientes a su sexo (hembras – estradiol, machos - testosterona) y Grupo 4 ratas castradas y ooforectomizadas tratadas con hormonas contrarias a su sexo (hembras - testosterona, machos – estradiol). Las hormonas se administraron por vía intramuscular, el valerato de estradiol (Est) a una dosis de 270 µg/Kg mensualmente, o enantato de testosterona (Test) a una dosis de 50 µg/Kg de peso cada dos semanas.

A todos los animales de cada grupo se les midió la presión sanguínea y se evaluó su peso mensualmente, en ratas hembra se hicieron frotis vaginales. Al final del período experimental (20 semanas) todos los animales fueron sometidos a un período de isquemia de 5 min. por ligadura de la arteria coronaria descendente anterior izquierda y este período fue seguido de reperfusión cardíaca también de 5 min., durante el proceso se tomó registro electrocardiográfico para cada uno de ellos. Al término se tomaron muestras de sangre para la obtención de suero, y determinación de la actividad de creatin cinasa (CK-MB) y lactato deshidrogenasa (LDH) como marcadores de daño miocárdico. Se retiró la grasa retroperitoneal y se pesó, en hembras también se disecó el útero desde el nivel del cuello.

Los resultados muestran que la ooforectomía indujo aumento de peso y presión sanguínea, así como mayor daño al tejido cardíaco, en tanto que la castración en machos provocó decremento en peso y presión, además de disminución de las arritmias letales. El efecto del tratamiento con Est en ratas hembra Oofo fue capaz de disminuir las arritmias letales y mantener actividad en los úteros. El tratamiento con Test en machos Cast indujo protección sobre el corazón, manifestada por disminución en las arritmias



letales; aún cuando no indujo aumento en peso. El tratamiento con Test en ratas hembra y Est en ratas macho resultó en un mayor nivel de daño al corazón.

## **SUMMARY**

In epidemiological studies it has been demonstrated that gender influences the survival of patients with cardiovascular diseases. Estradiol may be involved in the protective mechanism against these abnormalities, on account of its antioxidant properties, although the exact mechanism is not completely elucidated. The damage by ischemia-reperfusion is mainly produced by calcium overload and release of free radicals, therefore providing a good experimental model for the study of oxidative stress related to the cardiovascular system. The purpose of this study was to elucidate the roles of estradiol, as a possible cardioprotector, and testosterone as a modulator, in hypertriglyceridemic and hypertensive rats (HTG), which were subjected to a period of myocardial ischemia-reperfusion.

Weanling male and female Wistar rats were used. Control (CTRL) and HTG groups received water or 30 % sucrose solution, respectively; both had normal rat chow for about 20 weeks. The rats were randomly assigned to one of the four experimental groups, subdivided into CTRL and HTG: Group1 intact rats, Group 2 castrated (Cast) and oophorectomized (Oofo) rats, Group 3 Castrated with hormones corresponding to their sex (female-estradiol, male-testosterone) and Group 4 castrated and oophorectomized with opposite hormones to their sex (female-testosterone, male-estradiol). The hormones were administered by intramuscular injection, estradiol valerate 270 µg/Kg monthly, or testosterone enantate 50 µg/Kg every two weeks.

During the treatment period all the animals in each group had monthly measurements of blood pressure and body weight; vaginal smears were obtained from female rats. At the end of the evolution period (20 weeks) all the animals were subjected to ischemia, by means of occlusion of the left anterior descending coronary artery for 5 minutes, followed by 5 min of reperfusion. Recordings of the electrocardiograms were taken. At the end of the experiment, blood was withdrawn to obtain serum for measurements of creatin kinase (CK-MB) and lactate dehydrogenase (LDH), markers of myocardium damage. The intra-abdominal fat was dissected and weighed; in females the uterus was collected too.

The results showed that oophorectomy induced weight and blood pressure increases, and more damage to the heart, while castration in male rats produced weight loss and lower blood pressure, as well as diminution in the number of lethal arrhythmias. The effect of estradiol treatment in oophorectomized female rats did not show protection to the heart to the same extent as in intact animals, but it was sufficient to reduce the incidence of lethal arrhythmias and to maintain the activity of the uterus. The treatment with Test in castrated males provided heart protection, manifested by a decrease in the number of lethal

arrhythmias. It did not induce weight increases. The Test treatment in female rats and Est in male rats resulted in the largest damage to the heart in each case.

## INTRODUCCIÓN

En los países con estilo de vida occidental la primera causa de muerte la constituyen las enfermedades cardiovasculares. Se ha observado una cierta prevalencia relacionada con el género y la edad, ya que las mujeres están relativamente protegidas contra estas enfermedades durante todo su período de vida fértil, hasta el comienzo de la menopausia. Los eventos cardiovasculares ocurren más frecuentemente en varones que en mujeres.

Sin embargo, vale la pena mencionar que cuando las afecciones cardíacas se presentan en mujeres en edad fértil, la mayoría de las veces estas fallecen, situación que difiere de lo observado en los varones de la misma edad, de los cuales algunos pueden sobrevivir.

En cuanto cesa la actividad ovárica las afecciones cardíacas se manifiestan en mayor porcentaje que en varones de la misma edad; este patrón de comportamiento se ha atribuido a las propiedades de los estrógenos, que comprenden estrona, estriol y estradiol ( $\alpha$  y  $\beta$ ), de los cuales el  $\beta$ -estradiol ha sido el más estudiado y existe en la literatura una gran cantidad de material que demuestra las características de protección en el músculo liso, esquelético y cardíaco; sin embargo la desventaja es que sólo se han logrado ver estos efectos usando concentraciones superiores a las fisiológicas.

La manera en que los estrógenos ejercen sus efectos es compleja, se ha documentado que pueden o no utilizar receptores, e incluso se ha encontrado un efecto inmediato que ejercen a través de un receptor situado en la membrana celular. Existen observaciones in vitro donde se demuestran claramente las propiedades antioxidantes de los estrógenos, y su capacidad como anti-arritmogénicos, lo que resulta en protección para el sistema cardiovascular femenino.

Se ha demostrado la participación del estrés oxidativo como un factor determinante en la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares, especialmente la aterosclerosis y la hipertensión, así como las dislipidemias frecuentemente asociadas a ella. Se sabe que en personas diabéticas el estrés oxidativo se encuentra aumentado y sus sistemas de defensa abatidos. En un modelo de rata hipertensa e hipertriglicéridémica (HTG), desarrollado en nuestro laboratorio las anormalidades metabólicas y funcionales se indujeron en ratas Wistar por administración de azúcar comercial al 30% en el agua de bebida, encontrándose además de la hipertensión e hipertriglicéridemia, reactividad vascular alterada, hiperinsulinemia y alteraciones en los niveles de enzimas antioxidantes.

En la porción subendocárdica del ventrículo izquierdo, durante la sístole el flujo sanguíneo disminuye. Esta región es muy propensa al daño por isquemia-reperusión y por tanto es el sitio más

común del infarto. En el modelo de isquemia-reperfusión desarrollado en el laboratorio se valoró la actividad cardíaca y el daño causado por un periodo de 5 min. de isquemia y 5 min. de perfusión con respecto a la presencia o ausencia de hormonas, en ratas macho y hembra, ya que se sabe que la testosterona podría tener influencia sobre el sistema cardiovascular aunque no como la ejercida por los estrógenos.

## ANTECEDENTES

### EL MODELO DE RATA HIPERTRIGLICERIDEMICA

En nuestro laboratorio se ha desarrollado un modelo de rata hipertensa e hipertriglicéridémica (HTG), una variante del modelo descrito por Reaven (Reaven et al, 1991) en el cual las dietas con concentraciones altas de sacarosa o fructosa inducen hipertensión, hipertriglicéridemia, hiperinsulinemia, y resistencia a la insulina. Puesto que aún no se ha definido con suficiente certeza que la hipertriglicéridemia por sí sola represente un factor de riesgo en la etiopatología de las enfermedades cardiovasculares, hemos enfocado nuestras líneas de investigación al estudio de esta dislipidemia y su relación con la patología cardiovascular.

En la población mundial los padecimientos cardiovasculares ocupan uno de los principales lugares entre las causas de morbi-mortalidad encontrándose frecuentemente asociadas hipertensión, dislipidemias, obesidad y la antes mencionada diabetes, integrando el llamado cuarteto de la muerte (Kaplan, 1989). Este cuadro patológico es frecuentemente observado en la clínica y, asociado además a otras alteraciones se ha identificado como síndrome metabólico. En la prevalencia de estos padecimientos se ha observado alguna dependencia de edad, sexo y niveles circulantes de hormonas sexuales.

En el modelo desarrollado en nuestro laboratorio, las anormalidades metabólicas y funcionales se han inducido en ratas Wistar con la administración de azúcar comercial al 30% en el agua de bebida.

Se ha realizado la caracterización de este modelo en parte y algunos de los principales hallazgos son los siguientes:

- la adición de azúcar refinada comercial al agua de bebida (30%) en ratas Wistar (HTG) produce hipertriglicéridemia e hipertensión comparables a las encontradas por otros autores que administraron los carbohidratos con el alimento sólido. En nuestro caso únicamente tuvimos que prolongar el tiempo de tratamiento a 20-24 semanas para obtener diferencias significativas con respecto a los controles (Baños et al, 1997)
- la reactividad vascular en ratas HTG reveló dos tipos de anormalidades:
  - a) alteración en el tejido vascular (aórtico y mesentérico) manifestada por hipercontractilidad a vasoconstrictores e hiporelajación a vasodilatadores dependientes de óxido nítrico endotelial, lo que sugiere daño al endotelio
  - b) un componente plasmático circulante, posiblemente los lípidos alterados, que al ser adicionado a preparaciones de vasos in vitro indujo hipercontractilidad y redujo la respuesta de relajación dependiente de acetil colina (Baños, 1997).

Otros hallazgos pero relacionados a las diferencias de género son los siguientes:

- la reactividad vascular de las ratas HTG macho se normalizó cuando los animales se castraron al inicio del tratamiento con azúcar (Valdez, 1998) no sucedió esto cuando fueron castrados al final del tratamiento (Pérez, 2000)
- cambios significativos en el perfil lipídico y peroxidación con diferencias asociadas al género de los animales (El Hafidi, 1997; Pérez, 1999; El Hafidi, 2000)
- en ratas normales en experimentos de isquemia y reperfusión cardiaca in vivo se encontró un efecto protector por algunos compuestos sobre las arritmias post-reperfusión (Chávez, 1996). En las ratas HTG se ensayó uno de estos compuestos, el ketorolac, por sus efectos semejantes a los antagonistas del calcio, así como el atrapador de radicales libres PBN. En las ratas HTG hembra se observó que con la administración previa de ketorolac las arritmias post-reperfusión se revertían aunque más lentamente que en las ratas hembra normales, en cambio en los machos HTG el compuesto no fue capaz de revertir los latidos anormales y los animales no se recuperaban. Los resultados sugieren que los estrógenos endógenos ofrecieron protección a las hembras (Carvajal, 1997).

#### ESTRÉS OXIDATIVO (ISQUEMIA-REPERFUSION)

El corazón y el aparato circulatorio componen el aparato cardiovascular. El corazón actúa como una bomba que impulsa la sangre hacia los órganos, tejidos y células del organismo. La sangre suministra oxígeno y nutrientes a cada célula y recoge el dióxido de carbono y las sustancias de desecho producidas por esas células. La sangre es transportada desde el corazón al resto del cuerpo por medio de una red compleja de arterias, arteriolas y capilares, y regresa al corazón por las vénulas y venas.

Las dos arterias coronarias que riegan al miocardio nacen en los senos situados detrás de las valvas de la válvula aórtica, en la raíz de la aorta. Corrientes turbulentas conservan a las valvas alejadas de los orificios de las arterias y éstas son permeables a través de todo el ciclo cardiaco. Existen dos sistemas venosos de drenaje, uno superficial que termina en el seno coronario y venas cardiacas anteriores, el cual drena al ventrículo izquierdo y otro profundo que drena al resto del corazón. El corazón es un músculo que, como el esquelético, comprime sus vasos sanguíneos cuando se contrae. Debido a que no hay flujo sanguíneo en la porción subendocárdica del ventrículo izquierdo durante la sístole, esta región es propensa a dañarse por isquemia y es el sitio más común del infarto del miocardio (Ganong, 1992).

Etimológicamente anemia significa falta total de sangre, una condición que no se da nunca en todo el organismo, sin embargo la isquemia o anemia local, puede definirse como la falta parcial o total de

aporte de sangre a un órgano o parte de él. La primera alteración macroscópica que puede observarse en un órgano isquémico es la palidez.

Generalmente la isquemia tiene una causa local por una obstrucción arterial, a veces sin embargo no es así, en ocasiones hay una hipoxia general producida por insuficiencia circulatoria, a la cual se suma la disposición particular del árbol arterial de ciertos territorios. Las causas locales pueden estar en el lumen, en la pared o por fuera de la arteria. La alteración más frecuente en el lumen es la aterosclerosis: por una parte la placa aterosclerótica puede provocar una trombosis cuando se ulcera; por otra cuando predomina el componente fibroso, puede producir una estenosis por retracción de los tejidos. Entre las causas extrínsecas están la compresión, ligadura y torsión.

Los efectos de la isquemia dependen de diversos factores; los más importantes son:

- ❖ Duración de la isquemia: existen isquemias de tipo transitorio y otras de tipo persistente, una transitoria puede no tener consecuencia si es fugaz, aunque un efecto que puede tener es la llamada necrosis de reperfusión, la cual no se produce durante la isquemia sino en la re-entrada de sangre.
- ❖ Intensidad de la isquemia: depende del grado de obstrucción arterial, isquemia absoluta en caso de oclusión, isquemia relativa en caso de obstrucción parcial. En general, los infartos son consecuencia de una isquemia absoluta persistente.
- ❖ Rapidez con que se instala la isquemia: cuanto más bruscamente se produce, es más grave. En algunos casos, la estenosis se va produciendo gradualmente, de manera que hay desarrollo de colaterales o anastomosis sin que se produzca un infarto, aun después de ocluida la arteria.
- ❖ Sensibilidad o vulnerabilidad de los tejidos: los parénquimas son más vulnerables a la hipoxia que el estroma. Las células de los distintos parénquimas tienen también tiempos diferentes de sobrevivencia a la anoxia: las neuronas de 5 a 10 minutos, las células del epitelio de los túbulos renales alrededor de una hora, las células fijas del tejido conectivo varias horas.
- ❖ Disposición anatómica del árbol vascular: en algunos órganos, las arterias se ramifican a manera de las ramas de un árbol, esta es la circulación arboriforme o terminal, presente en miocardio, riñón y bazo. En otros órganos existe además de la ramificación, anastomosis, llamándose circulación anastomótica o reticular (típica de intestino). En este caso, puede ocluirse una rama sin que ocurra isquemia, dependiendo del calibre de la rama obstruida y las anastomosis existentes.

( [http://escuela.med.puc.cl/paginas/publicaciones/PatologíaGeneral/Patol\\_037.html](http://escuela.med.puc.cl/paginas/publicaciones/PatologíaGeneral/Patol_037.html))

En la rata la distribución arterial coronaria es diferente comparada con mamíferos superiores. Las principales ramas de las arterias coronarias derecha e izquierda descienden sobre las porciones de pared libre de los respectivos ventrículos, más que seguir los surcos atrio-ventriculares o el sulcus interventricular anterior como en los mamíferos superiores. La arteria coronaria izquierda es accesible a

través de una toracotomía izquierda y usualmente no tiene una rama circunfleja larga, la ligadura de la coronaria izquierda puede resultar en 20% a 60% de necrosis del ventrículo izquierdo. Se ha reportado que el procedimiento tiene una mortalidad de 40% o mayor, aunque Bajusz no observó mortalidad resultante de la oclusión de la arteria coronaria izquierda a 1 mm. por abajo de su origen (Baker et al. 1980).

La oclusión de una arteria coronaria produce diversas alteraciones en el metabolismo celular del tejido irrigado por ella. La cascada de eventos incluye: inhibición del metabolismo aeróbico, disminución en la cantidad de fosfocreatina e inicio del metabolismo anaeróbico con producción de diferentes metabolitos tóxicos para la célula. Si la oclusión coronaria persiste, en ausencia de circulación coronaria colateral el déficit de perfusión resultará en un daño estructural irreversible y finalmente llevará a las células a la muerte. Si la reperfusión ocurre antes que el daño sea irreversible, la célula puede recuperarse (Férez y col. 1998) Tabla 1

TABLA 1

Alteraciones del entorno celular durante la isquemia miocárdica

Intracelulares	Extracelulares
Aumento de $Ca^{2+}$ citoplasmático	Acumulación de $K^+$ , $Na^+$ y $H^+$
Acumulación de $CO_2$ y $H^+$	Aumento de lactatos
Aumento de AMP cíclico	Aumento de lisofosfoglicéridos
Depleción de ATP, AMP y CP	Liberación de catecolaminas
Disminución de NADH	Aumento de alfa- receptores

Los trastornos electrolíticos alteran el potencial de reposo, la amplitud y duración del potencial de acción transmembranal y, secundariamente, la fase de recuperación de la excitabilidad y conducción del estímulo cardíaco. El reestablecimiento de la circulación en un área previamente isquémica produce cambios electrofisiológicos y metabólicos tanto en las células isquémicas como en las células normales vecinas, que serán responsables de arritmias ventriculares letales y de alteraciones anatómicas severas (Cinca, 1988).

En la célula cardíaca, la isquemia produce diferentes alteraciones en sus propiedades electrofisiológicas, afectando la conducción eléctrica de forma muy significativa, dando lugar a bloqueos, alternancia de períodos refractarios, diferencias en los umbrales de reposo, excitación y duración del potencial de acción; dichas alteraciones se relacionan principalmente con la aparición de taquiarritmias (Nava; 2004).



Las alteraciones son consecuencia del cambio brusco en el sustrato electrolítico y metabólico del espacio extracelular, producido por el arrastre o lavado que ejerce la reperfusión del área isquémica. Por tanto, los efectos de la reperfusión coronaria dependerán de:

- a) la rapidez con la que se restituya el flujo coronario, ya que la reperfusión gradual atenúa la incidencia de las arritmias
- b) la duración del período previo de isquemia, puesto que éste condiciona la magnitud de la alteración electrolítica y metabólica del espacio intersticial y por tanto su osmolaridad
- c) la extensión del área de isquemia
- d) la frecuencia cardíaca previa, ya que su aumento incrementaría el grado de heterogeneidad que produce la reperfusión del intersticio isquémico.

Existen dos corrientes principales que tratan de explicar el daño celular que aparece subsiguiente a la reperfusión, una de ellas considera que el agente más importante es el calcio y que una sobrecarga de este ión en la célula produce el daño; la otra corriente considera a los radicales libres derivados del oxígeno (ROS) como los principales agentes implicados en el daño celular secundario a la reperfusión; probablemente ambos agentes interactúan durante la inducción del daño cardíaco (Téllez et al; 1996).

En el modelo de rata hipertriglicéridémica, Carvajal y cols. presentaron evidencia de la participación de los ROS como principales efectores del daño durante la reperfusión (Carvajal, 1999). Los ROS constituyen una familia de moléculas que incluye al oxígeno molecular y sus derivados producidos en todas las células aeróbicas. Durante la reperfusión, la producción de ROS en la zona isquémica es intensa y secundariamente los sistemas de protección están deprimidos (disminución de las tasas de superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa en el curso de la isquemia).

Los ROS ( $O_2^{\cdot-}$  y  $H_2O_2$  transformados en  $OH^{\cdot}$ ) reaccionan con los componentes fosfolipídicos de las membranas celulares (lipoperoxidación), proteínas y ácidos nucleicos, provocando la desorganización estructural y funcional de las células y su muerte, además actúan sobre los ácidos grasos libres acumulados en la fase isquémica y pueden desviar la cascada del ácido araquidónico hacia la vía metabólica del tromboxano  $A_2$ , vasoconstrictor y proagregante plaquetario. Los ROS son agentes quimiotácticos para las plaquetas (adhesión y agregación) y las células polimorfonucleares neutrófilas, las cuales activan la adherencia al endotelio y suman su propia producción de radicales (Droy-Lafaix et al, Folleto Informativo Editado por Farmasa Schwabe).

La producción de ROS está aumentada en personas con hiperglucemia (diabetes) por tanto el estrés oxidativo también se incrementa. Entre las principales complicaciones que se presentan en esta

enfermedad están, la enfermedad cardiovascular (cardiopatía isquémica), la enfermedad vascular cerebral y la enfermedad arterial periférica.

## INFLUENCIA DEL GENERO

En estudios epidemiológicos se ha demostrado que las mujeres premenopáusicas tienden a estar protegidas de enfermedad arterial coronaria en comparación con hombres de la misma edad, también es sabido que en mujeres premenopáusicas la incidencia de infarto al miocardio y otras complicaciones relacionadas a enfermedad aterosclerótica es más baja que en hombres, pero la incidencia después de la menopausia es similar a la observada en hombres. Estos hallazgos indican también un papel protector de los estrógenos endógenos (Barp et al, 2002).

A través de estudios electrofisiológicos se ha visto que las taquiarritmias son más fácilmente inducibles en hombres que en mujeres; Freedman y col. demostraron que las taquiarritmias ventriculares, investigadas por estimulación eléctrica programada se inducían en 88% de los hombres pero sólo en 39% de las mujeres (Freedman et al, 1988). Aunado a esto existen datos acerca de la mortalidad por enfermedad cardíaca: mayor número de hombres (39%) que mujeres mueren entre las edades de 45 y 64 años, sin embargo después de los 65 años, el porcentaje de mortalidad debido a enfermedad cardíaca en mujeres excede al de hombres en 22% (<http://www.census.gov/prod/www/statistical-abstracts-us.html>).

Se han reportado diferencias en la presión sanguínea arterial asociadas al género. Existe evidencia de que los andrógenos juegan un importante papel en la regulación de la presión sanguínea. Algunos estudios en los que han usado técnicas de monitoreo de presión ambulatoria en niños, han mostrado que con el aumento en la edad aumenta la presión sanguínea en niños y niñas. Sin embargo, después del inicio de la pubertad los varones presentan más alta la presión sanguínea que las jóvenes de su misma edad, de los 13 a los 15 años la presión sistólica es aproximadamente 4 mm Hg más alta en varones que en jovencitas, y de los 16 a los 18 años los varones tienen más elevada la presión sistólica que las jóvenes, por 10 a 14 mm Hg (Harshfield et al, 1994). Estos datos sugieren que en la adolescencia y la pubertad, cuando los niveles de andrógenos aumentan, también la presión sanguínea es más alta en varones que en jovencitas. Wiinberg y cols. estudiaron un grupo de 352 daneses, hombres y mujeres normotensos entre los 20 y 79 años de edad, encontrando que la presión sanguínea aumenta con la edad en ambos, pero los hombres tienen más alta la presión media de 24 Hrs. por 6 a 10 mm Hg que las mujeres, hasta los 70 a 79 años, cuando la presión es similar en ambos (Wiinberg et al, 1995).

Existen observaciones realizadas en mujeres con síndrome de ovario poliquístico o tumores adrenales virilizantes, ambos estados se caracterizan por niveles elevados de testosterona y las pacientes desarrollan hipertensión (Talbot et al, 1995; Mattson et al, 1984; Sorano et al, 1999). Las diferencias

encontradas en humanos también existen en varios modelos animales. En modelos de ratas hipertensas, muchos investigadores han observado que las ratas macho tienen la presión sanguínea más alta que las hembras. En estudios llevados a cabo en animales espontáneamente hipertensos el tratamiento con testosterona incrementa la presión sanguínea en hembras ooforectomizadas y machos castrados (Chen Y-F et al, 1991). Diferencias de género similares en el desarrollo de la hipertensión son encontradas en ratas Dahl sensibles a sal (Crofton et al, 1993; Rowland et al, 1992).

Esta información indica que el incremento en niveles de andrógenos en humanos y ratas, tanto normotensos como hipertensos provoca aumento en la presión sanguínea; dado que hombres y ratas macho tienen la presión sanguínea más alta que las mujeres y las ratas hembra, es probable que las hormonas femeninas jueguen un papel importante para evitar la elevación de la presión (Reckelhoff, 2001).

Los estrógenos comprenden al estriol,  $17\beta$ -estradiol y estrona, de ellos el que ha demostrado un mayor potencial protector en experimentos in vitro ha sido el  $17\beta$ -estradiol. Existen varios tejidos y células que tienen la capacidad de sintetizar estrógenos a partir de andrógenos y usarlos de manera paracrina o intracrina: entre ellos están las células de la granulosa ovárica, el sinciciotrofoblasto de la placenta, el tejido adiposo y los fibroblastos de piel, hueso y cerebro (Belanger et al, 2002; Nelson et al. 2001).

Actualmente existe evidencia que apoya el papel protector de los estrógenos en músculo cardíaco y esquelético in vivo e in vitro; en vasos sanguíneos también se han encontrado efectos protectores (Persky et al, 2000; McHugh et al, 1995; Watanabe et al, 2001; Babiker et al, 2002; Barp et al, 2002; Booth et al 2005, Pérez 2004), en varones los estrógenos son producidos en cantidades significativas, por aromatización local de los precursores androgénicos en testículos y glándulas adrenales, encontrándose involucrados en el metabolismo de los huesos (cierre de las epífisis y adecuada densidad mineral) (Simpson 1997), en el mantenimiento de un perfil adecuado de lípidos y en el metabolismo de la glucosa (Shono, 1996).

Existen datos que por una parte indican la presencia anormalmente alta de estrona en varones sobrevivientes de infarto al miocardio, cuando se comparan con sujetos control, mientras que sus niveles de testosterona no presentan cambios (Phillips, 1976), en otros estudios se postula que los niveles altos de estrógenos mejoran la sobrevivencia después de un ataque, más que provocar aterosclerosis (Zumoff, 1982)

No se han encontrado diferencias entre los niveles hormonales de hombres que han sufrido infarto y sujetos control (Barret-Connor et al, 1988). En la mayoría de estos estudios sólo se midieron los niveles de hormonas circulantes sin tomar en consideración las fracciones unidas a proteína, pues se sugiere que

sólo las primeras tienen actividad biológica significativa; sin embargo en la Prueba de Intervención de Múltiples Factores de Riesgo se midieron ambos tipos de hormona, sin encontrar asociación con enfermedad arterial coronaria (Cauley et al, 1987).

Algunos trabajos hacen mención de las diferencias en el patrón electrocardiográfico de mujeres y hombres; (Merri et al, 1995) Bidoggia y col las compararon en hombres castrados, mujeres con virilización y sujetos control pareados por edad y sexo, encontrando que las mujeres con virilización muestran una repolarización más corta y rápida en el electrocardiograma que la repolarización de mujeres normales y hombres castrados, estos últimos presentaban un patrón de repolarización más lento y largo que hombres normales, el cual podía ser revertido con administración de testosterona (Bidoggia et al, 2000). También existe la observación de que esta hormona disminuye la duración del potencial de acción en células endocárdicas de conejas ooforectomizadas (Hara et al, 1998); esto podría ser indicativo de la susceptibilidad del corazón de machos a desarrollar anomalías con más frecuencia que el corazón de las hembras.

## **PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA**

Los padecimientos crónico-degenerativos, particularmente los cardiovasculares son de amplia prevalencia y causa más frecuente de mortalidad en gran número de comunidades, por lo que deben ocupar un sitio prioritario en la investigación. Por otra parte, existen diferencias en la incidencia de estas enfermedades, asociadas al género y edad del individuo, entre otras variables.

Tomando en cuenta los antecedentes generales así como nuestros hallazgos experimentales, se utilizarán métodos fisiológicos y bioquímicos para evaluar la participación de las hormonas sexuales en la función cardiaca durante un período de estrés inducido por isquemia y reperfusión, en el modelo de rata hipertriglicéridémica.

## **HIPÓTESIS**

- En ratas macho, la castración o el tratamiento con estradiol podría conferirles protección contra el daño por isquemia – reperfusión en el miocardio, normalizando la frecuencia cardiaca y disminuyendo los niveles de enzimas marcadoras de daño (creatin cinasa y lactato deshidrogenasa).
- En ratas hembra la ooforectomía o el tratamiento con testosterona podría revertir la protección que muestran al daño por isquemia – reperfusión en el miocardio, existiendo alteración de la frecuencia cardiaca y aumento en los niveles de enzimas marcadoras de daño (creatin cinasa y lactato deshidrogenasa)

## **OBJETIVO**

- El propósito del presente trabajo fue analizar el papel modulador de los estrógenos y los andrógenos sobre la función cardiaca, particularmente en condiciones de estrés por isquemia y reperfusión in vivo, en ratas intactas o hipertriglicéridémicas.

## METODOLOGÍA

Animales.- Los experimentos fueron realizados en ratas Wistar machos y hembras adultos los cuales fueron obtenidos del bioterio del Instituto Nacional de Cardiología “Dr. Ignacio Chávez” cuando fueron destetados a las tres semanas de vida.

Protocolo Experimental:

Se formaron grupos de 10 ratas cada uno, machos o hembras, control (CTRL) e hipertrigliceridémicas (HTG). Tabla 2

Tabla 2

HEMBRAS		MACHOS	
Grupo 1 Intactas	Control (CTRL)	Grupo 1 Intactas	Control (CTRL)
	Hipertrigliceridémicas (HTG)		Hipertrigliceridémicas (HTG)
Grupo 2 Ooforectomizadas (Oofo)	Control	Grupo 2 Castradas (Cast)	Control
	Hipertrigliceridémicas		Hipertrigliceridémicas
Grupo 3 Ooforectomizadas + Estradiol (Est)	Control	Grupo 3 Castradas + Testosterona (Test)	Control
	Hipertrigliceridémicas		Hipertrigliceridémicas
Grupo 4 Ooforectomizadas +Testosterona	Control	Grupo 4 Castradas + Estradiol	Control
	Hipertrigliceridémicas		Hipertrigliceridémicas

Durante el protocolo experimental los animales fueron mantenidos en grupos de 5 ratas en cajas de policarbonato y acero inoxidable para alojamiento de roedores, los animales CTRL recibieron alimento comercial (Labdiet) y agua ad libitum, en tanto los animales HTG recibieron el mismo tipo de alimento pero el agua de bebida tenía azúcar comercial al 30%; también alimento y bebida fueron proporcionados ad libitum.

Inducción de la hipertrigliceridemia.- La hipertrigliceridemia se indujo por la administración de azúcar comercial al 30% en el agua de bebida durante un período de 20 semanas, al cabo del cual se

observó un aumento significativo en el nivel plasmático de triglicéridos sanguíneos (resultados previamente reportados por el laboratorio) y en la presión arterial.

Tratamiento hormonal.- Después de la remoción de las gónadas, transcurrieron dos semanas y se inició el tratamiento hormonal. Existen trabajos publicados donde se administró estradiol de forma aguda y en dosis fisiológicas o cercanas a ellas (Mc Hugh et al, 1995; Paredes et al, 1995), en nuestro caso se utilizó una dosis inferior a la fisiológica y aplicada crónicamente. Para suplir al estradiol se administró valerato de estradiol (Est), 270 µg/Kg de peso mensualmente; la testosterona (Test) fue reemplazada con enantato de testosterona 50 µg /Kg de peso cada dos semanas, ambas hormonas fueron administradas por vía intramuscular (IM).

## EVALUACIÓN DE LA PRESIÓN SANGUÍNEA

La presión sanguínea se midió por un método indirecto, a través de un manguito colocado en la cola de la rata y conectado a un transductor neumático de pulso (Narco Biosystems Inc., Houston Texas) el cual a su vez estaba conectado a un polígrafo Grass modelo 79D. Esta maniobra experimental se llevó a cabo con el siguiente protocolo:

- Se colocaron de 6 a 8 ratas en una jaula de acrílico translúcido y a su vez ésta en una caja de madera con 2 focos de 100 w, dejándolas ahí de 15 a 20 minutos, con el fin de provocar la dilatación de los vasos sanguíneos de la cola, que son los más superficiales y donde se evalúa la presión sanguínea.
- Posteriormente, las ratas se colocaron en una caja individual de acrílico, la cual permite ajustarla al tamaño del animal en cuestión, para mantenerlo inmóvil, dejando la cola fuera.
- A continuación se colocó sobre la cola el anillo de presión y en seguida el fotosensor, este último de tal manera que el haz de luz emitido quedó sobre alguno de los cuatro vasos que recorren de forma paralela la cola de la rata.
- El anillo de presión se conectó a una jeringa a través de la cual se impulsó el aire que infla el anillo para ejercer presión, esto es equivalente a un baumanómetro utilizado en el ser humano. Tanto el anillo de presión como el fotosensor estaban conectados al transductor, el cual enviaba la información hacia el polígrafo y de éste iba a la computadora, donde por medio del programa SIEVART se obtuvieron los valores de presión sistólica.
- Los registros se repitieron de 3 a 5 veces para cada animal hasta obtener resultados reproducibles, y se promediaron los valores obtenidos.
- El procedimiento se repitió mensualmente en todos los animales de cada grupo.

## OBTENCIÓN DEL FROTIS VAGINAL

Para obtener el frotis vaginal se llevó a cabo el siguiente protocolo:

- Se utilizaron aplicadores forrados con algodón en uno de sus extremos.

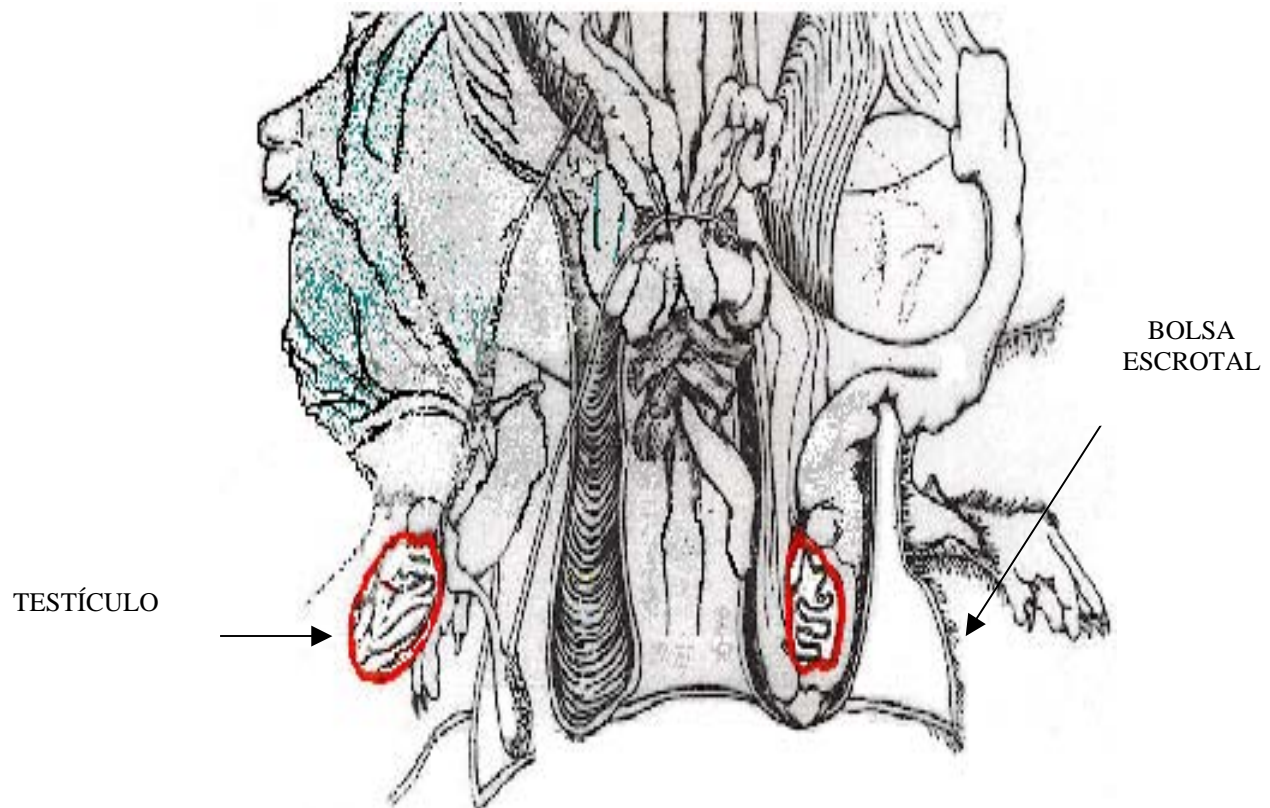


- Se sujetó a la rata con el vientre expuesto hacia arriba, y suavemente con movimientos rotatorios se introdujo el aplicador en la vagina.
- Se sacó el aplicador suavemente y con movimientos giratorios se puso en contacto con la superficie de un portaobjetos limpio.
- Se dejó secar la superficie del portaobjetos y se fijó la preparación con alcohol de 96°
- A continuación la preparación se tiñó de acuerdo al método de Papanicolaou (Luna, 1960)

## CASTRACIÓN

La castración se realizó a las 5 semanas del nacimiento de las ratas macho, bajo anestesia (pentobarbital sódico 1 mg/Kg. de peso)

- Se depiló la zona del escroto, se limpió y desinfectó con etanol y después con benzal al 5%
- Se realizó una incisión longitudinal de aproximadamente 1 cm.



- Se cortó la bolsa escrotal y se exteriorizaron los testículos, ligando los conductos eferentes y los vasos sanguíneos, a continuación se seccionó por debajo de las ligaduras y se suturó cada corte.
- En el agua de bebida se administró antibiótico lincomicina-espectinomomicina (Linco-Spectin 100, 0.46-0.5 g/L) durante una semana.

## OOFORECTOMÍA

La ooforectomía se realizó a las 4 semanas de nacimiento de las ratas hembra, bajo anestesia (pentobarbital sódico 1 mg/Kg. de peso).

- En primer término se depiló el perímetro abdominal del dorso del animal
- Se limpió y desinfectó con etanol y benzal al 5%
- Se hizo una incisión longitudinal de aproximadamente 1 cm, y se separó la piel del músculo
- Se practicó otra incisión en el músculo de aproximadamente 0.5 cm. a cada lado de la primera incisión



- Se exteriorizaron los ovarios y se colocó una ligadura inmediatamente por debajo de ellos abarcando una pequeña porción correspondiente al útero
- Se seccionó por arriba de la ligadura y después se suturaron los cortes efectuados.
- Se administro antibiótico a la dosis ya mencionada.

## ISQUEMIA – REPERFUSIÓN MIOCÁRDICA

- Los animales fueron anestesiados con pentobarbital sódico (55 mg/Kg. IP) y a través de una abertura en la tráquea se introdujo la cánula de un respirador, manteniendo la frecuencia respiratoria en 62/min.
- A continuación se abrió la piel a la altura de la arteria femoral, en ésta se introdujo un catéter conectado a un transductor de presión hidrostática, a través de éste la señal se envió a un polígrafo Grass modelo 79D y finalmente, al programa PolyVIEW donde se desplegó en forma de onda con una escala que permitió la evaluación de variaciones en la presión sanguínea durante todo el experimento.



- Por toracotomía lateral se expuso el corazón. Con un hilo de sutura de seda 6-0 pasado por debajo de la arteria coronaria descendente anterior izquierda y posteriormente anudado se ocluyó el paso de la sangre hacia la pared del ventrículo izquierdo durante 5 minutos y al cortar la sutura, se permitió el flujo 5 minutos más.
- Se hizo un registro de electrocardiograma (ECG) de superficie con 3 electrodos, colocados en la posición standard DII los cuales se conectaron al polígrafo, durante todo el proceso.
- Al término del experimento se colectaron 3ml de sangre, por punción en el ventrículo izquierdo y se separó el suero; se obtuvo la grasa retroperitoneal de todos los animales.
- De ratas hembra se obtuvo también el útero, quitándolo desde el nivel del cuello y eliminando la grasa adherida.

#### DETERMINACIÓN DE ENZIMAS

Tanto la creatin cinasa (CK-MB) como lactato deshidrogenasa (LDH) fueron determinadas por medio de kits de la marca RANDOX de acuerdo a los insertos que provee el fabricante.

## MEDICIÓN DE LAS CONCENTRACIONES HORMONALES (TESTOSTERONA Y ESTRADIOL)

Las hormonas sexuales se midieron en todos los grupos al final del periodo experimental. Personal del Departamento de Biología de la Reproducción del INNSZ realizó las determinaciones de estradiol (Est) y testosterona (Test) séricos utilizando kits comerciales, y se siguió el método recomendado por el fabricante.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

El análisis estadístico fue realizado con el programa SPSS versión 11.0 y las figuras con el programa Prism versión 3.0. Los datos se presentan como la media  $\pm$  error estándar, la significancia estadística se determinó por la prueba de t de Student y una  $p < 0.05$  se tomó como significativa

## RESULTADOS

### GRUPO 1: RATAS INTACTAS

#### Peso corporal

En las ratas hembra (Fig. 1A) se observó que desde el primer mes (tiempo 1) existió ganancia en el peso corporal, el cual fue ligeramente mayor en el grupo CTRL (95.8g) que en el grupo HTG (87.7g). El valor promedio del peso del grupo HTG permaneció por debajo del grupo CTRL. En el cuarto mes (tiempo 4) la diferencia entre los dos grupos fue más acentuada (CTRL 293±12 vs. HTG 240±12) permaneciendo con un mayor peso las ratas del grupo CTRL, esta diferencia se mantuvo hasta el final del tiempo experimental ( $p < 0.05$ ).

En la Fig. 1B correspondiente al peso corporal de las ratas macho, se observó un aumento progresivo de peso en las ratas de los dos grupos (HTG y CTRL); sin embargo, entre ellos no hubo diferencia (HTG 599 ± 45g vs. CTRL 646 ± 28g)  $p > 0.05$ .

Tanto las ratas hembra como las ratas macho de los grupos HTG tuvieron un menor peso corporal que las ratas de los grupos CTRL.

El peso final promedio de hembras CTRL fué de 392g al término del período experimental (20 semanas), mientras que el peso final de los machos CTRL fue 646g. Cuando se llevó a cabo una prueba t de Student para comparar el peso corporal, entre machos y hembras HTG, se obtuvo una diferencia significativa desde el primer mes (tiempo uno) ( $p < 0.05$ ) hasta el quinto mes (tiempo cinco); en ambos casos las ratas macho tuvieron mayor peso ( $p < 0.05$ ).

#### Presión sanguínea

Respecto a la presión sanguínea, en las ratas hembra (Fig. 1C) se observó que en el primer mes (tiempo 1) los valores que se obtuvieron en promedio fueron muy similares entre los grupos CTRL y HTG. A partir del segundo mes (tiempo 2), el grupo de ratas HTG presentó una elevación que se mantuvo significativa hasta el final del periodo experimental (HTG 130±2 vs. CTRL 117±3,  $p < 0.05$ ).

Se observó que desde el primer mes (tiempo 1), la presión arterial en las ratas machos del grupo HTG (figura 1D) se elevó significativamente (HTG 117 ± 4 mm Hg vs. CTRL 110 ± 5 mm Hg), aún cuando en el cuarto mes (tiempo 4) se presentó un descenso que se aproximó al valor promedio obtenido en el grupo CTRL (HTG 131 ± 2.6 vs. CTRL 124 ± 2 mm Hg), en el quinto mes (tiempo 5) se observó diferencia significativa entre ellos (HTG 147±2 vs. CTRL 125±2)  $p < 0.05$ .

Al comparar la presión arterial en las ratas intactas (grupo1), las ratas macho del grupo HTG tuvieron la presión más elevada que las hembras del mismo grupo ( $p < 0.05$ ) desde el primer mes (tiempo 1) (Fig. 1C y 1D). Este patrón también se observó cuando se compararon las ratas macho y hembra de los grupos CTRL,  $p < 0.05$ .

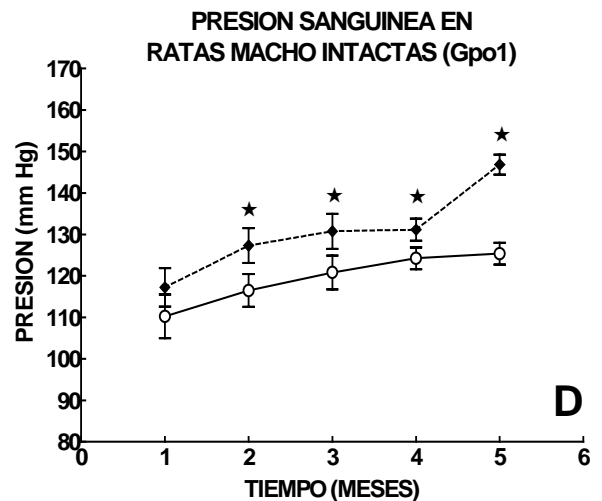
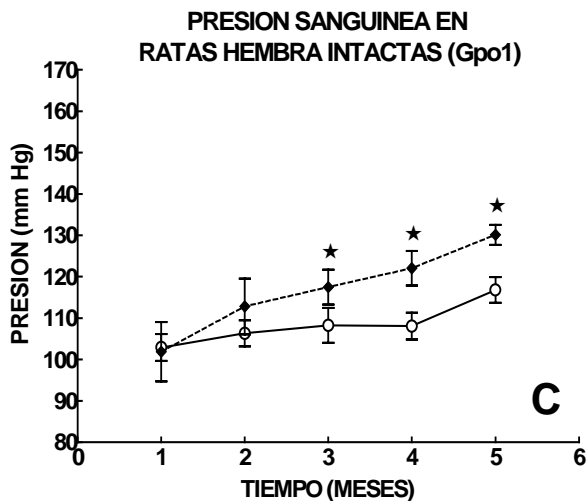
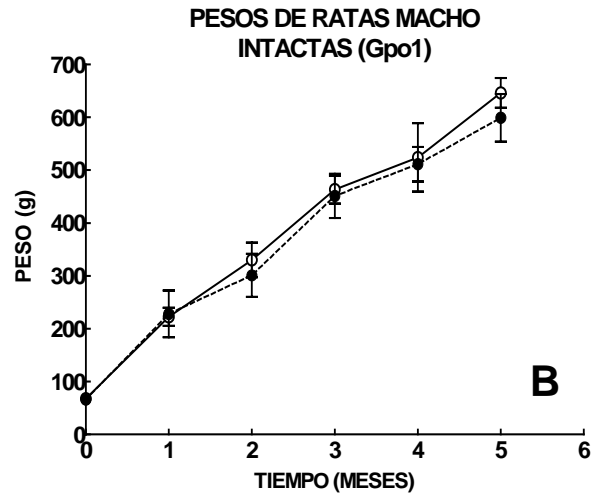
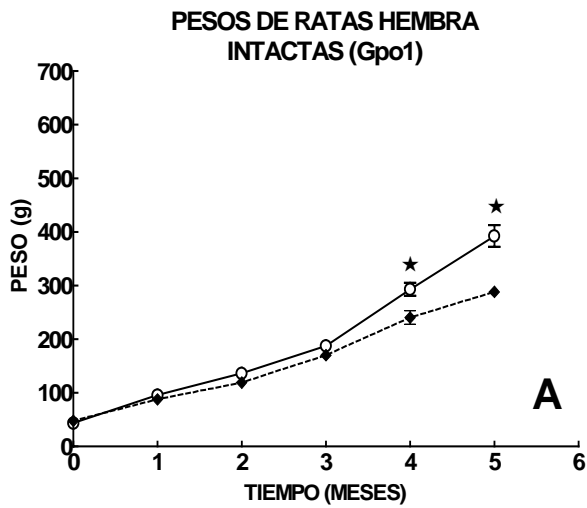


Figura 1.- En la gráfica A se muestra el peso corporal en ratas hembra intactas pertenecientes a los grupos CTRL (o) y HTG (♦). En la gráfica B se muestra el peso corporal de ratas macho intactas pertenecientes a los grupos CTRL (o) y HTG (♦). En las gráficas C y D, se muestra el registro de la presión arterial (mmHg) con respecto al tiempo, en los mismos grupos de ratas. Cada punto representa la media ± e.s. ★ Indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

## RATAS DEL GRUPO 2: OOFORECTOMIZADAS Y CASTRADAS

### Peso corporal

El incremento en el peso corporal en las ratas hembra ooforectomizadas (Oofo) fue mayor en las ratas del grupo HTG que en las del grupo CTRL (HTG  $417 \pm 40$  g vs. CTRL  $365 \pm 43$ g,  $p < 0.05$ ), (Fig. 2A).

Los grupos de ratas macho (Fig. 2B) presentaron un patrón de incremento brusco de peso a partir del primer mes (tiempo 1), sin embargo los animales pertenecientes al grupo HTG tuvieron un menor peso que los animales pertenecientes al grupo CTRL (HTG  $463 \pm 65$ g vs. CTRL  $487 \pm 24$ ), esta diferencia no fue significativa ( $p > 0.05$ ).

El análisis estadístico del incremento de peso entre los dos sexos de animales de los grupos HTG, no mostró diferencia ( $p > 0.05$ ). Esto pudo ser debido a los valores tan grandes de la desviación estándar y al aumento de peso que presentaron las hembras. Entre los animales de los grupos CTRL sí se encontró diferencia ( $p < 0.05$ ), siendo los machos más pesados.

### Presión arterial

Respecto a la presión arterial en las ratas hembra, Oofo (Fig. 2C), las ratas pertenecientes al grupo HTG mostraron un patrón de incremento ascendente con el tiempo, el cual fue mayor en las ratas del grupo CTRL. Al final del período de tratamiento que constó de 20 semanas, se obtuvieron valores de presión de  $141 \pm 5.4$  mmHg en las ratas del grupo HTG y de  $126 \pm 4.9$  mmHg en las ratas del grupo CTRL, sin embargo, esta diferencia no fue significativa ( $p > 0.05$ ). En las ratas del grupo CTRL, el incremento en la presión arterial presentó una gran variabilidad.

En las ratas macho, los valores de presión sanguínea tuvieron un comportamiento similar entre los animales del grupo CTRL y los del grupo HTG hasta el tiempo 3. En el tiempo 4 pudo observarse que las ratas del grupo HTG tenían la presión sanguínea más elevada que la de las ratas del grupo CTRL, esta elevación se mantuvo hasta el tiempo 5. Sin embargo los errores estándar fueron grandes en todos los tiempos, por lo tanto sus diferencias no fueron significativas (HTG  $134 \pm 6.1$ mmHg y CTRL  $126 \pm 4.3$  mmHg,  $p > 0.05$ ) (Fig. 2D).

No se encontraron diferencias en la presión sanguínea entre los dos sexos de los grupos de ratas HTG, en este caso, también influyó la dispersión en los datos, dado que los errores estándar eran grandes. En las ratas de los grupos CTRL el valor final de la presión arterial fue similar, no se encontraron diferencias significativas.



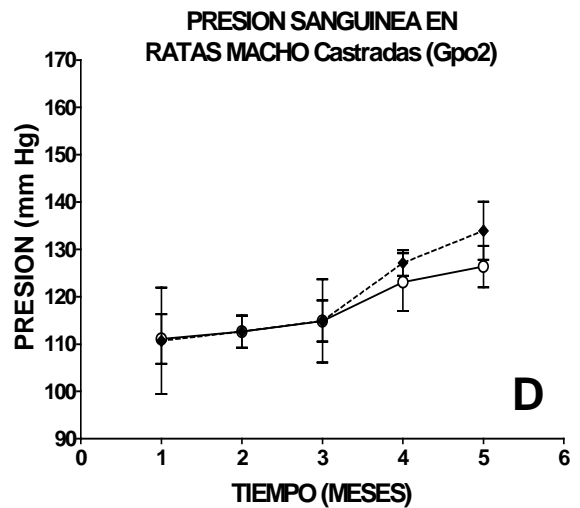
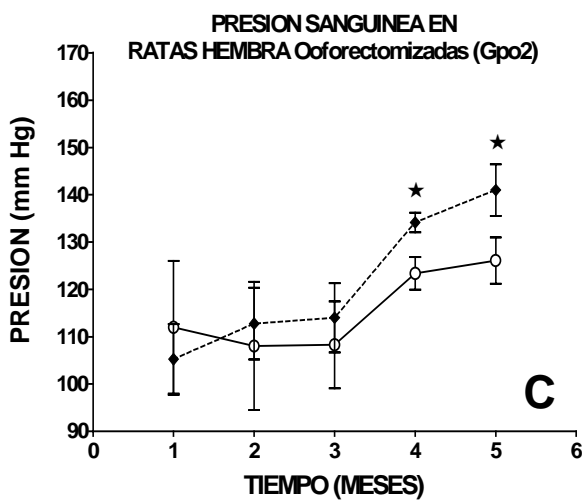
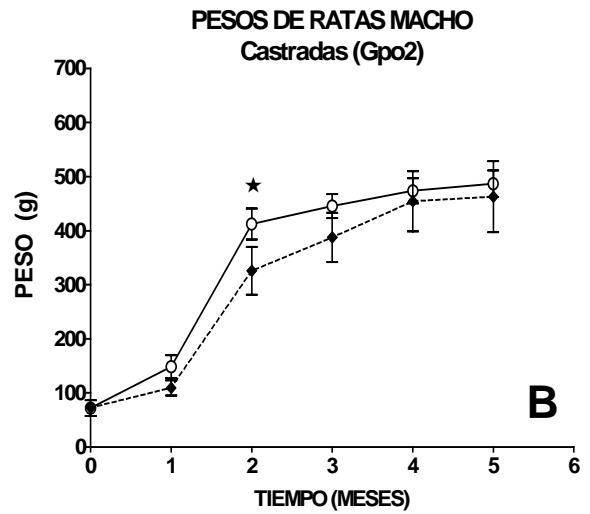
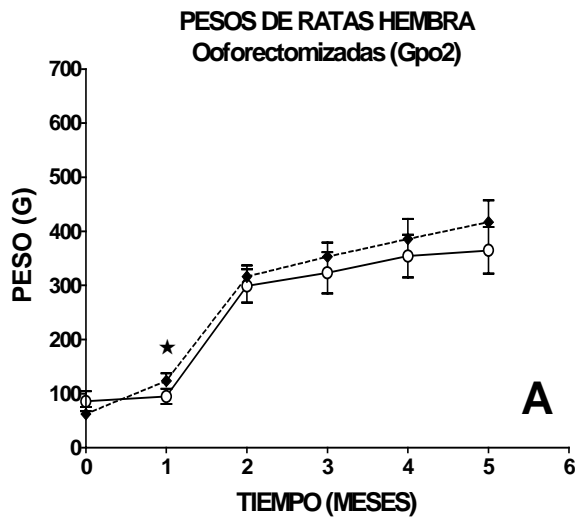


Figura 2.- En la gráfica A, se muestra el peso corporal en ratas hembra, ooforectomizadas tanto CTRL (o) como HTG (♦). En la gráfica B se muestra el peso corporal de ratas macho castradas pertenecientes a los grupos CTRL (o) y HTG (♦). En las gráfica C y D, se muestra el registro de la presión arterial (mmHg) con respecto al tiempo, en los mismos grupos de ratas. Cada punto representa la media  $\pm$  E.S. ★ Indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

### RATAS DEL GRUPO 3: OOFORECTOMIZADAS + Est Y CASTRADOS + Test

#### Peso corporal

El incremento de peso corporal a lo largo del período experimental no tuvo diferencias significativas ( $p>0.05$ ) entre los grupos de ratas hembras de los grupos HTG y CTRL (Fig. 3A).

En el grupo de machos (Fig. 3B), el aumento en el peso fue menor para el grupo de ratas HTG que para el grupo CTRL, al final del período experimental, pero no fue significativo ( $p>0.05$ ). Sin embargo, la diferencia de peso entre las hembras y los machos de los grupos CTRL sí fue significativa ( $p<0.05$ ). Lo mismo se encontró entre los grupos de ratas hembra y macho del grupo HTG, los machos tuvieron el mayor peso corporal.

#### Presión arterial

La presión arterial en el grupo de hembras CTRL (Fig. 3C) se mantuvo estable (tiempo 1=  $116.3 \pm 3.5$  y tiempo 5=  $116.8 \pm 3.7$ ) durante el período experimental y con valores más bajos de los obtenidos en el grupo HTG (CTRL  $116.8 \pm 3.7$  vs. HTG  $136 \pm 7.8$ ). En este último grupo, a partir del segundo mes (tiempo 2) se observó aumento paulatino en la presión arterial, que al final del período experimental fue significativo con respecto al grupo CTRL ( $p< 0.05$ ). En los machos, la presión arterial para el grupo HTG aumentó a partir del segundo mes (tiempo 2) hasta el final del período experimental, en tanto que el grupo CTRL mantuvo los valores de presión sin cambios significativos (Fig. 3D). Los valores de presión arterial entre los machos y las hembras de los grupos CTRL y HTG no fueron diferentes.

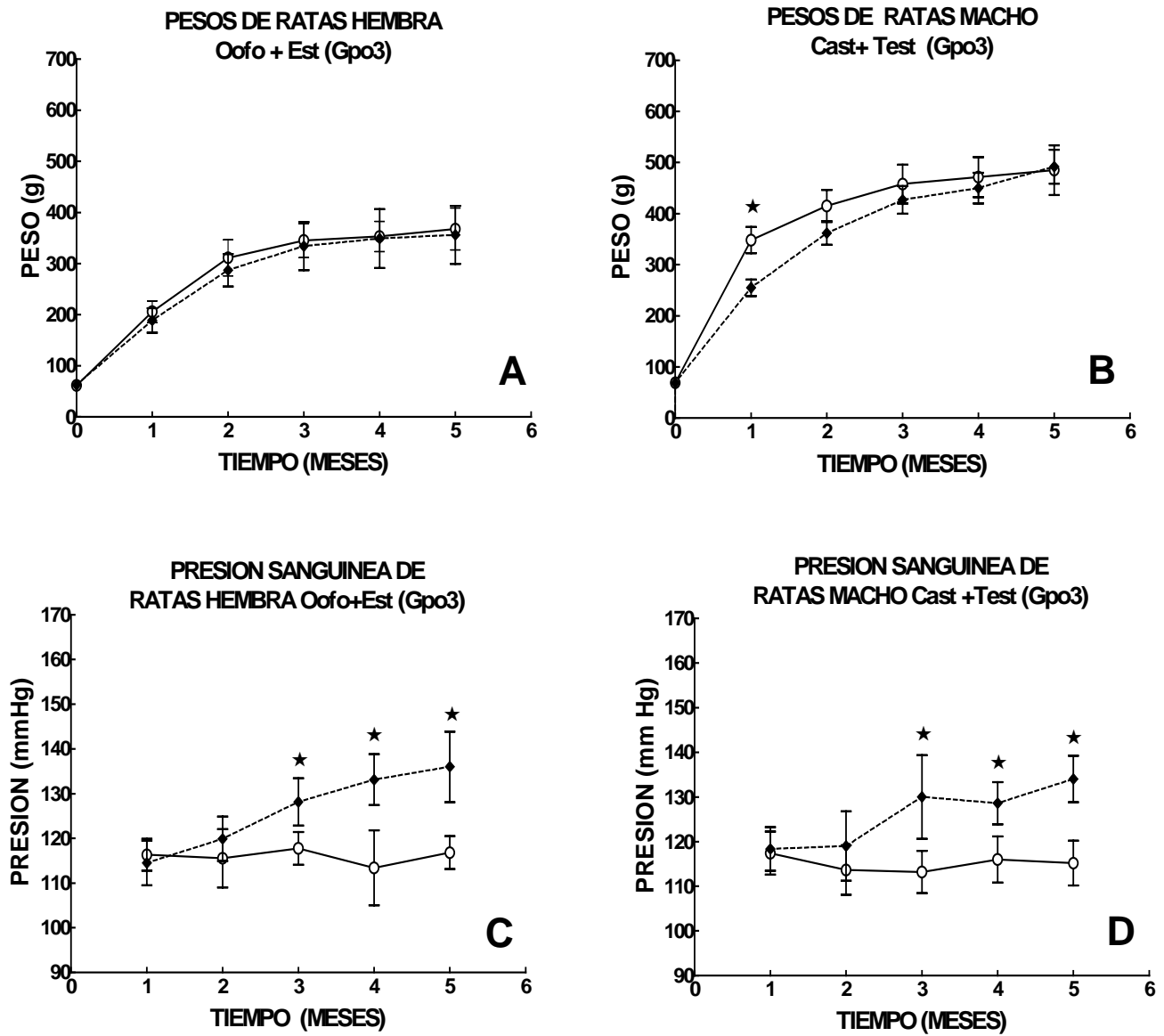


Figura 3.- En la gráfica A se muestra el peso corporal en ratas hembra ooforectomizadas + Est, tanto CTRL (o) como HTG (♦). En la gráfica B se muestra el peso corporal de ratas macho castradas + Test, pertenecientes a los grupos CTRL (o) y HTG (♦). En las gráfica C y D, se muestra el registro de la presión arterial (mmHg) con respecto al tiempo, en los mismos grupos de ratas. Cada punto representa la media ± E.S. ★ Indica diferencia significativa (p<0.05)

## RATAS DE GRUPO 4: OOFORECTOMIZADAS + Test Y CASTRADOS + Est

### Peso corporal

En las ratas hembra del grupo HTG y tratadas con Test ( $50\mu\text{g} / \text{Kg}$  cada 2 semanas) no se encontró un incremento en el peso corporal diferente ( $p > 0.05$ ) al de las ratas CTRL durante el período experimental (Fig.4A).

Las ratas macho del grupo HTG tratadas con Est, tampoco mostraron un incremento de peso diferente al de los animales CTRL (Fig. 4B).

Al comparar el peso corporal entre las ratas hembra y macho, sólo hubo diferencia ( $p < 0.05$ ) entre los grupos CTRL (CTRL hembras:  $428.6 \pm 30$  vs. machos:  $371 \pm 13.84$ )

### Presión arterial

Respecto a la presión arterial, entre el grupo CTRL y el HTG de ratas hembra tratadas con Test, en los primeros tres meses, no hubo diferencia, sin embargo los dos últimos meses fueron significativamente diferentes ( $p < 0.05$ ) (Fig. 4C). En los machos tratados con Est, la diferencia entre los grupos CTRL y HTG también fue significativa ( $p < 0.05$ ) (Fig. 4D).

La presión arterial entre hembras y machos del grupo CTRL tratados con hormonas opuestas a su género fue diferente ( $p < 0.05$ )

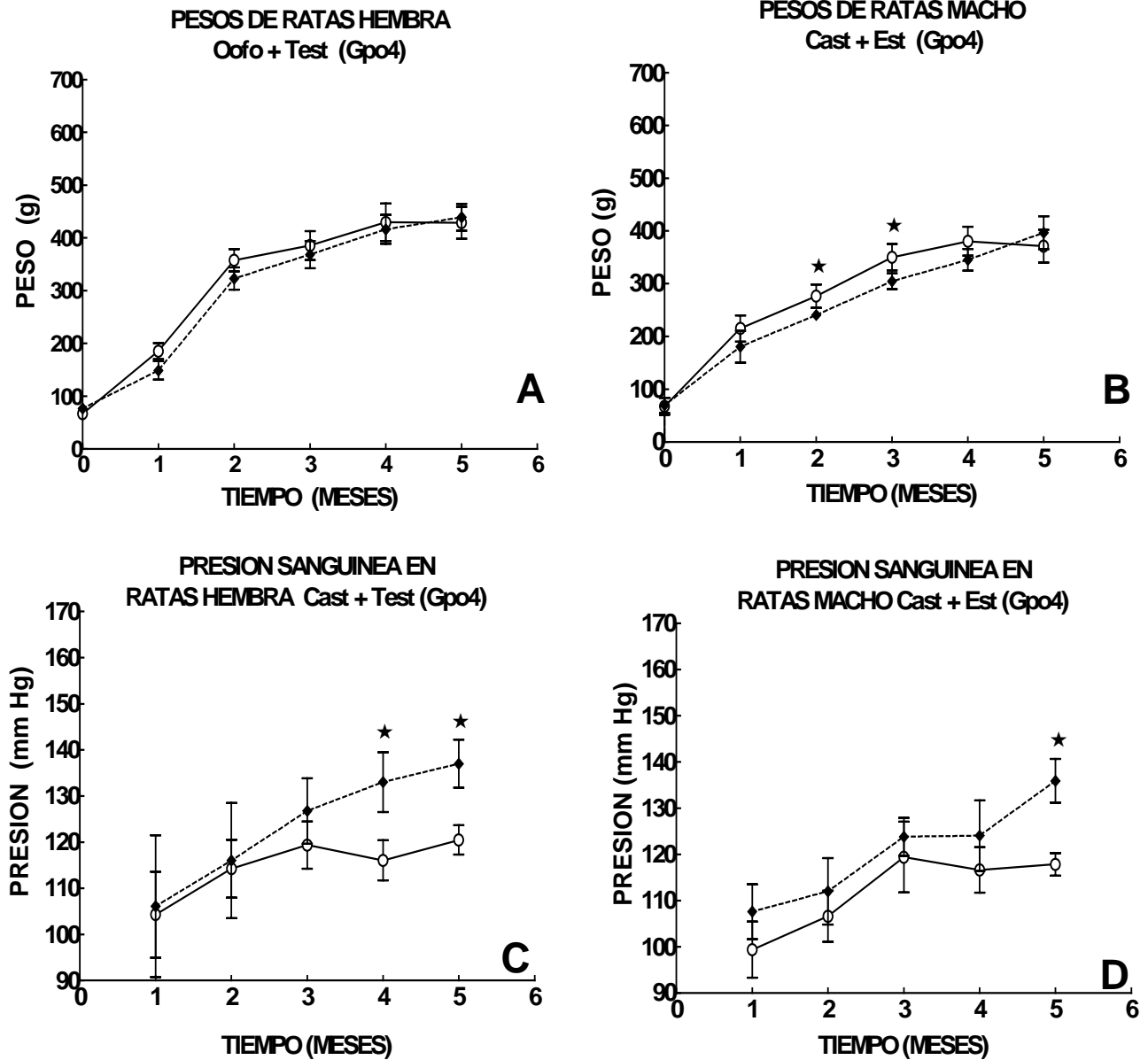


Figura 4.- En la gráfica A, se muestra el peso corporal en ratas hembra ooforectomizadas + Test, tanto CTRL (o) como HTG (♦). En la gráfica B se muestra el peso corporal de ratas macho castrados + Est, pertenecientes a los grupos CTRL (o) y HTG (♦). En las gráfica C y D, se muestra el registro de la presión arterial (mmHg) con respecto al tiempo, en los mismos grupos de ratas. Cada punto representa la media  $\pm$  E.S. ★ Indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

## FRECUENCIA CARDIACA

El cálculo de la frecuencia cardiaca durante la maniobra experimental de isquemia-reperfusión tuvo la finalidad de evaluar de manera indirecta el daño funcional del corazón. Los primeros 5 minutos corresponden al período de isquemia y los siguientes 5 minutos al período de perfusión del corazón.

### Grupo 1 (Intactos)

Se encontró que en hembras intactas la frecuencia cardiaca se incrementó de manera similar en las ratas del grupo CTRL y del grupo HTG hasta el minuto 6 (CTRL  $301 \pm 66$  vs. HTG  $335 \pm 40$ ). En el minuto 7 en los animales del grupo CTRL se observó un incremento mayor de la frecuencia cardiaca que los del grupo HTG (CTRL  $491 \pm 81$  vs. HTG  $396 \pm 37$ ,  $p < 0.05$ ), (Fig. 5A). Finalmente en el minuto 10, el grupo HTG presentó una mayor frecuencia cardiaca ( $685 \pm 36.8$ ) que el grupo CTRL ( $358 \pm 8$ ) con significancia estadística  $p < 0.05$ .

El patrón de incremento de la frecuencia cardiaca en el minuto 10, en las ratas macho del grupo HTG tendió a ir en aumento ( $549 \pm 22$ ) y el del grupo de animales CTRL tendió a descender ( $355 \pm 37$ ), significativamente  $p < 0.05$  (Fig. 5B).

Entre machos y hembras intactos, la frecuencia cardiaca se elevó más en las últimas, pero sólo para los animales del grupo HTG (hembras  $685 \pm 36.8$  vs. machos  $549 \pm 22$ ,  $p < 0.05$ ). Entre machos y hembras de los grupos CTRL no existió diferencia (hembras  $358 \pm 8$  vs. machos  $355 \pm 37$ ).

### Grupo 2 (castrados)

Respecto al grupo de animales castrados (Grupo2) no se encontró diferencia entre las hembras de los grupos HTG y CTRL, al contrario de lo observado en el grupo de animales intactos. La frecuencia cardiaca de las ratas macho tuvo una tendencia a incrementarse, que no fue diferente entre el grupo CTRL y el grupo HTG.

Cuando se comparó la frecuencia cardiaca entre sexos, el grupo de hembras HTG desarrolló menor frecuencia cardiaca ( $378 \pm 202$ ) que el grupo de machos (HTG  $670 \pm 146$ ) siendo diferente  $p < 0.05$ . Entre los grupos CTRL de hembras y machos no existió diferencia (hembras  $417 \pm 120$  vs machos  $374 \pm 135$ ).

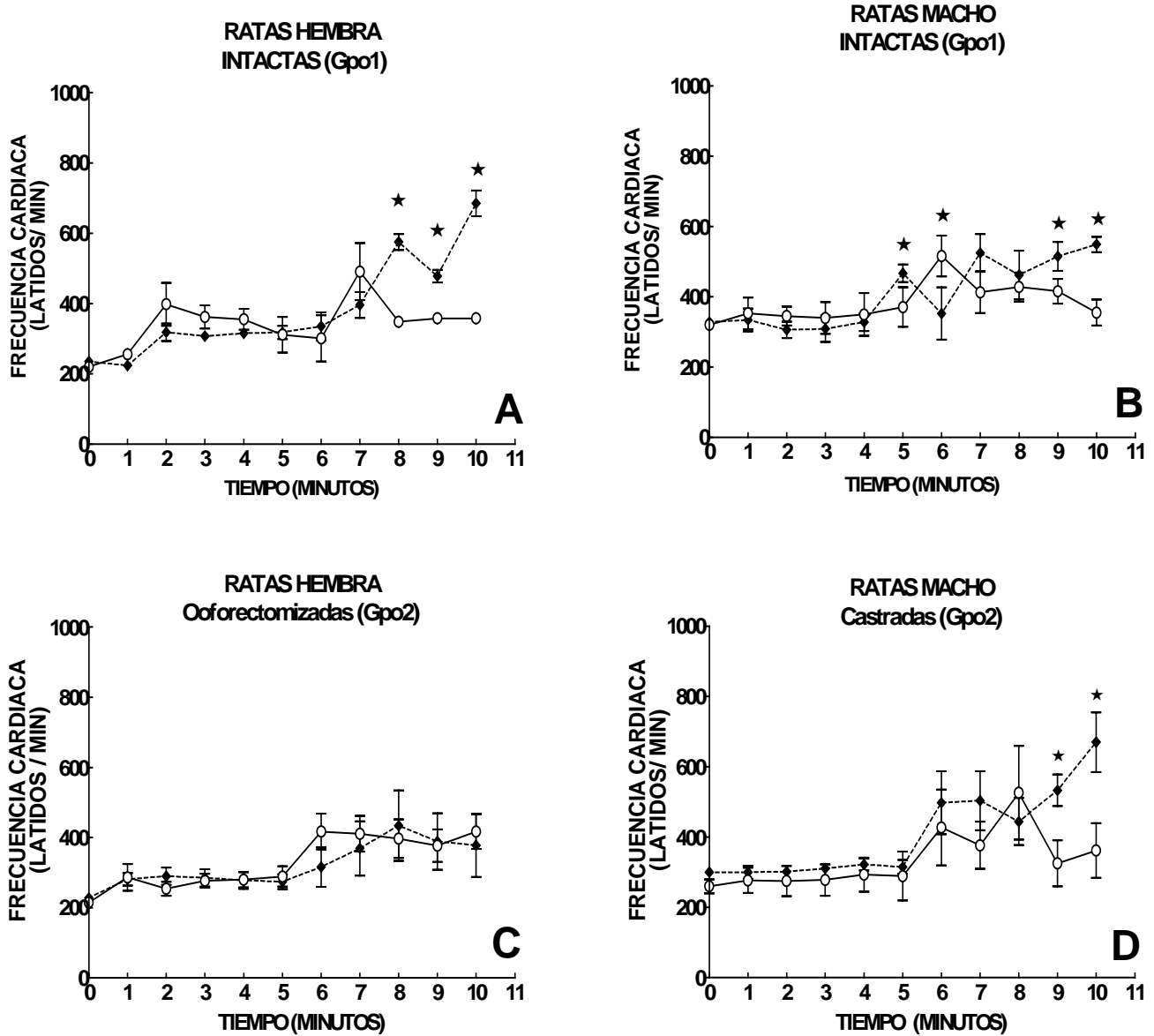


Fig. 5.- En las gráficas A y B se muestra el comportamiento de la frecuencia cardiaca (latidos/min) en los grupos de ratas intactas de machos y hembras CTRL (o) y HTG (♦), en las gráficas C y D se muestra la misma variable evaluada en animales ooforectomizados y castrados, machos y hembras CTRL (o) y HTG (♦); durante el tiempo en que el miocardio estuvo sometido a ischemia-reperfusion. En el tiempo cero se registró el valor normal de la frecuencia cardiaca. ★ Indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ )

### Grupo 3 (Cast + Test y Oofo + Est)

En las ratas hembra de los grupos CTRL y HTG que recibieron estradiol exógeno (270  $\mu\text{g}$  /Kg de peso, mensual), a partir del minuto 6 se produjo de manera muy similar, elevación de la frecuencia cardiaca (HTG  $367 \pm 79$  y CTRL  $404 \pm 92$ ), la cual no fue significativa debido a la dispersión tan grande en los datos (Gpo3, Fig. 6A).

En machos que recibieron testosterona exógena (50  $\mu\text{g}$  /Kg de peso cada dos semanas) (Gpo. 3, Fig. 6B) tanto en el grupo CTRL como en el HTG existió elevación de la frecuencia cardiaca a partir del minuto 7, ambos grupos mantuvieron esta elevación hasta el final del experimento, sin que se encontrara diferencia entre ellos.

Al comparar a los animales machos contra las hembras del grupo 3, no se encontraron diferencias entre los grupos CTRL, ni entre los HTG.

### Grupo 4 (Cast + Est y Oofo + Test)

En la Fig. 6C, se muestra la frecuencia cardiaca en hembras del grupo 4 (Oofo+ Test) donde se aprecia que aun cuando existió elevación a partir del minuto 6 en ambos grupos, el CTRL tuvo valores promedio por debajo del HTG (por ejemplo en el minuto 8, CTRL  $395.36 \pm 84.8$  vs HTG  $541.06 \pm 34.5$ ) excepto en el último punto (minuto 10, CTRL  $454.83 \pm 99.8$  vs. HTG  $418.6 \pm 60.9$ ); no se encontró diferencia entre ellos  $p > 0.05$ .

En el grupo de ratas macho Cast+ Est (Fig. 6D), no se encontró diferencia ( $p > 0.05$ ) entre el grupo CTRL y el HTG, pese a esto la frecuencia cardiaca se elevó de manera más notoria en el grupo HTG ( $517.64 \pm 152.4$  vs CTRL  $393.12 \pm 46.8$ ) a partir del min.7.

En la comparación entre sexos del grupo 4, sólo se encontró diferencia entre los grupos de animales HTG ( $p < 0.05$ ).



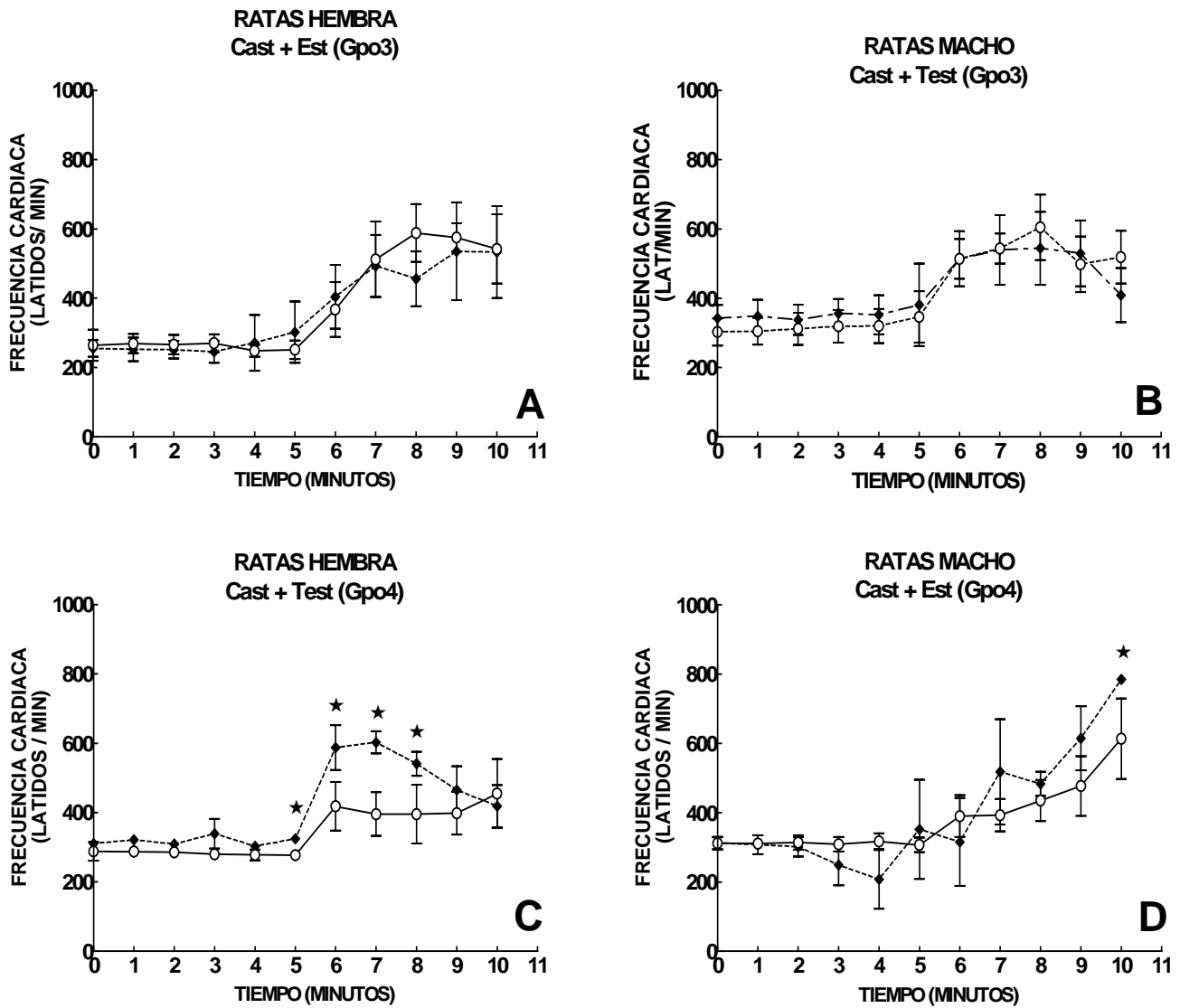


Figura 6.- En las gráficas A y B se muestra la variación en la frecuencia cardiaca en los grupos de ratas hembra ooforectomizadas + Est y macho castrados + Test (Grupo 3), tanto CTRL (o) como HTG (♦) y en C y D se muestra la misma variable evaluada en ratas hembra ooforectomizadas + Test y macho castrados + Est (Grupo 4), tanto en los grupos CTRL (o) como HTG (♦), durante el tiempo en que el miocardio se sometió a isquemia-reperfusión. En el tiempo cero se registró el valor normal de la frecuencia cardiaca.

## INCIDENCIA DE ARRITMIAS

### Taquicardia ventricular (TV)

En el grupo de animales intactos (Grupo 1) las hembras del grupo CTRL fueron las que tuvieron el menor porcentaje de taquicardia ventricular (TV, 66.6%) seguidas por el grupo de machos CTRL (71.42%), en tanto la incidencia del grupo HTG entre machos y hembras estuvo casi al mismo nivel (86% y 83% respectivamente).

En el grupo de ratas gonadectomizadas (Grupo2) fueron los machos del grupo CTRL los que presentaron menor incidencia de taquicardia ventricular (TV, 66%) respecto a todos los demás grupos, en tanto los animales HTG tanto hembras como machos presentaron la misma incidencia de TV (100%).

En las ratas que fueron gonadectomizadas y recibieron las hormonas correspondientes a su sexo (Grupo3), las que menor incidencia de TV tuvieron fueron las hembras HTG con 80%, seguidas por los machos CTRL (85.71%); en tanto que los machos HTG y hembras CTRL, manifestaron el mismo porcentaje de incidencia (100%) de TV.

En el grupo 4 (ratas gonadectomizadas más hormonas del sexo opuesto), los machos y hembras del grupo CTRL mostraron el mismo porcentaje de incidencia de TV (80%). En los grupos de animales HTG la TV se presentó en ambos casos con la misma incidencia (100%).

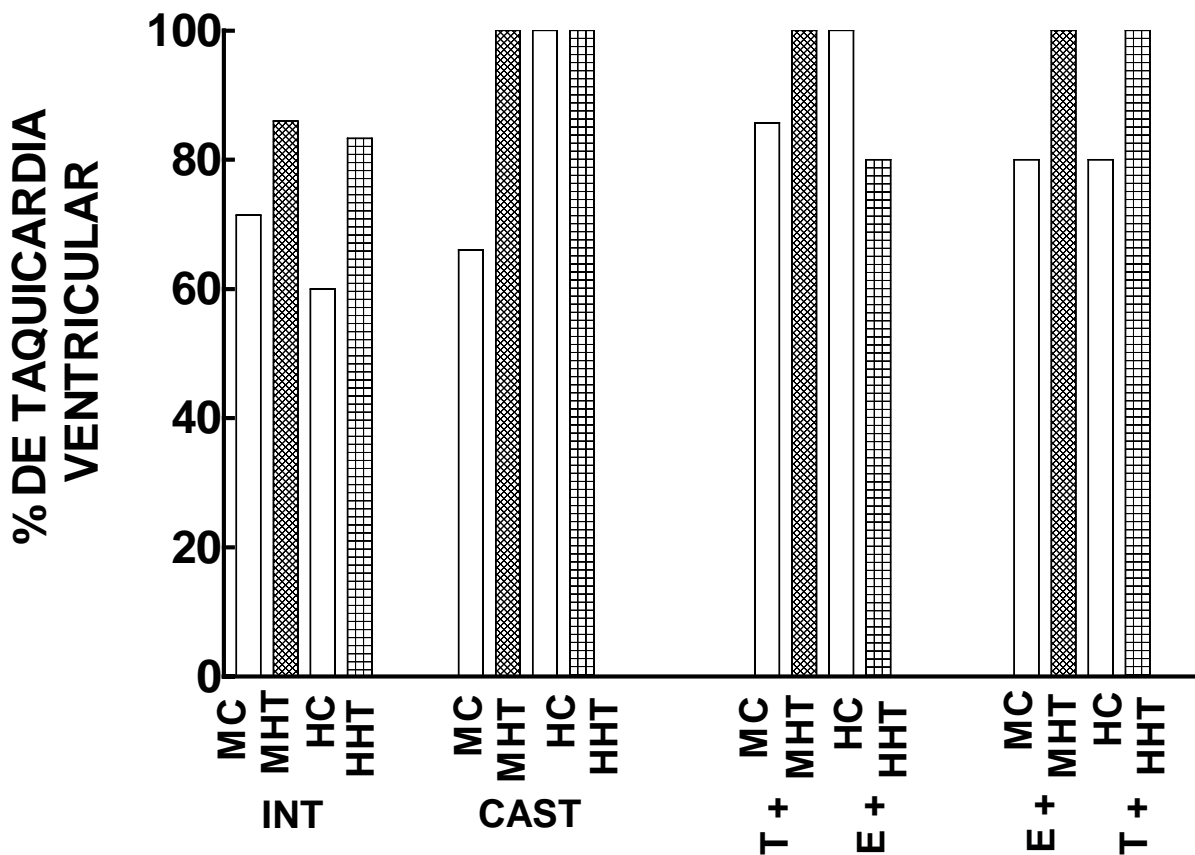


Figura 7.- Se muestra la incidencia de taquicardia ventricular (TV) durante la reperfusion en los diferentes grupos experimentales, en el eje X de izquierda a derecha: intactos, castrados, Oofo + Est y Cast + Test y el último grupo Oofo + Test y Cast + Est.

En todos los casos:

MC machos control	MHT machos HTG	HC hembras control
HHT hembras HTG	INT intactos	CAST castrados
T testosterona	E estradiol	

## Fibrilación ventricular (FV)

En ratas intactas (Gpo1), las hembras del grupo CTRL (Gpo1) no se desarrolló fibrilación ventricular (FV), pero en las hembras HTG hubo un 16.6%. En contraste, los machos CTRL tuvieron incidencia del 57.1% e igual comportamiento se observó en los HTG con el 71.4%.

En el grupo de animales castrados (Grupo 2) la presencia de FV se manifestó en el mismo porcentaje en los grupos de machos CTRL y HTG (50%). En el grupo de hembras Oofo en las del grupo HTG la FV fue 50%, en tanto en el grupo de hembras CTRL se observó una mayor incidencia de FV con 57%.

En aquellos animales que fueron gonadectomizados y recibieron hormonas exógenas (Gpo3), se observó incidencia de FV en 42.8% en el grupo de machos CTRL y en el HTG 28.57, en tanto los grupos de hembras que recibieron Est, tuvieron una incidencia de FV del 40%.

Finalmente, en los animales gonadectomizados y que recibieron hormonas del sexo opuesto, las hembras del grupo CTRL mostraron el menor porcentaje de FV (40%), seguidas por hembras del grupo HTG (60%), en tanto los grupos de ratas macho CTRL y HTG que recibieron Est desarrollaron los niveles más altos de FV de todos los grupos (80% y 100%, respectivamente).

Se anexó una imagen representativa de los diferentes patrones de electrocardiograma obtenidos, para fines ilustrativos (Fig. 8A)

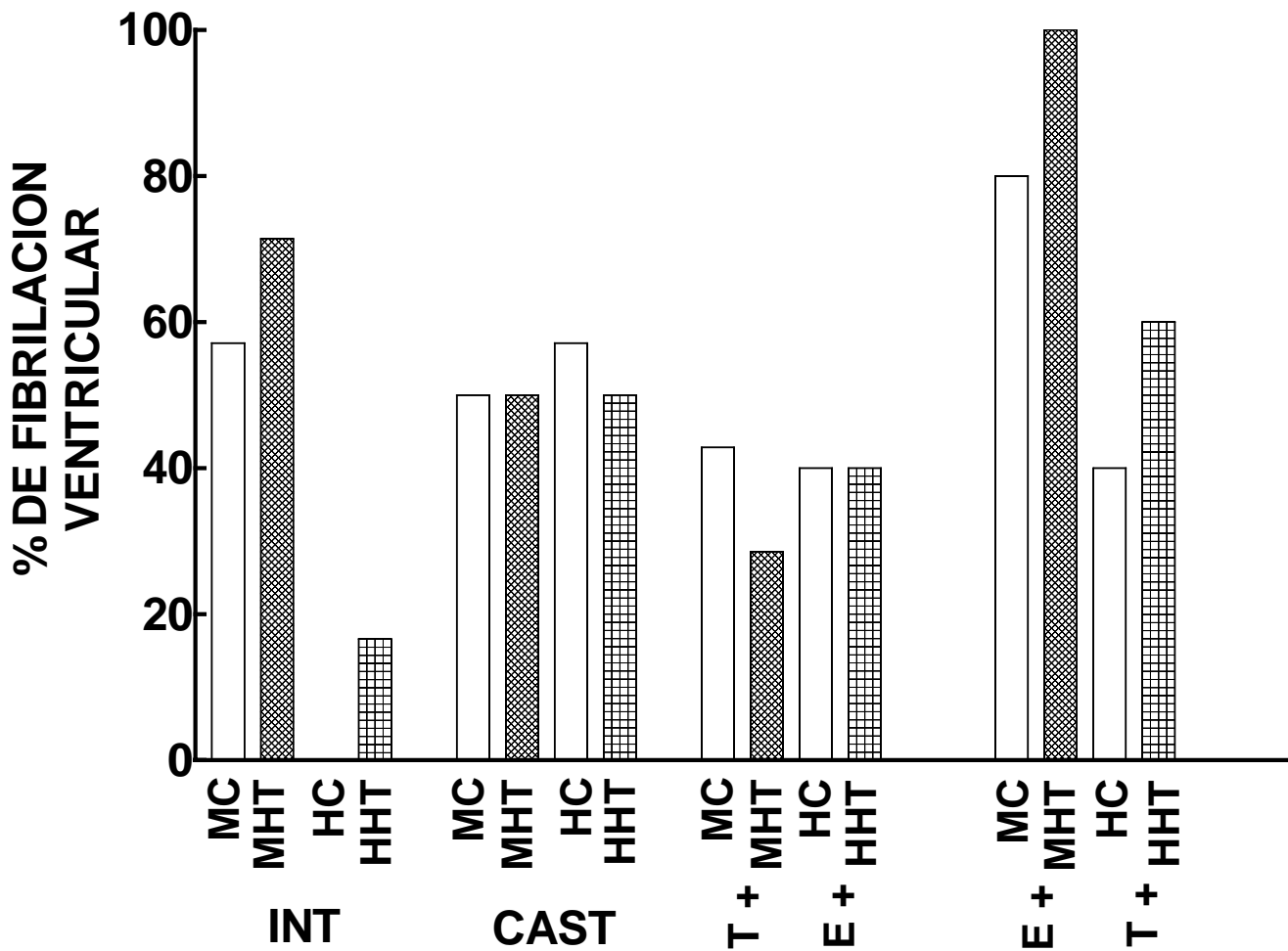


Figura 8.- Se muestra la incidencia de fibrilación ventricular (FV) durante la reperfusion en los diferentes grupos experimentales; en el eje X de izquierda a derecha: intactos, castrados, Oofo + Est y Cast + Test y el último grupo Oofo + Test y Cast + Est.

En todos los casos

MC Machos Control

MHT Machos HTG

HC Hembras Control

HHT

Hembras HTG

INT Intactos

CAST Castrados

T Testosterona

E Estradiol

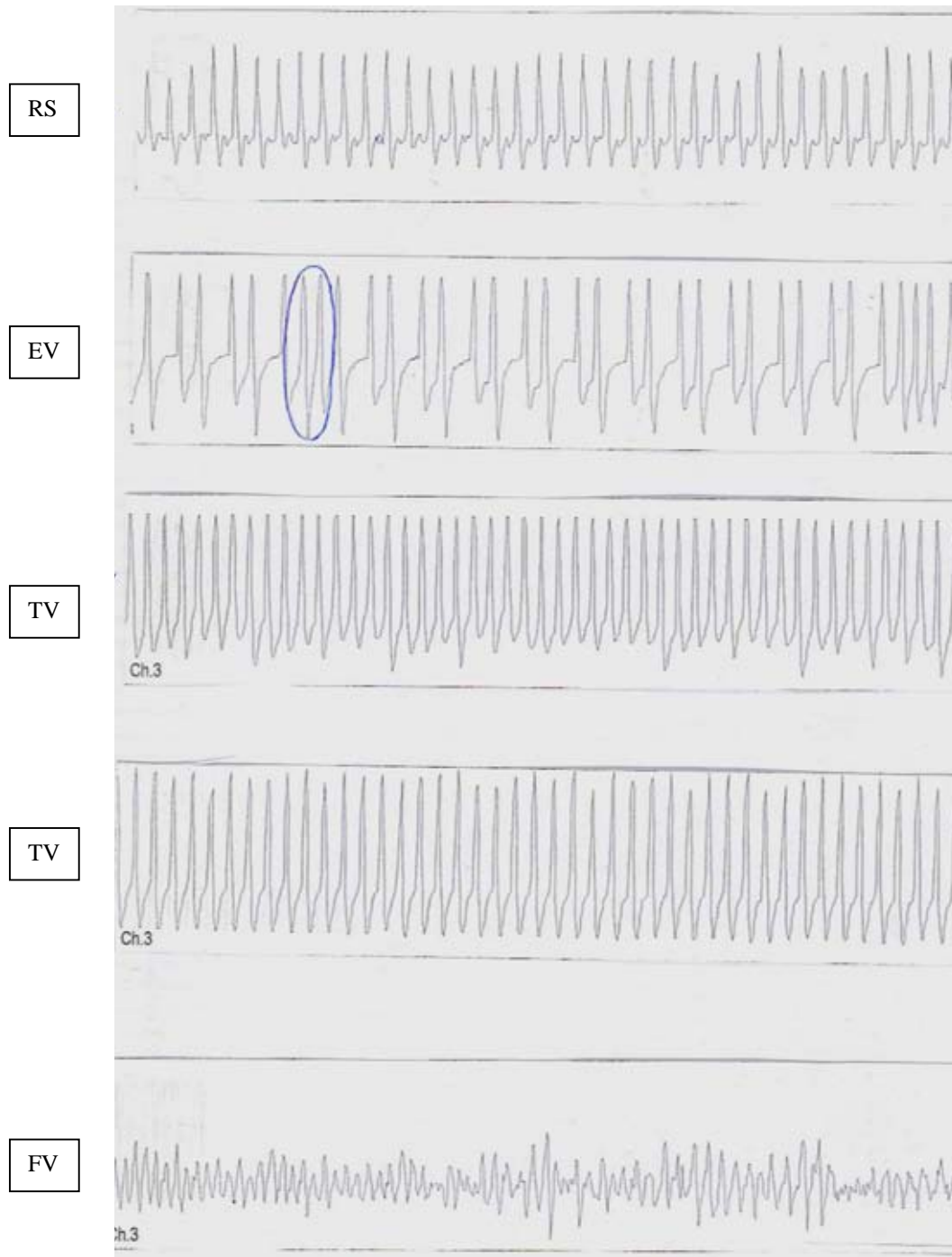


Figura 8A.- Imágenes representativas de los diversos electrocardiogramas obtenidos (de arriba hacia abajo) de ratas hembra Ctrl intactas, ratas hembra HTG intactas, ratas macho HTG Cast, ratas hembra HTG Oofo + Test y ratas macho HTG Cast + Est; en donde:  
 RS: ritmo sinusal            EV: extrasístole ventricular            TV: taquicardia ventricular  
 FV: fibrilación ventricular

## ENZIMAS MARCADORAS DE DAÑO MIOCÁRDICO

### CREATIN KINASA (CK-MB)

#### Intactos

En el grupo de animales macho intactos CTRL se incrementaron los niveles de enzima CK liberada. Sin embargo, al hacer la comparación contra el grupo HTG, no existió diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) (Fig. 9A). En ratas hembra intactas del grupo CTRL (Fig. 9C) se obtuvieron los niveles de CK más bajos ( $425 \pm 176$  UI/L), indicando menor daño en estos corazones. Las hembras del grupo HTG, aún cuando tuvieron niveles más elevados ( $1204 \pm 91$  UI/L) respecto a las hembras del grupo CTRL ( $p > 0.05$ ) éstos no fueron significativos.

Al efectuar la comparación entre sexos, en el grupo de animales intactos HTG, los machos tuvieron valores más elevados ( $1491 \pm 399$  UI/L), pero esta diferencia no fue significativa. Entre los grupos CTRL la diferencia si fue significativa (hembras  $425 \pm 176$  vs. machos  $1857 \pm 422$  UI/L)  $p < 0.05$

#### Castradas (Cast) y Ooforectomizadas (Oofo)

En el grupo de ratas hembra Oofo (Fig. 9D) hubo un incremento (respecto a intactas) en los niveles de CK, tanto en el grupo CTRL ( $p < 0.05$ ) como el HTG ( $p < 0.05$ ), al comparar sólo entre los grupos CTRL y HTG Oofo, no fueron diferentes entre sí. El incremento observado respecto al grupo de intactas indica la pérdida de algún factor protector de origen hormonal, debido a la ooforectomía a que fueron sometidas. En ratas macho (Fig. 9B) no existió cambio significativo en los niveles de CK que pudiera relacionarse con la castración de estos animales. Al efectuar la comparación entre sexos, en el grupo de animales gonadectomizados, aun cuando los valores de CK que se obtuvieron para hembras fueron muy altos (HTG  $2808 \pm 806$  y CTRL  $3026 \pm 724$  UI/L), también las desviaciones lo fueron, de tal forma que no hubo diferencia estadística entre los grupos HTG y CTRL.

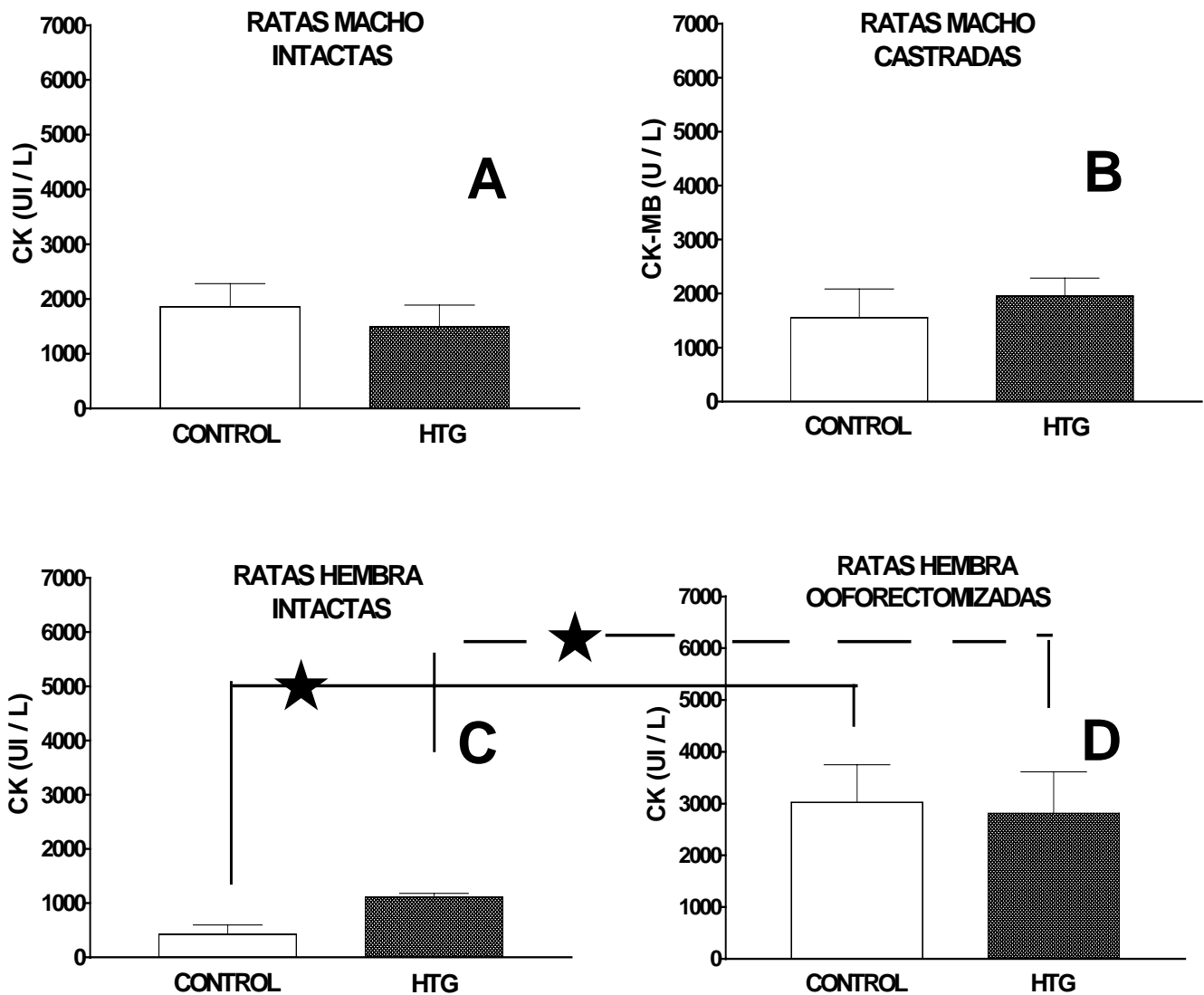


Fig. 9.- Se muestran los niveles de actividad de creatin cinasa (CK) medidos en suero, de ratas macho y ratas hembra tanto intactas, como gonadectomizadas sometidas a isquemia-reperfusión. La unidad internacional (UI/L) se define como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de un micromol de sustrato por minuto. ★Indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ )



## NIVELES DE CREATIN CINASA (CK)

### Cast + Test y Oofo + Est

En ratas macho del grupo HTG (Cast + Test, Fig. 10A) se encontraron mayores niveles de CK ( $2301 \pm 1178$  UI/L) liberada que en los animales del grupo CTRL ( $1598 \pm 365$  UI/L), sin embargo, el error estándar fue grande y no se obtuvo diferencia estadística entre ellos.

Los grupos de hembras CTRL y HTG (Oofo + Est, Fig. 10C) mostraron niveles similares de CK (CTRL  $2408.55 \pm 911$  vs. HTG  $2630 \pm 664$  UI/L).

Cuando se hizo la comparación entre sexos, no se encontró diferencia entre ninguno de los grupos.

### Cast+ Est y Oofo + Test

No se encontró diferencia significativa ( $p > 0.05$ ) entre los grupos de hembras CTRL y HTG (CTRL  $3810 \pm 1007$  vs. HTG  $5135 \pm 957$  UI/L) (Fig. 10D). En las ratas macho de este mismo grupo (Fig. 10B) los niveles de CK fueron más altos en el grupo HTG ( $3586 \pm 1079$  UI/L) que en los del grupo CTRL ( $1296 \pm 339$  UI/L)  $p < 0.05$ .

Al comparar entre los dos sexos del grupo 4 no se encontró diferencia entre los animales HTG pero sí entre CTRL ( $p < 0.05$ )

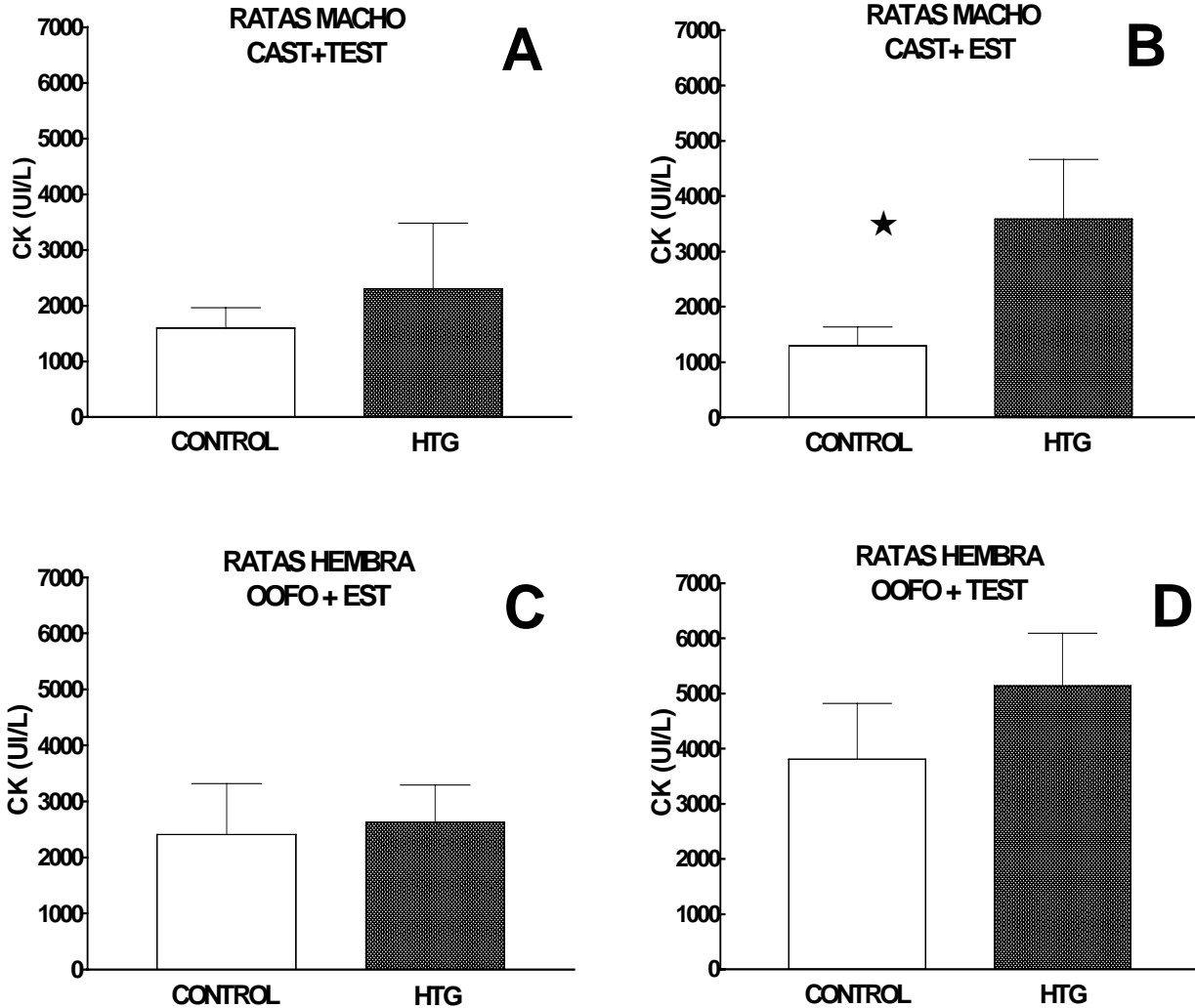


Figura 10.- Niveles de actividad de creatin cinasa (CK) medidos en suero, de ratas macho y ratas hembra, tanto aquellos que recibieron las hormonas correspondientes a su sexo (Oofo + Est y Cast + Test) como aquellos que recibieron las hormonas correspondientes al sexo opuesto (Oofo + Test y Cast + Est) y posteriormente fueron sometidos a la maniobra de ischemia-reperfusion. La UI/L, unidad internacional se define como la cantidad de enzima que cataliza la transformaci3n de un micromol de sustrato por minuto. ★ Indica diferencia significativa (p<0.05).

## LACTATO DESHIDROGENASA (LDH)

### Intactos

Los niveles de LDH para el grupo de animales macho intactos (Fig. 11A), no difirieron significativamente entre los grupos HTG ( $257 \pm 80$  UI/L) y CTRL ( $136 \pm 26$  UI/L), aún cuando en el grupo HTG tendió a ser mayor.

Las ratas hembra de este mismo grupo (Fig. 11C) no presentaron diferencia (CTRL  $184 \pm 119$  y HTG  $223 \pm 98.6$  UI/L).

Cuando se hizo la comparación entre los dos sexos no se encontraron diferencias significativas para los grupos HTG (hembras  $223 \pm 98.6$  UI/L vs. machos  $257 \pm 80$  UI/L) ni para los grupos CTRL (hembras  $184 \pm 119$  y machos  $136 \pm 26$  UI/L) ( $p > 0.05$ ).

### Grupo 2 (Cast y Oofo)

En machos castrados (Fig. 11B), sólo existió un ligero incremento para el grupo de los HTG ( $342 \pm 65$  vs. CTRL  $179 \pm 24$  UI/L), sin que éste tuviera significancia estadística ( $p > 0.05$ ).

Respecto a las ratas hembra Oofo (Fig. 11D), no se encontró diferencia entre los grupos HTG ( $490 \pm 81$  UI/L) y CTRL ( $321 \pm 110$  UI/L) ( $p > 0.05$ ).

En el análisis estadístico de comparación entre los dos sexos no se encontró diferencia.

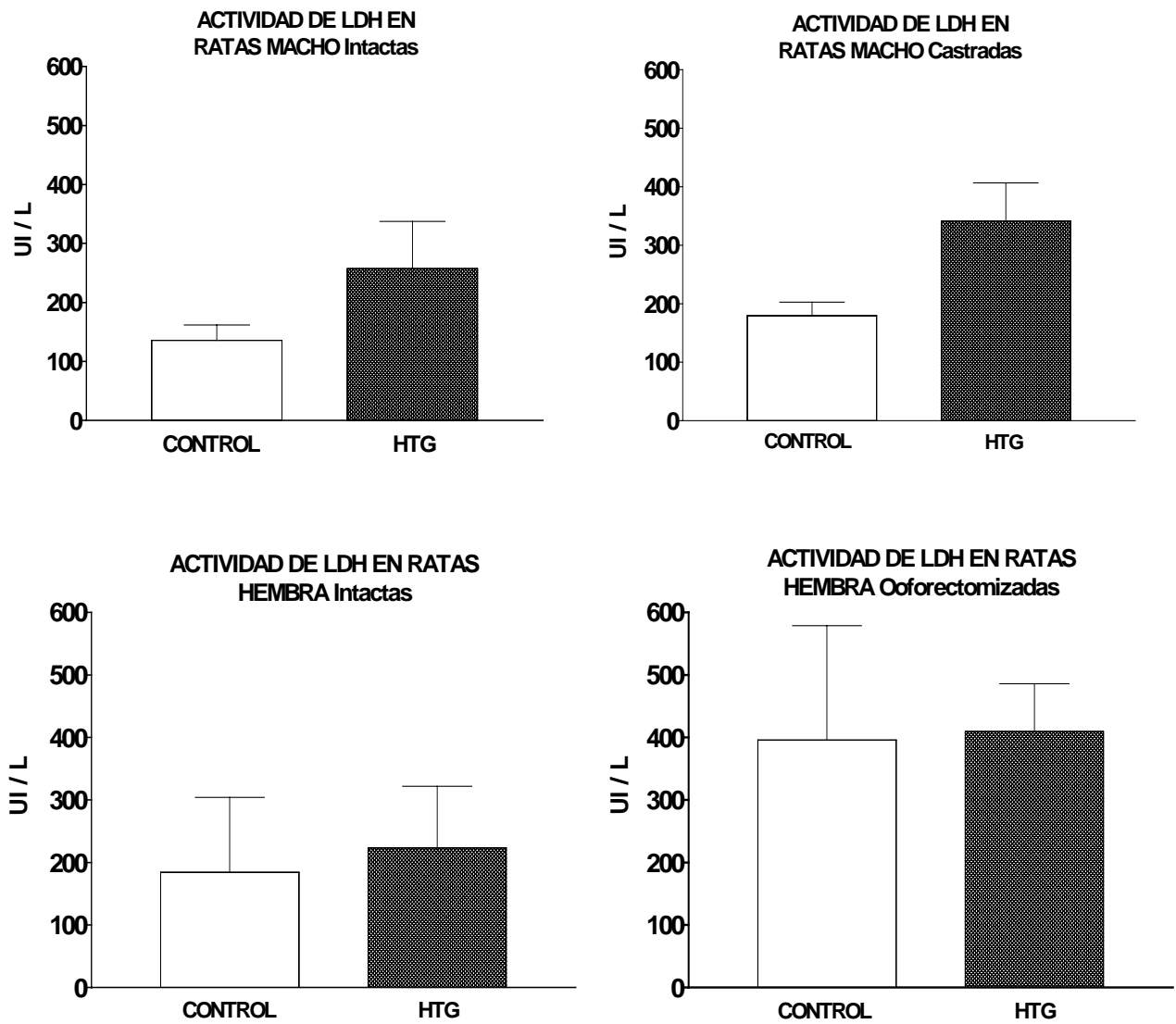


Figura 11.- Actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) en suero, de ratas macho y ratas hembra intactas y de ratas macho Cast y ratas hembra Oofo. Se presentan los niveles de animales del grupo CTRL y del grupo HTG, después de ser sometidos a la maniobra de isquemia-reperfusión. UI/L, cantidad de enzima que cataliza la transformación de un micromol de sustrato por minuto.

## LACTATO DESHIDROGENASA (LDH)

### Grupo 3 (Cast + Test y Oofo + Est)

El grupo de ratas macho que recibió Test exógena (grupo 3, Fig. 12A), no presentó diferencias en los niveles de LDH liberada, entre los grupos CTRL ( $143 \pm 34$  UI/L) y HTG ( $337 \pm 105$  UI/L) ( $p > 0.05$ ).

En las ratas hembra de los grupos CTRL ( $149 \pm 48$  UI/L) y HTG ( $285 \pm 117$  UI/L) (Fig. 12C) tampoco hubo diferencias en los niveles de LDH ( $p > 0.05$ ).

Al efectuar la comparación entre los dos sexos, no se encontró diferencia (CTRL, hembras  $149 \pm 48$  vs. machos  $143 \pm 34$  UI/L; HTG hembras  $285 \pm 117$  vs machos  $337 \pm 105$  UI/L)  $p > 0.05$ .

### Grupo 4 (Cast + Est y Oofo + Test)

Entre las ratas macho de los grupos CTRL ( $320 \pm 52$ ) y HTG ( $374 \pm 96$ ) castrados y tratados con estrógenos ( $270 \mu\text{g/Kg}$  de peso de forma mensual) (grupo 4, Fig. 12B) no se encontró diferencia significativa. Tampoco hubo diferencia significativa entre las ratas hembra de los grupos HTG ( $467 \pm 31$ ) y CTRL ( $336 \pm 55$ ) Oofo + Test ( $50 \mu\text{g/Kg}$  de peso cada 2 semanas) (grupo 4, Fig. 12D).

Cuando se compararon los grupos de ratas macho y hembra no se encontró diferencia entre ellos.

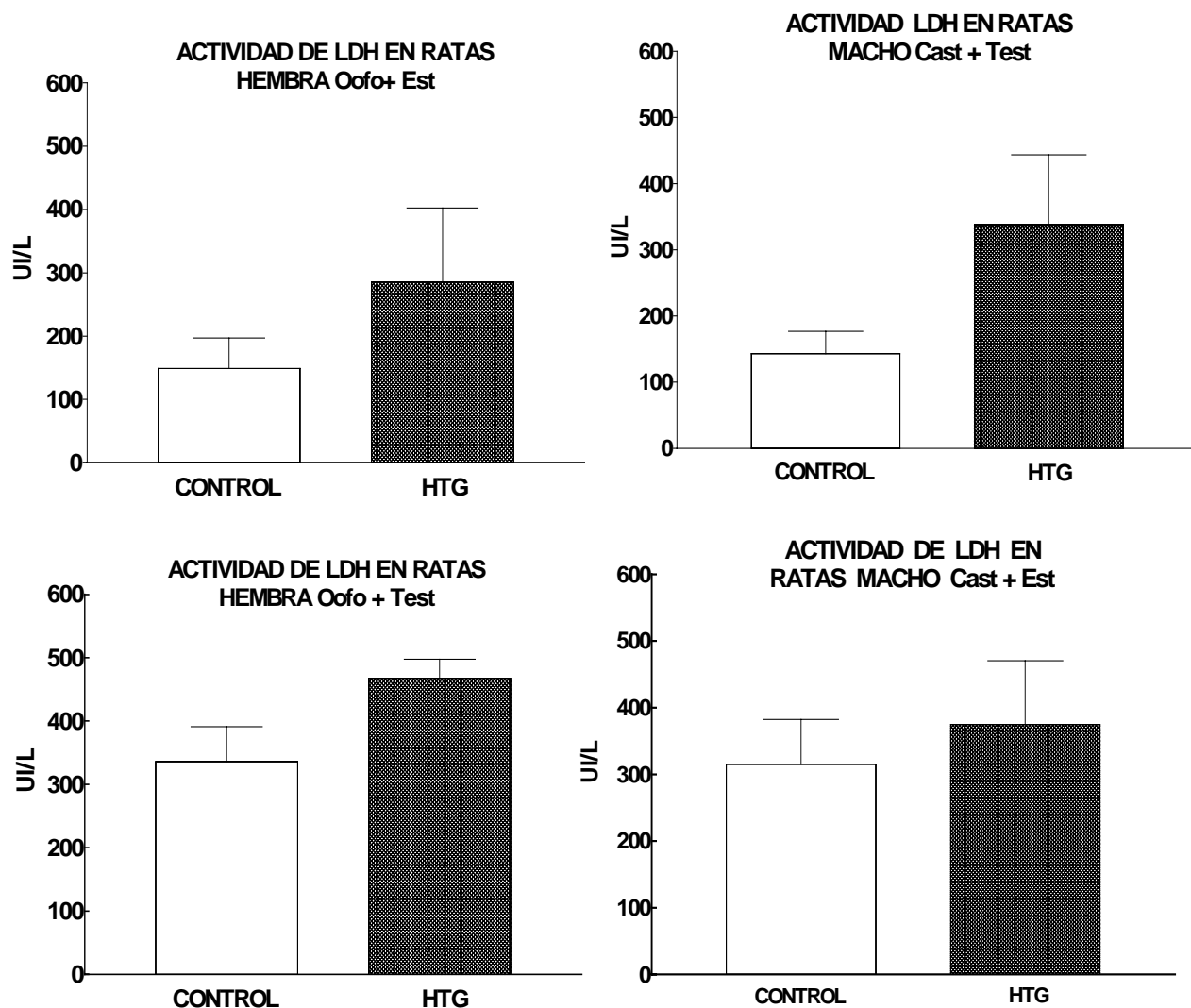


Figura 12.- Se exponen los niveles de actividad de lactato deshidrogenasa (LDH) medidos en suero, provenientes de ratas macho Cast + Test y de ratas hembra Oofo + Est y de ratas macho Cast + Est y ratas hembra Oofo + Test. Se presentan los niveles de animales del grupo CTRL y del grupo HTG, después de ser sometidos a la maniobra de isquemia-reperfusión. UI/L, una unidad internacional se define como la cantidad de enzima que cataliza la transformación de un micromol de substrato por minuto.

## GRASA RETROPERITONEAL

### Ratas hembra

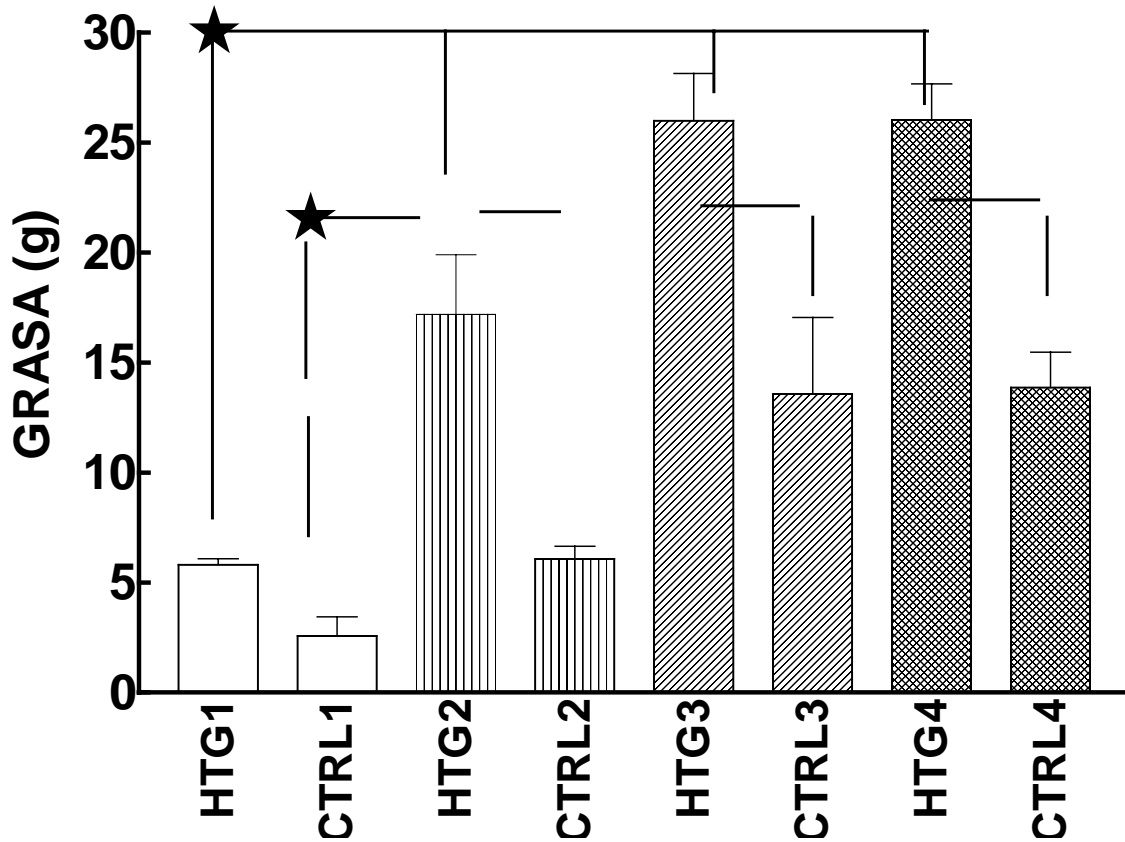
En las ratas hembra intactas de los grupos CTRL y HTG (grupo 1) se encontraron las menores cantidades de grasa retroperitoneal (CTRL  $3.22 \pm 1.14\text{g}$  y HTG  $5.26 \pm 0.20\text{g}$ ), entre ellas no hubo diferencia significativa.

El grupo de animales HTG Oofo acumuló mayor cantidad de grasa retroperitoneal ( $17.18 \pm 2.70\text{g}$ ), que los animales CTRL ( $5.77 \pm 0.57$ ), lo cual fue estadísticamente significativo ( $p < 0.05$ ).

Las ratas HTG del grupo 3 tuvieron un acúmulo de grasa mayor que en los dos primeros grupos experimentales (intactas HTG  $5.26 \pm 0.0.20\text{g}$  y CTRL  $3.22 \pm 1.14$ ; Oofo, HTG  $17.18 \pm 2.70\text{g}$  y CTRL  $5.77 \pm 0.57\text{g}$ ) sin embargo, de igual manera que en los casos anteriores, en los animales del grupo HTG hubo mayor incremento en la grasa retroperitoneal ( $25.98 \pm 2.78\text{g}$ ) que en el grupo de animales CTRL ( $13.13 \pm 4.56\text{g}$ )  $p < 0.05$ .

Los animales HTG del grupo 4 también tuvieron mayor incremento de grasa retroperitoneal ( $26.03 \pm 1.63\text{g}$ ) que los CTRL ( $13.86 \pm 1.59\text{g}$ )  $p < 0.05$ . Se encontró semejanza con los valores de las ratas del grupo 3 (grupo 3 HTG  $25.98 \pm 2.78\text{g}$  y CTRL  $13.13 \pm 4.56\text{g}$ ).

## GRASA RETROPERITONEAL RATAS HEMBRA



HTG1: HTG intactas

HTG2: HTG ooforectomizadas

HTG3: HTG + ooforectomizadas

HTG4: HTG + oofo +T

CTRL1: control intactas

CTRL2: control ooforectomizadas

CTRL3: control +oofo +E

CTRL4: control +oofo +T

Figura 13.- Acúmulo de grasa retroperitoneal de ratas hembra de cada grupo, al final del periodo experimental (5 meses). ★Indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).



## Ratas macho

En el grupo de ratas macho intactas HTG se encontró mayor incremento en grasa retroperitoneal ( $35.61 \pm 4.14\text{g}$ ) que en los animales del grupo CTRL ( $15.26 \pm 0.82\text{g}$ )  $p < 0.05$ .

En las ratas macho castradas HTG se encontró mayor cantidad de grasa retroperitoneal ( $22.69 \pm 3.64\text{g}$ ) que en los animales CTRL ( $8.76 \pm 1.60\text{g}$ ) del mismo grupo ( $p < 0.05$ ), pero menor que en los animales HTG y CTRL intactos (HTG: intactos,  $35.61 \pm 4.14\text{g}$  vs. castradas,  $22.69 \pm 3.64\text{g}$  y grupos CTRL: intactos,  $15.26 \pm 0.82\text{g}$  vs. castradas,  $8.76 \pm 1.60\text{g}$ ).

La grasa retroperitoneal acumulada en las ratas del grupo 3 (castrados + testosterona), fue mayor en el grupo HTG ( $18.50 \pm 2.94\text{g}$ ) que en el grupo CTRL ( $10.26 \pm 1.36\text{g}$ ), la diferencia fue significativa ( $p < 0.05$ ).

En las ratas del grupo 4 (Cast + Est) la acumulación de grasa tuvo un patrón similar al observado en los otros dos grupos, fue mayor en los animales HTG ( $22.91 \pm 4.54\text{g}$ ) y menor en los animales CTRL ( $2.50 \pm 0.62\text{g}$ ), siendo estadísticamente diferentes ( $p < 0.05$ ).

De todos los grupos experimentales, se encontró que los animales del grupo HTG intactos tuvieron la mayor cantidad de grasa retroperitoneal ( $35.61 \pm 4.14\text{g}$ ); en tanto que en los animales del grupo CTRL se mantuvo por debajo de los niveles de los animales HTG (CTRL grupo1;  $15.26 \pm 0.82$ ; grupo 2,  $8.76 \pm 1.60\text{g}$ ; grupo 3,  $10.26 \pm 1.36\text{g}$ ; grupo 4,  $2.50 \pm 0.62\text{g}$ ).

## GRASA RETROPERITONEAL MACHOS

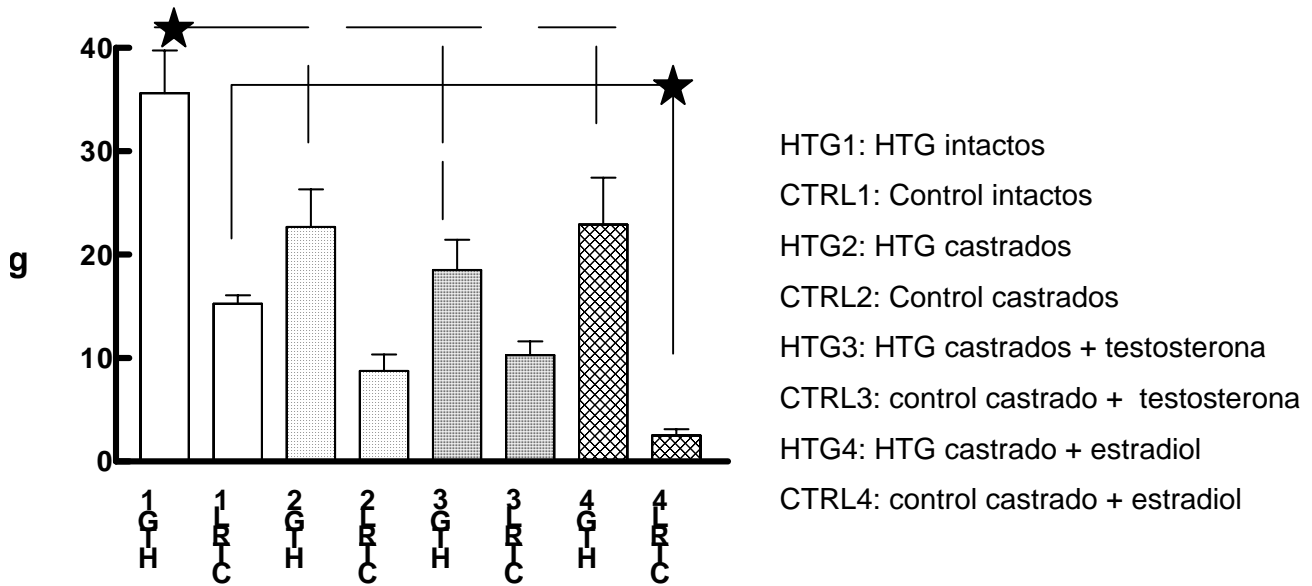


Figura 14.- Acúmulo de grasa retroperitoneal proveniente de ratas macho de cada grupo al final del periodo experimental (5 meses). ★ Indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

## ASPECTO MACROSCOPICO DEL UTERO

En las fotografías que muestran los úteros se observa que los más grandes fueron los provenientes de animales intactos, tanto HTG como CTRL, pero entre ellos existieron diferencias, fue notorio el mayor grosor de cada cuerno uterino en el grupo CTRL, el color rosado era más intenso y al tacto eran turgentes. Los úteros de los animales del grupo HTG, aún cuando tuvieron mayor longitud, el color fue más pálido en ambos cuernos y no eran tan firmes como los úteros de los animales CTRL. Además se observó que el tamaño de los ovarios era ligeramente menor en los úteros de ratas HTG. En las ratas Oofo, hubo mínimas diferencias entre los úteros provenientes de los grupos CTRL y HTG, ambos mostraron el mismo tamaño (CTRL 4.2cm. vs. HTG 4.2cm) y al tacto la consistencia fue la misma, flácida. En comparación con el grupo de ratas intactas tuvieron un menor tamaño, color y peso, lo cual indicó cierto grado de atrofia.

En los úteros de las ratas Oofo + Est, existió tendencia a la recuperación en el tamaño y el peso, aún cuando la turgencia no se recuperó del todo y en este caso fueron los úteros del grupo CTRL los que presentaron mayor longitud. Respecto a los úteros del grupo de animales intactos, tuvieron un menor peso (intactas: HTG 0.8g y CTRL 0.83g vs. Oofo + Est: HTG 0.50g y CTRL 0.62g), fueron menores en tamaño (Oofo + Est: HTG 6.5cm y CTRL 7.0cm vs. intactas: HTG 7.3cm y CTRL 6.6cm), además de la palidez que presentaron.

Los úteros de las ratas Oofo + Test tuvieron el mayor grado de atrofia, las paredes de los cuernos uterinos eran extremadamente delgadas y carentes por completo del color observado en el grupo de ratas intactas, en el peso no se encontró diferencia entre el grupo CTRL (0.052g) y el HTG (0.050g); aunque respecto a todos los otros grupos sí existieron diferencias en tamaño aún cuando fueron similares a los úteros de las ratas Oofo (Oofo + Test: HTG 4.1cm y CTRL 4.2cm vs. Oofo: CTRL 4.2cm. vs. HTG 4.2cm), presentaron atrofia más severa; al tacto su consistencia era mucoide.

## ASPECTO MACROSCÓPICO DEL ÚTERO

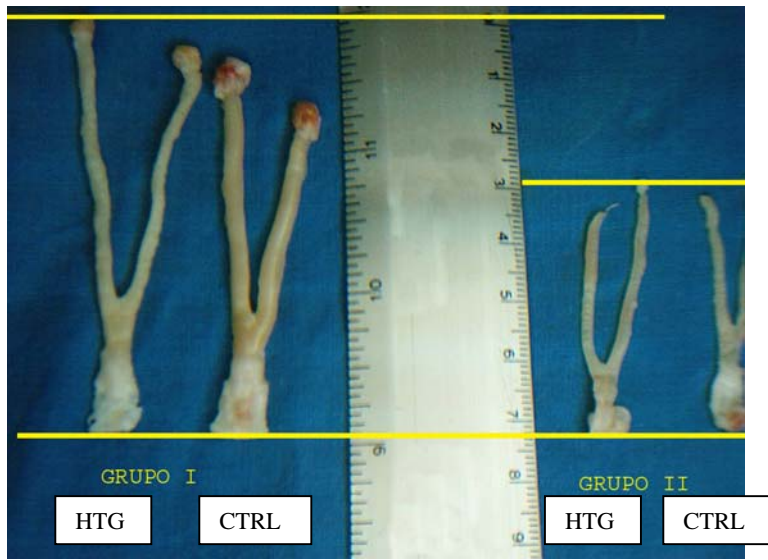
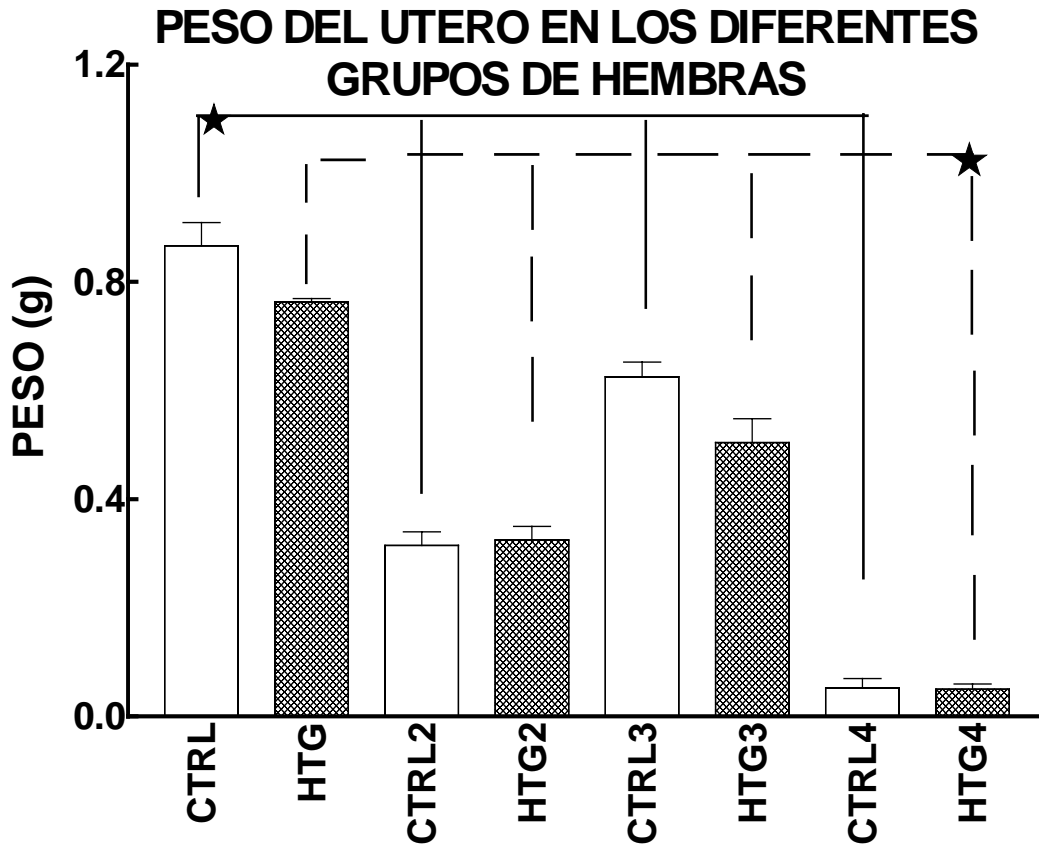


Figura 15.- Se muestran los úteros de hembras de cada uno de los grupos experimentales, tanto HTG como CTRL; fotografía superior de izquierda a derecha Intactos y Ooforectomizados, fotografía inferior de izquierda a derecha Ooforectomizados + Estradiol y Ooforectomizados + Testosterona.

## PESO DEL ÚTERO

Los úteros de animales intactos tuvieron mayor peso, tanto del grupo CTRL (0.83g) como HTG (0.8g), les siguieron los úteros de ratas que recibieron Est (HTG 0.50g y CTRL 0.62g), después los úteros de animales Oofo (HTG 0.325g y CTRL 0.315g) y finalmente con el peso más bajo, los úteros de los animales que recibieron cíclicamente Test (270 µg/Kg de peso mensualmente); se encontró significancia en estas diferencias



Donde:

HTG: HTG Intactas

HTG2: HTG Ooforectomizadas (Oofo)

HTG3: HTG Oofo + Estradiol

HTG4: HTG Oofo + Testosterona

CTRL: Intactas Control

CTRL2: ooforectomizadas Control

CTRL3: Oofo Control+ Estradiol

CTRL4: Oofo Control +Testosterona

Figura 16.- Se muestra el promedio de los pesos de los úteros obtenidos de los grupos de hembras, al final del periodo experimental (5 meses). ★Indica diferencia significativa ( $p < 0.05$ ).

## FROTIS VAGINAL

Las imágenes mostraron, en el caso de las ratas intactas, tanto en frotis de animales CTRL como HTG, la presencia de células escamosas y basales, las cuales indicaban la presencia de estrógenos, y por tanto función ovárica. Cuando se hizo la cuantificación de células, el valor de maduración (M.V.) para el grupo de animales HTG fue de 90, en tanto el grupo de animales CTRL tuvo M.V. de 80. Cabe señalar que estos valores de maduración fueron los más altos dentro de los cuatro grupos experimentales.

En las ratas que recibieron estradiol exógeno también fue posible apreciar en los frotis provenientes de ambos grupos (HTG y CTRL), células escamosas y basales pero en menor cantidad a lo observado en el grupo de intactas, la diferencia entre los grupos CTRL y HTG fue que para el primero abundaban más las células basales que las escamosas (M.V.20) y en HTG hubo mayoría de células escamosas (M.V.30). La presencia de estas células indicó el efecto de los estrógenos exógenos.

En los frotis de las ratas ooforectomizadas sólo pudo apreciarse la presencia de moco y células, que no fue posible identificar por la atrofia que presentaron, sin embargo, podrían corresponder a células epiteliales, dado que los otros tipos celulares requieren estradiol para su desarrollo, el M.V. en éste caso fue de 0.

En el grupo de animales ooforectomizados que recibió testosterona, tanto el moco como las células, fueron aún más escasos de lo que se había observado en el grupo Oofo, tanto para las ratas HTG como las ratas CTRL, lo cual reflejó la atrofia severa de estos úteros.

INTACTAS

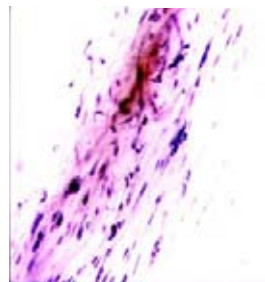


HTG

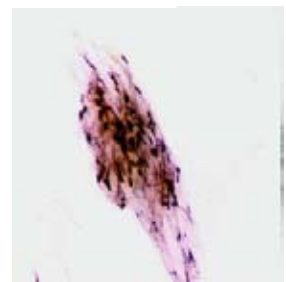


CONTROL

OOFORECTOMIZADAS



HTG

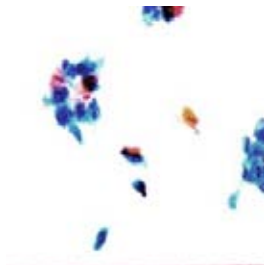


CONTROL

OOFORECTOMIZADAS + ESTRADIOL

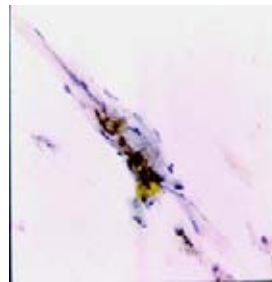


HTG

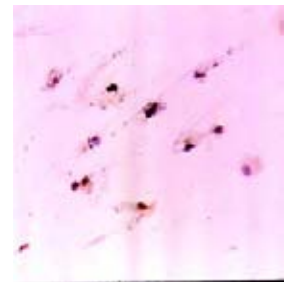


CONTROL

OOFORECTOMIZADAS + TESTOSTERONA



HTG



CONTROL

Figura 17.- Imágenes de los frotis vaginales obtenidos de las ratas hembra pertenecientes a cada grupo experimental, de arriba hacia abajo y de izquierda a derecha: Intactas en fase de Estro, Ooforectomizadas con atrofia simple con células de reserva, Ooforectomizadas+Est en fase de Proestro y Ooforectomizadas + Test con atrofia simple y células parabasales. Fotografías tomadas a 40X

## CONCENTRACIÓN DE HORMONAS SEXUALES AL FINAL DEL PERIODO EXPERIMENTAL EN RATAS HEMBRA

La concentración de Est en los grupos de ratas CTRL fue significativamente menor ( $p=0.01$ ) que la encontrada en los grupos de animales HTG. Para el grupo de Ooforectomizadas tanto las CTRL como las HTG tuvieron valores por debajo de los niveles detectables a través de la técnica empleada.

En el grupo que recibió Test, la concentración de estradiol fue mayor para las HTG presentando diferencia respecto a su grupo CTRL ( $p<0.001$ ). Respecto al grupo de hembras Oofo + Est también existió diferencia entre CTRL y HTG ( $p<0.001$ ); y adicionalmente se encontró diferencia respecto al grupo de ooforectomizadas ( $p<0.001$ ).

En los niveles de testosterona detectados, las ratas CTRL intactas y Oofo + Test CTRL presentaron mayor concentración con significancia estadística respecto a las HTG ( $p 0.01$ )

TABLA 3

GRUPOS	ESTRADIOL (pg/ml)	TESTOSTERONA (ng/ml)
Ratas HEMBRA		
Intactas Ctrl	3.190± 2.0244	0.0370±0.007*
Intactas HTG	9.526± 3.824	0.0170±0.0012
Oofo Ctrl	<0.001	<0.001
Oofo HTG	<0.001	<0.001
Oofo + Est Ctrl	2.386±1.332*	<0.001
Oofo + Est HTG	10.25±4.302	<0.001
Oofo + Test Ctrl	2.665±0.3547*	0.0214±0.004*
Oofo + Test HTG	4.038±0.1763	0.0180±0.001

Estradiol      \*Oofo + Est, Ctrl vs HTG p 0.01  
                   \* Oofo + Test, Ctrl vs HTG p 0.01

Testosterona   \*Intactas, Ctrl vs HTG p 0.01  
                   \*Oofo + Test, Ctrl vs HTG p 0.01



## CONCENTRACIÓN DE HORMONAS SEXUALES AL FINAL DEL PERIODO EXPERIMENTAL EN RATAS MACHO

Los niveles de Test detectados en el grupo de intactos Ctrl fueron mayores en comparación a su respectivo grupo HTG, esto tuvo diferencia significativa ( $p < 0.001$ ), en tanto para los grupos de Cast y Cast + Est no fue posible detectar los niveles de testosteron a través de la metodología empleada.

En el grupo de Cast+ Test, nuevamente se pudo observar que el grupo CTRL tuvo los niveles mas altos que el grupo HTG, alcanzando significancia estadística ( $p 0.001$ ).

Respecto a las concentraciones de Est, los menores niveles se encontraron en el grupo de Cast + Test donde no fue posible detectarlos, éste grupo fue seguido por el de animales intactos, en los cuales se encontró un mayor nivel en los pertenecientes al grupo CTRL ( $p 0.001$ )

En el grupo de castrados se encontró un aumento importante respecto al grupo de intactos ( $p 0.01$ ) pero entre CTRL y HTG no hubo diferencia con significancia estadística. Finalmente en el grupo de Cast + Est fue donde mayores niveles de Est pudieron detectarse sin embargo las desviaciones obtenidas fueron grandes y no se encontró diferencia entre ellos.

TABLA 4

GRUPOS	TESTOSTERONA	ESTRADIOL
Ratas MACHO	(ng/ml)	(pg/ml)
Ctrl Intactos	8.060±0.091*	0.758±0.042*
HTG Intactos	1.273±0.1365	0.5680±0.024
Ctrl Cast	<0.001	35.49±0.39
HTG Cast	<0.001	33.72±0.37
Ctrl Cast + Test	0.6945±0.004*	<0.001
HTG Cast + Test	0.2955±0.002	<0.001
Ctrl Cast + Est	<0.001	56.06±18.083
HTG Cast + Est	<0.001	81.85±29.79

Testosterona \* Intactos, CTRL vs HTG  $p < 0.001$

\* Cast + Test, CTRL vs HTG  $p < 0.001$

Estradiol \* Intactos, CTRL vs HTG  $p 0.001$

## DISCUSIÓN

El objetivo de este trabajo fue elucidar el posible papel modulador de las hormonas sexuales en ratas normales e hipertriglicéridémicas (HTG), sobre la función cardíaca, particularmente en condiciones de estrés por isquemia y reperfusión, con diferentes estados hormonales provocados por la remoción de las gónadas y la administración de hormonas exógenas.

### PESO CORPORAL

En las ratas macho intactas (CTRL y HTG) los pesos fueron los más elevados de todos los grupos experimentales, mientras que el grupo de animales Cast disminuyó de peso, lo cual probablemente se debió a la carencia de testosterona puesto que tiene un papel importante en el desarrollo muscular. Borg y col demostraron en ratas que la castración producía después de 6 horas la desaparición de Test del tejido graso, sin embargo, los niveles de ésteres de ácidos grasos decaían a las 48 horas y se les podía detectar sólo durante los siguientes 10 días después de la castración (Borg et al, 1995). Otros investigadores han reportado disminución en el peso de ratas macho posterior a la castración (Gauthaman et al, 2002). En cambio en este estudio las ratas macho Cast + Est se registraron pesos aún más bajos, esto se relaciona con la presencia de Est, que favorece pérdida de peso a través de la estimulación de lipólisis (Tchernof et al; 1998).

En ratas hembra Oofo se observó aumento de peso, aunque fue mayor para el grupo HTG; en la literatura existen datos que evidencian que con la remoción de los ovarios se observa obesidad en roedores y mujeres postmenopáusicas (Kamei et al 2005) debido a la disminución de factores de transcripción importantes para la lipogénesis y en las enzimas que participan en la beta oxidación (acil coenzima A deshidrogenasa y acetil CoA oxidasa) (Vasconcellos et al, 2004). En el grupo de ratas hembra Oofo + Est también hubo modificación del peso corporal; la dosis de Est administrada fue baja (respecto a las utilizadas en otros trabajos) y crónica. Se seleccionó este esquema porque con éste se han observado efectos benéficos sobre nuestro modelo de rata hipertriglicéridémica en la acumulación de grasa intra-abdominal, el perfil de lípidos, la presión sanguínea y la reactividad de vasos aislados (Pérez, 2004) y nos interesaba saber si habría algún efecto sobre la función cardiovascular bajo condiciones de estrés (isquemia-reperfusión) que evidencian la mayor o menor eficiencia del sistema.

Desde principios del siglo pasado se demostró que algunos músculos esqueléticos de cobayos macho son más grandes que los de hembras y la diferencia se suprime mediante la extirpación de los testículos o la administración de testosterona a la hembra ([www.biopsicologia.net/fichas/page\\_945.html](http://www.biopsicologia.net/fichas/page_945.html)), lo que provoca desarrollo masculino de los músculos, puede decirse que ésta es una característica fenotípica cuya aparición depende de andrógenos. Esto explicaría el aumento en el peso corporal del grupo de ratas hembra Oofo + Test.

Una situación reproducible fue el hecho de encontrar en todos los grupos de ratas HTG un menor peso respecto a su grupo CTRL. Se ha propuesto que esto es debido a disminución en la masa muscular (Nolte et al, 1995). En nuestro laboratorio se determinó que las ratas HTG consumen aproximadamente la mitad de alimento que las ratas CTRL, por tanto tienen un menor aporte de proteínas, lípidos y minerales, es decir existe una carencia nutricional (la cual se refleja en menor peso corporal) (Baños et al, 1997). Aun no hemos dilucidado cuales mecanismos pueden estar involucrados en el aumento de grasa visceral y demás alteraciones que le acompañan. La castración y el suplemento hormonal con Est o Test modificaron el peso corporal en las ratas macho y hembra. Para explicar las diferencias encontradas respecto al peso en nuestro modelo, es necesario llevar a cabo más estudios que involucren al músculo y su metabolismo.

## PRESION SANGUINEA

En ratas macho intactas se obtuvieron los valores más altos, mientras que el mismo grupo de hembras presentó valores menores, aunque en ambos sexos los animales HTG presentaron hipertensión moderada. En las ratas macho Cast disminuyó la presión sanguínea, lo cual permite especular sobre la posible pérdida de algún factor favorecedor de elevación en la presión sanguínea (en este caso particular Test). En la literatura existen abundantes datos demostrando en el humano que es en la adolescencia y la pubertad, cuando los niveles de andrógenos aumentan, que también la presión sanguínea es más alta en varones que en jovencitas (Harshfield et al, 1994). En estudios llevados a cabo en animales espontáneamente hipertensos, el tratamiento con Test incrementó la presión sanguínea en hembras Oofo y machos Cast, indicando que la testosterona está involucrada (Chen Y-F et al; 1991). Esto se hizo evidente en nuestros grupos de ratas macho Cast y hembra Oofo que recibieron Test, ya que hubo aumento en los valores de presión sanguínea, al contrario de lo observado en ratas macho Cast + Est cuyos valores se encontraron disminuidos, lo que pudiera reflejar por una parte la carencia de Test y por otra, la presencia del estradiol administrado, éste influencia directamente la presencia de elastina en los vasos sanguíneos además de su acción inmediata de estimulación de la sintasa del oxido nítrico (Prorock et al, 2003; Paredes-Carbajal y col, 1995) y la disminución en la síntesis y liberación de prostaglandinas vasoconstrictoras (Paredes-Carbajal y col, 1995): ambas acciones favorecen la vasodilatación y contrarrestarían el aumento en la presión sanguínea. En las ratas hembra Oofo +Test aún cuando había Test presente también hubo Est, lo cual indicó aromatización de una parte de la testosterona administrada, esto puede explicar que no se encontrara la presión sanguínea más elevada. En el grupo de ratas hembra Oofo se incrementó la presión arterial, posiblemente por la pérdida de estrógenos y porque sus depósitos en grasa y piel no son suficientes para mantener al organismo con niveles similares a los de ratas intactas, esto fue aún más relevante en el caso de las ratas hembra HTG, que tuvieron valores de presión similares a ratas macho HTG intactas.

Desde hace varios años se conoce el efecto que tienen las hormonas sexuales sobre la presión sanguínea, ya sea por la influencia que ejercen sobre la estructura de los vasos a través de la elastina y la colágena (la testosterona favorece la presencia de colágena y el estradiol de la elastina), lo cual favorece la elasticidad o rigidez de los vasos (Fischer et al, 1977) y por la acción directa sobre la síntesis/liberación del óxido nítrico, favoreciendo la vasodilatación. No resultó extraño encontrar que los valores de presión sanguínea difirieron de animales intactos a gonadectomizados o con reemplazo hormonal, puesto que las hormonas modulan esta variable.

Al comparar dentro de cada grupo experimental a las ratas del grupo CTRL vs. HTG se observó elevación de la presión sanguínea en los últimos, situación previamente descrita en este modelo. El síndrome metabólico lleva aparejados hipertensión, dislipidemias, obesidad, hiperinsulinemia y resistencia a la insulina, resultando difícil saber con exactitud cuál factor se instala primero y desencadena a los otros; hace ya varios años se sabe que los humanos, tanto hipertensos como diabéticos, frecuentemente son también obesos. Se ha estimado que para la quinta década de la vida sólo 15% de los diabéticos son normotensos y no obesos y que por el contrario, sólo 20% de los obesos tienen tolerancia normal a la glucosa y la presión arterial normal, mientras que sólo una tercera parte de los hipertensos, está libre de sobrepeso y de diabetes (Ferrannini et al, 1990).

#### FRECUENCIA CARDIACA E INCIDENCIA DE ARRITMIAS

Cuando se llevó a cabo la maniobra experimental de isquemia-reperfusión también se valoró el cambio en la frecuencia cardiaca durante el tiempo que duró el experimento. En las ratas hembra intactas se observó que el grupo HTG no recuperó su frecuencia cardiaca basal al término del experimento, sino que se elevó aún más, lo que no ocurrió con las ratas hembra del grupo CTRL, puesto que éstas si recuperaron en alguna medida su frecuencia cardiaca inicial y fueron capaces de mantenerla estable. Esto muestra la desventaja de las ratas del grupo HTG ante este tipo de estrés. El efecto protector de los estrógenos no fue capaz de compensar el daño.

En la reperfusión (cuando se restaura el flujo sanguíneo) existe daño celular en el cual se han involucrado principalmente dos mecanismos: la sobrecarga de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) (paradoja del calcio) y la formación de radicales libres derivados de oxígeno (paradoja del oxígeno) (Télez y col, 1996). Ambos mecanismos han sido denominados paradojas porque resulta contradictorio que siendo el  $\text{Ca}^{2+}$  esencial para la contracción del músculo cardiaco o para la liberación de neurotransmisores en cerebro y el oxígeno para la respiración celular, sean dañinos para la célula durante la reperfusión. La paradoja del oxígeno: al restaurar el flujo sanguíneo en corazones previamente isquémicos se producen radicales libres tales como el anión superóxido ( $\text{O}_2^-$ ) y radicales hidroxilo ( $\text{OH}^\cdot$ ) los cuales deben su actividad biológica al electrón no apareado en su orbital externo, este es altamente inestable. También se incluye al

peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ) aunque no es un radical libre. Los tres principales tipos de daño que pueden ser causados por los radicales libres son la peroxidación de lípidos, oxidación de proteínas y ruptura de ADN (Férez y col, 1998).

Paradoja del calcio: en los procesos de reperfusión, la concentración intracelular de  $Ca^{2+}$  se incrementa por arriba de los niveles normales, mediante la entrada de  $Ca^{2+}$  externo, a través de los canales de calcio y el intercambiador  $Na^+/Ca^{2+}$ ; la entrada incontrolada de calcio produce activación de fosfolipasas y proteasas que producen daño al citoesqueleto y las membranas celulares, favoreciendo la producción de radicales libres derivados del oxígeno (ROS). Al presentarse la reentrada de calcio al interior de una célula miocárdica se produce daño celular severo, caracterizado por elevación de las enzimas cardíacas y formación de bandas de contracción (Férez y col, 1998).

En la práctica clínica desde la introducción de la trombolisis, en la que se utilizan diversos medicamentos administrados a través de un catéter para deshacer coágulos que obstruyen el flujo de sangre, se observó la presencia de arritmias después de la reperfusión miocárdica; entre las observadas estaban las extrasístoles ventriculares (EV), la taquicardia ventricular (TV), la fibrilación ventricular (FV), el ritmo idioventricular acelerado (RIVA) y la bradicardia sinusal (BS) (Férez y col, 1998). En modelos experimentales, desde el siglo pasado se demostró que la reperfusión súbita de un miocardio sometido a isquemia aguda se acompañaba de arritmias ventriculares (Tennat et al, 1935).

En este estudio se analizaron tanto la incidencia de taquicardias ventriculares (TV) como de fibrilación ventricular (FV), dos de las arritmias descritas en la reperfusión miocárdica. En ratas hembra intactas, del grupo CTRL se observó el porcentaje más bajo de TV y fue donde menor incidencia de FV se presentó (la FV en la rata es mortal). Esto concuerda con los datos que existen en la literatura, Tsai et al. (2002) demostraron que el  $17\beta$ -estradiol reduce la extensión de daño miocárdico irreversible, la incidencia y duración de la TV y la FV inducidas en un modelo canino (Tsai et al, 2002). También se sabe que los estrógenos disminuyen la corriente de calcio a través de los canales de tipo-L en miocitos cardíacos aislados (Grohe et al, 1997). Además los estrógenos tienen efecto protector ante los radicales libres (Sugioka et al, 1987) y capacidad para incrementar la expresión del péptido natriurético auricular (ANP) el cual entra a la circulación y actúa a nivel vascular produciendo vasodilatación. Los estrógenos además poseen efectos anti-hipertróficos (Horio et al, 2000). Cada uno de estos efectos solos o en conjunto, pueden contribuir con la protección en la función cardíaca.

En el grupo de ratas hembra Ofo la incidencia de FV posterior a la isquemia-reperfusión casi triplicó a las observadas en el grupo de intactas, lo cual se tradujo en un porcentaje mayor de mortalidad en este grupo. Dadas las propiedades de los estrógenos comentadas anteriormente se puede suponer que su

carencia llevó a un mayor daño en los corazones de estos animales. En mujeres, después de la menopausia (cuando cesa la producción ovárica de estrógenos) la incidencia de eventos cardiovasculares provoca la muerte en un mayor porcentaje que el observado antes de la menopausia (<http://www.census.gov/prod/www/statistical-abstracts-us.html>.) lo que manifiesta la incapacidad del corazón para enfrentar eventos dañinos y no sufrir daño severo sin la participación de los estrógenos.

Al contrario de lo encontrado en los grupos de ratas hembra, en las ratas macho intactas se observó un porcentaje mayor de FV que el de cualquiera de éstas, cuando se analizaron los porcentajes en las ratas macho Cast se encontró una disminución en la incidencia de FV, tanto para los animales CTRL como para los animales HTG, al parecer la castración modifica algún factor que propicia la aparición de este evento. Se ha postulado la propiedad de la testosterona de promover una duración menor del potencial de acción en las células cardiacas, lo que favorece la aparición de arritmias y este hecho explicaría la presencia de FV y TV observadas en el grupo de ratas macho intactas (Hara et al, 1998; Bidoggia et al, 2000). Probablemente cuando se removieron las gónadas principales productoras de la testosterona, el corazón tuvo un menor riesgo de desarrollar TV y FV. En el trabajo de Bidoggia, citado anteriormente, se hizo la comparación entre hombres sanos y hombres castrados, se obtuvieron los mismos resultados (Bidoggia et al, 2000).

Se han encontrado receptores de androgenos en el atrio y los ventrículos cardiacos (Mc Gill et al, 1980) lo que sugiere que la testosterona tiene efecto sobre las diferentes corrientes iónicas implicadas en la repolarización cardiaca. A este respecto Won et al (2003) demostraron la participación de la testosterona en la activación de los canales de K+, los cuales participan en la repolarización de la célula cardiaca.

En los grupos de ratas que recibieron las hormonas correspondientes a su sexo se obtuvieron efectos benéficos, en hembras Oofo + Est, aunque la administración de Est no fue de forma aguda sino crónica, existió disminución en el porcentaje de aparición de FV respecto al encontrado en el grupo Oofo. En experimentos previos se demostró que la administración aguda de estradiol previene las arritmias por reperusión y reduce el tamaño del infarto (Node et al, 1997) sin embargo, lo novedoso de nuestro trabajo radica en la administración de estradiol en bajas dosis y en forma crónica, lo cual tuvo efectos benéficos sobre los corazones de las ratas hembra. Se debe tomar en cuenta que en la terapia de reemplazo hormonal se administran dosis de estrógenos que llevan a niveles circulantes más bajos que los normales encontrados en mujeres premenopáusicas. Por otra parte existe una controversia muy grande sobre los beneficios o riesgos de la terapia (Hodis et al, 2001; Angerer et al, 2000).

En las ratas macho Cast + Test la incidencia de FV fue disminuida respecto a los de todos los grupos de machos. Estos resultados concuerdan con información referente al sistema cardiovascular de los machos y las acciones benéficas de la testosterona. Callies y col. observaron una mejor recuperación en corazones de ratas macho tratados previamente con testosterona y sometidos a isquemia-reperusión a través del método de Langendorff (Callies et al, 2003). Por otra parte, en humanos se han encontrado resultados similares, cuando se administró testosterona de forma crónica o aguda a hombres con enfermedad arterial coronaria, se observó mejoría en ellos (Rosano et al, 1999). Existen estudios que muestran acciones vasodilatadoras de la testosterona en vasos aislados (Jones et al, 2003); nuestros resultados confirman acciones benéficas sobre el sistema cardiovascular en organismos masculinos. También existe información respecto a que el tratamiento de células endoteliales humanas con andrógenos induce la síntesis de óxido nítrico (NO) ya que mejora la expresión de la sintasa constitutiva endotelial del NO (eNOS) (Jones, 2004).

En conejas ooforectomizadas la testosterona disminuye la duración del potencial de acción en células cardíacas en 30% y 90% de la repolarización normal (Hara et al, 1998), esta disminución hace al corazón más susceptible a desarrollar frecuencias más elevadas (TV, FV y torcedura de puntas, ésta última es considerada una variante de TV en la que la morfología de los complejos QRS varía de latido a latido). En una población normal, los hombres muestran una repolarización más rápida y significativamente más corta que las mujeres (Bidoggia et al, 2000). Existe también el hecho de que mujeres con algún síndrome que implique virilización muestran un patrón electrocardiográfico diferente al de mujeres normales (Bidoggia et al, 2000). Estos datos sustentan lo observado en el grupo de ratas hembra Oofo + Test, aunque existe información que contradice lo antes mencionado, ya que en un grupo de humanos transexuales (mujeres a hombres) a los cuales se administró testosterona en dosis altas no se observaron efectos nocivos en el sistema cardiovascular (Elbers et al, 2003). En este estudio no se analizó el electrocardiograma, sino otras variables como el perfil de lípidos, la lipasa hepática posheparina, el acúmulo de grasa, la presión sanguínea y la utilización de glucosa, variables que evalúan indirectamente la función cardíaca.

En los grupos de ratas tanto machos como hembras, a los que se administró hormonas del sexo contrario, la frecuencia cardíaca estuvo más alterada y los porcentajes de FV fueron los más altos dentro de los grupos experimentales. En seres humanos existen datos paradójicos en la literatura acerca de la presencia anormalmente alta de estrógenos en varones sobrevivientes de infarto al miocardio, mientras sus niveles de testosterona no presentan cambios (Phillips, 1976). En el "Proyecto droga coronaria" se formaron cinco grupos de hombres con padecimientos cardíacos, en dos de ellos se administraron estrógenos equinos, debiendo terminar el estudio de forma imprevista, ya que se observó aumento en la

incidencia de eventos tromboembólicos e infarto al miocardio unocamente en estos grupos(The Coronary Drug Project Research Group, 1973); en este caso no se observó el efecto protector de los estrógenos.

Más recientemente, en sujetos transexuales (hombres a mujeres) que reciben terapias con estradiol, se ha encontrado una incidencia elevada de trombosis venosa (Van Kesteren et al; 1997) lo cual provoca un índice mayor de eventos cardiovasculares, manifestándose nuevamente la ausencia de beneficios en organismos masculinos. En mujeres transexuales la administración de testosterona conlleva a un aumento en el peso corporal (efecto observado en nuestros grupos experimentales de ratas hembra), disminución en la sensibilidad a la insulina, alteración en el perfil de lípidos y aumento en el hematocrito, variables que favorecen la aparición de eventos tromboembólicos y cardiacos (Van Kesteren et al; 1997). Estas situaciones indican la inconveniencia de administrar las hormonas del sexo opuesto en un organismo dado.

Con frecuencia se encontró que las ratas de los grupos HTG mostraron un desarrollo del evento cardiovascular menos favorable (dado que la aparición de FV fue mayor para ellas) que las ratas pertenecientes a los grupos CTRL, que fueron capaces de tolerar mejor el estrés que conlleva la reperfusión. El modelo de ratas HTG, basado en una dieta alta en carbohidratos, desarrolla varias características asociadas con el síndrome metabólico, alteraciones como hipertensión, hipertrigliceridemia, nefropatía y obesidad central, los cuales son factores de riesgo para la función cardiovascular (Baños et al, 2000), los cuales explicarían los resultados obtenidos en los grupos de ratas HTG. Nuestro grupo de trabajo publicó recientemente las observaciones hechas en corazones aislados de rata (método de Langendorff) tanto CTRL como HTG sometidos a isquemia-reperfusión. En los grupos de ratas HTG se encontró la función cardiaca alterada (Cárdenas et al; 2005) y se resaltó la incapacidad de estos animales para enfrentar procesos de estrés cardiaco. Uno de los factores que posiblemente contribuye al deterioro de la función cardiaca y otros procesos en el modelo HTG es el incremento en el estrés oxidativo, que se manifiesta por un aumento en niveles de especies reactivas al ácido tiobarbitúrico (TBARS)(Baños et al, 1995; Cárdenas et al, 2005)

#### NIVELES DE ENZIMAS MARCADORAS DE DAÑO AL MIOCARDIO (CK-MB Y LDH)

Cuando se reduce el flujo a través de una arteria coronaria, hasta el punto en que el miocardio irrigado se vuelve hipóxico, hay cambios en las células que pueden llegar hasta la necrosis si la isquemia se prolonga; las células dañadas liberan sus enzimas a la circulación. La elevación de la concentración de enzimas séricas y de las isoenzimas producidas por infarto del miocardio desempeña un papel importante en el diagnóstico, las enzimas que usualmente se cuantifican son: lactato deshidrogenasa (LDH) y creatin cinasa (CK). La isoenzima MB de CK y la fracción 1 de LDH se encuentran más elevadas en el músculo



cardíaco que en otros órganos, la medición de su concentración en suero ayuda a mejorar la especificidad diagnóstica.

En las ratas macho intactas no hubo variaciones en los niveles de CK-MB entre los grupos CTRL y HTG sin embargo fueron mayores que los obtenidos en los respectivos grupos de ratas hembra. Cuando se compararon los niveles encontrados con los otros grupos experimentales, sólo hubo diferencia significativa respecto al grupo Cast + Est ( $p < 0.05$ ). Los resultados obtenidos en los dos primeros grupos de ratas macho implican que la remoción de las gónadas no involucró algún factor que favoreciera o limitara el daño en el corazón, en cambio para el grupo de ratas Cast + Est los niveles de CK-MB indicaron daño considerable, en este caso el efecto protector del Est sobre el corazón, que podría manifestarse por bajos niveles de actividad de esta enzima, no se encontró.

En las ratas hembra los niveles de CK-MB, a diferencia de lo observado en las ratas macho, sí se modificaron con cada tratamiento dado, ya que cuando los animales fueron sometidos a ooforectomía los niveles de actividad enzimática casi se cuadruplicaron con respecto a los intactos, tanto en las ratas del grupo CTRL como HTG, aunque la diferencia sólo fue significativa entre los grupos CTRL ( $p < 0.05$ ), manifestando la pérdida de algún factor que confería protección al corazón. Cuando los animales recibieron Est, existió disminución en la actividad enzimática sin alcanzar los niveles de ratas intactas; lo que indicó la presencia de estrógenos en dosis insuficientes para contrarrestar el estrés oxidativo. En ratas Oofo+ Test los niveles de actividad de CK rebasaron los niveles sericos de los otros tres grupos, tanto CTRL como HTG, lo que indicaría en éstas algún factor que las predispusiera a un mayor daño. Recordemos que en las ratas HTG el estrés oxidativo se incrementa (Baños et al, 1995; Cárdenas et al, 2005) y la enzima CK es muy sensible a éste (Mekhfi et al; 1996) lo que aunado al efecto dañino de la reperfusión contribuirían al aumento en la liberación de la enzima.

En las ratas hembra intactas CTRL y HTG, no se encontraron diferencias en los niveles de LDH, esto se correlaciona con la incidencia de FV que fue la menor dentro de los grupos de ratas hembra. Con la ooforectomía, se perdió un factor de protección al miocardio, lo cual fue reflejado en los porcentajes elevados de FV. En el grupo de ratas hembra Oofo + Est, para el grupo CTRL los niveles de enzima liberada (LDH) se asemejaron a los obtenidos en intactas, también los niveles de estradiol fueron similares. Esto explica por qué la aparición de FV disminuyó en este grupo; en el grupo HTG aún cuando existió liberación de esta enzima, su concentración fue menor de la encontrada en las ratas Oofo sin ser significativa, lo que indicó la presencia de algún factor de protección, aunque no en la misma proporción que en el grupo de ratas intactas.

Aun cuando no se obtuvo diferencia significativa y las desviaciones estándar en los grupos experimentales fueron muy grandes, existió una tendencia en los niveles de LDH a seguir el patrón encontrado para la enzima CK.

En las ratas macho de los grupos intactos, Cast y Cast + Test, se observaron niveles sericos similares de LDH entre los grupos CTRL y HTG, es decir, la castración no modificó el daño a las células cardiacas, sin embargo cuando se compararon estos 3 grupos contra Cast + Est las diferencias fueron significativas puesto que fue en éste grupo donde mayores niveles de enzima se encontraron, el posible efecto protector del Est no se manifestó, sino posiblemente de forma contraria, provocó mayor daño indicado por los altos niveles de actividad enzimática encontrada. El hecho de que los mayores niveles de CK-MB en general se obtuvieron en los grupos de ratas HTG nuevamente pone de manifiesto la desventaja en que se encontraban estos animales.

## GRASA RETROPERITONEAL

La acumulación excesiva de tejido adiposo dentro de la cavidad abdominal (obesidad visceral) se correlaciona con alteraciones metabólicas, las cuales incrementan el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Kissebah et al, 1994). Este patrón de distribución de grasa normalmente se observa en hombres, quienes presentan concentraciones de andrógenos que son 5 a 10 veces más altas que en mujeres (Bolander, 1989). La obesidad y el sobrepeso masculinos se asocian con niveles reducidos de testosterona en plasma (Tchernof et al, 1995) aunque los mecanismos responsables de la compleja relación entre andrógenos, obesidad y distribución de grasa corporal aún no son claros. Sin embargo cabe resaltar que en pacientes hombres con hipertrigliceridemia la cual es un factor de predisposición a enfermedad cardiovascular (Phillips, 1997; Tong et al, 2005; Laaksonen et al, 2003) y en las ratas macho HTG, se ha encontrado que los niveles de testosterona están significativamente disminuidos (Pérez, 2004).

En las ratas HTG existieron alteraciones que involucraron un mayor acúmulo de grasa, pero fue en ratas hembra intactas donde se observó menor cantidad. La ooforectomía y/o la administración de testosterona a las ratas hembra, indujeron un acúmulo mayor de grasa, lo que manifestó la importancia de las hormonas en la regulación de esta variable. Lo anterior fue contrario a lo encontrado en el grupo de ratas macho intactas en las que se encontró la mayor cantidad de grasa y con la castración disminuyó. Existen en la literatura datos acerca de que la ooforectomía daña la capacidad del músculo para procesar y almacenar la glucosa en ratas, lo cual contribuye al aumento de la glucosa circulante, esto resulta a la larga en un aumento de substrato para la lipogénesis, lo que finalmente conduce a la acumulación de grasa (Rincón et al, 1996). Por otro lado, en mujeres prediabéticas donde se evaluó la relación entre la grasa visceral y el exceso de andrógenos, la hiperandrogenicidad aumentó significativamente su proporción (Bjorntorp, 1993). Con estos antecedentes podemos suponer que en los animales de este

estudio, el exceso de andrógenos participó en el aumento de grasa retroperitoneal. Nilsson y col (1998) evaluaron los efectos de los andrógenos sobre ratas hembra recién nacidas, encontraron que la testosterona disminuye la actividad de la lipasa sensible a hormonas en los adipocitos y además provoca resistencia a la insulina. Por ser la lipasa una enzima clave en lipólisis, se incrementa la proporción de la grasa corporal.

En las ratas hembra Oofo + Est se encontró un acúmulo de grasa mayor que el observado en animales intactos. Se sabe que en mujeres está relacionado un metabolismo lento con la disminución en la función hepática encargada de metabolizar a los estrógenos. Cuando esto ocurre, el exceso de estrógenos estimula la producción de células grasas, usualmente en el área abdominal y la parte superior de los muslos (donde los estrógenos están más concentrados) (<http://www.sensiblehealth.com/estrogen.html>). Por otra parte, la resistencia a la insulina es el desorden más comúnmente asociado a esteatosis hepática (Browning et al, 2004), también se sabe que el hígado graso es una complicación común en la obesidad (Yang et al, 2000). Estas condiciones están presentes en nuestro modelo de ratas HTG (observación aun no publicada por nuestro grupo de trabajo) e impiden el adecuado funcionamiento del hígado.

La cantidad de grasa en ratas macho Cast + Test, se encontró disminuida respecto a las intactas, este hecho puede tener varias explicaciones, en un estudio llevado a cabo por Marin y col. (1992) se administró testosterona a hombres obesos de edad media, se observó que disminuía la cantidad de grasa abdominal (Marin et al, 1992), este hallazgo apoya nuestros resultados. Otra explicación proviene del hecho de que los adipocitos llevan a cabo la síntesis de aromatasa, la cual convierte las hormonas masculinas a estrógenos (Deslypere et al 1985). El tejido adiposo, principalmente del abdomen convierte testosterona y sus hormonas precursoras a estrógenos (Schneider et al. 1979, Khaw et al 1992; Marin et al 1992) lo cual induce feminización, pero también la remoción de grasa, dada la capacidad lipolítica de estos esteroides.

En ratas macho Cast + Est se encontró un acúmulo de grasa similar al encontrado en las ratas Cast, lo que indica que en este último grupo la carencia de testosterona definió la poca acumulación de grasa y probablemente los estrógenos exógenos administrados participaron en su remoción, ya que pueden inhibir la entrada de lípidos a través de la inactivación de la lipoproteína lipasa y promover su movilización por estimulación de la lipólisis (Tchernof et al, 1998).

Cuando se comparó la acumulación de grasa retroperitoneal entre sexos, las ratas macho intactas presentaron mayor cantidad que las ratas hembra. Cuando los machos fueron castrados se observó disminución y cuando las ratas hembra fueron ooforectomizadas existió aumento; al administrar hormonas exógenas (ratas hembra-Est y ratas macho-Test) se observó como éstas modularon el acúmulo de grasa de forma diferente de acuerdo al sexo. El aumento o disminución observado, fue el reflejo de los niveles

de las hormonas sexuales y su efecto sobre la distribución de la grasa corporal y el músculo esquelético aunque los mecanismos involucrados no son del todo claros.

## ASPECTO MACROSCÓPICO Y PESO DEL ÚTERO

En las ratas hembra intactas CTRL se encontraron úteros de peso y aspecto normal, mostraban turgencia al tacto y su color era uniforme a lo largo de cada cuerno uterino, los ovarios presentaron un color que iba desde rosa hasta rojo, aquí se observó el efecto de los estrógenos sobre un útero sano. Sin embargo, en los úteros de las ratas HTG se observaron los cuernos uterinos más delgados, los ovarios pequeños y de un ligero color rosa; esto indica posibles alteraciones hormonales en el modelo, que requieren estudios adicionales.

En las ratas Oofo se observaron úteros de menor tamaño y paredes más delgadas que los de las ratas intactas, también su peso se encontró disminuido. En mujeres inmaduras y castradas el útero es pequeño, atrófico e inactivo (Ganong, 1992), características similares en este grupo de animales. Cabe mencionar que aún cuando existió atrofia, ésta fue menor que en los úteros de las ratas Oofo + Test, que carecían de turgencia y el grosor de sus paredes fue ínfimo, además de bajo peso. Anteriormente se discutió la dependencia del útero hacia el estradiol y en este caso, aún cuando haya existido producción de estrógenos por parte de la grasa retroperitoneal acumulada, la presencia de testosterona sobrepasaba los niveles que pudieran producirse dado que no existían los órganos que normalmente llevan a cabo la mayor parte de la conversión de esta hormona a estradiol; Boulton y col. (1992) usaron una técnica de canulación que midió las diferencias arteriovenosas a través del tejido adiposo humano; encontrando que el manejo de androstenodiona por parte del tejido adiposo era altamente variable en hombres y mujeres, la testosterona era captada por el tejido adiposo en hombres pero liberada en mujeres, y ambos sexos liberaban estradiol. Asumiendo que todos los depósitos de tejido adiposo sean igualmente activos, calcularon que la conversión esteroidea por parte de este tejido puede representar aproximadamente una tercera parte de la producción de andrógenos periféricos y proponen que la importancia de esta ruta puede ser proporcionalmente más grande en la obesidad. En ratas, también se ha encontrado que la grasa lleva a cabo la conversión de esteroides, lo que explicaría el mayor grado de atrofia de los úteros, ya que las hembras HTG tienen mayores niveles de grasa.

En los úteros de las ratas Oofo+Est se observó recuperación en el tamaño, aspecto y peso, aunque no llegaron a normalizarse, es decir, la presencia del estradiol exógeno no fue suficiente para revertir completamente la atrofia de estos órganos, pero sí para que recuperaran parte de sus características. Por los resultados obtenidos podemos especular que las hormonas sexuales tienen una participación de tipo genómico (Mc Ewen, 1991) ya que transcurrieron varios días para observar los efectos involucrados en el metabolismo de las ratas HTG.

## FROTIS VAGINAL Y NIVELES HORMONALES EN HEMBRAS

De los grupos de ratas intactas se obtuvieron frotis vaginales seriados que mostraban abundante presencia de células escamosas indicativas de actividad ovárica, a diferencia de lo encontrado en ratas Oofo HTG y Oofo CTRL, con carencia completa de células escamosas, parabasales y basales; este patrón fue similar al encontrado en el grupo de ratas Oofo + Test lo cual indicó la ausencia de los estrógenos, puesto que es bajo su influencia que estas células se desarrollan. Respecto a los niveles hormonales, las ratas hembra HTG tenían más elevado el estradiol que las ratas CTRL, esto puede explicarse por la presencia de estradiol en el tejido adiposo (Deslypere et al, 1985), un aumento de la conversión intrácrina de precursores esteroideos a estradiol puede contribuir a la regulación local y su distribución en el organismo femenino; en rata también se han encontrado receptores a estradiol en el tejido adiposo.

En el grupo de ratas Oofo los niveles séricos de hormonas no fueron detectables por el método utilizado. En humanos se han encontrado niveles de esteroides en grasa de 40 a 400 veces mayores que el contenido total en plasma, asumiendo un volumen plasmático de 3 L (Deslypere et al, 1985). En ratas, se ha demostrado la presencia de esteroides en grasa, que muy probablemente se diluyen considerablemente al ser vertidos al plasma, y no se detectan excepto a nivel del tejido en cuestión. En las ratas Oofo + Est los frotis vaginales mostraron células escamosas, aunque menos abundantes de lo observado en ratas intactas, lo cual probablemente se relaciona con la dosis de Est administrada.

Con respecto a los valores de Est y sus efectos en hembras, podrían explicarse como sigue: existen estudios que indican que en sobrevivientes de infarto al miocardio, el estradiol y los niveles de estrona comparados con los niveles de sujetos control, son más altos (Luria et al, 1982), también se sabe que el estradiol atenúa el desarrollo de hipertrofia ventricular tanto derecha como izquierda en modelos de roedores (Farhat et al, 1993); aunado a esto, incrementa la expresión del péptido natriurético atrial (ANF) el cual posee efectos anti-hipertróficos (Ganong, 1992) y vasodilatadores (Drucker, 2005), en alguna de estas formas los estrógenos pudieron limitar el daño post-reperusión.

## NIVELES HORMONALES EN RATAS MACHO

Cuando se compararon los niveles séricos de Test, en el grupo de animales intactos fueron más bajos en las ratas HTG, esto pudiera relacionarse a la presencia de grasa corporal por sus funciones de esteroidogénesis y porque fue más abundante en los animales HTG. En las ratas Cast los niveles séricos de Test fueron indetectables y los de Est estaban elevados. Se ha descrito en varones y mujeres posmenopáusicas que la principal fuente de estrógenos es el estroma del tejido adiposo, donde se sintetiza estrona a partir de dehidroepiandrosterona (DHEA) ([www.biopsicologia.net/fichas/page\\_906.html](http://www.biopsicologia.net/fichas/page_906.html)), y puesto que en todos los organismos existe una reserva de grasa en mayor o menor grado, ésta explicaría

la presencia de los estrógenos. En la síntesis de esteroides, la testosterona producida por las gónadas es el precursor de androstenodiona, androsterona y epiandrosterona, en su ausencia, la síntesis en grasa y otros tejidos posiblemente se limita a nivel local sin que las cantidades liberadas al plasma sean detectables.

En ratas Cast + Test no se alcanzaron los niveles hormonales de los animales intactos, lo que explica la disminución en el peso y los bajos niveles de grasa abdominal ya que las hormonas no influyeron en el mismo grado. En el grupo de ratas Cast + Est también se encontró disminución en los niveles de Test. En las ratas del grupo HTG la testosterona fue indetectable y los niveles de Est eran altos, en el grupo CTRL los niveles de estradiol y el acúmulo de grasa fueron bajos, lo que puede atribuirse a los efectos lipolíticos de los estrógenos. No puede descartarse la otra postura existente en la literatura, respecto a las elevaciones en los niveles de estradiol, ya que se afirma que son éstas las que conllevan el daño y fue en este último grupo tratado con Est, donde se observó mayor daño en el miocardio.

En resumen:

Se encontraron cambios en todas las variables evaluadas, el peso en hembras en ausencia de las gónadas resultó en aumento y en machos en disminución, las variaciones en la masa corporal no sólo están dadas por el alimento consumido sino también por la influencia de las hormonas sexuales y el efecto que tienen sobre la distribución de la grasa corporal y el músculo esquelético: la distribución y proporción del tejido adiposo en hombres y mujeres es diferente (Enzi et al, 1986). Esta diferencia indica la importancia de las hormonas sexuales sobre el desarrollo de este tejido; la grasa retroperitoneal, como ya se ha mencionado es un tejido metabólicamente activo; la almacenada en los adipocitos en forma de triglicéridos al oxidarse libera ácidos grasos libres a la circulación (May et al, 2000) y el aumento resultante está estrechamente ligado a resistencia a la insulina y diabetes mellitus tipo II, además de acelerar la mortalidad de los pacientes con aterosclerosis. Existe la observación por parte de nuestro grupo de trabajo, de que en las ratas HTG tanto machos como hembras, los niveles de triglicéridos séricos totales se encuentran elevados, con diferencia estadística en comparación con su respectivo control (Pérez, 2004).

Las respuestas observadas en las ratas hembra y macho que recibieron Est o Test fueron diferentes. El ovario en la hembra y el testículo en el macho desempeñan funciones reproductivas, de producción de gametos y síntesis de las hormonas esteroideas responsables de las características fenotípicas que distinguen a cada sexo, las hormonas esteroideas son moléculas hidrofóbicas de tamaño pequeño que penetran en el interior de la célula blanco, sus efectos son mediados por proteínas nucleares específicas denominadas receptores. El mecanismo de acción general de los esteroides

mediante sus receptores nucleares consiste en modificar los patrones de expresión génica, el complejo hormona receptor activado es traslocado al núcleo de la célula y ahí interactúa con secuencias específicas de DNA lo cual da como resultado la activación o represión de la transcripción de genes dependientes de esteroides.

Aún cuando los resultados obtenidos en este estudio sugieren que en las ratas macho el Est no es benéfico y en las ratas hembra la Test tampoco lo es, hacen falta estudios que permitan elucidar los mecanismos involucrados y la relación que existe entre éstos y las alteraciones que acompañan al síndrome metabólico.

## CONCLUSIONES

- Las ratas de los grupos HTG están en desventaja ante el estrés oxidativo generado en un evento de isquemia y reperfusión miocárdica en comparación con las ratas de los grupos CTRL, las que presentaron menor daño, independientemente de su sexo.
- La presencia de estradiol en ratas hembra amortigua la presencia de arritmias severas
- La presencia de testosterona en ratas macho disminuye la incidencia de arritmias severas.
- La presencia de hormonas contrarias al sexo del animal en cuestión, no favoreció la protección cardiaca durante un evento de estrés, tanto en ratas macho como en ratas hembra.
- La presencia o ausencia de hormonas sexuales afectó el comportamiento de la presión arterial: la Testosterona provocó aumento, en tanto que el Estradiol provocó disminución
- Se observó una modulación por parte de las hormonas sexuales sobre el peso corporal: la testosterona provocó aumento en el peso independientemente del sexo y el estradiol provocó disminución.
- Existió un efecto directo sobre el acúmulo de grasa por parte de las hormonas presentes en la rata; la Test aumentándolo y el Est disminuyéndolo.
- La presencia de testosterona en ratas hembra tiene efectos deletéreos sobre el útero y provocó comportamiento agresivo en estos animales.



## REFERENCIAS

1. Angerer P, Kothny W, Stork S, von Schacky C. "Hormone replacement therapy and distensibility of carotid arteries in postmenopausal women: a randomized, controlled trial. *J Am Coll Cardiol.* 2000; 15; 36(6):1789-96.
2. Babiker AF, De Windt JL, Van Eickels M, Grohe C, Meyer R, Doevendans PA. "Estrogenic hormone action in the heart: regulatory network and function" *Cardiovasc Res.* 2002; 15; 53 (3):709-719.
3. Baker HJ, Lindsey RJ and Weisbroth HS "The laboratory Rat" USA Academic Press, INC. 1980; pp 162-175.
4. Baños G, Carvajal , Cardoso G, et al "Vascular reactivity and effect of serum in a rat model of hypertriglyceridemia and hipertensión" *Am J Hypertens* 1997; 10: 379-388.
5. Baños G, El Hafidi M, Franco M. "Oxidative stress and cardiovascular physiopathology" *Curr Topics Pharmacol* 2000; 5:1-17.
6. Barp J, Araujo ASR, Fernandes TRG y col. "Myocardial antioxidant and oxidative stress changes due to sex hormones" *Brazilian Journal of Medical and Biological Research.* 2002; (35): 1075-1081.
7. Barret-Connor E, Khaw KT "Endogenous Sex Hormones and Cardiovascular Disease in Men" *Circulation* 1988; 78:539-545
8. Belanger C, Luu-The V, Dupont P et al "Adipose Tissue Intracrinology: Potential Importance of Local Androgen/Estrogen Metabolism in the Regulation of Adiposity" *Horm Metab Res* 2002; 34:737-745
9. Bidoggia H, Maciel PJ, Capalozza N, Mosca S, Blaksley JE, Valverde E, Bertran G, Arini P, Biagetti OM, Quinteiro AR, "Sex Differences on the electrocardiographic Pattern of Cardiac Repolarization: Possible Role of Testosterone" *Am Heart J* 2000;14(4):678-683
10. Bjorntorp P "Hyperandrogenicity in women: a prediabetic condition?" *J Intern Med.* 1993; 234: 579-583
11. Bolander FF. *Molecular endocrinology.* New York: Academic Press,1989.
12. Booth AE, Obeid RN and Lucchessi RB "Activation of estrogen receptor- $\alpha$  protects in vivo rabbit heart from ischemia-reperfusion injury" *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 289: H2039-H2047.
13. Borg W, Shackelton CHL, Pahuja SL, Hochberg RB "Long-lived testosterone esters in the rat" *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:1545-1549
14. Boulton KL, Hudson DU, Coppack SW, Frayn KN "Steroid hormone interconversions in human adipose tissue in vivo" *Metabolism* 1992;41:556-559
15. Browning DJ and Horton DJ "Molecular mediators of hepatic steatosis and liver injury" *J. Clin Invest* 2004; 114:147-152
16. Callies F, Strömer H, Schwinger GHR, Bölc B, Hu K, et al "Administration of Testosterone Is Associated with a Reduced Susceptibility to Myocardial Ischemia" *Endocrinology* 2003; 144:4478-4483).

17. Cárdenas G, Torres JC, Zamora J and Baños G "Isolated heart function during ischemia and reperfusion in sucrose-fed rats. Effect of insulin infusion" *Cardiovasc. Pathol.* 2005; 14(5): 256-264
18. Carvajal K "Estudio de la función cardiovascular en un modelo experimental de hipertrigliceridemia e hipertensión en rata" Tesis de Maestría en Biología Experimental. UAM-I,1997
19. Carvajal K, El Hafidi M y Baños G "Myocardial damage due to ischemia and reperfusion in hypertriglyceridemic and hypertensive rats: participation of free radicals and calcium overload" *Journal of Hypertension* 1999; 17:1607-1616
20. Cauley JA, Gutai JP, Kuller LH, Dai WS "Usefulness of sex steroid hormone levels in predicting coronary artery disease in men" *Am J Cardiol* 1987; 60:771-777
21. Cinca CJ "Bases fisiopatológicas de las arritmias de la isquemia y reperfusión coronaria" *Revista Española de Cardiología* 1988; Vol. 41(4): 244-253
22. Crofton JT, Ota M, Share L. "Role of vasopressin , the renin –angiotensin system and sex in Dahl salt-sensitive hypertension" *J Hypertens* 1993; 11:1031-1038
23. Chávez E, Téllez F, Pichardo J et al "On the protection by the analgesic ketorolac of reperfusión-induced Heart damage" *Comp Biochem Physiol* 1996; 115C 95-100
24. Chen Y-F and Meng Q-M. "Sexual dimorphism of blood pressure in spontaneously hypertensive rats is androgen dependent" *Life Sci* 1991; 48:85-96
25. Deslypere JP, Verdonck L and Vermeulen "Fat tissue: a steroid reservoir and site of steroid metabolism" *J Clin Endocrinol Metab* 1985; 61(3):564-70
26. Droy-Lafaix MT, Ferrandini C, Gardes-Albert M "Los radicales libres en 10 preguntas" Folleto Informativo Editado por Farmasa Schwabe
27. Drucker CR "Fisiología Médica" Edit. Manual Moderno. México, 2005. pp272
28. El Hafidi M, Valdez R, Baños G "Posible relationship between altered fatty acid composition of serum, platelets and aorta, and hipertensión induced by sugar feeding in rats" *Clin Exp Hypertens* 2000; 22 (1): 99-108
29. El Hafidi M. And Baños G "In vivo plasma lipid oxidation in sugar-induced rat hypertriglyceridemia and hipertensión" *Hipertensión* 1997; 30: 624-628
30. Elbers JM, Giltay EJ, Teerlink T, et al "Effects of sex steroids on components of the insulin resistance syndrome in transsexual subjects" *Clin Endocrinol (Oxf)* 2003; 58(5):562-71
31. Enzi G, Gasparo M, Biondetti PR, Fiore D, Semisa M, Zurlo F "Subcutaneous and visceral fat distribution according to sex, age, and overweight, evaluated by computed tomography" *Am J Clin Nutr* 1986; 44:739-746
32. Farhat MY, Chen MF, Batí T, Iqbal A, Cathapermal S, Ramwell PW "Protection by oestradiol against the development of cardiovascular changes associated with monocrotaline pulmonary hipertensión in rats" *Br J Pharmacol* 1993; 110:719-723

33. Férrez S.M.S., de la Peña A.E., Márquez FM y Eid LG “Daño miocárdico por reperfusión: su impacto en la clínica. Parte I” Arch Inst Cardiol Mex 1998; 68: 431-437
34. Férrez S.M.S., Lupi H E “El comportamiento del miocardio en la isquemia y en la reperfusión” Edit. Elsevier. España 2004; pp 9 –11.
35. Ferrannini E, Haffner MS y Stern PM “Hipertensión Esencial: Un Estado de Resistencia a la Insulina” J Cardiovasc Pharmacol 1990; Vol. 15 (suppl. 5):S1-S9
36. Fischer MG and Swain ML “Effect of sex hormones on blood pressure and vascular connective tissue in castrated and noncastrated male rats” Am J Physiol 1977; 232(6):H617-21
37. Freedman R, Swerdlow C, Soderholm-Difatte V et al “Clinical predictors of arrhythmia inducibility in survivors of cardiac arrest: Importance of gender and prior myocardial infarction” J Am Coll Cardiol 1988; 12:973-978
38. Ganong FW. Fisiología Médica. 13° Edición. Edit Manual Moderno. México 1992 pp 469,537
39. Gauthaman K, Adaikan PG, Prasad RN. “Aphrodisiac properties of Tribulus Terrestris extract (Protodioscin) in normal and castrated rats” Life Sci 2002; 71(12): 1385-96
40. Hara M, Danilo P and Rosen MR. “Effects of gonadal steroids on ventricular repolarization and on the response to E-4031” J Pharmacol Exp Ther 1998; 285:1068-72
41. Harshfield GA, Alpert BS, Pulliam DA, Somes GW, Wilson DK. “Ambulatory blood pressure recordings in children and adolescents” Pediatrics 1994; 94:180-184.
42. Hodis HN, Mack WJ, Lobo RA, Shoupe D, Sevanian A, Mahrer PR, Selzer RH, Liu Cr CR, Liu Ch CH, Azen SP, Estrogen in the Prevention of Atherosclerosis Trial Research Group. “Estrogen in the prevention of atherosclerosis. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial” Ann Intern Med. 2001; 4;135 (11):939-53.
43. Horio T, Nishikimi T, Yoshihara F et al “Inhibitory regulation of hypertrophy by endogenous atrial natriuretic peptide in cultured cardiac myocytes” Hipertensión 2000; 35:19-24
44. [http://escuela.med.puc.cl/paginas/publicaciones/PatologíaGeneral/Patol\\_037.html](http://escuela.med.puc.cl/paginas/publicaciones/PatologíaGeneral/Patol_037.html)
45. <http://www.census.gov/prod/www/statistical-abstracts-us.html>.
46. <http://www.census.gov/prod/www/statistical-abstracts-us.html>.
47. <http://www.sensiblehealth.com/estrogen.html>
48. Jones DR, Pugh JP, Jones HT and Channer SK “The vasodilatory action of testosterone: a potassium channel opening or a calcium antagonistic action? British Journal of Pharmacology 2003;138:733-744
49. Jones DR, Jones HT and Channer SK “The influence of testosterone upon vascular reactivity” European Journal of Endocrinology 2004;151:29-37
50. Kamei Y, Suzuki M, Miyazaki H, Tsuboyama-Kasaoka N, Wu J, Ishimi Y and Ezaki O. “Ovariectomy in mice decreases lipid metabolism-related gene expression in adipose tissue and skeletal muscle with increased body fat” J Nutr Sci Vitaminol (Tokyo) 2005; 51(2):110-7

51. Kaplan NM. "The deadly quartet. Upper-body obesity, glucose intolerance, hypertriglyceridemia and hypertension" *Arch Intern Med* 1989; 149(7): 1514-1520
52. Khaw KT and Barret-Connor E. "Lower endogenous androgens predict central adiposity in men" *Ann Epidemiol* 1992; 2(5):675-82
53. Kissebah AH, Krakower GR "Regional adiposity and morbidity". *Physiol Rev* 1994; 74:761-811
54. Laaksonen DE, Niskanen L, Punnonen K, Nyyssonen K, Tuomainen TP, Salonen R, Rauramaa R, Salonen JT. "Sex hormones, inflammation and the metabolic syndrome: a population-based study" *Eur J Endocrinol* 2003; 149(6):601-8
55. Luna G. L. "Manual of HISTOLOGIC STAINING METHODS of the Armed Forces. Institute of Pathology" McGraw-Hill Book Company Third Edition 1960; pp.70-71
56. Luria HM, Jonson WM, Pego R et al "Relationship Between Sex Hormones, Myocardial Infarction, and Occlusive Coronary Disease" *Arch Intern Med* 1982; 142:42-44
57. Marin P, Andersson B, Ottoson M, Olbe L, Chowdhury B, Kvist H, et al "The morphology and metabolism of intraabdominal adipose tissue in men" 1992;41(11):1242-8
58. Marin P., Holmang S., Jonson L., et al "The effects of testosterone treatment on body composition and metabolism in middle-aged obese men" *Int J Obes Relat Metab Disord* 1992; 16:991-997
59. Mattson LACG, Hamberger L, Samsioe G et al "Lipid metabolism in women with polycystic ovary syndrome: possible implications for an increased risk of coronary heart disease" *Fertil Steril* 1984; 42:579-584
60. May JE, Brands MW, Hildebrandt DA, Kuo J, Fitzgerald S "Role of sympathetic nervous system and neuropeptides in obesity hipertensión" *Braz J Med Biol Res* 2000; 33:605-618.
61. Mc Ewen BS "Non-genomic and genomic effects of steroids on neural activity. TIPS Review 1991; 12:143-147
62. Mc Gill HC, Anselmo VC, Buchanan JM "The heart is a target organ for androgen" *Science* 1980; 207:775-777
63. McHugh AN, Cook MS, Schairer JL et al "Ischemia and reperfusion induced ventricular arrhythmias in dogs: effects of estrogen" *Am J Physiol* 1995; 268 (Heart Circ. Physiol 37): H2569-H2573
64. Mekhfi H, Veksler V, Mateo P, Maupoil V, Rochette L, Ventura-Clapier R. "Creatine kinase is the main target of reactive oxygen species in cardiac myofibrils" *Circ Res.*1996; 78(6):1016-27
65. Merri M, Benhorin J, Alberti M et al "Electrocardiographic quantitation of ventricular repolarization" *Circulation* 1989; 80:1301-8; Gambill CL, Wilkins ML, Haisty WK et al "T wave amplitudes in normal populations. Variation with ECG lead, sex and age" *J Electrocardiology* 1995; 28:191-197
66. Nava TS Aspectos electrofisiológicos de los bloqueos ventriculares causados por isquemia En: Férrez y Lupi editores El comportamiento del miocardio en la isquemia y en la reperfusión Edit ELSEVIER 2004; pp 700

67. Nelson LR and Bulun SE "Estrogen production and action" *J Am Acad Dermatol* 2001; 45(3 Suppl):S116-24
68. Nilsson C, Niklasson M, Ericsson E, Bjorntorp P, Holmang A "Imprinting of female offspring with testosterone results in insulin resistance and changes in body fat distribution at adult age in rats" *J Clin Invest* 1998; 101:74-78
69. Node K, Kitakaze M, Kosaka H, Minamino T, Funaya H and Hori M "Amelioration of ischemia- and reperfusion-induced myocardial injury by 17beta-estradiol: role of nitric oxide and calcium-activated potassium channels" *Circulation* 1997; 96:1953-1963
70. Nolte LA, Rincon J, Wahlstrom EO, Craig BW, Zierath JR, Wallberg-Henriksson H "Hyperglycemia activates glucose transport in rat skeletal muscle via a Ca (2+)-dependent mechanism" *Diabetes* 1995; 44(11):1345-8
71. Paredes-Carbajal MC, Juárez-Oropeza MA, Ortiz-Mendoza CM and Mascher D. "Effects of acute and chronic estrogenic treatment on vasomotor responses of aortic rings from ovariectomized rats" *Life Sciences*. 1995; 57(5):473-486
72. Pérez I, El Hafidi M, Sánchez C, Baños G "Effect of sugar-induced hipertensión in rats on the pattern of serum arachidonic, dihomo-gamma-linoleic and linoleic acids" *Med Sci Res* 1999; 27:847-848
73. Pérez TI "Efecto de la castración a diferentes tiempos sobre la reactividad vascular en un modelo de rata hipertensa e hipertriglicéridémica" Tesis de licenciatura en Biología. Facultad de Ciencias. UNAM, 2000
74. Pérez TI "Modulación por hormonas sexuales de la reactividad vascular en un modelo de rata hipertensa e hipertriglicéridémica" Tesis de Maestría 2004
75. Persky MA, Green SP, Stublely L et al "Protective Effect of Estrogens Against Oxidative Damage to Heart and Skeletal Muscle In vivo and In vitro" *PSEBM* 2000; 223: 59-65
76. Phillips GB "Evidence for hyperestrogenemia as a risk factor for myocardial infarction in men" *Lancet* 1976; 2:14-18
77. Phillips GB "Relationship between serum sex hormones and glucose, insulin and lipid abnormalities in men with myocardial infarction" *Proc Natl Acad Sci USA*. 1977; 74(4):1729-33
78. Prorock JA, Hafezi-Moghadam A, Laubach EV et al "Vascular protection by estrogen in ischemia-reperfusion injury requires endothelial nitric oxide synthase" *Am J Physiol* 2003; 284 (1):133-140
79. Reaven G and Ho H "Sugar-induced hipertensión in Sprague-Dawley rats" *Am. J. Hypertens*. 1991; 4: 610-614
80. Reckelhoff FJ "Gender Differences in the Regulation of Blood Pressure" *Hypertension* 2001; 37:1199-1208
81. Rincón J, Holmang A, Wahlstrom EO, Lonroth P, Bjorntorp P, Zierath JR, Henriksson WH, "Mechanisms behind insulin resistance in rat skeletal muscle alter oophorectomy and additional testosterone treatment" *Diabetes* 1996; 45: 615-621

82. Rosano GM, Leonardo F, Pagnotta P, Pelliccia F, Panina G, Cerquetani E, et al "Acute anti-ischemic effect of testosterone in men with coronary artery disease" *Circulation* 1999; 99: 1666-1670
83. Rowland NE, Fregly MJ " Role of gonadal hormones in hypertension in the Dahl salt-sensitive rat" *Clin Exp Hypertens*. 1992; A14: 367-375
84. Schneider G, Kirschner MA, Berkowitz R, Ertel NH "Increased estrogen production in obese men" *J Clin Endocrinol Metab* 1979; 48(4):633-8
85. Shono N, Kumagai S, Higaki Y, Nishizumi M et al "The relationships of testosterone, estradiol, dehydroepiandrosterone-sulfate and sex hormone-binding globulin to lipid and glucose metabolism in healthy men" *J Atheroscler Thromb*. 1996; 3:45-51
86. Simpson ER, Zhao Y, Agarwal VR et al "Aromatase expression in health and disease" *Recent Prog Horm Res* 1997; 52:185-213
87. Sorano D, Prasad V, Oberfield DR et al "Hypertension and virilization caused by a unique dioxycorticosterone and androgen-secreting adrenal adenoma" *J Pediatr Endocrinol Metab* 1999; 12:215-220
88. Sugioka K, Shimosegawa Y and Nakano M. "Estrogens as natural antioxidants of membrane phospholipid peroxidation" *FEBS Lett* 1987; 210: 37-39
89. Talbott E, Guzick D, Clerici A, et al. "Coronary heart disease risk factors in women with polycystic ovary syndrome" *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1995; 15:821-826
90. Tchernof A, Después JP, Bélanger A, Dupont A, Prud'homme D, Moorjani S, Lupien PJ, Labrie F "Reduced testosterone and adrenal C19 steroid levels in obese men" *Metabolism* 1995;44:513-519
91. Tchernof A, Poehlman ET "Effects of the menopause transition on body fatness and body fat distribution". *Obesity Res* 1998;6:246-254.
92. Téllez F, Carvajal K, García C et al "Bases bioquímicas y celulares del daño por isquemia y reperfusión en el miocardio" *Arch Inst Cardiol Méx* 1996, 66:162-181.
93. Tennat R and Wiggers CJ "The effect of coronary occlusion on myocardial contraction" *Am J Physiol* 1935; 112: 351-361.
94. The Coronary Drug Project Research Group "The Coronary Drug Project. Findings leading to discontinuation of the 2.5-mg day estrogen group". *JAMA* 1973;226:652-657
95. The coronary drug Project: "Initial findings leading to modifications of its research protocol" The Coronary Drug Project Research Group. *JAMA* 1970; 214:1303-1313.
96. Tong PC, Ho CS, Yeung VT, NgMC, So WY, Ozaki R, Ko GT, Ma RC, Poon E, Chan NN, Lam CW, Chan JC "Association of testosterone, insulin-like growth factor-I, and C-reactive protein with metabolic syndrome in chinese middle-aged men with a family history of type 2 diabetes" *J Clin Endocrinol Metab*, 2005; 90(12): 6418-23

97. Tsai CH, Su FS, Chou TF and Lee TM "Differential effects of sarcolemmal and mitochondrial channels activated by  $17\beta$ -estradiol on reperfusion arrhythmias and infarct size in canine hearts" J Pharmacol Exp Ther 2002; 301: 234-240.
98. Valdez R "Modulación por hormonas sexuales de la reactividad vascular en un modelo de rata hipertensa e hipertriglicéridémica" Tesis de licenciatura en Biología Experimental. UAM-I, 1998.
99. Van Kesteren P, Asscheman H, Megens J and Gooren L. "Mortality and morbidity in transsexual subjects treated with cross-sex hormones. Clin Endocrinol (Oxf) 1997; 47:337-342
100. Vasconcellos LS, Leite JM, Sabino KR, Petroianu A. "Influence of oophorectomy on weight variance in young and adult female rats" Arq Bras Endocrinol Metabol 2004; 48(2):229-304
101. Watanabe Y, Littleton-Kearney TM, Traystman JR and Hurn DP "Estrogen restores postischemic pial microvascular dilation" Am Physiol Heart Circ Physiol 2001. 281:H155-H160.
102. Wiinberg N, Høegholm A, Christensen HR et al "24-h Ambulatory Blood Pressure in 352 Normal Danish Subjects, Related to Age and Gender" AJH 1995. 8(10): 978-986.
103. Won E, Won J, Kwon S, Lee Y, Nam T and Ahn Ducksun "Testosterone Causes Simultaneous Decrease of  $(Ca^{2+})_i$  and Tension in Rabbit coronary Arteries: by Opening Voltage Dependent Potassium Channels" Yonsei Med J 2003. 44(6): 1027-1033
104. [www.biopsicologia.net/fichas/page\\_906.html](http://www.biopsicologia.net/fichas/page_906.html)
105. [www.biopsicologia.net/fichas/page\\_945.html](http://www.biopsicologia.net/fichas/page_945.html)
106. Yang S, Zhu H, Li Y, et al "Mitochondrial Adaptations to Obesity-Related Oxidant Stress" Arch. Biochem. Biophys 2000, 378(2): 259-268.
107. Zumoff B, Troxler RG, O'Connor J, Rosenfeld RS, Kream J, Fukushima DK "Abnormal hormone levels in men with coronary artery disease" Arteriosclerosis 1982; 2:58-67.