



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**LA TESTOSTERONA REDUCE EL INCREMENTO DE Ca^{2+}
INTRACELULAR INDUCIDO POR EL CARBACOL POR MEDIO DEL
BLOQUEO DE CANALES DE Ca^{2+} TIPO L Y LA ENTRADA
CAPACITATIVA EN MIOCITOS TRAQUEALES DE COBAYO.**

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

PRESENTA

ALDO ISAAC MARTÍNEZ BANDERAS



MÉXICO, D.F.

2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Elia Brosla Naranjo Rodríguez

VOCAL: Profesor: María Eva González Trujano

SECRETARIO: Profesor: Edgar Flores Soto

1er. SUPLENTE: Profesor: José Ignacio Paramo Ramírez

2° SUPLENTE: Profesor: Vanessa Rebeca Maya Ampudia

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

LABORATORIO DE INVESTIGACIÓN EN ASMA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM

ASESOR DEL TEMA: DR. EDGAR FLORES SOTO

SUPERVISOR TÉCNICO: DR. LUIS MANUEL MONTAÑO RAMÍREZ

SUSTENTANTE: ALDO ISAAC MARTÍNEZ BANDERAS

ÍNDICE

LISTA DE ABREVIATURAS	5
LISTA DE FIGURAS	9
RESUMEN	11
INTRODUCCIÓN	13
<i>La testosterona</i>	13
<i>Síntesis, secreción y acción de la testosterona</i>	13
<i>Receptores a andrógenos</i>	17
<i>Efectos genómicos</i>	17
<i>Efectos no genómicos</i>	18
<i>Regulación del Ca^{2+} intracelular</i>	19
<i>Mecanismos que mantienen la concentración de Ca^{2+} intracelular</i>	22
<i>ATPasa de Ca^{2+} de retículo sarcoplásmico</i>	22
<i>ATPasa de Ca^{2+} de membrana plasmática</i>	23
<i>Intercambiador Na^+/Ca^{2+}</i>	24
<i>Mecanismos que aumentan la concentración de Ca^{2+} intracelular</i>	24
<i>Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje</i>	25
<i>Canales operados por el receptor</i>	26
<i>Entrada capacitativa ó canales operados por almacén</i>	27
Efecto de los andrógenos en el músculo liso	29
<i>Músculo liso intestinal</i>	29

<i>Músculo liso vascular</i>	30
<i>Músculo liso de las vías aéreas</i>	32
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	35
HIPÓTESIS	35
OBJETIVO	35
MATERIAL Y MÉTODOS	35
<i>Mediciones de Ca²⁺ intracelular en miocitos traqueales de cobayo</i>	36
FÁRMACOS	39
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	39
RESULTADOS	40
<i>La testosterona disminuye la elevación de la concentración de Ca²⁺ intracelular inducida por el carbacol</i>	40
<i>La testosterona actúa sobre los principales mecanismos involucrados en el relleno de Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico</i>	43
<i>La testosterona bloquea la entrada capacitativa disminuyendo la entrada de Ca²⁺ al interior de la célula</i>	45
DISCUSIÓN	47
CONCLUSIONES	50
ANEXO	51
BIBLIOGRAFÍA	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
ACh	Acetilcolina
ADP	Adenosina Difosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
2-APB	2-aminoetil difenil borato
Ca ²⁺	Ion calcio
[Ca ²⁺]	Concentración de Ca ²⁺
[Ca ²⁺] _i	Concentración de Ca ²⁺ intracelular
[Ca ²⁺] _e	Concentración de Ca ²⁺ extracelular
CCh	Carbacol
CLM	Cadena ligera de la miosina
CPA	Ácido ciclopiazónico
CYP19	Estrógeno sintasa ó Aromatasa
DAG	Diacilglicerol
DHT	Dihidrotestosterona
D-600	Metoxiverapamil
EGTA	Etilen glicol ácido tetracético
ER α	Receptor de estrógenos tipo α
Er β	Receptor de estrógenos tipo β

ESM	Error estándar de la media
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropinas
GPCRs	Receptores acoplados a proteínas G
I _{CRAC}	Corriente de Ca ²⁺ activada por liberación de Ca ²⁺
IP ₃	Inositol 1,4-5 trisfosfato
H ⁺	Ion hidronio
HA	Histamina
HL	Hormona Luteinizante
5-HT	Serotonina
K ⁺	Ion Potasio
KB-R7993	2-[2-[4-(4-nitrobenziloxi)fenil]etil]isotiourea mesilato
kDa	Kilodaltones
K _v	Canales de K ⁺ dependientes de voltaje
La ³⁺	Lantano
MAPK	Proteína cinasa activada por mitógenos
Mg ²⁺	Magnesio
MLCK	Cinasa de la cadena ligera de la miosina
MLCP	Fosfatasa de la cadena ligera de la miosina
MLV	Músculo liso vascular
MLVA	Músculo liso de las vía aéreas
Mn ²⁺	Manganeso

mRNA	Ácido ribonucleico mensajero
Na ⁺	Ion Sodio
NCX	Intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺
NCX _{REV}	Intercambiador Na ⁺ /Ca ²⁺ en su forma reversa
ON	Óxido nítrico
PIP ₂	Fosfatidil inositol 4,5 bisfosfato
PLC	Fosfolipasa C
PLCβ	Fosfolipasa C beta
PMCA	ATPasa de Ca ²⁺ de membrana plasmática
PPADS	Sal tetrasódica de piridoxal fosfato-6-azo(benzeno-2,4- ácido disulfónico)
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PTX	Toxina pertussis
ROC	Canales operados por el receptor
RA	Receptor a andrógenos
RE	Retículo Endoplásmico
RIP ₃	Receptor de trifosfato de inositol
RNA	Ácido ribonucléico
ROCK	Cinasa de RhoA
RhoA	Proteína monomérica RhoA
RS	Retículo sarcoplásmico

RyR	Receptor de rianodina
R-max	Cociente de fluorescencia máxima 340/380
R-min	Cociente de fluorescencia mínima 340/380
SEA 0400	[2-[4-[(2,5-Difluorofenyl)metoxi]fenoxi]-5-etoxianilina]
SERCA	ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico
SK-F96365	1-[2-(4-Metoxifenil)-2-[3-(4 metoxifenil)propoxi]etil-1 <i>H</i> -imidazole hidrocloreuro
SOC	Canal operado por el almacén o entrada capacitativa
SOCE	Entrada de Ca^{2+} operada por el almacén
Sr^{2+}	Estroncio
STIM	Molécula de interacción estromal
TRP	Canales potenciales de receptor transitorio
VDCC	Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje
VDCC-L	Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje tipo L

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO
1	Estructura química de la testosterona.
2	Síntesis de la testosterona y otras hormonas gonadales.
3	Propuesta del mecanismo de los efectos genómicos y no genómicos de la testosterona.
4	Ensamblaje molecular del complejo SOC.
5	Registro original del efecto relajante de la testosterona de manera acumulativa a las concentraciones 10, 20 y 100 μM sobre la contracción inducida por el CCh (1 μM) en anillos traqueales de cobayo.
6	Registro original del efecto de la nifedipina (1 μM) sobre la contracción del CCh (1 μM) en anillos traqueales de cobayo.
7	Registro original del efecto de la nifedipina (1 μM) y 2-APB (100 μM) en el mantenimiento de la contracción inducida por el CCh en músculo liso traqueal de cobayo. Esta inhibición es independiente del orden en el cual se añadan la nifedipina y el 2-APB.
8	El carbacol (CCh, 10 μM) induce un incremento bifásico de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ constituido por un pico y una meseta en miocitos traqueales de cobayo.
9	El incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducido por el CCh es inhibido parcialmente por la testosterona y el D-600 en miocitos traqueales de músculo liso de cobayo.
10	Protocolo experimental para evaluar el relleno de Ca^{2+} del RS.

- 11 Efecto de la testosterona en el relleno del RS en células de MLVA de cobayo.
- 12 Efecto de la testosterona 10 μM en la entrada capacitativa.
- 13 Efecto de la testosterona 32 μM en la entrada capacitativa.

RESUMEN

La testosterona es una hormona esteroidea producida por los testículos que presenta efectos genómicos y no genómicos. Los efectos no genómicos podrían estar mediados por su interacción con proteínas en la membrana plasmática incluyendo a las implicadas en los mecanismos encargados de la regulación del calcio iónico (Ca^{2+}) intracelular. El Ca^{2+} es un mensajero intracelular que da inicio al proceso de contracción muscular, su incremento en el citoplasma está regulado por los canales de Ca^{2+} dependientes del voltaje tipo L (VDCC-L), canales operados por receptor (ROC), canales operados por almacén (SOC) y el intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en su forma reversa (NCX_{REV}) localizados en la membrana plasmática. También, éste se libera desde el retículo sarcoplásmico (RS) a través de la activación del receptor de IP_3 (RIP_3) y la estimulación del receptor de rianodina (RyR) al interactuar con sus respectivos ligandos. Así mismo, otros mecanismos disminuyen la concentración de Ca^{2+} citoplasmático. La ATPasa de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico (SERCA) se encarga de introducir Ca^{2+} citoplasmático al RS. La extracción de Ca^{2+} al espacio extracelular está regulada principalmente por la ATPasa de Ca^{2+} de la membrana plasmática (PMCA) y el intercambiador de $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ (NCX).

En diferentes tipos de músculo liso se han observado efectos no genómicos inducidos por los andrógenos. En estudios funcionales se observó que la testosterona inhibe totalmente la contracción generada por un agonista muscarínico en músculo liso de la vía aérea (MLVA) de cobayo. Este resultado se reprodujo únicamente con la combinación de nifedipina y 2-APB, denotando la importancia de los VDCC-L y SOC en el mantenimiento del proceso de contracción y sugiriendo la interacción entre la testosterona y ambos mecanismos. En ésta tesis se investigó si el efecto inhibitorio de la testosterona sobre el proceso de contracción en el MLVA de cobayo generado por el carbacol (CCh) ocurre a través del bloqueo de los SOC y VDCC-L.

Para ello, se utilizó la técnica de microfluorimetría donde se mide la concentración de Ca^{2+} citoplasmático en miocitos traqueales de cobayo. La testosterona, a

concentraciones fisiológicas (10 nM), disminuyó significativamente el incremento de la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) generado por el CCh, dicha disminución fue similar a la generada por el metoxiverapamil (D-600) señalando que la testosterona inhibe la entrada de Ca^{2+} a través de los VDCC-L. Por otro lado, se midió la capacidad de estas células para rellenar el RS mediante el índice S2/S1. En condiciones control el RS se rellena 71%; sin embargo, cuando son incubadas por 10 y 15 minutos con testosterona (10 nM), éste disminuye significativamente a 29% y 14%, respectivamente. Se ha demostrado que SOC y VDCC-L son los principales mecanismos encargados del relleno del retículo sarcoplásmico, por lo que éstos resultados sugieren que la testosterona podría actuar sobre el mecanismo de la entrada capacitativa, además de inhibir al VDCC-L. En estudios paralelos, se examinaron los efectos de la testosterona 10 y 32 μM sobre la entrada de Ca^{2+} a través de SOC. La testosterona 10 μM no generó un efecto significativo sobre la velocidad en la entrada de Ca^{2+} , ni sobre la cantidad de Ca^{2+} que ingresa al citoplasma a través de SOC, en tanto que la aplicación de 32 μM disminuyó significativamente la velocidad de la entrada de Ca^{2+} de 1.57 ± 0.30 a 0.73 ± 0.12 nM/s, así como la cantidad de Ca^{2+} que ingresa para mantener los niveles basales (75%). Estos resultados demuestran que a la concentración 32 μM , la testosterona inhibe la entrada de Ca^{2+} a través de SOC, lo cual podría explicar el fenómeno de relajación inducido por este andrógeno en tejido contraído previamente con CCh.

INTRODUCCIÓN

La testosterona

La testosterona es un andrógeno producido por los testículos que no sólo es una hormona espermatogénica sino, también, un activador de genes en la mayoría de los tejidos del organismo.

Los andrógenos son esteroides derivados del ciclopentanoperhidrofenantreno. La molécula de la testosterona presenta una estructura necesaria para su actividad androgénica y está compuesta por 19 C, una doble ligadura entre C4 y C5, un átomo de O en C3 y un OH en C17. Figura 1.¹

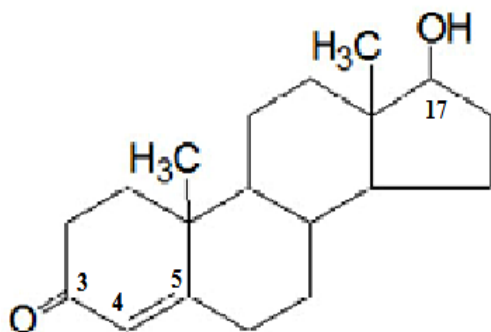


Figura1. Estructura química de la testosterona¹

La testosterona se sintetiza a partir de ésteres de colesterol, los cuales se derivan de las lipoproteínas circulantes y del colesterol formado en el hígado dentro del sistema retículo-endoplásmico de las células de Leydig en los testículos. Los andrógenos también, se sintetizan en ovario y corteza suprarrenal.^{1,}

48, 55

Síntesis, secreción y acción de la testosterona

La hormona luteinizante (LH), liberada de la adenohipófisis por acción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), regula la mayoría de la producción y secreción de esta hormona mediante la unión a su receptor específico, localizado en células de Leydig.

Después de la hidrólisis de los ésteres del colesterol, éste se mueve hacia la mitocondria, en donde se produce la reacción limitante en la formación de la testosterona, que es la síntesis de la pregnenolona; en tanto que el precursor directo de la testosterona es la dehidroepiandrosterona. Aunque, la testosterona es el producto mayor de secreción de los testículos, también, se producen en ellos dihidrotestosterona, androsterona, androstenediona, 17-hidroxiprogesterona, progesterona y pregnanolona.^{1, 48, 55}

La producción diaria de testosterona en el adulto es aproximadamente de 5 – 7 mg y el contenido de testosterona en los testículos del adulto es de 15 a 25 µg, lo que indica que el testículo está produciendo y secretando testosterona a la circulación de manera permanente. Se ha demostrado que la secreción de testosterona y sus precursores ocurre en pulsos, aproximadamente uno por hora, debido a que la producción de la LH ocurre de ésta misma manera. La concentración de testosterona en sangre periférica varía de 300 a 1000 ng/dL (11-36 nmol/L),^{55, 59} lo que no correlaciona con la secreción de testosterona reportada por día. Esto se debe a la presencia de proteínas de unión encargadas del transporte de moléculas no-hidrosolubles, tal como la albúmina y globulina fijadora de hormonas sexuales, además de su degradación y excreción.

La testosterona también actúa como una pro-hormona circulante para dos clases de hormonas esteroideas, los andrógenos reducidos 5-alfa y los estrógenos, los cuales producen la mayoría de las acciones de la testosterona sobre las células.⁵⁵

Dentro de las células de Leydig y algunos otros tejidos la testosterona es convertida a dihidrotestosterona por acción de la enzima 5 α -reductasa tipo 1 y 2; así mismo la mayoría de los estrógenos de la circulación se derivan de la conversión de testosterona a androstenediona a estradiol o estrona, respectivamente, por el complejo enzimático de la aromatasa o estrógeno sintetasa (CYP19), miembro de la superfamilia de la citocromo P450 presente en tejido adiposo, músculo, riñón e hígado. De ahí se deduce que los estrógenos circulantes en los hombres (0.1 – 0.3% de la testosterona producida) son proporcionales a la producción de estos sustratos, como también a la actividad de

la aromatasa en los diferentes tejidos incluyendo al tejido vascular, endotelio y músculo liso. Aunque, la principal función de los estrógenos se ejerce sobre el tejido óseo y cerebro.^{48, 55}

La cantidad de dihidrotestosterona (DTH) en la circulación es el 10% (1-2.9nmol/L) de la testosterona producida³³ y de ésta, el 20% se origina en testículo y el 80% es generado en hígado, riñones, músculo y piel.

La conversión de la testosterona a su metabolito reducido DTH amplifica la acción de la testosterona debido a que presenta una mayor afinidad y menor grado de disociación del RA citosólico.^{48, 55}

Ambos, andrógenos y estrógenos se unen a receptores proteicos de alta afinidad, receptores ER α y ER β en el caso de estrógenos; los complejos resultantes de hormona y receptor alcanzan sitios específicos dentro del núcleo para iniciar el efecto hormonal también denominado genómico. En el testículo existen receptores androgénicos en las células de Sertoli y en células de Leydig, que participan principalmente en el proceso de la espermatogénesis. Se ha determinado la presencia de estos receptores en el músculo esquelético, tejido vascular y placenta, en diferentes especies incluyendo al humano.^{48, 55} En la figura 2 se esquematiza la biosíntesis de la testosterona y otras hormonas gonadales.¹

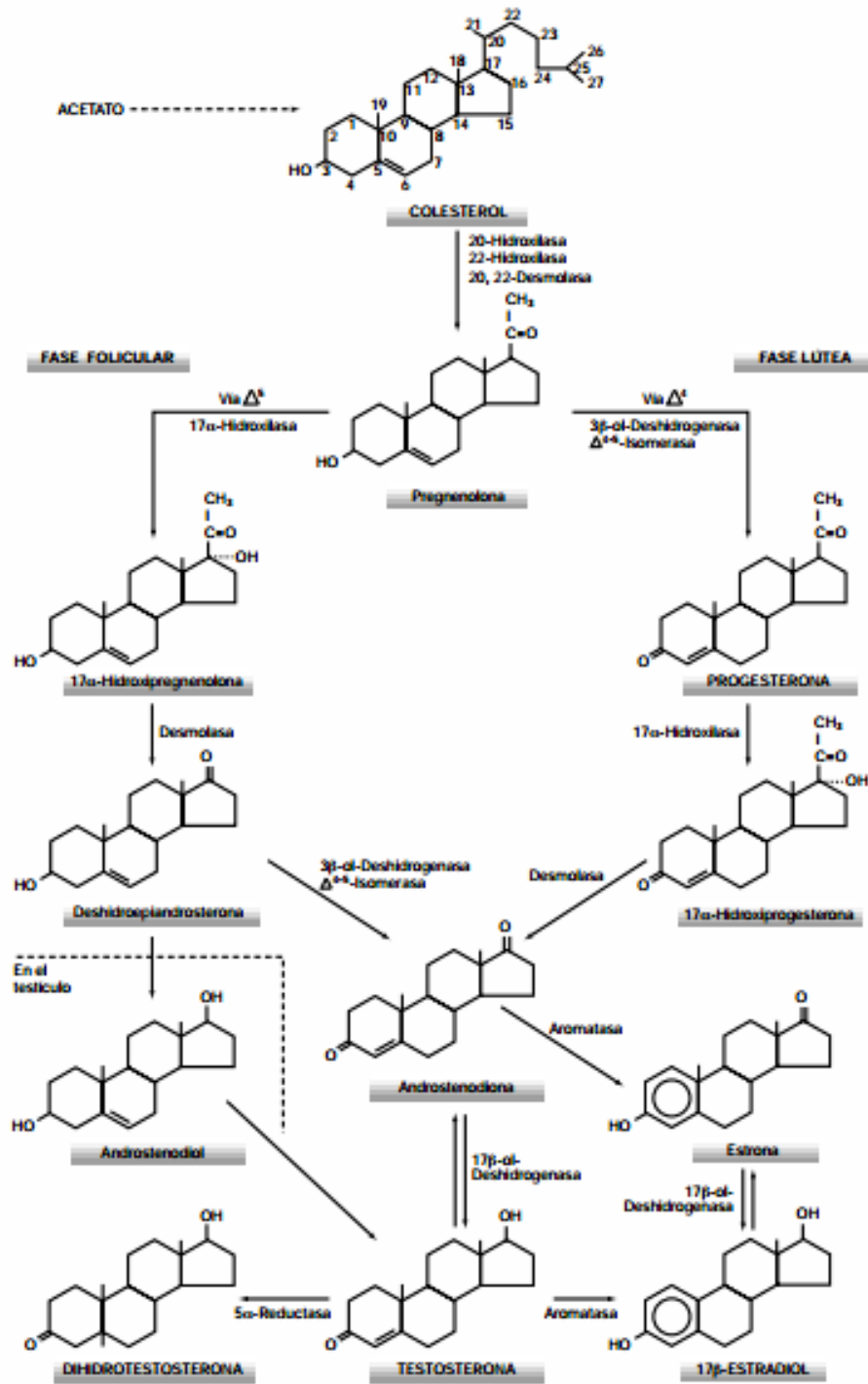


Figura 2. Síntesis de la testosterona y otras hormonas gonadales.
(Tomada de Amado JA., y Florez J., 2003)

Receptores a andrógenos

La testosterona y los andrógenos atraviesan fácilmente la membrana celular y se unen a receptores intracelulares específicos: Estos receptores han sido purificados, son proteínas con un peso molecular aproximadamente de 120 kDa, su síntesis está determinada genéticamente en el cromosoma X. Los receptores androgénicos se localizan principalmente en el citosol y a veces en el núcleo, tienen una estructura modular y están formados por diferentes regiones que corresponden a dominios funcionales autónomos.⁴⁹ El receptor nuclear típico tiene un extremo N- terminal, un dominio de unión a DNA, una región bisagra, una región carboxiterminal que contiene al dominio de unión de ligando y una región de dimerización. Los receptores nucleares tienen además, dos dominios de activación de transcripción, uno dependiente y otro independiente de ligando, localizados en diferentes regiones.⁵⁵ Actúan como factores de transcripción dependientes de ligando regulando la expresión de genes específicos.

Efectos genómicos

Como se mencionó anteriormente, la vía clásica de acción de los andrógenos involucra la unión del esteroide con el RA actuando como factores de transcripción. Se ha descrito que, las acciones más importantes de los andrógenos son: regulación de la secreción de gonadotropinas por medio del sistema hipotálamo hipofisario, el cual regula la producción de testosterona; iniciación y mantenimiento de la espermatogénesis, formación del fenotipo masculino durante la diferenciación sexual, activación de la maduración sexual durante la pubertad y el control del comportamiento sexual y potencia en el hombre.

Aunque la testosterona circula por todo el cuerpo, los mecanismos encargados de la sensibilidad a la testosterona presente en cada uno de los tejidos permanecen desconocidos. Existen determinantes biológicos que pueden ser considerados como participes de la sensibilidad, tal como la presencia de polimorfismos de los RA, correguladores, enzimas del metabolismo de andrógenos, mecanismos no genómicos y el nivel de expresión de los RA, que se ha considerado constante.

Además de las acciones producidas por la vía clásica, se han descrito otro tipo de respuestas atribuidas a los andrógenos, cuya principal característica es la velocidad a la que ocurren, mucho mayor que los efectos genómicos. Dichas respuestas se conocen como los efectos no genómicos.⁴⁸

Efectos no genómicos

Actualmente, existe mucha evidencia sobre los efectos no-genómicos o rápidos de los esteroides, incluyendo a los andrógenos. Se distinguen principalmente por la rapidez del inicio, que va de segundos a minutos y es más rápido que los efectos genómicos, además de insensibilidad a la inhibición en la síntesis de RNA y proteínas, no se bloquean por antagonistas a RA y sus efectos pueden ser producidos por esteroides incapaces de entrar al núcleo de la célula.

Se ha propuesto que la mayoría de los efectos no genómicos se dan a través de su interacción con proteínas membranales, aunque existe evidencia que indica su mediación por RA^{13, 33, 49} y se han descrito sitios putativos de unión a esteroides en algunos receptores incluyendo a andrógenos, así, en mamíferos se ha identificado un receptor membranal a progesterona, aunque su caracterización funcional no se ha llevado a cabo.²⁵ Del mismo modo se han realizado estudios preliminares para caracterizar receptores no membranales con sitios de unión a andrógenos pero, aún hacen falta muchos estudios para comprobar su funcionalidad.

Los efectos no genómicos generados por andrógenos involucran la activación de segundos mensajeros convencionales pertenecientes a cascadas de señalización y transducción tal como, Ca^{2+} citosólico, activación de la proteína cinasa A (PKA), proteína cinasa C (PKC) y proteína cinasa activada por mitógenos (MAPK)⁴⁸, bloqueo de VDCC^{27, 36, 42, 53, 57, 69, 70}, activación de corrientes de K^+ inducidas por Ca^{2+} ^{15, 23, 24, 66, 73, 78}, resultando en diversos efectos celulares como la plasticidad neuronal, relajación neuromuscular y la relajación del músculo liso. En la figura 3 se muestra la propuesta de los diferentes mecanismos por los que la testosterona genera efectos genómicos y no genómicos.⁴⁸

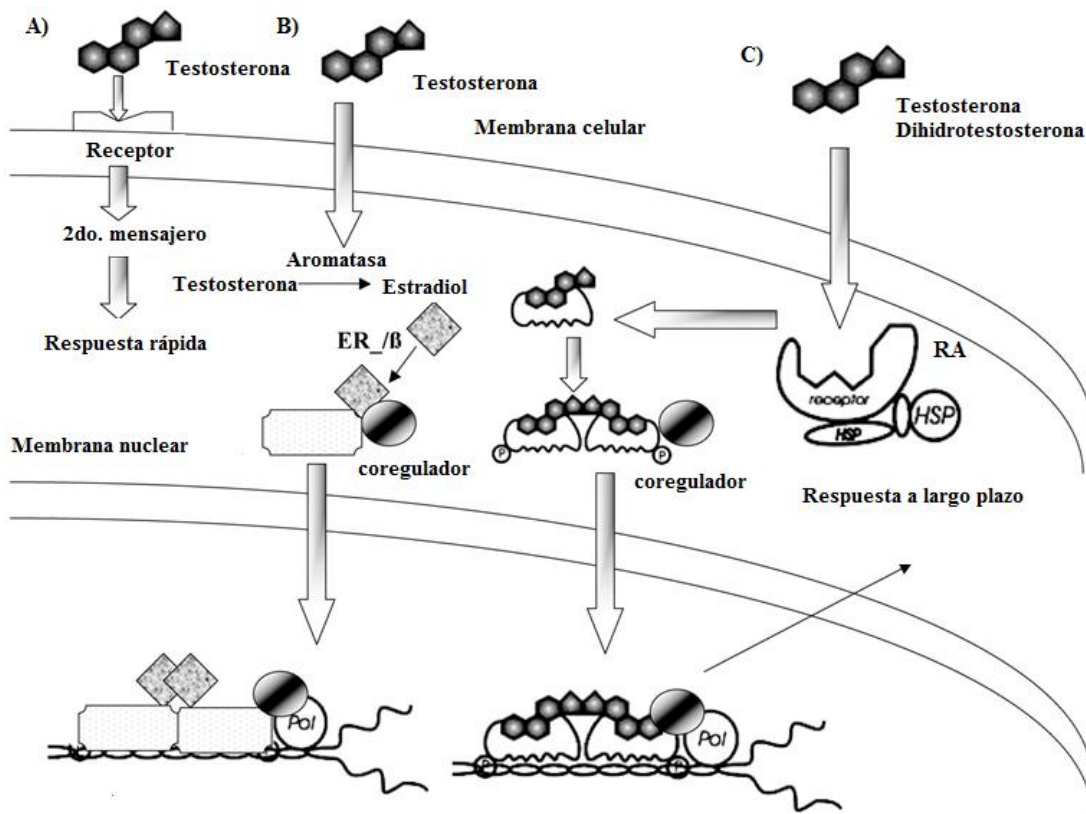


Figura 3. Propuesta del mecanismo de los efectos genómicos y no genómicos de la Testosterona. A) Efectos no-genómicos de la testosterona originados a través de su unión con receptores membranales (no clásicos), B) La testosterona atraviesa la membrana plasmática y es aromatizada a estradiol por medio de la CYP19, permitiendo su unión y activación de receptores a estrógenos (ER α y β). C) La testosterona o sus metabolitos reducidos se unen a receptores a andrógenos (RA). Tanto en B como en C la unión de los respectivos ligandos a sus receptores generará efectos genómicos. (Modificada de Liu PY y Cols., 2003)⁴⁸

Regulación del Ca²⁺ intracelular

El ion Ca²⁺ es un mensajero intracelular y el catión divalente de mayor prevalencia en el organismo, presente en diversos tipos celulares. El incremento de la [Ca²⁺]_i en el tiempo y el espacio regula múltiples procesos celulares. En milisegundos se genera excitación; en segundos contracción y por minutos u horas origina eventos tales como la transcripción, fertilización, proliferación celular y apoptosis.^{11, 18}

La habilidad que presenta el Ca²⁺ de alterar las propiedades electrostáticas y la conformación de las proteínas son dos herramientas universales en la transducción de señales. Se propone que el Ca²⁺, además, de generar respuesta en una vía de señalización, también, es capaz de regular la expresión de los componentes que participan en dicha vía de señalización mediante

retroalimentación negativa.^{11, 18} Para mantener la homeostasis en la célula, el Ca^{2+} debe almacenarse, quelarse y liberarse controladamente.¹⁸

En células musculares lisas existe un organelo muy desarrollado que sirve como almacén de Ca^{2+} , que contiene concentraciones de alrededor de 5-10 mM, denominado RS que participa de forma importante en regular su concentración intracelular así como en la contracción muscular.^{20, 39} En miocitos de la vía aérea la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en estado de reposo es aproximadamente de 128 nM y es necesaria para mantener el tono basal del músculo liso.^{39, 52} Por otro lado, la concentración fisiológica de éste ion en el medio extracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_e$) es ~ 1 a 2 mM.^{35, 39} Cuando las células son estimuladas por agonistas broncoconstrictores como acetilcolina (ACh), histamina (HA) o serotonina (5-HT) puede haber un incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de hasta 500-700 nM.^{14, 52} En el MLVA, el aumento o la disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$, tiene un papel muy importante en la relación contracción/relajación.³

La actividad contráctil del músculo liso está bajo control neurogénico y hormonal. Sin embargo, el control de la actividad contráctil varía dependiendo del tipo de músculo, función y localización. El músculo liso no presenta una sarcómera organizada como el músculo estriado, y se caracteriza por la ausencia de túbulos T, reflejando éstas diferencias en el mecanismo de contracción. La maquinaria contráctil de estas células está constituida por: a) filamentos gruesos de miosina (~12-15 nm), b) filamentos finos de actina (~7 nm) y por c) filamentos intermedios (~10 nm) compuestos por desmina y vimentina. La miosina es un hexámero constituido por dos cadenas asimétricas pesadas (200-204 kDa) y dos pares de cadenas ligeras (CLM) de 17 y 20 kDa.³⁹ Las dos cadenas pesadas forman una doble hélice, denominada cola de la miosina, el otro extremo de cada una de éstas cadenas está plegado en una estructura polipeptídica globulosa y junto con los dos pares de cadenas ligeras forman la cabeza de la miosina que, además de servir como sitio de interacción con la actina, presenta actividad ATPasa que le proporciona la energía necesaria para llevar a cabo el proceso de contracción.³⁵

Según la teoría de la contracción muscular por deslizamiento de los filamentos, la contracción del MLVA se produce como resultado de las interacciones actina-miosina que generan movimientos entre los filamentos gruesos y delgados.³⁹ Para

que ocurra la contracción, la cinasa de la cadena ligera de la miosina (MLCK) debe fosforilar a la cadena ligera de la miosina de 20-kDa en la serina-19, permitiendo la interacción entre la miosina y la actina. La energía liberada de la hidrólisis de ATP hacia ADP por la actividad de la ATPasa de la miosina resulta en la formación de los puentes cruzados con la actina, necesarios para la contracción.^{19, 39, 60, 72} Para generar un proceso de contracción en el MLVA, agonistas broncoconstrictores como la ACh, HA y 5-HT estimulan a sus respectivos receptores membranales acoplados a proteínas G (GPCR) del tipo Gq^{14, 52}, lo que conducirá a la activación de la fosfolipasa C_β (PLC_β).

La PLC_β cataliza la ruptura del fosfatidil-inositol 4,5-bisfosfato (PIP₂) para producir inositol 1, 4, 5-trisfosfato (IP₃) y diacilglicerol (DAG). La unión de IP₃ a sus receptor (RIP₃), localizado en la membrana del RS generará la liberación masiva de Ca²⁺ al citoplasma.^{6, 11} El incremento de la [Ca²⁺]_i promueve la formación del complejo Ca²⁺-calmodulina. La interacción de este complejo con la subunidad catalítica de la MLCK permite la fosforilación de la cadena ligera de la miosina. Al mismo tiempo, se activa otra vía de señalización, la RhoA-Cinasa (ROCK), cuya función es inactivar a la fosfatasa de la cadena ligera de la miosina (MLCP), encargada de desfosforilar a la CLM, permitiendo el mantenimiento de la contracción. Este proceso es conocido también como sensibilización al Ca²⁺.⁷²

El proceso de relajación del músculo liso ocurre como resultado de la remoción del estímulo generador de la contracción que se traduce en la disminución de la [Ca²⁺]_i a niveles basales, el cual inactiva a ROCK, permitiendo que la MLCP desfosforile a la cadena ligera de la miosina de 20 kDa⁷² o mediante la acción directa de una sustancia que estimule la inhibición del mecanismo contráctil. De ésta manera, los mecanismos responsables de mantener la concentración intracelular de Ca²⁺ en niveles basales juegan un papel primordial en la homeostasis del músculo liso de la vía aérea.

Mecanismos que mantienen la concentración de Ca^{2+} intracelular

Diferentes mecanismos se encargan de regular la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Actualmente se conocen tres proteínas transportadoras que participan en la homeostasis del Ca^{2+} , dentro de los que se encuentran: 1) La PMCA que funciona transportando Ca^{2+} del citoplasma hacia el medio extracelular. 2) La SERCA la cual, transporta Ca^{2+} del citoplasma al interior del RS. Ambas proteínas utilizan ATP como fuente de energía para transportar Ca^{2+} en contra de su gradiente electroquímico. Son ATPasas del tipo P por la generación de un intermediario fosforilado obligado (aspartilfosfato) durante el ciclo de transporte. Aunque, ambas ATPasas poseen diez dominios transmembranales y la homología entre ellas es muy baja.¹⁸ La PMCA y la SERCA presentan una gran afinidad por el Ca^{2+} pero una velocidad de transporte baja en comparación con canales y contratransportadores que trabajan sin gasto de energía.¹¹ 3) El NCX, un contratransportador, que trabaja a favor del gradiente electroquímico del Na^+ y cuya función es sacar un ion de Ca^{2+} al espacio extracelular por cada tres iones Na^+ que introduce al citoplasma provenientes de espacio extracelular.²⁰ Además, el Ca^{2+} interactúa con diversas proteínas en el citoplasma (alrededor de 200 codificadas en el genoma humano), que actúan como reguladores y son consideradas amortiguadoras de Ca^{2+} .¹¹ Dentro de estas proteínas amortiguadoras se encuentra la familia de las calmodulinas, anexinas y la calpaina.¹⁸

La ATPasa de Ca^{2+} de retículo sarcoplásmico

En la década de los 60's se describió el primer transportador de Ca^{2+} dependiente de ATP, éste transportador fue descubierto en músculo esquelético y anteriormente era conocido como el factor de relajación de Marsh. Años más tarde, se identificó como una proteína de aproximadamente 110 kDa localizada en la membrana del RS.^{9, 56}

La SERCA está codificada por 3 genes (SERCA 1, 2 Y 3) localizados en diferentes cromosomas. Existen muchas variantes "splicing" para esta proteína, por lo que se conocen más de 10 isoformas de la SERCA presentes en distintos tejidos y estados de desarrollo SERCA1 se expresa en músculo esquelético y

contiene a los subtipos SERCA1a y SERCA1b, los cuales se expresan en diferentes etapas del desarrollo.⁹ Las formas del “splicing” alternativo de SERCA2 han sido detectadas en músculo cardíaco y esquelético (SERCA2a) y en el MLVA, así como tejidos no musculares (SERCA2b). Una tercera isoforma de SERCA2 (SERCA2c) se encuentra tanto en el músculo cardíaco como en tejidos no musculares, incluyendo, células epiteliales, mesenquimales y hematopoyéticas. SERCA3 se expresa de manera selectiva principalmente en intestino, bazo, pulmón, útero y cerebro.²⁶

Todos los transportadores tipo P son inhibidos por el ion lantánido (La^{3+}) y ortovanadato. Específicamente la SERCA es inhibida selectivamente por la tapsigargina y por el ácido ciclopiazónico (CPA), donde, el segundo presenta una menor afinidad y su inhibición se da de manera reversible. Estudios recientes han demostrado que el CPA inhibe la actividad de la SERCA impidiendo el acceso del Ca^{2+} al transportador.⁹

ATPasa de Ca^{2+} de membrana plasmática

El transportador PMCA fue descubierto en eritrocitos por Schatzmann (1966) como un sistema dependiente de ATP que expulsaba Ca^{2+} del citoplasma al medio extracelular.⁶⁷ Esta ATPasa tipo P opera con una gran afinidad al Ca^{2+} y baja capacidad de transporte con una estequiometría $\text{Ca}^{2+}/\text{ATP}$ 1:1.⁹

Se han descubierto 4 genes involucrados en la producción de la PMCA de una manera tejido-específica, con una gran cantidad de isoformas generadas por splicing alternativo.¹⁸ Los 4 productos génicos difieren en su distribución en los tejidos, así como la afinidad a calmodulina. PMCA 1 y 4 están presentes en músculo liso, aunque, se consideran ubicuas y su expresión varía durante el desarrollo⁴⁷, y presentan una afinidad baja por la calmodulina, mientras que PMCA 2 y 3 presentan una alta afinidad por el Ca^{2+} y se localizan en tejidos específicos, siendo PMCA2 en sistema nervioso y glándulas mamarias, en tanto que PMCA3 se encuentra solamente en sistema nervioso.⁹

Los inhibidores de PMCA son el La^{3+} y la carboxieosina, recientemente se ha reportado que la Caloxina inhibe de forma no selectiva a la PMCA.^{65, 79}

Intercambiador Na⁺/Ca²⁺

El NCX es una proteína que se encuentra en la membrana plasmática de todas las células del organismo. Como se mencionó anteriormente, su función principal es sacar un ion Ca²⁺ del citoplasma al espacio extracelular e introducir tres iones Na⁺ del espacio extracelular al citoplasma, sin gasto de ATP, utilizando la carga neta positiva del Na⁺. Las primeras evidencias sobre la existencia del intercambiador Na⁺/Ca²⁺ fueron dadas por Reuter y Seitz (1968) donde, en músculo cardíaco propusieron un mecanismo responsable de expulsar Ca²⁺ al espacio extracelular regulado por la concentración de Na⁺ extracelular.⁶⁴

Este intercambiador posee la capacidad de cambiar su direccionalidad dependiendo del gradiente de Na⁺, pasando de su forma normal a la forma reversa (NXC_{REV}) donde introduce un ion Ca²⁺ por cada tres iones Na⁺ que saca de la célula.^{20, 51} Hasta el momento se han logrado identificar tres formas del intercambiador: NCX 1, 2 y 3. El NCX1 se localiza en cerebro, músculo esquelético, músculo liso vascular y MLVA; el NXC2 se localiza principalmente en estómago y el último de ellos se expresa principalmente en músculo cardíaco, aunque puede encontrarse en casi todos los tejidos.^{20, 51}

Mecanismos que aumentan la concentración de Ca²⁺ intracelular

Existen 2 fuentes principales que generan el aumento de la [Ca²⁺]_i: 1) El RS es el reservorio más importante de Ca²⁺ en el MLVA, se almacenan alrededor de 5-10 mM. En la membrana de RS se localizan 2 receptores canal por medio de los cuales se libera Ca²⁺ del interior del RS al citoplasma. Uno de ellos es el RIP₃ y el otro es el RyR.³

Anteriormente se describió como se produce el IP₃, el cual actúa como segundo mensajero mediante la unión a su receptor tetramérico situado en el RS produciendo la liberación del Ca²⁺ almacenado.^{6, 11} El Ca²⁺ también puede ser liberado mediante el RyR localizado en el RS, este receptor es activado cuando las [Ca²⁺]_i aumenta por arriba de la basal, es decir por encima de 100 nM, así como por fármacos administrados exógenamente, tal como la cafeína y la rianodina.⁶⁰

2). El Ca^{2+} extracelular que ingresa a la célula a través de diferentes canales membranales tales como los VDCC^{10, 16, 17}, ROC^{44, 52} y SOC.³ Los últimos dos permiten la entrada de Ca^{2+} y Na^+ al citoplasma. Además, se encuentra dentro de éstos mecanismos al intercambiador $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ en su fase reversa cuya función es introducir un ion Ca^{2+} y sacar tres iones Na^+ de la célula.²⁰

Canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje

Los VDCC se localizan en la membrana plasmática de células excitables como neuronas y células musculares. Estos canales permiten la entrada de Ca^{2+} al citoplasma en respuesta a una despolarización de la membrana.^{10, 16, 17}

Los canales de Ca^{2+} son complejos formados por cuatro o cinco subunidades producto de múltiples genes: una subunidad $\alpha 1$ de ~190 a 250 kDa que contiene los dominios funcionales más importantes: el poro, la región sensible al voltaje, la maquinaria de apertura y la mayoría de sitios de regulación. Consiste en 4 dominios (I-IV), cada uno compuesto por 6 segmentos transmembranales (S1-S6). S4 de cada dominio tiene la función de detectar el voltaje, mientras que S5 Y S6 determinan la selectividad y la conductancia del ion. Además, contiene un complejo transmembranal unido por un puente disulfuro por las subunidades $\alpha 2$ y δ que aparentemente regula el procesamiento intracelular y promueve la expresión del canal; una subunidad β , que es una proteína intracelular y parece modificar la sensibilidad al voltaje y la cinética del canal.^{10, 16, 17} Durante el potencial de reposo (-90 a -60 mV) los canales permanecen cerrados y dependiendo del subtipo de canal la apertura puede ocurrir al alcanzar voltajes de -65 a -20mV. La clasificación de los VDCC se genera mediante las diferencias farmacológicas, electrofisiológicas y recientemente moleculares. Con base en esto, ha surgido una nomenclatura alfabética para la clasificación de estos canales que han sido nombrados: L, N, P, Q, R y T^{16, 17} Sin embargo, la clasificación más utilizada se basa en el rango de voltaje necesario para su activación. Los canales que requieren pequeñas despolarizaciones para su activación se denominan canales activados por bajo voltaje (LVA), dentro de los cuales se encuentran los canales tipo T. En cambio, los canales que requieren despolarizaciones más

grandes se conocen como canales activados por alto voltaje (HVA), dentro de los cuales, el más estudiado es el tipo L. El VDCC-L presenta sensibilidad al bloqueo por dihidropiridinas tal como nifedipina. Las dihidropiridinas pueden ser activadoras o bloqueadoras del canal, por lo que se cree actúan alostéricamente para mantener en una conformación abierta o cerrada. Su sitio de unión incluye a residuos de aminoácidos de los segmentos S de los dominios III y IV y del segmento S5 del dominio II.^{16, 71}

Distintos tipos de fármacos no dihidropiridínicos incluyendo verapamil (una fenilalquilamina) y diltiazem (una benzodiacepina) también bloquean VDCC-L aunque con menos especificidad. Se ha encontrado VDCC-L en músculos cardíaco, liso, esquelético y neuronas. Se han descrito también, canales tipo N, presentes en neuronas y células neuroendócrinas, así como tipos P y Q presentes en neuronas de Purkinje.^{16, 17}

Canales operados por el receptor

Los ROC son canales iónicos que se abren debido a un estímulo con un agonista externo permitiendo la entrada de Ca^{2+} y Na^+ . Wang y Cols. (1997), describieron en músculo liso traqueal de equino una corriente de cationes no selectiva, por la cual puede entrar Ca^{2+} al citoplasma, activada por la estimulación de receptores muscarínicos. Esta corriente requiere la activación de receptores M_2 sensibles a la toxina pertussis (PTX) y de incrementos en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en músculo liso.⁷⁴ Más tarde Kotlikoff y Cols. (2000), encontraron en músculo liso traqueal de equino que los receptores histaminérgicos H_1 también, eran capaces de activar una corriente catiónica no selectiva y que el mecanismo era parecido a la activación muscarínica por la necesidad del incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. A partir de esto, se conoce que los receptores M_2 y H_1 modulan la apertura de los canales ROC a través de proteínas Gi/Go , lo cual resulta en una elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$.⁴⁴

Entrada capacitativa ó canales operados por almacén

La idea original de que el Ca^{2+} podría entrar a la células mediante un mecanismo capacitativo fue propuesta por Jim Putney (1986), basado en que la entrada de Ca^{2+} estaba regulada por el vaciamiento de almacenes de Ca^{2+} tal como el RS y que estaba mediada por canales en la membrana plasmática.^{5, 61} Posteriormente, en células de MLVA de humano Amrani y Cols. (1995), observaron un incremento en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ generado después de el vaciamiento del RS, sugiriendo la presencia del mecanismo de entrada capacitativa.² La corriente mediante la cual se genera la entrada de Ca^{2+} fue identificada propiamente años más tarde por Hoth y Penner (1993). Fue definida como “corriente de Ca^{2+} activada por la liberación de Ca^{2+} ” (I_{CRAC}) del RS.³⁸

El proceso de entrada capacitativa no es activado por voltaje y es conocido también, como la entrada de Ca^{2+} operada por el almacén (SOCE). Se ha identificado a los canales operados por almacén (SOC) como participantes en la SOCE y es conocido como uno de los mecanismos dominantes en la modulación del Ca^{2+} en el MLVA.

Experimentalmente los almacenes de Ca^{2+} del RS pueden ser vaciados mediante la inhibición de la SERCA (utilizando tapsigargina o CPA), la exposición a quelantes de Ca^{2+} como EGTA, mediante la activación de receptores acoplados a proteínas G vía el RIP_3 , y la liberación por RyR por la aplicación de cafeína en medio sin Ca^{2+} . Tras dicho vaciamiento, la entrada de Ca^{2+} ocurre principalmente a través de SOCE.

Se ha postulado que algunas proteínas de la familia de los canales potenciales de receptor transitorio (TRPs) intervienen en la constitución de los SOC. En el caso del MLVA se ha puesto especial atención en la subfamilia de las TRP canónicas (TRPC), especialmente TRPC 3 y 6.^{4, 31, 76}

La molécula de interacción estromal (STIM) localizada principalmente en RS fue reportada por primera vez por Oritani y Cols. (1996), aunque, el papel de STIM en la señalización del Ca^{2+} no había sido dilucidado hasta el 2005. Existen dos subtipos (1 y 2) y se ha demostrado que STIM1 se localiza en la membrana del RS e indica a la célula que es necesario el incremento en el flujo de Ca^{2+} hacia el

interior de la célula por el vaciamiento de los almacenes de Ca^{2+} . Subsecuentemente, Prakriya (2006) encontró una proteína transmembranal denominada Orai1, necesaria para la SOCE ya que formaba parte del poro en los SOC.⁶²

El proceso por el que se lleva a cabo SOCE se resume en que debido al vaciamiento de Ca^{2+} del RS, STIM1 polimeriza y se mueve a través del RS justo debajo de Orai1, localizado en la membrana plasmática aproximando al RS a la membrana plasmática (25 nm) aunque, un contacto directo no ha sido comprobado. Se cree que dicha aproximación facilita la captura de Ca^{2+} por parte del RS. La entrada de Ca^{2+} mediante SOC no sólo participa en el reabastecimiento de almacenes intracelulares, si no también, provee Ca^{2+} que participa en la mantención de la contracción y puede iniciar otros mecanismos celulares¹¹ aunque, se requiere de mucha más investigación para conocer del todo el funcionamiento de éste mecanismo, así como sus componentes moleculares y participación en otras actividades celulares. Figura 4.

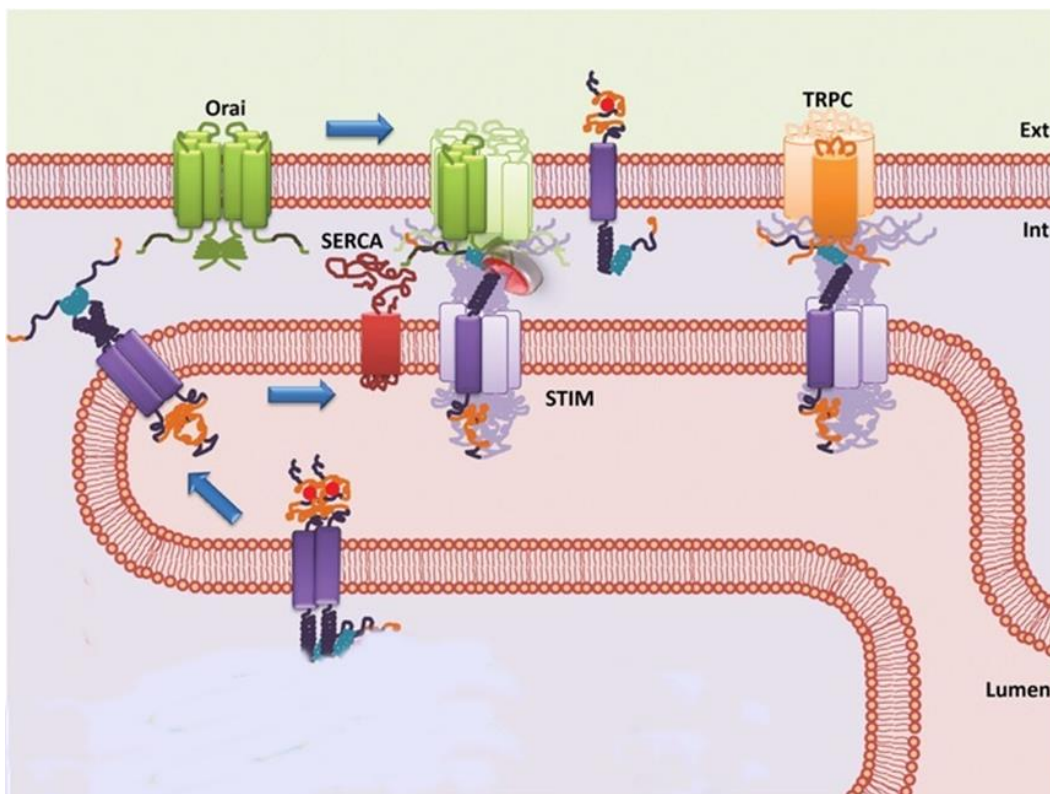


Fig. 4. Ensamblaje molecular del complejo SOC. Durante el vaciado del RS, se activa la formación de oligómeros de STIM altamente ordenados que son reclutados hacia la membrana plasmática, donde inducen la formación y apertura del canal Orai (Modificada de Shen y Cols., 2011)⁶⁸.

Actualmente, se han utilizado algunas sustancias como el 2-aminoetil difenil borato (2-APB) y el 1-(beta-[3-(4-metoxi-fenil) propoxil]-4-metoxifenetil)-1H-imidazol hidrocloreto (SKF 96365) como bloqueadores de la entrada capacitativa de Ca^{2+} en miocitos de la vía aérea, vasculares y células cebadas.^{38, 77}

En el laboratorio se ha comprobado que el relleno del RS depende no sólo de la entrada capacitativa, si no también, de otro mecanismo no capacitativo. Esto se descubrió mediante el uso de bloqueadores específicos para canales SOC y otros canales como los VDCC-L y NCX_{REV} además, de la combinación de los mismos en el proceso de relleno del RS asegurando el completo vaciamiento previamente.³⁰ Se ha demostrado además, que la entrada de Ca^{2+} a la célula ocurre a una mayor velocidad cuando se genera un vaciamiento del RS mayor al 50% del contenido en condiciones basales. Esto implica la participación de la entrada capacitativa cuando los niveles de Ca^{2+} en el retículo son menores al 50%.³

Efecto de los andrógenos en el músculo liso

Músculo liso intestinal

En años anteriores se han demostrado y caracterizado algunos de los efectos genómicos y no genómicos de los andrógenos en diferentes tipos de músculo liso. De ésta manera, existen reportes en músculo liso intestinal en los cuales, la pre exposición aguda (<30 min) de testosterona y dihidrotestosterona, en concentraciones fisiológicas, aumenta tanto el espectro de frecuencia de la actividad peristáltica, es decir, las contracciones del músculo liso intestinal, como la amplitud de la actividad contráctil inducida por un agonista colinérgico. Este efecto fue observado en íleo y colón de ratón pero no así en duodeno.³³ Se determinó que dicho efecto ocurre mediante la interacción de la testosterona con RA en un efecto no-genómico, ya que no involucraba la transcripción génica, y que estaba mediado por un proceso de sensibilización al Ca^{2+} generado por la activación de la ROCK en el que estaba involucrada la vía de síntesis de las poliaminas.^{32, 33} Estas moléculas (putresina, spermidina, spermina) se han

propuesto como transductores de la potenciación mecánica de los andrógenos en diferentes tejidos debido a que las poliaminas activan ROCK y su síntesis es estimulada directamente por la testosterona y sus derivados.^{12, 32, 40, 43, 54}

Todo esto sugiere que las hormonas esteroideas pueden participar como moduladores fisiológicos de la contractilidad intestinal.^{32, 33}

Músculo liso vascular

Muchos estudios han tratado de determinar la participación de la testosterona y sus metabolitos en la regulación de tono del músculo liso vascular (MLV). Hasta el momento los resultados obtenidos han sido variados e incluso contradictorios y se han atribuido dichas diferencias al tipo específico de tejido vascular, la especie, la concentración de testosterona empleada y la presencia o ausencia de endotelio. Perusquía y Cols. (2010), sugieren que el efecto vasodilatador de la testosterona a concentraciones fisiológicas (11-36 nmol/L) y menores a las farmacológicas (100 nM -10 µM) es, en parte, dependiente de la producción de óxido nítrico (ON) por el endotelio, mientras que la vaso-relajación observada a concentraciones farmacológicas (>10 µM) parece ser independiente del endotelio.⁵⁹

Estudios sobre la función estructural de la testosterona empleando análogos y derivados han demostrado que su efecto en la vasodilatación es no-genómico, específico de la estructura y que difiere de los efectos genómicos.^{24, 58, 78} Massheimer y Cols. (2012), determinaron en músculo liso vascular de ratas hembras que éste efecto es independiente de la aromatización de la testosterona a estradiol mediante el uso de anastrozol, un inhibidor específico de CYP19, la cuantificación de estradiol en la muestra que permaneció constante y mediante el bloqueo de receptores a estrógenos, que no afectaron la producción de ON. Además, determinaron que el efecto relajante depende directamente de la participación de RA ya que su antagonismo con flutamida inhibió totalmente al efecto vaso-relajante, lo cual, también ocurrió al inhibir a la 5α-reductasa indicando la participación de los derivados reducidos en la producción de ON y su efecto relajante.¹³ Así mismo, se ha determinado que dicho efecto relajante está asociado con la modulación de la función de canales iónicos de la membrana

plasmática de células del MLV, principalmente la inactivación de VDCC-L^{27, 36, 42, 53, 57, 69, 70} y la activación de canales de K⁺, particularmente los dependientes del voltaje (K_v) y/o el canal de K⁺ de larga conductancia dependiente de Ca²⁺^{15, 23, 24, 66, 73, 78}, aunque ambos mecanismos sólo se han estudiado por separado por lo que es necesario un estudio simultáneo para determinar su papel dentro del efecto de la testosterona.⁵⁹

Estudios de “Patch Clamp” realizados en células de MLV han corroborado lo establecido en los estudios funcionales.⁵³ Además, se ha demostrado, que la testosterona inhibe las corrientes de Ca²⁺ a través de VDCC-L en células de MLV de rata y que su inhibición ocurre mediante la unión de la testosterona al mismo sitio de acción de la nifedipina, una dihidropiridina^{53, 69} y que su efecto se asimila al generado por la nifedipina, es decir, presenta un efecto antagonista a bajas concentraciones (nM) y agonista al incrementar la entrada de Ca²⁺ a través de los VDCC-L a concentraciones mayores (32 µM).⁵³ Se propone además que muchos otros mecanismos pudieran estar involucrados en el proceso de vasorelajación generado por la testosterona y sus metabolitos tanto a concentraciones fisiológicas como farmacológicas. Por ejemplo, la participación de ROC y SOC, así como la modulación de otros segundos mensajeros además del Ca²⁺, tal como el GMPc y el AMPc.⁵⁹

Massheimer y Cols. Caracterizaron el efecto de los andrógenos en el músculo vascular y proponen además, el efecto no genómico de la producción de ON es mediado por la entrada de Ca²⁺ extracelular, así como MAPK y la activación de la PKC.¹³

Como se mencionó anteriormente, existe una gran variabilidad en los resultados obtenidos en diferentes tejidos vasculares y en diferentes especies lo que indica, además de la variabilidad, diferencias importantes en la regulación en el funcionamiento del tejido vascular.

Músculo liso de las vías aéreas

En estudios recientes in vitro, se ha demostrado que la testosterona y sus metabolitos 5-reducidos, 5 α y 5 β dihidrotestosterona (DHT), inducen relajación del MLVA en diversas especies. Koulomenta y Cols. (2006), demostraron en MLVA de conejo que la testosterona, a concentraciones fisiológicas y farmacológicas, produce relajación en tejido pre-contraído con Ach y CCh, y que es dependiente de la concentración y de la producción de ON por epitelio. El efecto relajante se encontraba mediado aparentemente por un efecto no-genómico y que no resulta de la alteración en la expresión de receptores colinérgicos.⁴⁵

Recientemente Bordallo y Cols. (2008), demostraron en bovino y cobayo el efecto relajante inducido por la testosterona y sus metabolitos reducidos en la contracción generada por CCh y KCl. La remoción del epitelio no modificó el efecto relajante de la testosterona y sus metabolitos, además, observaron que la acción relajante de los andrógenos es independiente de los RA, se descartó que dicho efecto pudiera ser a través de la activación de receptores adrenérgicos β_2 o incrementos en los niveles de AMPc y que los andrógenos generaran un aumento en la síntesis de poliaminas contrariamente a lo demostrado en el músculo liso intestinal.

Estos autores no caracterizaron los mecanismos por los cuales las testoteronas y sus metabolitos producen el efecto relajante, pero si proponen que puede ser vía la inhibición del VDCC-L, activación de corrientes de K⁺ activadas por Ca²⁺, lo cual nos llevaría a la hiperpolarización del músculo y a la subsecuente relajación, como ha sido propuesto en MLV.⁸

En estudios funcionales realizados en nuestro laboratorio se observó que la testosterona inhibe en su totalidad la respuesta generada por el CCh 1 μ M en forma dependiente de la concentración, observándose una inhibición total de la contracción a la concentración de 100 μ M. Figura 5.

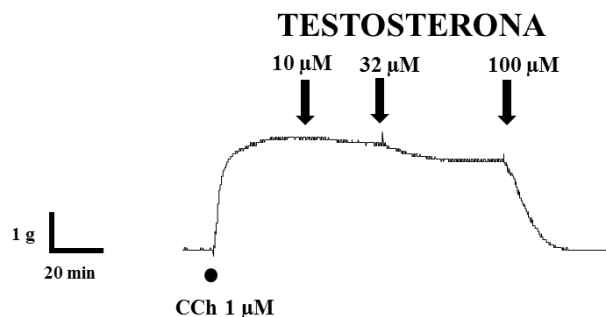


Figura 5. Registro original del efecto relajante de la testosterona de manera acumulativa a las concentraciones de 10, 32 y 100 μM sobre la contracción inducida por el CCh (1 μM) en anillos traqueales de cobayo. Datos no publicados.

Por otro lado, se observó que la Nifedipina, un inhibidor de VDCC-L, que presenta el mismo sitio de unión que la Testosterona^{53, 69}, inhibe únicamente ~15% de la contracción generada en MLVA de cobayo por 1 μM de CCh. Figura 6.

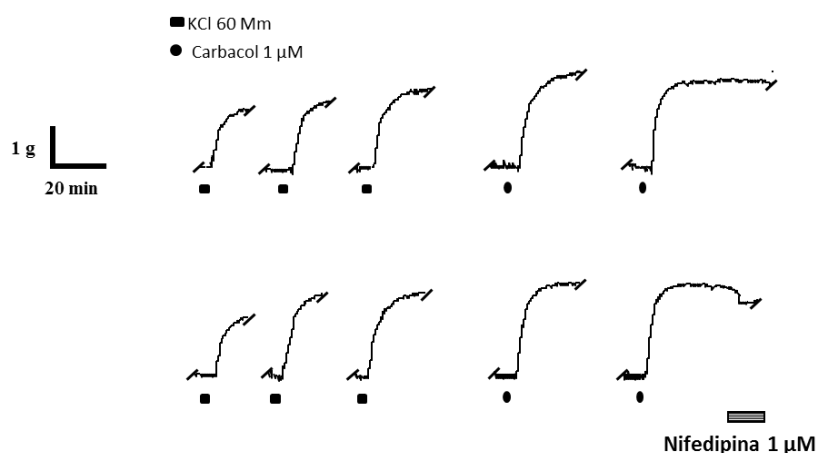


Figura 6. Registro original del efecto de la nifedipina (1 μM) sobre la contracción de CCh (1 μM) en anillos traqueales de cobayo. Datos no publicados

Lo anterior indica la presencia de otros mecanismos que participan en el mantenimiento del proceso de contracción además del VDCC-L, sobre los cuales pudiera estar actuando la testosterona.

En la figura 7 se muestran resultados de nuestro grupo de investigación, en donde el empleo de 2-APB 100 μM , un inhibidor de los SOC^{38, 77}, inhibe también, parcialmente, la respuesta de CCh. En contraste, la combinación de nifedipina y 2-APB inhibe totalmente la contracción generada por el agonista colinérgico

muscarínico independientemente del orden en el que se añadan, tal como ocurre con la testosterona.

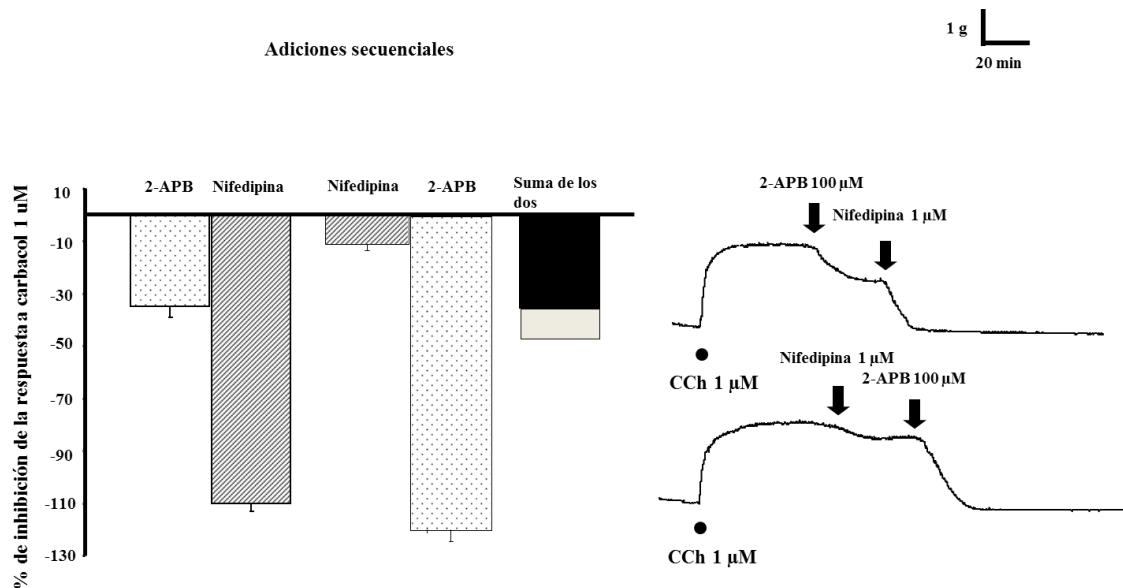


Figura 7. Registro original del efecto de la nifedipina (1 μM) y 2-APB (100 μM) en el mantenimiento de la contracción inducida por el CCh en músculo liso traqueal de cobayo. Esta inhibición es independiente del orden en el cual se añadan la nifedipina y el 2-APB. Datos no Publicados

Esto sugiere que la entrada de Ca^{2+} al citoplasma a través de SOC Y VDCC-L son los responsables de mantener al proceso de contracción y que el efecto de la testosterona probablemente ocurre a través de la inhibición de ambos mecanismos. Por lo tanto, proponemos que la testosterona disminuye el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ generado por agonistas colinérgicos muscarínicos (CCh) mediante la interacción entre la testosterona y VDCC-L así como SOC, mecanismos que intervienen en la entrada de Ca^{2+} en el citoplasma, para rellenar al RS y mantener la contracción.

En la presente tesis se investigó el efecto de la testosterona en el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ generado por el CCh, así como los mecanismos reguladores de la $[Ca^{2+}]_i$ con los cuales la testosterona pudiera estar interactuando para generar dicho efecto en miocitos traqueales de cobayo.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los resultados obtenidos en los estudios funcionales realizados en nuestro laboratorio nos permiten proponer que el efecto inhibitor de la testosterona sobre el proceso de contracción en el MLVA de cobayo, generado por el CCh, ocurre a través del bloqueo de los SOC y VDCC-L. De ésta manera, es importante determinar el efecto de la testosterona en la respuesta generada por el CCh en miocitos traqueales de cobayo, así como su posible participación en el bloqueo de la entrada capacitativa y los VDCC-L responsables, principalmente, del relleno del RS y la contracción del MLVA.

HIPÓTESIS

La testosterona inhibe la contracción generada por el CCh en músculo liso de las vías aéreas de cobayo mediante la inhibición de mecanismos reguladores de la $[Ca^{2+}]_i$ como la entrada capacitativa y VDCC-L.

OBJETIVO

Investigar los mecanismos responsables de la entrada de Ca^{2+} y su regulación por el RS en miocitos traqueales de cobayo, dado que la testosterona inhibe la contracción en MLVA generado por el CCh.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron cobayos machos cepa Hartley con un peso de entre 400 y 600 g, los cuales fueron criados en condiciones convencionales del bioterio de la Facultad de Medicina (aire acondicionado filtrado, 21 ± 1 °C, humedad entre 50–70% y camas esterilizadas) y fueron alimentados con pellets Harlan®.

Mediciones de Ca²⁺ intracelular en miocitos traqueales de cobayo

Para estos experimentos los cobayos se sacrificaron mediante una sobredosis de pentobarbital sódico (Pisabental®, México) 35 mg/Kg i.p., se les extrajo la tráquea y se colocó en una placa de disección donde posteriormente se eliminó el exceso de tejido conjuntivo adyacente bajo microscopio estereoscópico (Nikon, Tokio, Japón). Inmediatamente después, se realizó la disección del músculo liso traqueal, se cortó longitudinalmente a la tráquea en la parte cartilaginosa para exponer la parte membranosa y fijarla ventralmente mediante alfileres pequeños al fondo de una caja de petri con Sylgard® (Dow Corning Co. Midland, Mi, EUA). Ya obtenido el músculo liso traqueal, se incubó en 5 ml de solución de Hanks (GIBCO, NY, EUA) que contenía 0.04 UI de papaína (Worthington, NJ, EUA) y 2 mg de L-cistienina (Sigma, Alemania) durante 10 minutos a 37°C, ajustando el pH a 7.4 con NaHCO₃ 1M. A continuación el tejido fue lavado con solución de Leibovitz (L15 GIBCO, NY, EUA) para remover el exceso de la enzima y después el tejido fue incubado en 5 ml de solución de Hanks con 1 mg/ml de colagenasa tipo 1 y 4 mg/ml de dispasa II (proteasa neutra) durante aproximadamente 10 minutos a 37°C. Posteriormente, se realizó la disociación mecánica del tejido con una pipeta Pasteur aspirando y soltando el tejido a través de la pipeta hacia las paredes del tubo, este procedimiento se realizó 20 veces. Después, se incubó nuevamente con la solución de colagenasa-dispasa, por otros 10 min y se realizó el mismo procedimiento mecánico para la disociación hasta observar células aisladas al microscopio. Finalmente, la actividad enzimática fue detenida adicionando solución L15 y se centrifugó el tejido a 600 rpm durante 5 min desechando el sobrenadante. Este último procedimiento se realizó dos veces más. Una vez obtenidas las células se incubaron con 0.5 µM de fura-2/AM en concentraciones bajas de Ca²⁺ (0.1 mM) a temperatura ambiente (22-25°C), durante 1 h. Las células cargadas con fura 2/AM fueron colocadas en una cámara de perfusión durante 30 minutos con el propósito de facilitar que las células se adhieran a la base de la cámara que tiene un cubre objetos de vidrio en su base, cubierto de colágena de cola de rata. Posteriormente, esta cámara fue colocada sobre un microscopio invertido (Diaphot 200, Nikon, Tokio, Japón) y las células adheridas al

vidrio fueron perfundidas a un flujo de 2-2.5 ml/min con una solución Krebs que contenía (mM) NaCl 118, NaHCO₃ 25, KCl 4.6, KH₂PO₄ 1.2, MgSO₄ 1.2, glucosa 11, CaCl₂ 2.0. Se mantuvieron a una temperatura de 37°C, con burbujeo constante de 95% O₂ y 5% CO₂ para mantener el pH de 7.4.¹⁴

Las células musculares lisas cargadas con fura-2/AM fueron excitadas alternadamente con un haz de luz con dos longitudes de onda de excitación que corresponden a 340 y 380 nm, la luz emitida es colectada a 510 nm usando un microfluorómetro (Photon Technology Internacional, Modelo D-104, Princeton, NJ, EUA). La fluorescencia basal fue determinada automáticamente removiendo cualquier célula que se encontrara en el campo óptico del microscopio por donde pasa el haz de luz. La [Ca²⁺]_i se calculó de acuerdo a la fórmula de Grynkiewicz y Cols. (1985):

$$[Ca^{2+}]_i = K_d (R - R_{min} / R_{max} - R) \beta^{34}$$

dónde: K_d corresponde a la constante de disociación del fura 2, que se consideró de 386 nM; β corresponde al cociente de fluorescencia observada a 380 nm en ausencia de Ca²⁺/presencia de Ca²⁺ de saturación que tuvo un valor promedio de 4.23; R_{max} y R_{min} corresponde a los cocientes de fluorescencia 340/380 mínimo y máximo respectivamente que se obtuvieron en ausencia de Ca²⁺ + EGTA (1.11 mM) y en presencia de Ca²⁺ de saturación (10 mM) + ionomicina (10 mM) en la solución Krebs, respectivamente. El promedio de R_{max} fue de 6.06 y el de R_{min} fue de 0.39. Los registros obtenidos fueron almacenados en una computadora y analizados usando un programa de análisis y adquisición de datos (Félix v. 1.2.1, Photon Technology Internacional, Princeton, NJ, EUA).

Después de evaluar la viabilidad de las células a través de la estimulación con cafeína 10 mM, las células de músculo liso fueron estimuladas con CCh 10 μM en dos ocasiones con un intervalo de 15 min entre cada estimulación para observar repetitividad de la respuesta. En un grupo distinto de células se realizó el procedimiento anterior pero pre-incubando a la células con testosterona (10 nM, n=5) por 5 min durante el tiempo de lavado, previo al segundo estímulo de CCh. En otra serie de experimentos se pre-incubó con testosterona (10 nM, n=4) durante 10 min antes del segundo estímulo con CCh, el segundo estímulo se dio

en presencia de la testosterona. Este mismo protocolo se utilizó D-600, inhibidor de los VDCC-L, a una concentración 32 μM (n=4) en la segunda respuesta a CCh y de ésta manera realizar una comparación con el efecto obtenido con la testosterona a los dos diferentes tiempos de pre-incubación.

También, se investigó, si la testosterona presentaba un efecto sobre los mecanismos involucrados en el relleno del RS. Como se realizó anteriormente, se observó la viabilidad de las células a través de la estimulación con cafeína 10 mM. Posteriormente, los miocitos fueron perfundidos con una solución libre de Ca^{2+} (conteniendo EGTA 0.1 mM) y 1 min después, se estimuló con cafeína (S1) durante 10 min. La estimulación de cafeína en un medio libre de Ca^{2+} vacía completamente las pozas de Ca^{2+} del RS.³ Después, las células se lavaron en un medio libre de Ca^{2+} para eliminar la cafeína e inmediatamente fueron perfundidas con Krebs (2 mM de Ca^{2+}) durante 10 min para permitir el relleno de Ca^{2+} del RS. Por último, la estimulación con cafeína fue repetida (S2) bajo las mismas condiciones en un medio libre de Ca^{2+} (n=6). En estos experimentos, el cálculo del cociente S2/S1 corresponde al grado de relleno de Ca^{2+} del RS y evalúa además, indirectamente la actividad de la SERCA.

Una vez estandarizado el modelo para evaluar el relleno del RS, las células fueron perfundidas con una solución de Krebs con testosterona 10 nM durante los 10 min del tiempo de regreso de la solución Krebs con Ca^{2+} 2 mM (n=5) y se observó el efecto en la respuesta S2. Además, se evaluó la dependencia del tiempo en dicho efecto pre-incubándolas con testosterona (10 nM) 5 min durante el periodo de vaciamiento del RS además de los 10 min en el tiempo de restitución de la solución de Krebs con Ca^{2+} , es decir, un total de 15 min observándose nuevamente el efecto generado en S2 (n=5).

En otros experimentos, se evaluó el efecto de la testosterona en el proceso de la entrada capacitativa. Tras observar la viabilidad de los miocitos como en los protocolos anteriores, se estimuló a las células con cafeína (10 mM) en un medio libre de Ca^{2+} durante 10 min, asegurando nuevamente el vaciamiento del RS, pero a diferencia del protocolo para evaluar el relleno, se preincubó a las células con D-600 (32 μM) y CPA (10 mM, bloqueador de la SERCA) durante los últimos 3 y 5

min, respectivamente. Después las células fueron perfundidas con Ca^{2+} en presencia también, de D-600 (32 μM) y CPA (10 mM) para permitir que la entrada de Ca^{2+} al interior de la célula ocurriera únicamente por SOC, el resultado obtenido se consideró como el control. Después de cada control obtenido, se determinó el efecto de la testosterona 10 μM (n=5) y 32 μM (n=5) en el proceso de entrada capacitativa para lo cual, primero se lavó las células durante 10 min con solución Krebs con Ca^{2+} y se repitió el protocolo anterior preincubando con testosterona (10 y 32 μM , 5 min) al mismo tiempo que el D-600 y el CPA durante el vaciamiento del RS. La restitución del Ca^{2+} también fue en presencia de testosterona, CPA y D-600. Se comparó el la cantidad de Ca^{2+} que ingreso a la célula durante la restitución, así como la velocidad de entrada del Ca^{2+} a través de SOC entre los controles e incubados con testosterona 10 y 32 μM .

FÁRMACOS

La cafeína, el metoxiverapamil (D-600), el carbacol (CCh), al ácido ciclopiazónico (CPA), el fura-2/AM, fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis. Missouri, EUA). La testosterona fue obtenida de Sigma-Aldrich (Canadá). El fura-2/AM, el CPA fueron disueltos en DMSO (Sigma-Aldrich, St. Louis. Missouri, EUA), el D-600 y la testosterona fueron disueltos en etanol (Sigma-Aldrich, St. Louis. Missouri, EUA), el CCh fue disuelto en agua desionizada (desionizador, Milli-Q Academic A10, EUA) La cafeína fue disuelta en solución Krebs-Ringer tanto en presencia como ausencia de Ca^{2+} .

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Las diferencias en la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ fueron evaluadas mediante la utilización de prueba t de Student pareada y no pareada, (ANDEVA) de una vía o análisis de varianza de mediciones repetidas, seguido de la prueba de Dunnet (GraphPad InStat). La significancia estadística se fijó a una $p < 0.05$ bimarginal. Los resultados, tanto en el texto como en las figuras, son expresados como promedio \pm error estándar de la

media (ESM), la n corresponde al número de células y sólo un experimento fue realizado por animal.

RESULTADOS

La testosterona disminuye la elevación de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por el carbacol

En célula única de músculo liso traqueal de cobayo, la estimulación del CCh induce un cambio en la $[Ca^{2+}]_i$, constituido por un rápido incremento, que ha sido denominado como pico, seguido por una elevación sostenida de la $[Ca^{2+}]_i$, que se ha descrito como meseta. Una segunda estimulación con CCh produce un pico y una meseta similar después de un lavado de 15 minutos (n=5, Fig. 8 A,B).

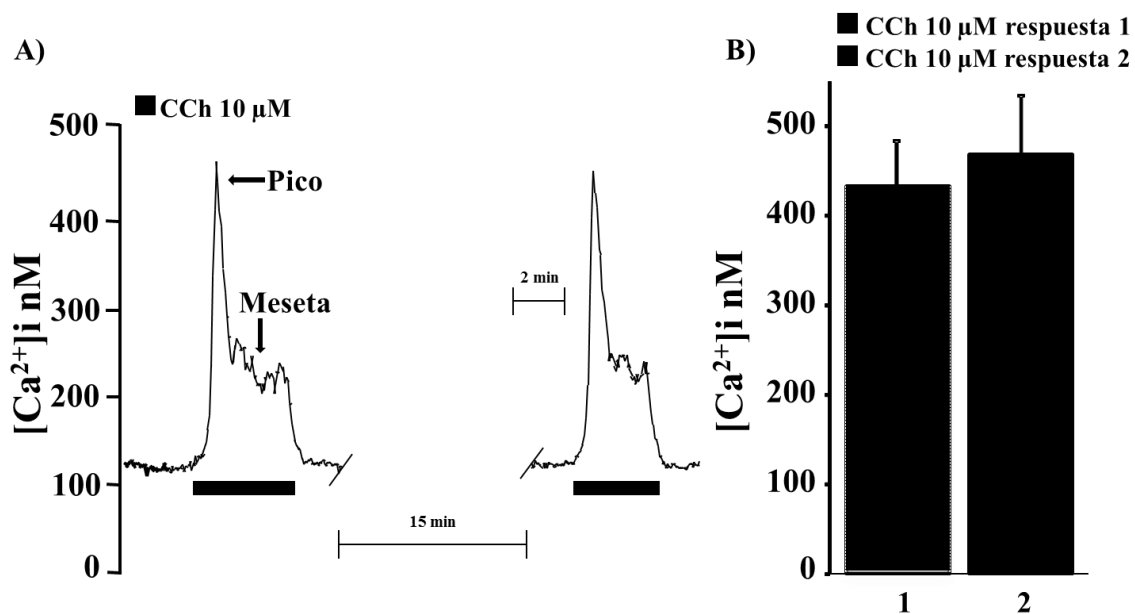


Figura 8. El CCh 10 μ M induce un incremento bifásico de la $[Ca^{2+}]_i$ constituido por un pico y una meseta. A) Registro original que muestra como el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por el CCh es repetible después de un lavado de 15 min. B) Gráfica de barras que muestra la repetitividad de la respuesta de CCh a los 15 minutos (n=5). No significativo con t de Student pareada, *p < 0.05.

Con el propósito de evaluar el efecto de la testosterona en la respuesta inducida por CCh, se utilizaron concentraciones similares a las que se encuentran fisiológicamente en sangre periférica. Las células fueron preincubadas con testosterona (10 nM) 5 y 10 minutos antes del segundo estímulo con CCh. En

ambos casos se observó una disminución significativa de la $[Ca^{2+}]_i$ generado por el CCh en el pico. (~32%, n=5, y ~65%, n=4, respectivamente, $p < 0.01$; Fig. 9, A, B, D). Existen antecedentes donde se ha demostrado que la testosterona inhibe a los canales dependientes de voltaje en MLV^{27, 36, 42, 53, 57} y ha sido reportado que ésta se une al mismo sitio al cual se une la nifedipina.⁶⁹ Debido a esto, se ha realizado la misma propuesta para el caso del MLVA.⁸ En éste estudio se utilizó D-600 (32 μ M), con el cual, las células fueron pre-incubadas durante 10 min antes del segundo estímulo a CCh. Este fármaco disminuyó (57%, n=4, $p < 0.01$, Fig. 9, C y D) el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por el CCh. Estos resultados sugieren que la testosterona esta inhibiendo al VDCC y que el efecto es mas visible cuando el periodo de incubacion es prolongado.

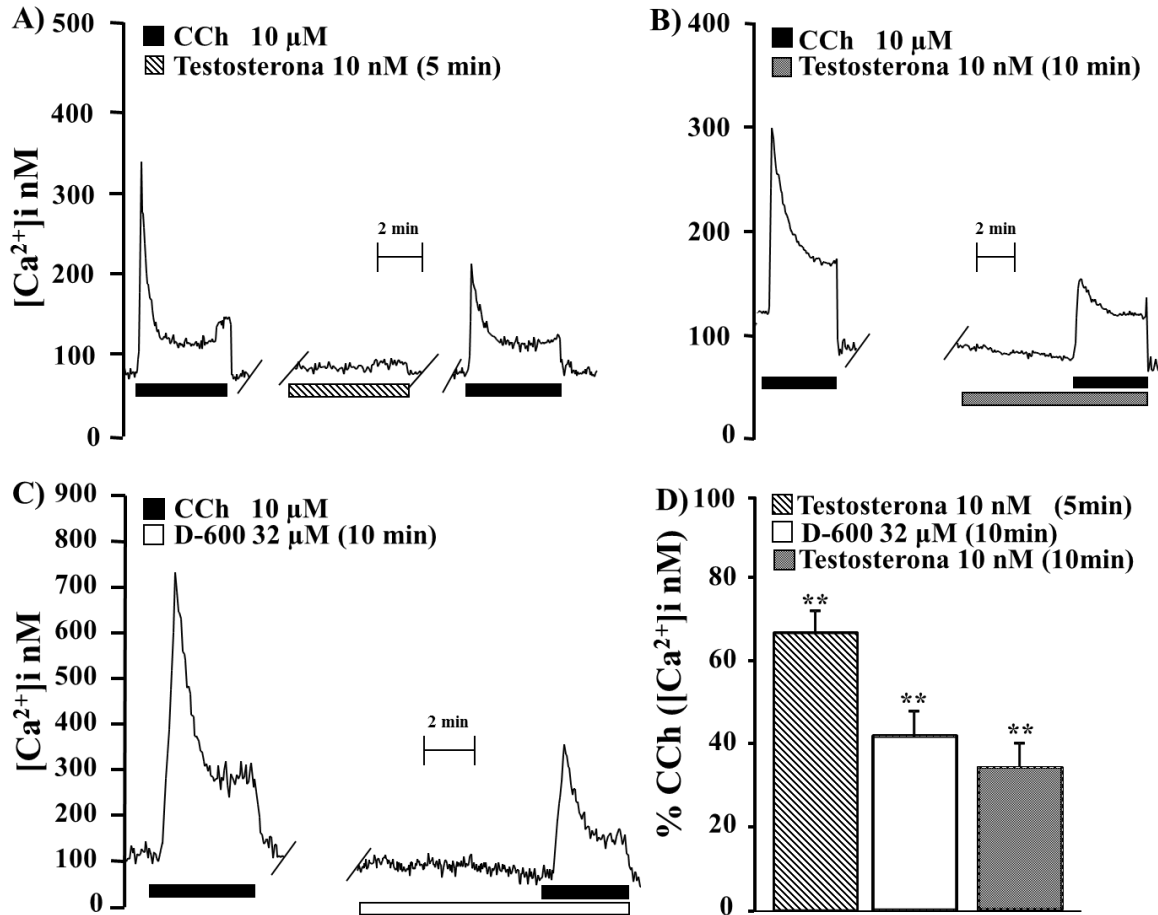


Figura 9. El incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por el CCh es inhibido parcialmente por la testosterona y el D-600. En los grupos A y B se observa la disminución del incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por el CCh cuando los miocitos son preincubados con testosterona 10 nM durante 5 y 10 min. En el panel C) se observa un registro original que muestra el efecto del D-600 (32 μ M) sobre la repuesta de la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por el CCh. D) Grafica de barras que muestra la disminución significativa de la respuesta de CCh por la adición de testosterona durante 5 y 10 min ($n=5$ y 4, respectivamente), así como por la adición de D-600 ($n=4$), $*p<0.05$, $**p<0.01$. Se utilizó t de Student pareada en cada uno de los 3 casos.

Recientemente Flores-Soto y Cols., (2013, 1^a revisión), demostraron que SOC y VDCC-L son los principales mecanismos involucrados en el relleno de Ca^{2+} del RS en células de músculo liso traqueal de cobayo.³⁰ Debido a que los resultados obtenidos sugieren la interacción de la testosterona con los VDCC, se decidió determinar el efecto de éste andrógeno en el proceso de relleno del RS.

La testosterona actúa sobre los principales mecanismos involucrados en el relleno de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico

Debido a los recientes hallazgos encontrados por Flores-Soto y Cols.,³⁰ se investigó la posibilidad de que la testosterona disminuyera la recaptura de Ca^{2+} del RS. Para explorar esta alternativa, se midió indirectamente la actividad de la ATPasa del RS en células de músculo liso traqueal de cobayo¹⁴ utilizando el cociente S2/S1, (S1, primer estímulo con cafeína, S2, segundo estímulo con cafeína, ver detalles en la Figura 10). Bajo nuestras condiciones experimentales el cociente S2/S1 fue alrededor de 0.71 ± 0.05 (n=6, Fig. 10), es decir, después de vaciar el contenido de Ca^{2+} disponible del RS, se obtuvo un 71 % de llenado de este almacén, lo que corresponde a nuestro grupo control.

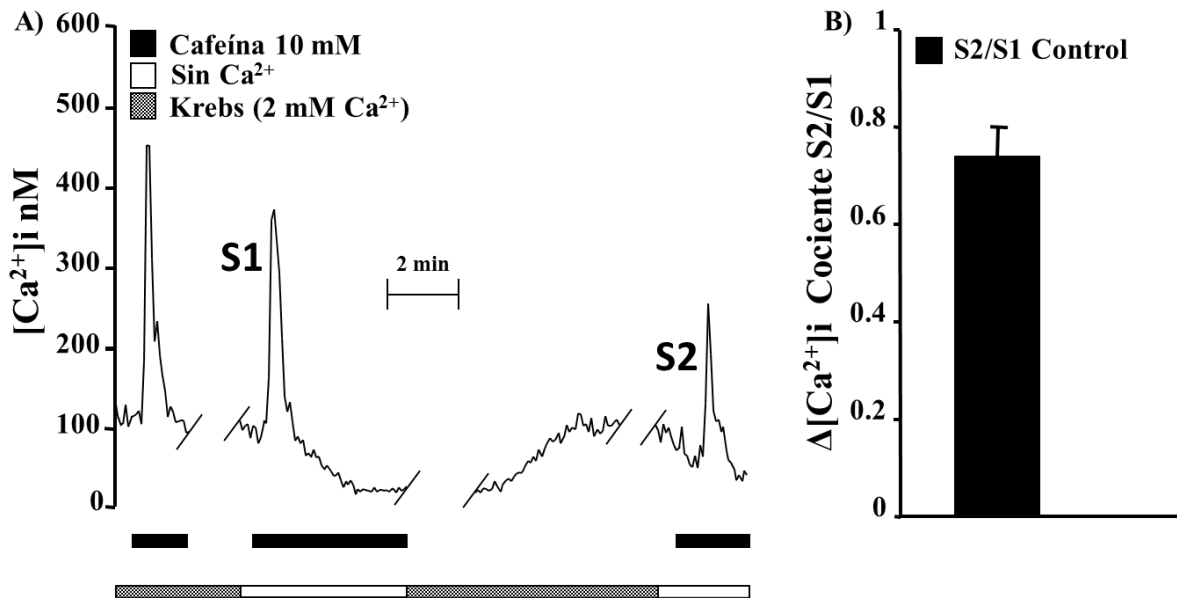


Figura 10. Protocolo experimental para evaluar el relleno de Ca^{2+} del RS. A) Registro original donde S1 es la primera estimulación con cafeína en un medio libre de Ca^{2+} y S2 es la segunda respuesta a cafeína en un medio sin Ca^{2+} . B) Gráfica que muestra la capacidad de la SERCA para rellenar al RS después de vaciar el contenido de Ca^{2+} disponible, expresada mediante el cociente S2/S1 (n=6). Este es considerado como el grupo control.

Cuando se incubo la testosterona (10 nM) durante 10 minutos en la restitución del Ca^{2+} (S2) se observó que el cociente S2/S1 disminuye significativamente a $(0.29 \pm 0.04$ n=5, $p < 0.01$; Fig. 11 A y C), es decir, una

disminución de ~59% en comparación con el grupo control. Por otro lado, se investigó si el aumento en el tiempo de incubación de la testosterona podría aumentar la magnitud del efecto inhibitor en el cociente S2/S1. Para demostrarlo, se incubó 5 min la testosterona (10 nM) durante el vaciamiento del RS (S1) y 10 min en la restitución del Ca^{2+} (S2). Bajo estas condiciones, el cociente S2/S1 disminuyó significativamente a $(0.14 \pm 0.04, n=5 p<0.01; \text{Fig. 11 B y C})$, que comparado con el grupo control descendió en ~ 80%. Estos datos demuestran que la testosterona inhibe el relleno del RS y podría estar haciéndolo vía la inhibición de los VDCC y SOC.

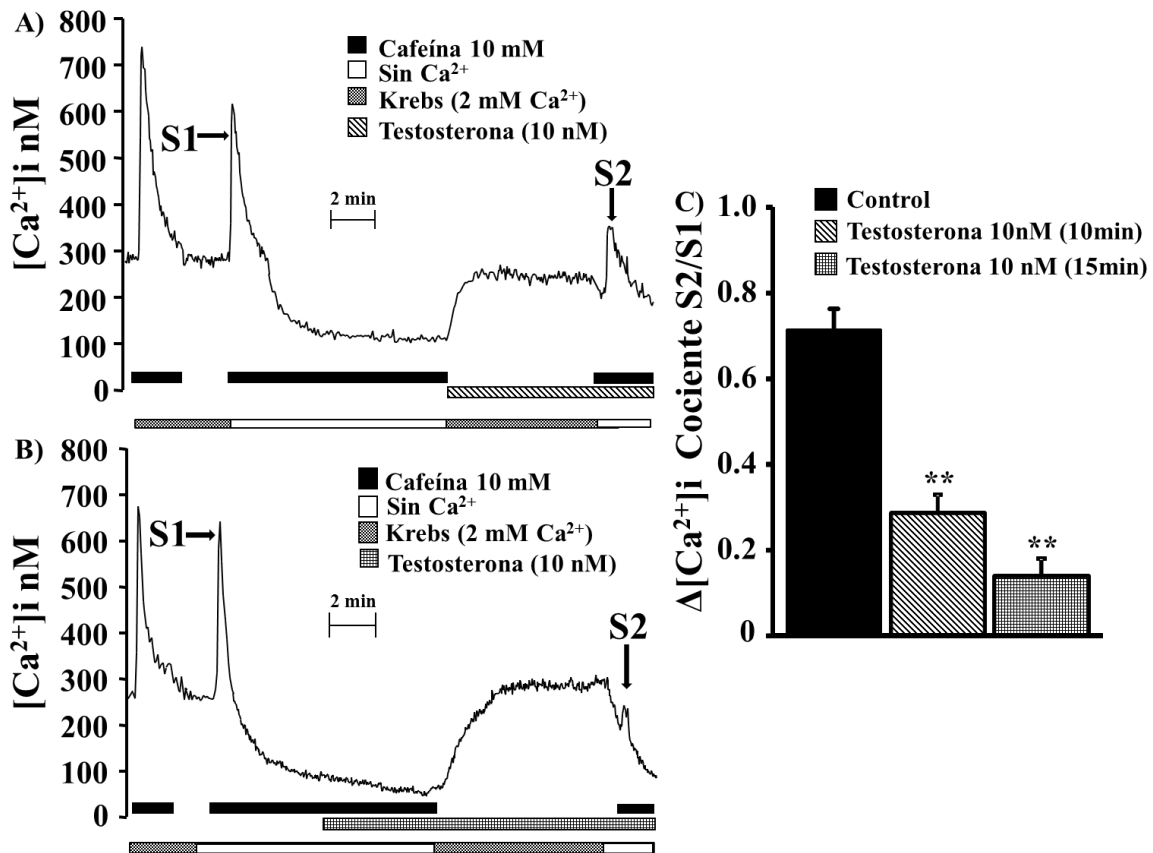


Figura 11. Efecto de la testosterona en el relleno del RS en células de MLVA de cobayo. A) Registro original donde S1 es la primera estimulación con cafeína en un medio libre de Ca^{2+} y S2 es la segunda respuesta a cafeína en un medio sin Ca^{2+} en presencia de testosterona (10 nM, 10 min) durante la restitución de Ca^{2+} . B) Registro original donde se muestra un periodo más largo de incubación de la testosterona (10 nM, 15 min) 5 min en S1 y 10 min durante la restitución de Ca^{2+} . C) Gráfica de barras mostrando la disminución significativa del relleno del RS ocasionado por la incubación con testosterona durante 10 y 15 min. Cuando se compara con el grupo control se encontraron diferencias significativas ($n=5$ en ambos casos), $*p<0.05$, $**p<0.01$. Se utilizó un análisis de varianza seguido de una prueba Dunnet.

Debido a los resultados obtenidos en conjunto con la evidencia recientemente proporcionada por Flores-Soto y Cols.,³⁰ donde el relleno de Ca^{2+} del RS es principalmente por los VDCC y SOC, se decidió evaluar si la testosterona bloqueaba la entrada de Ca^{2+} a través de SOC.

La testosterona bloquea la entrada capacitativa disminuyendo la entrada de Ca^{2+} al interior de la célula

En estudios paralelos, se examinaron los efectos de la testosterona 10 y 32 nM sobre la entrada de Ca^{2+} a través de SOC. El protocolo utilizado para el estudio del proceso de entrada capacitativa fue establecido previamente en éste laboratorio en células de músculo liso de bovino.³ Como se ha descrito para el protocolo S2/S1, la perfusión de 10 mM de cafeína en medio sin Ca^{2+} (EGTA, 1 μM) durante 10 min, permitió el vaciado del RS³. La entrada de Ca^{2+} a través de los canales dependientes de voltaje fue bloqueada por la adición de D-600 (32 μM , 5 min). La actividad de la SERCA fue inhibida mediante la incubación con CPA (10 μM , 3 min). La adición de ambos fármacos permite que la entrada de Ca^{2+} desde el medio extracelular, tras el vaciamiento de las reservas disponibles del RS, ocurra principalmente a través de SOC mediante el proceso de entrada capacitativa y así, la subsecuente estabilización de los niveles de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ basal. La testosterona fue incubada durante 5 min en presencia continua de cafeína en medio sin Ca^{2+} , D-600 y CPA, previamente al reingreso del Ca^{2+} extracelular. La testosterona a la concentración de 10 μM no generó una disminución significativa en la velocidad en la entrada de Ca^{2+} de 1.87 ± 0.37 nM/s ,control: n=5; a 1.60 ± 0.36 nM/s n=5, (Fig. 12 A y B, p <0.05), ni tampoco disminuyó la cantidad de Ca^{2+} que ingresa al citoplasma a través de SOC (89 %, test 10 μM vs 100% del grupo control, p<0.05, n=5; Fig. 12 A y C), aunque, presentó una tendencia a la disminución en la velocidad de entrada de Ca^{2+} al citoplasma a través de los canales SOC.

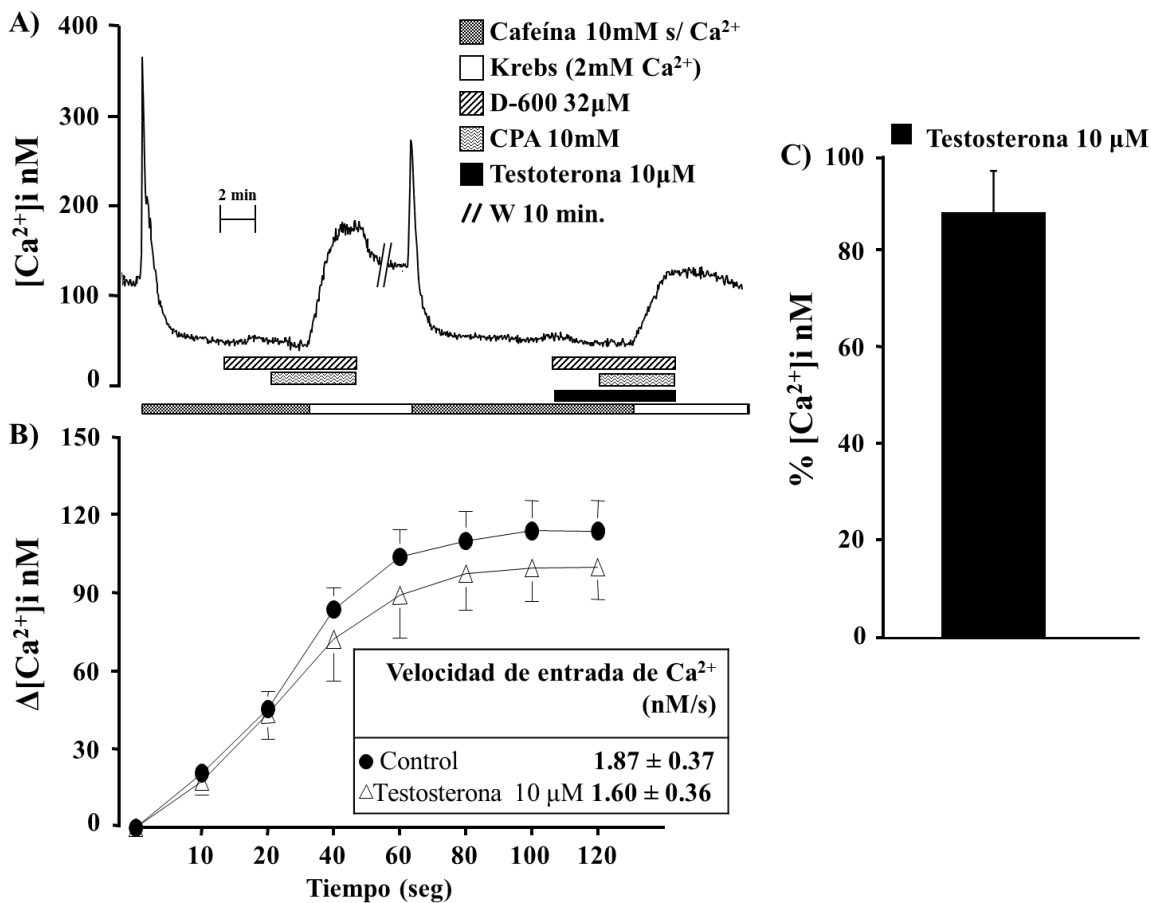


Figura 12. Efecto de la testosterona 10 μM en la entrada capacitativa. A) Registro original que muestra el efecto de la incubación por 5 min de la testosterona 10 μM en el proceso de la entrada capacitativa. B) Cursos temporales de la recuperación de la basal de [Ca²⁺]i en presencia de testosterona 10 μM (n=5, experimental) así como en ausencia de la misma (n=5, control). C) Grafica de barras que muestra el porcentaje de Ca²⁺ que ingresa a la célula a través de la entrada capacitativa en presencia de testosterona 10 μM. Se observa una tendencia a la disminución tanto en la velocidad de entrada de Ca²⁺, como la cantidad de Ca²⁺ que ingresa a la célula mediante la entrada capacitativa. No significativo con t de Student pareada, *p<0.05.

Por otro lado, la aplicación de testosterona 32 μM disminuyó significativamente la velocidad de la entrada de Ca²⁺ de 1.57 ± 0.30 nM/s control: n=5 a 0.73 ± 0.12 nM/s, n=5 (p<0.05 Fig.13 A y B) así como la cantidad de Ca²⁺ que ingresa para mantener los niveles basales. (~75 %, test 32 μM vs 100 % del grupo control, p<0.05, n=5, Fig. 13 A y C). Estos resultados demuestran que a la concentración 32 μM la testosterona inhibe la entrada de Ca²⁺ a través de SOC. Estos efectos de la testosterona podrían explicar el fenómeno de relajación inducido por este andrógeno en tejido contracturado con CCh.

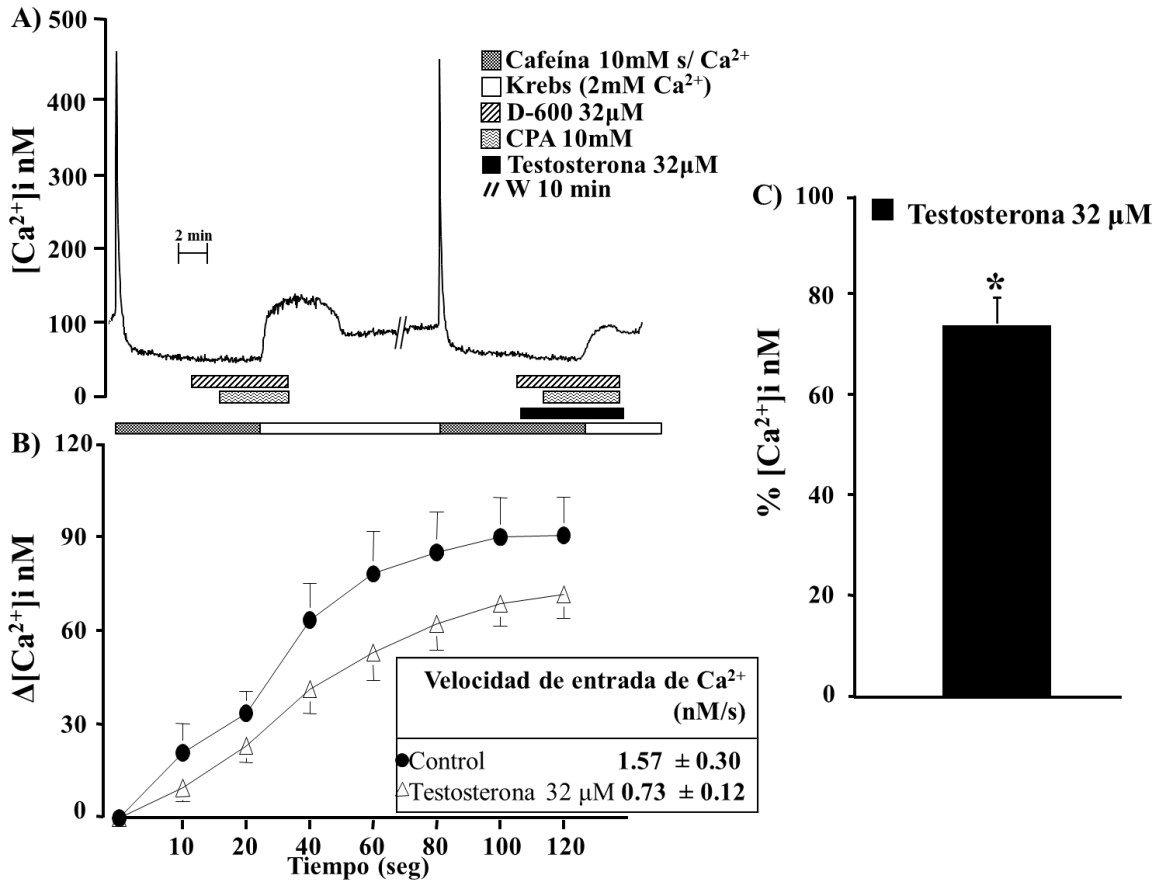


Figura 13. Efecto de la testosterona 32 μM en la entrada capacitativa. A) Registro original que muestra el efecto de la administración de testosterona (32 μM) en la entrada capacitativa. B) Cursos temporales de la recuperación de la basal de $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en presencia de testosterona 32 μM (n=5, experimental) así como en ausencia de la misma (n=5, control). C) Grafica de barras que muestra el porcentaje de Ca^{2+} que ingresa a la célula a través de la entrada capacitativa en presencia de testosterona 32 μM . Se observa una disminución significativa tanto en la velocidad de entrada de Ca^{2+} , como la cantidad de Ca^{2+} que ingresa a la célula mediante la entrada capacitativa. Se utilizó t de Student pareada para ambos parámetros, *p<0.05.

DISCUSIÓN

El efecto de relajación no genómico generado por los andrógenos sobre el MLVA ha sido muy poco estudiado, aunque recientemente se han tratado de explorar los mecanismos por los que la testosterona y sus metabolitos reducidos inhiben al efecto contráctil generado por un agonista colinérgico muscarínico. Se ha propuesto que dicho efecto ocurre principalmente por el bloqueo de VDCC-L²⁷,^{36, 42, 53, 57, 69, 70}, así como la activación de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} hiperpolarizando a la célula y generando relajación^{15, 23, 24, 66, 73, 78} Debido a los

estudios realizados donde la adición de testosterona inhibe completamente la contracción generada por CCh en MLVA fuera equiparable únicamente con el efecto generado por la adición conjunta de 2-APB y nifedipina, se propuso que el efecto de la testosterona sobre el MLVA de cobayo incluía no solamente la participación de VDCC, sino también, el proceso de entrada capacitativa. Así, en ésta tesis se determinó que la testosterona a concentraciones farmacológicas (32 μM) inhibe la entrada de Ca^{2+} al interior de la célula mediante su interacción con SOC, lo que pudiera dar una explicación a la inhibición del proceso de contracción generado por un agonista colinérgico muscarínico en el MLVA de cobayo. Como se mencionó anteriormente, a concentraciones fisiológicas (10nM) no se observó un efecto considerable, lo que puede explicarse por el hecho de que inhibidores de la entrada capacitativa, tal como el 2-APB, requieren de concentraciones mayores (100 μM) para generar un efecto significativo sobre dicho proceso.

Recientemente en nuestro laboratorio, se encontró que la testosterona, en células de músculo liso traqueal de cobayo, disminuía significativamente el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ generado por KCl de manera dependiente de la concentración desde 1 nM, presentando la inhibición máxima a 320 nM (datos no publicados). La elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ generada por KCl ocurre mediante la despolarización de la membrana plasmática e incluye únicamente la participación de VDCC-L, por lo que éste resultado comprueba el efecto inhibitor de dicho andrógeno sobre éste mecanismo de entrada de Ca^{2+} en el MLVA. En este mismo contexto, en éste estudio, la testosterona a concentraciones fisiológicas (10 nM) produjo una disminución significativa del incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (pico) inducido por el CCh, muy similar a lo observado con D-600. Estos resultados corroboran que la testosterona a concentraciones fisiológicas (nM) sólo bloquea a los VDCC-L.

La respuesta característica producida por el CCh en miocitos traqueales de cobayo está compuesta principalmente por una elevación rápida de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ representada por un pico, seguida de una fase tónica o meseta. El pico, como se mencionó antes, representa la rápida elevación de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ tras su liberación por el RS vía IP_3^{28} , en tanto que la meseta es generada por mecanismos encargados

de introducir Ca^{2+} al citoplasma, tal como SOC, ROC, NXC_{REV} y VDCC-L, los cuales además, participan en el relleno del RS.^{21, 22, 30, 37} Esta respuesta es repetible cada 15 min, ya que un segundo estímulo de CCh, después de lavar a las células durante el tiempo mencionado, no presenta diferencia significativa con respecto a la altura del pico y la meseta de la primera respuesta. Además, la preincubación con D-600 genera una disminución significativa de la respuesta de CCh, lo que comprueba la participación de la entrada de Ca^{2+} a través de los VDCC-L en la respuesta generada por el agonista muscarínico, específicamente durante la elevación rápida de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en la primera parte de la respuesta.

Con respecto a los resultados reportados por Flores y Cols. (2003, 1ª revisión), donde encontraron que SOC y VDCC-L son los principales mecanismos involucrados en el relleno del RS,³⁰ se decidió evaluar el efecto de la testosterona en el relleno del RS utilizando el protocolo experimental para obtener el cociente S2/S1. En este modelo en particular, asumimos que, el vaciado del RS mediado por cafeína en un medio libre de Ca^{2+} lleva a la activación de los canales SOC, que permiten la entrada de Ca^{2+} y Na^+ al citoplasma celular; este último ión, despolariza la membrana plasmática y permite la activación de los VDCC-L, además, el incremento en la $[\text{Na}^+]_i$ ocasiona que el NCX cambie a su forma reversa.³⁷ Un RS disponible de Ca^{2+} es indispensable para que, la contracción de este tejido pueda llevarse a cabo. El cociente S2/S1, y por tanto, el grado de relleno del RS fue disminuido notablemente por la presencia de la testosterona, debido al bloqueo de VDCC-L.

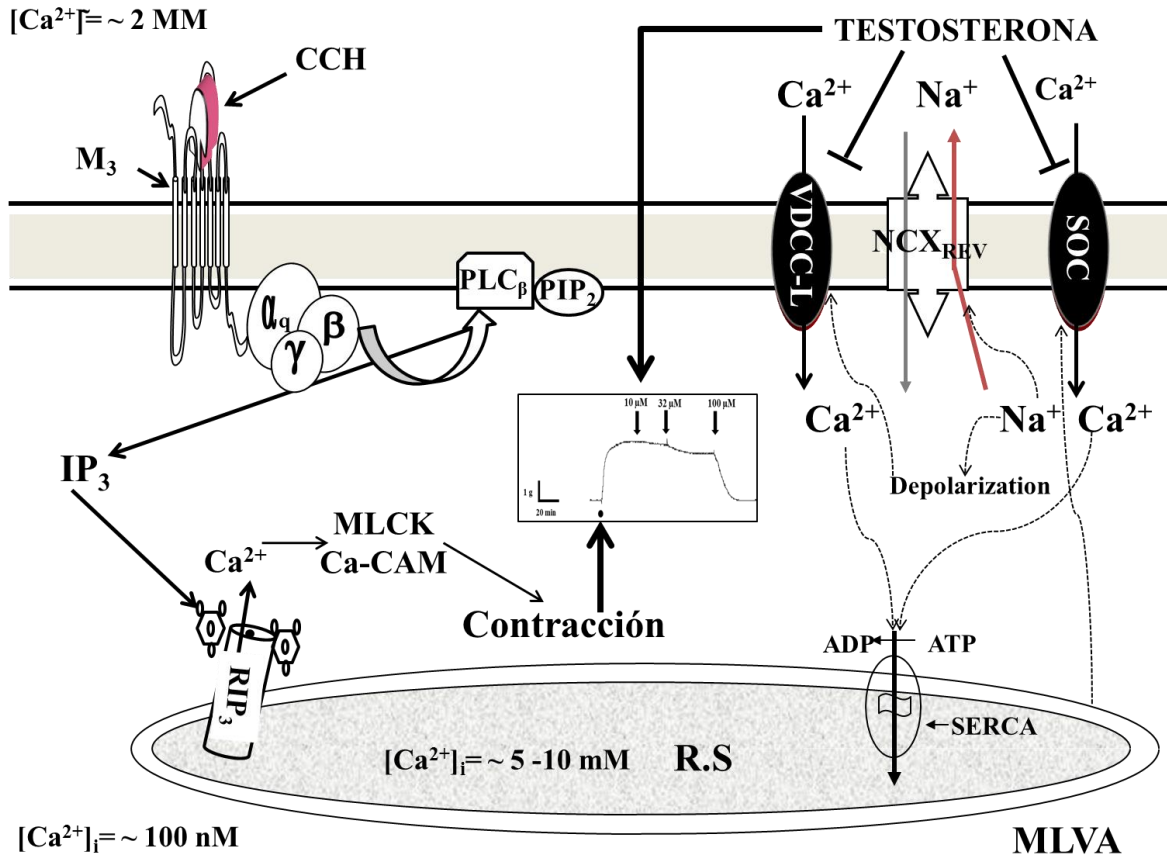
Los resultados anteriores apoyan la propuesta que sugiere que el efecto inhibitorio de la testosterona sobre el proceso de contracción en el MLVA de cobayo generado por un agonista colinérgico muscarínico ocurre principalmente por el bloqueo de la entrada capacitativa y los VDCC-L. Estos hallazgos son novedosos y contribuyen al mecanismo de relajación no genómico producido por la testosterona, ya que hasta la fecha se le conoce un papel principal solo sobre los VDCC-L.

CONCLUSIONES

En miocitos traqueales de cobayo:

- 1) La testosterona, a concentraciones fisiológicas (10 nM), disminuye significativamente el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ generado por CCh, un agonista colinérgico muscarínico.
- 2) La testosterona, a concentraciones fisiológicas (10 nM), disminuye el grado de relleno del RS a través de su interacción con los mecanismos encargados de aumentar la $[Ca^{2+}]_i$, principalmente VDCC-L.
- 3) A concentraciones farmacológicas (32 μ M), la testosterona bloquea al proceso de entrada capacitativa, disminuyendo tanto la cantidad de Ca^{2+} que ingresa al citoplasma a través de SOC como la velocidad de entrada.

ANEXO



Efecto no genómico de la testosterona en músculo liso de la vías aéreas de cobayo. En MLVA de cobayo, el receptor múscarínico M₃ acoplado a una proteína G_q es estimulado por CCh, lo que genera un incremento de la [Ca²⁺]_i a través de la vía de señalización PLC_β-IP₃. El vaciamiento de las pozas de Ca²⁺ del RS puede generar la apertura de canales catiónicos no específicos (entrada capacitativa de Ca²⁺) permitiendo la entrada de Ca²⁺ y Na⁺ al citoplasma. Dicho flujo iónico a través de la membrana puede inducir despolarización, activando a los VDCC-L. Adicionalmente, el incremento de la [Na⁺]_i puede favorecer el modo reverso del intercambiador Na⁺/Ca²⁺. La testosterona bloquea la entrada de Ca²⁺ al citoplasma mediante su interacción con los VDCC-L y SOC, mecanismos necesarios para el mantenimiento del proceso de contracción, produciendo un efecto relajante. Ambos mecanismos son también importantes para el relleno del RS, por lo que la testosterona también afecta a dicho mecanismo.

BIBLIOGRAFÍA

1. Amado JA, Florez J. Hormonas sexuales: estrógenos, gestágenos, andrógenos y anticonceptivos hormonales. Farmacología humana. 4ª Ed. Barcelona: Masson, 2003; 887-889.
2. Amrani Y, Magnier C, Enouf J, Wuytack F, Bronner C. Ca^{2+} increase and Ca^{2+} -influx in human tracheal smooth muscle cells: role of Ca^{2+} pools controlled by sarco-endoplasmic reticulum Ca^{2+} -ATPase 2 isoform. Br J Pharmacol. 1995; 115: 1205-1210.
3. Bazan-Perkins B, Sanchez-Guerrero E, Carbajal V, Barajas-Lopez C, Montaña LM. Role of sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} content in Ca^{2+} entry of bovine airway smooth muscle cells. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2003; 368: 277-283.
4. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. More Messengers, More Channels, More Complexity. Current Biol. 2002; 12: 563-565.
5. Berridge MJ. Capacitative calcium entry. Biochem J. 1995; 312: 1-11.
6. Berridge MJ. Inositol triphosphate and calcium signalling mechanisms. Biochimica et Biophysica Acta. 2009; 1793: 933-940.
7. Billington C, Penn R. Signaling and regulation of G protein-coupled receptors in airway smooth muscle. Respir Res. 2003; 4:1-23.
8. Bordallo J, García de Boto MJ, Meana C, Velasco L, Bordallo C, Suarez L, Cantabra B, Sanchez M. Modulatory role of endogenous androgens on airway smooth muscle tone in isolated quinea-pig and bovine trachea; involvement of β 2 adrenoreceptors, the polyamine system and external calcium. Eur J Pharmacol. 2008; 601:154-162.
9. Brini M, Carafoli E. Calcium pumps in health and disease. Physiol. Rev. 2009; 89:1341-78.
10. Bean BP. Calcium Channels. Encyclopedia of life sciences. Nat Pub Group. 2001
11. Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium Signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2003; 4: 517-529

12. Bordallo C, Rubín JM, Varona AB, Cantabrana B, Hidalgo A, Sánchez M. Increases in ornithine decarboxylase activity in the positive inotropism induced by androgens in isolated left atrium of the rat. *Eur J Pharmacol.* 2001; 422: 101-107.
13. Campelo AE, Cutini PH, Massheimer VL. Cellular actions of testosterone in vascular cells: Mechanism independent of aromatization to estradiol. *Steroids.* 2012; 77: 1033-1040
14. Carbajal V, Vargas MH, Flores-Soto E, Martínez-Cordero E, Bazán-Perkins B, Montaña LM. LTD₄ induces hyperresponsiveness to histamine in bovine airway smooth muscle: role of SR-ATPase Ca²⁺ pump and tyrosine kinase. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol.* 2005; 288: 84-92.
15. Cairrão E, Alvarez E, Santos-Silva AJ, Verde I. Potassium channels are involved in testosterone-induced vasorelaxation of human umbilical artery. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 2008; 376: 375-383.
16. Catterall WA, Perez-Reyes E, Snutch TP, Striessnig J. Nomenclature and Structure-Function Relationships of Voltage-Gated Calcium Channels. *International Union of Pharmacology. XLVIII Pharmacol Rev.* 2005; 57: 411-425.
17. Catterall WA. Structure and regulation of voltage-gated Ca²⁺ channels. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2000; 16: 521-555.
18. Clapham DE. Calcium Signaling, Review. *Cell.* 1995; 80: 259-268
19. Clinton WR. Smooth muscle contraction and relaxation. *Advan in Physiol Edu.* 2003; 27: 201-206.
20. Cobar L, Cruz- Valderrama JE, Montaña LM, Flores-Soto E. Importancia del intercambiador Na⁺/Ca²⁺ en la regulación de Ca²⁺ del músculo liso de las vías aéreas. *Neumol Cir Torax.* 2010; 1: 39-45.
21. Dai JM, Kuo KH, Leo JM, van Breemen C, Lee CH, Mechanism of Ach induced asynchronous calcium waves and tonic contraction in porcine tracheal muscle bundle. *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2006; 290: 459-469.

22. Dai JM, Kuo KH, Leo JM, Pare PD, van Breemen C, Lee CH. Acetylcholine-induced asynchronous calcium waves in intact human bronchial muscle bundle. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2007; 36: 600-608.
23. Deenadayalu VP, White RE, Stallone JN, Gao X, Garcia AJ. Testosterone relaxes coronary arteries by opening the large-conductance, calcium-activated potassium channel. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001; 281: 1720-1727.
24. Ding AQ, Stallone JN. Testosterone-induced relaxation of rat aorta is androgen structure specific and involves K⁺ channel activation. *J Appl Physiol.* 2001; 91: 2742-2750.
25. Dressing GE, Goldberg JE, Charles NJ, Schwertfeger KL, Lange CA. Membrane progesterone receptor expression in mammalian tissues: a review of regulation and physiological implications. *Steroids.* 2011; 76:11-7.
26. Edes I, Kranias EG. Ca²⁺-ATPases/pumps. In: *Cell Physiology Source Book: Section II Transport physiology, pumps and exchangers.* 2nd ed. New York: Academic press. 1998; 225-236
27. English KM, Jones RD, Jones TH, Morice AH, Channer KS. Testosterone acts as a coronary vasodilator by a calcium antagonistic action. *J Endocrinol Invest.* 2002; 25: 455-458.
28. Flores-Soto E, Carbajal V, Reyes-García J, García-Hernández LM, Figueroa A, Checa M, Barajas-López C, Montaña LM. In airways ATP refills sarcoplasmic reticulum via P2X smooth muscle receptors and induces contraction through P2Y epithelial receptors. *Pflugers Arch.* 2011; 461: 261-275.
29. Flores Soto,E, Reyes Garcia J., Sommer B, Chavez J, Barajas Lopez C, Montaña LM. PPADS, a P2X receptor antagonist, as a novel inhibitor of the reverse mode of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in guinea pig airway smooth muscle. *Eur J Pharmacol.* 2012; 67: 439-444
30. Flores-Soto E, Reyes-García J, Sommer B, Montaña LM. Sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ refilling mechanisms in guinea pig airway smooth muscle. Enviado al *Eur J Pharmacol.* 2013, Primera Revisión.

31. Godin N, Rousseau E. TRPC6 silencing in primary airway smooth muscle cells inhibits protein expression without affecting OAG-induced calcium entry. *Mol Cell Biochem.* 2007; 296: 193-201.
32. González-Montelongo MC, Marín R, Gómez T, Díaz M. Androgens differentially potentiate mouse intestinal smooth muscle by nongenomic activation of polyamine synthesis and Rho kinase activation. *Endocrinol.* 2006; 147: 5715-5729.
33. González-Montelongo MC, Marín F, Gómez T, Díaz M. Androgens are powerful non-genomic inducers of calcium sensitization in visceral smooth muscle. *Steroids.* 2010; 75: 533-538.
34. Grynkiewicz G, Poenie M, Tsien RY. A new generation of Ca^{2+} indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem.* 1985; 260: 3440-3450.
35. Guyton AC, Hall JE. *Tratado de fisiología Médica McGraw-Hill Interamericana*, décima edición. 2001; 1280.
36. Hall J, Jones RD, Jones TH, Channer KS, Peers C. Selective inhibition of L-type Ca^{2+} channels in A7r5 cells by physiological levels of testosterone. *Endocrinology.* 2006; 147: 2675-2680.
37. Hirota S, Janssen LJ. Store-refilling involves both L-type calcium channels and reverse mode sodium-calcium exchange in airway smooth muscle. *Eur Respir J.* 2007; 30: 269-278.
38. Hoth M, Penner R. Calcium release-activated calcium current in rat mast cells. *J Physiol.* 1993; 465: 359-386.
39. Horowitz A, Menice CB, Laporte R, Morgan KG. Mechanisms of smooth muscle contraction. *Physiol. Rev.* 1996; 76: 967-1003
40. Jänne OA, Crozat A, Palvimo J, Eisenberg LM. Androgen-regulation of ornithine decarboxylase and S-adenosylmethionine decarboxylase genes. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1991;40: 307-315.
41. Janssen LJ, Pierre AB., Netherton SJ, Walters DK. Superficial buffer barrier and preferentially directed release of Ca^{2+} in canine airway smooth muscle. *Am J physiol Lung Cell Mol Physiol.* 1999. 276: 744-753

42. Jones RD, English KM, Pugh PJ, Morice AH, Jones TH, Channer KS. Pulmonary vasodilatory action of testosterone: evidence of a calcium antagonistic action. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2002; 39: 814-823.
43. Koenig H, Goldstone AD, Lu CY. Polyamines are intracellular messengers in the beta-adrenergic regulation of Ca²⁺ fluxes, [Ca²⁺]_i and membrane transport in rat heart myocytes. *Biochem Biophys Res Commun.* 1988; 153:1179-1185.
44. Kotlikoff MI, Wang YX. Signalling pathway for histamine activation of nonselective cation channels in equine tracheal myocytes. *J Physiol.* 2000; 523: 131-138.
45. Koulomenta V, Hatziefthimiou A, Paraskeva E, Gourgoulisanis K, Molyvdas PA. Non-genomic effect of testosterone on airway smooth muscle. *Br J Pharmacol.* 2006; 149: 1083-1091.
46. Liou J, Kim ML, Heo WD, et al. STIM is a Ca²⁺ sensor essential for Ca²⁺-store-depletion triggered Ca²⁺ influx. *Curr Biol.* 2005; 15: 1235-1241.
47. Liu L, Ishida Y, Okunade G, Pyne-Geithman GJ, Shull GE, Paul RJ. Distinct roles of PMCA isoforms in Ca²⁺ homeostasis of bladder smooth muscle: evidence from PMCA gene-ablated mice. *Am J Physiol Cell Physiol.* 2007; 292: 423–431.
48. Liu PY, Death AK, Handelsman DJ. Androgens and Cardiovascular Disease. *Endocrine Rev.* 2003; 24: 313-340.
49. Lösel R, Wehling M. Nongenomic actions of steroid hormones. *Nature Rev Mol Biol.* 2003; 4: 46- 56.
50. Manteuffel-Cymborowska M, Chmurzynska W, Grzelakowska-Sztabert B. Tissue-specific effects of testosterone on S-adenosylmethionine formation and utilization in the mouse. *Biochim Biophys Acta.* 1992; 1116: 166-172.
51. Matsuda T, Takuma K, Baba A. Na⁺/Ca²⁺ exchanger: physiology and pharmacology. *Jpn J Pharmacol.* 1997; 74: 1-20.
52. Montaña LM, Bazán Perkins B. Resting calcium influx in airway smooth muscle. *Can J Physiol Pharmacol.* 2005; 83: 717-723.

53. Montaña LM, Calixto E, Figueroa A, Flores-Soto E, Carbajal V, Perusquía M. Relaxation of androgens on rat thoracic aorta: testosterone concentration dependent agonist/antagonist L-type Ca^{2+} channel activity, and 5β -dihydrotestosterone restricted to L-type Ca^{2+} channel blockade. *Endocrinology*. 2008; 149: 2517-2526.
54. Oritani K, Kincade PW. Identification of stromal cell products that interact with pre-B cells. *J Cell Biol*. 1996; 134: 771-82.
55. Orrego A, Vélez H, Rojas W, Borrero J, Restrepo J. *Fundamentos de Medicina. Endocrinología*. 6ª edición. Fondo Editorial CIB. Colombia. 2004.
56. Periasamy M y Kalyanasundaram A. SERCA Pump isoforms: their role in calcium transport and disease. *Muscle Nerve*. 2007; 35: 430-442.
57. Perusquía M, Navarrete E, González L, Villalón CM. The modulatory role of androgens and progestins in the induction of vasorelaxation in human umbilical artery. *Life Sci*. 2007; 81: 993-1002.
58. Perusquía M, Villalón CM. The vasodepressor effect of androgens in pithed rats: potential role of calcium channels. *Steroids*. 2002; 67: 1021-1028.
59. Perusquía M, Stallone J. Do androgens play a beneficial role in the regulation of vascular tone? Nongenomic vascular effects of testosterone metabolites. *Am J Physiol-Heart and Circulatory Physiol*. 2010; 298: 1301-1307.
60. Pessah IN, Stambuck RA, Casida JE. Ca^{2+} -activated ryanodine binding: Mechanisms of sensitivity and intensity modulation by Mg^{2+} , caffeine and adenine nucleotides. *Mol Pharmacol*. 1987; 31: 232-238.
61. Putney JW. A model for receptor-regulated calcium entry. *Cell Calcium*. 1986; 7: 1-12.
62. Prakriya M, Feske S, Gwack Y, Srikanth S, Rao A, Hogan PG. Orai1 is an essential pore subunit of the CRAC channel. *Nature*. 2006 ; 443: 230-233.
63. Rahman M, Inman M, Kiss L, Janssen LJ. Reverse-mode current in mouse airway smooth muscle: Na and voltage dependence, contributions to Ca^{2+} influx and contraction, and altered expression in a model of allergen-induced

- hyperresponsiveness. *Acta Physiologica. Scandinavian Physiological Society*. 2011; 1748-1716.
64. Reuter H, Seitz N. The dependence of calcium efflux from cardiac muscle on temperature and external ion composition. *J Physiol*. 1968; 195: 451-460
65. Rossi JP, Villamil AM, Echarte MM, Alzugaray ME, Borelli MI, García ME, Pande J, Grover AK, Gagliardino JJ. Plasma membrane calcium pump activity in rat pancreatic islets: an accurate method to measure its calcium-dependent modulation. *Cell Biochem Biophys*. 2006; 46: 193-200.
66. Seyrek M, Yildiz O, Ulusoy HB, Yildirim V. Testosterone relaxes isolated human radial artery by potassium channel opening action. *J Pharmacol Sci*. 2007;103: 309-316.
67. Schatzman HJ. ATP-dependent Ca^{2+} -extrusion from human red cells. *Experientia*. 1966; 22: 364-365.
68. Shen W, Frieden M, Demaurex N. Remodelling of the endoplasmic reticulum during store-operated calcium entry. *Biol Cell*. 2011; 103: 365–380
69. Scragg JL, Dallas ML, Peers C. Molecular requirements for L-type Ca^{2+} channel blockade by testosterone. *Cell Calcium*. 2007; 42: 11-5.
70. Scragg JL, Jones RD, Channer KS, Jones TH, Peers C Testosterone is a potent inhibitor of L-type Ca^{2+} channels. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004; 318: 503-506.
71. Sheng X, Nakada T, Kobayashi M, Kashihara T, Shibazaki T, Horiuchi-Hirose M, Gomi S, Hirose M, Aoyama T, Yamada M. Two mechanistically distinct effects of dihydropyridine nifedipine on $\text{CaV}1.2$ L-type Ca^{2+} channels revealed by Timothy syndrome mutation. *Eur J Pharmacol*. 2012; 685: 15-23.
72. Somlyo AP, Somlyo AV. Ca^{2+} sensitivity of smooth muscle and nonmuscle myosin II: modulated by G proteins, kinases, and myosin phosphatase. *Physiol Rev*. 2003; 83: 1325-1358.
73. Tepareenan P, Kendall DA, Randall MD. Testosterone-induced vasorelaxation in the rat mesenteric arterial bed is mediated predominantly via potassium channels. *Br J Pharmacol*. 2002; 135: 735-740.

74. Wang YX, Fleischmann BK, Kotlikoff MI. M2 receptor activation of nonselective cation channels in smooth muscle cells: calcium and Gi/G(o) requirements. *Am J Physiol Cell Physiol.* 1997 273: 500-508
75. Wu C, Sui G, Fry CH. The role of the L-type Ca^{2+} channel in refilling functional intracellular Ca^{2+} stores in guinea-pig detrusor smooth muscle. *J Physiol.* 2002; 538: 357-369.
76. Xiao JH, Zheng YM, Liao B, Wang YX Functional role of canonical transient receptor potential 1 and canonical transient receptor potential 3 in normal and asthmatic airway smooth muscle cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2010; 43: 17-25.
77. Yoshimura M, Oshima T, Matsuura H, Ishida T, Kambe M, Kajiyama G. Extracellular Mg^{2+} inhibits capacitative Ca^{2+} entry in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 1997; 95: 2567–2572.
78. Yue P, Chatterjee K, Beale C, Poole-Wilson PA, Collins P. Testosterone relaxes rabbit coronary arteries and aorta. *Circulation.* 1995; 91: 1154-1160.
79. Wheatly MG, Gao Y, Stiner LM, Whalen DR, Nade M, Vigo F, Golshani AE. Roles of NCX and PMCA in basolateral calcium export associated with mineralization cycles and cold acclimation in crayfish. *Ann N Y Acad Sci.* 2007; 1099: 190-192.