



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS

**PAPEL FISIOLÓGICO DE LAS HORMONAS SEXUALES MASCULINAS EN LA PATOGÉNESIS
DEL ASMA.**

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

PRESENTA:

M. en C. MARÍA JULIA ESPINOZA CAMACHO

TUTORA PRINCIPAL DE TESIS: DRA. MARÍA MERCEDES PERUSQUÍA NAVA
INTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM.

COMITÉ TUTOR: DR. LUIS MANUEL MONTAÑO RAMÍREZ
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM
DR. MOISÉS EDUARDO SELMAN LAMA
INSTITUTO DE ENFERMEDADES RESPIRATORIAS, INER.

MÉXICO, D.F. ENERO, 2014.



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.

Dr. Isidro Ávila Martínez
Director General de Administración Escolar, UNAM.
Presente

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 30 de septiembre de 2013, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **DOCTORA EN CIENCIAS** de la alumna **ESPINOZA CAMACHO MARIA JULIA** con número de cuenta **402029090** con la tesis titulada "**PAPEL FISIOLÓGICO DE LAS HORMONAS SEXUALES MASCULINAS EN LA PATOGENESIS DEL ASMA**", realizada bajo la dirección de la **DRA. MERCEDES PERUSQUÍA NAVA**.

Presidente: DRA. ROSALINDA GUEVARA GUZMÁN
Vocal: DR. FEDERICO MARTÍNEZ MONTES
Secretario: DRA. SARA HUERTA YEPEZ
Suplente: DRA. GABRIELA MORALI DE LA BREÑA
Suplente: DRA. LOURDES MARÍA BARRERA RAMÍREZ

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 08 de enero de 2014.

M. del Coro Arizmendi

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA

AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM; por permitirme continuar mi formación académica.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la Beca para Estudios de Doctorado que me fue asignada.

A los miembros del Comité Tutor que supervisaron este proyecto: Dra. María Mercedes Perusquía Nava (Tutora Principal), Dr. Luis Manuel Montaña Ramírez y Dr. Moisés Eduardo Selman Lama; por sus valiosos comentarios y correcciones durante cada sesión Tutorial.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A la *Dra. María Mercedes Perusquía Nava*, por ser mi tutora académica y por la excelente dirección de este proyecto de investigación.

Al *Dr. Luis Manuel Montaña Ramírez* por abrirme las puertas de su laboratorio, por su invaluable apoyo en cada etapa de este proyecto.

Al Jurado para el examen de grado: *Dra. Rosalinda Guevara Guzmán; Dr. Federico Martínez Montes; Dra. Sara Huerta Yopez; Dra. Gabriela Morali de la Brena; Dra. Lourdes María Barrera Ramírez*; por la revisión de esta Tesis.

Al QFB. *Edgar Flores Soto* por su valioso apoyo Técnico para la realización de los experimentos de microfluorometría.

Al *Dr. Jaime Chávez Alderete*, por su importante colaboración para la realización de los experimentos de pletismografía, por todo su apoyo y enseñanzas a lo largo de este proyecto.

Al MVZ. *Alberto Pizaña* por su colaboración para la obtención de cobayos del Bioterio del Instituto de Enfermedades Respiratorias, *Ismael Cosío Villegas*.

Al *M. en C. Ricardo Vázquez Ramírez*, por la elaboración de las estructuras de los andrógenos.

Al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica/Dirección General de Asuntos del Personal Académico (PAPIIT/DGAPA) por el financiamiento al proyecto No. IN205511 otorgado a la Dra. Perusquía.

PAPEL FISIOLÓGICO DE LAS HORMONAS SEXUALES MASCULINAS EN LA PATOGÉNSIS DEL ASMA.

Esta Tesis fue dirigida y supervisada por la Dra. María Mercedes Perusquía Nava, en el laboratorio a su cargo: Endocrinología de la Reproducción, perteneciente al Departamento de Biología Celular y Fisiología del Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. El proyecto fue desarrollado con financiamiento de PAPIIT/DGAPA (Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica/Dirección General de Asuntos del Personal Académico), proyecto No. IN205511-3 otorgado a la Dra. Perusquía.



Este proyecto lo dedico a mi familia, mi día y noche; mi luz y mi camino, con cariño.

Seymur para ti con respeto y admiración.

ESTE ESTUDIO FUE PARCIALMENTE PUBLICADO EN:

Espinoza J, Montaña LM, Perusquía M, Nongenomic bronchodilating action elicited by dehydroepiandrosterone (DHEA) in a guinea pig asthma model. *Steroid Biochem Mol Biol.*, 138:174-82, 2013.

ESTE ESTUDIO TABIÉN FUE PARCIALMENTE PRESENTADO EN LOS EVENTOS ACADÉMICOS:

Internacionales

Perusquía M, Espinoza J, Montaña LM, **Preventive effect of androgens against the bronchospasm in sensitized guinea pigs**, British Pharmacology Society; BPS Winter Meeting, Londres Inglaterra; 17-19 de diciembre de 2013.

Espinoza J, Montaña LM, Flores-Soto E, Perusquía M, **Androgens elicit relaxation by blocking the intracellular Ca²⁺ increment induced by KCl in the Guinea Pig airway smooth muscle**, 2nd Congress on Steroid Research, Chicago USA, 10-12 de marzo de 2013.

Perusquía M, Espinoza J, Montaña LM, **Dehydroepiandrosterone induces bronchodilation on antigen-induced contraction in ovalbumin-sensitized Guinea Pig tracheal smooth muscle**, 2nd Congress on Steroid Research, Chicago USA, 10-12 de marzo de 2013.

Nacionales

Espinoza J, Montaña LM, Perusquía M, **New bronchodilating properties of dehydroepiandrosterone (DHEA): posible role in the treatment of asthma**, XXXVIII Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción, A.C., Cholula, Puebla, 12-14 de junio de 2013.

Espinoza J, Chávez J, Montaña LM, Perusquía M, **Prevención del broncoespasmo presentado en el asma por un metabolito de testosterona, 5β-DHT**, XXXVII Reunión Anual de la Academia de Investigación en Biología de la Reproducción, A.C., Pachuca, Hidalgo, 27-30 de junio 2012.

ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
LISTA DE FIGURAS Y TABLAS.....	3
ABREVIATURAS.....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	5
1.1. Importancia del asma.....	5
1.2. Relación entre el asma y las variaciones hormonales.....	6
1.3. Generalidades de las hormonas esteroides.....	8
1.3.1. Niveles de andrógenos.....	12
1.4. Mecanismos de acción de las hormonas esteroides sexuales.....	14
1.4.1. Acción genómica de las hormonas esteroides sexuales.....	14
1.4.2. Acción no genómica de las hormonas esteroides sexuales.....	15
1.5. Efectos de las hormonas esteroides sobre las vías aéreas.....	17
1.5.1. Efectos de las hormonas sexuales femeninas sobre las vías aéreas.....	17
1.5.2. Efectos benéficos de los andrógenos sobre las vías aéreas.....	19
1.6. Mecanismo de acción del efecto broncodilatador de los andrógenos...	23
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	25
3. HIPÓTESIS.....	26
4. OBJETIVOS.....	27
4.1. General.....	27
4.2. Particulares.....	27
5. METODOLOGÍA.....	30
5.1. Material Biológico.....	30
5.1.1. Cobayos sensibilizados a OVA.....	30
5.2. Sistema de registro isométrico para tejido aislado.....	31
5.2.1. Montaje de los anillos traqueales en el sistema de registro isométrico.....	32
5.2.2. Determinación farmacológica de la presencia o la ausencia de epitelio traqueal.....	34
5.2.3. Prueba de los andrógenos sobre anillos traqueales de cobayo.....	34
5.3. Determinación del potencial papel del óxido nítrico (NO) en el efecto broncodilatador inducido por andrógenos.....	36
5.4. Mecanismo de acción de los andrógenos.....	36
5.4.1. Inhibidores de la síntesis de proteínas, de la transcripción y de la actividad de la 3 β -HSD.....	37
5.4.2. Exploración de la posible participación de los receptores β_2 adrenérgicos en la broncodilatación inducida por los andrógenos.....	38
5.4.3. Potencial participación de los canales de potasio en la acción broncorelajante Potencial de los andrógenos.....	39
5.4.4. Potencial antagonismo de los andrógenos sobre los canales de Ca ²⁺ operados por voltaje (CCOV).....	39

5.5. Fluctuación de la concentración de Ca^{2+} intracelular en la célula del MLVA en respuesta a los andrógenos.....	41
5.6. Evaluación del potencial efecto preventivo de los andrógenos sobre el broncoespasmo provocado por OVA in vivo.....	44
5.7. Evaluación y análisis estadístico de los datos.....	47
5.8. Fármacos utilizados.....	49
6. RESULTADOS.....	51
6.1. Determinación de la condición epitelial en los anillos traqueales de cobayos no sensibilizados.....	51
6.2. Efecto relajante de los andrógenos en anillos traqueales de cobayo...	52
6.3. Efecto de la eliminación del epitelio sobre la relajación inducida por los andrógenos.....	57
6.4. Potencia y eficacia de los andrógenos.....	59
6.5. Efecto de los inhibidores seleccionados sobre la respuesta de los andrógenos.....	61
6.6. La broncorelajación inducida por los andrógenos en la tráquea de cobayo es independiente de los canales de potasio.....	63
6.7. Efecto de DHEA sobre el influjo de Ca^{2+} a través de los CCOV.....	65
6.8. Disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ inducida por los andrógenos en miocitos traqueales de cobayo.....	67
6.9. Los andrógenos previenen la broncoespasmo en cobayos sensibilizados.....	70
7. DISCUSIÓN.....	75
7.1. General.....	75
7.2. Mecanismo de la acción broncodilatadora de los andrógenos.....	78
7.2.1. La acción broncorelajante de los andrógenos es independiente del epitelio bronquial, del NO, de los β_2 adrenoreceptores y de los canales de K^+	80
7.2.2. Los andrógenos bloquean los CCOV.....	83
7.3. Relación entre la estructura química y la potencia broncodilatadora de los andrógenos.....	86
7.4. Importancia fisiológica de la acción broncodilatadora de los andrógenos.....	90
8. CONCLUSIONES.....	93
9. REFERENCIAS.....	95
10. ANEXO.....	124

RESUMEN

Datos epidemiológicos señalan que la deficiencia de andrógenos podría ser la causa de exacerbación de los episodios asmáticos en los hombres; pero la evidencia experimental es muy escasa. Se ha mostrado que la testosterona (TES) y 5α -dihidrotestosterona (5α -DHT) inducen un efecto broncorelajante de tipo no genómico; sin embargo, no se ha esclarecido su mecanismo de acción. El objetivo de este estudio fue: caracterizar la acción relajante de diferentes andrógenos en el músculo liso de la vía aérea (MLVA) de un modelo experimental de asma; estudiar sus mecanismos de acción mediante varias estrategias experimentales y; determinar su capacidad para prevenir el broncoespasmo en el animal asmático. El registro isométrico de anillos traqueales, aislados de cobayos machos adultos, mostró que no hubo diferencia en la broncorelajación causada por dehidroepiandrosterona (DHEA), TES, 5α -DHT y 5β -DHT en los cobayos sanos y asmáticos, pero cada andrógeno tuvo diferente potencia y eficacia para relajar las contracciones, provocadas por agentes broncoconstrictores de diferente naturaleza. 5β -DHT y DHEA resultaron los broncorelajantes más potentes sobre la contracción producida por K^+ alto (KCl); mientras los andrógenos restantes lo fueron sobre la contracción a carbacol (CCh) o a ovoalbúmina (OVA) en cobayos asmáticos, sensibilizados previamente a este alérgeno. La respuesta relajante a los andrógenos no fue modificada por: la ausencia del epitelio traqueal, la presencia del inhibidor de la óxido nítrico (NO) sintasa, de un antagonista β_2 adrenérgico o de un bloqueador de los canales de K^+ , en un amplio rango de concentraciones. Asimismo, se caracterizó que el efecto relajante de DHEA es mediado por mecanismos no genómicos y no requiere que la hormona sea biotransformada, ya que su efecto no fue afectado por los inhibidores de la transcripción y la síntesis de proteínas o por la 3β -hidroesteroide deshidrogenasa (3β -HSD), pero si fue disminuido por Bay K 8644, un activador de los canales de Ca^{2+} operados por voltaje tipo L (CCOV). DHEA, antagonizó la contracción producida por Ca^{2+} o Bay K 8644. Mediante el uso de microfluorometría en los miocitos traqueales aislados, también se determinó que con excepción de 5α -DHT, los andrógenos causaron disminución de la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[Ca^{2+}]_i$) provocada por KCl, de manera dependiente de la concentración, siendo 5β -DHT el más potente. Empleando pletismografía barométrica, se observó que el aumento de la resistencia pulmonar (R_L), provocado por un reto antigénico con OVA en cobayos sensibilizados, fue disminuido con el pretratamiento de cada andrógeno, en forma dependiente de la dosis. Se concluye que la broncorelajación de los andrógenos *in vitro* es operativa *in vivo* al prevenir el broncoespasmo provocado por un reto antigénico en animales asmáticos. Los resultados descartan que en el efecto broncorelajante de los andrógenos participen: el epitelio traqueal, el NO, los receptores β_2 adrenérgicos y los canales de K^+ ; siendo el bloqueo de los CCOV un sitio de acción preferencial para el mecanismo broncorelajante de DHEA y 5β -DHT y, posiblemente los canales de Ca^{2+} activados por reservas (SOCC) para TES y 5α -DHT.

ABSTRACT

Epidemiological data indicate that androgens deficiency could be contribute to exacerbation of asthmatic episodes in men; however, experimental evidence is scant. It has been shown that testosterone (TES) and 5 α -dihydrotestosterone (-DHT) induce a nongenomic bronchorelaxing effect although the mechanism for this action remains to be elucidated. The aim of this study was: to characterize the relaxing action of different androgens on airway smooth muscle of an experimental model of asthma; to study the mechanisms of action by several experimental strategies, and to evaluate their ability to prevent the bronchospasm in asthmatic animal. Isometric record of isolated tracheal rings from adult male guinea pigs showed no difference in bronchorelaxation elicited by dehydroepiandrosterone (DHEA), TES, 5 α -DHT y 5 β -DHT on healthy and asthmatic guinea pigs, but each androgen had different potency and efficacy to relax the contractions induced by bronchoconstrictor agents of different nature. 5 β -DHT and DHEA were the most potent in bronchorelaxing contractions produced by high K⁺ (KCl) while the remaining androgens were on contractions by carbachol (CCh) or ovalbumin (OVA) in asthmatic guinea pigs previously sensitized to this allergen. The relaxing response to androgens was not modified by: the absence of tracheal epithelium, the presence of nitric oxide (NO) synthase inhibitor, of a β_2 -adrenergic antagonist or a K⁺ channels blocker, in a wide range of concentrations. Likewise, the relaxing effect of DHEA was found to be mediated by nongenomic mechanisms and does not require hormone biotransformation, since its effect was not affected by inhibition of transcription, protein synthesis or the activity of the 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (-HSD). However, relaxing activity was decreased by Bay K 8644, an activator of L-type voltage-operated Ca²⁺ channels (VOCC). DHEA antagonized contractions produced by Ca²⁺ or Bay K 8644. Using microfluorometry in isolated tracheal myocytes it was also was determined that, except 5 α -DHT, androgens elicited a decrease in the intracellular Ca²⁺ concentration induced by KCl in a concentration-dependent manner; 5 β -DHT was the most potent. Using barometric plethysmography, the increase in pulmonary resistance induced by an antigen challenge was observed to be prevented by pre-treatment with each androgen in a dose-dependent manner. We conclude that the *in vitro* bronchorelaxation of androgens is operative *in vivo* to prevent bronchospasm caused by an antigen challenge in asthmatic animals. The results indicate that the bronchorelaxing effect of androgens does not involve participation of the tracheal epithelium, NO, β_2 -adrenergic receptors or K⁺ channels. Blockade of VOCC seems to be the preferential mechanism for DHEA and 5 β -DHT, whereas store-operated Ca²⁺ channels (SOCC) are possible targets for TES, and 5 α -DHT.

LISTA DE FIGURAS Y TABLAS

Figura	Título	Página
1	Biosíntesis de andrógenos.	12
2	Patrón de secreción de la DHEA a través de la vida.	13
3	Efecto protector de los andrógenos sobre las vías respiratorias	23
4	Sistema de registro isométrico para tejido aislado.	34
5	Sistema de microfluorimetría.	44
6	Pletismografía para animal anestesiado.	47
7	Registros típicos de la tráquea de cobayo donde se muestra la prueba farmacológica de la función epitelial con bradicidina.	52
8	Registros típicos de la tráquea de cobayo donde se muestra la broncorelajación inducida por los andrógenos	54
9	Curvas concentración-respuesta de andrógenos sobre la tráquea de cobayos no sensibilizados y sensibilizados.	55
10	Curvas concentración-respuesta de salbutamol en anillos traqueales de cobayos no sensibilizados y sensibilizados.	57
11	Curvas concentración-respuesta de andrógenos en la tráquea de cobayos no sensibilizados con epitelio y sin epitelio.	59
12	Registros típicos de la tráquea de cobayo donde se muestra la contracción inducida por carbacol (CCh) inhibida por salbutalmol.	63
13	Curvas concentración respuesta de andrógenos en presencia de TEA.	65
14	Prevención del influjo de Ca^{2+} extracelular por DHEA.	67
15	Aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ al estímulo de KCl (60 mM) en miocitos traqueales de cobayo.	69
16	Curvas concentración respuesta de la disminución de $[Ca^{2+}]_i$ al estímulo de KCl por los andrógenos en miocitos aislados de la tráquea de cobayo.	70
17	Prevención, dependiente de la dosis y del tiempo, del broncoespasmo por andrógenos.	73
18	Curvas dosis respuesta de inhibición de la R_L por los andrógenos.	74
19	Comparación de la estructura química de los andrógenos.	90
Tabla 1	Efecto broncorelajante de los andrógenos en anillos traqueales de cobayos no sensibilizados y sensibilizados.	61
Tabla 2	Efecto de los tratamientos sobre el efecto relajante inducido por los andrógenos.	63

LISTA DE ABREVIATURAS

ACh; Acetilcolina, AMPc; Adenosín monofosfato cíclico, BK; Bradicidina, BSA; Albumina de suero bovino, CCh; Carbacol, CCOV; Canales de Ca^{2+} operados por voltaje, CI_{50} ; Concentración inhibitoria media, DAG; Diacilglicerol, DHEA; Dehidroepiandrosterona, DMSO; Dimetilsulfóxido, EAR ; Respuesta asmática temprana, $E_{\text{máx}}$; Efecto máximo, ER; Receptores de estrógenos, Fura-2-AM; Fura-2-acetoximetil éster, GMPc; Guanosín monofosfato cíclico, IL; Interleucina, IP_3 ; inositol trifosfato, Kv; Canales de K^+ dependientes de voltaje, LAR; Respuesta asmática tardía, L-NAME; N^{ω} -nitro-L-arginina metil éster, MAPK; Proteínas cinasas activadas por mitogenos, MLVA; Músculo liso de la vía aérea, NO; Óxido nítrico, OVA; Ovoalbúmina, PGE_2 ; Prostaglandina E_2 , PR; Receptor de progestinas, RA; Receptor de Andrógenos, R_L ; Resistencia pulmonar, ROCC; Canales de Ca^{2+} operados por receptor, SHBG; Hormona esteroidea unida a globulina, SOCC; Canales de Ca^{2+} operados por reservas, TEA; Tetrametilamonio, TES; Testosterona, $[\text{Ca}^{2+}]_i$; Concentración de Ca^{2+} intracelular; 3β -HSD; 3β -hidroesteroide deshidrogenasa, 5α -DHT; 5α -dihidrotestosterona, 5β -DHT; 5β -dihidrotestosterona.

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Importancia del asma

El asma es una enfermedad respiratoria que se manifiesta de forma muy variable; tanto en sus síntomas, como en su frecuencia y gravedad. Se define por ser un padecimiento crónico inflamatorio de las vías respiratorias, determinado por la obstrucción variable del flujo de aire en las vías respiratoria; dicha obstrucción puede ser reversible o irreversible y está determinada por la broncoconstricción del músculo liso de la vía aérea (MLVA). La inflamación y la hiperreactividad bronquial son dos signos importantes dentro del cuadro clínico del asma. (Global Initiative for Asthma; GINA, 2012).

Otra característica del asma es el remodelado de la vía aérea, que se reconoce por: daño epitelial, hipertrofia e hiperplasia del MLVA, engrosamiento de la capa de colágeno subepitelial y edema (Messer *et al.*, 1960; Pare *et al.*, 1997). Actualmente, se ha reconocido que los cambios estructurales de la vía aérea comienzan desde los primeros síntomas del asma en niños y adultos (Al-Muhsen *et al.*, 2011; Davies, 2009; Girodet *et al.*, 2011).

Los síntomas más importantes del asma son: dificultad recurrente para respirar, silbilancias súbitas y/o episódicas, opresión en el pecho y tos (McFadden, Jr., 2003; Regal *et al.*, 2007). Aunque los síntomas del asma son reconocidos en la práctica clínica, su etiología y patogénesis no han quedado establecidas (Holgate y Polosa, 2008; Szeffler y Dakhama, 2011; Global Initiative for Asthma (GINA), 2012). Se sabe que este padecimiento tiene un importante componente hereditario; considerado el principal factor de riesgo

(Ober y Yao, 2011; Seibold *et al.*, 2008; Torgerson *et al.*, 2012); y un componente de índole ambiental (ISSAC, 1998; Vargas, 2009), como son las infecciones respiratorias de origen viral o la exposición a alérgenos (Jackson *et al.*, 2011; Martínez, 2011; Szeffler y Dakhama, 2011).

El asma es un problema de salud grave, se estima que hay 300 millones de pacientes asmáticos en todo el mundo (Anto, 2012). El último reporte anual de GINA (Global Initiative for Asthma; GINA, 2012) informó que la prevalencia del asma es muy heterogénea entre las distintas regiones del mundo, teniendo un intervalo que va del 1 al 18% de la población general, considerando niños y adultos. Es importante hacer notar que durante la infancia existe mayor riesgo para desarrollar asma; de tal manera que, la prevalencia de este padecimiento puede llegar a ser 30% mayor en los niños en comparación con los adultos (Bousquet, 2000; Cookson, 2004; Jenkins *et al.*, 2003).

Es obvio que el asma es un serio problema de salud pública mundial, con una tasa de mortalidad que va del 1.6 al 36.7 muertes por 100,000 asmáticos (Lemanske, Jr. y Busse, 2010).

1.2. Relación entre el asma y las variaciones hormonales

Es fundamental destacar los datos epidemiológicos que indican que la prevalencia del asma está fuertemente relacionada con el género, estatus endócrino y la edad. En numerosos reportes se ha señalado que, durante la infancia la prevalencia del asma es mayor en los niños en comparación con las niñas de la misma edad (≤ 10 años) (Bonner, 1984a; Carey *et al.*, 2007; Fagan *et al.*, 2003; ISSAC, 1998; Kjellman y Gustafsson, 2000; Ninan y Russell, 1992;

Osman, 2003; Sears, 1997b; Tam *et al.*, 2011; Zannolli y Morgese, 1997). Sin embargo, cuando inicia la pubertad esta situación se invierte, ya que la prevalencia del asma es 50% mayor en las mujeres que en los hombres en edad reproductiva (12-45 años) (Almqvist *et al.*, 2008; Becklake y Kauffmann, 1999; Bonner, 1984b; Jeon *et al.*, 2009; Osman, 2003; Schatz y Camargo, Jr., 2003). Cabe hacer mención que las mujeres asmáticas son las que presentan, con mayor frecuencia, el fenotipo de asma severa; con ataques asmáticos graves (Almqvist *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2008; De Marco R. *et al.*, 2000; Jeon *et al.*, 2009; Melgert *et al.*, 2007; Paoletti *et al.*, 1995; Postma, 2007) y además, donde inciden varios problemas de tipo alérgico y respiratorios (Bouman *et al.*, 2005; Melgert *et al.*, 2007).

En marcado contraste, como se mencionó, en los hombres asmáticos se ha observado una elevada prevalencia del asma durante la niñez, que se reduce cuando inicia la adolescencia y con notable disminución de la sintomatología a lo largo de la juventud; sin embargo, la enfermedad nuevamente se exacerba a partir de la quinta o sexta década de la vida (Zannolli y Morgese, 1997). Estas observaciones permiten sugerir que la variación de los niveles plasmáticos de las hormonas sexuales masculinas (andrógenos) durante la vida están involucradas en la patogénesis del asma (Canguven y Albayrak, 2011; Zannolli y Morgese, 1997), *i.e.*, los niveles bajos de andrógenos en la infancia y su deficiencia en la madurez y senectud propician la exacerbación de la enfermedad, postulando que los andrógenos tienen una notable acción “protectora” sobre el asma.

Con base en las evidencias anteriores queda claro que el asma es una enfermedad ligada al sexo; por lo que las hormonas esteroides sexuales tienen una importancia destacada en el desarrollo y curso del asma (Revisado por Tesse *et al.*, 2011).

1.3. Generalidades de las hormonas esteroides

Es pertinente hacer mención sobre algunos aspectos de las hormonas esteroides. Los esteroides son lípidos derivados del colesterol (lípidos de 27 carbonos) y comparten la misma estructura química de 4 anillos de carbono fusionados, llamada ciclopentanoperhidrofenantreno.

Los diferentes tipos de esteroides se diferencian y clasifican por el número de carbonos y por los grupos funcionales que presentan: las progestinas, glucocorticoides y mineralcorticoides poseen 21 carbonos; los andrógenos tienen 19 átomos de carbono y los estrógenos tienen 18 carbonos (Voet *et al.*, 2007).

En particular, las hormonas esteroides sexuales, son responsables de mantener los fenotipos sexuales: masculino (andrógenos) y femenino (estrógenos y progesterona); y son peculiarmente importantes en los procesos reproductivos.

Los andrógenos se sintetizan, principalmente, en las glándulas suprarrenales, las gónadas masculinas (testículos) y la placenta; en menor medida, se sintetizan en el hígado, el tejido adiposo, subcutáneo, las glándulas mamarias y el hipotálamo (Tsutsui *et al.*, 1999). El primer paso de la biosíntesis de los andrógenos es la bioconversión del colesterol a pregnenolona, mediante

la ruptura de la cadena lateral del colesterol, por acción de la enzima P450_{scc} (*side chain cleavage*). Cabe señalar que, a partir de la pregnenolona también se sintetizan los mineralcorticoides, glucocorticoides y las progestinas.

En la Fig. 1 se ilustra la siguiente ruta de biotransformación. La pregnenolona tiene dos vías de biotransformación hacia andrógenos: (i) es metabolizada por la P450 C-17 para originar la dehidroepiandrosterona (DHEA; un andrógeno principalmente de origen suprarrenal); y (ii) es sustrato de la enzima 3 β -HSD (HSD: hidroxisteroide deshidrogenasa) para generar a la progesterona, la cual se metaboliza, por la P450 C-17, a androstendiona, un precursor de la testosterona (TES). La DHEA es un Δ^5 -esteroide suprarrenal y puede ser sulfatado para producir a su metabolito, sulfato de DHEA (DHEA-S); la DHEA también puede ser biotransformada a los andrógenos: androstendiol, por la reducción del grupo 17-ceto, por acción de la enzima 17 β -HSD y androstendiona, por acción de la 3 β -HSD, que oxida el grupo 3 β -hidroxilo. Como se puede apreciar en la Fig. 1, la 3 β -HSD y la 17 β -HSD también toman como sustrato al androstendiol y a la androstendiona para biotransformarse a TES (Δ^4 -esteroide).

La TES es sustrato de la enzima P450 aromatasa, que reduce su grupo 3-ceto y aromatiza el anillo A, para generar al esteroide femenino de mayor importancia, el 17 β -estradiol, producido en los ovarios en grandes cantidades.

La TES también es precursora de otros importantes andrógenos. Las enzimas 5 α - y 5 β -reductasa producen una reducción en el C-5 de la TES, cambiando la orientación del hidrógeno para modificar la configuración a α /*trans* o β /*cis*, lo cual permite la biotransformación hacia los

dihidrometabolitos: 5α -dihidrotestosterona (5α -DHT) y 5β -dihidrotestosterona (5β -DHT). Estos andrógenos son sintetizados principalmente en los testículos y, a diferencia de la TES, no pueden ser aromatizados a estrógenos (Pozzi *et al.*, 2003; Poletti *et al.*, 1998). Además, son sustrato de las enzimas 3α - o 3β -HSD para producir tetrahydroderivados no aromatizables como: androstandiol ($3\alpha,5\alpha$); epiandrostandiol ($3\beta,5\alpha$); etiocolanona ($3\alpha,5\beta$) y epietiocolanona ($3\beta,5\beta$) (Jez y Penning, 1998; Penning *et al.*, 2000).

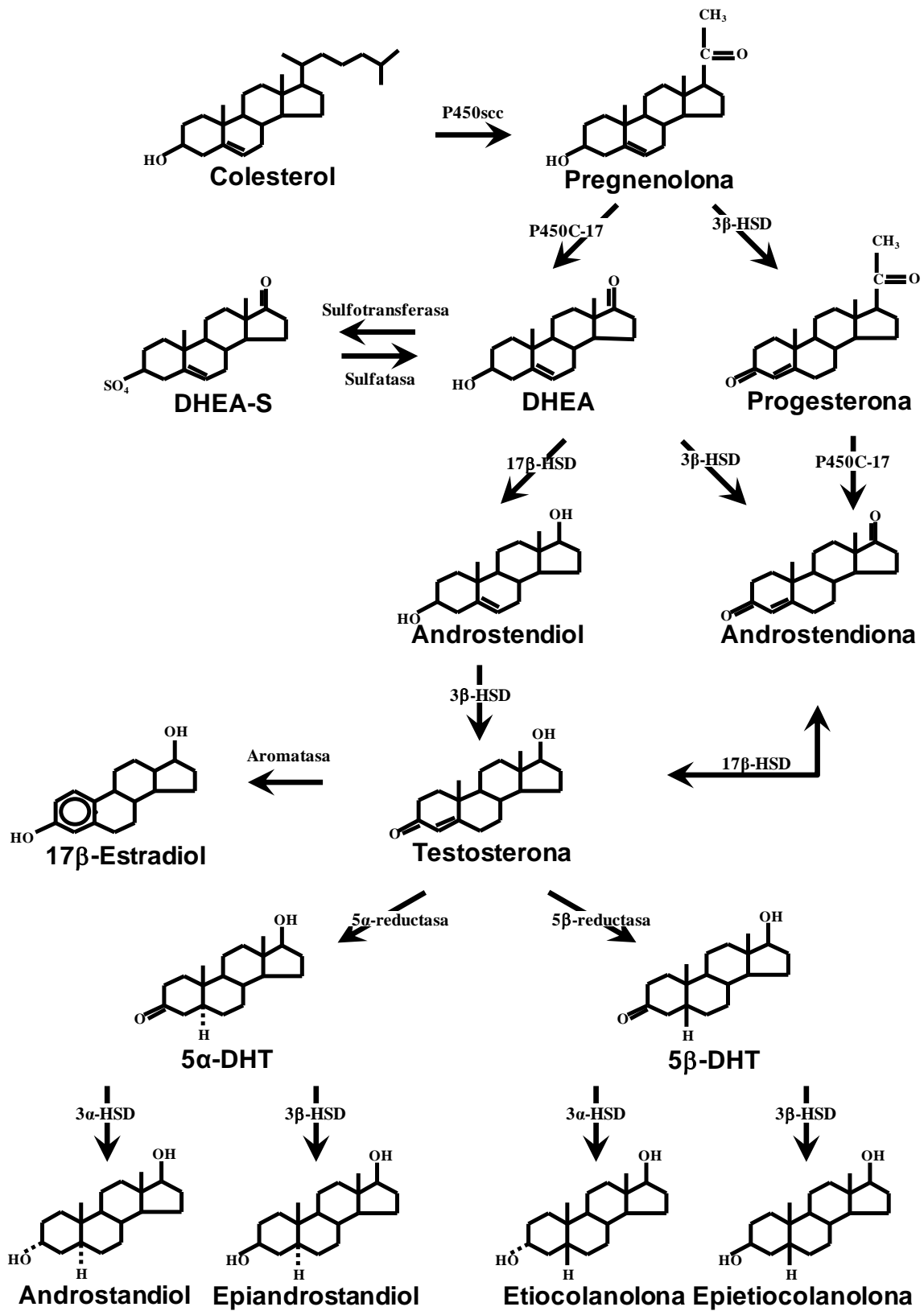


Figura 1. Biosíntesis de andrógenos. HSD (hidroxiesteroide deshidrogenasa), P450 (citocromo P450), P450_{scc} (P450 side chain cleavage), DHT (dihidrottestosterona); DHEA (dehidroepiandrosterona) y DHEA-S (sulfato de DHEA).

1.3.1. Niveles de andrógenos

Específicamente, el esteroide precursor de los andrógenos, la DHEA, alcanza su nivel máximo en plasma en la segunda década de la vida y comienza a declinar, de manera progresiva, hasta alcanzar los niveles más bajos a partir de la quinta década de la vida (Fig. 2; Labrie, 1998).

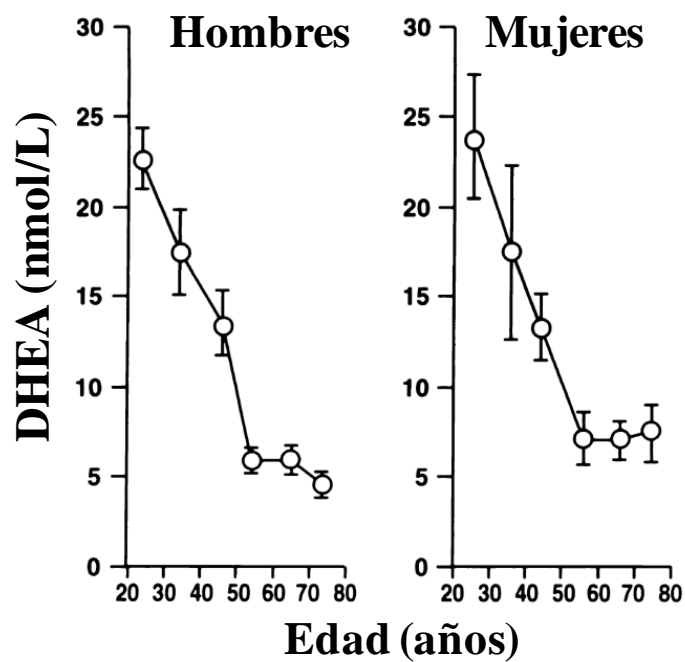


Figura 2. Patrón de secreción de la DHEA a través de la vida. Modificado de Labrie, 1998.

La declinación de la secreción de la DHEA, y de su metabolito sulfatado (DHEA-S), coincide con el aumento de la incidencia de varias enfermedades degenerativas, de tipo: cardiovascular, cognitivas, metabólicas o motoras; por lo que desde hace décadas se ha considerado a la DHEA como responsable, en parte, de mantener la salud general del organismo (Rainey *et al.*, 2002; Saltzman y Guay, 2006; Traish *et al.*, 2011).

Otro andrógeno importante es la TES, los niveles fisiológicos de la TES son menores en comparación con los niveles de DHEA y en un adulto sano oscilan entre 13.9 y 31.2 nmol/L, de esta concentración sólo el 2% de la TES se encuentra en forma libre en la sangre (Ostatnikova *et al.*, 2002) y el 98% se encuentra unida a proteínas como la albumina y la globulina unida a hormonas esteroides (SHBG; *steroid hormone binding globulin*) lo que impide que la TES ingrese al citoplasma (Diver *et al.*, 2003).

Así como la DHEA, la TES también disminuye gradualmente a partir de los 40 años y, se ha observado que la disminución de este andrógeno también está asociado con una mayor incidencia de padecimientos relacionados con el género, como son las enfermedades metabólicas, endocrinas, disfunción eréctil, neurodegenerativas, cardiovasculares, respiratorias y de tipo alérgico, como es el asma (Revisado por Traish *et al.*, 2009b; Traish *et al.*, 2009a; Traish *et al.*, 2009c).

Cabe destacar que, aunque la DHEA y la TES son los andrógenos que se encuentran a las concentraciones más altas en sangre, el metabolito 5 α -reducido de la TES, 5 α -DHT, es otro andrógeno con acciones fundamentales para el desarrollo y mantenimiento del fenotipo masculino

(Duskova y Pospisilova, 2011). Específicamente, 5α -DHT tiene un papel esencial en la diferenciación y desarrollo de los genitales externos; además, en conjunto con la TES mantiene la fertilidad y el fenotipo masculino en los individuos adultos. En comparación con la DHEA y la TES, el metabolito 5α -DHT se encuentra a niveles plasmáticos inferiores (0.91 -3-92 nmol/L), pero a diferencia de sus precursores, los niveles plasmáticos de 5α -DHT no declinan con la edad (Belanger *et al.*, 1994; Labrie *et al.*, 1998; Feldman *et al.*, 2002; Barrett-Connor *et al.*, 1999). Respecto al otro metabolito 5-reducido de la TES, 5β -DHT, no existen reportes sobre sus niveles plasmáticos.

1.4. Mecanismos de acción de las hormonas esteroides sexuales

Las hormonas esteroides sexuales llevan a cabo sus efectos mediante dos mecanismos; el mecanismo clásico o genómico, que involucra la modulación de la expresión de diversos genes y el mecanismo no genómico, que, a diferencia del mecanismo genómico, es independiente de la modulación de genes.

1.4.1. Acción genómica de las hormonas esteroides sexuales

El mecanismo genómico de las hormonas esteroides sexuales se caracteriza por ser de larga latencia, sus efectos se observan a largo plazo y son irreversibles. Para actuar mediante este mecanismo, las hormonas esteroides sexuales atraviesan la membrana plasmática y se unen a un receptor citoplasmático específico, hay receptores intracelulares específicos para cada grupo de esteroides sexuales: los receptores a estrógenos ($ER\alpha$ y $ER\beta$); los receptores a progestinas (PR-A PR-B) y el receptor a andrógenos

(RA). La unión de la hormona sexual con su receptor citoplasmático se da en una conformación de homodímero; el cual es transportado a la región nuclear y se une a una región que tiene secuencias específicas del DNA llamadas de manera genérica elementos de respuesta a hormonas, una vez que el homodímero receptor-hormona se ha unido al DNA se comporta como un factor de transcripción, que induce la expresión o la represión de genes específicos; en esta acción también intervienen otras moléculas accesorias llamadas coactivadores o corepresores, que participan en la expresión o la represión de los genes modulados por las hormonas esteroides (Revisado por Beato y Klug, 2000; Pennell y Morrow, 2013).

1.4.2. Acción no genómica de las hormonas esteroides sexuales

El mecanismo no genómico de las hormonas esteroides sexuales, a diferencia del mecanismo genómico, es muy rápido, sucede en segundos o minutos y es reversible, debido a que la modulación de genes, la transcripción o la síntesis de proteínas no están involucrados; además, este mecanismo tampoco requiere la unión de la hormona con su receptor intracelular específico (Falkenstein *et al.*, 2000; Wierman, 2007). Así, los mecanismos no genómicos no pueden ser bloqueados por los inhibidores de la síntesis de proteínas (*e.g.* cicloheximida), de la transcripción (*e.g.* actinomicina D) o los antagonistas clásicos del receptor intracelular de las hormonas (antiprogestinas, antiestrógenos o antiandrógenos), estas son herramientas farmacológicas imprescindibles para garantizar la caracterización de respuestas de tipo no genómico (Wehling, 1997).

El mecanismo no genómico de las hormonas esteroideas sexuales no tiene una ruta específica y puede ser a través de varias vías; por ejemplo, mediante segundos mensajeros como son las MAPK (proteínas cinasas activadas por mitogenos), las proteínas tirosina cinasa, el GMPc (guanosín monofosfato cíclico) o el AMPc (adenosín monofosfato cíclico); también puede ser a través de la regulación de los canales iónicos (de Na, Ca²⁺ o K⁺) de la membrana plasmática (Simoncini y Genazzani, 2003; Rahman y Christian, 2007).

Los estrógenos y las progestinas tienen efectos no genómicos activando sus receptores específicos (ER α , ER β , PR) situados en la membrana celular que, a diferencia de sus receptores intracelulares, no funcionan como factores de transcripción (Revisado por Wierman, 2007); sino que se encuentran asociados a receptores acoplados a proteínas G (G_{q/11}) o proteínas cinasa y, cuando son activados, inducen vías de señalización mediante segundos mensajeros como: GMPc, AMPc, inositol trifosfato (IP₃), diacil glicerol (DAG), Ras/Raf/MEK/ERK (Simoncini y Genazzani, 2003; Boonyaratanakornkit y Edwards, 2007; Tokumoto *et al.*, 2012; Kaore *et al.*, 2012).

En el caso de los andrógenos, se ha sugerido que estos esteroideos producen efectos no genómicos alterando la permeabilidad de la membrana celular, sin requerir un RA (Falkenstein *et al.*, 2000; Wierman, 2007); en línea con lo anterior, se ha demostrado que la TES, unida a una proteína (albumina de suero bovino), que impide el ingreso del andrógeno al citoplasma celular, provoca diversas acciones que se han caracterizado como no genómicas (Rahman y Christian, 2007). Así, aunque el grupo de Liu y Dillon (2002) han reportado que la DHEA provoca varios efectos actuando sobre un receptor de

membrana, asociado a proteínas G_i, también han considerado que éste es un receptor putativo y no propiamente un receptor específico de DHEA o un RA (Liu y Dillon, 2002; 2004).

1.5. Efectos de las hormonas esteroides sobre las vías aéreas

Aunque las propiedades antiinflamatorias de los glucocorticoides, inducidas por una vía genómica, han sido ampliamente reconocidas y aprovechadas en su uso terapéutico en el asma (Revisado por Barnes y Adcock, 2003), los efectos genómicos y no genómicos que ejercen de los esteroides sexuales, estrógenos, progestinas y andrógenos sobre las vías aéreas no han sido completamente establecidos (Revisado por Oertelt-Prigione, 2012; Verma *et al.*, 2011).

1.5.1. Efectos de las hormonas sexuales femeninas sobre las vías aéreas

Se ha reportado que, de las hormonas femeninas, el estradiol tiene evidentes efectos proinflamatorios sobre las vías aéreas, como son el incremento de numerosas moléculas y células proinflamatorias y la estimulación de la presentación de los antígenos (Corteling y Trifilieff, 2004; Haggerty *et al.*, 2003; Melgert *et al.*, 2007; Murphy y Gibson, 2008; Seymour *et al.*, 2002; Tam *et al.*, 2011); estos efectos están directamente asociados con el asma y otros padecimientos alérgicos (Hamelmann *et al.*, 1999; Komi y Lassila, 2000; Tam *et al.*, 2011).

Los efectos proinflamatorios del estradiol, son provocados por un mecanismo genómico y se han señalado como responsables de que la

incidencia y la gravedad del asma sean mayores en las mujeres en edad reproductiva (Barr y Camargo, Jr., 2004; Choi, 2011; Derimanov y Oppenheimer, 1998; Fagan *et al.*, 2003; Gillum, 2005; Jarvis y Leynaert, 2008; Lange *et al.*, 2001; Macsali *et al.*, 2009; Romieu *et al.*, 2010; Salam *et al.*, 2006; Troisi *et al.*, 1995; Zaitso *et al.*, 2007).

En años recientes estudios *in vitro* han mostrado que el estradiol, a concentraciones fisiológicas (10-100 nM), previene la contracción inducida por carbacol (CCh) en preparaciones traqueales y bronquiales de ratón; este efecto no genómico es mediado por la activación de los canales de potasio sensibles a Ca^{2+} (K_{Ca}) en el MLVA y por la síntesis de óxido nítrico (NO), en el epitelio de las vías aéreas (Dimitropoulou *et al.*, 2005). Otros estudios también han demostrado que el estradiol: (i) induce la síntesis de NO (Townsend *et al.*, 2012a); (ii) incrementa los niveles de GMPc (Pang *et al.*, 2002) y (iii) disminuye la concentración de Ca^{2+} intracelular ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) por el bloqueo de los canales de Ca^{2+} operados por voltaje tipo L (CCOV) (Townsend *et al.*, 2010); todos son efectos no genómicos que podrían provocar una acción broncorelajante benéfica; sin embargo, el efecto proinflamatorio del estradiol es el más preponderante en las vías aéreas.

A diferencia del estradiol, desde hace décadas se ha sugerido que la progestina más abundante, la progesterona, tiene una acción antiinflamatoria sobre las vías aéreas (Beckmann, 2008; Grindheim *et al.*, 2012; Schatz *et al.*, 2003; Stenius-Aarniala *et al.*, 1988), aumentando la concentración de la interleucina IL-10 (de Oliveira *et al.*, 2007; Oertelt-Prigione, 2012). Además, se ha reportado que la progesterona induce otro efecto benéfico sobre las vías

aéreas, al prevenir las contracciones del MLVA provocadas, *in vitro*, por diferentes broncoconstrictores (CCh, histamina o Ca^{2+}), mediante un mecanismo no genómico; los metabolitos 5-reducidos de la progesterona también tienen este efecto (Perusquía *et al.*, 1997), el cual podría explicar la broncodilatación que se ha observado en mujeres embarazadas (Beckmann, 2008).

Como se puede apreciar, la progesterona produce efectos benéficos sobre las vías aéreas, tanto por un mecanismo genómico (efecto antiinflamatorio) como por un mecanismo no genómico (la broncodilatación); posiblemente, estos efectos son los responsables de la protección que confiere el incremento de los niveles plasmáticos de la progesterona durante el embarazo (Beckmann, 2008; Grindheim *et al.*, 2012; Juniper *et al.*, 1989; Kwon *et al.*, 2004; Schatz *et al.*, 2003; Sims *et al.*, 1976; Turner *et al.*, 1980) o durante la administración de progesterona en las mujeres (Beynon *et al.*, 1988). Algunos estudios epidemiológicos han mostrado que en algunas mujeres asmáticas los síntomas se ven agravados durante el embarazo (Farha *et al.*, 2009; Namazy y Schatz, 2005; Svanes *et al.*, 2005); sin embargo, se ha considerado que podría ser debido a la suspensión de los medicamentos antiasmáticos o al inadecuado tratamiento médico (Murphy y Gibson, 2008; Dombrowski, 2006).

1.5.2. Efectos benéficos de los andrógenos sobre las vías aéreas

La DHEA ejerce efectos antiinflamatorios, favorables para la vía aérea, funcionando como un factor de transcripción (Kasperska-Zajac, 2010; Yu *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2002a) para disminuir la citocina proinflamatoria TNF α (factor

de necrosis tumoral α) (Kimura *et al.*, 1998) o para inhibir los niveles de la inmunoglobulina IgE, implicada en los procesos alérgicos (Sudo *et al.*, 2001). Se ha señalado que estos efectos de la DHEA podrían prevenir el desarrollo del asma alérgica (Sudo *et al.*, 2001), ya que en pacientes con exacerbaciones frecuentes, los niveles de DHEA y de DHEA-S se encuentran disminuidos (Dunn *et al.*, 1984a; Feher *et al.*, 1983; Karalus *et al.*, 1985; Weinstein *et al.*, 1996). También, se ha documentado que la restitución de los niveles fisiológicos de la DHEA causa mejorías en los asmáticos (Choi *et al.*, 2008; Eusebio *et al.*, 2011). Sin embargo, la potencial acción relajante de la DHEA, directamente sobre el MLVA, no ha sido explorada.

Conjuntamente a los beneficios antiinflamatorios de la DHEA, se ha reportado que la TES, producto del metabolismo de la DHEA, también induce efectos benéficos en los hombres asmáticos y otras enfermedades alérgicas, por su capacidad antiinflamatoria. La TES disminuye la IL- β y el TNF α , ambas las citocinas proinflamatorias; además la TES también incrementa los niveles de la IL-10 (Corrales *et al.*, 2006; Malkin *et al.*, 2004). Se ha reportado que, la administración de TES provoca la disminución de respuestas inflamatorias (Cutolo, 1997; Dalal *et al.*, 1997; Olsen y Kovacs, 1995) y disminuye los síntomas en hombres asmáticos que padecen hipogonadismo (Corrales *et al.*, 2006; Malkin *et al.*, 2004).

Aunado a sus acciones (genómicas) antiinflamatorias, los andrógenos inducen efectos no genómicos sobre las vías aéreas. Es conocido que provocan relajación de diferentes tipos de músculo liso, como son el vascular y el uterino; se ha reportado que este efecto relajante es mediado por el bloqueo

de los CCOV (Perusquía *et al.*, 2005; Perusquía y Stallone, 2010; Montañaño *et al.*, 2008). En este contexto, las evidencias experimentales del efecto relajante de los andrógenos sobre el MLVA son muy escasas.

Dos trabajos funcionales han mostrado que los andrógenos también tienen la capacidad de provocar broncorelajación. El primer trabajo, realizado en anillos traqueales de conejo, reportó que la TES relaja el MLVA contracturado con acetilcolina (ACh; 10 μ M) o CCh (10 μ M), de manera dependiente de la contratación (0.1-100 μ M) (Kouloumenta *et al.*, 2006). En este reporte se mostró que el efecto broncorelajante de la TES no fue alterado por: (i) la flutamida (10 μ M; un antagonista del RA), (ii) la actinomicina (100 μ M; inhibidor de la transcripción) o (iii) cuando la TES fue probada en un conjugado con la albumina de suero bovino (TES-BSA), lo cual impide que la TES atraviese la membrana celular, y por tanto, que actúe a través del RA. Estas tres evidencias, obtenidas en MLVA de conejo, mostraron que el efecto broncorelajante de la TES es un efecto de tipo no genómico, independiente del RA intracelular. La importancia del trabajo realizado por Kouloumenta y colaboradores (2006) es evidente, fue la primera evidencia de tipo experimental, mostrando que la TES, poseen efectos (broncorelajación) benéficos sobre la vías aérea que, como han señalado numerosos estudios epidemiológicos, posiblemente confieran protección contra el asma (Fig. 3).

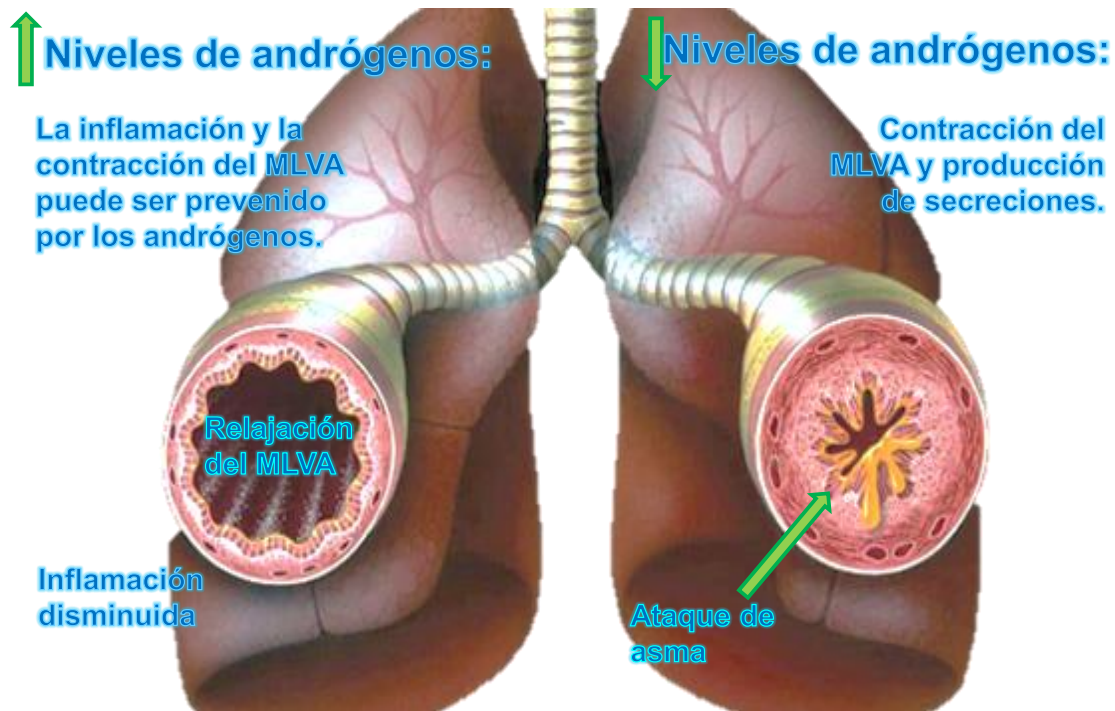


Figura 3. Efecto protector de los andrógenos sobre las vías respiratorias. Los niveles de andrógenos altos, como en los hombres, previenen la inflamación y la contracción del MLVA, característicos de un ataque de asma.

Posteriormente, el grupo de Bordallo *et al.*, (2008) mostró que, la TES y los andrógenos 5-reducidos, 5 α -DHT y 5 β -DHT, a las concentraciones de 1-100 μ M, también provocan un efecto relajante sobre el MLVA de bovino contracturado con CCh (0.1 μ M) y, a la concentración de 100 μ M relajan la contracción inducida por KCl (80 mM). Asimismo, revelaron que la flutamida (10 μ M) no altero la relajación por TES y 5 α -DHT, los dos andrógenos con afinidad al RA; considerando que 5 β -DHT no tiene afinidad al RA (Fagan *et al.*, 2003) se concluyó que la broncorelajación de TES, 5 α -DHT y 5 β -DHT es por una vía no genómica. En este trabajo también se observó la acción relajante inducida por

5 α -DHT (1-300 μ M) sobre preparaciones traqueales de cobayo (Bordallo *et al.*, 2008).

1.6. Mecanismo de acción del efecto broncodilatador de los andrógenos

La investigación dirigida por el grupo de Kouloumenta *et al.* (2006), indicó que la TES induce un efecto broncodilatador mediado por el NO y el epitelio de la vía aérea de conejo. En contraste a lo anterior, el grupo de Bordallo (Bordallo *et al.*, 2008) reportó que la acción relajante de la TES y sus dos metabolitos 5-reducidos es independiente del epitelio de la vía aérea de bovino. Se debe admitir que la escasa información al respecto no permite elaborar conclusiones contundentes, debido a que en ninguno de los dos trabajos se demostró, histológica y/o farmacológicamente, la eliminación mecánica del epitelio, lo cual es un procedimiento experimental fundamental para poder llegar a una conclusión sobre la participación de esta capa celular en el efecto relajante ejercido por algún andrógeno.

Interesantemente, en estos dos únicos trabajos funcionales se indagaron otros posibles mecanismos de acción, no genómica, de los andrógenos para inducir relajación. Por un lado, el trabajo de Kouloumenta *et al.* (2006) mostró que la indometacina (10 μ M), un inhibidor de la síntesis de prostanoïdes, no modificó la relajación inducida por la TES, por lo que la síntesis de los prostanoïdes se excluyó como un mecanismo implicado en la broncodilatación provocada por la TES (Kouloumenta *et al.*, 2006).

Por otro lado, Bordallo y colaboradores (2008) descartaron que 5 α -DHT provoque broncorelajación a través de los receptores β_2 adrenérgicos, la síntesis de las poliaminas o por el incremento del AMPc. En este estudio, también se mostró que al incrementar de la concentración de Ca²⁺ extracelular, de 2.5 mM (concentración fisiológica) a 3-10 mM (concentraciones suprafisiológicas), en la solución Ringer, la acción broncorelajante provocada por TES, 5 α -DHT y 5 β -DHT fue disminuida, en las preparaciones traqueales de bovino contracturadas con KCl (80 mM); además, debido a que los tres andrógenos fueron más eficaces para relajar la contracción provocada por KCl, que la contracción inducida por CCh (Bordallo *et al.*, 2008), es posible que, estos andrógenos eviten el influjo de Ca²⁺; por el bloqueo de los CCOV para provocar su efecto broncorelajante. Cabe notar que este mecanismo ha sido documentado para el efecto vasodilatador y úterorelajante que ejercen los andrógenos (Perusquía *et al.*, 2005; Perusquía y Stallone, 2010). Sin embargo, los datos del grupo de Bordallo (2008) para explicar el mecanismo del efecto broncodilatador de los andrógenos son sólo sugerentes, pero no contundentes.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El asma es un padecimiento crónico inflamatorio de la vía aérea, con una alta prevalencia en todo el mundo, lo cual justifica su estudio. Numerosas evidencias epidemiológicas han señalado que, la incidencia y la severidad del asma se encuentran directamente relacionadas por el estatus endócrino, el género y la edad. En años recientes, varios trabajos epidemiológicos y clínicos han señalado que la incidencia de asma es crítica en los niños respecto a las niñas, pero menor en los varones durante la edad reproductiva, cuando los andrógenos alcanzan los niveles fisiológicos más altos en los hombres sanos, volviendo a exacerbarse en la tercera edad del varón. La correlación entre los niveles de andrógenos y el asma sugiere que posiblemente las hormonas sexuales masculinas confieran una protección en los hombres jóvenes en edad reproductiva, disminuyendo el riesgo de padecer asma. Sin embargo, la información disponible respecto al papel que juegan los andrógenos en la reactividad del MLVA y su asociación con el asma es muy exigua.

Por lo tanto, se requiere contar con más evidencias experimentales que permitan definir si los andrógenos intervienen en la regulación de la contracción de las vías aéreas y, en consecuencia, puedan actuar previniendo el broncoespasmo producido por alérgenos. Cabe señalar que es indispensable contar con el conocimiento sobre el mecanismo de la acción broncorelajante que ejercen estas hormonas masculinas. Este estudio será una contribución importante para el entendimiento de la fisiopatología del asma y la presunta participación benéfica de los andrógenos en este padecimiento.

3. HIPÓTESIS

Se espera que el efecto broncodilatador de los andrógenos sea capaz de prevenir el broncoespasmo causado por un reto antigénico (modelo experimental de asma). Se plantea también que la respuesta provocada por los andrógenos sea en consecuencia a un bloqueo de la entrada de Ca^{2+} extracelular a través de los canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (CCOV), resultando en la disminución de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$. Además, la diferencia estructural de cada andrógeno podría correlacionar con su actividad broncodilatadora y sitio de acción.

4. OBJETIVOS

4.1. General

Evaluar el efecto relajante de diferentes andrógenos DHEA, TES, 5 α -DHT y 5 β -DHT sobre diferentes tipos de contracciones inducidas en el músculo liso traqueal aislado de cobayo, en condiciones normales (cobayos no sensibilizados) y en un modelo experimental de asma (cobayos sensibilizados); explorando el mecanismo de la acción broncodilatadora inducida por los andrógenos sobre el MLVA (epitelio; β_2 adrenoreceptores; canales iónicos de K⁺ y Ca²⁺). Determinar si el efecto broncodilatador *in vitro* de los andrógenos es operativo *in vivo* al prevenir el broncoespasmo en cobayos sensibilizados.

4.2. Particulares:

1. Establecer el efecto que causa el precursor de los andrógenos, DHEA sobre el MLVA. Determinar si es una acción de tipo no genómica y explorar si el efecto producido es antes de su biotransformación hacia TES o estrógenos. Explorar el potencial antagonismo de DHEA sobre los canales de Ca²⁺.
2. Comparar el efecto relajante de DHEA, TES, 5 α -DHT y 5 β -DHT sobre contracciones provocadas por CCh (0.3 μ M) o KCl (60 mM) en el músculo liso traqueal de cobayos machos no sensibilizados vs. cobayos sensibilizados y, conjuntamente, explorar la habilidad broncorelajante de los mismos andrógenos sobre una contracción de diferente naturaleza; la contracción provocada por el reto antigénico con OVA en cobayos sensibilizados. Con estos datos se

determinará la potencia y la eficacia de cada andrógeno sobre diferentes tipos de contracción y, comparar la respuesta entre tejidos sanos (normales) y sensibilizados (condición de asma). Evaluar la participación de la función del epitelio en el efecto relajante inducido por los andrógenos en anillos traqueales con y sin epitelio y en presencia de un inhibidor de la óxido nítrico sintasa, *N*^ω-nitro-*L*-arginina metil éster (L-NAME, 10 μM), para descartar también la participación del óxido nítrico (NO).

3. Establecer una relación entre la estructura química y la actividad broncorelajante de cada andrógeno.
4. Determinar la participación de los receptores β₂ adrenérgicos en el efecto relajante inducido por los andrógenos, probando los andrógenos en presencia de propranolol, un antagonista de los receptores β₂ adrenérgicos.
5. Explorar la posible participación de los canales de K⁺ en el efecto relajante de los andrógenos en la tráquea aislada de cobayo, utilizando un bloqueador no selectivo de los canales de K⁺ (tetraetilamonio; TEA).
6. Evaluar la participación de los CCOV en el efecto broncorelajante de los andrógenos mediante la técnica de microfluorometría en miocitos aislados de la tráquea de cobayo, midiendo el aumento de la [Ca²⁺]_i por estímulos de KCl ante la preincubación con cada andrógeno.

7. Determinar la acción broncodilatadora *in vivo* de los diferentes andrógenos en el animal completo mediante pletismografía barométrica sobre el broncoespasmo provocado por OVA en cobayos previamente sensibilizados.

5. METODOLOGÍA

5.1. Material Biológico

Para este trabajo se utilizaron cobayos machos de la cepa Hartley, con un peso de 450 a 600 g, provenientes del Bioterio del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER). Los animales fueron mantenidos en condiciones convencionales, con acceso al alimento (pellets Harlan Inc.) y al agua *ad libitum*. Los protocolos realizados fueron aprobados por el “Comité para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio” del Instituto de Investigaciones Biomédicas, de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los experimentos se realizaron siguiendo los “Principios que Guían el Cuidado y Uso de Animales” aprobado por la *American Physiological Society*. Los cobayos fueron agrupados en: no sensibilizados y sensibilizados a OVA.

5.1.1. Cobayos sensibilizados a OVA

Para obtener el modelo de asma experimental, los cobayos fueron sensibilizados el día 1 por administración de 0.5 ml i.p. y 0.5 ml s.c. de una mezcla de $60 \mu\text{g ml}^{-1}$ de OVA y $1 \mu\text{g ml}^{-1}$ de $\text{Al}(\text{OH})_3$ (hidróxido de aluminio como coadyuvante) disueltos en solución salina (NaCl 0.9%). El día 8, los animales recibieron un reto antigénico con 3 mg ml^{-1} de OVA en solución salina, nebulizada durante 5 min, con un nebulizador ultrasónico (WH-2000 YueHua Medical Instrument Factory Co., Ltd., China). En el día 15, los animales recibieron otro reto antigénico con 1 mg ml^{-1} de OVA en solución salina nebulizada durante 1 min. La respuesta al antígeno fue establecida por la disnea severa. Los experimentos se realizaron entre los días 21 y 25 de

tratamiento y sólo se utilizaron los animales que respondieron al reto antigénico.

5.2. Sistema de registro isométrico para tejido aislado

Se utilizaron anillos traqueales de cobayos no sensibilizados y sensibilizados. Con la finalidad de comparar el efecto broncodilatador inducido por los andrógenos en ambos grupos, siempre se realizó el mismo protocolo experimental.

Los cobayos fueron sacrificados por exsanguinación bajo anestesia (pentobarbital sódico, 70 mg kg⁻¹, i.p.); inmediatamente se disecó la tráquea y se colocó en una caja de Petri de doble pared con solución Ringer Krebs-Henseleit normal (Ringer) con la siguiente composición (mM): NaHCO₃ (25), NaCl (120), KCl (4.77), KH₂PO₄ (1.20), MgSO₄ (1.20), CaCl₂ (2.5) y Glucosa (11). La temperatura del Ringer se mantuvo a 37°C mediante un baño recirculador de agua, además, para estabilizar su pH a 7.4, la solución fue burbujeada con una mezcla gaseosa de 5% CO₂ en 95% O₂. En estas condiciones, la tráquea se limpió de tejido adiposo y se cortó en ocho anillos, cada uno de 0.3 cm de longitud.

Para determinar la participación del epitelio en el efecto relajante inducido por los andrógenos, los anillos traqueales de los cobayos no sensibilizados se utilizaron en dos condiciones: (i) intactos (anillos con integridad del epitelio; no raspados) y (ii) anillos raspados (en los cuales se eliminó el epitelio). Para eliminar el epitelio, el lumen de los anillos traqueales fue raspado

vigorosamente realizando movimientos circulares con una lima odontológica (K-File Colorinox 140), evitando el daño de la capa muscular.

5.2.1. Montaje de los anillos traqueales en el sistema de registro isométrico

Cada anillo traqueal fue colocado en el sistema de registro isométrico y suspendido de manera horizontal en una cámara de incubación con 10 ml de solución Ringer a 37°C y con un pH de 7.4, mantenido mediante burbujeo continuo de una mezcla gaseosa 95% O₂/5% CO₂. Cada anillo traqueal fue colocado en la cámara de incubación utilizando dos ganchos de acero inoxidable en forma de “L”, que fueron introducidos a través del lumen de manera contrapuesta. Uno de los ganchos fue fijado a la base de la cámara y el otro gancho se sujetó a un transductor de tensión (Grass Instruments, FT03C) con ayuda de un hilo de seda. El transductor detectó las señales mecánicas del tejido y las transformó en señales eléctricas que envió a un sistema de captura (BIOPAC, Systems Inc.). En el sistema de registro isométrico (Fig. 4), los anillos se sometieron a una fuerza de tensión de 1 g (10 mN) durante todo el experimento.

Los anillos traqueales fueron estabilizados por 60 min, antes ser despolarizados (preestímulo), durante 20 min, con Ringer de K⁺ alto (KCl 60 mM), obtenido por sustitución equimolecular de NaCl 64.7 mM por KCl 60 mM. Los tejidos fueron repolarizados mediante un cambio de solución Ringer normal (lavado) y cuando regresaron a su basal se dejaron en reposo por 20 min. Se repitieron dos preestímulos más para verificar la viabilidad del tejido; sólo se utilizaron anillos que tuvieron una fuerza de contracción ≥ 1 g.

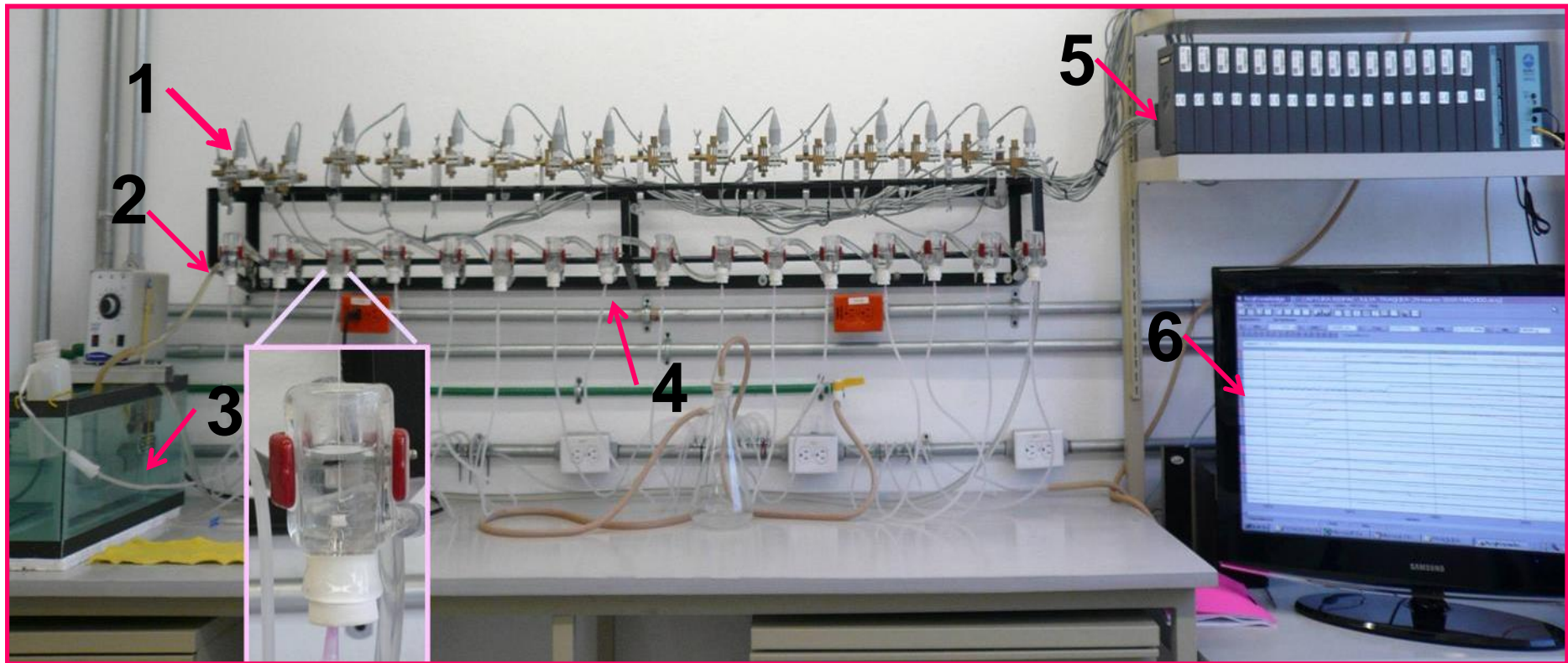


Figura 4. Sistema de registro isométrico para tejido aislado. 1. Transductores de tensión, 2. Cámaras de incubación, 3. Baño recirculador de agua para mantener la temperatura constante a 37°C, 4. Suministro de la mezcla gaseosa 5% CO₂/95% O₂, 5. Amplificadores y 6. Computadora.

5.2.2. Determinación farmacológica de la presencia o la ausencia de epitelio traqueal

Con el objetivo de corroborar la presencia o la ausencia de epitelio en los anillos traqueales de cobayos no sensibilizados, se utilizó bradicidina (BK); este compuesto provoca relajación dependiente del epitelio (Bramley *et al.*, 1990). Así, después de los preestímulos con KCl, se adicionó 320 nM de BK sobre el tono basal de cada anillo traqueal; entonces, la presencia del epitelio fue corroborada cuando la BK provocó la disminución del tono basal (≤ 0.3 g) en los anillos intactos y, de manera opuesta, en los anillos raspados, la eliminación del epitelio fue confirmada por el incremento del tono basal inducido por la BK. Las respuestas provocadas por la BK fueron registradas durante 10 min.

5.2.3. Prueba de los andrógenos sobre anillos traqueales de cobayo

Una vez realizados los preestímulos y confirmada la condición del epitelio, se realizaron las pruebas de los andrógenos; para esto, las preparaciones traqueales de cobayos no sensibilizados y sensibilizados fueron contracturados con KCl (60 mM) o con CCh (0.3 μ M) por 90 min (respuesta control); otras preparaciones traqueales, únicamente de cobayos sensibilizados fueron contracturados con OVA (1 μ M; esta contracción se provocó una vez, ya que fue resistente a los lavados, por lo cual los tejidos no regresaron a su tono basal). Cabe aclarar que los andrógenos se estudiaron de manera comparativa, sobre las contracciones provocadas por los tres diferentes agentes contráctiles (OVA, KCl y CCh), ya que cada agente actúa por mecanismos de acción diferentes para inducir contracción. Después de 60 min de haberse registrado la contracción control con KCl o CCh, una segunda contracción fue provocada

y, sobre el tono estable de cada contracción (inducidas por OVA, KCl o CCh), se adicionó cada andrógeno (DHEA, TES, 5 α -DHT y 5 β -DHT), por separado y a concentraciones acumulativas (9, 20, 42, 91 y 200 μ M); el efecto de cada concentración de los andrógenos se registró por 15 min. Finalmente, los tejidos fueron lavados y reequilibrados por 60 min, antes de realizar un último estímulo para observar la recuperación funcional de los anillos traqueales. Colateralmente, se realizaron las pruebas correspondientes con el vehículo (etanol absoluto, 0.1% v/v, para cada concentración de andrógeno) en el cual fueron disueltos y adicionados los andrógenos. Las curvas concentración respuesta de los andrógenos fueron construidas y comparadas; igualmente, se compararon las curvas obtenidas en los tejidos de cobayos no sensibilizados vs. sensibilizados.

En otros experimentos, para comparar la acción broncodilatadora de los andrógenos con un conocido broncodilatador, agonista β adrenérgico, salbutamol; se realizaron pruebas a diferentes concentraciones de salbutamol (9-420 nM). Estas pruebas se realizaron en anillos traqueales de cobayos no sensibilizados y sensibilizados, sobre la contracción con OVA o CCh. Las concentraciones de salbutamol se adicionaron a los tejidos de manera acumulativa. Se construyeron las curvas concentración respuesta de salbutamol y su efecto broncorelajante fue comparado con el efecto provocado por los andrógenos.

5.3. Determinación del potencial papel del óxido nítrico (NO) en el efecto broncodilatador inducido por andrógenos

Para investigar la posible participación del NO en la acción broncorelajante inducida por los andrógenos, los anillos con epitelio, de cobayos no sensibilizados, fueron contracturados con KCl y tratados durante 30 min con el inhibidor de la óxido nítrico sintasa (NOS), L-NAME (10 μ M), después de este tiempo, los andrógenos fueron probados con el mismo esquema de concentraciones acumulativas. Para cada andrógeno, se comparó su efecto broncorelajante en presencia y en ausencia del tratamiento con L-NAME.

5.4. Mecanismo de acción de los andrógenos

Estudios previos han mostrado que el efecto broncorelajante de la TES y sus dos dihidrometabolitos es de tipo no genómico (Bordallo *et al.*, 2008; Kouloumenta *et al.*, 2006); sin embargo, para la DHEA esto aún no se conoce; por lo anterior, en esta tesis se investigó la posible participación de los mecanismos de transcripción, traducción y de los productos de la biotransformación de DHEA en su efecto broncorelajante.

Además, se examinó la potencial participación de los receptores β_2 adrenérgicos, los CCOV o los canales de potasio en la acción broncorelajante de los cuatro andrógenos bajo estudio. Para llevar a cabo estas pruebas se utilizaron cobayos no sensibilizados.

5.4.1. Inhibidores de la síntesis de proteínas, de la transcripción y de la actividad de la 3 β -HSD

Para caracterizar la vía de la acción relajante de la DHEA (genómica o no genómica), se realizaron experimentos en anillos traqueales con epitelio, se provocó una contracción con KCl y, sobre el tono estable, se preincubó el tejido con el inhibidor de la síntesis de proteínas (cicloheximida; 40 μ M) o el inhibidor de la transcripción (actinomicina D; 10 μ M), pasados 30 min de tratamiento se adicionaron las concentraciones acumulativas de DHEA (9-200 μ M) para obtener las curvas concentración respuesta de DHEA en presencia de los inhibidores, estas curvas fueron comparadas con las obtenidas sin los inhibidores mencionados.

Al existir la posibilidad de que el efecto relajante de DHEA sea provocado después de su biotransformación (hacia estrógenos o hacia andrógenos), se realizaron los siguientes experimentos. Se obtuvo el efecto de las diferentes concentraciones de DHEA sobre contracciones inducidas por KCl en tejidos traqueales, preincubados con epostano (WIN 32,729; 1 μ M) durante 60 min. El epostano es un inhibidor puro de la enzima 3 β -HSD, que cataliza la biotransformación de DHEA a andrógenos y estrógenos. Así, la curva concentración respuesta de DHEA en presencia de epostano se comparó con el control (sin epostano).

5.4.2. Exploración de la posible participación de los receptores β_2 adrenérgicos en la broncodilatación inducida por los andrógenos

En otro grupo de experimentos, se evaluó la potencial participación de los receptores β_2 adrenérgicos; los cuales activan una importante vía de señalización para la relajación del MLVA. Los anillos traqueales de cobayos no sensibilizados se contracturaron con CCh y se preincubaron durante 30 min con propranolol (10 μM ; antagonista de los β_2 adrenoreceptores); en estas condiciones las diferentes concentraciones de cada uno de los andrógenos fueron adicionadas a los tejidos para obtener las curvas concentración respuesta de los andrógenos. Se compararon las curvas de los andrógenos con y sin tratamiento con el antagonista. El vehículo de los andrógenos también fue probado en presencia de propranolol.

Previamente, se verificó que la concentración de 10 μM de propranolol, efectivamente antagonizará los receptores β_2 adrenérgicos en la tráquea de cobayo. Para esto, cuando el tono de la contracción provocada por CCh (0.3 μM) se mantuvo estable, se adicionó 10 μM de salbutamol (agonista β_2 adrenérgico), que relajó la contracción inducida por CCh; posteriormente, en una segunda contracción con CCh, el tejido se preincubó con propranolol (10 μM) por 30 min y después se adicionó salbutamol. La presencia de propranolol inhibió totalmente el efecto relajante inducido por la salbutamol, confirmando que propranolol, a la concentración de 10 μM , antagoniza a los receptores β_2 adrenérgicos en los anillos traqueales de cobayo.

5.4.3. Potencial participación de los canales de potasio en la acción broncorelajante de los andrógenos

Teniendo en cuenta que el eflujo de K^+ , a través de los canales de K^+ , de la célula del MLVA provoca relajación, en otros experimentos se investigó el potencial papel de los canales de K^+ en la acción broncorelajante de los andrógenos. Se obtuvieron las curvas concentración respuesta de los andrógenos en anillos traqueales contracturados con CCh y tratados, por 30 min, con tres diferentes concentraciones de tetraetilamonio (TEA; 1, 10 o 30 mM). TEA es un inhibidor no selectivo de los canales de K^+ ; a concentraciones bajas (≤ 1 mM) tiene la habilidad de ser un inhibidor selectivo de los canales de K^+ dependientes de voltaje (K_v) y a concentraciones altas (10-30 mM) bloquea selectivamente los canales de K^+ sensibles a Ca^{2+} (K_{Ca}) (Bradding y Wulff, 2009; Ghatta *et al.*, 2006). Las curvas de los andrógenos obtenidas en presencia de cada concentración de TEA se compararon con las curvas sin TEA. Colateralmente, se realizaron las pruebas del vehículo (etanol absoluto; 0.1% v/v) de los andrógenos.

5.4.4. Potencial antagonismo de los andrógenos sobre los canales de Ca^{2+} operados por voltaje (CCOV)

Los CCOV permiten el influjo de Ca^{2+} extracelular, teniendo como prerequisite la despolarización de la membrana. El Ca^{2+} que entra por esta vía contribuye al mantenimiento de una contracción tónica, por lo cual, se investigó el potencial antagonismo de los andrógenos sobre los CCOV, como un posible mecanismo a través del cual inducen su efecto broncorelajante. Utilizando el registro isométrico, primero se realizaron pruebas con el precursor de los

andrógenos, DHEA. Los anillos traqueales se despolarizaron con Ringer alto en K^+ libre de Ca^{2+} (KCl- Ca^{2+} Ø; solución despolarizante con KCl 60 mM, modificada por la adición de 2 mM de EGTA y sin $CaCl_2$); lo cual provocó una contracción transitoria. Cuando los anillos regresaron a su tono basal por ausencia de Ca^{2+} , se adicionó $CaCl_2$ (2.5 mM) para provocar una contracción tónica por entrada de Ca^{2+} a través de la activación, por despolarización, de los CCOV, la contracción se registró por 30 min (respuesta control). Los anillos fueron lavados con KCl- Ca^{2+} Ø y se reequilibraron por 60 min. Antes de provocar una segunda contracción con $CaCl_2$, los anillos traqueales fueron incubados 10 min antes con DHEA (9-91 μ M; de manera independiente y no acumulativa). En estas condiciones se adicionó la misma concentración de $CaCl_2$ y la contracción fue registrada por 30 min. Los anillos nuevamente fueron lavados y reequilibrados por 60 min y, se provocó una tercera contracción con $CaCl_2$, para verificar la viabilidad de los tejidos. La primera contracción inducida por $CaCl_2$ (respuesta control) fue comparada con la segunda estimulación a $CaCl_2$ en presencia de cada una de las concentraciones de DHEA.

En otros ensayos, los anillos traqueales fueron contracturados con KCl y se preincubaron 10 min con Bay K 8644 (100 μ M; activador de los canales de Ca^{2+} sensibles a dihidropiridinas), antes de adicionar las concentraciones acumulativas de la DHEA. La curva concentración respuesta de DHEA en presencia de Bay K 8644 fue obtenida y comparada con la curva concentración respuesta de DHEA sin Bay K 8644. Además, en otros anillos traqueales, se probó DHEA 200 μ M (concentración para obtener el $E_{m\acute{a}x}$) sobre la contracción inducida con Bay K 8644 (100 μ M). Paralelamente, en todos los casos se

realizaron las pruebas con el vehículo de Bay K 8644 (etanol absoluto, 0.1% v/v) y se realizó la comparaciones con el efecto de los tratamientos.

5.5. Fluctuación de la $[Ca^{2+}]_i$ en la célula del MLVA en respuesta a los andrógenos

Los datos anteriores indicaron que la relajación de DHEA está asociada con el bloqueo del paso de Ca^{2+} extracelular por los CCOV. Para relajar el MLVA, un hecho contundente es la disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ y una de las consecuencias es el bloqueo del influjo de Ca^{2+} extracelular, entre otras. Por lo tanto, con la técnica de microfluorimetría (Fig. 5) se procedió a medir directamente la fluctuación de $[Ca^{2+}]_i$ en presencia de los derivados de la DHEA, para determinar el efecto de los andrógenos sobre la $[Ca^{2+}]_i$ en miocitos aislados en fresco del músculo liso de la tráquea de cobayo no sensibilizado.

Para estos experimentos, la tráquea se aisló (como fue explicado previamente) y el MLVA fue disecado para aislar los miocitos, por disgregación enzimática y mecánica. El MLVA fue incubado a 37°C en 5 ml de solución Hanks con 2 mg de cisteína y 0.05 U ml^{-1} de papaína. Después de 10 min, el tejido fue lavado con solución Leibovitz y se colocó en solución Hanks con 1 mg ml^{-1} de colagenasa tipo-1 y 4 mg ml^{-1} de dispasa II, durante aproximadamente 10 min a 37°C. El tejido se dispersó con agitación mecánica hasta que se observó la separación del tejido, la actividad enzimática fue detenida por la adición de solución Leibovitz. Posteriormente, las células fueron centrifugadas a 600 rpm a 20°C durante 5 min. Finalmente, el sobrenadante se desechó y el botón celular se suspendió en 5 ml de Ringer Krebs-Henseleit

bajo en Ca^{2+} (0.1 mM), donde las células se incubaron con 0.5 μM de Fura-2-acetoximetil éster (Fura-2-AM; un fluoróforo de Ca^{2+}) durante 1 h a 22-25°C.

Posteriormente, las células marcadas con Fura-2-AM se pegaron, con colágena, a la base de una cámara de registro montada en un microscopio invertido; en la cámara se mantuvo una perfusión continua (1 a 1.5 ml min^{-1}) con solución Krebs (1.5 mM Ca^{2+}) a 37°C con pH de 7.4, mantenido por el burbujeo con una mezcla de 5% CO_2 y 95% O_2 . En estas condiciones las células fueron excitadas, alternadamente, con luz de 340 y 380 nm de longitud de onda y la emisión fue colectada a 510 nm usando un microfluorómetro de PTI (modelo D-104). La fluorescencia basal se restó automáticamente. La $[\text{Ca}^{2+}]_i$ se calculó de manera convencional con la fórmula de Grynkiewicz y colaboradores (Grynkiewicz *et al.*, 1985).

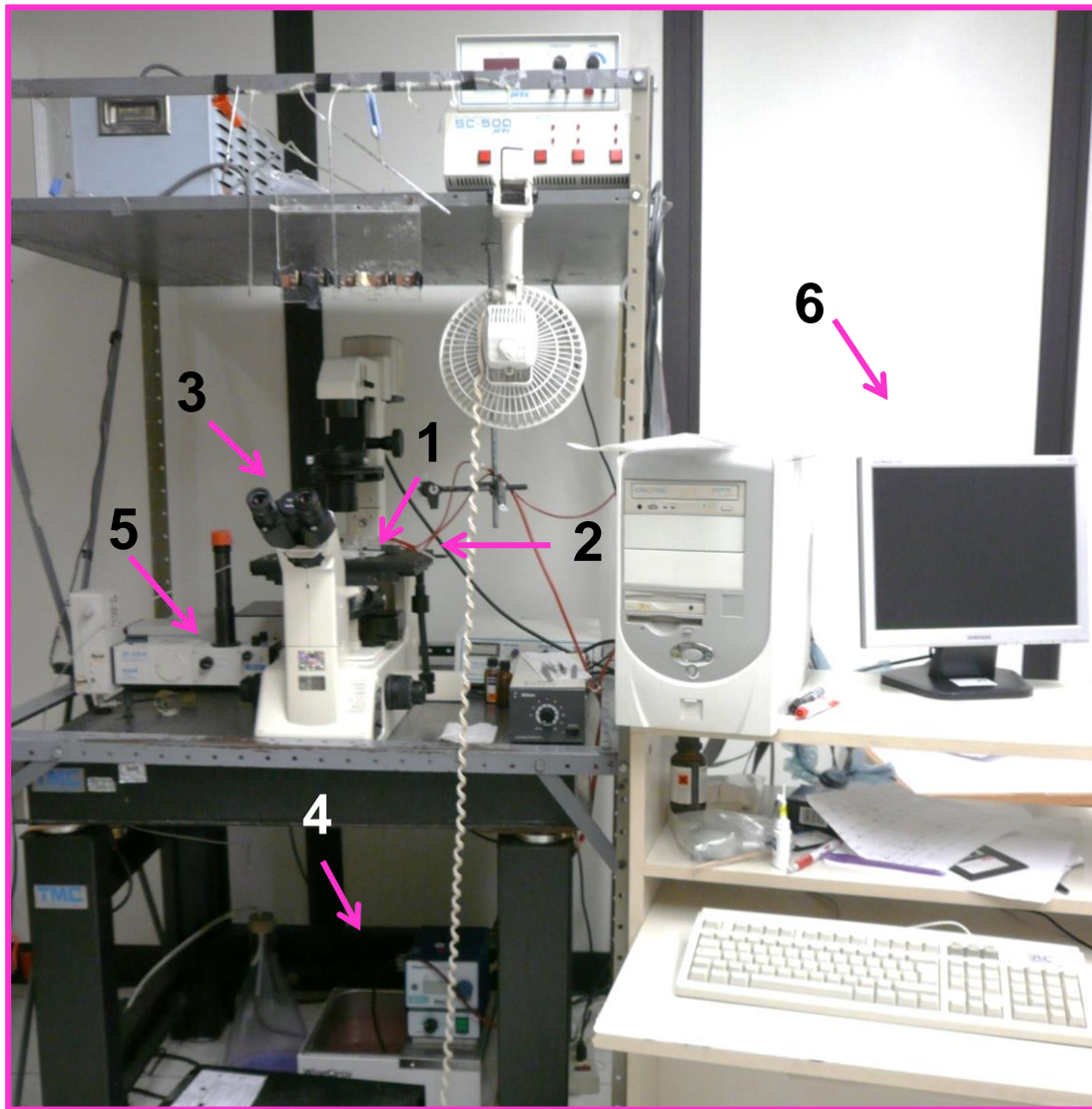


Figura 5. Sistema de microfluorimetría. 1. Cámara de perfusión, 2. Suministro de la solución Krebs, 3. Microscopio invertido, 4. Baño recirculador de agua para mantener la temperatura constante a 37°C, 5. Microfluorómetro y 6. Computadora.

Al iniciar el protocolo experimental, los miocitos fueron perfundidos con solución Ringer normal, por 15 min, antes de verificar su viabilidad mediante un estímulo de 5 min con KCl (60 mM; estímulo control); después, se lavaron con Krebs normal y se dejaron en reposo durante 15 min. A continuación, los miocitos fueron incubados por 5 min con las diferentes concentraciones de cada andrógeno (1, 10, 100 y 320 nM), de forma independiente; es decir, antes de otro estímulo con KCl. Entre cada estímulo las células permanecieron en reposo un periodo de 15 min. Se comparó el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por estímulo control de KCl con el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por el KCl en presencia de cada concentración de los andrógenos. El mismo protocolo se realizó adicionando el vehículo en el cual fueron adicionados los andrógenos (etanol absoluto; 0.1% v/v). Se construyeron las curvas concentración respuesta de los andrógenos y se obtuvo la CI_{50} y el $E_{máx}$.

5.6. Evaluación del potencial efecto preventivo de los andrógenos sobre el broncoespasmo provocado por OVA *in vivo*

Para evaluar si la acción broncodilatadora de los andrógenos previene el broncoespasmo en el animal completo, se utilizó un método isovolumétrico con una cámara pletismográfica cerrada (Fig. 6; Buxco Electronics Inc.) para registrar los cambios de la resistencia pulmonar (R_L) de las vías aéreas de los cobayos sensibilizados. Así, entre los días 21 y 25 de la sensibilización con OVA, los cobayos fueron anestesiados con pentobarbital sódico (35 mg kg^{-1} ; i.p.); se mantuvieron bajo anestesia mediante la administración de pentobarbital sódico (9 mg kg^{-1} ; i.v.) cada hora. Para suprimir los movimientos respiratorios espontáneos se administró bromuro de pancuronio (0.06 mg kg^{-1} ; i.v.).

Después, con ayuda de material de microcirugía, se colocó una cánula en la vena yugular; a través de esta cánula se administraron los fármacos; la arteria carótida fue canulada para el registro de la presión arterial. Además, la tráquea de los cobayos también se canuló para que recibieran ventilación mecánica (10 ml kg^{-1} ; a $48 \text{ respiraciones min}^{-1}$) durante todo el experimento.

Otra cánula fue colocada en la parte media del esófago, con la finalidad de medir la presión intraesofágica, como un indicador de la presión intrapleurales. Las presiones de las cánulas esofágica y traqueal fueron registradas con un transductor de presión diferencial (TRD4510; Buxco Biosystem). La presión en la cámara pletismográfica, fue registrada por otro transductor de presión diferencial y convertida en una señal de flujo por el software Buxco Biosystem (XA v1.0; Buxco Biosystem). Con ayuda de este software se calculó la R_L con la siguiente fórmula $R_L = \Delta P / \Delta V'$; donde ΔP es el cambio de la presión y $\Delta V'$ es el cambio del flujo en la vía aérea.

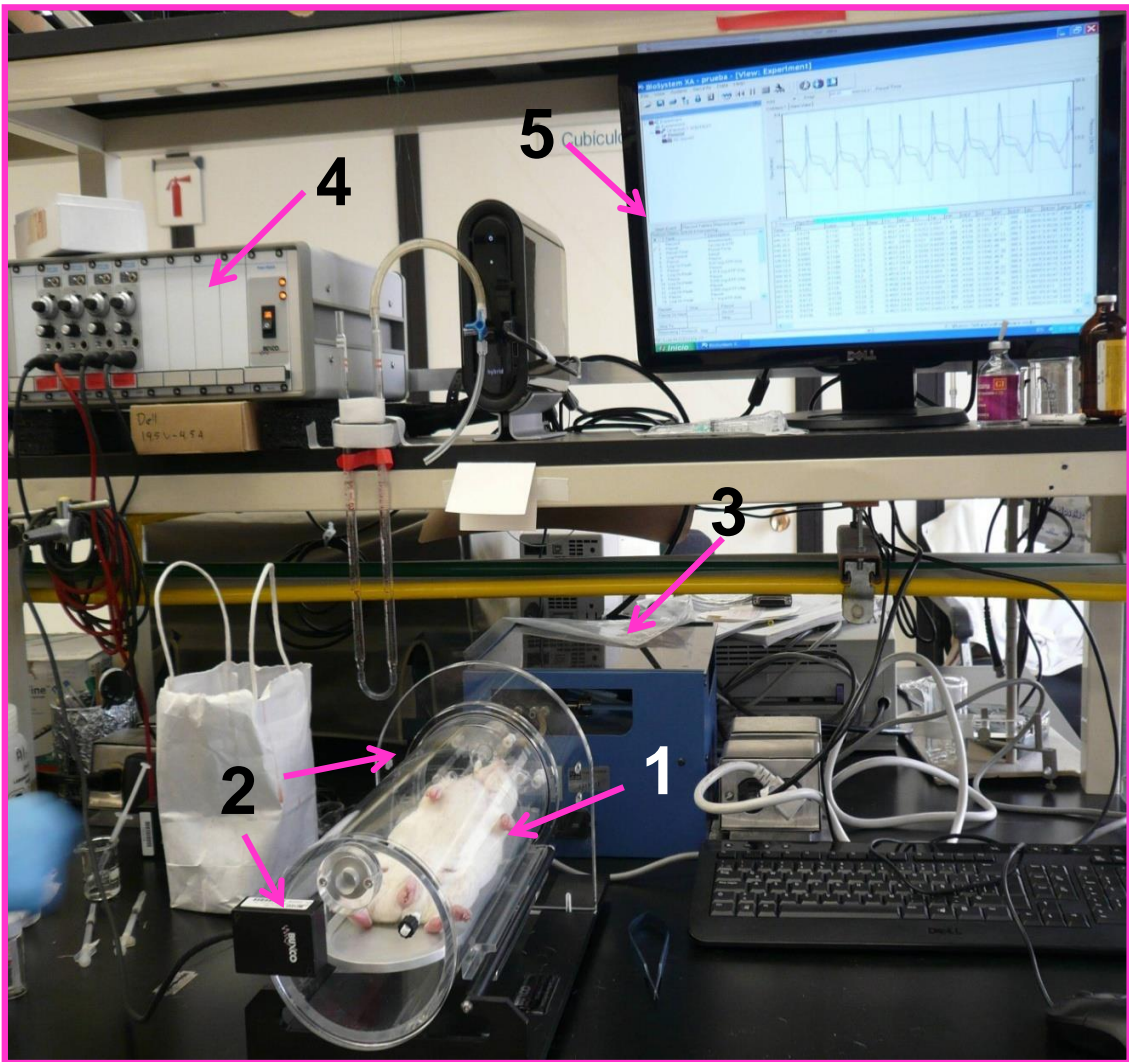


Figura 6. Pletismografía para animal anestesiado. 1. Cámara pletismográfica, 2. Transductores de presión diferencial, 3. Ventilador para mantener la frecuencia respiratoria constante, 4. Amplificadores y 5. Computadora.

Con el objetivo de determinar si los andrógenos podrían prevenir el broncoespasmo, se realizó el siguiente procedimiento; una vez que los animales fueron preparados en la cámara pletismográfica cerrada, se registró la R_L de los cobayos durante 3 min (valor de la R_L basal). Después, se administró una dosis de cada andrógeno ($35, 110$ y $350 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$; i.v) o de su vehículo (DMSO: dimetilsulfóxido; $11 \mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$; i.v.); el tratamiento se inició 15 min antes de provocar el reto antigénico por la administración de OVA ($75 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$; i.v.). Para obtener el control del broncoespasmo provocado por OVA, en otros animales se registró la R_L en respuesta al reto antigénico sin ningún tratamiento previo. Durante el reto antigénico, los cambios en la R_L fueron registrados por 30 min. Cabe aclarar que sólo se administró una dosis de cada andrógeno por animal. Finalmente, los cambios de la R_L durante el broncoespasmo fueron comparados entre los animales sin tratamiento (control), los que recibieron el vehículo (control del vehículo) y los animales que recibieron alguna dosis de cada andrógeno. Es importante señalar que los valores basales de la R_L no fueron modificados por la administración de DMSO ni de los andrógenos. Se construyeron las curvas dosis respuesta para cada andrógeno y se calculó la DE_{50} (dosis efectiva 50; dosis a la cual se obtiene el 50% de la inhibición de la R_L después del reto antigénico).

5.7. Evaluación y análisis estadístico de los datos

El efecto relajante inducido por los andrógenos *in vitro* es presentado como % de relajación de la contracción inducida por OVA, KCl o CCh. Cada dato en las curvas concentración respuesta de los andrógenos representa la

media \pm DEM ($n = 6$, cada n representa un cobayo). El efecto de los andrógenos sobre cada contracción fue evaluado comparando la amplitud de la contracción control vs. la respuesta producida ~ 15 min después de adicionar cada concentración de los andrógenos. La eficacia de los andrógenos, fue expresada como $E_{m\acute{a}x}$ (efecto máximo inducido por los andrógenos a la mayor concentración probada; 200 μ M). A partir de las curvas se calculó, por regresión lineal, la concentración inhibitoria media (CI_{50}) de los andrógenos, la cual es la concentración del andrógeno requerida para inhibir el 50% de la contractura provocada por cada agente contráctil, (OVA, KCl, CCh o $CaCl_2$, en los experimentos *in vitro*; o inhibir el 50% de la $[Ca^{2+}]_i$ en los experimentos con células únicas).

La prevención del broncoespasmo de los cobayos sensibilizados fue expresada como disminución de la resistencia pulmonar (R_L). Se estableció el tiempo de la respuesta asmática temprana (EAR, por sus siglas en inglés) como el tiempo con mayor incremento de la R_L ; siendo está la fase aguda del broncoespasmo, al min 4. La respuesta asmática tardía (LAR) fue establecida cuando la R_L disminuyó y se estabilizó, a los 12 min de iniciado el broncoespasmo. La DE_{50} (dosis efectiva 50; dosis a la cual se obtiene el 50% de inhibición de la R_L provocada por el broncoespasmo) se calculó con las curvas temporales de la inhibición de la R_L en los experimentos *in vivo*. Además, se obtuvo el área bajo la curva del incremento de la R_L durante el reto antigénico.

Para comparaciones entre dos grupos se utilizó la prueba t de *Student* de dos colas no pareada; para la comparación entre los andrógenos y su

respectivo control, se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de dos colas de una vía, seguido de la prueba de *Dunnett*, para la comparación entre los andrógenos se realizó una ANOVA seguido de la prueba de *Tukey*. La comparación de las curvas se realizó mediante un análisis de covarianza (ANCOVA). Se consideró un valor significativo cuando $P < 0.05$.

5.8. Fármacos utilizados

Con excepción del epostano (WIN 32,729; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, EUA), Bay K 8644 (INC Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA, EUA) y pentobarbital sódico (Pfizer, México); los siguientes compuestos fueron adquiridos de Sigma (Chemical Co., St Louis MO., EUA): dehidroepiandrosterona (DHEA; 3 β -hidroxi-5-androsten-17-ona), testosterona (TES; 17 β -hidroxi-4-androsten-3-ona), 5 α -dihidrotestosterona (5 α -DHT; 17 β -hidroxi-5 α -androstano-3-ona), 5 β -dihidrotestosterona (5 β -DHT; 17 β -hidroxi-5 β -androstano-3-ona), carbacol (CCh; 2carbamoiloxietil-trimetilazano), bradicidina (BK), propranolol ((RS)-1-(isopropilamino)-3-(naftalen-1-iloxi)propan-2-ol), L ^{ω} -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME), salbutamol, bromuro de pancuronio, los inhibidores de la transcripción (actinomicina D) y de la síntesis de proteínas (cicloheximida), ovoalbúmina (OVA) hidróxido de aluminio (Al(OH)₃), dimetilsulfóxido (DMSO), cloruro de tetraetilamonio (TEA), Fura-2-acetoximetil éster (Fura-2-AM).

En los experimentos *in vitro*, los andrógenos, Bay K 8644, epostano, actinomicina D, cicloheximida, TEA y FURA-2-AM se disolvieron y adicionaron en etanol absoluto (Merck-México, S.A.). Cada concentración de andrógeno fue aplicada en un volumen final de 0.1 % v/v en 10 ml de Ringer, lo cual

corresponde a 17.14 mM de etanol. Se disolvieron en agua bidestilada: CCh, BK, propranolol, L-NAME y salbutamol. Para los experimentos *in vivo* los andrógenos se disolvieron y administraron en DMSO; la OVA se disolvió en solución salina fisiológica.

6. RESULTADOS

6.1. Determinación de la condición epitelial en los anillos traqueales de cobayos no sensibilizados

Los anillos traqueales de los cobayos no sensibilizados fueron utilizados para las pruebas de los andrógenos sólo cuando se confirmó, de manera farmacológica, la presencia o la ausencia de epitelio bronquial. Como se observa en la Fig. 7, en los anillos intactos la BK (320 nM) disminuyó el tono basal (≤ 300 mg), indicando así la presencia de epitelio; por el contrario, la BK provocó un incremento del tono basal (≥ 300 mg) en los anillos donde se eliminó mecánicamente el epitelio, lo cual corroboró que estos anillos no tenían células epiteliales.



Figura 7. Registros típicos de la tráquea de cobayo donde se muestra la prueba farmacológica de la función epitelial con bradicidina (BK, 320 nM), la cual induce disminución del tono basal en anillos con epitelio y, de manera contrastante, incrementa el tono basal en anillos sin epitelio; lavado (L).

6.2. Efecto relajante de los andrógenos en anillos traqueales de cobayos

Los andrógenos bajo estudio: DHEA, TES, 5 α -DHT y 5 β -DHT, a todas las concentraciones probadas (9-200 μ M), disminuyeron del tono de la contracción provocada por KCl o CCh en anillos traqueales de cobayos no sensibilizados y sensibilizados (Fig. 8); asimismo, los andrógenos relajaron la contracción inducida por OVA en los anillos traqueales de cobayos sensibilizados. El efecto broncorelajante de los andrógenos, sobre los tres tipos de contracciones, fue dependiente de la concentración (ver Fig. 9) y se caracterizó por presentarse ~2 min después de la adición de cada concentración de los andrógenos. Además, dicho efecto fue reversible; es decir, cuando los andrógenos fueron retirados del tejido, en otro estímulo con KCl o CCh, se observó una total recuperación de la amplitud de la contracción.

El vehículo (etanol absoluto, 0.1% v/v; por cada concentración de andrógeno) utilizado, para disolver y adicionar los andrógenos, no modificó de manera significativa ($P > 0.05$) el tono de la contracción provocada por OVA, KCl o CCh (<5.7% de relajación). El efecto relajante inducido por los andrógenos fue significativamente diferente al vehículo ($P < 0.05$).

Con base en el análisis estadístico realizado, se observó que las curvas concentración respuesta de los andrógenos, sobre las contracciones por KCl o CCh, no tuvieron diferencias entre las preparaciones traqueales de animales no sensibilizados y sensibilizados (Fig. 9; $P > 0.05$).

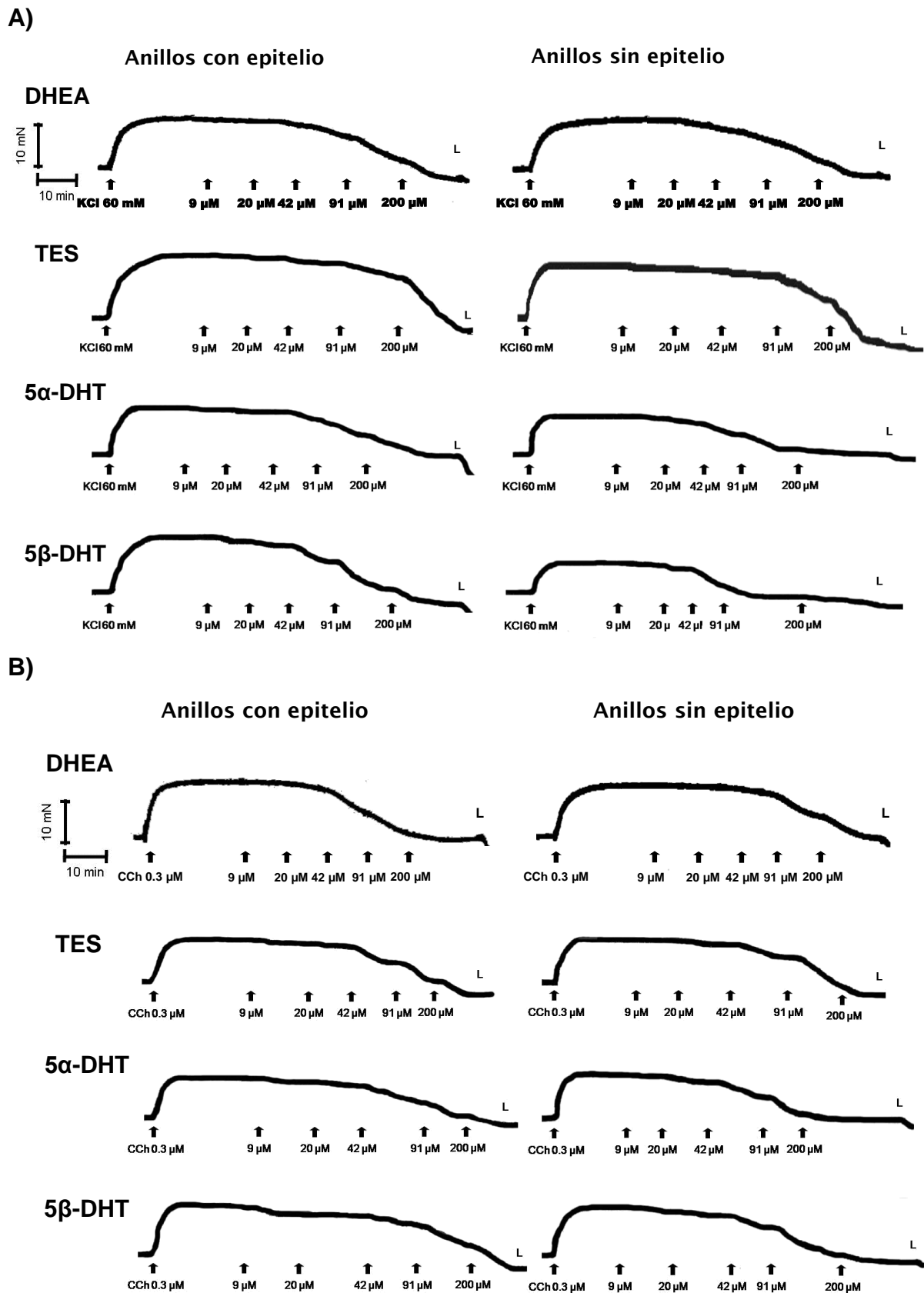


Figura 8. Registros típicos de la tráquea de cobayo donde se muestra el efecto inhibitorio de dehidroepiandrosterona (DHEA), testosterona (TES), 5α-dihidrotestosterona (5α-DHT) y 5β-dihidrotestosterona (5β-DHT) sobre la contracción inducida por: A) KCl (60 mM) y B) CCh 0.3 μM en anillos la tráquea de cobayos no sensibilizados; lavado (L).

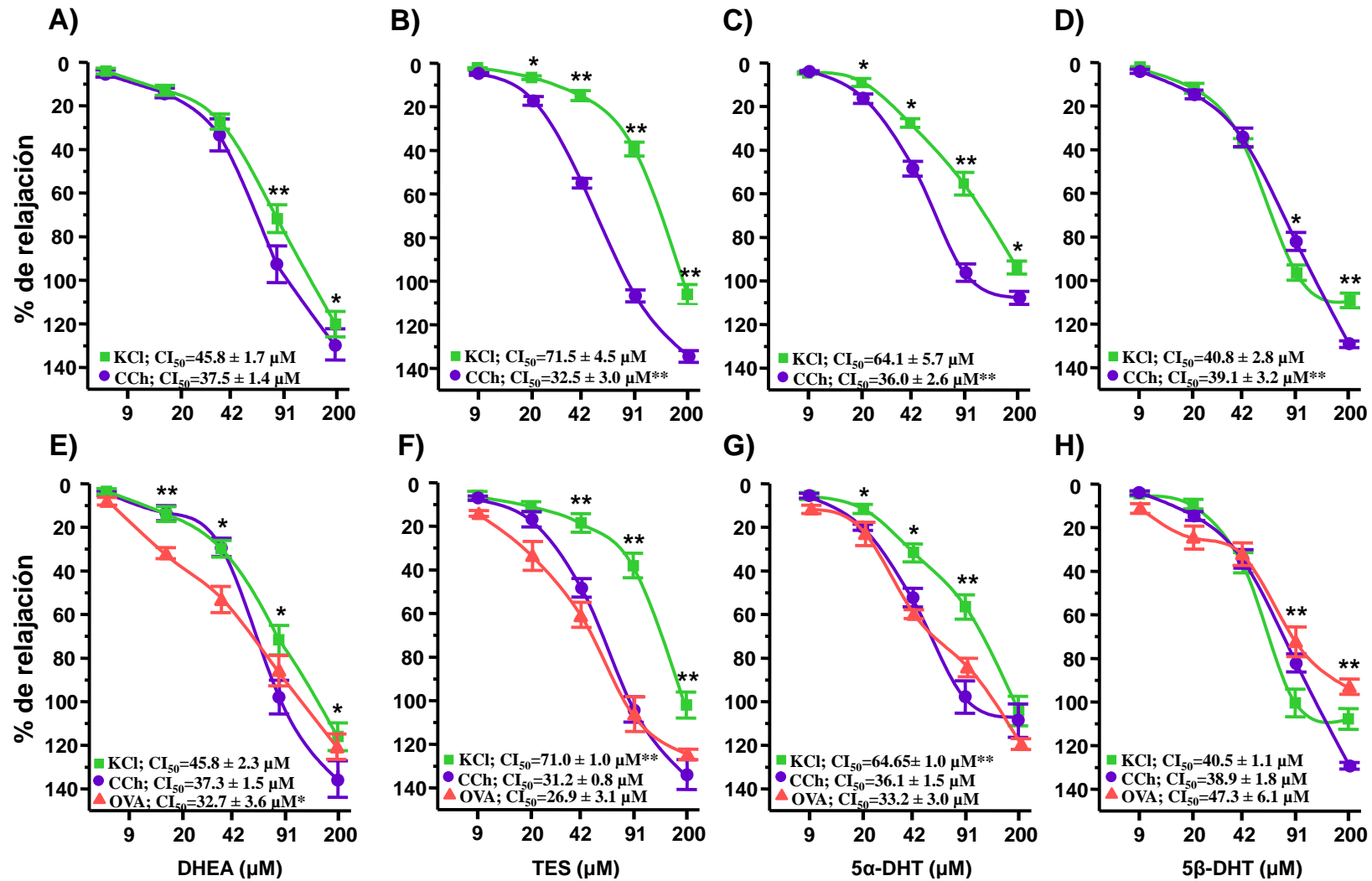


Figura 9. Curvas concentración-respuesta de dehidroepiandrosterona (DHEA) testosterona (TES), 5 α -dihidrotestosterona (5 α -DHT) y 5 β -dihidrotestosterona (5 β -DHT) sobre la contracción inducida por ovoalbúmina (OVA, 1 μM), KCl (60 mM) o carbacol (CCh, 0.3 μM) en la tráquea de cobayos no sensibilizados (A-D) y sensibilizados (E-H). Diferencias entre el efecto relajante inducido por los andrógenos en las contracciones (* $P < 0.01$; ** $P < 0.0001$). Concentración inhibitoria 50 (CI_{50}). Cada símbolo es la media de $n = 6 \pm DEM$.

Por otro lado, como se muestra en la Fig. 10, salbutamol, como era de esperarse, provocó un efecto broncodilatador en preparaciones traqueales de cobayos no sensibilizados y sensibilizados. El efecto relajante inducido por salbutamol fue más potente que el inducido por los andrógenos, ya que su efecto se observó a concentraciones mil veces menores, en el rango nM. Sin embargo, a diferencia del efecto broncodilatador provocado por los andrógenos, el salbutamol fue menos potente en anillos traqueales contracturados con CCh de cobayos sensibilizados.

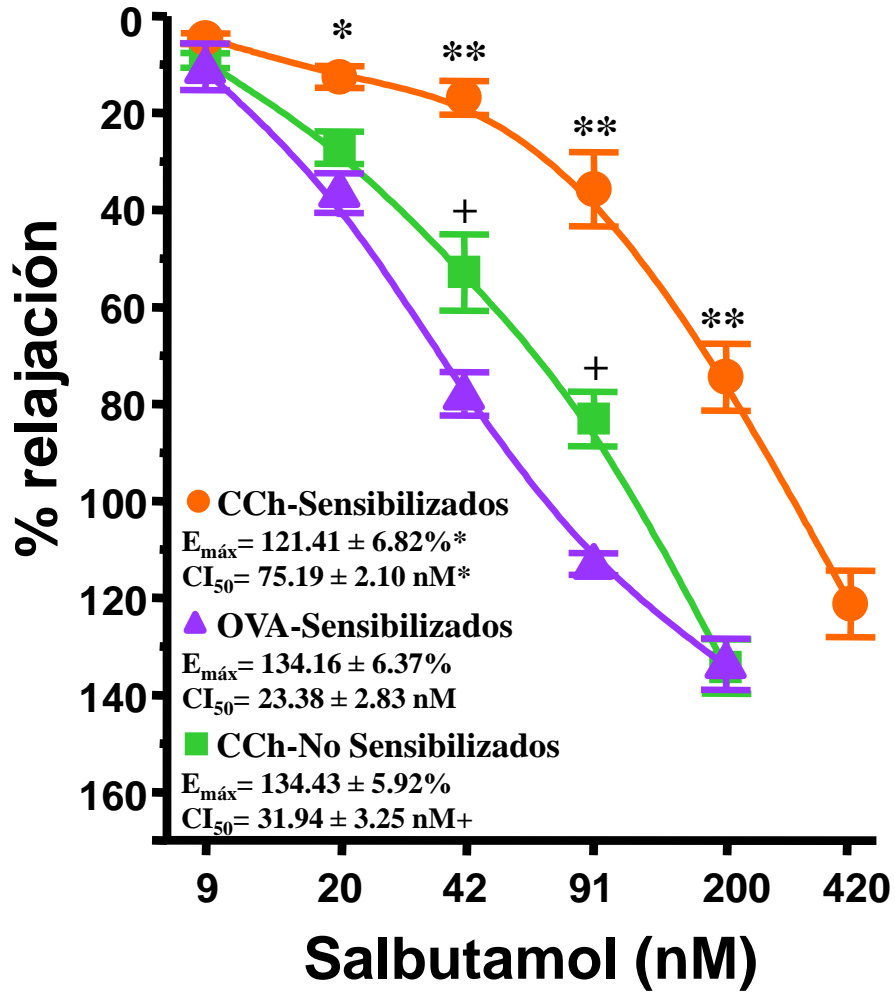


Figura 10. Curvas concentración-respuesta de salbutamol sobre la contracción inducida por CCh (0.3 μM) y OVA (1 μM) en anillos traqueales de cobayo. Diferencias entre el efecto relajante inducido por salbutamol sobre la contracción por CCh en cobayos sensibilizados vs. OVA en cobayos sensibilizados y CCh en cobayos no sensibilizados (* $P < 0.001$; ** $P < 0.00001$) y; diferencias del efecto de salbutamol sobre la contracción de OVA en cobayos sensibilizados vs. CCh en cobayos no sensibilizados (* $P < 0.05$). Efecto máximo ($E_{m\acute{a}x}$). Concentración inhibitoria 50 (CI_{50}). Cada símbolo es la media de $n = 6 \pm \text{DEM}$.

6.3. Efecto de la eliminación del epitelio sobre la relajación inducida por los andrógenos

Las comparaciones entre las curvas concentración respuesta de cada andrógeno en los anillos traqueales con y sin epitelio de cobayos no sensibilizados muestran que sobre la contracción por KCl: (i) el efecto relajante de DHEA no tuvo diferencias ($P > 0.05$; Fig. 11A) entre los anillos con y sin epitelio y; (ii) la relajación de TES, 5α -DHT y 5β -DHT fue mayor por la eliminación del epitelio, ya que las curvas concentración respuesta de estos andrógenos en los anillos sin epitelio, fueron desplazadas a la izquierda, de manera significativa ($P < 0.0001$; Fig. 11B-D), con respecto a las curvas obtenidas en los anillos con epitelio.

En los tejidos contracturados con CCh, no se encontraron diferencias entre las curvas concentración respuesta en los anillos con y sin epitelio de DHEA y TES ($P > 0.05$; Fig. 11E y 19F); pero las curvas de 5α -DHT y 5β -DHT en anillos sin epitelio fueron desplazadas a la izquierda significativamente ($P < 0.0001$; Fig. 11G y 9H) con respecto a las curvas en los anillos con epitelio, indicando que la relajación inducida por estos andrógenos se incrementó en los anillos sin epitelio.

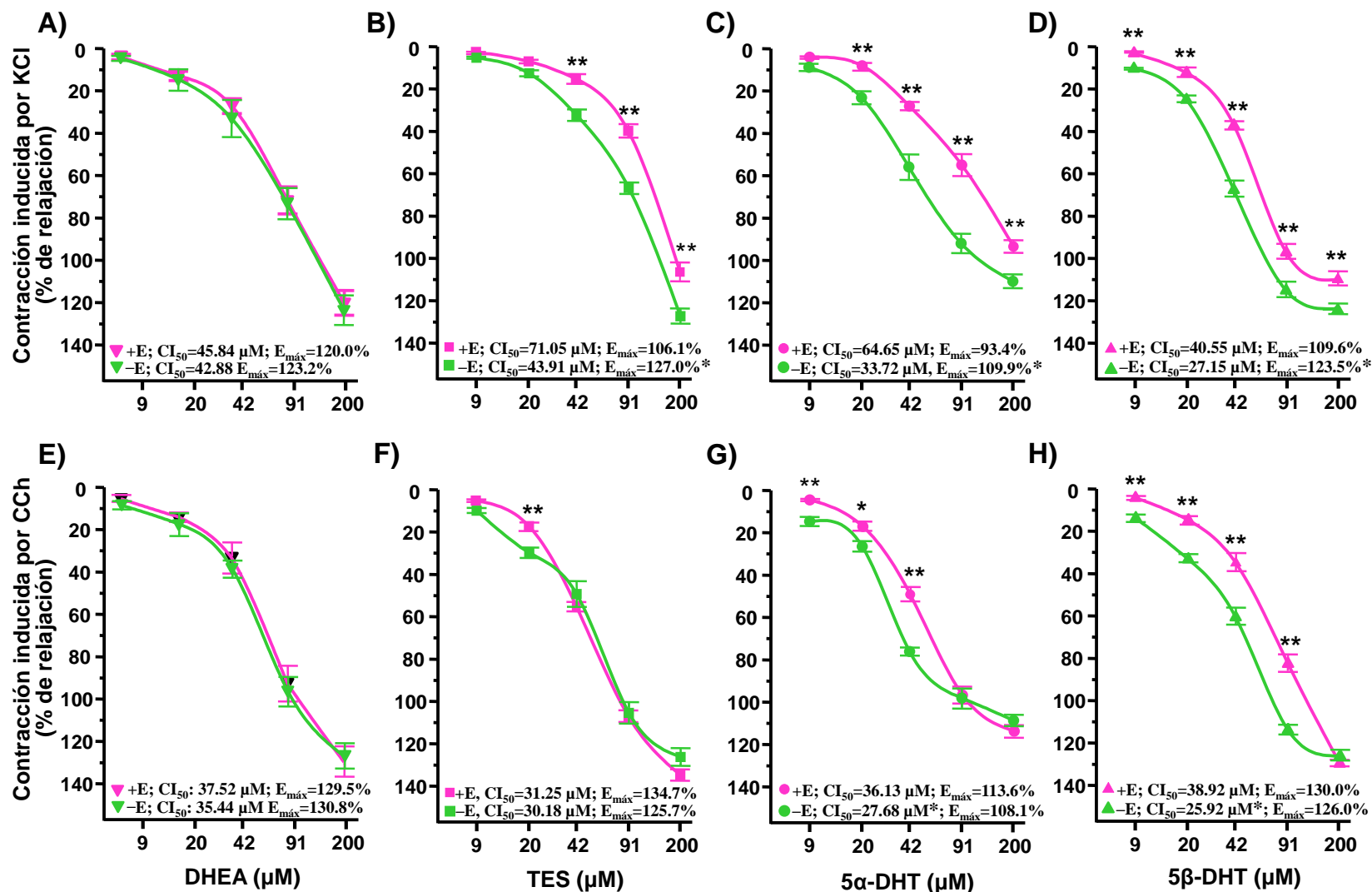


Figura 11. Curvas concentración-respuesta de dehidroepiandrosterona (DHEA) testosterona (TES), 5 α -dihidrotestosterona (5 α -DHT) y 5 β -dihidrotestosterona (5 β -DHT) sobre la contracción inducida por KCl (60 mM) o CCh (0.3 μM) en la tráquea de cobayos no sensibilizados con epitelio (A-D) y sin epitelio (E-H). Diferencias entre el efecto relajante de los andrógenos (* $P < 0.01$; ** $P < 0.0001$). Cada símbolo es la media de $n = 6 \pm \text{DEM}$.

6.4. Potencia y eficacia de los andrógenos

De manera general, las curvas concentración respuesta de los andrógenos sobre los diferentes agentes contráctiles fueron diferentes entre sí ($P < 0.01$); por consecuencia, también existen diferencias ($P < 0.01$) entre su potencia y eficacia (Tabla 1). La comparación del $E_{m\acute{a}x}$ (efecto máximo inducido por los andrógenos a la mayor concentración probada) de los andrógenos, arrojó las siguientes relaciones de eficacia entre los andrógenos: (i) DHEA > TES = 5β -DHT > 5α -DHT en anillos con y sin epitelio contracturados con KCl; (ii) DHEA = TES = 5β -DHT > 5α -DHT en anillos con y sin epitelio contracturados con CCh, en animales no sensibilizados y sensibilizados y; (iii) DHEA = TES = 5α -DHT > 5β -DHT en anillos contracturados con OVA de animales sensibilizados. La comparación de la CI_{50} (concentración del andrógeno requerida para provocar 50% de relajación) entre los andrógenos determinó que 5β -DHT fue el andrógeno con mayor potencia para relajar los anillos con y sin epitelio contracturados con KCl y los anillos sin epitelio contracturados con CCh; mientras que TES fue el andrógeno más potente en los anillos con epitelio contracturados con CCh. En los anillos traqueales de cobayos sensibilizados contracturados con OVA se observó que DHEA, TES y 5α -DHT tuvieron la misma potencia broncorelajante, siendo 5β -DHT el de menor potencia.

En otra comparación de la CI_{50} de los andrógenos, se observó que las contracciones tuvieron diferente sensibilidad a la relajación inducida por cada andrógeno, el orden de la sensibilidad de las contracciones para el efecto de DHEA fue: OVA > CCh > KCl; para la TES y 5α -DHT el orden obtenido fue: CCh = OVA > KCl; finalmente, la sensibilidad de las tres contracciones fue igual para la relajación ejercida por 5β -DHT: OVA = KCl = CCh.

Tabla 1. Efecto broncorelajante de los andrógenos en anillos traqueales de cobayos no sensibilizados y sensibilizados

Andrógeno		$E_{m\acute{a}x}$ (% de relajaci3n)	CI_{50} (μM)	Potencia
KCl 60 mM				
<i>DHEA</i>	<i>NS</i>	120.04 \pm 5.86	45.84 \pm 1.77	1.00
	<i>S</i>	116.63 \pm 6.42	45.81 \pm 2.31	1.00
<i>TES</i>	<i>NS</i>	106.12 \pm 4.53	71.05 \pm 1.00	0.64
	<i>S</i>	102.01 \pm 6.85	71.57 \pm 4.5	0.64
<i>5α-DHT</i>	<i>NS</i>	93.45 \pm 2.96	64.65 \pm 1.06	0.70
	<i>S</i>	89.47 \pm 4.42	64.14 \pm 5.73	0.71
<i>5β-DHT</i>	<i>NS</i>	109.68 \pm 4.03	40.55 \pm 1.1	1.13
	<i>S</i>	107.7 \pm 4.75	40.88 \pm 2.8	1.12
CCh 0.3 μM				
<i>DHEA</i>	<i>NS</i>	124.53 \pm 8.06	37.52 \pm 1.49*	1.00
	<i>S</i>	135.9 \pm 8.82*	37.31 \pm 1.55*	1.00
<i>TES</i>	<i>NS</i>	134.77 \pm 3.32*	31.25 \pm 0.84**	1.20
	<i>S</i>	133.79 \pm 7.94*	32.52 \pm 3.06**	1.14
<i>5α-DHT</i>	<i>NS</i>	113.65 \pm 3.12*	36.13 \pm 1.51**	1.03
	<i>S</i>	106.82 \pm 7.68*	36.03 \pm 2.69**	1.03
<i>5β-DHT</i>	<i>NS</i>	130.07 \pm 1.91**	38.92 \pm 1.89	0.96
	<i>S</i>	125.72 \pm 7.60**	39.12 \pm 3.23	0.95
OVA 1 μM				
<i>DHEA</i>	<i>S</i>	121.74 \pm 5.72	32.75 \pm 3.67 [§] *	1.00
<i>TES</i>	<i>S</i>	124.60 \pm 2.39 ^{§§}	26.96 \pm 3.11 [§] **	1.21
<i>5α-DHT</i>	<i>S</i>	118.80 \pm 2.49 [§] *	33.26 \pm 3.05 [§] **	0.98
<i>5β-DHT</i>	<i>S</i>	94.01 \pm 4.23 [§] *	47.39 \pm 6.10	0.69

Efecto máximo ($E_{m\acute{a}x}$) y concentraci3n inhibitoria media (CI_{50}) de dehidroepiandrosterona (DHEA), testosterona (TES), 5 α -dihidrotestosterona (5 α -DHT) y 5 β -dihidrotestosterona (5 β -DHT). Diferencias significativas al comparar KCl vs. CCh (* $P < 0.01$; ** $P < 0.0001$) y al comparar CCh vs. OVA ([§] $P < 0.01$ y ^{§§} $P < 0.0001$). Los datos son la media de $n = 6 \pm DEM$.

6.5. Efecto de los inhibidores seleccionados sobre la respuesta de los andrógenos

El tratamiento con los inhibidores cicloheximida (inhibidor de la síntesis de proteínas) o actinomicina D (inhibidor de la transcripción) no afectó la acción broncorelajante de DHEA ($P > 0.05$); de manera que su potencia y eficacia fueron estadísticamente iguales ($P > 0.05$) con cicloheximida ($CI_{50} = 46.19 \pm 2.55 \mu\text{M}$; $E_{\text{máx}} = 122.62 \pm 7.45\%$ de relajación), actinomicina D ($CI_{50} = 43.41 \pm 3.10 \mu\text{M}$; $E_{\text{máx}} = 122.18 \pm 3.37\%$ de relajación) o sin tratamiento ($CI_{50} = 45.84 \pm 1.77 \mu\text{M}$; $E_{\text{máx}} = 120.04 \pm 5.86\%$ de relajación). De forma similar, el pretratamiento con L-NAME (10 μM), tampoco alteró significativamente ($P > 0.05$) las curvas de los andrógenos: DHEA, TES, 5α -DHT y 5β -DHT (Tabla 2).

Para los experimentos que se realizaron con el fin de determinar la posible participación de los receptores β_2 adrenérgicos en el efecto relajante de los andrógenos, se verificó que propranolol a la concentración de 10 μM antagoniza los receptores β_2 adrenérgicos, impidiendo la relajación inducida por salbutamol (10 μM ; agonista β_2 adrenérgico) sobre la contracción provocada por CCh, como se muestra en la Fig. 12B; posteriormente se obtuvieron las curvas de los andrógenos en presencia de 10 μM de propranolol. Los valores de CI_{50} y $E_{\text{máx}}$ de dichas curvas no fueron diferentes a los valores obtenidos en anillos sin tratamiento con propranolol ($P > 0.05$).

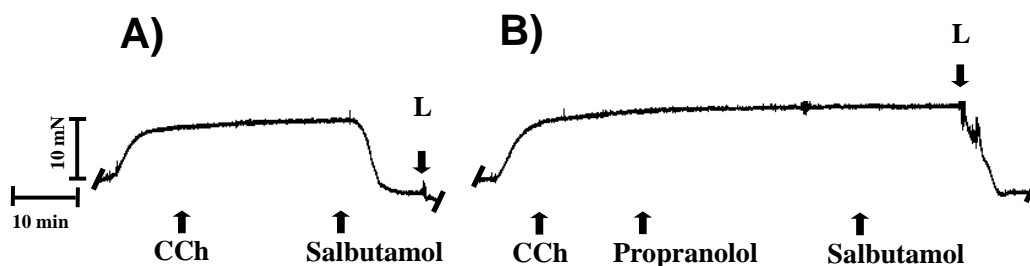


Figura 12. Registros típicos de la tráquea de cobayo donde se muestra la contracción inducida por carbacol (CCh); A) inhibida por salbutamol y; B) el antagonismo de propranolol sobre la relajación inducida con Salbutamol; lavado (L).

Tabla 2. Efecto de los tratamientos sobre el efecto relajante inducido por los andrógenos.

Andrógeno	Contracción por KCl		Contracción por CCh	
	Control	L-NAME	Control	Prop
$E_{m\acute{a}x}$ (% de relajación)				
<i>DHEA</i>	120.04 ± 5.86	121.66 ± 8.07	129.53 ± 8.06	130.71 ± 7.39
<i>TES</i>	106.12 ± 4.53	106.65 ± 5.10	134.77 ± 3.32	131.67 ± 5.14
<i>5α-DHT</i>	93.45 ± 2.96	90.23 ± 2.25	113.67 ± 5.14	108.28 ± 5.68
<i>5β-DHT</i>	109.68 ± 4.03	109.69 ± 5.09	130.07 ± 1.91	128.01 ± 2.91
CI_{50} (μM)				
<i>DHEA</i>	45.84 ± 1.77	45.59 ± 0.86	37.52 ± 1.49	37.52 ± 0.95
<i>TES</i>	71.05 ± 1.00	71.84 ± 1.90	31.25 ± 0.84	30.18 ± 2.07
<i>5α-DHT</i>	64.65 ± 1.06	66.75 ± 2.60	36.13 ± 1.51	35.62 ± 1.64
<i>5β-DHT</i>	40.55 ± 1.10	41.23 ± 0.93	38.92 ± 1.89	39.64 ± 1.31

Efecto máximo ($E_{m\acute{a}x}$) y concentración inhibitoria media (CI_{50}) de dehidroepiandrosterona (DHEA), testosterona (TES), 5 α - y 5 β -dihidrotestosterona (-DHT) sobre las contracciones provocadas por KCl (60 mM) o CCh (0.3 μ M) incubadas con L^w-nitro-L-arginina metil ester (L-NAME, 10 μ M) o propranolol (Prop, 10 μ M). Ni hay diferencias con el control (sin tratamiento) ($P > 0.05$). Cada dato es la media de $n = 6 \pm DEM$.

6.6. La broncorelajación inducida por los andrógenos en la tráquea de cobayo es independiente de los canales de potasio

Parte de este trabajo fue investigar la potencial participación de los canales de K^+ en el efecto relajante de TES, 5α -DHT y 5β -DHT. Los datos mostraron que las curvas concentración respuesta de los andrógenos sobre contracciones de CCh en presencia de TEA, un bloqueador de los canales de K^+ , no fueron significativamente diferentes ($P > 0.05$) a las curvas concentración respuesta de los andrógenos sin TEA (Fig. 13).

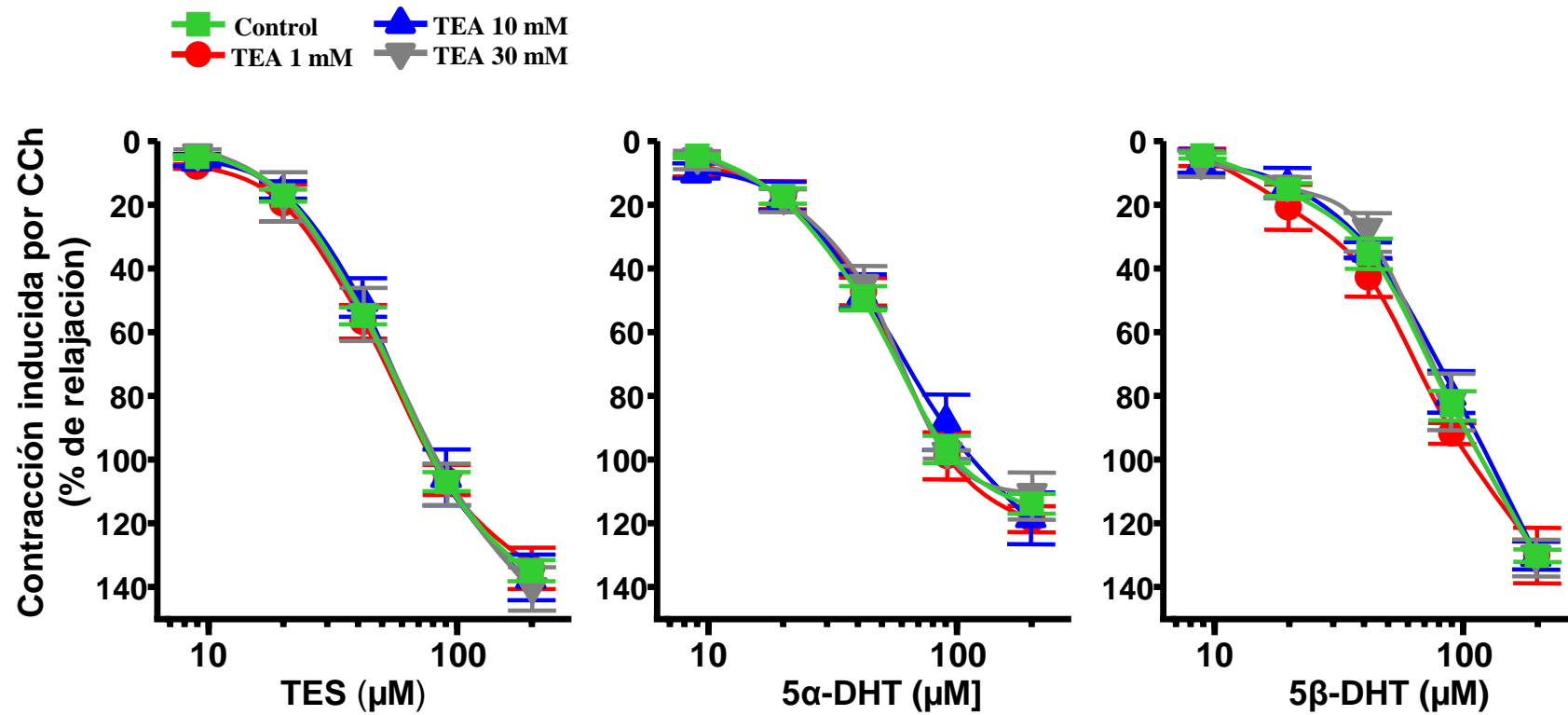


Figura 13. Curvas concentración respuesta de testosterona (TES), 5 α -dihidrotestosterona (5 α -DHT) y 5 β -dihidrotestosterona (5 β -DHT). El tratamiento con diferentes concentraciones de tetraetilamonio (TEA) no modificó las curvas concentración respuesta de los andrógenos sobre la contracción inducida por CCh (0.3 μ M) en la tráquea aislada de cobayos no sensibilizados ($P > 0.05$). Cada símbolo es la media de $n = 6 \pm$ DEM.

6.7. Efecto de DHEA sobre el influjo de Ca^{2+} a través de los CCOV

En este trabajo, se estudió la capacidad de DHEA para actuar como un bloqueador de los CCOV mediante tres estrategias experimentales. Primero se observó que, el pretratamiento con Bay K 8644 (activador de los CCOV) antagonizó el efecto broncodilatador de DHEA; de manera que, respecto al control (sin Bay K8644; $\text{CI}_{50} = 45.84 \pm 1.77 \mu\text{M}$; $\text{E}_{\text{máx}} = 120.04 \pm 5.86\%$ de relajación) la incubación con Bay K8644 disminuyó de manera significativa ($P < 0.001$) la potencia ($\text{CI}_{50} = 60.43 \pm 5.03 \mu\text{M}$) y la eficacia ($\text{E}_{\text{máx}}: 98.99 \pm 5.56\%$ de relajación) de DHEA.

En segundo lugar, se determinó que la DHEA tiene la habilidad de prevenir la contracción inducida por Ca^{2+} (Fig.14A) en anillos traqueales despolarizados; dicho efecto fue dependiente de la concentración y no hubo diferencias estadísticas ($P > 0.05$) entre sus curvas concentración respuesta en las preparaciones traqueales de animales no sensibilizados y sensibilizados (ver Fig. 14B); el vehículo no modificó de manera significativa ($P > 0.05$) la contracción inducida por Ca^{2+} (3.16% de prevención). Otro tercer hallazgo es que la DHEA, a $200 \mu\text{M}$ (concentración de su $\text{E}_{\text{máx}}$), provocó una inhibición total e inmediata de la contracción inducida directamente por Bay K 8644, disminuyendo también el tono basal de los anillos traqueales (Fig. 14C). Después que la DHEA fue retirada de los anillos traqueales, estos recuperaron su tono basal inicial. El análisis de estos tres resultados muestra que la DHEA es un potente bloqueador de los CCOV.

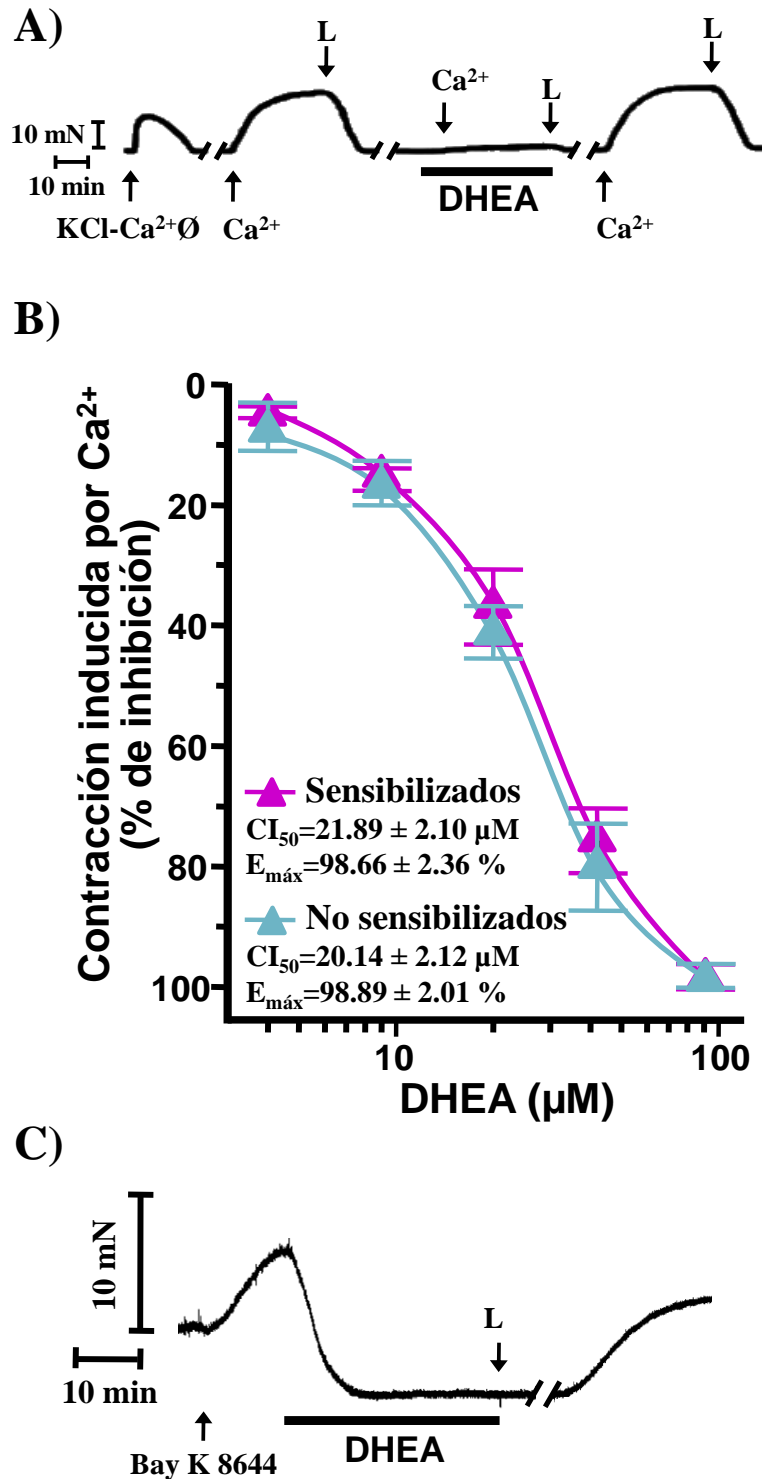


Figura 14. Prevención del influjo de Ca^{2+} extracelular por DHEA. A) DHEA antagoniza la contracción inducida por de CaCl_2 (Ca^{2+} ; 2.5 mM) en anillos traqueales previamente despolarizados por solución alta en potasio libre de Ca^{2+} ($\text{KCl-Ca}^{2+} \emptyset$). La contracción inducida por Ca^{2+} fue completamente prevenida por DHEA a 91 μM , la línea sólida indica el tiempo de incubación de DHEA; la contracción de Ca^{2+} se recuperó totalmente después del lavado (L) con $\text{KCl-Ca}^{2+} \emptyset$. B) Curvas de concentración respuesta del efecto bloqueador de DHEA sobre los CCOV en anillos traqueales de cobayos no sensibilizados y sensibilizados, sin diferencias estadísticas ($P > 0.05$). Cada punto representa la media $n = 6 \pm \text{DEM}$. C) Registro típico que muestra la relajación inducida por DHEA (200 μM) sobre la contracción provocada por Bay K 8644 (100 μM).

6.8. Disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por los andrógenos en miocitos traqueales de cobayo

Los estudios funcionales de esta Tesis (resultados anteriores) señalan que DHEA, puede inhibir el paso del Ca^{2+} externo por los CCOV, como ha sido previamente sugerido para sus metabolitos (Bordallo et al., 2008); aunque se desconoce si TES, 5α -DHT y 5β -DHT pueden modular la $[Ca^{2+}]_i$. Para investigar esta posibilidad, en este estudio se utilizó la técnica de microfluorometría.

En la Fig. 15A se muestra que el estímulo con KCl produce un incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ (respuesta control) que es repetible en cada estímulo. De forma comparativa, la presencia de las concentraciones de los andrógenos previno el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ al estímulo de KCl en los miocitos traqueales aislados de cobayo (Fig. 15B-D). Cuando los andrógenos se eliminaron al perfundir las células con Ringer normal, se observó que la $[Ca^{2+}]_i$ regreso a sus valores basales; después de un estímulo con KCl, nuevamente se incrementó la $[Ca^{2+}]_i$; esa observación indica que la disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ inducida por los andrógenos es reversible.

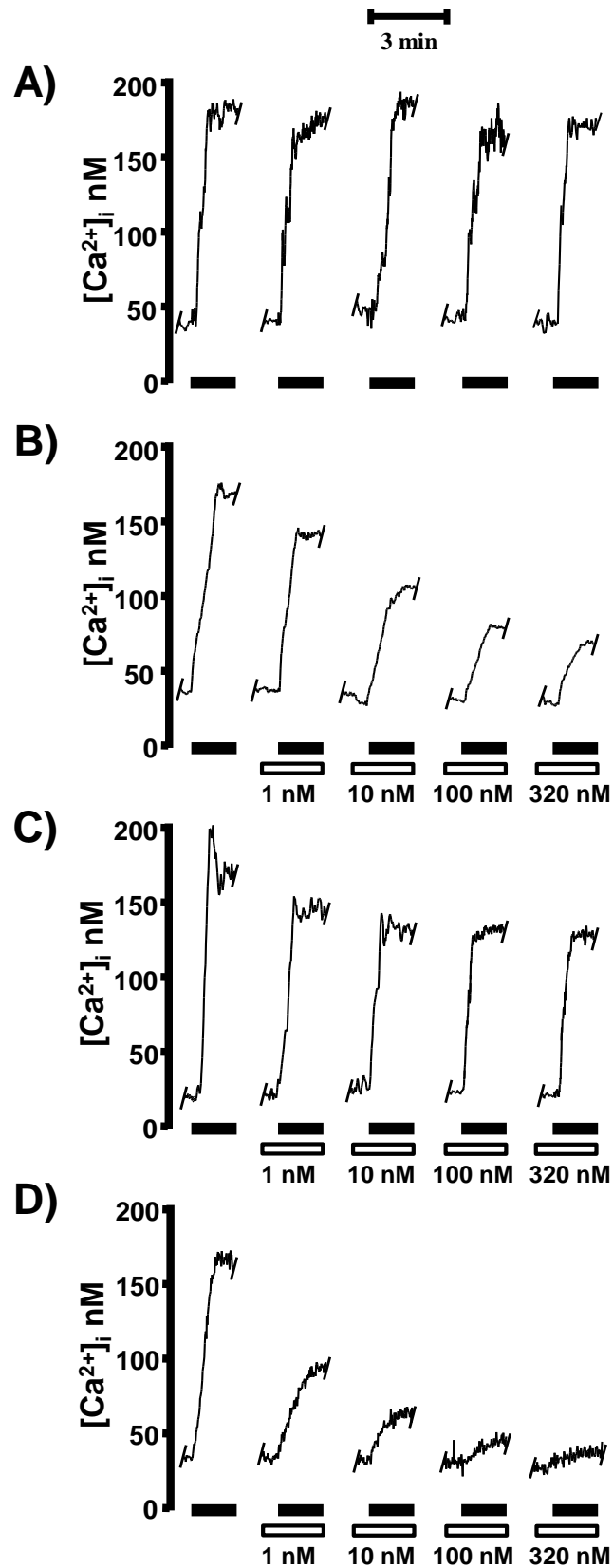


Figura 15. Aumento de la $[Ca^{2+}]_i$ al estímulo de KCl (60 mM) en miocitos traqueales de cobayo (barra negra). A) Nótese que la elevación de $[Ca^{2+}]_i$ es reproducible ante cada estímulo de KCl. Disminución de la $[Ca^{2+}]_i$ por estímulo de KCl (barra negra) en presencia de diferentes dosis (barra blanca) de: B) testosterona (TES), C) 5 α -dihidrotestosterona y D) 5 β -dihidrotestosterona.

Con base en el análisis de las curvas concentración respuesta obtenidas (Fig. 16), se observó que los tres andrógenos tienen la habilidad de disminuir la $[Ca^{2+}]_i$ provocada por la despolarización con KCl. La TES y su metabolito 5β -DHT previnieron la $[Ca^{2+}]_i$, de manera dependiente de la concentración, pero esto no sucedió así para 5α -DHT.

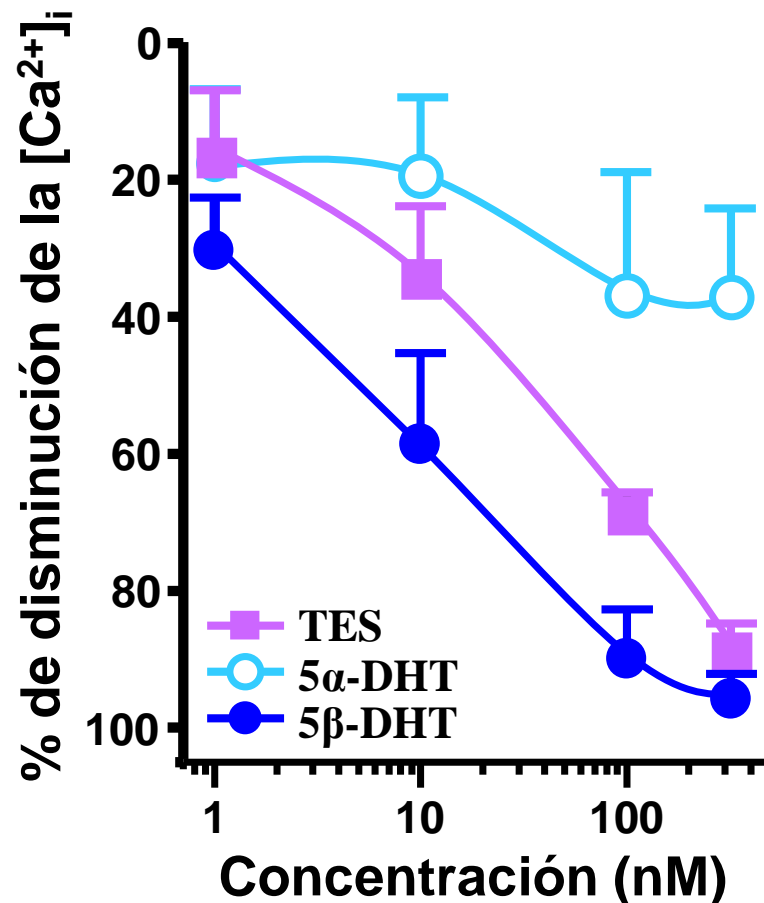


Figura 16. Curvas concentración respuesta de la disminución de $[Ca^{2+}]_i$ al estímulo de KCl por testosterona (TES) 5α - y 5β -dihidrotestosterona (DHT) en miocitos aislados de la tráquea de cobayo. Las curvas de 5α - y 5β -DHT fueron diferentes a la de TES ($P < 0.001$). Cada símbolo en las curvas es la media de $n = 4 \pm DEM$.

El orden de la potencia de los andrógenos para inhibir la $[Ca^{2+}]_i$ se obtuvo por la comparación de la CI_{50} (concentración a la cual se inhibió el 50% del incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ provocada por KCl) de los tres andrógenos y fue el siguiente: 5β -DHT ($CI_{50} = 6.06 \pm 3.90$ nM) > TES ($CI_{50} = 21.90 \pm 5.94$ nM) >>> 5α -DHT. No fue posible calcular la CI_{50} de 5α -DHT, ya que no provocó la inhibición de la $[Ca^{2+}]_i$ de manera dependiente de la concentración. El vehículo (etanol absoluto, 0.1% v/v) de los andrógenos no modificó la $[Ca^{2+}]_i$ de los miocitos.

6.9. Los andrógenos previenen el broncoespasmo en cobayos sensibilizados

Como se observa en la Fig. 17, en los cobayos sensibilizados la administración de la OVA ($75 \mu\text{g kg}^{-1} \text{min}^{-1}$, i.v.) provocó un aumento de la R_L . En animales asmáticos retados sin tratamiento con andrógenos (grupo control), la EAR se caracterizó por el incremento inmediato (a los 10 segundos) de la R_L después del reto antigénico, que alcanzó un valor máximo, aproximadamente a los 4 min, de $3.80 \pm 0.54 \text{ cm H}_2\text{O ml}^{-1} \text{ s}^{-1}$. A los 12 min, la R_L comenzó un descenso gradual, hasta estabilizarse durante la LAR, pero sin regresar a la R_L basal (R_L basal antes del reto fue de $0.37 \pm 0.03 \text{ cm H}_2\text{O ml}^{-1} \text{ s}^{-1}$; $P < 0.001$).

De forma similar, en los cobayos sensibilizados que recibieron el pretratamiento con el vehículo (DMSO; 0.04 - 0.06 ml min^{-1}) usado para la administración de la testosterona, 15 min antes de provocar el reto antigénico con OVA, se observó el incremento de la R_L durante la EAR, que no fue estadísticamente diferente a la EAR del grupo control ($P > 0.05$). Asimismo, en este grupo de animales, los valores de la R_L durante la LAR no mostraron diferencias significativas ($P > 0.05$) respecto al grupo control.

En contraste con lo observado en los grupos control y del vehículo, en los animales que fueron pretratados con las diferentes dosis de cada andrógeno (35, 110 y 350 $\mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$) se observó que el incremento de la R_L durante el reto antigénico con OVA fue prevenido de manera significativa ($P < 0.05$). En los cobayos que recibieron las dosis de 110 o 350 $\mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$ hubo un retraso, de aproximadamente 2 min, en el inicio del incremento de R_L (Fig. 17, nótese un desplazamiento a la derecha del incremento de la R_L con el pretratamiento de cada dosis de andrógeno). El análisis del área bajo la curva, de las curvas temporales del incremento de la R_L durante el broncoespasmo, muestra que los cuatro andrógenos tuvieron la habilidad de prevenir la EAR del broncoespasmo, de manera dependiente de la dosis ($P < 0.05$).

En la Fig. 18 se presentan los valores máximos de la R_L , obtenidos al minuto 4 durante la EAR; con base en estos datos, se calculó la DE_{50} (dosis a la cual los andrógenos previnieron el 50% del broncoespasmo) de cada andrógeno, su orden de potencia para prevenir el broncoespasmo fue: $5\beta\text{-DHT} = \text{DHEA} > \text{TES} > 5\alpha\text{-DHT}$.

Además de inhibir la fase aguda del broncoespasmo (la EAR), los andrógenos, a todas las dosis (análisis de área bajo la curva) también provocaron la disminución de la R_L durante la LAR ($P < 0.001$); aunque esto fue más evidente a la dosis de 350 $\mu\text{mol kg}^{-1} \text{min}^{-1}$, ya que a esta dosis los valores de R_L durante la LAR fueron iguales al valor basal inicial ($P > 0.05$); de manera contundente, los cuatro andrógenos abolieron la LAR durante un reto antigénico con OVA en los cobayos sensibilizados.

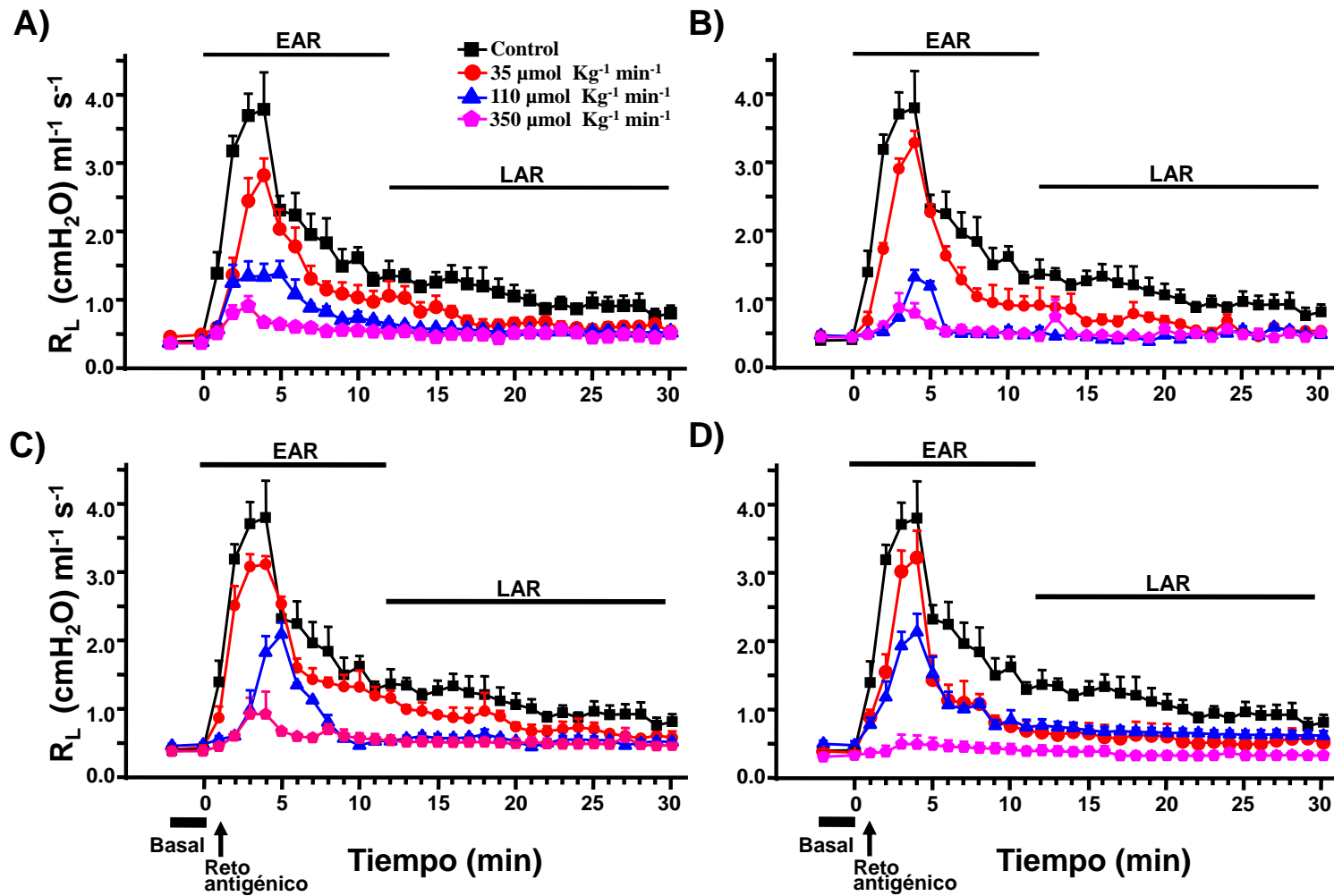


Figura 17. Prevención, dependiente de la dosis y del tiempo, del broncoespasmo por A) dehidroepiandrosterona, B) testosterona, c) 5 α -dihidrotestosterona y D) 5 β -dihidrotestosterona. Cada dosis de andrógeno fue administrada 15 min antes del reto antigénico con ovoalbúmina (OVA). Las dosis inhibieron el incremento de la resistencia pulmonar (R_L) de manera significativa ($P < 0.05$) comparado con el control. Respuesta asmática temprana (EAR), respuesta asmática tardía (LAR). Cada símbolo en las curvas es la media de $n = 6 \pm \text{DEM}$.

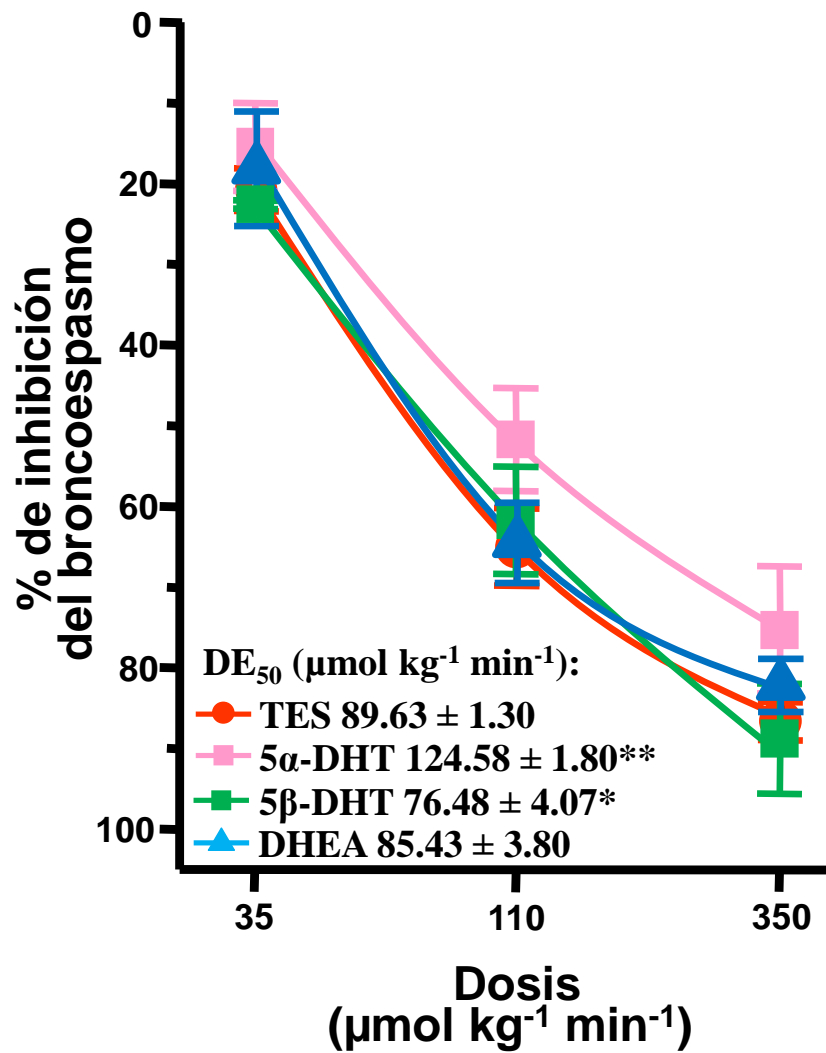


Figura 18. Curvas dosis respuesta de inhibición de la resistencia pulmonar durante la EAR por dehidroepiandrosterona (DHEA), testosterona (TES), 5α-dihidrotestosterona (5α-DHT) y 5β-dihidrotestosterona (5β-DHT) a los 4 min de provocar el broncoespasmo con ovoalbúmina (OVA). Diferencias significativas al comparar la DE₅₀ (dosis para inhibir el 50% de la R_L durante el broncoespasmo) con DHEA *P<0.05, **P<0.0001. TES y DHEA no tuvieron diferencias en su DE₅₀. Cada símbolo en las curvas es la media de n = 6 ± DEM.

Respecto a las pruebas con salbutamol, el broncorelajante por excelencia, se observó que previno la EAR del broncoespasmo, de manera dependiente de la dosis. En comparación con los andrógenos, el salbutamol fue significativamente ($P < 0.00001$) más potente ($DE_{50} = 12.58 \pm 1.31 \text{ ng kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$) para inhibir la EAR del broncoespasmo, mostrando su efecto protector en el rango de dosis nanomolares. Sin embargo, se observó que durante la LAR la disminución gradual de la R_L se vio revertida, ya que la R_L nuevamente comenzó a incrementarse, mostrando que el salbutamol no disminuyó la LAR, como sucedió por el pretratamiento con los andrógenos (datos no mostrados).

Colateralmente, se observó que durante el reto antigénico, la presión arterial (sistólica = $73.99 \pm 15.38 \text{ mmHg}$ y diastólica = $67.62 \pm 15.28 \text{ mmHg}$) y la frecuencia cardiaca (144.20 ± 13.34 latidos por min) en los cobayos sensibilizados sin pretratamiento (grupo control) fueron estadísticamente iguales ($P > 0.05$) a la presión arterial (sistólica = $73.65 \pm 10.67 \text{ mmHg}$ y diastólica $67.48 \pm 11.06 \text{ mmHg}$) y a la frecuencia cardiaca (154.43 ± 17.22 latidos por min) de los cobayos sensibilizados pretratados; mostrando que la administración de los andrógenos no altera estos parámetros durante el broncoespasmo.

7. DISCUSIÓN

7.1. General

Los resultados de la presente Tesis muestran que el precursor de los andrógenos, la DHEA, y sus metabolitos TES, 5 α -DHT y 5 β -DHT tienen la habilidad de inducir un efecto broncodilatador sobre las contracciones provocadas con KCl (60 mM) y CCh (0.3 μ M) de igual magnitud en preparaciones de tráquea de cobayos no sensibilizados y sensibilizados, lo cual indica que la relajación del MLVA es funcional aún en las condiciones fisiopatológicas características del asma; como son la hiperplasia e hipertrofia del MLVA (Revisado por Girodet *et al.*, 2011).

En este trabajo, por primera vez se reporta la capacidad de la DHEA, TES, 5 α -DHT y 5 β -DHT para relajar una contracción provocada por un alérgeno, OVA (1 μ M), en cobayos previamente sensibilizados, dado que este tipo de contracción es muy resistente a la relajación; aún efectuando numerosos lavados del tejido. La poderosa modulación de la reactividad del MLVA por los andrógenos, observada en los animales sensibilizados, indica que los andrógenos podrían ser un atenuante en la patogénesis del asma, al ser efectivos aún en el estado hiperreactivo del MLVA de los asmáticos.

La capacidad broncorelajante de los andrógenos están en línea con los reportes previos que han mostrado que la TES induce una acción broncorelajante sobre contracciones inducidas por ACh (10 μ M) y CCh (10 μ M) en la tráquea aislada de conejo (Kouloumenta *et al.*, 2006) y sobre contracciones inducidas por CCh (0.1 μ M) y KCl (80 mM) en tiras aisladas de MLVA de bovino (Bordallo *et al.*, 2008) y por los metabolitos de la TES: (i) 5 α -DHT y 5 β -DHT, sobre contracciones inducidas por

CCh (0.1 μ M) y KCl (80 mM) en la tráquea aislada de bovino y; (ii) 5 α -DHT sobre contracciones inducidas por CCh (0.3 μ M) en la tráquea aislada de cobayo (Bordallo *et al.*, 2008). Es importante resaltar que los presentes hallazgos reportan la broncorelajación provocada por DHEA, un nuevo aspecto de los efectos biológicos de esta hormona.

Los resultados de este estudio, también mostraron que la broncorelajación *in vitro* provocada por los andrógenos (DHEA, TES, 5 α -DHT y 5 β -DHT) consecuentemente produce una importante prevención del broncoespasmo (causado por el reto antigénico con OVA) en el animal completo. En nuestro modelo animal de asma, como en los pacientes asmáticos, el broncoespasmo tiene dos fases (Revisado por Canning y Chou, 2008; Ricciardolo *et al.*, 2008): la EAR, caracterizada principalmente por la broncoconstricción inmediata (Christianson y Alam, 2013; Holgate y Polosa, 2008; Walsh, 2013); y la LAR, inducida desde el inicio del broncoespasmo y mantenida durante horas por la inflamación y la hiperreactividad bronquial (Christianson y Alam, 2013; Naik y Wala, 2013).

Es conocido que el MLVA es pieza clave durante el broncoespasmo, al contracturarse por la acción de diversos factores broncoconstrictores; sin embargo, esta no es la única participación del MLVA, ya que también libera varios factores (IL-1 β , IL-5, IL-6, IL-17, IFN β y TGF β) que contribuyen a la inflamación de las vías respiratorias (Matsubara *et al.*, 2006; Panettieri, Jr., 2004; Seow *et al.*, 1998; Tliba y Panettieri, Jr., 2009). En este contexto, es evidente que los andrógenos previenen la broncoconstricción en la EAR, como consecuencia de su efecto broncorelajante; sin embargo, la prevención de la LAR, observada en los animales tratados con los andrógenos, indica que los andrógenos también están atenuando los procesos de

hiperreactividad e inflamación, un hecho bien conocido dado por los efectos antiinflamatorios de los andrógenos por vía genómica. Específicamente, la DHEA inhibe la expresión del TNF α (Kimura *et al.*, 1998) y de la IgE, una inmunoglobulina asociada al desarrollo del asma alérgica (Sudo *et al.*, 2001); la TES también disminuye los niveles de la IgE (Yamatomo *et al.*, 2001) y la expresión de varias citocinas proinflamatorias (IL-1, IL-6, IL- β y TNF α); además, incrementa la expresión de la IL-10 antiinflamatoria (Corrales *et al.*, 2006; Malkin *et al.*, 2004). Se ha reportado que 5 α -DHT también modula los procesos inflamatorios, al disminuir la producción de la IL-4 (Araneo *et al.*, 1991). Por lo tanto, estos efectos antiinflamatorios genómicos de los andrógenos podrían explicar la prevención de la LAR, sumándose a su acción no genómica broncorelajante, proporcionando una acción protectora sobre las vías aéreas, por la prevención del broncoespasmo.

El hecho de que los andrógenos presenten estos dos efectos los pone en marcada ventaja con respecto a los agonistas β -adrenérgicos, a pesar de que son broncorelajantes más potentes, con una acción de corta duración, que de forma terapéutica alivia la EAR en el broncoespasmo; sin embargo, se debe mencionar que estos agentes, como salbutamol, poseen efectos secundarios (Giubergia, 2009; Huclova *et al.*, 2003), como la taquicardia y la resistencia del MLVA a la relajación por su acción; por lo que el uso prolongado de agonistas β_2 adrenérgicos aún continua siendo debatido (Arboe y Ulrik, 2013; Hizawa, 2009) y hace necesario nuevas alternativas terapéuticas. Además, el salbutamol carece de efectos sobre la LAR, por lo que su uso, así como el de otros agonistas β_2 adrenérgicos, generalmente se complementa con corticoesteroides, por su valiosa acción antiinflamatoria (Barnes y Adcock, 2003; Edmonds *et al.*, 2012; Szeffler y Leung, 1997; Cates *et al.*, 2013). Por lo anterior, aunque los andrógenos mostraron menor

potencia que el salbutamol, es importante resaltar nuevamente que sus acciones broncorelajantes se integran con sus propiedades antiinflamatorias para proteger de los ataques asmáticos.

7.2. Mecanismo de la acción broncodilatadora de los andrógenos

En esta Tesis se describe, por primera vez, la propiedad broncodilatadora de DHEA, mediada por una acción no genómica, lo cual fue sustentado por el hecho de que su efecto broncodilatador no fue modificado por el uso de bloqueadores de la transcripción (actinomicina D) y de la síntesis de proteínas (cicloheximida). Ha quedado demostrado que el efecto broncodilatador de DHEA es ejercido por este esteroide y no provocado por sus productos *i.e.*, después de su biotransformación hacia estrógenos o TES, como ha sido propuesto para numerosos efectos causados por DHEA; esto está apoyado por nuestra evidencia experimental de que la inactivación de la enzima 3 β -HSD, encargada de la biotransformación de la DHEA, no alteró su efecto broncodilatador (previamente reportado en Espinoza *et al.*, 2013).

En las pruebas *in vitro*, la acción broncodilatadora inducida por los cuatro andrógenos, se caracterizó por ser muy rápida, observándose dentro de los primeros 2 minutos, fue de corta duración (el efecto máximo se evaluó a los 15 min) y reversible, ya que al retirarse el andrógeno del tejido, en un siguiente estímulo se observó la recuperación total de la amplitud de la contracción; estas características indican que el efecto broncorelajante provocado por los andrógenos es por una vía no genómica. Estas observaciones están en acuerdo con los estudios previos que han caracterizado al efecto broncodilatador de andrógenos como una acción no genómica, dado por las evidencias que muestran que el efecto broncodilatador de la TES fue el mismo: (i) con o sin tratamiento de flutamida (un antagonista del RA) en

la tráquea de conejo (Kouloumenta *et al.*, 2006) y de bovino (Bordallo *et al.*, 2008); (ii) con o sin tratamiento de actinomicina (inhibidor de la transcripción) en la tráquea de conejo (Kouloumenta *et al.*, 2006) y; (iii) con TES conjugada a la albumina de suero bovino, TES-BSA, que impide la entrada de la TES al citoplasma celular y, por consecuencia se impide su interacción con el RA (Kouloumenta *et al.*, 2006); estas pruebas irrevocables certifican que el efecto broncorelajante de la TES es por mecanismos no genómicos, independiente del RA. Además, la relajación provocada por 5 α -DHT se categorizó como no genómica en el tejido traqueal de bovino, dado que la flutamida no modificó su acción broncorelajante (Bordallo *et al.*, 2008). Respecto a 5 β -DHT, es conocido que este metabolito de la TES, no tiene afinidad por el RA (Fagan *et al.*, 2003) y, por tanto, sus efectos son considerados como no genómicos.

Las evidencias encontradas en el presente estudio, sobre la acción no genómica de las hormonas sexuales masculinas para relajar el MLVA, coinciden con lo reportado por Perusquía *et al.* (1997); demostrando que también las hormonas esteroides sexuales femeninas, la progesterona y sus metabolitos 5-reducidos, previenen la contracción provocada por CCh o histamina mediante un mecanismo de tipo no genómico, proponiendo un bloqueo de la entrada de Ca²⁺ extracelular para explicar su efecto relajante (Perusquía *et al.*, 1997), pero su efecto fue menos potente para broncorelajar que los andrógenos estudiados. Posteriormente, se reportó la capacidad broncodilatadora del estrógeno más abundante en sangre, el estradiol. El efecto broncorelajante del estradiol fue caracterizado como no genómico, a través de diferentes rutas (Revisado por Townsend *et al.*, 2012b): (i) mediante los ER situados en la membrana, induce la síntesis NO; (Dimitropoulou *et al.*, 2005; Townsend *et al.*, 2012a) y del GMPc (Dimitropoulou *et al.*, 2005; Pang *et*

al., 2002) y (ii) por su acción directa sobre los K_{Ca} (Dimitropoulou *et al.*, 2005) y de los CCOV (Townsend *et al.*, 2010); notoriamente, la potencia broncorelajante del estradiol fue más potente que la inducida por los andrógenos estudiados.

7.2.1. La acción broncorelajante de los andrógenos es independiente del epitelio bronquial, del NO, de los β_2 adrenoreceptores y de los canales de K^+

Por otro lado, el efecto broncorelajante de los andrógenos no fue disminuido por la eliminación mecánica del epitelio de la vía aérea; por el contrario, el efecto broncodilatador de TES, 5 α -DHT y 5 β -DHT fue aumentado con la ausencia de epitelio, lo que podría indicar que esta capa epitelial está atenuando dicha acción relajante. El epitelio bronquial es una importante capa de células que recubren el lumen de las vías aéreas; hasta hace unas décadas, se había considerado que este epitelio era una barrera física que regulaba la comunicación entre las partículas exógenas y el medio interno de las vías aéreas, siendo también una barrera para la acción de diversos fármacos (Folkerts y Nijkamp, 1998). Actualmente, se ha establecido que el epitelio bronquial posee actividad paracrina y autocrina fundamental para la regulación, tanto de procesos inflamatorios (Coraux *et al.*, 2008), como del tono del MLVA (Revidado por Gras *et al.*, 2013). Varias evidencias han señalado que el epitelio de las vías aéreas contribuye a la regulación del MLVA al liberar: (i) broncoconstrictores, como los leucotrienos, la endotelina y los prostanoïdes y (ii) broncodilatadores, entre los más importantes están el NO y la PGE₂ (Redington, 2006; Ricciardolo, 2003; Ricciardolo *et al.*, 2004). Así, en nuestro diseño experimental, la eliminación mecánica del epitelio descartó la influencia de todas las sustancias endógenas producidas por las células epiteliales y permitió

determinar que la potente acción de los andrógenos es directamente sobre las células del MLVA.

Colateralmente, la presencia de L-NAME tampoco modificó la acción relajante de los andrógenos probados, descartando la participación del NO en la relajación inducida por los andrógenos sobre el MLVA. Cabe señalar que en las vías aéreas el NO es un importante broncorelajante, producido por varios tipos celulares; además del epitelio, se sintetiza y libera en el MLVA, en los mastocitos, neutrófilos, macrófagos, células endoteliales y terminaciones nerviosas de las vías aéreas (Barnes, 1993; Ricciardolo, 2003). Sin embargo, con base en los resultados presentados, los andrógenos actúan de manera independiente del NO.

Nuestros resultados concuerdan con el estudio de Bordallo *et al.*, (2008), ellos reportaron que la broncodilatación por TES, 5 α -DHT y 5 β -DHT no fue modificada en preparaciones traqueales de bovino libres de epitelio. De forma contrastante, en el trabajo de Kouloumenta *et al.*, (2006) reportaron que el efecto relajante de TES fue disminuido, pero no abolido, por la eliminación del epitelio traqueal y por el tratamiento con L-NAME; por tanto, en este trabajo se concluyó que la TES provoca relajación del MLVA por mecanismos dependientes del NO y del epitelio, aunque cabe la posibilidad de la capa muscular haya sido dañada en el procedimiento para retirar el epitelio o por una particularidad de la especie usada (conejo).

Es importante señalar que, las diferencias sobre la importancia del epitelio podrían estar originadas por los distintos protocolos experimentales empleados en cada estudio, que van desde la especie seleccionada (conejo, cobayo o bovino), el agente contráctil usado (KCl, ACh o CCh), las preparaciones traqueales (anillos o tiras de MLVA), las concentraciones de los andrógenos probadas y, muy relevante,

la forma de remover el epitelio en sus preparaciones, ya que en los trabajos anteriores no existe ninguna prueba para garantizar el retiro del epitelio. En nuestro estudio se tuvo riguroso cuidado para obtener las preparaciones con y sin epitelio y, además, se avaló con una prueba farmacológica.

Al descartar la participación la función de las células epiteliales de la vía aérea en el efecto broncorelajante de los andrógenos, indagamos mecanismos directamente en las células de MLVA, a través de los cuales se produce broncorelajación. Así, la vía de señalización activada por los receptores β_2 adrenérgicos, acoplados a proteínas G_s , es bien conocida en las células del MLVA, ya que a través de ella se induce un importante efecto broncorelajante por el incremento del AMPc (Shore y Moore, 2003). Sin embargo, los resultados presentados señalan que la DHEA, TES, 5α -DHT y 5β -DHT, inducen broncodilatación sin intervención de los receptores β_2 adrenérgicos, ya que propranolol no alteró su efecto broncodilatador. Asimismo, utilizando preparaciones de MLVA de bovino, Bordallo *et al.* (2008) también mostraron que la relajación inducida por 5α -DHT no fue alterada por propranolol; ellos sólo realizaron pruebas con este andrógeno y, también descartaron que las poliaminas se encuentren involucradas en su mecanismo de la acción broncodilatadora.

En las células de MLVA los canales de K^+ son otro elemento clave, ya que a través de estos canales se produce hiperpolarización del MLVA y, por consecuencia, la broncorelajación (Ghatta *et al.*, 2006; Perez-Zoghbi *et al.*, 2009). Nuestros resultados indicaron que el bloqueador de dichos canales, TEA, no modificó el efecto relajante inducido por los andrógenos. Este bloqueador fue usado a concentraciones bajas ≤ 1 mM como un inhibidor selectivo de los canales de K_v y concentraciones

altas, de 10-30 mM, para bloquear selectivamente los canales de K_{Ca} (Bradding y Wulff, 2009; Ghatta *et al.*, 2006) y, en ningún caso, la TEA alteró la acción relajante inducida por los andrógenos, lo cual descarta la posibilidad de que en la broncorelajación de los andrógenos participen los canales de K^+ .

7.2.2. Los andrógenos bloquean los CCOV

Con la intención de indagar sobre el mecanismo de la broncorelajación provocada por los andrógenos, en las pruebas *in vitro* se utilizaron agentes que inducen la contracción del MLVA por distintos mecanismos. El KCl despolariza la membrana plasmática e induce el influjo de Ca^{2+} extracelular, mediante la apertura de los CCOV (Guibert *et al.*, 2008; Hirota *et al.*, 2007a; Jude *et al.*, 2008; Ratz *et al.*, 2005); el CCh es una catecolamina sintética que induce la contracción a través de un receptor muscarínico (M_3) acoplado a proteínas $G_{q/11}$ e induce la síntesis de IP_3 y DAG; el IP_3 es el responsable de inducir la salida de Ca^{2+} del retículo sarcoplásmico y, de esta forma, incrementa la $[Ca^{2+}]_i$ (Bourreau *et al.*, 1991; Janssen *et al.*, 2001); de forma secundaria, el incremento de Ca^{2+} provoca la apertura de canales iónicos membranales a Ca^{2+} como: los CCOV, los canales catiónicos no selectivos (NSCC), los canales de Ca^{2+} operados por receptor (ROCC) o los canales de Ca^{2+} operados por reservas (SOCC) (Hirota y Janssen, 2007; Hirota *et al.*, 2007b; Turner *et al.*, 1980). La contracción por OVA es causada por la liberación de leucotrienos, histamina, ACh, tromboxano A_2 , el factor de necrosis tumoral α , serotonina, prostaglandinas (PGD_2); que de forma conjunta movilizan segundos mensajeros (IP_3 , DAG; AMPc) y modulan la apertura de canales iónicos (CCOV, NSCC ROCC o SOCC) (Bjorck y Dahlen, 1993; McFadzean y Gibson, 2002; Wong *et al.*, 1999).

Notablemente, todos los andrógenos tuvieron la habilidad de relajar más del 100% de las distintas contracciones, pero cada contracción tuvo una sensibilidad específica a cada andrógeno, proporcionando pistas del mecanismo y sitio de la acción relajante de los andrógenos. Las observaciones señalan que la contracción por KCl fue más sensible a 5β -DHT, la de OVA lo fue para la DHEA y la contracción por CCh fue más sensible a TES y 5α -DHT. Este resultado indica que, cada andrógeno posee múltiples vías de acción, que le proporcionan la capacidad de broncorelajar el MLVA. Aunque, de forma evidente, cada andrógeno tiene un mecanismo preferencial entre las diferentes vías de acción colaterales que pueden estar involucradas para provocar broncodilatación. La DHEA antagonizó la contracción provocada por Ca^{2+} en anillos traqueales despolarizados, lo cual es una evidencia de que la DHEA es un bloqueador de los CCOV; esto también se corroboró por la disminución de efecto por Bay K 8644 (activador de los CCOV) y, de forma más contundente, cuando DHEA inhibió completamente (>100% de inhibición) la contracción provocada con Bay K 8644. Por lo anterior, posiblemente el bloqueo de los CCOV es un mecanismo preferencial, pero no el único, a través del cual actúa la DHEA para broncorelajar.

Con base en los datos obtenidos al medir el incremento de Ca^{2+} interno provocado por KCl en los miocitos traqueales aislados, se determinó que los tres metabolitos de la DHEA: TES, 5α -DHT y 5β -DHT, también actúan como bloqueadores de los CCOV en las células de MLVA aisladas. Marcadamente, 5β -DHT fue el andrógeno más potente para inhibir el incremento de la $[Ca^{2+}]_i$, seguido de la TES; mientras que 5α -DHT tuvo un efecto discreto sobre la $[Ca^{2+}]_i$. Este importante hallazgo, explica la mayor sensibilidad de la contracción por KCl a la relajación inducida por 5β -DHT y dilucida, parcialmente, la capacidad de este

andrógeno para relajar las contracciones de OVA o CCh. Asimismo, la TES, que también mostró una importante inhibición de la $[Ca^{2+}]_i$ por el bloqueo de los CCOV, aunque su destacada broncodilatación sobre las contracción de OVA y CCh sugiere que su mecanismo también involucra procesos de movilización de Ca^{2+} interno y otros canales iónicos, como los NSCC ROCC o SOCC. Estudios preliminares de nuestro grupo de trabajo indican que la TES actúa antagonizando los SOCC y, por tanto, modulando las reservas de Ca^{2+} intracelular.

Categóricamente, el metabolito 5 α -DHT fue el andrógeno con menor habilidad para disminuir la $[Ca^{2+}]_i$, esto podría explicar su menor eficacia y potencia broncodilatadora en tejido aislado y en los animales asmáticos; además, este hallazgo indica que 5 α -DHT provoca tenue broncorelajación por otros mecanismos.

Es claro que los andrógenos provocan su efecto broncorelajante por múltiples vías, siendo el bloqueo de los CCOV un mecanismo común a todos; así la examinación de otras vías de acción relajante por los andrógenos sería interesante y parte de otro estudio.

Por otro lado, aunque el efecto de los andrógenos fue observado a concentraciones farmacológicas (rango micromolar), esto obedece a las características de dichos experimentos *in vitro*, ya que los andrógenos (esteroides derivados del colesterol) fueron adicionados a la solución Ringer, de naturaleza hidrofílica, que contenía los tejidos traqueales; además, el uso de altas concentraciones es aceptado en este tipo de pruebas. Cabe resaltar que en las células aisladas del MLVA los andrógenos inhibieron el incremento del Ca^{2+} a concentraciones nanomolares (1-320 nM), que incluyen el intervalo de concentraciones fisiológicas de TES en hombres (100 pM-100 nM); además, en las

pruebas *in vivo*, los andrógenos mostraron su acción preventiva del broncoespasmo en el rango de 35-350 $\mu\text{mol kg}^{-1}$, lo cual es equivalente a 0.01-0.1 mg kg^{-1} ; estas concentraciones son menores a las de DHEA, el andrógeno más abundante secretado en el orden de 0.25-0.5 mg kg^{-1} en los humanos.

7.3. Relación entre la estructura química y la potencia broncodilatadora de los andrógenos

En nuestro estudio, se determinó que 5 β -DHT fue el andrógeno con mayor potencia broncorelajante en las preparaciones contracturadas con KCl; además, en las células aisladas, este andrógeno fue el más potente para modular la $[\text{Ca}^{2+}]_i$; mientras que DHEA, TES y 5 α -DHT tuvieron mayor habilidad para relajar las contracciones por OVA y CCh (que involucran la movilización de Ca^{2+} interno). Asimismo, 5 β -DHT fue el andrógeno más efectivo para prevenir *in vivo* el broncoespasmo, en comparación con sus precursores y con su isómero 5 α -DHT, que mostró la menor potencia para prevenir el broncoespasmo.

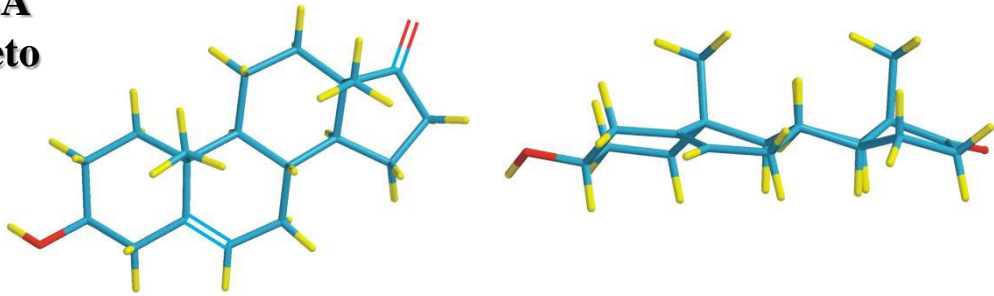
En apariencia, la diferente potencia broncorelajante, observada entre los andrógenos en el presente trabajo, se encuentra en controversia con lo presentado por el grupo de Bordallo *et al.*, (2008), quienes indicaron que sobre la contracción inducida por KCl (80 mM) la TES 5 α -DHT y 5 β -DHT presentaban el mismo % de relajación (>90%) a la única concentración probada (100 μM) (Bordallo, *et al.*, 2008); obviamente, la discrepancia con el trabajo citado puede ser debida a que no se realizaron las curvas concentración respuesta de los tres andrógenos sobre la contracción de KCl, probando los andrógenos a una sola concentración, lo cual no permite determinar su eficacia y potencia relajante.

La marcada potencia relajante de 5 β -DHT coincide con diversos estudios que señalan a 5 β -DHT como un andrógeno con alta potencia relajante en otros tipos de músculo liso, como el vascular, en preparaciones aisladas de animales (Montaño *et al.*, 2008; Perusquía *et al.*, 2012) y humanos (Perusquía *et al.*, 2007) y, en el tejido uterino humano (Perusquía *et al.*, 2005). Mientras 5 α -DHT (isómero de 5 β -DHT) fue el que presentó menor eficacia sobre la contracción de KCl y fue un andrógeno con reducida acción sobre los CCOV; lo cual también ha sido observado en otros tejidos (Perusquía y Stallone, 2010; Perusquía *et al.*, 2012). Esta diferencia entre la potencia de cada andrógeno coincide con las particularidades estructurales de cada molécula (Fig. 17).

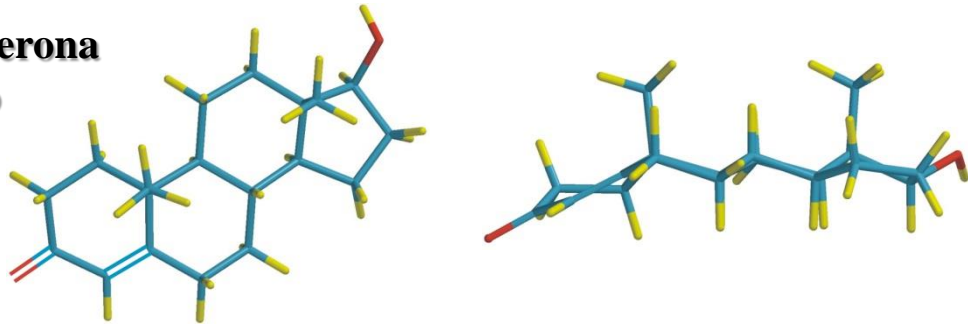
Es ampliamente reconocido que existe una correlación directa entre la estructura química de cada hormona esteroide y su función biológica, en este contexto, los resultados de esta Tesis y de diversos estudios realizados en nuestro grupo de investigación, han señalado que 5 α -DHT posee una eficacia pobre para inducir relajación en varios músculos lisos, en comparación con otros andrógenos, posiblemente como resultado de la configuración *α /trans* de su hidrógeno en el C-5. En contraparte, su isómero 5 β -DHT tiene mayor potencia relajante que sus precursores, DHEA (Δ 5 ceto) y TES (Δ 4 ceto), este hecho podría ser atribuido a la configuración *β /cis* de este andrógeno; esta configuración es especial por que provoca un marcado giro de 90° del anillo A, con respecto a los otros anillos de carbono de la molécula (Fig. 19). De forma que, así como la configuración de 5 β -DHT es motivo de que este andrógeno carezca de afinidad al RA (Fagan *et al.*, 2003), también es posible que le confiera mayor efectividad broncorelajante, en comparación con otros esteroides sexuales y presente mayor interacción con los CCOV para bloquear la entrada del Ca²⁺ intracelular.

Es claro que la estructura química única de cada andrógeno determina su efectividad relajante, de manera particular, para modular diferentes mecanismos celulares que están relacionados con los procesos de contracción del MLVA característicos para cada agente contráctil (OVA, CCh o KCl).

DHEA
 $\Delta 5$ ceto



Testosterona
 $\Delta 4$ ceto



5 α -DHT
 α /trans



5 β -DHT
 β /cis

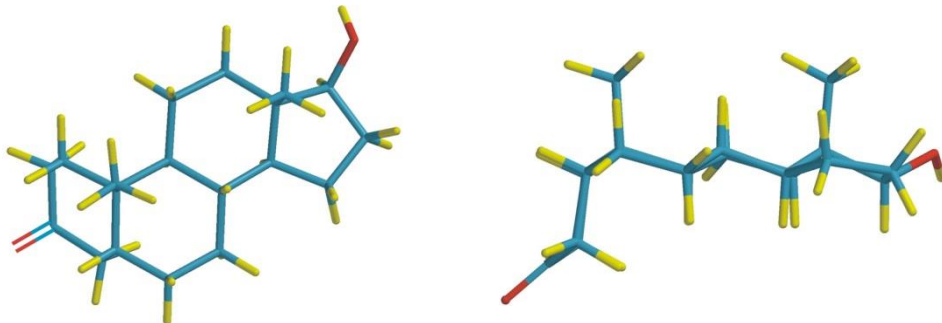


Figura 19. Comparación de la estructura química de los andrógenos, vista frontal (panel izquierdo) y del arreglo espacial de las moléculas, vista lateral (panel derecho). DHEA (dehidroepiandrosterona); TES (testosterona); 5 α - y 5 β -DHT (dihidrotestosterona).

7.4. Importancia fisiológica de la acción broncodilatadora de los andrógenos

Numerosas evidencias epidemiológicas han señalado a los andrógenos como las hormonas que protegen a los hombres del asma, ya que el incremento natural de estos esteroides, durante la edad reproductiva, se encuentra relacionado con la disminución de la gravedad de la enfermedad y de su incidencia (Bonner, 1984b; Carey *et al.*, 2007; Fagan *et al.*, 2003; Kjellman y Gustafsson, 2000; Ninan y Russell, 1992; Osman, 2003; Sears, 1997a; Tam *et al.*, 2011; Zannolli y Morgese, 1997). En línea con esto, se ha reportado que en los hombres asmáticos se encuentran drásticamente disminuidos los niveles de los andrógenos más abundantes en sangre: la DHEA (Dunn *et al.*, 1984b; Feher *et al.*, 1983; Karalus *et al.*, 1985; Weinstein *et al.*, 1996) y la TES (Corrales *et al.*, 2006; Malkin *et al.*, 2004; Mileva y Maleeva, 1988), siendo la restitución de sus niveles fisiológicos normales (mediante terapia hormonal sustitutiva) un factor que induce mejorías en los síntomas de los hombres asmáticos (Choi *et al.*, 2008; Cutolo, 1997; Dalal *et al.*, 1997; Eusebio *et al.*, 2011; Olsen y Kovacs, 1995). Todas estas evidencias epidemiológicas, observacionales y clínicas sugieren fuertemente que la disminución de los niveles fisiológicos de los andrógenos (en un rango nanomolar; 13.9-31.2 nmol/L para la TES) podrían tener un papel relevante en la patogénesis del asma (Revisado por Canguven y Albayrak, 2011).

Es conocido que los andrógenos tienen efectos antiinflamatorios importantes. Se ha sugerido que las acciones antiinflamatorias (Kasperska-Zajac, 2010; Yu *et al.*, 1999; Yu *et al.*, 2002b) y antialérgicas (Kimura *et al.*, 1998) de DHEA participan en la prevención del desarrollo del asma (Sudo *et al.*, 2001). Algunos reportes señalan que la DHEA suprime la hiperreactividad a metacolina en un modelo experimental de

asma (Cui *et al.*, 2008) y en pacientes humanos las nebulizaciones con DHEAS mejora los síntomas (Wenzel *et al.*, 2010).

Asimismo, es posible que la eficacia antiinflamatoria de la TES (Cutolo, 1997; Dalal *et al.*, 1997; Olsen y Kovacs, 1995) y de 5 α -DHT (Araneo *et al.*, 1991) modulen los procesos inflamatorios y el desarrollo del asma.

Recientemente, Canguven y Albayrak (Canguven y Albayrak, 2011) hipotetizaron que niveles fisiológicos bajos de la TES podrían alterar significativamente los procesos inmunes y con ello la respuesta del MLVA, a través de mecanismos genómicos y no genómicos, incrementando el riesgo a desarrollar asma. Dos reportes previos (Bordallo *et al.*, 2008; Kouloumenta *et al.*, 2006) y los datos presentados en este estudio han demostrado que además de la TES, su precursor y sus dihidrometabolitos podrían estar implicados en la patogénesis del asma, por la capacidad que poseen estas hormonas masculinas para modular el tono del MLVA, sumado a sus efectos genómicos, para regular los procesos inflamatorios.

Cabe destacar que, por primera vez se muestra que el efecto broncorelajante de los andrógenos previene el síntoma más evidente y grave del asma: la broncoconstricción. De tal forma que, la habilidad de los andrógenos para modular la reactividad del MLVA, de forma directa y no genómica, también podría explicar su importancia fisiológica sobre la vía aérea, sustentando los resultados de estudios epidemiológicos, los cuales señalan a los andrógenos como protectores de las vías aéreas (Canguven y Albayrak, 2011; Zannolli y Morgese, 1997).

Por otro lado, la destacada acción broncodilatadora de 5 β -DHT, aunado al hecho de que no tiene efectos masculinizantes ni feminizantes, por carecer de afinidad al receptor de andrógenos y ser un compuesto no aromatizable (Fagan *et*

al., 2003), hace de 5 β -DHT un buen candidato con importancia fisiológica y terapéutica en el asma, aunque se admite que son necesarios más estudios al respecto.

8. CONCLUSIONES

1. El precursor de los andrógenos, DHEA induce un efecto broncorelajante por una vía no genómica, antes de su biotransformación a otros andrógenos.
2. Los andrógenos, DHEA, TES, 5 α -DHT y 5 β -DHT, presentan la misma magnitud para broncorelajar *in vitro* preparaciones traqueales de cobayos sanos y asmáticos (no sensibilizados y sensibilizados), señalando que el estado patológico de la vía aérea no es un requisito para que los andrógenos produzcan relajación.
3. La acción broncorelajante de los andrógenos, previene y retarda la fase aguda del broncoespasmo y además, abole la fase tardía en el animal completo; lo cual indica que estos andrógenos son importantes moduladores de la reactividad de las vías respiratorias y están implicados en la patogénesis de asma.
4. La sensibilidad de las contracciones utilizadas (OVA, CCh y KCl) a la acción broncorelajante ejercida por los andrógenos fue diferente, y obedece a la habilidad de cada andrógeno para modular los mecanismos específicos involucrados en cada contracción.
5. La broncorelajación provocada por los andrógenos es un efecto de tipo no genómico, independiente del epitelio traqueal, del NO, de los receptores β_2 adrenérgicos y de los canales de K⁺.

6. Los andrógenos estudiados: DHEA, TES, 5 α -DHT y 5 β -DHT inhiben la $[Ca^{2+}]_i$ por un bloqueo de los CCOV; siendo este un mecanismo de acción preferencial para 5 β -DHT, DHEA y TES.
7. Cada andrógeno mostró una potencia específica sobre las diferentes contracciones utilizadas; 5 β -DHT tuvo mayor potencia relajante sobre la despolarización por KCl indicando que la configuración β/cis le confiere mayor habilidad para bloquear los CCOV; las configuraciones $\Delta 5$ ceto y $\Delta 4$ ceto de la DHEA y la TES, respectivamente, optimizaron la acción de estos andrógenos sobre la contracción de OVA y/o CCh, donde además de los CCOV, se involucra la movilización de Ca^{2+} intracelular.

9. REFERENCIAS

1. Al-Muhsen, S, Johnson, JR y Hamid, Q. (2011). Remodeling in asthma. *J Allergy Clin Immunol*, **128**, 451-462.
2. Almqvist, C, Worm, M y Leynaert, B. (2008). Impact of gender on asthma in childhood and adolescence: a GA2LEN review. *Allergy*, **63**, 47-57.
3. Anto, JM. (2012). Recent advances in the epidemiologic investigation of risk factors for asthma: a review of the 2011 literature. *Curr Allergy Asthma Rep*, **12**, 192-200.
4. Araneo, BA, Dowell, T, Diegel, M y Daynes, RA. (1991). Dihydrotestosterone exerts a depressive influence on the production of interleukin-4 (IL-4), IL-5, and gamma-interferon, but not IL-2 by activated murine T cells. *Blood*, **78**, 688-699.
5. Arboe, B y Ulrik, CS. (2013). Beta-blockers: friend or foe in asthma? *Int J Gen Med*, **6**, 549-555.
6. Barnes, PJ. (1993). Nitric oxide and airways. *Eur Respir J*, **6**, 163-165.
7. Barnes, PJ y Adcock, IM. (2003). How do corticosteroids work in asthma? *Ann Intern Med*, **139**, 359-370.

8. Barr, RG y Camargo, CA, Jr. (2004). Hormone replacement therapy and obstructive airway diseases. *Treat Respir Med*, **3**, 1-7.
9. Barrett-Connor, E, Von, MD, Laughlin, GA y Kripke, A. (1999). Endogenous levels of dehydroepiandrosterone sulfate, but not other sex hormones, are associated with depressed mood in older women: the Rancho Bernardo Study. *J Am Geriatr Soc*, **47**, 685-691.
10. Beato, M y Klug, J. (2000). Steroid hormone receptors: an update. *Hum Reprod Update*, **6**, 225-236.
11. Becklake, MR y Kauffmann, F. (1999). Gender differences in airway behaviour over the human life span. *Thorax*, **54**, 1119-1138.
12. Beckmann, CA. (2008). Peak flow values by gestation in women with asthma. *Clin Nurs Res*, **17**, 174-181.
13. Belanger, A, Candas, B, Dupont, A, Cusan, L, Diamond, P, Gomez, JL y Labrie, F. (1994). Changes in serum concentrations of conjugated and unconjugated steroids in 40- to 80-year-old men. *J Clin Endocrinol Metab*, **79**, 1086-1090.
14. Beynon, HL, Garbett, ND y Barnes, PJ. (1988). Severe premenstrual exacerbations of asthma: effect of intramuscular progesterone. *Lancet*, **2**, 370-372.

15. Bjorck, T y Dahlen, SE. (1993). Leukotrienes and histamine mediate IgE-dependent contractions of human bronchi: pharmacological evidence obtained with tissues from asthmatic and non-asthmatic subjects. *Pulm Pharmacol*, **6**, 87-96.
16. Bonner, JR. (1984a). The epidemiology and natural history of asthma. *Clin Chest Med*, **5**, 557-565.
17. Bonner, JR. (1984b). The epidemiology and natural history of asthma. *Clin Chest Med*, **5**, 557-565.
18. Boonyaratanakornkit, V y Edwards, DP. (2007). Receptor mechanisms mediating non-genomic actions of sex steroids. *Semin Reprod Med*, **25**, 139-153.
19. Bordallo, J, de Boto, MJ, Meana, C, Velasco, L, Bordallo, C, Suarez, L, Cantabrana, B y Sanchez, M. (2008). Modulatory role of endogenous androgens on airway smooth muscle tone in isolated guinea-pig and bovine trachea; involvement of beta2-adrenoceptors, the polyamine system and external calcium. *Eur J Pharmacol*, **601**, 154-162.
20. Bouman, A, Heineman, MJ y Faas, MM. (2005). Sex hormones and the immune response in humans. *Hum Reprod Update*, **11**, 411-423.

21. Bourreau, JP, Abela, AP, Kwan, CY y Daniel, EE. (1991). Acetylcholine Ca²⁺ stores refilling directly involves a dihydropyridine-sensitive channel in dog trachea. *Am J Physiol*, **261**, C497-C505.
22. Bousquet, J. (2000). Global initiative for asthma (GINA) and its objectives. *Clin Exp Allergy*, **30 Suppl 1**, 2-5.
23. Bradding, P y Wulff, H. (2009). The K⁺ channels K(Ca)_{3.1} and K(v)_{1.3} as novel targets for asthma therapy. *Br J Pharmacol*, **157**, 1330-1339.
24. Bramley, AM, Samhoun, MN y Piper, PJ. (1990). The role of the epithelium in modulating the responses of guinea-pig trachea induced by bradykinin in vitro. *Br J Pharmacol*, **99**, 762-766.
25. Canguven, O y Albayrak, S. (2011). Do low testosterone levels contribute to the pathogenesis of asthma? *Med Hypotheses*, **76**, 585-588.
26. Canning, BJ y Chou, Y. (2008). Using guinea pigs in studies relevant to asthma and COPD. *Pulm Pharmacol Ther*, **21**, 702-720.
27. Carey, MA, Card, JW, Voltz, JW, Arbes, SJ, Jr., Germolec, DR, Korach, KS y Zeldin, DC. (2007). It's all about sex: gender, lung development and lung disease. *Trends Endocrinol Metab*, **18**, 308-313.

28. Cates, CJ, Jaeschke, R, Schmidt, S y Ferrer, M. (2013). Regular treatment with salmeterol and inhaled steroids for chronic asthma: serious adverse events. *Cochrane Database Syst Rev*, **3**, CD006922.
29. Chen, W, Mempel, M, Schober, W, Behrendt, H y Ring, J. (2008). Gender difference, sex hormones, and immediate type hypersensitivity reactions. *Allergy*, **63**, 1418-1427.
30. Choi, IS. (2011). Gender-specific asthma treatment. *Allergy Asthma Immunol Res*, **3**, 74-80.
31. Choi, IS, Cui, Y, Koh, YA, Lee, HC, Cho, YB y Won, YH. (2008). Effects of dehydroepiandrosterone on Th2 cytokine production in peripheral blood mononuclear cells from asthmatics. *Korean J Intern Med*, **23**, 176-181.
32. Christianson, CA y Alam, R. (2013). Mechanisms of sustained signalling in asthma. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, **13**, 100-105.
33. Cookson, W. (2004). The immunogenetics of asthma and eczema: a new focus on the epithelium. *Nat Rev Immunol*, **4**, 978-988.
34. Coraux, C, Roux, J, Jolly, T y Birembaut, P. (2008). Epithelial cell-extracellular matrix interactions and stem cells in airway epithelial regeneration. *Proc Am Thorac Soc*, **5**, 689-694.

35. Corrales, JJ, Almeida, M, Burgo, R, Mories, MT, Miralles, JM y Orfao, A. (2006). Androgen-replacement therapy depresses the ex vivo production of inflammatory cytokines by circulating antigen-presenting cells in aging type-2 diabetic men with partial androgen deficiency. *J Endocrinol*, **189**, 595-604.
36. Corteling, R y Trifilieff, A. (2004). Gender comparison in a murine model of allergen-driven airway inflammation and the response to budesonide treatment. *BMC Pharmacol*, **4**, 4.
37. Cui, Y, Choi, IS, Koh, YA, Lin, XH, Cho, YB y Won, YH. (2008). Effects of combined BCG and DHEA treatment in preventing the development of asthma. *Immunol Invest*, **37**, 191-202.
38. Cutolo, M. (1997). Do sex hormones modulate the synovial macrophages in rheumatoid arthritis? *Ann Rheum Dis*, **56**, 281-284.
39. Dalal, M, Kim, S y Voskuhl, RR. (1997). Testosterone therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces a T helper 2 bias in the autoantigen-specific T lymphocyte response. *J Immunol*, **159**, 3-6.
40. Davies, DE. (2009). The role of the epithelium in airway remodeling in asthma. *Proc Am Thorac Soc*, **6**, 678-682.
41. De Marco R., Locatelli, F, Sunyer, J y Burney, P. (2000). Differences in incidence of reported asthma related to age in men and women. A

retrospective analysis of the data of the European Respiratory Health Survey.
Am J Respir Crit Care Med, **162**, 68-74.

42. de Oliveira, AP, Domingos, HV, Cavriani, G, Damazo, AS, Dos Santos Franco, AL, Oliani, SM, Oliveira-Filho, RM, Vargaftig, BB y de Lima, WT. (2007). Cellular recruitment and cytokine generation in a rat model of allergic lung inflammation are differentially modulated by progesterone and estradiol. *Am J Physiol Cell Physiol*, **293**, C1120-C1128.
43. Derimanov, GS y Oppenheimer, J. (1998). Exacerbation of premenstrual asthma caused by an oral contraceptive. *Ann Allergy Asthma Immunol*, **81**, 243-246.
44. Dimitropoulou, C, White, RE, Ownby, DR y Catravas, JD. (2005). Estrogen reduces carbachol-induced constriction of asthmatic airways by stimulating large-conductance voltage and calcium-dependent potassium channels. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **32**, 239-247.
45. Diver, MJ, Imtiaz, KE, Ahmad, AM, Vora, JP y Fraser, WD. (2003). Diurnal rhythms of serum total, free and bioavailable testosterone and of SHBG in middle-aged men compared with those in young men. *Clin Endocrinol (Oxf)*, **58**, 710-717.
46. Dombrowski, MP. (2006). Asthma and pregnancy. *Obstet Gynecol*, **108**, 667-681.

47. Dunn, PJ, Mahood, CB, Speed, JF y Jury, DR. (1984a). Dehydroepiandrosterone sulphate concentrations in asthmatic patients: pilot study. *N Z Med J*, **97**, 805-808.
48. Dunn, PJ, Mahood, CB, Speed, JF y Jury, DR. (1984b). Dehydroepiandrosterone sulphate concentrations in asthmatic patients: pilot study. *N Z Med J*, **97**, 805-808.
49. Duskova, M y Pospisilova, H. (2011). The role of non-aromatizable testosterone metabolite in metabolic pathways. *Physiol Res*, **60**, 253-261.
50. Edmonds, ML, Milan, SJ, Camargo, CA, Jr., Pollack, CV y Rowe, BH. (2012). Early use of inhaled corticosteroids in the emergency department treatment of acute asthma. *Cochrane Database Syst Rev*, **12**, CD002308.
51. Espinoza, J, Montaña, LM y Perusquía, M. (2013). Nongenomic bronchodilating action elicited by dehydroepiandrosterone (DHEA) in a guinea pig asthma model. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **138**, 174-182.
52. Eusebio, MO, Grzelewski, T, Pietruczuk, M, Lewandowska, B y Stelmach, I. (2011). The patents on glucocorticosteroids and selected new therapies for the management of asthma in children. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, **5**, 57-65.
53. Fagan, J, Galea, S, Ahern, J, Bonner, S y Vlahov, D. (2003). Relationship of self-reported asthma severity and urgent health care utilization to

psychological sequelae of the September 11, 2001 terrorist attacks on the World Trade Center among New York City area residents. *Psychosom Med*, **65**, 993-996.

54. Falkenstein, E, Tillmann, HC, Christ, M, Feuring, M y Wehling, M. (2000). Multiple actions of steroid hormones--a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev*, **52**, 513-556.
55. Farha, S, Asosingh, K, Laskowski, D, Hammel, J, Dweik, RA, Wiedemann, HP y Erzurum, SC. (2009). Effects of the menstrual cycle on lung function variables in women with asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, **180**, 304-310.
56. Feher, KG, Koo, E y Feher, T. (1983). Adrenocortical function in bronchial asthma. *Acta Med Hung*, **40**, 125-131.
57. Feldman, HA, Longcope, C, Derby, CA, Johannes, CB, Araujo, AB, Coviello, AD, Bremner, WJ y McKinlay, JB. (2002). Age trends in the level of serum testosterone and other hormones in middle-aged men: longitudinal results from the Massachusetts male aging study. *J Clin Endocrinol Metab*, **87**, 589-598.
58. Folkerts, G y Nijkamp, FP. (1998). Airway epithelium: more than just a barrier! *Trends Pharmacol Sci*, **19**, 334-341.

59. Ghatta, S, Nimmagadda, D, Xu, X y O'Rourke, ST. (2006). Large-conductance, calcium-activated potassium channels: structural and functional implications. *Pharmacol Ther*, **110**, 103-116.
60. Gillum, RF. (2005). Frequency of attendance at religious services and cigarette smoking in American women and men: the Third National Health and Nutrition Examination Survey. *Prev Med*, **41**, 607-613.
61. Girodet, PO, Ozier, A, Bara, I, Tunon de Lara, JM, Marthan, R y Berger, P. (2011). Airway remodeling in asthma: new mechanisms and potential for pharmacological intervention. *Pharmacol Ther*, **130**, 325-337.
62. Giubergia, V. (2009). [Long-acting beta2-agonist bronchodilators safety for asthma treatment]. *Arch Argent Pediatr*, **107**, 291-293.
63. Global Initiative for Asthma (GINA). (2012). Reporte Anual 2012. Disponible en: www.ginathama.org
64. Gras, D, Chanez, P, Vachier, I, Petit, A y Bourdin, A. (2013). Bronchial epithelium as a target for innovative treatments in asthma. *Pharmacol Ther*, **140**, 290-305.
65. Grindheim, G, Toska, K, Estensen, ME y Rosseland, LA. (2012). Changes in pulmonary function during pregnancy: a longitudinal cohort study. *BJOG*, **119**, 94-101.

66. Grynkiewicz, G, Poenie, M y Tsien, RY. (1985). A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, **260**, 3440-3450.
67. Guibert, C, Ducret, T y Savineau, JP. (2008). Voltage-independent calcium influx in smooth muscle. *Prog Biophys Mol Biol*, **98**, 10-23.
68. Haggerty, CL, Ness, RB, Kelsey, S y Waterer, GW. (2003). The impact of estrogen and progesterone on asthma. *Ann Allergy Asthma Immunol*, **90**, 284-291.
69. Hamelmann, E, Tateda, K, Oshiba, A y Gelfand, EW. (1999). Role of IgE in the development of allergic airway inflammation and airway hyperresponsiveness--a murine model. *Allergy*, **54**, 297-305.
70. Hirota, S, Helli, P y Janssen, LJ. (2007a). Ionic mechanisms and Ca²⁺ handling in airway smooth muscle. *Eur Respir J*, **30**, 114-133.
71. Hirota, S y Janssen, LJ. (2007). Store-refilling involves both L-type calcium channels and reverse-mode sodium-calcium exchange in airway smooth muscle. *Eur Respir J*, **30**, 269-278.
72. Hirota, S, Pertens, E y Janssen, LJ. (2007b). The reverse mode of the Na⁽⁺⁾/Ca⁽²⁺⁾ exchanger provides a source of Ca⁽²⁺⁾ for store refilling following agonist-induced Ca⁽²⁺⁾ mobilization. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **292**, L438-L447.

73. Hizawa, N. (2009). Beta-2 adrenergic receptor genetic polymorphisms and asthma. *J Clin Pharm Ther*, **34**, 631-643.
74. Holgate, ST y Polosa, R. (2008). Treatment strategies for allergy and asthma. *Nat Rev Immunol*, **8**, 218-230.
75. Huclova, J, Satinsky, D, Sklenarova, H y Karlicek, R. (2003). Determination of salbutamol using on-line solid-phase extraction and sequential injection analysis. Comparison of chemiluminescence and fluorescence detection. *Anal Bioanal Chem*, **376**, 448-454.
76. ISSAC. (1998). Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *Eur Respir J*, **12**, 315-335.
77. Jackson, DJ, Sykes, A, Mallia, P y Johnston, SL. (2011). Asthma exacerbations: origin, effect, and prevention. *J Allergy Clin Immunol*, **128**, 1165-1174.
78. Janssen, LJ, Wattie, J, Lu-Chao, H y Tazzeo, T. (2001). Muscarinic excitation-contraction coupling mechanisms in tracheal and bronchial smooth muscles. *J Appl Physiol (1985)*, **91**, 1142-1151.
79. Jarvis, D y Leynaert, B. (2008). The association of asthma, atopy and lung function with hormone replacement therapy and surgical cessation of

- menstruation in a population-based sample of English women. *Allergy*, **63**, 95-102.
80. Jenkins, HA, Cherniack, R, Szeffler, SJ, Covar, R, Gelfand, EW y Spahn, JD. (2003). A comparison of the clinical characteristics of children and adults with severe asthma. *Chest*, **124**, 1318-1324.
81. Jeon, YH, Yang, HJ y Pyun, BY. (2009). Lung function in Korean adolescent girls: in association with obesity and the menstrual cycle. *J Korean Med Sci*, **24**, 20-25.
82. Jez, JM y Penning, TM. (1998). Engineering steroid 5 beta-reductase activity into rat liver 3 alpha-hydroxysteroid dehydrogenase. *Biochemistry*, **37**, 9695-9703.
83. Jude, JA, Wylam, ME, Walseth, TF y Kannan, MS. (2008). Calcium signaling in airway smooth muscle. *Proc Am Thorac Soc*, **5**, 15-22.
84. Juniper, EF, Daniel, EE, Roberts, RS, Kline, PA, Hargreave, FE y Newhouse, MT. (1989). Improvement in airway responsiveness and asthma severity during pregnancy. A prospective study. *Am Rev Respir Dis*, **140**, 924-931.
85. Kaore, SN, Langade, DK, Yadav, VK, Sharma, P, Thawani, VR y Sharma, R. (2012). Novel actions of progesterone: what we know today and what will be the scenario in the future? *J Pharm Pharmacol*, **64**, 1040-1062.

86. Karalus, NC, Mahood, CB, Dunn, PJ y Speed, JF. (1985). Adrenal function in acute severe asthma. *N Z Med J*, **98**, 843-846.
87. Kasperska-Zajac, A. (2010). Asthma and dehydroepiandrosterone (DHEA): facts and hypotheses. *Inflammation*, **33**, 320-324.
88. Kimura, M, Tanaka, S, Yamada, Y, Kiuchi, Y, Yamakawa, T y Sekihara, H. (1998). Dehydroepiandrosterone decreases serum tumor necrosis factor-alpha and restores insulin sensitivity: independent effect from secondary weight reduction in genetically obese Zucker fatty rats. *Endocrinology*, **139**, 3249-3253.
89. Kjellman, B y Gustafsson, PM. (2000). Asthma from childhood to adulthood: asthma severity, allergies, sensitization, living conditions, gender influence and social consequences. *Respir Med*, **94**, 454-465.
90. Komi, J y Lassila, O. (2000). Nonsteroidal anti-estrogens inhibit the functional differentiation of human monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, **95**, 2875-2882.
91. Kouloumenta, V, Hatziefthimiou, A, Paraskeva, E, Gourgoulisanis, K y Molyvdas, PA. (2006). Non-genomic effect of testosterone on airway smooth muscle. *Br J Pharmacol*, **149**, 1083-1091.

92. Kwon, HL, Belanger, K y Bracken, MB. (2004). Effect of pregnancy and stage of pregnancy on asthma severity: a systematic review. *Am J Obstet Gynecol*, **190**, 1201-1210.
93. Labrie, F. (1998). DHEA as physiological replacement therapy at menopause. *J Endocrinol Invest*, **21**, 399-401.
94. Labrie, F, Belanger, A, Luu-The, V, Labrie, C, Simard, J, Cusan, L, Gomez, JL y Candas, B. (1998). DHEA and the intracrine formation of androgens and estrogens in peripheral target tissues: its role during aging. *Steroids*, **63**, 322-328.
95. Lange, P, Parner, J, Prescott, E, Ulrik, CS y Vestbo, J. (2001). Exogenous female sex steroid hormones and risk of asthma and asthma-like symptoms: a cross sectional study of the general population. *Thorax*, **56**, 613-616.
96. Lemanske, RF, Jr. y Busse, WW. (2010). Asthma: clinical expression and molecular mechanisms. *J Allergy Clin Immunol*, **125**, S95-102.
97. Liu, D y Dillon, JS. (2002). Dehydroepiandrosterone activates endothelial cell nitric-oxide synthase by a specific plasma membrane receptor coupled to Galpha(i2,3). *J Biol Chem*, **277**, 21379-21388.
98. Liu, D y Dillon, JS. (2004). Dehydroepiandrosterone stimulates nitric oxide release in vascular endothelial cells: evidence for a cell surface receptor. *Steroids*, **69**, 279-289.

99. Macsali, F, Real, FG, Omenaas, ER, Bjorge, L, Janson, C, Franklin, K y Svanes, C. (2009). Oral contraception, body mass index, and asthma: a cross-sectional Nordic-Baltic population survey. *J Allergy Clin Immunol*, **123**, 391-397.
100. Malkin, CJ, Pugh, PJ, Jones, RD, Kapoor, D, Channer, KS y Jones, TH. (2004). The effect of testosterone replacement on endogenous inflammatory cytokines and lipid profiles in hypogonadal men. *J Clin Endocrinol Metab*, **89**, 3313-3318.
101. Martinez, FD. (2011). New insights into the natural history of asthma: primary prevention on the horizon. *J Allergy Clin Immunol*, **128**, 939-945.
102. Matsubara, S, Li, G, Takeda, K, Loader, JE, Pine, P, Masuda, ES, Miyahara, N, Miyahara, S, Lucas, JJ, Dakhama, A y Gelfand, EW. (2006). Inhibition of spleen tyrosine kinase prevents mast cell activation and airway hyperresponsiveness. *Am J Respir Crit Care Med*, **173**, 56-63.
103. McFadden, ER, Jr. (2003). Acute severe asthma. *Am J Respir Crit Care Med*, **168**, 740-759.
104. McFadzean, I y Gibson, A. (2002). The developing relationship between receptor-operated and store-operated calcium channels in smooth muscle. *Br J Pharmacol*, **135**, 1-13.

105. Melgert, BN, Ray, A, Hylkema, MN, Timens, W y Postma, DS. (2007). Are there reasons why adult asthma is more common in females? *Curr Allergy Asthma Rep*, **7**, 143-150.
106. Messer, JW, Peters, GA y Bennett, WA. (1960). Causes of death and pathologic findings in 304 cases of bronchial asthma. *Dis Chest*, **38**, 616-624.
107. Mileva, Z y Maleeva, A. (1988). [The serum testosterone level of patients with bronchial asthma treated with corticosteroids and untreated]. *Vutr Boles*, **27**, 29-32.
108. Montaña, LM, Calixto, E, Figueroa, A, Flores-Soto, E, Carbajal, V y Perusquía, M. (2008). Relaxation of androgens on rat thoracic aorta: testosterone concentration dependent agonist/antagonist L-type Ca²⁺ channel activity, and 5beta-dihydrotestosterone restricted to L-type Ca²⁺ channel blockade. *Endocrinology*, **149**, 2517-2526.
109. Murphy, VE y Gibson, PG. (2008). Premenstrual asthma: prevalence, cycle-to-cycle variability and relationship to oral contraceptive use and menstrual symptoms. *J Asthma*, **45**, 696-704.
110. Naik, SR y Wala, SM. (2013). Inflammation, allergy and asthma, complex immune origin diseases: mechanisms and therapeutic agents. *Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov*, **7**, 62-95.

111. Namazy, JA y Schatz, M. (2005). Pregnancy and asthma: recent developments. *Curr Opin Pulm Med*, **11**, 56-60.
112. Ninan, TK y Russell, G. (1992). Respiratory symptoms and atopy in Aberdeen schoolchildren: evidence from two surveys 25 years apart. *BMJ*, **304**, 873-875.
113. Ober, C y Yao, TC. (2011). The genetics of asthma and allergic disease: a 21st century perspective. *Immunol Rev*, **242**, 10-30.
114. Oertelt-Prigione, S. (2012). Immunology and the menstrual cycle. *Autoimmun Rev*, **11**, A486-A492.
115. Olsen, NJ y Kovacs, WJ. (1995). Case report: testosterone treatment of systemic lupus erythematosus in a patient with Klinefelter's syndrome. *Am J Med Sci*, **310**, 158-160.
116. Osman, M. (2003). Therapeutic implications of sex differences in asthma and atopy. *Arch Dis Child*, **88**, 587-590.
117. Ostatnikova, D, Pastor, K, Putz, Z, Dohnanyiova, M, Mat'aseje, A y Hampl, R. (2002). Salivary testosterone levels in preadolescent children. *BMC Pediatr*, **2**, 5.
118. Panettieri, RA, Jr. (2004). Airway smooth muscle: immunomodulatory cells? *Allergy Asthma Proc*, **25**, 381-386.

119. Pang, JJ, Xu, XB, Li, HF, Zhang, XY, Zheng, TZ y Qu, SY. (2002). Inhibition of beta-estradiol on trachea smooth muscle contraction in vitro and in vivo. *Acta Pharmacol Sin*, **23**, 273-277.
120. Paoletti, P, Carrozzi, L, Viegi, G, Modena, P, Ballerin, L, Di, PF, Grado, L, Baldacci, S, Pedreschi, M, Vellutini, M y . (1995). Distribution of bronchial responsiveness in a general population: effect of sex, age, smoking, and level of pulmonary function. *Am J Respir Crit Care Med*, **151**, 1770-1777.
121. Pare, PD, Roberts, CR, Bai, TR y Wiggs, BJ. (1997). The functional consequences of airway remodeling in asthma. *Monaldi Arch Chest Dis*, **52**, 589-596.
122. Pennell, TM y Morrow, EH. (2013). Two sexes, one genome: the evolutionary dynamics of intralocus sexual conflict. *Ecol Evol*, **3**, 1819-1834.
123. Penning, TM, Burczynski, ME, Jez, JM, Hung, CF, Lin, HK, Ma, H, Moore, M, Palackal, N y Ratnam, K. (2000). Human 3alpha-hydroxysteroid dehydrogenase isoforms (AKR1C1-AKR1C4) of the aldo-keto reductase superfamily: functional plasticity and tissue distribution reveals roles in the inactivation and formation of male and female sex hormones. *Biochem J*, **351**, 67-77.
124. Perez-Zoghbi, JF, Karner, C, Ito, S, Shepherd, M, Alrashdan, Y y Sanderson, MJ. (2009). Ion channel regulation of intracellular calcium and airway smooth muscle function. *Pulm Pharmacol Ther*, **22**, 388-397.

125. Perusquía, M, Espinoza, J, Montaña, LM y Stallone, JN. (2012). Regional differences in the vasorelaxing effects of testosterone and its 5-reduced metabolites in the canine vasculature. *Vascul Pharmacol*, **56**, 176-182.
126. Perusquía, M, Hernández, R, Montaña, LM, Villalón, CM y Campos, MG. (1997). Inhibitory effect of sex steroids on guinea-pig airway smooth muscle contractions. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, **118**, 5-10.
127. Perusquía, M, Navarrete, E, González, L y Villalón, CM. (2007). The modulatory role of androgens and progestins in the induction of vasorelaxation in human umbilical artery. *Life Sci*, **81**, 993-1002.
128. Perusquía, M, Navarrete, E, Jasso-Kamel, J y Montaña, LM. (2005). Androgens induce relaxation of contractile activity in pregnant human myometrium at term: a nongenomic action on L-type calcium channels. *Biol Reprod*, **73**, 214-221.
129. Perusquía, M y Stallone, JN. (2010). Do androgens play a beneficial role in the regulation of vascular tone? Nongenomic vascular effects of testosterone metabolites. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, **298**, H1301-H1307.
130. Poletti, A, Coscarella, A, Negri-Cesi, P, Colciago, A, Celotti, F y Martini, L. (1998). 5 alpha-reductase isozymes in the central nervous system. *Steroids*, **63**, 246-251.

131. Postma, DS. (2007). Gender differences in asthma development and progression. *Gen Med*, **4 Suppl B**, S133-S146.
132. Pozzi, P, Bendotti, C, Simeoni, S, Piccioni, F, Guerini, V, Marron, TU, Martini, L y Poletti, A. (2003). Androgen 5-alpha-reductase type 2 is highly expressed and active in rat spinal cord motor neurones. *J Neuroendocrinol*, **15**, 882-887.
133. Rahman, F y Christian, HC. (2007). Non-classical actions of testosterone: an update. *Trends Endocrinol Metab*, **18**, 371-378.
134. Rainey, WE, Carr, BR, Sasano, H, Suzuki, T y Mason, JI. (2002). Dissecting human adrenal androgen production. *Trends Endocrinol Metab*, **13**, 234-239.
135. Ratz, PH, Berg, KM, Urban, NH y Miner, AS. (2005). Regulation of smooth muscle calcium sensitivity: KCl as a calcium-sensitizing stimulus. *Am J Physiol Cell Physiol*, **288**, C769-C783.
136. Redington, AE. (2006). Modulation of nitric oxide pathways: therapeutic potential in asthma and chronic obstructive pulmonary disease. *Eur J Pharmacol*, **533**, 263-276.
137. Regal, JF, Regal, RR, Meehan, JL, Duan, M y Mohrman, ME. (2007). Contributions of age and sex to heterogeneity of symptoms and effectiveness of secondary prevention strategies in asthma as modeled in the Guinea pig. *J Immunotoxicol*, **4**, 1-13.

138. Ricciardolo, FL. (2003). Multiple roles of nitric oxide in the airways. *Thorax*, **58**, 175-182.
139. Ricciardolo, FL, Nijkamp, F, De, R, V y Folkerts, G. (2008). The guinea pig as an animal model for asthma. *Curr Drug Targets*, **9**, 452-465.
140. Ricciardolo, FL, Sterk, PJ, Gaston, B y Folkerts, G. (2004). Nitric oxide in health and disease of the respiratory system. *Physiol Rev*, **84**, 731-765.
141. Romieu, I, Fabre, A, Fournier, A, Kauffmann, F, Varraso, R, Mesrine, S, Leynaert, B y Clavel-Chapelon, F. (2010). Postmenopausal hormone therapy and asthma onset in the E3N cohort. *Thorax*, **65**, 292-297.
142. Salam, MT, Wenten, M y Gilliland, FD. (2006). Endogenous and exogenous sex steroid hormones and asthma and wheeze in young women. *J Allergy Clin Immunol*, **117**, 1001-1007.
143. Saltzman, E y Guay, A. (2006). Dehydroepiandrosterone therapy as female androgen replacement. *Semin Reprod Med*, **24**, 97-105.
144. Schatz, M y Camargo, CA, Jr. (2003). The relationship of sex to asthma prevalence, health care utilization, and medications in a large managed care organization. *Ann Allergy Asthma Immunol*, **91**, 553-558.
145. Schatz, M, Dombrowski, MP, Wise, R, Thom, EA, Landon, M, Mabie, W, Newman, RB, Hauth, JC, Lindheimer, M, Caritis, SN, Leveno, KJ, Meis, P,

- Miodovnik, M, Wapner, RJ, Paul, RH, Varner, MW, O'sullivan, MJ, Thurnau, GR, Conway, D y McNellis, D. (2003). Asthma morbidity during pregnancy can be predicted by severity classification. *J Allergy Clin Immunol*, **112**, 283-288.
146. Sears, MR. (1997a). Descriptive epidemiology of asthma. *Lancet*, **350 Suppl 2**, SII1-SII4.
147. Sears, MR. (1997b). Epidemiology of childhood asthma. *Lancet*, **350**, 1015-1020.
148. Seibold, MA, Wang, B, Eng, C, Kumar, G, Beckman, KB, Sen, S, Choudhry, S, Meade, K, Lenoir, M, Watson, HG, Thyne, S, Williams, LK, Kumar, R, Weiss, KB, Grammer, LC, Avila, PC, Schleimer, RP, Burchard, EG y Brenner, R. (2008). An african-specific functional polymorphism in KCNMB1 shows sex-specific association with asthma severity. *Hum Mol Genet*, **17**, 2681-2690.
149. Seow, CY, Schellenberg, RR y Pare, PD. (1998). Structural and functional changes in the airway smooth muscle of asthmatic subjects. *Am J Respir Crit Care Med*, **158**, S179-S186.
150. Seymour, BW, Friebertshauser, KE, Peake, JL, Pinkerton, KE, Coffman, RL y Gershwin, LJ. (2002). Gender differences in the allergic response of mice neonatally exposed to environmental tobacco smoke. *Dev Immunol*, **9**, 47-54.
151. Shore, SA y Moore, PE. (2003). Regulation of beta-adrenergic responses in airway smooth muscle. *Respir Physiol Neurobiol*, **137**, 179-195.

152. Simoncini, T y Genazzani, AR. (2003). Non-genomic actions of sex steroid hormones. *Eur J Endocrinol*, **148**, 281-292.
153. Sims, CD, Chamberlain, GV y de, SM. (1976). Lung function tests in bronchial asthma during and after pregnancy. *Br J Obstet Gynaecol*, **83**, 434-437.
154. Stenius-Aarniala, B, Piirila, P y Teramo, K. (1988). Asthma and pregnancy: a prospective study of 198 pregnancies. *Thorax*, **43**, 12-18.
155. Sudo, N, Yu, XN y Kubo, C. (2001). Dehydroepiandrosterone attenuates the spontaneous elevation of serum IgE level in NC/Nga mice. *Immunol Lett*, **79**, 177-179.
156. Svanes, C, Real, FG, Gislason, T, Jansson, C, Jogi, R, Norrman, E, Nystrom, L, Toren, K y Omenaas, E. (2005). Association of asthma and hay fever with irregular menstruation. *Thorax*, **60**, 445-450.
157. Szefer, SJ y Dakhama, A. (2011). New insights into asthma pathogenesis and treatment. *Curr Opin Immunol*, **23**, 801-807.
158. Szefer, SJ y Leung, DY. (1997). Glucocorticoid-resistant asthma: pathogenesis and clinical implications for management. *Eur Respir J*, **10**, 1640-1647.

159. Tam, A, Morrish, D, Wadsworth, S, Dorscheid, D, Man, SF y Sin, DD. (2011). The role of female hormones on lung function in chronic lung diseases. *BMC Womens Health*, **11**, 24.
160. Tesse, R, Schieck, M y Kabesch, M. (2011). Asthma and endocrine disorders: shared mechanisms and genetic pleiotropy. *Mol Cell Endocrinol*, **333**, 103-111.
161. Tliba, O y Panettieri, RA, Jr. (2009). Noncontractile functions of airway smooth muscle cells in asthma. *Annu Rev Physiol*, **71**, 509-535.
162. Tokumoto, T, Tokumoto, M, Oshima, T, Shimizuguchi, K, Fukuda, T, Sugita, E, Suzuki, M, Sakae, YT, Akiyama, Y, Nakayama, R, Roy, SR, Saydur, RM, Pang, Y, Dong, J y Thomas, P. (2012). Characterization of multiple membrane progesterin receptor (mPR) subtypes from the goldfish ovary and their roles in the induction of oocyte maturation. *Gen Comp Endocrinol*, **177**, 168-176.
163. Torgerson, DG, Capurso, D, Ampleford, EJ, Li, X, Moore, WC, Gignoux, CR, Hu, D, Eng, C, Mathias, RA, Busse, WW, Castro, M, Erzurum, SC, Fitzpatrick, AM, Gaston, B, Israel, E, Jarjour, NN, Teague, WG, Wenzel, SE, Rodriguez-Santana, JR, Rodriguez-Cintron, W, Avila, PC, Ford, JG, Barnes, KC, Burchard, EG, Howard, TD, Bleecker, ER, Meyers, DA, Cox, NJ, Ober, C y Nicolae, DL. (2012). Genome-wide ancestry association testing identifies a common European variant on 6q14.1 as a risk factor for asthma in African American subjects. *J Allergy Clin Immunol*, **130**, 622-629.

164. Townsend, EA, Meuchel, LW, Thompson, MA, Pabelick, CM y Prakash, YS. (2012a). Estrogen modulation of nitric oxide signaling in the airway. *J Cell Physiol*.
165. Townsend, EA, Miller, VM y Prakash, YS. (2012b). Sex differences and sex steroids in lung health and disease. *Endocr Rev*, **33**, 1-47.
166. Townsend, EA, Thompson, MA, Pabelick, CM y Prakash, YS. (2010). Rapid effects of estrogen on intracellular Ca²⁺ regulation in human airway smooth muscle. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, **298**, L521-L530.
167. Traish, AM, Guay, A, Feeley, R y Saad, F. (2009a). The dark side of testosterone deficiency: I. Metabolic syndrome and erectile dysfunction. *J Androl*, **30**, 10-22.
168. Traish, AM, Kang, HP, Saad, F y Guay, AT. (2011). Dehydroepiandrosterone (DHEA)--a precursor steroid or an active hormone in human physiology. *J Sex Med*, **8**, 2960-2982.
169. Traish, AM, Saad, F, Feeley, RJ y Guay, A. (2009b). The dark side of testosterone deficiency: III. Cardiovascular disease. *J Androl*, **30**, 477-494.
170. Traish, AM, Saad, F y Guay, A. (2009c). The dark side of testosterone deficiency: II. Type 2 diabetes and insulin resistance. *J Androl*, **30**, 23-32.

171. Troisi, RJ, Speizer, FE, Willett, WC, Trichopoulos, D y Rosner, B. (1995). Menopause, postmenopausal estrogen preparations, and the risk of adult-onset asthma. A prospective cohort study. *Am J Respir Crit Care Med*, **152**, 1183-1188.
172. Tsutsui, K, Ukena, K, Takase, M, Kohchi, C y Lea, RW. (1999). Neurosteroid biosynthesis in vertebrate brains. *Comp Biochem Physiol C Pharmacol Toxicol Endocrinol*, **124**, 121-129.
173. Turner, ES, Greenberger, PA y Patterson, R. (1980). Management of the pregnant asthmatic patient. *Ann Intern Med*, **93**, 905-918.
174. Vargas, MH. (2009). Epidemiología del asma. *Neumología y Cirugía de Tórax*, **68**, S91-S97.
175. Verma, MK, Miki, Y y Sasano, H. (2011). Sex steroid receptors in human lung diseases. *J Steroid Biochem Mol Biol*, **127**, 216-222.
176. Voet, D, Voet J.G. & Pratt C.W. (2007). *Fundamentos de Bioquímica. La vida a nivel molecular*. Ed. Panamericana: España.
177. Walsh, GM. (2013). An update on biologic-based therapy in asthma. *Immunotherapy*, **5**, 1255-1264.
178. Wehling, M. (1997). Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu Rev Physiol*, **59**, 365-393.

179. Weinstein, RE, Loboeki, CA, Gravett, S, Hum, H, Negrich, R, Herbst, J, Greenberg, D y Pieper, DR. (1996). Decreased adrenal sex steroid levels in the absence of glucocorticoid suppression in postmenopausal asthmatic women. *J Allergy Clin Immunol*, **97**, 1-8.
180. Wenzel, SE, Robinson, CB, Leonard, JM y Panettieri, RA, Jr. (2010). Nebulized dehydroepiandrosterone-3-sulfate improves asthma control in the moderate-to-severe asthma results of a 6-week, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Allergy Asthma Proc*, **31**, 461-471.
181. Wierman, ME. (2007). Sex steroid effects at target tissues: mechanisms of action. *Adv Physiol Educ*, **31**, 26-33.
182. Wong, WS, Tsang, F, Li, H y Ma, B. (1999). Effects of inhibitors of the tyrosine kinase signaling cascade on an in vitro model of allergic airways. *Asian Pac J Allergy Immunol*, **17**, 229-237.
183. Yamatomo, T, Okano, M, Ono, T, Nakayama, E, Yoshino, T, Satoskar, AR, Harn, DA, Jr. y Nishizaki, K. (2001). Sex-related differences in the initiation of allergic rhinitis in mice. *Allergy*, **56**, 525-531.
184. Yu, CK, Liu, YH y Chen, CL. (2002a). Dehydroepiandrosterone attenuates allergic airway inflammation in *Dermatophagoides farinae*-sensitized mice. *J Microbiol Immunol Infect*, **35**, 199-202.

185. Yu, CK, Liu, YH y Chen, CL. (2002b). Dehydroepiandrosterone attenuates allergic airway inflammation in *Dermatophagoides farinae*-sensitized mice. *J Microbiol Immunol Infect*, **35**, 199-202.
186. Yu, CK, Yang, BC, Lei, HY, Chen, YC, Liu, YH, Chen, CC y Liu, CW. (1999). Attenuation of house dust mite *Dermatophagoides farinae*-induced airway allergic responses in mice by dehydroepiandrosterone is correlated with down-regulation of TH2 response. *Clin Exp Allergy*, **29**, 414-422.
187. Zaitso, M, Narita, S, Lambert, KC, Grady, JJ, Estes, DM, Curran, EM, Brooks, EG, Watson, CS, Goldblum, RM y Midoro-Horiuti, T. (2007). Estradiol activates mast cells via a non-genomic estrogen receptor-alpha and calcium influx. *Mol Immunol*, **44**, 1977-1985.
188. Zannolli, R y Morgese, G. (1997). Does puberty interfere with asthma? *Med Hypotheses*, **48**, 27-32.



Contents lists available at ScienceDirect

Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/jsbmb

Nongenomic bronchodilating action elicited by dehydroepiandrosterone (DHEA) in a guinea pig asthma model

Julia Espinoza^a, Luis M. Montaño^b, Mercedes Perusquía^{a,*}^a Universidad Nacional Autónoma de México, Instituto de Investigaciones Biomédicas, Departamento de Biología Celular y Histología, México, D.F. 04510, México^b Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Medicina, Departamento de Farmacología, México, D.F. 04510, México

ARTICLE INFO

Article history:

Received 18 December 2012

Received in revised form 16 April 2013

Accepted 22 May 2013

Keywords:

Asthma
Dehydroepiandrosterone
DHEA
Bronchorelaxation
Adrenal steroid
Airway smooth muscle

ABSTRACT

Primates secrete large amounts of the precursor steroid dehydroepiandrosterone (DHEA); in humans, its levels are low during childhood and start declining after the fourth decade. It has been postulated that the progressive decline in DHEA levels may be related with the severity of asthma associated with age. To determine whether DHEA may regulate the airway smooth muscle (ASM) activity, isolated tracheal rings with and without epithelium from male guinea pigs were isometrically recorded to characterize the response of ASM to DHEA at different concentrations on KCl- and carbachol (CCh)-induced contraction as well as on ovalbumin (OVA)-induced contraction in sensitized guinea pigs. Additionally, we used harmonic plethysmography in sensitized guinea pigs in order to compare changes of the lung resistance increased by the antigen challenge to OVA in the absence and presence of different doses of DHEA. DHEA concentration-dependently abolished the contraction to KCl, CCh and OVA, and no differences were found in preparations with and without epithelium. DHEA-induced relaxation was not modified by the suppression of protein synthesis or transcription, pharmacological inhibition of nitric oxide (NO) synthase, nor by antagonist of β_2 adrenergic receptors or an inhibitor of the 5β HSD enzyme. Likewise, Ca^{2+} -induced contraction in Ca^{2+} -free depolarized tissues was antagonized by DHEA, and the contraction to the L-type voltage-dependent calcium channel activator (Bay K 8644) was inhibited by DHEA. Furthermore, DHEA prevented OVA-induced increases in lung resistance. These results indicate that DHEA-induced relaxation in ASM is a nongenomic (membrane) action and is not produced after its biotransformation. The data suggest that DHEA-induced relaxation is an epithelium- and NO-independent mechanism that involves a blockade of voltage-dependent calcium channels and possible non-selective cation channels.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Asthma is a worldwide common chronic disease. It is well known that childhood asthma frequency before puberty is higher in boys than in girls [1–10]. Contrarily, during adulthood, asthma prevalence augments among women when compared to men;

furthermore, this ailment exhibits a more severe form in female asthma [1,5,11–17]. Notably, asthma severity decreases among males during adolescence but prevalence increases once again in this gender during the fifth or sixth decade [10]. Therefore, it seems that decreasing serum androgen levels in men may contribute to an increase in asthma [10,18]. In general, it is accepted that female sex hormones (estrogens and progesterone) aggravate asthma and other allergic diseases, whereas male sex hormones (androgens) suppress such diseases (for review see [9]).

Even though asthma incidence is determined by a large number of variables, its relation to sex and age is, indeed, not well understood. Obviously, the endocrine status may be an important factor to take into account, due to the fact that many changes are closely related to the age-associated decline in hormones. For instance, dehydroepiandrosterone (DHEA) and its sulfated derivative (DHEA-S), the most abundantly produced adrenal steroids, particularly in primates, and all the other hormones that decline with age appear to be associated with physiological functions and overall human health. In this respect, DHEA decreases with age in both men and

Abbreviations: DHEA, dehydroepiandrosterone; DHEA-S, dehydroepiandrosterone sulfate; ASM, airway smooth muscle; CCh, carbachol; KCl, potassium chloride; OVA, ovalbumin; NO, nitric oxide; KHS, Krebs-Henseleit bicarbonate solution; BK, bradykinin; F_{max} , maximal effect; IC_{50} , inhibitory concentration 50; L-NAMF, N^G-nitro-L-arginine methyl ester; DMSO, dimethylsulfoxide; KCl- Ca^{2+} -free, KCl- Ca^{2+} -free solution; R_L, lung resistance; EAR, early asthmatic response; IAR, late asthmatic response; SOCC, store-operated Ca^{2+} entry; ROCC, receptor-operated Ca^{2+} channel; VDCC, voltage-dependent Ca^{2+} channels.

* Corresponding author at: Department of Cell Biology and Physiology, Institute for Biomedical Research, P.O. Box 70728, National Autonomous University of Mexico, Mexico, D.F. 04510, México. Tel.: +52 5556229968; fax: +52 556229198.

E-mail address: perusquia@iim.unam.mx (M. Perusquía).

women; thus, one of the main characteristics of DHEA and DHEA-S is their age-dependent pattern of secretion. Large amounts of DHEA are produced during fetal development, but after birth, this production falls sharply and remains low for several years; then the synthesis resumes and the plasmatic levels peak during the second decade of life [19,20]; nonetheless, the DHEA levels may be lower for women when compared with men. Towards the third life decade, an age-dependent decline in DHEA's plasmatic concentrations starts and progresses with aging in both genders [21].

Regarding the relationship between DHEA and asthma, available data are scant. Preliminary reports have documented that DHEA levels in postmenopausal, asthmatic women were lower when compared with an equal number of age-matched, postmenopausal, non-asthmatic women [22]. Additionally, asthmatic patients, with severe bronchospasm, had lower DHEA and/or DHEA-S levels [23–25]. Although these findings certainly reinforce the view that the low levels of DHEA may affect the asthma symptoms, very few formal studies have evaluated its effects on the respiratory system. DHEA has been considered an important immunomodulating and anti-inflammatory hormone that reverses cytokine imbalances associated with asthma. Therefore, DHEA may prevent and attenuate allergic inflammation in the airways of different animal models of asthma [26–28]. Subsequently, it has been suggested that DHEA supplementation may show some therapeutic benefits for asthmatic patients [29,30]. Additionally, we have shown that DHEA is capable of inducing an acute nongenomic uterine and vascular relaxation in humans and animals [31–33], and we hypothesized that the airway smooth muscle (ASM) may be also a target of the nongenomic relaxing effect induced by DHEA. To test this hypothesis, we examined the potential bronchodilating effects of DHEA on ASM in order to investigate what role it might play in preventing the development of bronchospasm during an antigenic challenge. For this purpose, we analyzed the potential bronchodilating effect induced by DHEA on high potassium (KCl) solution or carbachol (CCh)-elicited contraction in ASM preparations from non-sensitized (unchallenged control guinea-pigs) vs. ovalbumin (OVA)-sensitized guinea pigs (an experimental model of asthma). The role of airway epithelium in these DHEA-induced relaxations was also investigated. Accordingly, the response to DHEA was also evaluated on OVA-induced contraction in guinea pigs tracheas from sensitized animals. To confirm that DHEA-induced relaxation is operative *in vivo*, the steroid was tested in the lung resistance of OVA-sensitized animals. In order to shed further light on the mechanism(s) involved in DHEA-induced bronchodilation, we also explored the possible participation of: (i) the product of DHEA bioconversion in its relaxing effect; (ii) β_2 -adrenoceptors; (iii) epithelium-derived relaxing factor (nitric oxide; NO); (iv) nuclear transcription/translation mechanisms; and (v) voltage-dependent Ca^{2+} channels (VDCC).

2. Materials and methods

2.1. Animals

Adult male guinea pigs of the Hartley strain (450–600 g) were obtained from the Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, Mexico City. The animals were housed in our animal facility in conventional conditions and fed with Purified Guinea Pig Diet pellets (Harlan Inc.) and water *ad libitum*. The protocols were approved by the Institutional Care and Use Committee of the Instituto de Investigaciones Biomédicas, Universidad Nacional Autónoma de México. The experiments were conducted in accordance with the published Guiding Principles in the Care and Use of Animals, approved by the American Physiological Society. The guinea pigs were grouped in: non-sensitized and ovalbumin (OVA)-sensitized guinea pigs.

2.1.1. OVA-sensitized guinea pigs procedure

To obtain the asthmatic model, guinea pigs were sensitized at day 1 by administration of 0.5 ml i.p. and 0.5 ml s.c. of $60 \mu\text{g ml}^{-1}$ OVA and 1 mg ml^{-1} Al(OH)₃ (aluminum hydroxide as adjuvant) dissolved in saline (0.9% NaCl). At day 8, the animals received an antigenic challenge with 3 mg ml^{-1} OVA in saline solution nebulized during 5 min, delivered by an ultrasonic nebulizer (WH-2000; Yueh Medical Instrument Factory Co., Ltd., China). On day 15, animals received another antigenic challenge with 1 mg ml^{-1} OVA in saline solution nebulized for 1 min. The response to the antigen was always established by deep abdominal breathing. The onset of severe dyspnea was selected as the experimental endpoint for this study. Finally, the guinea pigs were subjected to experimentation on days 21–25. Exceptional guinea-pigs with a poor response to antigen were excluded from the study.

2.2. Tracheal rings preparation and contractile force measurements *in vitro*

In order to compare the effect of androgens on non-sensitized (control group) and sensitized (asthmatic group) guinea pigs, we used the same experimental protocol for the two groups. The guinea pigs were deeply anaesthetized with sodium pentobarbital (35 mg kg^{-1} , i.p.) and then killed by exsanguination. The trachea was immediately placed in Krebs–Henseleit bicarbonate solution (KHS) with the following composition (mM): NaHCO_3 (25), NaCl (120), KCl (4.7), KH_2PO_4 (1.2), MgSO_4 (1.2), CaCl_2 (2.5) and glucose (11); this solution was aerated continuously with a gas mixture of 95% O_2 and 5% CO_2 to maintain pH 7.4 and constant temperature at 37 °C. The trachea was cut in eight tracheal rings of approximately 0.5 cm of length (each one containing three cartilaginous rings).

To determine the role of the airway epithelium in the relaxing effect induced by DHEA, tracheal rings from non-sensitized animals were used in two ways: (i) preparations with epithelium; tracheas were carefully handled to avoid epithelium injuring; and (ii) preparations without epithelium; the luminal surface of tracheal rings was rubbed by using a dental drill bur with cylinder round end (K-file Colorinox 140). The presence and absence of epithelium was evaluated functionally in all experiments (as described below).

Each tracheal ring was suspended horizontally between two stainless steel wires, and was placed in a temperature-controlled (37 °C) organ bath containing 10 ml KHS continuously gassed with O_2/CO_2 throughout the experiment for isometric tension recordings. One wire was attached to a fixed support at the bottom of the chamber, and the other end to an isometric force transducer (FT03C; Grass Instrument, Quincy, MA, USA) connected to a computerized data acquisition and analysis system (MP 150; Biopac Systems, CA, USA). The resting force was adjusted to 10 mN (1 g). Under these conditions, tissues were equilibrated for 1 h before conducting the experiments. Then, the bronchoconstrictive responses to 60 mM KCl were induced after replacing KHS with an equimolar substitution of 60 mM KCl and 64.7 mM NaCl. KCl caused a tonic contraction which was repeated three times in order to verify the reproducibility of the response to obtain a maximum stable tonic contraction during 15 min.

The epithelial condition was pharmacologically corroborated as reported previously [34]. Bradykinin (BK) induces epithelium-dependent relaxation; on this basis, 320 nM BK was added of each preparation at basal tone. The absence of epithelium (rubbed tissues) was verified when BK induced an increase of the basal tone ($\geq 0.3 \text{ g}$); whereas the presence of epithelium was confirmed when BK elicited a diminution of the basal tone in the tracheal rings with epithelial integrity. Then, the tissues were washed with KHS.

2.2.1. DHEA response on ASM contraction

After the three KCl pre stimuli, preparations with and without epithelium from non sensitized and sensitize animals were contracted either with KCl (60 mM) or CCh (0.3 μ M) for 90 min (control response). Later on, tissues were washed with KHS. Likewise, different tracheal rings only from sensitized animals with epithelium were contracted with 1 μ M OVA. The tissues contracted by these different agents (KCl, CCh or OVA) induce a tonic contraction through different mechanisms; these contractions were stable with constant amplitude for a long time (recorded more than 2 h). After a stable tension was attained (>15 min), different concentrations (9, 20, 42, 91 and 200 μ M) of DHEA, dissolved in absolute ethanol, were added cumulatively with an interval of 15 min between each addition and the response was also evaluated on this period. Subsequently, the tissues were washed to re-equilibrate for 60 min before inducing the last contraction to KCl or CCh, recorded during 90 min (second control response to verify tissue viability); this was not the case of OVA induced contraction which never returns to the baseline after washout. The concentration–response curves to DHEA were plotted, and the inhibitory concentration 50 (IC_{50} : DHEA concentration to inhibit 50% of KCl-, CCh-, or OVA-induced contraction) was calculated to compare DHEA potency and the sensitivity of each contraction to DHEA induced relaxation. Likewise, the highest concentration to induce the maximal relaxing effect (E_{max}) on KCl-, CCh- or OVA-induced contraction was obtained for DHEA to determine its efficacy. In a separate group of experiments, the effect of the vehicle or DHEA (EtOH: absolute ethanol) on the different tonic contractions was determined after exposure to EtOH; each concentration added never exceeded 0.1% (w/v). The concentration–response curves to DHEA on contractions induced by different bronchoconstrictors were determined independently in tracheal rings from different animals ($n=6$). The IC_{50} and E_{max} values in each group were compared.

2.3. The potential role of NO in the bronchodilating effect of DHEA

The potential role of NO in DHEA-induced relaxation was separately explored in a set of experiments. Tracheal rings with epithelium from non sensitized animals were incubated with the NO synthase inhibitor, N^G -nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME, 10 μ M), for 30 min on KCl-induced contraction, before eliciting the relaxation to the same cumulative concentrations of DHEA. The bronchodilating effect of DHEA was observed during 30 min. The concentration–response curve to DHEA as well as its potency and efficacy in tracheal rings without any pretreatment was compared with L-NAME pretreatment.

2.4. Mechanism of action

To investigate the mechanisms of action in the bronchodilating effect to DHEA, we analyzed the involvement of: nuclear transcription/translation mechanisms; the product of DHEA biotransformation; β_2 -adrenoreceptors; and VDCC.

2.4.1. Inhibitors of protein synthesis, transcription and 3 β -HSD activity

In other experiments, the tracheal rings with epithelium were pre incubated with the protein synthesis inhibitor cycloheximide (40 μ M) or the transcription inhibitor actinomycin D (10 μ M) for 30 min on the KCl-induced contraction. DHEA was then added at the same concentrations and its effect was compared in the presence and absence (control group) of those inhibitors. This protocol was designed to discard that DHEA might induce a genomic action. Additionally, since DHEA can be bioconverted into androgens or estrogens, the involvement of androgen or estrogen in the acute bronchodilation to DHEA was examined by the same

protocol: KCl pre-contracted tissues were pre-incubated, during 60 min, with 1 μ M Ipostane (WIN 32,720); a pure inhibitor of the 3 β hydroxy steroid dehydrogenase (3 β HSD) activity which is an essential step in the biosynthesis of active estrogens and androgens. Then, DHEA, at selected concentrations, were added in a cumulative concentration curve. The comparisons were made with the concentration–response curve of DHEA without any pretreatment. In addition, the effect produced by the final volume of vehicle (0.1% EtOH; absolute ethanol) for inhibitors plus the DHEA vehicle was analyzed in independent experiments.

2.4.2. Potential interaction of DHEA with the β_2 -adrenergic receptors

To assess the possible interaction of DHEA with the β_2 adrenergic receptors, the tracheal rings with epithelium contracted with CCh were incubated with 10 μ M propranolol (a β_2 -adrenergic receptors antagonist) for 30 min. Then, each concentration of DHEA was added and its effect (evaluated as described before) was compared in the absence of that antagonist. Previously, we corroborated that 10 μ M propranolol elicited an antagonist effect in ASM of guinea pig. For this purpose, on the steady tone of the CCh-induced contraction, salbutamol (10 μ M; β_2 -adrenergic agonist) was added, and an inhibition of the contraction tone was observed. Then, on a second CCh contraction, the rings were incubated for 30 min with 10 μ M propranolol, before adding salbutamol. Propranolol at 10 μ M abolished the salbutamol-induced relaxation (data not shown). On this basis, DHEA relaxing effect on CCh-induced contraction was evaluated in the presence of 10 μ M propranolol under the same experimental protocol.

2.4.3. Potential calcium channel antagonism

In another assay, DHEA was tested in tracheal rings depolarized with a KCl Ca^{2+} free solution (KCl Ca^{2+} 0; a depolarizing 60 mM KCl solution modified by addition of 2 mM EGTA and without $CaCl_2$). A transient contraction was obtained to KCl Ca^{2+} 0 and, once the baseline was reached, 2.5 mM $CaCl_2$ was added to evoke a reproducible tonic contraction, which was recorded for ~30 min (control). Afterwards, the tissues were washed with KCl Ca^{2+} 0 to re equilibrate for 60 min were then pre incubated with different noncumulative concentrations of DHEA (9–91 μ M) for 10 min before the addition of $CaCl_2$ at 2.5 mM. Under these conditions, the contraction induced by $CaCl_2$ was recorded for 30 min, which was compared with the corresponding control. Subsequently, the tissues were washed and a $CaCl_2$ induced contraction was elicited again. The washout was done three times with KCl- Ca^{2+} 0 after all $CaCl_2$ contractions. Additionally, different tissues were pre-incubated with 100 μ M dihydropyridine-calcium channel activator (Bay K 8644, dissolved in 0.1% ethanol) 10 min after the contraction to KCl was induced. After 30 min, the cumulative concentration–response curve to DHEA was performed. The effect of DHEA was recorded as described before, and compared with its effect without Bay K 8644 and estimated in terms of diminution of the IC_{50} and E_{max} values of the control. Moreover, in different preparations, the concentration eliciting E_{max} of DHEA (200 μ M on KCl contraction) was added 10 min after the 100 μ M Bay K 8644 induced contraction had been elicited at the basal tone. Obviously, the response produced by the final volume of the DHEA vehicle or Bay K 8644 vehicle (0.1% absolute ethanol) was analyzed in independent experiments under the same experimental conditions.

2.5. Effect of DHEA on OVA-induced bronchospasm *in vivo*

Lung resistance (R_L) was measured by using the isovolumetric method in a closed chamber plethysmograph (Buxco Electronics Inc., Wilmington, NC, USA). Sensitized guinea pigs (after 21–25

days of treatment) were anesthetized with sodium pentobarbital (35 mg kg⁻¹, i.p.), and the depth of anesthesia was maintained with hourly administration of additional doses of pentobarbital as needed. Each animal received pancuronium bromide (0.06 mg kg⁻¹, i.v.) to avoid spontaneous respiratory movements. After cannulating the trachea, each animal was mechanically ventilated through a rodent ventilator (7025; Ugo Basile Biological Research Apparatus, Varese, Italy) with a tidal volume of 10 ml kg⁻¹ and 48 breaths min⁻¹. Right jugular vein and left carotid artery were cannulated for drug administration (DHEA or OVA) and for arterial pressure recording through a dynograph (BPA 400A; Dig-Med Blood Pressure Analyzer, Louisville, KY, USA), respectively. A water-filled cannula was positioned into the middle third of the esophagus in order to measure intraesophageal pressure as a surrogate of intrapleural pressure. Pressures obtained from the esophageal and tracheal cannulas were recorded through a differential pressure transducer (TRD4510; Buxco Biosystem). Pressure inside the plethysmograph chamber was also recorded through another differential pressure transducer. This last signal was converted to a pseudo-flow signal through software (XA v2.1; Buxco Biosystem) which calculated the relationship between signals from both transducers to obtain R_L through the formula: $R_L = \Delta P / \Delta V$, where ΔP is the pressure change and ΔV is the flow change. The R_L of the animals was recorded for 3 min (basal R_L value). After 15 min, the guinea pigs received 75 $\mu\text{g kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ OVA i.v., administered in 40 μl saline solution, and the R_L was recorded for 30 min. To determine if the bronchospasm produced by OVA could be prevented by the DHEA, sensitized guinea pigs were pretreated, 15 min before the antigenic challenge, with non-cumulative bolus injection of DHEA at different i.v., independent doses (35, 110, or 350 $\mu\text{mol kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$; each independent dose was administered in 40 μl dimethylsulfoxide (DMSO); 11 $\mu\text{mol kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ equivalent to 410 nM). R_L of sensitized guinea pigs was compared in the absence (control response) and presences of DHEA administration or in the pretreatment with the i.v. bolus injection to the same dose volume of the DHEA vehicle, DMSO, which did not change the R_L value after the antigen challenge.

2.6. Data presentation and statistical analysis

All data in the text and figures are expressed as mean \pm SEM. Differences with $P < 0.05$ were considered to be significant. All experiments were repeated at least six times. In the tension studies, n represents one guinea pig. The relaxing effect of DHEA on CCh-, KCl- or OVA-induced contraction, and the preventive effect of Ca²⁺-induced contraction are referred as percentage of inhibition of each contraction. The concentration for each compound is expressed as the final concentration in the organ bath. The efficacy of the DHEA was expressed as E_{max} (maximal effect induced by DHEA at the highest concentration tested). The potency of DHEA was calculated from the cumulative concentration–response curve by straight-line regression and obtained through the IC_{50} values (IC_{50} : DHEA concentration required to induce 50% relaxation or prevention of the contraction induced in each protocol) on: (i) KCl-, CCh- or OVA-induced contraction in isolated tracheal rings, and the prevention of Ca²⁺-induced contraction by DHEA in depolarized isolated tracheal rings; and (ii) prevention of R_L in sensitized guinea pigs *in vivo*. Bronchospasm was expressed as the changes in R_L (% increase). Nonpaired Student *t*-test was used to compare the responses between two groups. To compare IC_{50} between groups, we used a one-way ANOVA followed by Tukey multiple comparisons test. The comparison between treatments vs. control we used one-way ANOVA followed by Dunnett's multiple comparison test.

2.7. Drugs and chemicals

With the exception of Epostane (WIN 32,729; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Dallas, TX, USA), Bay K 8644 (NC Pharmaceuticals, Costa Mesa, CA, USA) and sodium pentobarbital (Pfizer, Mex.co), the remaining compounds were purchased from Sigma (St. Louis, MO, USA) and included: dehydroepiandrosterone (DHEA), 5 β -hydroxy-5-androsten-17-one), carbachol chloride (CCh), bradykinin (BK), ovalbumin (OVA), pancuronium bromide, aluminum hydroxide (Al(OH)₃), dimethylsulfoxide (DMSO), N^ω-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), propranolol ((RS)-1-(isopropilamino)-3-(naftalen-1-ilossi)propan-2-ol), salbutamol, the protein synthesis inhibitor (cycloheximide), the transcription inhibitor (actinomycin D), DHEA, Epostane, Bay K 8644, protein synthesis, and transcription inhibitors were dissolved in absolute ethanol to the concentration needed for each experiment; 10 μl aliquots were added to the 10 ml bath chambers, which never exceeded 0.5% (v/v) of vehicle, and the remaining drugs were dissolved in distilled water. Actinomycin D, salbutamol and BK were kept in the dark until use in order to avoid light-induced degradation.

3. Results

3.1. Effects of DHEA on isolated tracheal rings

DHEA in the concentration range of 9–200 μM fast and strongly inhibited the tone of the contraction induced by KCl and CCh as well as the tone of OVA-induced contraction in sensitized guinea pigs in a concentration-dependent manner, an effect observed within 2 min after each concentration was added (Fig. 1, top). After washout, the amplitude and tone of the next contraction induced by the respective agent, was completely recovered (data not shown), and thus, the DHEA action disappeared. These concentration–response curves did not significantly differ from those obtained in tracheal ring without epithelium (Fig. 1B and D), and from non-sensitized and sensitized animals (Fig. 1A, C and E). Regarding the sensitivity of each contraction to DHEA-induced relaxation, the IC_{50} values indicated that: OVA-induced contraction in sensitized animals was more sensitive than CCh-induced contraction in non-sensitized and sensitized animals, and these two last contractions turned out to be significantly more sensitive than KCl-induced contraction in non-sensitized and sensitized animals (Fig. 1F). However, the E_{max} values show that DHEA is more efficient to relax CCh-induced contraction in sensitized animals than KCl-induced contraction in non-sensitized animals and OVA-induced contraction in sensitized animals (Fig. 1F). The inhibition on the contraction tone induced by different agents reveals the ability of DHEA to induce relaxation in ASM. The vehicle used with the DHEA (0.1% EtOH latex) concentration did not significantly affect (<5.7% of relaxation, $n \geq 6$) the tone of KCl, CCh or OVA contraction, but the effect induced by DHEA was significantly different from the vehicle control ($P < 0.01$).

3.2. Effect of selected inhibitors on DHEA response

The importance of NO or β_2 -adrenoceptors in mediating DHEA-induced ASM relaxation was investigated by obtaining a series of complete concentration–response relationships on KCl- or CCh-induced contraction in tracheal rings with epithelium. In these experiments, pretreatment with the NO synthase inhibitor (L-NAME) or a β_2 adrenoceptor antagonist (propranolol) resulted in no significant differences when compared to the DHEA response curves ($P > 0.05$). In addition, the inhibitors of protein synthesis (cycloheximide) and transcription (actinomycin D) had no effect

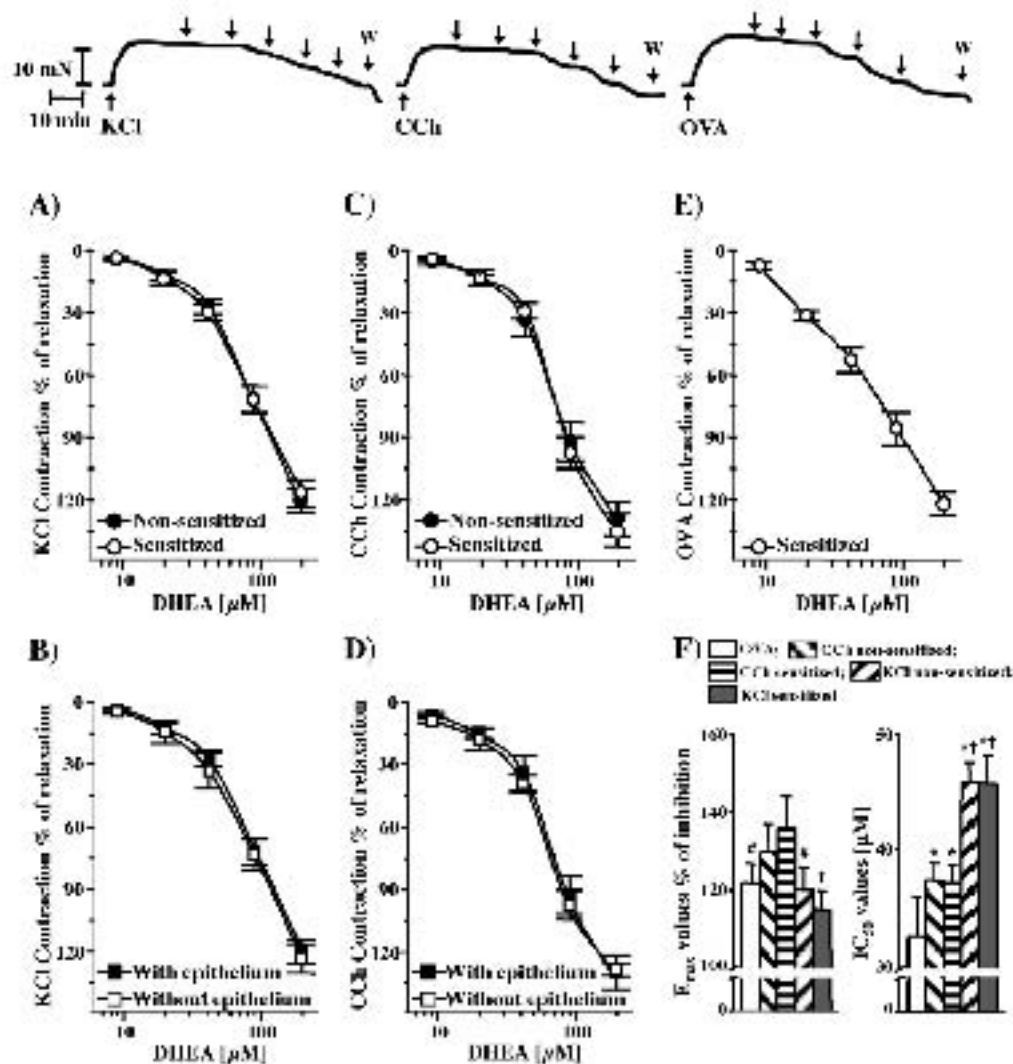


Fig. 1. Relaxing effect elicited by DHEA on different contractions in guinea pig tracheal smooth muscle. Upper panel, representative recordings of DHEA induced relaxation in tracheal rings on the tonic contraction elicited by: high potassium solution (KCl 60 mM); carbachol (CCh 0.3 μ M) and ovalbumin (OVA 1 μ M) in sensitized guinea pigs. Arrows indicate the DHEA addition at increasing concentrations (9, 20, 42, 91 and 200 μ M); W represents the time of washout with Krebs–Henseleit solution. Comparison of the concentration–response curves to DHEA on: (A) KCl induced contraction in non-sensitized vs. sensitized guinea pigs; (B) trachea with vs. without epithelium; (C) CCh induced contraction in non-sensitized vs. sensitized guinea pigs; (D) trachea with vs. without epithelium; and (E) OVA induced contraction in sensitized guinea pigs. (F) Maximal effect (E_{max}) and inhibitory concentration 50 (IC_{50}) values obtained from the concentration–response curves (A)–(E). Statistical significances: * $P < 0.05$ as compared with OVA; † $P < 0.05$ as compared with CCh in sensitized and non-sensitized animals; ‡ $P < 0.05$ as compared with CCh in sensitized animals. Each symbol or bar represents the mean \pm SEM ($n = 6$).

on the concentration–response curve to DHEA ($P > 0.05$). Similarly, pretreatment with the inhibitor of 3 β -HSD enzyme did not block the DHEA relaxing response ($P > 0.05$). Thus, with the exception of Bay K 8644 treatment ($P < 0.001$), identical concentration–response curves to DHEA were obtained with and without the remaining treatments ($P > 0.05$). Obviously, the IC_{50} and E_{max} values did not significantly differ from that obtained after each pretreatment (Table 1).

3.3. Effect of DHEA on influx Ca^{2+} through voltage-dependent Ca^{2+} channels

After tracheal rings depolarization with KCl Ca^{2+} solution, a tonic contraction was induced rapidly by $CaCl_2$, which was: (i) antagonized when tissues were pre incubated with DHEA; and (ii) reversible after washout (Fig. 2A). Fig. 2B shows that DHEA induced a concentration-dependent blockade on the $CaCl_2$ contractions in both non-sensitized and sensitized guinea pigs which were not significantly different ($P > 0.05$). DHEA at the highest concentration tested (91 μ M) induced a nearly complete prevention of $CaCl_2$ contractions (>98% of prevention in both non-sensitized

and sensitized, $n = 6$). For the sake of comparison, the prevention of $CaCl_2$ -induced contraction to DHEA turned out to be significantly higher than its inhibitory effect on KCl–CCh and OVA-induced contraction ($P < 0.05$). This finding reveals that DHEA is a powerful

Table 1
Maximal effect and IC_{50} values in tracheal rings with epithelium from non-sensitized animals in response to DHEA.

Contraction	Treatment	E_{max} (%)	IC_{50} (μ M)
CCh	Control	129.53 \pm 8.06	37.52 \pm 1.40
CCh	Progesterone	130.71 \pm 7.39	37.25 \pm 0.85
KCl	Control	120.04 \pm 5.86	45.84 \pm 1.77
KCl	1-NAME	121.66 \pm 8.07	45.59 \pm 0.86
KCl	Epostane	121.31 \pm 4.07	48.39 \pm 7.56
KCl	Lydheximide	122.62 \pm 7.45	46.19 \pm 2.55
KCl	Actinomycin	122.18 \pm 3.37	43.41 \pm 3.10
KCl	Bay K 8644	98.95 \pm 7.36*	60.48 \pm 5.03*

Values are mean \pm SEM; n = number of animals. Half inhibitory concentration (IC_{50}) and maximal effect (E_{max}) were obtained from the concentration–response curve to DHEA on CCh or KCl induced contraction with and without (control) tracheal rings.

* Value significantly different ($P < 0.001$) as compared with its control.

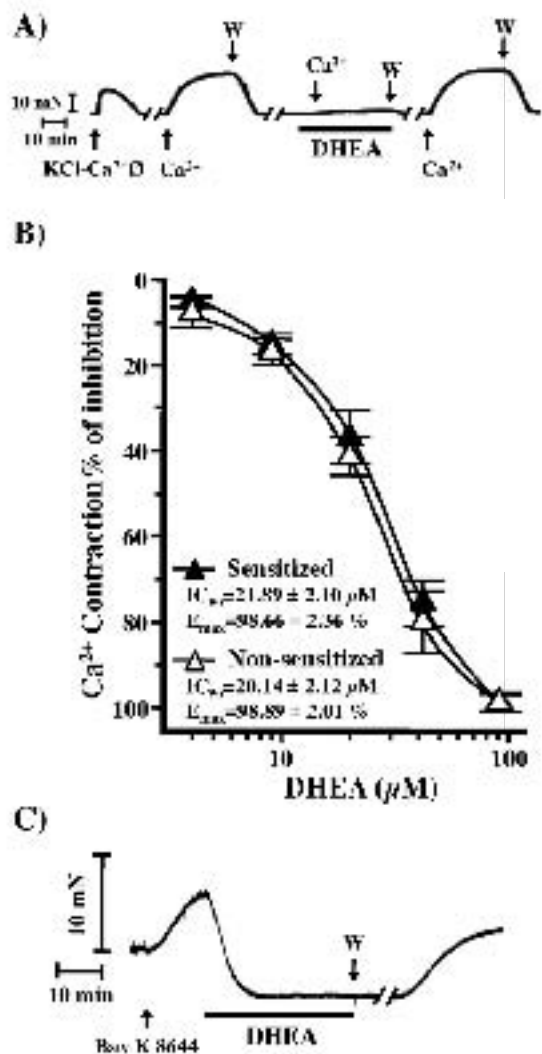


Fig. 2. Prevention of extracellular Ca^{2+} influx by DHEA. (A) DHEA antagonizes the contraction induced by 2.5 mM $CaCl_2$ (Ca^{2+}) in tracheal rings previously depolarized by KCl- Ca^{2+} free solution (KCl- Ca^{2+}). Ca^{2+} -induced contraction was completely prevented by DHEA at 91 μM ; the solid black line indicates the incubation time with DHEA; note the initial relaxation immediately after washout (W) with KCl- Ca^{2+} showing that the Ca^{2+} antagonistic effect of DHEA was reversible. (B) Concentration–response curves of the Ca^{2+} antagonistic effect of DHEA in non-sensitized and sensitized guinea pigs. Each point represents the mean \pm SEM ($n=6$); inhibitory concentration 50% (IC_{50}) and maximal effect (E_{max}) were expressed as the mean \pm SEM ($n=6$). (C) Typical recording of the contraction induced by 100 μM Bay K 8644 (1- μs VDC channel activation) and the immediate relaxing effect of DHEA at 300 μM . W indicates washout with normal Krebs-Henseleit solution.

Ca^{2+} antagonist. The final volume of DHEA vehicle (0.1% absolute ethanol) did not significantly prevent $CaCl_2$ -induced contraction (3.16 \pm 1.41% of prevention, $n=6$; $P>0.05$). Furthermore, tracheal preparations pre-incubated with Bay K 8644 shifted to the left the concentration–response curve to DHEA on KCl-induced contraction (data not shown); thus, the E_{max} and IC_{50} values were significantly different ($P<0.05$) when compared with that produced by DHEA alone (Table 1). Notably, DHEA at the concentration eliciting E_{max} induced an immediate relaxant effect on the Bay K 8644-induced contraction (>100% of relaxation, $n=6$), with a loss of the basal tone; subsequently, the tissues were washed out and the basal tone was recovered (Fig. 2C).

3.4. Lung resistance measurement in response to DHEA

Fig. 3A shows the time-course of change in R_L after the challenge with OVA in the sensitized guinea pigs. After 4 min of

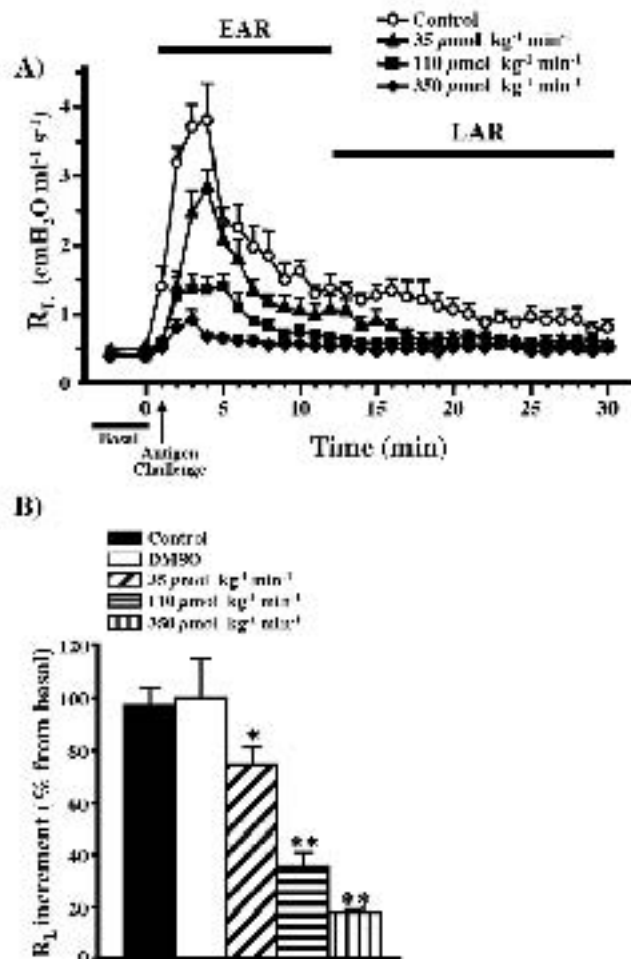


Fig. 3. Time- and dose-dependent effects of DHEA in lung resistance to antigen challenge induced by OVA in sensitized guinea pigs. (A) The different doses of DHEA were administered 30 min before the antigen challenge and evaluated during 30 min. Each dose was significantly different ($P<0.05$) as compared with OVA-induced bronchospasm in the absence of DHEA (control); R_L lung resistance. EAR, early asthmatic response; LAR, late asthmatic response. (B) Percent of diminution in R_L after 4 min of OVA-induced bronchospasm (EAR, acute phase of bronchospasm). $^{*}P<0.05$ and $^{**}P<0.01$ compared with the control and vehicle group. Each value represents the mean \pm SEM for 6 animals.

the challenge, an elevation of basal R_L value to 3.80 ± 0.54 cm H₂O ml⁻¹ s⁻¹; $n=6$ was observed as the maximal peak of bronchospasm (early asthmatic response; EAR) but 12 min later the R_L was decreased to 1.37 ± 0.21 cm H₂O ml⁻¹ s⁻¹ ($n=6$) and the basal R_L value was not recovered for 28 min (late asthmatic response; LAR); i.e., during this period the bronchospasm never returned to the basal R_L values. Pretreatment with DHEA was delayed (~2 min) and suppressed (25–80%) in a dose dependent manner the EAR (Fig. 3B). Furthermore, DHEA diminished (>25%) the LAR, which was completely abolished at the highest doses tested. It is important to note that bronchospasm prevention was not accompanied by significant changes in blood pressure and heart rate in any case (not shown for the sake of clarity).

4. Discussion

4.1. General

In previous studies, we have shown that DHEA is capable of inducing an acute uterine and vascular relaxation in animals and humans [31–33]. In the present study, we demonstrated that DHEA may also induce ASM relaxation, a new aspect of DHEA function. The data showed that in tracheal rings from non-sensitized

and sensitized animals, DHEA elicited a concentration-dependent ASM relaxing effect on contraction induced by KCl, CCh or OVA, as well as a marked preventive effect on the Ca^{2+} -induced contraction in KCl-depolarized tissues without Ca^{2+} . In addition, we also found that sensitized guinea pigs treatment with DHEA suppressed the bronchospasm by OVA in a dose-response manner. Taken together, these results indicated that DHEA is a "bronchorelaxant" steroid that induces an acute ASM relaxation. The present data permit the first direct analysis of the correlation between DHEA and ASM. The relaxation induced by DHEA was immediate in onset, occurring within 2 min, and reversible after washouts, suggesting a nongenomic (membrane) action rather than the classical steroid modulation of nuclear transcription. This proposal is strengthened by our findings that the relaxation response to DHEA was not modified by inhibitors of protein synthesis and transcription. With this background, the present study reports a nongenomic relaxing action of DHEA on ASM. In line with this view, several responses induced by DHEA have been characterized as nongenomically mediated, since a specific receptor protein had been identified or characterized for DHEA. Admittedly, it has been recently reported a membrane-bound receptor protein that interacts specifically with [3H]DHEA in endothelium, heart, liver, and kidney [35,36]. On the other hand, it has been suggested that the action of DHEA is thought to act after its biotransformation into active androgens or estrogens. However, in this study the relaxing effect of DHEA was unaffected in the presence of an inhibitor of the 3β -HSD, an essential enzyme in the biosynthesis of active estrogens and androgens. Therefore, this result pointed out that the intracrine transformation of DHEA is not needed to elicit bronchorelaxation. Consequently, DHEA is not just a metabolic intermediate in the pathway for the synthesis of androgens and estrogens. These data do not contradict the fact that the ASM relaxing effect is also elicited by androgens and estrogens [37–39] or by progestins [40].

Another key finding of the current study is that the bronchodilating effect of DHEA is operative *in vivo* since this steroid may prevent and retard the bronchospasm elicited by OVA in sensitized guinea pigs. This result is consistent with a previous report, where the combination of low doses of bacille Calmette-Guérin and DHEA had a synergistic effect in suppressing the development of airway hyperresponsiveness to methacholine in female mice [41]. Moreover, a clinical study has also shown that an inhaled suspension of DHEA-S delivered via nebulizer improved asthma control scores in subjects with poorly controlled moderate-to-severe asthma [42]. These lines of evidence and the present data suggest that DHEA is a bronchodilator that acts rapidly to alleviate bronchospasm, which could be therapeutically relevant in the treatment of asthma. Remarkably, we have now demonstrated that the prevention of bronchospasm by DHEA administered to OVA-sensitized guinea pigs about 35–350 $\mu\text{mol kg}^{-1}$ (equivalent to 0.01–0.1 mg kg^{-1}), are low compared to the 0.25–0.5 mg kg^{-1} of DHEA and DHEA-S secreted daily in humans [43].

4.2. Mechanism of human bronchodilating action of DHEA

In ASM cells, Ca^{2+} influx is mediated by different pathways including store-operated Ca^{2+} entry (SOCE), receptor-operated Ca^{2+} channel (ROCC) and VDCC [44]. In this context, we observed that KCl-induced contraction was completely inhibited by DHEA, implying a reduction of extracellular Ca^{2+} influx and also suggesting an antagonism on the VDCC. In line with this proposal, we found that DHEA prevented Ca^{2+} -induced contractions in tracheal rings depolarized by high KCl- Ca^{2+} -free solution. In agreement with these data, we observed that DHEA elicited a minor relaxation in the presence of Bay K 8644 which promotes calcium influx with receptors

on the VDCCs; likewise, DHEA strongly abolished the contraction elicited by Bay K 8644. On this basis, one would expect that the relaxation elicited by DHEA is a consequence of calcium entry blockade via VDCCs, probably by binding to dihydropyridine site. These results indicated that DHEA inhibited contractile responses of ASM to Ca^{2+} by blocking, at least in part, the VDCC. However, the fact that DHEA may also induce an acute relaxation on CCh- or OVA-induced contraction deserves further consideration. CCh induces cytosolic Ca^{2+} increase, which consists of an initial transient due to Ca^{2+} release from sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} stores and a subsequent sustained plateau due to extracellular Ca^{2+} influx. Therefore, DHEA may also block the SOCE and ROCC. On the other hand, the highlighted ability of DHEA to relax a bronchoconstriction immunologically induced (OVA-induced contraction in sensitized animals) pointed out that DHEA plays an important role in the functional regulation of ASM. The mechanism of action to relax OVA-induced contraction by DHEA is difficult to explain due to the fact that, upon OVA challenge, the sensitized guinea pig trachea releases histamine, peptidoleukotrienes, thromboxane A_2 , tumoral necrosis factor (TNF- α), serotonin, and prostaglandins PGD_2 and PGI_2 , among the most relevant. Interestingly, we observed that nifedipine at 1 μM (a concentration enough to block the VDCC) induced less than 10% of relaxation on OVA-induced contraction whereas DHEA induced a complete inhibition of this contraction. In this respect, we cannot rule out that this relaxing effect may employ additional mechanisms such as a blockade of SOCE and ROCC, which play an important role in the functional regulation of ASM and contribute to agonist-induced intracellular Ca^{2+} increment and tracheal contraction, as reported to be the case for acetylcholine-induced contraction [45]. On these bases, further studies are needed to define the Ca^{2+} -dependent regulation of DHEA to induce bronchodilation on ASM.

On the other hand, no difference was found in sensitivity to DHEA between non-sensitized and sensitized guinea pigs, suggesting that the pathological status might not be an important factor for the relaxing effect induced by DHEA. Thus, both non-sensitized (non-asthmatic) and sensitized (asthmatic) ASM are targets of DHEA's relaxing action. We also observe that the tracheal rings remained unaltered after epithelium removal; this finding strongly suggested an epithelium independent action. Likewise, as expected, L-NAME did not block DHEA-induced relaxation in ASM. Therefore, DHEA inhibits ASM tone *via* epithelium- and NO-independent mechanism. These findings agree with the epithelium- and NO-independent relaxing response which are elicited by the product of DHEA metabolism, testosterone and dihydrotestosterone, in isolated the guinea pig and the bovine trachea [37]. Nevertheless, these results are not in line with a previous study in the isolated rabbit trachea [38], in which testosterone elicits relaxation *via* epithelium- and NO-mediated way. The reason for this discrepancy may be related to differences between the steroid studied and perhaps species. Our results are consistent with the response of DHEA in vascular smooth muscle by producing an endothelium- and NO-independent vasorelaxation in human umbilical artery [32]. We also exclude a possible interaction of DHEA with β_2 adrenoreceptors because the β_2 antagonist, propranolol, did not block the relaxing effect of DHEA.

Admittedly, μM concentrations of DHEA were tested in the *in vitro* experiments of the present study but by its nature, DHEA and other steroids are high hydrophobic substances, and are applied at rather high concentrations in isolated tissues. Consequently, μM concentrations are accepted in this type of experiments, which is consistent with previous findings indicating that in isolated guinea pig trachea, physiological levels of cortisol (around 150 μM) induces bronchodilation by synergizing with the relaxing action produced by a β_2 -agonist through the nongenomic pathways of glucocorticoids [46].

4.3. Possible physiological and clinical implications

Indeed, it is important to consider that there is a correlation between the onset time of nonallergic asthma and the DHEA levels. DHEA levels are very high in the umbilical cord and in first day of life but these levels decrease progressively over the next 6 months and remain very low for the first 6 years of life; thus, asthma symptoms may be partly attributed to the lowest DHEA levels during the first 6 years of life, particularly in boys. Afterward, plasmatic DHEA levels begin an abrupt rise and continue to increase until peaking at 20–30 years [47,48], when, in men, severity of asthma is relatively stable from puberty until reaching the age of 30. Remarkably, it has been observed that nonallergic asthma usually occurs in the second half of life: initially around the age of 40 years [49], the time when circulating DHEA starts to decline. Therefore, a fall in serum DHEA may be considered at least as partly accountable for the asthma symptoms. This suggestion correlates well with the observation that the levels of DHEA and DHEA-S are reduced in patients with asthma [22–24]; hence, in asthma, it may be desirable to at least restore this hormone level, which may be considered as DHEA replacement therapy after middle age to prevent or attenuate asthma symptoms.

The age-related decline in DHEA has been implicated in the high incidence of cardiovascular and neurodegenerative diseases, cancer, diabetes, obesity, stress, viral and bacterial infections, and in overall mortality [50,51]. Notably, DHEA and DHEA-S have important immunomodulating effects on animal and humans [52,53]. Thus, DHEA ameliorates inflammatory responses in a number of experimental systems [reviewed by [21]]. In addition, a recent study has reported that DHEA-S inhibited chemotaxis of both human neutrophils and ASM cells, suggesting that DHEA-S may attenuate airway inflammation and cell migration [54]. Taken together, the immunomodulating property of DHEA plus the acute bronchorelaxing effect, that we here reported, this study provides some basic fundaments for our understanding of asthma pathophysiology and the role that DHEA plays in this process.

Conflict of interest

The authors have declared no conflict of interest.

Acknowledgments

This study was supported by Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica/Dirección General de Asuntos del Personal Académico Grant no. IN205511-3 to M. Perusquia. We thank Dr. Bettina Sommer for her English correction of this manuscript. J. Espinoza is a Ph.D. student in M. Perusquia laboratory, who is registered in a graduate research degree program (Doctorado en Ciencias Biológicas, UNAM) and supported by a fellowship from CONACYT (225722).

References

[1] M.R. Berkline, E. Kazilman, Gender differences in airway behaviour over the human life span, *Thorax* 54 (1999) 1114–1138.
 [2] J.R. Dummer, The epidemiology and natural history of asthma, *Clinics in Chest Medicine* 5 (1984) 557–565.
 [3] E. Kjellman, P.M. Gustafsson, Asthma from childhood to adulthood: asthma severity, allergies, sensitization, living conditions, gender influence and socio-economic issues, *Respiratory Medicine* 94 (2000) 454–465.
 [4] L.K. Niman, C. Russell, Respiratory symptoms and allergy in Aberdeen schoolchildren: evidence from two surveys 25 years apart, *BMJ* 304 (1992) 873–875.
 [5] M. Osman, Therapeutic implications of sex differences in asthma and allergy, *Archives of Disease in Childhood* 88 (2003) 587–590.
 [6] M.R. Sears, Epidemiology of childhood asthma, *Lancet* 330 (1987) 1015–1020.
 [7] The International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC) Steering Committee, Worldwide variations in the prevalence of asthma symptoms: the International Study of Asthma and Allergies in Childhood (ISAAC). *The European Respiratory Journal* 12 (1998) 315–335.

[8] E.A. Townsend, V.M. Miller, Y.S. Prakash, Sex differences and sex steroids in lung health and disease, *Endocrine Reviews* 33 (2012) 1–47.
 [9] M.J. von, T. Nivala, B.D. Martinez, Prematurity as a risk factor for asthma in preschool-aged children, *Journal of Pediatrics* 125 (1993) 227–230.
 [10] K. Zanotti, G. Morgese, Does puberty interfere with asthma? *Medical Hypotheses* 48 (1997) 27–32.
 [11] C. Almqvist, M. Wilén, B. Tegstedt, Impact of gender on asthma in childhood and adolescence: a GAZLEN review, *Allergy* 63 (2008) 67–77.
 [12] W. Chen, M. Meupel, W. Scheiber, H. Behrendt, J. Ring, Gender difference, sex hormones, and immediate type hypersensitivity reactions, *Allergy* 63 (2008) 1418–1427.
 [13] R. De Marco, F. Locatelli, J. Sanger, P. Burney, Differences in incidence of reported asthma related to age in men and women. A retrospective analysis of the data of the European Respiratory Health Survey, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 162 (2000) 60–74.
 [14] Y.H. Jeon, H.J. Yang, B.Y. Pyun, Lung function in Korean adolescent girls: its association with obesity and the menstrual cycle, *Journal of Korean Medical Science* 24 (2009) 20–25.
 [15] S.H. Weiger, A. Kay, M.Z. Hylkema, W. Timens, D.S. Postma, Are there reasons why adult asthma is more common in females? *Current Allergy and Asthma Reports* 7 (2007) 143–150.
 [16] P. Panfili, I. Carozzi, C. Viegi, P. Modena, I. Ballone, P.T. Di, T. Grada, S. Balducci, M. Pecorella, M. Velluto, Distribution of bronchial responsiveness in a general population: effect of sex, age, smoking, and level of pulmonary function, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* 151 (1995) 1770–1777.
 [17] D.S. Postma, Gender differences in asthma: development and progression, *Gender Medicine* 4 (Suppl. 8) (2007) S133–S146.
 [18] G. Cargnini, S. Alhajryak, Do low testosterone levels contribute to the pathogenesis of asthma? *Medical Hypotheses* 76 (2011) 580–588.
 [19] W.E. Rainey, R.R. Carr, H. Sasano, T. Suzuki, J.L. Mason, Dissecting human adrenal androgen production, *Trends in Endocrinology & Metabolism* 13 (2002) 234–239.
 [20] S. Saffman, A. Guay, Dehydroepiandrosterone therapy as female androgen replacement, *Seminars in Reproductive Medicine* 24 (2006) 97–105.
 [21] A.M. Traish, H.P. Kang, F. Saad, A.L. Guay, Dehydroepiandrosterone (DHEA): a precursor steroid in an active hormone in human physiology, *Journal of Sexual Medicine* 8 (2011) 2960–2982.
 [22] H.E. Weinstock, C.A. Lapocki, S. Gravett, H. Hum, B. Neegrich, L. Herber, D. Gooding, D.R. Piquet, Testosterone/adrenal sex steroid levels in the absence of glucocorticoid suppression in postmenopausal asthmatic women, *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 117 (2006) 1–8.
 [23] P.J. Dunn, C.B. Mahood, J.F. Speed, D.R. Jung, Dehydroepiandrosterone sulphate concentrations in asthmatic patients: pilot study, *New Zealand Medical Journal* 97 (1984) 805–808.
 [24] K.G. Teher, F. Koh, T. Teher, Adrenocortical function in bronchial asthma, *Acta Medica Hungarica* 40 (1983) 125–131.
 [25] N.C. Karalus, C.B. Mahood, P.J. Dunn, J.F. Speed, Adrenal function in acute severe asthma, *New Zealand Medical Journal* 98 (1985) 843–846.
 [26] A. Kasperka-Jajac, Asthma and dehydroepiandrosterone (DHEA): facts and hypotheses, *Inflammation* 32 (2010) 320–324.
 [27] C.K. Yu, B.C. Yang, H.Y. Lei, Y.C. Chen, Y.H. Liu, C.C. Chen, C.W. Liu, Attenuation of house dust mite (*Dermatophagoides farinae*-induced airway allergic responses in mice by dehydroepiandrosterone is correlated with down-regulation of Th2 response, *Clinical & Experimental Allergy* 29 (1999) 414–422.
 [28] C.K. Yu, Y.H. Liu, L.L. Chen, Dehydroepiandrosterone attenuates allergic airway inflammation in *Dermatophagoides farinae*-sensitized mice, *Journal of Microbiology, Immunology and Infection* 35 (2002) 199–202.
 [29] J.S. Choi, Y. Kim, Y.A. Kim, H.L. Lee, Y.R. Cho, Y.H. Won, Effects of dehydroepiandrosterone on Th2 cytokine production in peripheral blood mononuclear cells from asthmatics, *Korean Journal of Internal Medicine* 23 (2008) 176–181.
 [30] M.D. Kashefi, T. Grzelewski, M. Pietruczuk, K. Lewandowska, I. Stelmach, The pattern of glucocorticosteroids and selected new therapies for the management of asthma in children, *Recent Patents on Inflammation & Allergy Drug Discovery* 5 (2011) 57–65.
 [31] M. Perusquia, E. Navarro, J. Jasso-Kama, I.M. Monrroy, Androgens induce relaxation of contractile activity in pregnant human myometrium at term: a genomic action on L-type calcium channels, *Biology of Reproduction* 75 (2016) 214–221.
 [32] M. Perusquia, E. Navarro, I. Gonzalez, C.M. Villalon, The modulatory role of androgens and progesterin in the induction of vasorelaxation in human uterine artery, *Life Sciences* 81 (2007) 995–1002.
 [33] M. Perusquia, E. Calisto, Non-genomic action of dehydroepiandrosterone on vesicular time and intracellular calcium, in: *Gagliardi, F.I. (Ed.) Recent Research in Development in Life Sciences*, vol. 4, Research Signpost, India, 2008, pp. 141–152.
 [34] A.M. Bramley, M.H. Samraoui, F.J. Piper, Effects of theophylline in modulating the responses of guinea pig trachea induced by bradykinin *in vitro*, *British Journal of Pharmacology* 99 (1990) 762–766.
 [35] D. Liu, J.S. Dillon, Dehydroepiandrosterone activates endothelial cell nitric oxide synthase by a specific plasma membrane receptor coupled to G $\alpha_{i2/3}$, *Journal of Biological Chemistry* 277 (2002) 21375–21388.
 [36] L. Liu, J.S. Dillon, Dehydroepiandrosterone stimulates nitric oxide release in vascular endothelial cells: evidence for a cell surface receptor, *Stress* 9 (2004) 279–289.

- [37] J. Boncalo, M.J. de Bato, C. Meana, J. Velasco, C. Bardales, L. Suarez, B. Cantabrana, M. Sanchez, Modulatory role of endogenous androgens on airway smooth muscle tone in isolated guinea pig and bovine trachea; involvement of beta2-adrenoceptors, the polyamine system and external calcium. *European Journal of Pharmacology* 607 (2008) 154–162.
- [38] V. Koukounara, A. Hatzefthimiou, E. Paraskeva, K. Georgoulakis, T.A. Molyvdas, Non-genomic effect of testosterone on airway smooth muscle. *British Journal of Pharmacology* 149 (2006) 1083–1091.
- [39] Z.A. Townsend, M.A. Thompson, C.M. Pabelnick, V.S. Prakash, Rapid effects of estrones on intracellular Ca^{2+} signaling in human airway smooth muscle. *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology* 298 (2010) 1573–1580.
- [40] M. Perusquia, R. Hernandez, L.M. Montano, C.M. Villalon, M.G. Campus inhibitory effect of sex steroids on guinea-pig airway smooth muscle contractions. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 118 (1997) 5–10.
- [41] Y. Cai, L.S. Cho, Y.A. Koh, X.F. Lin, Y.R. Cho, Y.H. Woo, Effects of combined BCG and DHEA treatment in preventing the development of asthma. *Immunological Investigations* 37 (2008) 191–200.
- [42] S.E. Weazel, C.B. Robinson, J.M. Leonard, R.A. Panettieri Jr., Nebulized dehydroepiandrosterone 3-sulfate improves asthma control in the moderate-to-severe asthma results of a 6-week, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Allergy & Asthma Proceedings* 31 (2010) 461–471.
- [43] C.H. Williams, R.G. Duthy, Disorders of the adrenal cortex, in: L. Braunzel, et al. (Eds.), *Harrison's Principles of Internal Medicine*. McGraw-Hill, Toronto, 2001, pp. 2084–2105.
- [44] L.F. Perez-Zoghbi, C. Kamei, S. Ito, M. Shepherd, Y. Alrasidan, M.J. Sanderson, Ion channel regulation of intracellular calcium and airway smooth muscle function. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 22 (2009) 366–397.
- [45] J.M. Dai, R.-H. Kuo, J.M. Lee, R.C. van, L.H. Lee, Mechanism of ACh-induced synchronous calcium waves and tonic contraction in porcine tracheal muscle bundle. *American Journal of Physiology – Lung Cellular and Molecular Physiology* 290 (2006) L459–L465.
- [46] C. Wang, Y.J. Li, Y.Q. Zheng, B. Jeng, Y. Liu, J.M. Cao, Glucocorticoid decreases airway tone via a nongenomic pathway. *Respiratory Physiology & Neurobiology* 183 (2012) 10–14.
- [47] Z. de Peretti, M.G. Forest, Pattern of plasma dehydroepiandrosterone sulfate levels in humans from birth to adulthood: evidence for testicular production. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 47 (1978) 572–577.
- [48] N. Orentreich, J.L. Brind, J.H. Vogelman, R. Andres, H. Baldwin, Long-term longitudinal measurements of plasma dehydroepiandrosterone sulfate in normal men. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 75 (1992) 1002–1004.
- [49] C. Kroegel, L. Jogan, C. Walker, Is there a place for intrinsic asthma as a distinct immunopathological entity? *European Respiratory Journal* 10 (1997) 510–515.
- [50] N. Orentreich, J.L. Brind, R.L. Klein, J.H. Vogelman, Age changes and sex differences in serum dehydroepiandrosterone sulfate concentrations throughout adulthood. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 59 (1984) 551–555.
- [51] W. Segeblom, K. Loria, M. Kalina, Hormonal intervention: buller hormones or state dependency. The role of dehydroepiandrosterone (DHEA), thyroid hormone, estrogen and hypophysectomy in aging. *Annals of the New York Academy of Sciences* 521 (1988) 260–273.
- [52] J.R. Carson, R.N. Anderson, H.G. Horro, F.B. Stentz, A.J. Straight, C.C. Abraham, J.E. Buster, Oral dehydroepiandrosterone in physiologic doses modulates immune function in postmenopausal women. *American Journal of Obstetrics & Gynecology* 169 (1993) 1536–1539.
- [53] Z.A. Deynes, D.J. Dudley, R.A. Aronow, Regulation of murine lymphokine production in vivo. II. Dehydroepiandrosterone is a natural enhancer of interleukin 2 synthesis by helper T cells. *European Journal of Immunology* 20 (1990) 793–802.
- [54] C.J. Cox-White, E.A. Gorcharova, G. Cao, M. Johnston, V.P. Krymskaya, R.A. Panettieri Jr., DHEA-S inhibits human neutrophil and human airway smooth muscle migration. *Biophysical Research Letters* 1822 (2012) 1638–1642.