



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA.

SECCIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN.

**EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE AROMATASA
EN CÉLULAS ENDOTELIALES
MICROVASCULARES CORONARIAS DE
RATA EN CULTIVO.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN
INVESTIGACIÓN EN MEDICINA.**

P R E S E N T A:

M EN C. José Alfredo Sierra Ramírez.



MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2004



INSTITUTO POLITECNICO NACIONAL

ESCUELA SUPERIOR DE MEDICINA.

SECCIÓN DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN.

**EXPRESIÓN Y ACTIVIDAD DE AROMATASA
EN CÉLULAS ENDOTELIALES
MICROVASCULARES CORONARIAS DE RATA
EN CULTIVO.**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS EN INVESTIGACIÓN EN
MEDICINA.**

P R E S E N T A

M EN C. José Alfredo Sierra Ramírez.

MÉXICO, D.F.

JUNIO, 2004

ESTA TESIS FUE REALIZADA EN EL LABORATORIO
MULTIDISCIPLINARIO DE LA SECCIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN DE LA ESCUELA
SUPERIOR DE MEDICINA DEL INSTITUTO POLITÉCNICO
NACIONAL, BAJO LA DIRECCIÓN DEL

DR. GUILLERMO M. CEBALLOS REYES

La comprensión humana no es simple luz sino que recibe infusión de la voluntad y los afectos; de donde proceden ciencias que pueden llamarse <<ciencias a discreción>>. Porque el hombre cree con más disposición lo que preferiría que fuera cierto. En consecuencia rechaza cosas difíciles por impaciencia en la investigación; silencia cosas, porque reducen las esperanzas; lo más profundo de la naturaleza, por superstición; la luz de la experiencia, por arrogancia y orgullo; cosas no creídas comúnmente, por deferencia a la opinión del vulgo. Son pues innumerables los caminos, y a veces imperceptibles, en que los afectos colorean e infectan la comprensión.

Francis Bacon,
Novum Organon (1620)

... con frecuencia la ignorancia engendra más confianza que el conocimiento: son los que saben poco, y no los que saben mucho, los que aseveran positivamente que éste o aquel problema nunca será resuelto por la ciencia.

Charles Darwin,
Introducción, La descendencia del hombre (1871)

“Bajo la luz del entendimiento los fantasmas desaparecen...”

Anónimo griego.

AGRADECIMIENTOS.

A MI FAMILIA. Como un testimonio de gratitud y eterno reconocimiento, por el apoyo que siempre me han brindado.

Gracias al Instituto Politécnico Nacional por haberme formado tanto profesional como personalmente.

A mis maestros por haber compartido conmigo su tiempo, sus conocimientos y su amistad.

A mis compañeros y amigos por mostrarme mis errores y siempre estar dispuestos a apoyarme.

Con cariño, admiración y respeto a MIS PADRES;
Nicolasa Ramírez Arellano y Domingo Sierra Campos (en paz descansen)
por su apoyo incondicional a lo largo de mi vida, porque con sus ejemplos y enseñanzas me permitieron ser lo que soy. Gracias.

Y muy especialmente al Dr. Guillermo Manuel Ceballos Reyes por su amistad, sus consejos, sus enseñanzas y su apoyo para llevar a buen término mi formación profesional.

Por ser un modelo a seguir para muchas generaciones de estudiantes.

INDICE.

GLOSARIO. -----	<i>iv</i>
RELACION DE CUADROS Y FIGURAS. -----	<i>vii</i>
RESUMEN. -----	<i>xiii</i>
ABSTRACT -----	<i>xv</i>
INTRODUCCION. -----	<i>1</i>
<i>Controversias de la terapia hormonal de reemplazo.</i> -----	<i>2</i>
<i>Efecto de los estrógenos sobre el sistema cardiovascular.</i> -----	<i>6</i>
<i>Receptores estrogénicos.</i> -----	<i>7</i>
<i>Andrógenos y Enfermedades Cardiovasculares.</i> -----	<i>10</i>
<i>Receptor Androgénico.</i> -----	<i>13</i>
<i>Acción genómica de los esteroides.</i> -----	<i>15</i>
<i>Efectos esteroideos no genómicos.</i> -----	<i>16</i>
<i>Receptores asociados con acciones no genómicas de los estrógenos.</i> -----	<i>18</i>
<i>Acciones no genómicas de los andrógenos en el sistema cardiovascular.</i> -----	<i>20</i>
<i>Activación metabólica de la testosterona.</i> -----	<i>22</i>
<i>Efecto del 17β-estradiol y la testosterona en la cinética intracelular de calcio.</i> -----	<i>27</i>
<i>Endotelio vascular como un órgano endocrino.</i> -----	<i>29</i>
JUSTIFICACIÓN. -----	<i>33</i>
HIPÓTESIS. -----	<i>36</i>

OBJETIVO GENERAL. -----	37
OBJETIVOS ESPECIFICOS. -----	37
MATERIAL Y METODOS. -----	38
<i>Aislamiento y cultivo de células endoteliales microvasculares coronarias</i>	
<i>de rata macho y hembra.</i> -----	38
<i>Caracterización.</i> -----	38
<i>Protocolo experimental para la cuantificación de las concentraciones</i>	
<i>intracelulares de calcio.</i> -----	39
<i>Efectos del 17β-estradiol sobre la concentración intracelular de calcio.</i> ---	40
<i>Efectos de la Testosterona sobre la concentración intracelular de calcio.</i> --	40
<i>Efecto del U73122 sobre las respuestas de Testosterona y 17β-estradiol.</i> --	40
<i>Ensayos inmunocitoquímicos para análisis de expresión de Receptores</i>	
<i>α-Estrogénico (αER) y Androgénico (AR).</i> -----	40
<i>Efecto de los inhibidores específicos de Aromatasa (P450_{AROM})</i>	
<i>sobre las respuestas de Testosterona.</i> -----	41
<i>Ensayos inmunocitoquímicos para aromatasa.</i> -----	41
<i>Preparación de los homogenizados de CEMC's de rata que contienen</i>	
<i>aromatasa.</i> -----	42
<i>Inmunoblot.</i> -----	42
<i>Hibridación in situ.</i> -----	43
<i>Preparación de microsomas placentarios que contienen aromatasa.</i> -----	44
<i>Análisis de la actividad de aromatasa.</i> -----	44

<i>Análisis estadístico.</i> -----	45
RESULTADOS. -----	46
DISCUSIÓN. -----	62
BIBLIOGRAFÍA. -----	77
ARTICULO. -----	90
<i>“Acute effects of testosterona on intracellular Ca²⁺ kinetics in rat coronary endothelial cells are exerted via aromatization to estrogens”.</i>	

GLOSARIO.

ECV	Enfermedades Cardiovasculares.
T	Testosterona.
E₂	17β-Estradiol.
LDL	Lipoproteínas de baja densidad.
HDL	Lipoproteínas de alta densidad.
ON	Oxido Nítrico.
eNOS	Sintasa de oxido nítrico endotelial.
Bradicinina.	Nonapéptido con efecto vasodilatador, Actua como un agonista de actividad endotelial.
HERS	The Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study.
ERA	The Estrogen and Atherosclerosis Trial.
WHI-HRT	The women's Health Initiative Hormone Replacement Trial.
ERα	Receptor alfa estrogénico.
ERβ	Receptor beta estrogénico.
ERm	Receptor estrogénico membranal.
AR.	Receptor androgénico.
RNA_m	Acido ribonucleico mensajero.
DNA	Acido desoxirribonucleico.
PKA	Protein Cinasa A.
PKC	Protein Cinasa C.
[Ca²⁺]_i	Concentración intracelular de calcio.
TIF's	factores intermediarios de trascripción.
hps90	Proteína de choque térmico 90.
hps70	Proteína de choque térmico 70.
hps56	Proteína de choque térmico 56.
ERH	Elementos de respuesta a la hormona.
AMPc	Adenosin-monofosfato cíclico.

MAPK	Protein cinasa activada por mitógenos.
SHGB	Globulinas de unión a hormonas sexuales.
Shaer-Stress	Inducción por fuerzas de roce.
GMPc	Guanosin-monofosfato cíclico.
DHEA	Dehidroepiandrostendiona.
DHT	Dihidrotestosterona.
P450_{AROM}	Enzima Aromatasa, Hemo-proteína perteneciente a la superfamilia de citocromo P450.
CYP 19	Gen que codifica para P450 _{AROM} .
PLC_β	Fosfolípasa C _β .
PIP₂	4,5-difosfato de fostatidilinositol.
IP₃	Inositol trifosfato.
DGA	Diacilglicerol.
vWf	Factor de von Willebrand.
VCAM-1	Molécula-1 de adhesión celular vascular.
ICAM-1	molécula-1 de adhesión intracelular.
CEMC	Células endoteliales microvasculares coronarias.
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Médium.
SFB	Suero fetal Bovino.
Fura-2AM	Agente Fluorescente quelante de calcio (forma acetoximetil ester).
PBS	Buffer salino de fosfatos.
SDS	Dodecil sulfato de sodio.
S	Sobrenadante.
P	Pellet.
DNasa	Enzima hidrolítica de DNA.
RNasa	Enzima hidrolítica de RNA.
MgCl₂	Cloruro de magnesio.
β-NADPH	Forma reducida del fosfato de nicotinamida adenindinucleotido.

mM	Concentración milimolar ($1 \times 10^3 \text{ M}$)
μM	Concentración micromolar ($1 \times 10^6 \text{ M}$)
nM	Concentración nanomolar ($1 \times 10^9 \text{ M}$)
ANOVA	Análisis de variancia.
SEM	Error estándar.
N	Numero de muestra (células).
U73122	Aminoesteroide con estructura similar a esteroides sexuales, inhibidor específico de PLC β .
kDa	Unidad de medida de la masa molecular. (kilo-Daltons).
ICI 182,780	Antiestrógeno puro (derivado 7α substituido del E $_2$).
BSA	Albúmina serica bovina.
HUVEC	Células endoteliales de vena umbilical humana.

RELACION DE CUADROS Y FIGURAS.

Figura 1. Efectos cardiovasculares directos e indirectos (metabolismo de lípidos) de los estrógenos.

Figura 2. Imagen cristalográfica del receptor α -estrogénico. Dímero unido con dos moléculas de su ligando (17β -estradiol, amarillo).

Figura 3. Representación esquemática de los dominios estructurales de los receptores estrogénicos nucleares. El dominio A/B en el extremo amino terminal contiene el sitio AF-1, en donde interactúa con otros factores transcripcionales. El dominio C/D contiene dos estructuras denominadas “dedos de zinc” que se unen al DNA, y el dominio E/F contienen los sitios de unión a ligando así como el dominio AF-2 que entra en contacto directo con pépticos coactivadores.

Figura 4. Cristalografía de rayos X del receptor androgénico unido con su ligando (testosterona, azul).

Figura 5. Integración de las acciones genómicas y no genómicas de las hormonas esteroides.

Figura 6. Rutas de acción de la testosterona. En hombres, la mayoría de la testosterona (95%) se produce bajo la estimulación de la hormona luteinizante (LH) a través de un receptor específico acoplado a proteínas G localizado en la superficie membranal de las células esteroidogénicas de Leydig. La producción diaria de testosterona (5-7mg) queda disponible para seguir una de las 4 principales vías.

Figura 7. Organización genómica del gen CYP19 humano. El exon I corresponde a una región no codificada del gen y solo presenta funciones regulatorias.

Figura 8. Biosíntesis de hormonas sexuales esteroideas: **(1)** Sulfatasa, **(2)** Sulfa-transferasa, **(3)** Enzima de corte de la cadena lateral Citocromo P₄₅₀ (P450_{C_{scc}}), **(4)** 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD), **(5)** Sistema enzimático 17α-hidroxilasa / 17,20 liasa (P450_{C₁₇} o P450_{17α}), **(6)** 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β-HSD), **(7)** 5α-reductasa, **(8)** Aromatasa (estrógeno sintasa).

Figura 9. Trazo representativo del incremento en la concentración de calcio intracelular inducido por testosterona y bradicinina en células endoteliales de aorta de rata. La testosterona no tiene un efecto directo sobre la cinética [Ca²⁺]_i (círculos grises). Los círculos llenos muestran la cinética [Ca²⁺]_i inducida por bradicinina. La incubación de las células con testosterona (1μM x 30s) bloquea el efecto inducido por bradicinina y modifica la segunda fase de la cinética (triángulos). Esta segunda fase es abolida en ausencia de calcio extracelular (círculos vacíos).

Figura 10. Trazo representativo del incremento en la concentración intracelular de calcio ([Ca²⁺]_i) inducido por 17β-Estradiol (E₂) y Testosterona en células endoteliales microvasculares coronarias (CEMC) de rata macho y hembra en cultivo, cargadas con Fura-2. Las líneas continua y punteada muestran la cinética [Ca²⁺]_i inducida por testosterona (1nM) y E₂ (1nM) respectivamente. La flecha representa el tiempo de adición de testosterona o E₂.

Figura 11. Efecto del 17β-Estradiol (E₂) sobre la concentración intracelular de calcio ([Ca²⁺]_i) en CEMC de rata macho y hembra, en el que se consideró el incremento máximo alcanzado en la fase de espiga de la cinética [Ca²⁺]_i inducida por la aplicación de E₂ [0.01nM a 1μM]. La gráfica muestra un comportamiento dependiente de la concentración, de forma bifásica (campana). Cada punto de la gráfica representa 6 experimentos. Los valores son expresados como media ± SEM (n=25, por cada experimento). No existieron diferencias estadísticas significativas entre las respuestas a E₂ en las CEMC de rata macho y hembra.

Figura 12. Efecto de la testosterona (T) sobre la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$) en CEMC de rata macho y hembra, en el que se consideró el incremento máximo alcanzado en la fase de espiga de la cinética $[Ca^{2+}]_i$ inducida por la aplicación de T [0.01nM a 1 μ M]. La grafica muestra un comportamiento dependiente de la concentración. Cada punto de la grafica representa 6 experimentos. Los valores son expresados como media \pm SEM (n=25, por cada experimento). No existieron diferencias estadísticas significativas entre las respuestas inducidas por T en CEMC de rata macho y hembra.

Figura 13. Imagen confocal (Sistema Confocal Modelo TCS SP2, Marca LEICA) de la expresión de los receptores; androgénico (AR) y alfa estrogénico (ER α) en células endoteliales microvasculares coronarias (CEMC) de rata macho y hembra. Se localizó intensa reactividad inmunocitoquímica para ER α (Verde, marcaje con fluoresceína, FICT) en la periferia celular y a nivel citoplasmático. También se observó inmunoreactividad para AR (Rojo, marcaje con rodamina) localizada únicamente a nivel citoplasmático. La co-expresión de ER α y AR (amarillo) se localizó solo en el compartimiento citoplasmático. No existieron diferencias en CEMC de rata macho y hembra.

Figura 14. Trazo representativo de los efectos de la Testosterona (1nM) y el 17 β -Estradiol (1nM) sobre el incremento en $[Ca^{2+}]_i$ en presencia del inhibidor específico de la enzima fosfolípasa C β (PLC), U73122 (1 μ M), en CEMC de rata macho y hembra. Los efectos inducidos por Testosterona y 17 β -Estradiol fueron abolidos con el U73122, este efecto no se debió a la depleción de los depósitos intracelulares de calcio, ya que la adición de caféina (20mM), 4min después de la estimulación con el esteroide sexual, induce un incremento rápido en $[Ca^{2+}]_i$. El U73122 no produce incrementos en $[Ca^{2+}]_i$ por si mismo. No existieron diferencias entre las respuestas de CEMC de rata macho y hembra.

Figura 15. Trazo representativo de los efectos de la Testosterona (1nM) sobre el incremento en $[Ca^{2+}]_i$ en presencia del inhibidor específico de la enzima Aromatasa, aminoglutetimida (4 μ M), en CEMC de rata macho y hembra.

El efecto inducido por la Testosterona fue abolido por la aminoglutetimida, este efecto no se debió a la depleción de los depósitos intracelulares de calcio, ya que la aplicación de E₂ (1nM) induce un incremento rápido en [Ca²⁺]_i. La aminoglutetimida no afecta la [Ca²⁺]_i por si misma.

Figura 16. Trazo representativo de los efectos de la Testosterona (1nM) sobre el incremento en [Ca²⁺]_i en presencia del inhibidor específico de la enzima Aromatasa, 4-hidroxiandrostenediona (4μM), en CEMC de rata macho y hembra. El efecto inducido por la Testosterona fue abolido en presencia de 4-hidroxiandrostenediona, este efecto no se debió a la depleción de los depósitos intracelulares de calcio, ya que la aplicación de E₂ (1nM) induce un incremento rápido en [Ca²⁺]_i. 4-hidroxiandrostenediona no afecta la [Ca²⁺]_i por si misma. No existió diferencia en las respuestas de CEMC de rata macho y hembra.

Figura 17. Imagen confocal (Sistema Confocal Modelo TCS SP2, Marca LEICA) de la inmunoexpresión de P450_{AROM}, utilizando el fragmento F(ab')₂ de los anticuerpos policlonales generados contra el péptido de P450_{AROM}, en CEMC de rata macho y hembra en cultivo. Se localizó intensa reactividad inmunocitoquímica de P450_{AROM} (gris) a nivel de la periferia celular y en citoplasma. No se observó tinción cuando las células se procesaron sin el fragmento F(ab')₂ del anticuerpo primario (datos no mostrados).

Figura 18. Inmunoblot de los lisados de CEMC de rata macho y hembra, utilizando el fragmento F(ab')₂ de las IgG's policlonales generados contra el péptido del citocromo P450_{AROM} de rata. Las membranas fueron incubadas por una 1h con el fragmento F(ab')₂ del IgG's anti-aromatasa (dilución 1:250) y por 2h con el fragmento F(ab')₂ del anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (Horse Radish Peroxidase, HRP)(SIGMA, dilución 1:500). Finalmente, las bandas fueron teñidas con un kit (VECTOR laboratories, substrato para peroxidasa; Diaminobenzidina, DAB) según especificaciones del proveedor.

La reactividad fue evidente con la presencia de una banda proteica simple de peso molecular alrededor de 50KDa en CEMC de rata macho y hembra, esta banda fue observada en el liquido sobrenadante [S1 (10,000 x g), S2 (100,000 x g)] así como en el pellet [P1 (10,000 x g), P2 (100,000 x g), electroforesis (a), inmunoblot (b)]. Se utilizó como control la proteína ribosomal (RPS6).

Figura 19. Hibridación in situ del RNAm de aromatasa en CEMC de rata macho y hembra. La expresión tejido específica de P450_{AROM} en CEMC fue evidente a través del uso de las sondas de oligonucleótidos antisentido conjugadas con fluoresceína de ovario del cDNA de aromatasa correspondiente a la región del extremo 5' del exon I. La señal fluorescente de hibridación del RNAm de la sonda específica de ovario se localizó principalmente a nivel citoplasmático en CEMC de rata macho y hembra. No existieron diferencias en la hibridación asociadas al género. No se detectó reactividad con el uso de las sondas antisentido de Placenta y Próstata/Testículo. Las sondas de oligonucleótidos con sentido conjugadas con fluoresceína fueron utilizadas como controles negativos.

Figura 20. La aromatización de andrógenos en estrógenos fue medida a través del aislamiento y cuantificación de agua tritiada. Se observa un efecto dependiente de la concentración de microsomas de placenta humanos (círculos negros), CEMC de rata macho (círculos blancos) y hembra (triángulos negros). La incubación del substrato, [1β -³H] androstenediona (1pM), y los cofactores (NADPH, glucosa 6 fosfato, Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa y MgCl₂) con diferentes concentraciones de microsomas placentarios [0.05-5μg] o homogenizados de CEMC de rata [130-1300μg] resulta en la formación de agua tritiada en forma dependiente de la concentración. No existieron diferencias en los efectos inducidos por las CEMC de rata macho y hembra.

Figura 21. Formación de agua tritiada (prueba indirecta de aromatización) en CEMC de rata macho (barra con líneas diagonales) y hembra (barra con líneas verticales). La incubación del substrato, [1β -³H] androstenediona (1pM), y cofactores con los homogenizados de CEMC (1300μg) resulta en una producción significativa de agua tritiada.

No existieron diferencias en los efectos inducidos por CEMC de rata macho y hembra. Se detectó actividad insignificante en ensayos de control negativo, en donde la fuente de enzima P450_{AROM} fue omitida o substituida con albúmina bovina (100µM; barra sin líneas). En los ensayos de control positivo, microsomas de placenta humana (2.5µg; barra con líneas horizontales), se detectó actividad enzimática importante.

Figura 22. Secuencia de la reacción de aromatización. La conversión de andrógenos en estrógenos requiere del consumo de tres moléculas de NADPH y O₂ por cada molécula de estrógeno formado. El NADPH proporciona los equivalentes reducidos, mientras que el O₂ es insertado en la molécula a través de 3 hidroxilaciones secuenciales. Resultando en la pérdida del grupo metilo del C-19 en forma de ácido fórmico (HCOOH) y la aromatización del anillo A, con la consecuente pérdida estereoespecífica de los hidrógenos 1β y 2β del sustrato.

(*H denota 1β-³H).

Figura 23. a) Cristalografía de rayos X de la enzima P450_{AROM}, unida a dos moléculas de sustrato (androstenediona, azul), la aromatasa es una hemo-proteína (grupo hemo en amarillo), perteneciente a la superfamilia de los citocromos P450. En verde observamos el péptido correspondiente a los residuos 379-398 de la proteína P450_{AROM} (496 aminoácidos), utilizado para la producción del fragmento F(ab')₂ de los anticuerpos policlonales contra la P450_{AROM}, para los ensayos inmunocitoquímicos y Westernblot. b) Sitio activo de la enzima P450_{AROM}, en donde observamos la apertura del sitio activo, por donde entra el sustrato (testosterona o androstenediona).

RESUMEN.

Las diferencias en la incidencia de las enfermedades cardiovasculares (ECV) asociadas al género sugieren que factores ligados al sexo pueden ejercer un papel importante en el desarrollo de estas enfermedades, posiblemente relacionados con los diferentes estados hormonales entre hombres y mujeres. La frecuencia de ECV en mujeres premenopáusicas es significativamente menor comparado con hombres de la misma edad y mujeres posmenopáusicas, aún en igualdad de riesgo cardiovascular (Diabetes, Hipertensión, Tabaquismo, Hiperlipidemia, Sedentarismo, obesidad, etc). Sin embargo, estas diferencias en morbilidad y mortalidad disminuyen después de la menopausia. Se le ha atribuido a los cambios en los niveles plasmáticos de estrógenos durante el transcurso de la vida, un papel importante en la incidencia de estos procesos patológicos.

Las hormonas sexuales esteroides están involucradas en un gran número de procesos fisiológicos y fisiopatológicos. Clásicamente, sus efectos se han descrito como moduladores de la transcripción nuclear. Sin embargo, otros de sus efectos han sido reconocidos como de origen no genómicos o ejercidos a nivel de la membrana plasmática, ya que ocurren en periodos muy cortos. Las células endoteliales en los diferentes sitios del árbol vascular difieren en estructura y función, y su respuesta a las esteroides sexuales parece ser dependiente de origen celular y del género. El objetivo de este trabajo fue evaluar los efectos de testosterona (T) y el 17β -estradiol (E_2), en células endoteliales microvasculares coronarias (CEMC) de rata macho y hembra en cultivo. Analizamos los efectos rápidos, no-genómicos de las hormonas sexuales sobre la cinética intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$), utilizando el agente quelante de calcio FURA 2AM y un sistema computarizado de microscopia inversa (programa InCyt Im2) el cual mide la fluorescencia emitida por el complejo FURA 2- Ca^{2+} al ser estimulado por luz UV. También exploramos la posibilidad de la aromatización de T a E_2 a través del uso de inhibidores selectivos para la enzima aromatasa ($P450_{AROM}$); Aminoglutetimida ($4\mu M$) y 4-hidroxiandrostenedione ($4\mu M$). Investigamos la presencia de la enzima aromatasa ($P450_{AROM}$) a través de estudios inmunocitoquímicos e inmunoblot, utilizando el fragmento $F(ab')_2$ de los anticuerpos policlonales generados contra un péptido sintético de 20 aminoácidos de la proteína $P450_{AROM}$

de rata, y a través de ensayos de hibridación *in situ* investigamos la presencia del RNAm de P450_{AROM} en estas células. La actividad de P450_{AROM} se demostró por la pérdida estéreo-específica del átomo de tritio del sustrato, [1 β -³H] androstenedione.

Nuestros resultados indican que T y E₂ inducen un incremento rápido en la [Ca²⁺]_i. El hecho de que los efectos de T y E₂ se lleven a cabo en milisegundos sugiere que son ejercidos a nivel de la membrana plasmática y no a través de receptores intracelulares. Ambos efectos son bloqueados por el U73122, que es un inhibidor específico de la enzima fosfolípasa C β (PLC β), lo que sugiere la participación de esta vía de señalización intracelular en los efectos inducidos por T y E₂ sobre la cinética [Ca²⁺]_i. Los ensayos inmunocitoquímicos indican la expresión de los receptores alfa estrogénico (α ER) y androgénico (AR) en este tipo celular. Los efectos inducidos por la T en la cinética [Ca²⁺]_i fueron bloqueados por los inhibidores selectivos de la enzima aromatasa. Los ensayos inmunocitoquímicos sugieren que P450_{AROM} puede estar asociada a la membrana plasmática. El inmunoblot reveló una proteína inmunoreactiva de peso molecular aproximado de 50kDa que puede estar en asociación al plasmalema. Los estudios de hibridación *in situ* demostraron la presencia del RNAm ovario específico para la enzima aromatasa. Finalmente los estudios enzimáticos *in vitro* demostraron la formación de E₂ como resultado de una actividad significativa de P450_{AROM} en CEMC de rata macho y hembra. No existieron diferencias asociadas al género.

ABSTRACT.

Human sexual dimorphism and the different incidence of cardiovascular diseases (CVD) had led to the hypothesis that sex-linked factors may have a role in the development of this disorder, may be related to different hormonal status. The incidence of CVD in premenopausal women is lower than age-matched men and postmenopausal women, in spite of the same cardiovascular risk factors (diabetes, hypertension, smoking, hyperlipidemia, sedentary life style, obesity, etc.). However, the gender differences in morbidity and mortality decrease after the menopause. Indeed, the changes of estrogen plasma levels during the course of life have been attributed to play a role in the pathogenesis of CVD, suggesting that sexual steroid hormones play a major role in the incidence of such pathological processes.

Sex steroid hormones are involved in a great number of physiological and pathophysiological processes. Frequently, steroid hormone effects have been described as modulators of nuclear transcription. However, other effects of these hormones have been recognized as non-genomic or membrane-associated, since they occur in a very short time. Endothelial cells from different sites of the vascular tree differ in structure and function and its responses to sex steroids seem to be dependent on cell origin and gender. Thus, the objective of this work was to evaluate the effects of testosterone (T) and 17β -estradiol (E_2) on coronary microvascular endothelial cells (CMEC) of male and female rats. To analyze the short-term effects of such sexual steroid hormones on intracellular calcium concentration ($[Ca^{2+}]_i$) kinetics we used chelating agent (FURA 2 AM) and a computerized system (InCyt Im2 program) of inverse microscopy to measure the fluorescence emitted by the FURA 2- Ca^{2+} complex after being stimulated by UV light. We also explored the possibility of testosterone aromatization to E_2 by using selective inhibitors of the aromatase enzyme ($P450_{AROM}$); aminoglutethimide ($4\mu M$) and 4-hydroxyandrostenedione ($4\mu M$). The presence of $P450_{AROM}$ was investigated by immunocytochemical and immunoblot assays, using the fragment $F(ab')_2$ of peptide-generated polyclonal antibodies raised against a 20-amino acid synthetic fragment of the rat $P450_{AROM}$ and by *in situ* hybridization to locate the aromatase mRNA in such cells.

The activity of P450_{AROM} was demonstrated by the stereospecific loss of the tritium atom of the substrate, [1 β -³H] androstenedione.

Our results indicate that both T and E₂ induced a rapid increase in [Ca²⁺]_i. The fact that E₂ and T effects were carried out within milliseconds suggests that they were exerted at the membrane level and not through intracellular receptors. The possibility of involvement of the Phospholipase C β (PLC) in these effects is suggested since U-73122, a PLC inhibitor, blocked both T and E₂ effects. Immunocytochemical assays indicated the expression of androgenic (AR) and alpha estrogenic (α ER) receptors in these cells. T effects were blocked by the selective aromatase inhibitors. We also demonstrated membrane-association of P450_{AROM} by immunocytochemical assays and immunoblot that show a protein of molecular weight to around 50kDa. The expression of the ovary-specific mRNA was demonstrated after *in situ* hybridization and *in vitro* enzymatic assays showed E₂ formation resulting from a significant activity of P450_{AROM} in CMEC. There were not any gender-based differences.

INTRODUCCIÓN.

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son una de las principales causas de muerte a nivel mundial. Diversos estudios clínicos y epidemiológicos han reportado menor incidencia de ECV en mujeres premenopáusicas comparada con hombres o mujeres posmenopáusicas de la misma edad.^(1, 2) Además, la incidencia de ECV y la morbilidad /mortalidad asociada se incrementa con la edad y la menopausia.^(1, 2, 3, 4, 5) Esta disparidad en ECV en mujeres premenopáusicas y hombres de la misma edad sugiere que las hormonas sexuales endógenas tales como estrógenos, progesterona y/o andrógenos ejercen un papel fundamental en la patogénesis de ECV.^(6, 7)

Los estrógenos son de importancia primaria en la protección de ECV tanto en mujeres premenopáusicas como en la terapia hormonal de reemplazo en mujeres posmenopáusicas.^(3, 4, 8, 9) La terapia hormonal de reemplazo o más específicamente la terapia de reemplazo estrogénico se ha asociado con efectos cardiovasculares benéficos en mujeres posmenopáusicas, especialmente en la prevención secundaria.^(10, 11) La mortalidad por ECV entre hombres y mujeres varía en una relación de 3 a 6 hombres por cada mujer, en 27 países.⁽²⁾ En México se reporta una incidencia de 4 hombres por cada mujer.⁽¹²⁾ Entre los factores de riesgo conocidos para esta enfermedad, se encuentran: la hipertensión, la diabetes mellitus, el tabaquismo, la hiperlipidemia y la obesidad, cada uno de los cuales pueden ser potencialmente reversible o controlables. Sin embargo, uno de los principales factores de riesgo para enfermedades coronarias puede ser el género masculino.^(1, 2, 6, 13)

La mayor susceptibilidad para ECV en hombres puede deberse a factores genéticos, hormonales, ambientales o una combinación de todos estos mecanismos.⁽¹³⁾ A pesar de las similitudes anatómicas, existen evidencias de que tanto la función como la estructura cardiovascular pueden presentar diferencias significativas en hombres y mujeres, sugiriendo que las diferencias hormonales relacionadas con el género son un importante modulador de la fisiología cardiovascular.⁽¹⁴⁾ Por ejemplo, se sabe que la función cardíaca, así como su adaptación a la edad y respuesta a las enfermedades, puede ser diferente dependiendo del género.⁽¹⁴⁾ Las dimensiones cardíacas, su estructura y la masa del ventrículo izquierdo varían con el tamaño del cuerpo y el género.^(15, 16) Diversos estudios han reportado en mujeres un incremento en la masa del ventrículo izquierdo dependiente de

la edad, mientras que en el hombre permanece prácticamente constante.^(6, 14, 15, 16) El estudio de Framingham⁽¹⁷⁾ mostró que después de los 60 años de edad, la prevalencia de hipertrofia del ventrículo izquierdo en mujeres se incrementa 69% por cada década de vida, comparado con el 15% en hombres.

Estas diferencias en la estructura ventricular también se extienden a su función, la hipertrofia cardiaca se presenta más comúnmente en mujeres hipertensas comparada con hombres hipertensos (cardiomiopatía hipertrófica hipertensiva). Una vez que las mujeres son afectadas por enfermedad isquémica cardiaca, lo hacen con mayor severidad que sus contrapartes masculinas.⁽¹⁴⁾

Por otra parte, con la edad, el árbol vascular (arterias, arteriolas, capilares, venulas y venas) presenta diferentes tipos de adaptaciones dependiendo del género. La declinación de la función endotelial relacionada a la edad ocurre más tempranamente y en forma más gradual en hombres (cerca de los 40 años de edad). Mientras que las mujeres presentan mayor deficiencia de adaptaciones cardiacas y vasculares durante el transcurso de la vida, en comparación a los hombres.⁽¹⁸⁾ La diferencia más obvia, que relaciona al género con la edad, es la menopausia en la mujer, a su vez la relación de este “evento” con ECV ha generado mucha controversia especialmente en lo relacionado con la terapia hormonal de reemplazo en el manejo de pacientes cardiopatas.^(5, 14) Así, tanto los diferentes estados hormonales entre hombres y mujeres, como los cambios en las concentraciones plasmáticas de estrógenos durante el transcurso de la vida pueden ejercer un papel importante en la patogénesis de las enfermedades cardiovasculares.

Controversias de la terapia hormonal de reemplazo.

El sistema cardiovascular responde a múltiples señales endocrinas y existe un fuerte paralelismo entre los mecanismos endocrinos y otros tipos de señales que influyen la función del sistema cardiovascular, (señales nutricionales, nerviosas, etc.).⁽⁷⁾

Antes de la pubertad, no existen diferencias estadísticas significativas, en el tamaño del corazón, relacionadas al género. Después de la pubertad, la masa cardiaca absoluta es de 15% a 30% mayor en hombres en comparación con mujeres. Tanto mujeres como hombres presentan el mismo número de miocitos cardiacos al nacimiento y su tamaño es

inicialmente el mismo. Sin embargo, parece que los miocitos masculinos sufren un mayor grado de hipertrofia durante el crecimiento postnatal normal comparado con su contraparte femenina.⁽¹⁵⁾ Con respecto a la función normal, la ecocardiografía ha demostrado una mejor función diastólica en mujeres jóvenes comparado con hombres de la misma edad.⁽¹⁷⁾ Es claro que las mujeres presentan menor incidencia de enfermedades cardiovasculares comparadas con hombres de la misma edad, hasta antes de la menopausia, lo cual sugiere que la menopausia puede constituir un acontecimiento cardiovascular significativo. Sin embargo, no debe asumirse una relación causal directa entre este evento fisiológico y las ECV. Los estudios durante la menopausia son complicados debido a la interacción con factores de riesgo tal como el efecto del tabaco sobre las ECV así como en la inducción de la menopausia temprana.^(5, 6, 14)

En las formas más comunes de enfermedades cardiovasculares, las mujeres en etapa premenopáusicas muestran un mejor pronóstico comparado con hombres de la misma edad. ¿Este pronóstico favorable puede deberse al efecto cardioprotector de los estrógenos? Es probable que no sea un asunto tan simple.

La terapia hormonal de reemplazo en mujeres posmenopáusicas puede ser considerada como un componente positivo en los cuidados de la salud en la mujer mayor.^(10, 11) Diversos estudios epidemiológicos y estudios de casos y controles sugieren que la terapia hormonal de reemplazo puede ser benéfica en relación con la prevención primaria de enfermedades cardiovasculares.^(1, 3, 4, 8, 9, 19) Los efectos benéficos de los estrógenos fueron inicialmente atribuidos a una reducción de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y a un incremento en las lipoproteínas de alta densidad (HDL).^(9, 19) Estudios recientes han demostrado que los estrógenos protegen contra el estrés oxidativo y disminuyen la oxidación de LDL,^(4, 8, 19) además de tener efectos directos sobre tejidos arteriales, modulando la reactividad vascular a través de la síntesis de óxido nítrico (ON) y prostaglandinas.^(4, 8, 19) Sin embargo, los reportes son inciertos, y aún controversiales. Asimismo, los datos respecto al efecto de la terapia hormonal en mujeres de diferentes razas y clases socioeconómicas son insuficientes.

Existe poca información con respecto a la asociación entre el riesgo para ECV con la duración de la terapia hormonal de reemplazo. Los estrógenos tienen muchos efectos que pueden asumir varios grados de importancia durante la terapia a corto o largo plazo. Los

mecanismos más importantes durante el uso de estrógenos a corto plazo pueden incluir; su actividad procoagulante, particularmente a altas dosis, y sus efectos sobre la función endotelial (estimulando la producción de una variedad de mediadores vasoactivos como prostaciclina y óxido nítrico (ON) y músculo liso vascular (regulando funciones tales como contractilidad, proliferación, formación y composición de matriz celular). El efecto de los estrógenos sobre el perfil de lípidos, disminución de la formación de nuevas plaquetas y estabilización de las plaquetas ya existentes pueden ser más importantes durante la terapia a largo plazo. La importancia relativa de estos mecanismos puede depender también de la asociación con factores de riesgo tales como aterosclerosis subyacente, tabaquismo y otros.^(10, 11, 19, 20)

Algunos estudios han cuestionado el efecto protector de los estrógenos. The Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study (HERS)⁽²¹⁾ fue uno de los primeros estudios controlado por placebo, en donde observaron que la terapia hormonal de reemplazo no solo fracasa en reducir la tasa promedio de eventos coronarios, sino que incrementa las enfermedades arteriales coronarias en el primer año, con un 89% de incremento en eventos tromboembólicos. El estudio de Framingham^(20, 22) mostró que durante la terapia hormonal de reemplazo no existe un efecto cardioprotector significativo en mujeres jóvenes pero tampoco efectos adversos significativos en mujeres mayores. Otros estudios han observado efectos adversos en mujeres que toman más de 1.25mg de estrógenos diarios, dichas dosis fueron comunes en el estudio de Framingham.^(23, 24)

The Estrogen and Atherosclerosis Trial (ERA)⁽²⁵⁾ demostró que no existe disminución en la progresión de enfermedad arterial coronaria con la terapia hormonal de reemplazo en mujeres posmenopáusicas con al menos la estenosis de una arteria coronaria. The women's Health Initiative Hormone Replacement Trial (WHI-HRT)^(24, 26) reportó que la terapia hormonal de reemplazo en forma de combinación oral continua de conjugados estrogénicos equinos y acetato de medroxiprogesterona resulta en un incremento en la tasa de eventos cardiovasculares y eventos tromboembólicos, a través de un seguimiento de 5.2 años en mujeres que tomaron la terapia hormonal en comparación con el grupo placebo.

Diversas hipótesis se han propuesto para explicar estos hallazgos inesperados, la más ampliamente aceptada es que la trombosis puede ser limitada a un grupo de mujeres en terapia hormonal de reemplazo que pudieran presentar una susceptibilidad incrementada a

la trombosis, debido por ejemplo a mutaciones genéticas en factores trombogénicos (factor V de Leiden, mutaciones en el gen de protrombina y del activador de plasminogeno).^(27, 28)

El uso de diversos conjugados estrogénicos puede contribuir también a dicha controversia. El “Premarin” (una mezcla de conjugados estrogénicos equinos, distribuida por Wyeth/Ayerst Labs, Radnor, PA, USA) es el estrógeno utilizado en la mayoría de los estudios realizados. Sin embargo, la composición exacta del Premarin es desconocida. Recientemente, otro tipo de conjugado estrogénico el “Cenestin” (contiene una composición conocida de 10 estrógenos, distribuido por Duramed Pharmaceuticals) ha sido aprobado para el tratamiento de los síntomas de la menopausia.⁽²⁹⁾

La terapia hormonal de reemplazo parece estar asociada con alteraciones en otros factores que median los eventos trombóticos arteriales y venosos. Los mecanismos inflamatorios son esenciales en el proceso de formación de trombos arteriales, que siguen a la ruptura de la placa ateromatosa, por lo que la modulación de los procesos inflamatorios puede ser un medio potencial para reducir el riesgo cardiovascular. Las hormonas sexuales pueden influir en los procesos inflamatorios y así modificar el riesgo cardiovascular, por lo que se han utilizado a la proteína C reactiva, la homocisteína, la interleucina 6 y la lipoproteína (a) como marcadores para riesgo de enfermedades cardiovasculares.⁽³⁰⁾

Por otra parte, el incremento en el riesgo de cáncer endometrial asociado con terapias hormonales en mujeres posmenopáusicas se ha visto disminuido o casi eliminado con la adición de progestágenos a la terapia hormonal de reemplazo.^(10, 11) Se requiere de futuras investigaciones para identificar que mujeres serán más probablemente beneficiadas con la terapia hormonal de reemplazo, así como el efecto de la adición de progestinas a la terapia hormonal, en base a un análisis de riesgos y beneficios.

La terapia hormonal de reemplazo óptima, debe considerar diversos factores tales como; la edad ideal para el inicio de la terapia, la duración de la misma en base a los efectos a corto y largo plazo, las dosis óptimas y tipo de estrógenos administrados, la asociación de progestagenos o inclusive andrógenos, así como la presencia de factores de riesgo asociados para ECV. En la actualidad la atención se ha enfocado en el uso de estrógenos dirigidos a tejidos específicos (por ejemplo, tejido vascular o sitios de aterosclerosis, hueso, etc.) con la finalidad de evitar la amplia gama de efectos indeseables.^(6, 10)

En términos de cardioprotección, se continúa publicando estudios que documentan efectos positivos con el uso de terapia hormonal de reemplazo respecto a los factores de riesgo relacionados a enfermedades cardíacas. La evaluación del riesgo-beneficio será personalizada, de acuerdo con las condiciones médicas de la mujer y las características no médicas (incluyendo el temor al cáncer). La decisión debe ser de forma individual para cada mujer después de evaluar todos los riesgos y beneficios relevantes. El efecto cardioprotector de los estrógenos parece ser más complicado de lo que originalmente se pensó, y requiere de mayor investigación.

Efecto de los estrógenos sobre el sistema cardiovascular.

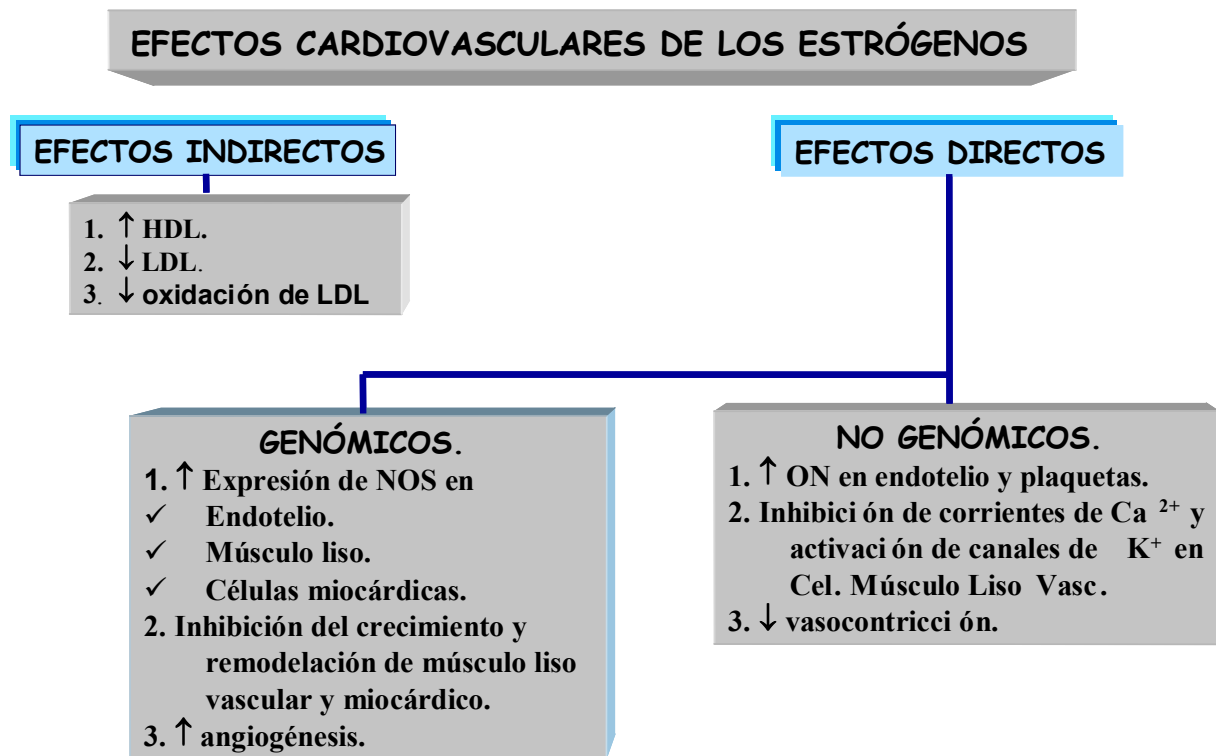
Las acciones cardioprotectoras de los estrógenos son parcialmente mediadas por efectos directos sobre la pared vascular. Los estrógenos son activos tanto en células endoteliales como de músculo liso vascular, en donde se han identificado receptores estrogénicos (ER) funcionalmente competentes. La vasculatura, al igual que los tejidos reproductivo, óseo, hepático y cerebral, es ahora reconocida como un importante blanco para la acción de los esteroides. (4, 8, 19, 31)

Los estrógenos parecen reducir el riesgo de ECV a través de una combinación de efectos biológicos que incluyen; cambio en el perfil de lípidos, incrementando las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y disminuyendo las lipoproteínas de baja densidad (LDL), (9, 19) generación de óxido nítrico (ON) endotelial, proliferación celular y angiogénesis, efectos antioxidantes, así como regulación de los canales de potasio dependientes de calcio en células de músculo liso vascular (Figura 1). (3, 4, 8, 19, 31)

Esta diversidad de efectos biológicos pueden dividirse en dos grupos: aquellos de duración prolongada y que requieren de la activación de genes y de la biosíntesis de proteínas denominados “genómicos”, y aquellos de respuesta rápida, de corta duración, que son ejercidos alrededor de la membrana plasmática y que requieren de la participación de vías de señalización intracelular y segundos mensajeros denominados “no genómicos”. (32, 33, 34)

Receptores estrogénicos.

La presencia de receptores estrogénicos (ER) se ha descrito en una amplia variedad de tejidos normales y patológicos tales como: testículos, sistema nervioso central, tubo digestivo, hígado, tracto urinario, tejido linfoide, tracto respiratorio, hueso, tejidos blandos, piel, sistema cardiovascular, glándulas; pineal, tiroides paratiroides, adrenales y páncreas, carcinoma mamario y endometrial. Además, estos ER's han sido estudiados tanto a nivel de RNAm como de DNA. En la actualidad podemos explorar si los ER son funcionales y si controlan genes y funciones celulares.⁽³⁵⁾



Skafar FD, Rui Xu, Morales J, Ram J and Sowers RJ. (1997) J Clin End Met. 82:3913-3918

Figura 1. Efectos cardiovasculares directos e indirectos (metabolismo de lípidos) de los estrógenos.

Evidentemente la parte central de los efectos clásicos de las hormonas esteroides es su unión a receptores citoplásmico/nucleares específicos. Existen dos tipos de receptores estrogénicos funcionales, conocidos como; receptor alfa estrogénico (ER α) (Figura 2) y receptor beta estrogénico (ER β), entre los cuales se presentan una considerable homología y al igual que todos los receptores hormonales esteroides son factores de transcripción que alteran la expresión de genes cuando son activados.

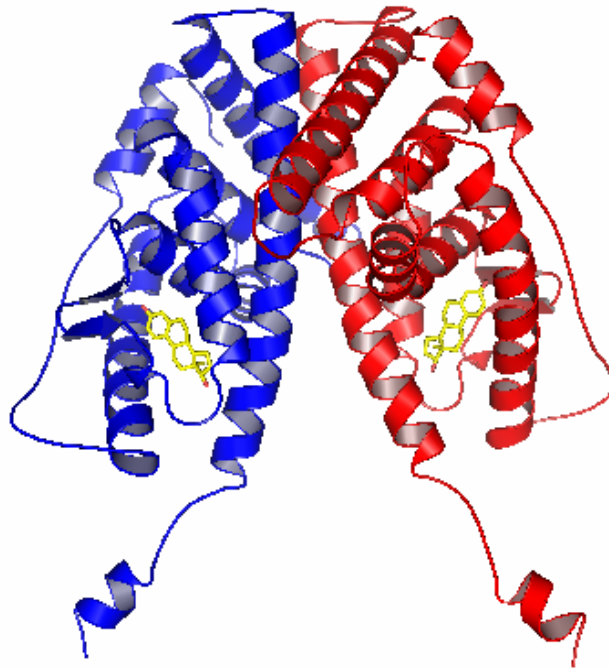


Figura 2. Imagen cristalográfica del receptor α -estrogénico. Dímero unido con dos moléculas de su ligando (17 β -estradiol, amarillo).

Ambos receptores pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares hormonales esteroideos/tiroideos, los cuales se componen de tres dominios funcionales independientes pero capaces de interactuar entre ellos: el dominio amino terminal o dominio A/B, dominio C o dominio de unión a DNA y el dominio D/E/F o dominio de unión a ligando⁽³¹⁾ (Figura 3).

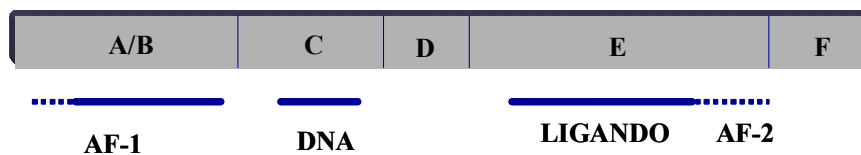


Figura 3. Representación esquemática de los dominios estructurales de los receptores estrogénicos nucleares. El dominio A/B en el extremo amino terminal contiene el sitio AF-1, en donde interactúa con otros factores transcripcionales. El dominio C/D contiene dos estructuras denominadas “dedos de zinc” que se unen al DNA, y el dominio E/F contienen los sitios de unión a ligando así como el dominio AF-2 que entra en contacto directo con pépticos coactivadores.

El dominio amino terminal presenta una función de activación independiente de ligando, una región del receptor involucrada en interacciones entre proteínas y activación transcripcional de la expresión de genes blanco. El dominio de unión a DNA contiene dos estructuras denominadas “dedos de zinc”, las cuales ejercen un importante papel en la dimerización del receptor y en la unión del receptor a secuencias específicas de DNA. Este dominio presenta una alta homología entre los receptores ER α y ER β , en particular en la región conocida como “caja P” que es idéntica en ambos receptores y es una secuencia crítica para la especificidad y el reconocimiento del DNA blanco. Así, se puede esperar que tanto ER α como ER β se unan a diversos elementos de respuesta estrogénica con similar especificidad y afinidad. Finalmente, el dominio de unión a ligando, E/F, o dominio carboxilo terminal media la unión al ligando, la dimerización del receptor, la traslación nuclear y transactivación de expresión de genes blanco.⁽³¹⁾

Por muchos años se pensó que el mecanismo por medio del cual los estrógenos afectan la transcripción de genes blanco es únicamente a través de la unión directa de ER's activados a elementos de respuesta estrogénica (ERE) en el DNA. En la actualidad se sabe que tanto ER α como ER β pueden modular la expresión de genes sin su unión directa al DNA (por ejemplo a través de interacciones con promotores, o disparando cascadas de señalización intracelular que pueden inducir la transcripción).^(31, 32)

Por otra parte, en los últimos 15 años, el dogma del requerimiento hormonal estricto para la activación de receptores esteroideos ha cambiado. Existen evidencias de activación de ER's independiente de ligando, los mecanismos fundamentales para esta activación involucran la fosforilación de ER's. Los sitios para la fosforilación de ER α se han estudiado intensamente a través del análisis del contenido de fosfoaminoácidos en el receptor y/o por la unión con anticuerpos anti-fosofotirosina. Existe aun controversia sobre si los residuos de tirosina o serina son fosforilados y cuales de estas fosforilaciones son dependientes de ligando. Se ha identificado un solo sitio de fosforilación de un residuo de tirosina en posición 537 del receptor ER α humano.⁽³¹⁾ La gran mayoría de los residuos de serina se mapearon en el dominio A/B amino terminal del ER α , se han caracterizado como sitios de fosforilación los residuos Ser-104, -106, -118, -154, y -167. Fuera de este dominio, se han identificado residuos de serina en la posición 236 del dominio de unión al DNA y en la posición 305 del dominio de unión a ligando.⁽³¹⁾

En contraste, son escasos los estudios respecto a la fosforilación de ER β , y se ha demostrado fosforilación de residuos de serina 106 y 124 del ER β .⁽³¹⁾

En ausencia de Estradiol, otras vías de señalización pueden modular los ER's a través de fosforilación, las cuales incluyen; 1) reguladores de el estado de fosforilación celular general, tales como Protein Cinasa A (PKA) o Protein Cinasa C (PKC). 2) señales extracelulares como factores peptídicos de crecimiento, citosinas o neurotransmisores. 3) reguladores del ciclo celular.^(31, 32, 33)

Andrógenos y Enfermedades Cardiovasculares.

Por décadas, las diferencias en la incidencia de enfermedades cardiovasculares (ECV) relacionadas al género se han interpretado esencialmente como un reflejo de la protección

mediada por los estrógenos contra la aterogénesis. Enfocando los estudios casi exclusivamente en la hipótesis cardioprotectora de los estrógenos, la cual ha llegado a ser casi indiscutible. Cuando se aplicó esta hipótesis en hombres, a mediados de la década de los 70's, prediciendo que el tratamiento con estrógenos reduciría las muertes por ECV, fue refutada concluyentemente. Diferentes estudios mostraron que el tratamiento con estrógenos en hombres causa un mayor número de muertes por ECV. Este incremento en la mortalidad fue un efecto directo de los estrógenos.⁽³⁶⁾

Diversos estudios han logrado obtener evidencias indirectas de que los niveles masculinos normales de testosterona en adultos pueden favorecer las ECV, a través de considerar longevidad y mortalidad de: 1) hombres normales después de la castración por alguna causa médica o estudios con animales gonadectomizados, 2) hombres con resistencia genética a andrógenos, y 3) mujeres tratadas con dosis "masculinas" de andrógenos.⁽¹³⁾

Clásicamente se ha considerado que la testosterona ejerce una influencia negativa en el sistema cardiovascular debido a la alta prevalencia de las ECV en hombres. Aún en igualdad de riesgo vascular. Sin embargo, diversos estudios reportan hipotestosteronemia en pacientes con enfermedades cardíacas.⁽³⁷⁾ Similarmente, se ha reportado que los niveles circulantes de testosterona son inversamente proporcionales al riesgo de aterosclerosis, y otros factores de riesgo para ECV, incluyendo hipertensión, hiperinsulinemia, diabetes, obesidad, tabaquismo, edad y un perfil trombotico adverso, todos los cuales se han asociado con hipotestosteronemia.^(38, 39) Tales observaciones contradicen el punto de vista tradicional, y sugiere que la testosterona podría tener un efecto benéfico en el sistema cardiovascular, al menos en hombres, y que la deficiencia en los niveles circulantes de testosterona pueden estar asociados con ECV.^(13,39)

Por otra parte se han estudiado los efectos cardiovasculares por el abuso de andrógenos, estos efectos adversos incluyen; infarto a miocardio, hipertensión, arritmias, falla cardíaca, embolismo pulmonar, choque y muerte súbita, mostrando una relación directa con el tiempo de uso. Sin embargo, los estudios han sido de reportes de casos simples o asociados con desordenes médicos que pueden contribuir incrementar el riesgo de ECV.^(40,41)

Hasta ahora los datos sugieren que la exposición a concentraciones normales de andrógenos correspondientes a hombres adultos no disminuye la expectativa de vida. Pero el tratamiento con estrógenos orales tiene efectos cardiovasculares adversos en hombres, pero

no en mujeres. ¿Que tanto del daño es debido a la vía de administración (oral) o al uso de estrógenos sintéticos? no es claro. El riesgo de daño cardiovascular debido a la exposición de altas dosis de andrógenos o abuso de andrógenos (atletas, físico-culturistas) necesita de mayor investigación.^(13, 37, 40, 41)

Por otra parte, se ha demostrado efectos benéficos con la terapia con testosterona en pacientes hombres con angina.⁽⁴²⁾ Además, la administración aguda de testosterona produce una rápida mejoría de la isquemia miocárdica.⁽⁴³⁾ La testosterona induce la dilatación arterial coronaria y produce incremento del flujo sanguíneo coronario en hombres con enfermedad arterial coronaria establecida.⁽⁴⁴⁾ Asimismo, la terapia hormonal de reemplazo con testosterona ejerce un significativo efecto antiesclerótico,⁽⁴⁵⁾

Pronto surgió la pregunta ¿si la testosterona puede influir en forma benéfica el tono vascular coronario? Webb et al (1999)⁽⁴⁴⁾ en estudios subsecuentes demostró que la infusión de concentraciones fisiológicas intracoronarias de testosterona incrementa el diámetro arterial coronario y el flujo coronario en hombres con ECV, lo cual es consistente con una acción vasodilatadora coronaria directa.

La testosterona causa vasodilatación de forma rápida y no-genómica que parece ser mediada por más de un mecanismo. Por ejemplo, en arterias de conductancia y resistencia coronaria caninas⁽⁴⁶⁾ y aorta torácica de rata⁽⁴⁷⁾ es mediada, en parte por la estimulación directa de la síntesis de óxido nítrico (ON) derivado de endotelio. Mientras, que en arterias coronarias y aorta de conejo⁽⁴⁸⁾ aorta de rata,⁽⁴⁹⁾ lechos arteriales mesentéricos de rata,⁽⁵⁰⁾ y arteria coronaria de puerco,⁽⁵¹⁾ el efecto vasodilatador es por la activación de canales de potasio en músculo liso vascular. De esta forma, la testosterona parece ser un regulador en diversos procesos metabólicos, principalmente a través de un efecto regulatorio sobre la $[Ca^{2+}]_i$.^(52, 53, 54)

La testosterona es un agente vasodilatador coronario con efectos comparables al uso de fármacos antiisquémicos convencionales. Ninguno de los estudios clínicos han aclarado si en este efecto existe participación de las vías metabólicas; aromatización o 5α -reducción, o si es a través del receptor AR, o por mecanismos no genómicos.^(13, 54)

Receptor Androgénico.

Las hormonas sexuales esteroideas masculinas median sus efectos a través de la interacción con receptores específicos denominados receptores androgénicos (AR's), los cuales son un factor de transcripción dependiente de ligando, al igual que los ER's, pertenece a la súperfamilia de receptores nucleares esteroideos/tiroideos/retinoideos/huérfanos. Un solo tipo de AR ha sido identificado y clonado (Figura 4). Así, los dos andrógenos mas importantes, la testosterona y la 5 α -dihidrotestosterona, median sus acciones a través de un mismo receptor AR, las cuales son específicas en cada tejido, esto sugiere que existe un reclutamiento específico de diferentes factores intermediarios de transcripción (TIF's) dependiente del ligando unido al receptor. El AR muestra una amplia homología en los dominios de unión al DNA y unión a ligando con otros miembros de la superfamilia de receptores para hormonas esteroideas. (Por ejemplo; receptores para glucocorticoides, Estradiol, progesterona y mineralocorticoides).^(55, 56)

Al igual que todos los receptores nucleares pertenecientes a esta súperfamilia, presenta tres dominios: 1) un dominio variable amino terminal, el cual esta involucrado en activación de la transcripción y contiene la función de transactivación AF1. 2) un dominio central, altamente conservado, denominado "dominio de unión al DNA", que media su interacción con elementos de respuesta a la hormona en el DNA. 3) y un dominio carboxilo terminal de 250 residuos de aminoácidos que esta involucrado con la unión a ligando. Este dominio de unión a ligando esta involucrado además en funciones de dimerización del AR y puede interactuar funcionalmente con TIF's.^(55, 56) (Figura 3)

La unión del andrógeno a su AR resulta en dos cambios conformacionales en el AR, los cuales son diferentes a los inducidos por antiandrógenos. El receptor androgénico puede usar diferentes dominios de transactivación (el AF1 y AF5 en el dominio amino terminal y AF2-AD en el dominio carboxilo terminal) dependiendo de la forma del AR. La función AF2 es fuertemente dependiente de la presencia de coactivadores del AR.⁽⁵⁶⁾

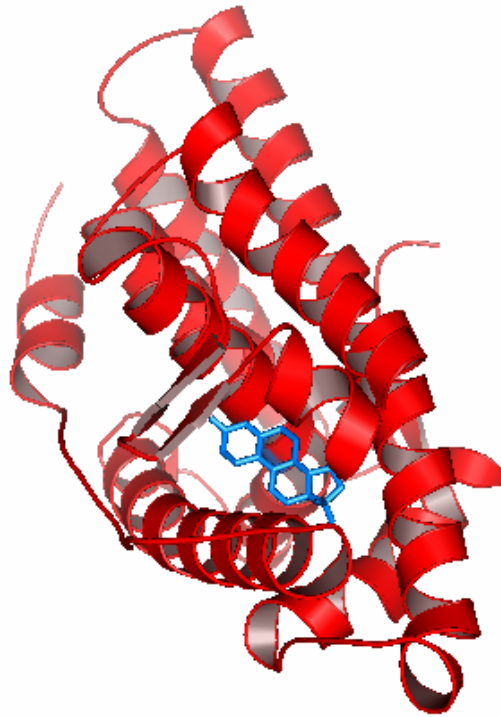


Figura 4. Cristalografía de rayos X del receptor androgénico unido con su ligando (testosterona, azul).

El AR puede sufrir dos modificaciones post-traduccionales durante la activación del receptor: Primero, durante la síntesis de la proteína AR, esta es rápidamente fosforilada posiblemente a nivel de residuos de serina 506, 641 y 653. Esta rápida modificación es importante para adquirir la capacidad de unión al andrógeno. Segundo, una fosforilación adicional en el receptor AR ocurre como resultado de su unión del andrógeno, la cual es necesaria para adquirir la forma activa durante la transcripción del DNA, generando así diferentes polimorfismos del AR. El complejo AR-andrógeno formado en el núcleo de la célula blanco reconoce regiones regulatorias dentro o alrededor de genes específicos en donde modulan la expresión génica.⁽⁵⁵⁾

Mientras que la testosterona circula a través de todo el cuerpo, los factores responsables de la variación en la sensibilidad androgénica en cada tejido no han sido clarificados. La intensidad en la expresión de AR en el humano define en forma parcial la sensibilidad

androgénica de cada tejido. Además, existen otros determinantes biológicos que influyen la sensibilidad androgénica. Incluyendo polimorfismos funcionales del AR así como la distribución y regulación de diversos co-reguladores de AR distintivos en los diferentes tejidos, las enzimas encargadas del metabolismo androgénico y mecanismos no genómicos.^(13, 55, 56)

Acción genómica de los esteroides.

Las hormonas esteroides se han asociado con diversas respuestas fisiológicas, con un enfoque primario en los aspectos genómicos de su actividad. De acuerdo a la teoría clásica del mecanismo de acción de las hormonas esteroides, estas modulan la transcripción de genes a través de su interacción con receptores nucleares intracelulares, los cuales actúan como factores de transcripción dependientes de ligando.^(7, 31, 33, 34)

La mayoría de los miembros de la familia de receptores nucleares esteroideos/tiroideos van y vienen entre el citoplasma y el núcleo en ausencia de ligando. Con la unión de un agonista, se trasladan al núcleo en donde actúan como factores e iniciadores de la transcripción. El receptor en su forma inactiva se encuentra unido con proteínas de choque térmico (hps90, hps70, hps56), de las cuales se piensa que su función es mantener la conformación apropiada del receptor, así como proteger el dominio hidrofóbico de unión a la hormona de interacciones inapropiadas.^(31, 32, 33)

Debido a las características lipofílicas de las hormonas esteroides atraviesan la membrana celular por medio de difusión pasiva, actuando posteriormente como ligandos que se unen a moléculas intracelulares. La unión de la hormona sexual esteroide con su receptor (ER α , ER β , o AR) ocurre con alta afinidad y promueve cambios conformacionales en el receptor, liberación de las proteínas de choque térmico y dimerización del mismo, lo que conduce a su activación. Este proceso permite al complejo la unión con secuencias específicas en el DNA conocidas como elementos de respuesta a la hormona (ERH), dentro de las regiones de genes blancos. A través de esta unión, el complejo hormona-receptor dispara la síntesis de RNAm's específicos y la producción de proteínas que son responsables de los efectos de las hormonas en los diferentes tipos celulares. Este mecanismo de transcripción dependiente de ligando, mediado por un complejo ligando-receptor ha sido denominado como

“genómico” y es sensible al uso de inhibidores tanto de la transcripción como de la traducción de proteínas.^(7,31,32,33,34) (Figura 5).

Alternativamente, la modulación de la transcripción puede ocurrir por interacciones proteicas en el complejo hormona-receptor activo, que pueden actuar como co-activadores o co-represores. Una forma diferente de regulación en la expresión de genes involucra la modulación de la actividad de otros factores de transcripción tales como; activador de proteína 1 o factor nuclear-kb. En forma completamente diferente, algunos esteroides sexuales, como los estrógenos pueden activar la expresión de genes actuando fuera del núcleo (vía alternativa de activación génica). A través de cascadas de señalización que pueden inducir la transcripción por activación de elementos de respuesta a AMPc o fosforilación y activación de factores de transcripción.^(31,32,33,57)

Efectos esteroideos no genómicos.

En contraste con la acción genómica de los esteroides, los efectos esteroideos no genómicos se caracterizan principalmente por su insensibilidad al uso de inhibidores de la transcripción (actinomicina D) y síntesis de proteínas (cicloheximida) así como la rapidez con la cual se presentan (que varían de milisegundos a minutos), la cual representa la más obvia evidencia experimental. Se piensa que la latencia de las acciones genómicas son consecuencia de una serie de eventos inducidos por el esteroide, iniciando con la producción y modificación de RNAm, seguido por la síntesis y transporte proteico, así como las acciones específicas de dicha proteína.^(34,57)

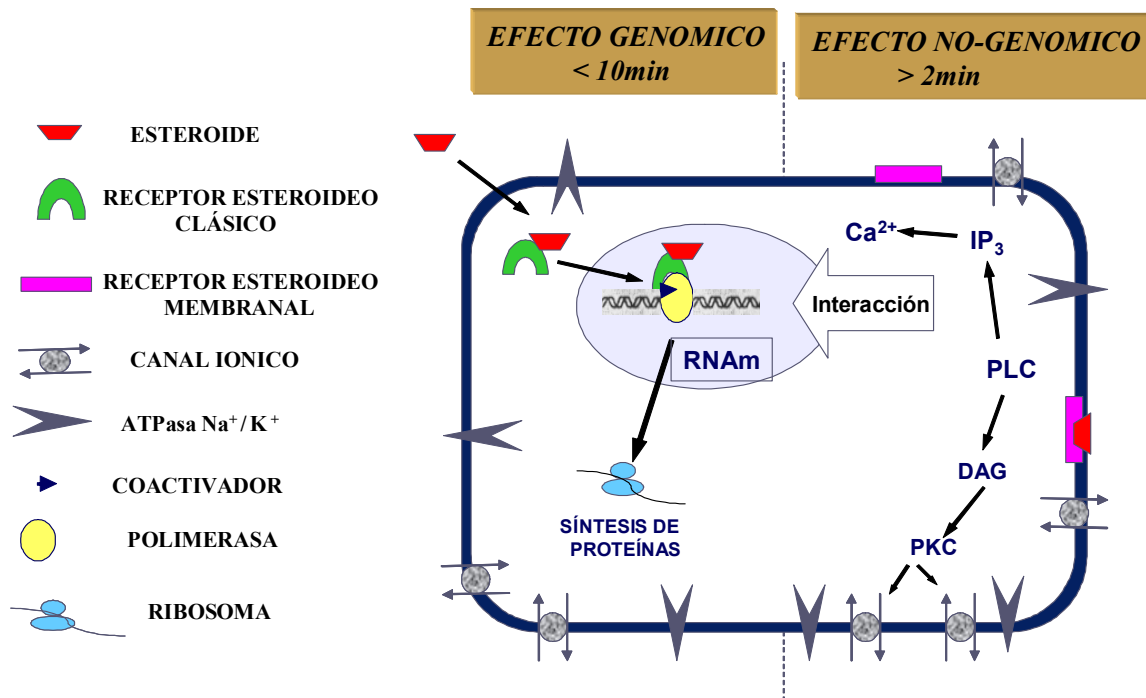
Los efectos esteroideos rápidos, no genómicos son probablemente ejercidos a nivel de la membrana plasmática, y mediados a través de receptores con propiedades farmacológicas distintivas de aquellos receptores esteroideos intracelulares. Las discrepancias en las propiedades farmacológicas no son suficientes para apoyar la hipótesis de receptores proteicos separados para acciones no genómicas. Sin embargo, han surgido diversas evidencias para acciones no genómicas que involucran dos tipos de receptores esteroideos membranales específicos: 1) receptores membranales con estructura molecular relacionada con receptores nucleares esteroideos clásicos y 2) receptores membranales esteroideos no clásicos.⁽⁵⁷⁻⁶⁰⁾

Estas acciones membranales pueden deberse también a cambios en algunas propiedades fisicoquímicas de la membrana plasmática, debido a su interacción con el esteroide. Estos efectos inespecíficos se asocian más comúnmente con cambios en la fluidez de la membrana o cambios en el micro-medioambiente de proteínas de membrana y normalmente se presentan a concentraciones farmacológicas. Sin embargo, dado la especificidad de muchos de los efectos rápidos y su ocurrencia a concentraciones bajas (fisiológicas), es difícil explicarlos únicamente a través de interacciones inespecíficas. Las proteínas de membrana involucradas en las acciones rápidas específicas de los esteroides pueden incluir; receptores esteroideos específicos, canales iónicos, enzimas membranales y otros receptores.^(34, 57 - 60)

Los principales criterios para considerar un efecto como no genómico son: 1) la rapidez con la que se presentan (milisegundos hasta menos de 2 minutos) lo cual excluye un posible mecanismo genómico clásico. 2) estos efectos ocurren aun cuando se restringe el ingreso de la hormona esteroide a la célula, con el uso de esteroides acoplados a macromoléculas tales como albúmina sérica bovina o dextranos de elevado peso molecular. 3) estos efectos esteroideos rápidos no son bloqueados por el uso de inhibidores de la transcripción o de la síntesis de proteínas. 4) los efectos rápidos de las hormonas esteroideas son estereoespecíficos, lo que sugiere que son mediados por receptores membranales específicos. 5) muchos de las hormonas esteroideas muestran potente actividad biológica con poca o ninguna afinidad por el receptor esteroideo clásico.^(34, 57)

Recientemente, las evidencias de acciones de hormonas sexuales esteroideas sobre la función del sistema cardiovascular han ido en aumento. Debido a las diferencias entre acciones genómicas y no genómicas de las hormonas esteroideas, es complicado explicar su mecanismo de acción en base solo a un modelo. La teoría de acción de las hormonas esteroideas debe incluir la interpretación de ambos aspectos y su posible interacción. Así, se ha propuesto un modelo para la acción de las hormonas esteroideas que integra ambos procesos, genómico y no genómico. Este modelo describe: 1) la vía no genómica de acción de los esteroides, la cual comprende la unión de la hormona esteroide a receptores membranales, resultando en señalización celular y cambios funcionales. 2) la unión del esteroide a receptores intracelulares clásicos, modulando la transcripción nuclear y la síntesis de proteínas. 3) como hipótesis a probar, es la interacción de ambas vías, la evidencia de

que cascadas de señalización intracelular y segundos mensajeros modulan procesos transcripcionales sigue en aumento.^(31, 33, 57, 61) (Figura 5)



Christ M and Wehling M (1998) Cardiovascular steroid actions: swift swallows or sluggish snails? Cardiovascular Research 40:34-44

Figura 5. Integración de las acciones genómicas y no genómicas de las hormonas esteroides.

Receptores asociados con acciones no genómicas de los estrógenos.

Los receptores intracelulares clásicos para hormonas esteroides pueden no solamente estar involucrados con acciones genómicas, sino que también pueden estar asociados con efectos esteroideos rápidos, no genómicos. Se ha demostrado por estudios de unión de ligando e inmunohitoquímicos, la existencia de sitios de unión (receptores) a estrógenos a nivel de la membrana plasmática.⁽⁶³⁾ En la superficie celular, se localiza una pequeña población de ER

que cuando se unen al Estradiol, activan proteínas G y disparan múltiples vías de señalización, las cuales pueden inducir o activar diferentes factores de transcripción.^(31-33,57)

El Estradiol es capaz de inducir la traslocación de la sintasa de oxido nítrico endotelial (eNOS) a través de un mecanismo rápido mediado por receptor, calcio dependiente, lo que sugiere un papel no genómico de los estrógenos en la modulación del tono vascular dependiente de oxido nítrico.⁽⁶⁴⁾ Existen datos inmunológicos que demuestran que el receptor nuclear hormonal ER α no solo se encuentra asociado a la membrana plasmática endotelial sino que además, se localiza acoplado a eNOS formando un modulo de señalización funcional que es capaz de regular el calcio en el medio ambiente. Este complejo de señalización funcional ER α -eNOS se localiza a nivel de la “caveola”, que es un microdominio en la membrana plasmática que se encuentra enriquecido con diversas moléculas de señalización.⁽⁶⁵⁾ Estudios funcionales han mostrado que la activación de la vía MAPK por el Estradiol requiere de ER α asociado a membrana plasmática.⁽⁶⁶⁾ La señalización a nivel de la membrana plasmática conduce a modificaciones post-traduccionales de importantes proteínas estructurales y funcionales en la célula. En células endoteliales, el Estradiol activa la vía p38-MAPKAP-2; esta vía fosforila y modifica la función de la proteína de choque térmico 27, esta importante modificación conduce a la preservación morfológica y sobrevivida de las células endoteliales y estimula la formación de tubos capilares.⁽⁶⁷⁾

El debate actual se ha enfocado en la naturaleza y las propiedades de estos receptores estrogénicos membranales (mER). Existen evidencias de que este mER es idéntico al menos a uno de los subtipos de ER (ER α).⁽⁶⁸⁾ Algunos estudios de transfección han revelado que cerca del 3% de ambos ER's (ER α y ER β) se localizan en fracciones enriquecidas de membrana plasmática.⁽⁶⁹⁾ Sin embargo, existen también reportes que muestran que estos mER's pueden ser diferentes a los receptores ER α y ER β . El incremento en la concentración intracelular de calcio inducida Estradiol, iniciado a nivel de la membrana plasmática, en macrófagos de ratón IC-21 no es mediada por ER α o ER β , si no a través de un nuevo receptor estrogénico membranal asociado a proteínas G.⁽⁷⁰⁾

Con el uso de ratones transgénicos (Knockout) que carecían ya sea de ER α o ER β , Derblade B. et al⁽⁷¹⁾ demostraron que solo ER α , pero no ER β , media los efectos benéficos del Estradiol en la producción basal de oxido nítrico. Dan Pauline et al⁽⁷²⁾ por su parte

demonstraron que ciertos tipos celulares tiene abundantes ER α extranucleares, algunos de los cuales co-localizan con las caveolas y pueden representar receptores asociados a membrana. Además, localizaron al ER β predominantemente a nivel intranuclear, postulando también, diferentes conformaciones para ER α a nivel de membrana y en el núcleo, las cuales pueden tener relación con vías de señalización específicas a su localización. Así, el ER α endotelial debe ser considerado como un blanco primordial para las acciones genómicas y no genómicas de los estrógenos.

Acciones no genómicas de los andrógenos en el sistema cardiovascular.

Diversos estudios han tratado de elucidar el mecanismo de acción mediante el cual la testosterona induce vasodilatación. Clásicamente, se reconoce que la testosterona regula la función celular a través de la interacción con el receptor androgénico nuclear (AR), (Figura 4). La testosterona, al igual que otras hormonas sexuales esteroides, es transportada en la circulación sanguínea en conjunción con proteínas de unión; globulinas de unión a hormonas sexuales (SHGB) y con menor afinidad a la albúmina. En la célula blanco la testosterona se disocia de la proteína de unión, difunde a la célula y se une al su AR, en donde induce la transcripción y síntesis de proteínas. Este proceso puede tomar horas en la mayoría de los casos.^(54,62)

La observación de que la vasodilatación mediada por la testosterona se logra en minutos después de su aplicación es fuertemente sugestiva de eventos no genómicos. Esto es apoyado por evidencias substanciales de efectos vasodilatadores de análogos no polares de testosterona⁽⁴⁹⁾, el uso de análogos de testosterona unidos covalentemente con albúmina o dextranos de alto peso molecular que impiden su ingreso a la célula^(49, 73) o por el uso del bloqueador de AR flutamida⁽⁴⁸⁾ Tales observaciones sugieren que la testosterona puede también activar vías de señalización no genómicas alternativas y que en la superficie celular pueden existir AR's.

Como en otros esteroides, los efectos no genómicos de los andrógenos característicamente involucran la inducción rápida de cascadas de transducción de señales de segundos mensajeros convencionales, incluyendo incrementos en la concentración de calcio

intracelular y activación de protein cinasa A y protein cinasa C, y MAPK, conduciendo a una diversidad de efectos celulares.^(13, 40, 58, 60, 61)

Se ha reportado que la acción vasodilatadora de la testosterona es independiente de la liberación de prostanoides dilatadores (Prostaciclina) y el factor hiperpolarizante derivado de endotelio^(48, 54). Diversos estudios han aportado evidencias substanciales de un papel modulador de la testosterona sobre la función de canales de potasio en músculo liso vascular^(48-51, 54). Otros reportes han demostrado la existencia de acciones modulatorias de la testosterona en la función endotelial. La testosterona puede ejercer un efecto benéfico en la regulación del tono vascular controlado por la liberación de oxido nítrico del endotelio, y en pruebas clínicas en las cuales se ha empleado testosterona. La terapia con testosterona ha demostrado mejorar la dilatación arterial braquial mediada por flujo, la cual ocurre por el oxido nítrico liberado por inducción de fuerzas de roce o shaer-stress.^(74, 75) Además, la terapia con testosterona exógena es capaz de mejorar la dilatación inducida por nitroglicerina,⁽⁷⁵⁾ se desconoce aún el mecanismo exacto de este efecto, pero se sugiere que se produce a nivel de cGMP/protein cinasa G. Mientras que estos últimos estudios demuestran interacción de la testosterona con vías de señalización endoteliales (oxido nítrico), la mayoría de las acciones vasodilatadoras de la testosterona se consideran como un efecto directo sobre el músculo liso vascular.⁽⁵⁴⁾

Otros estudios que han explorado la actividad de la testosterona a nivel cardiovascular muestran que esta puede también facilitar un efecto vasodilatador.⁽¹³⁾ Datos recientes obtenidos en nuestro laboratorio, obtenidos en corazones de rata aislados y perfundios mostraron que la testosterona induce un incremento agudo de la resistencia vascular y bloquea el efecto de agentes vasodilatadores, aún cuando se restringe su presencia en el lumen de los vasos coronarios. Este efecto fue de origen no genómico y ejercido a nivel de la membrana plasmática.⁽⁵²⁾

Hasta el momento no se han reportado AR asociados a la membrana plasmática, pero existen evidencias preliminares de sitios de unión membranales microsomales de baja afinidad para andrógenos⁽⁷⁶⁾ y un sitio de unión para dehidroepiandrosterona (DHEA) en membrana plasmática de células endoteliales⁽⁷⁷⁾ que aun requieren de pruebas funcionales y estatus específico del receptor. Además, se ha descrito en humanos, un receptor para

SHBG en membrana plasmática capas de modular la acción de los andrógenos en la membrana plasmática e iniciar la señalización intracelulares vía AMPc.⁽⁷⁸⁾

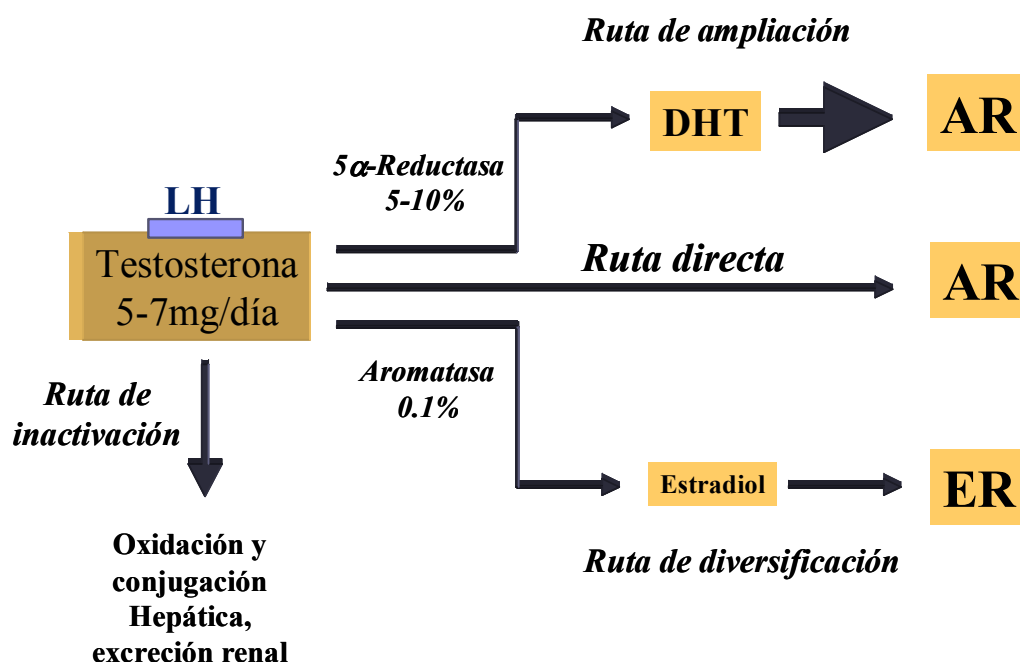
Activación metabólica de la testosterona.

Un punto clave en la actividad biológica de la testosterona es su conversión a metabolitos bioactivos. La testosterona es frecuentemente una pro-hormona, la cual es convertida *in situ in* en sus metabolitos activos en tejidos esteroideogénicos. Solo una pequeña fracción de la producción diaria total de testosterona sufre tal transformación (aproximadamente 5%), dicha conversión amplifica y diversifica los efectos de la testosterona (Figura 6). La conversión a su metabolito 5 α -reducido, dihidrotestosterona (DHT) por la 5 α -reductasa tipo 1 y 2 amplifica la acción de la testosterona, la DHT tiene una mayor potencia debido a su mayor afinidad y menor frecuencia de disociación del AR.^(13, 56) Los dos subtipos enzimáticos de la 5 α -reductasa (tipo 1 y tipo 2) han sido identificados en tejidos vasculares con estudios inmunoreactivos⁽⁷⁹⁾ y de actividad enzimática,⁽⁸⁰⁾ pero las consecuencias biológicas de esta amplificación androgénica en la pared de los vasos sanguíneos aun no ha sido clarificada.

Por otra parte, la conversión de testosterona a Estradiol diversifica la acción de los andrógenos por activación de receptores ER's (figura 6). La expresión del gen de la aromatasa,^(81, 82, 84) la proteína^(83, 84) y la actividad enzimática^(83 - 86) ha sido detectada en tejidos vasculares, incluyendo arterias coronarias humanas⁽⁸⁷⁾ particularmente en endotelio y músculo liso vascular. El Estradiol se ha reconocido como un agente vasodilatador en una amplia variedad de lechos vasculares y ya que la testosterona es convertida rápidamente a Estradiol a través de la enzima aromatasa, este representa un mecanismo potencial por medio del cual la testosterona puede inducir relajación vascular. Estudios realizados por Grohé C. et al⁽⁸⁸⁾ demostraron que la biosíntesis local de estrógenos en el corazón es efectiva para activar receptores estrogénicos α y β , así como genes blanco, en forma dependiente del genero, lo cual puede contribuir a los efectos benéficos de los estrógenos en la patogénesis de las ECV.

Otros estudios han aportado evidencias que excluyen la participación de la aromatasa en los efectos relajantes de la testosterona. La vasodilatación inducida por la testosterona no es

reducida por el uso de inhibidores de la enzima aromatasa^(48, 50) o por antagonistas de receptores estrogénicos⁽⁴⁶⁾ y el metabolito no aromatisable, DHT, ejerce vasodilatación similar a la testosterona.⁽⁵¹⁾ Lo que sugiere que la conversión de testosterona en Estradiol mediada por la enzima aromatasa puede no estar involucrada en las respuestas vasodilatadoras en estos lechos vasculares. Se requiere de una mayor comprensión de la regulación de las hormonas sexuales esteroideas en la actividad de las enzimas aromatasa y 5 α -reductasa en tejidos vasculares, así como de las diferencias asociadas al género.

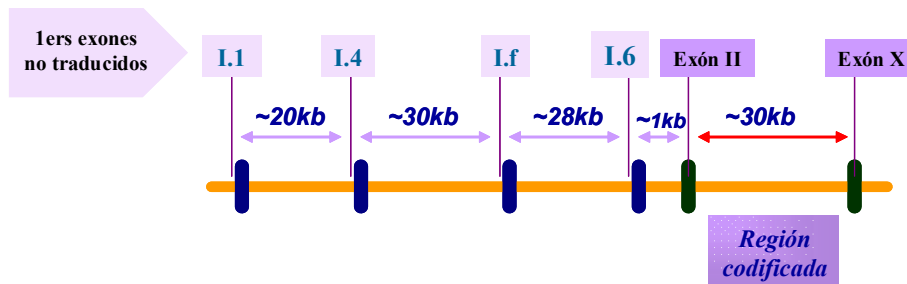


Liu YP, Death KA and Handelsman JD (2003) Androgens and Cardiovascular Disease. Endocrine Reviews. 24(3)313-340.

Figura 6. Rutas de acción de la testosterona. En hombres, la mayoría de la testosterona (95%) se produce bajo la estimulación de la hormona luteinizante (LH) a través de un receptor específico acoplado a proteínas G localizado en la superficie membranal de las células esteroidogénicas de Leydig. La producción diaria de testosterona (5-7mg) queda disponible para seguir una de las 4 principales vías.

Un ejemplo de la capacidad de la biosíntesis local de estrógenos se relaciona con el cáncer de mama en mujeres posmenopáusicas, se ha determinado que la concentración de E₂ presente en tumores de mama en mujeres posmenopáusicas, es al menos 20 veces mayor que el presente en el plasma.⁽⁸⁹⁾ Con la terapia inhibitoria de aromataasa, existe un caída importante en las concentraciones intratumorales de E₂ y estrona, junto con la correspondiente perdida de actividad intratumoral de la aromataasa, indicando que su actividad dentro del tumor y alrededores en tejido adiposo mamario son responsables de las altas concentraciones de E₂.

Los andrógenos (testosterona y androstenediona) pueden ser transformados en estrógenos (Estradiol y Estrona respectivamente) a través de la enzima aromataasa. Esta enzima se expresa en una amplia variedad de órganos y tejidos tanto masculinos como femeninos (gónadas, placenta, tejido adiposo, piel, hígado, cerebro y también esta presente en el sistema cardiovascular). La aromataasa ha sido ampliamente caracterizada a nivel proteico y genético. Pertenece a la superfamilia de citocromo P450 (P450_{AROM}) y es codificado por un solo gen (CYP 19), el cual esta compuesto por 10 exones, el primero de los cuales es una región no traducida del gen (Figura 7). La proteína muestra un alto grado de homología entre las diferentes especies.^(81, 84) No existen isoenzimas para la aromataasa, excepto en el cerdo que presenta 5 diferentes isoformas,⁽⁸⁴⁾ por lo que la secuencia de aminoácidos de la proteína es la misma en todos los tejidos. Sin embargo, la secuencia del mRNA primario que codifica para la aromataasa presenta diferencias en la región 5'-no traducida que es específica en cada tejido. Esto es debido a la presencia en el gen de varios subtipos de exon I, los cuales pueden ser controlados por diferentes promotores, esta característica también implica la activación tejido específica de la trascrición por diferentes señales.^(81, 84, 90)

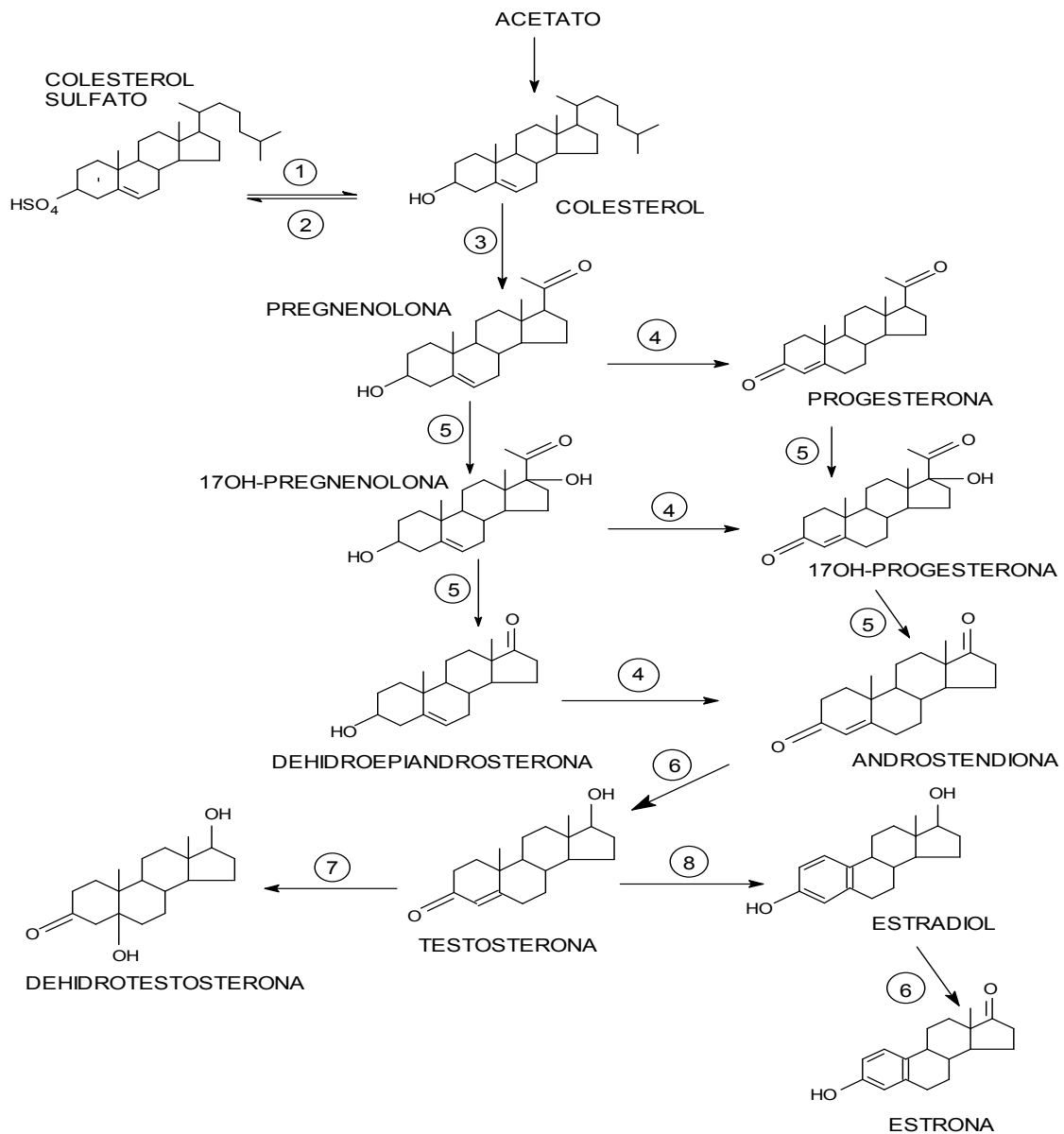


Sebastian Sibi and Bulun E. Serdar. (2001) A highly complex organization of the regulatory Region of the human CYP19 (aromatase) gene revealed by the human genome project. J Clin Endocrinol Metab. 86 (10)4600-4602.

Figura 7. Organización genómica del gen CYP19 humano. El exon I corresponde a una región no codificada del gen y solo presenta funciones regulatorias.

Otro punto importante es que la producción de estrógenos en sitios extragonadales es dependiente de fuentes externas de precursores androgénicos C19, debido a que estos tejidos extragonadales son incapaces de convertir el colesterol en esteroides de C19 (Figura 8). En consecuencia, las concentraciones circulantes de testosterona y androstenediona, así como DHEA y DHEAS son extremadamente importantes en términos de proveer adecuadamente de substrato para la biosíntesis de estrógenos en estos sitios. ⁽⁹¹⁾

En este contexto, es apropiado considerar que los niveles circulantes de testosterona en hombres durante el transcurso de su vida, provee de substrato suficiente para la biosíntesis local de estrógenos a través de su aromatización en tejidos dependientes de estrógenos, y así proporciona protección en contra de la llamada enfermedad por deficiencia de estrógenos. Esto parece ser importante en términos de protección ósea contra la desmineralización y puede contribuir al mantenimiento de las funciones cognitivas y prevención de la enfermedad de Alzheimer. ^(91,92)



Ayikoe G. (1999) Pharmacol Rev 51:63-81

Figura 8. Biosíntesis de hormonas sexuales esteroides: (1) Sulfatasa, (2) Sulfotransferasa, (3) Enzima de corte de la cadena lateral Citocromo P₄₅₀ (P450_{C₃sc}), (4) 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-HSD), (5) Sistema enzimático 17α-hidroxilasa / 17,20 liasa (P450_{C₁₇} o P450_{17α}), (6) 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β-HSD), (7) 5α-reductasa, (8) Aromatasa (estrógeno sintasa).

Efecto del 17β-estradiol y la testosterona en la cinética intracelular de calcio.

En efecto, el (o los) mecanismo (s) por medio del cual las hormonas sexuales esteroideas afectan al sistema cardiovascular es complejo y puede incluir varios procesos. La testosterona (T) y el 17β-Estradiol (E₂) ejercen un papel importante en la regulación de la cinética de calcio en diversos tipos celulares. El Ca²⁺ es esencial para múltiples respuestas celulares, la mayoría de las células utiliza los flujos de Ca²⁺ provenientes del espacio extracelular y de la liberación de depósitos intracelulares para generar señales intracelulares.^(93, 94) Cuando se activa los canales de Ca²⁺ tanto en la membrana plasmática como en los depósitos intracelulares pueden inducir una elevación de un pulso leve que se propaga dentro del citoplasma. Estas señales pueden permanecer localizadas y activar efectores dentro de la vecindad inmediata a los canales y reclutar otros efectores o pueden sumarse y difundir en forma global propagándose en todo el citoplasma y entre las células, en forma de olas de calcio. Las señales localizadas de Ca²⁺ sirven para activar blancos específicos antes de su difusión o del inicio de mecanismos regenerativos de la concentración normal de Ca²⁺ en la célula.^(95, 96)

Las células endoteliales en el sistema cardiovascular tienen importantes funciones. En los microvasos ejercen un papel activo en la regulación de la permeabilidad vascular, mientras en los vasos grandes, las células endoteliales contribuyen al control del tono del músculo liso vascular. El control tanto de la permeabilidad como del tono vascular involucra varios mecanismos en los cuales la concentración intracelular de calcio parece ejercer un papel primordial.⁽⁹⁷⁾ Típicamente, los agonistas de actividad endotelial activan receptores específicos localizados en la superficie celular, este complejo agonista-receptor activan a la enzima fosfolipasa C (PLC) a través de proteínas G. El substrato principal de esta enzima el membrana 4,5-difosfato de fosfatidilinositol (PIP₂) es un fosfolípido de membrana cuya hidrólisis genera una molécula hidrosoluble, el IP₃, y un compuesto hidrofóbico, el diacilglicerol (DGA). El IP₃ difunde al espacio citoplasmático y al unirse a receptores específicos localizados en los depósitos intracelulares de calcio (porciones modificadas de retículo endoplásmico) promueve la liberación de calcio. Por su parte el DGA activa otras enzimas.^(93, 94) Una vez formado el IP₃ tiene una vida media de aproximadamente 7s, siendo degradado secuencialmente por fosfatasa a bifosfato de inositol (IP₂), monofosfato

de inositol (IP_1) y posteriormente a inositol libre, mismo que es utilizado junto con el DGA para sintetizar nuevamente fosfoinositidos de membrana.⁽⁹⁴⁾

El receptor para IP_3 es un canal iónico formado por 4 subunidades proteicas, cada una con un sitio de unión para IP_3 , cuando este se une a su receptor experimenta cambios conformacionales que origina la apertura del canal, lo cual conduce a la salida rápida de los iones calcio a favor de un gradiente de concentración, generando así un aumento rápido e importante en la concentración de calcio citoplasmática.^(93, 94)

La cinética intracelular de calcio inducida por agonistas de actividad endotelial se presenta en 2 fases. Un pico inicial (en espiga) mediado por la liberación de los depósitos intracelulares de calcio a través de IP_3 y la recaptura de calcio por bombas metabólicas (ATPasas) localizadas en los depósitos, seguida por una segunda fase de meseta sostenida que es dependiente de la presencia de calcio extracelular y que lentamente regresa a niveles basales.^(52, 93, 94, 98) Como ejemplo puede observarse el efecto de la bradicinina sobre el endotelio de aorta de rata (Figura 9).

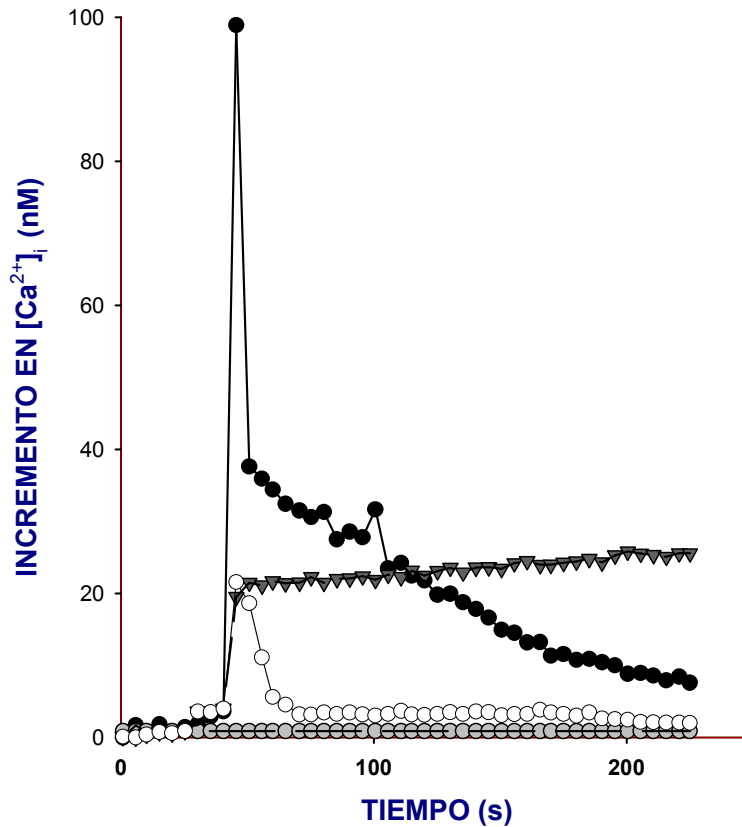
Datos previos de nuestro laboratorio obtenidos en células endoteliales de aorta de rata macho en cultivo, demostraron que E_2 induce un incremento en la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$) actuando como un agonista de actividad endotelial, en forma rápida y no-genómica (milisegundos), a través de la enzima fosfolípasa C_β (PLC_β), que esta acoplada a proteínas G, el incremento en $[Ca^{2+}]_i$ se presenta aún cuando se restringe el ingreso del E_2 a la célula, por el uso del esteroide acoplado a albúmina serica bovina, los receptores estrogénicos intracelulares no participan en este efecto, demostrando que estos efectos son ejercidos a nivel de la membrana plasmática, posiblemente a través del receptor $ER\alpha$.⁽⁹⁸⁾

Por otra parte, la testosterona no afecta en forma directa la cinética $[Ca^{2+}]_i$ en células endoteliales de aorta de rata, pero bloquea el incremento en la concentración intracelular de calcio inducida por bradicinina (Figura 9), estos resultados sugieren un estímulo esteroideo directo de alguna vía de señalización intracelular, la testosterona puede modular los efectos inducidos por bradicinina en la cinética intracelular de calcio por activación de receptores de bradicinina unidos a membrana.⁽⁵²⁾

Sin embargo, la aorta es una arteria de conductancia y debido a la heterogeneidad endotelial, es necesario explorar los efectos esteroideos en endotelio vascular obtenido de otras fuentes arteriales

Endotelio vascular como un órgano endocrino.

El endotelio desempeña un papel fundamental en la homeostasis vascular, mediante la síntesis y liberación de diversas sustancias autocrinas y paracrinas. Forma la capa interna de los vasos sanguíneos y debido a su localización estratégica entre la circulación y la pared vascular interactúa con mediadores tanto celulares como hormonales, provenientes de estos compartimientos.⁽⁹⁹⁾ El endotelio vascular tiene un área de superficie de 400 metros cuadrados, pesa cerca de 1-5kg y contiene un estimado de 1-2 trillones de células endoteliales. Es una barrera selectivamente permeable para macromoléculas, y proporciona una superficie no adhesiva y no trombogénica que mantiene activamente la fluidez de la sangre. Además de sus funciones como barrera y de transporte, el endotelio vascular actúa como un órgano endocrino / paracrino, a través de la secreción de una amplia variedad de mediadores biológicamente activos.^(99, 100) Estos ejercen un papel esencial en la regulación de la respuesta inmune, coagulación y tono vascular, y actúan sobre diversas células vecinas, tales como; músculo liso vascular, monocitos, macrófagos, fibroblastos y diversas células específicas de cada órgano.^(99, 100, 101) Estas sustancias mediadores incluyen:



Rubio-Gayosso I. et al. (2002) Testosterone inhibits bradykinin-induced intracellular calcium kinetics in rat aortic endothelial cell en culture. Steroids 67, 393-397.

Figura 9. Trazo representativo del incremento en la concentración de calcio intracelular inducido por testosterona y bradicinina en células endoteliales de aorta de rata. La testosterona no tiene un efecto directo sobre la cinética $[Ca^{2+}]_i$ (círculos grises). Los círculos llenos muestran la cinética $[Ca^{2+}]_i$ inducida por bradicinina. La incubación de las células con testosterona ($1\mu M \times 30s$) bloquea el efecto inducido por bradicinina y modifica la segunda fase de la cinética (triángulos). Esta segunda fase es abolida en ausencia de calcio extracelular (círculos vacíos).

- ⇒ Vasodilatadores [prostaciclina (PGI₂), óxido nítrico (ON), factor hiperpolarizante derivado de endotelio (EDRF)] y péptidos natriuréticos.
- ⇒ Vasoconstrictores [endotelina (ET), tromboxano A₂, prostaglandina H₂ y componentes del sistema renina-angiotensina].
- ⇒ Factores pro- y anti-trombóticos [factor tisular, factor activador plaquetario (PAF), factor de von Willebrand (vWf)].
- ⇒ Activadores e inhibidores fibrinolíticos [activador del plasminógeno tisular (t-PA), activador del plasminógeno inhibitorio-1 (PAI-1)].
- ⇒ Metabolitos del ácido araquidónico (prostanoides).
- ⇒ Moléculas de adhesión leucocitaria [molécula-1 de adhesión intracelular (ICAM-1), molécula-1 de adhesión celular vascular (VCAM-1), E-selectina, P-selectina].
- ⇒ Múltiples citosinas transformadoras del factor del crecimiento, mediadores pro-inflamatorios y anti-inflamatorios, factor de necrosis tumoral, quimiocinas y esteroides.

La función endotelial es usualmente determinada por el diámetro del vaso, la contractilidad vascular, o el flujo sanguíneo en respuesta a agonistas dependientes de endotelio tales como acetilcolina o bradicinina. La relajación vascular dependiente de endotelio es mediada predominantemente por el ON y en menor grado por prostaciclina y canales de potasio sensibles a calcio. Existen evidencias de que la disfunción endotelial, que frecuentemente se define como una disminución en la síntesis, liberación y/o actividad del ON, es un factor determinante que conduce a diversas patologías como aterosclerosis y síndrome coronario agudo.^(99, 101)

Se ha descrito la heterogeneidad de las células endoteliales a nivel de su morfología, función, composición antigénica y en las diferentes redes de señalización. Lejos de ser un conglomerado gigante de células homogéneas, el endotelio representa un consorcio de pequeños arcos celulares localizados dentro de los vasos sanguíneos en los diferentes tejidos. Mientras que como una unidad comparten ciertas características comunes, cada grupo endotelial se encuentra adaptado únicamente para cubrir con las necesidades de su

medioambiente local.^(102, 103) Además, existen evidencias de que el endotelio en los compartimientos macro- y microvascular presenta orígenes embrionarios distintos, sugiriendo que un fenotipo endotelial determinado, diferenciado durante el desarrollo, puede contribuir a las funciones específicas de sitio de localización de la célula.⁽¹⁰⁴⁾ Como un importante corolario, el origen embrionario y el medioambiente local de las células endoteliales pueden contribuir importantemente en su función normal y en su respuesta a estímulos fisiopatológicos.^(104, 105)

Además de los determinantes genéticos en la función celular endotelial, los determinantes ambientales regulan de forma crítica la heterogeneidad de las células endoteliales en los diferentes sitios del árbol vascular (arterias, arteriolas, capilares, venulas y venas). Estos determinantes ambientales pueden incluir; parámetros biofísicos y mecánicos inherentes a una región vascular específica, la presencia o ausencia de estímulos inflamatorios, así como el microambiente único presente en los diferentes lechos vasculares. Los determinantes ambientales son muy variados, pueden además afectar la expresión génica diferencial en las células endoteliales localizadas en diferentes órganos o tejidos.^(104 - 106) El medio ambiente en el cual residen ejerce un papel importante en la determinación de sus funciones, el endotelio se adapta a las señales ambientales,^(105, 106) de esta forma pueden mostrar especialización funcional.

JUSTIFICACION.

Las enfermedades cardiovasculares permanecen como una de las principales entidades patológicas a nivel mundial. Su incidencia así como la morbilidad / mortalidad asociada se incrementa con la edad. Se ha reconocido que, en todas las edades, las mujeres están relativamente más protegidas en comparación con los hombres. Los mecanismos que contribuyen para determinar las diferencias sexuales en la distinta susceptibilidad y mortalidad para ECV son aún desconocidos. Los hombres presentan una mayor incidencia para ECV comparado con las mujeres en edad reproductiva, sin embargo estas diferencias disminuyen después de la menopausia. Los hombres no experimentan una reducción abrupta en la producción de hormonas sexuales endógenas, como ocurre en la mujer con la menopausia, pero es claro que ocurre una disminución en los niveles plasmáticos de hormonas sexuales (bioactivas) asociado a la edad. Se piensa que la menopausia así como la declinación de las hormonas sexuales asociada a la edad, promueven diferentes problemas de salud. Actualmente se ha puesto mayor atención en la importancia de los esteroides sexuales (testosterona, estrógenos y andrógenos adrenales) respecto a la etiología, prevención y tratamiento de las ECV.

Las hormonas sexuales esteroides; Testosterona y 17β -estradiol, pueden influir en acciones metabólicas que no están directamente involucradas con procesos reproductivos. Las señales endocrinas que influyen a el sistema cardiovascular pueden dividirse en dos grandes grupos; aquellas acciones genómicas que involucran la transcripción de genes y biosíntesis de proteínas y aquellas acciones no genómicas que son ejercidas a nivel de la membrana plasmática e involucran vías de señalización intracelular y segundos mensajeros, ambos tipos de señales pueden interactuar mutuamente y estar significativamente integradas. El efecto de las hormonas sexuales esteroides sobre la cinética intracelular de calcio puede tener un importante mecanismo regulatorio en células endoteliales vasculares, que a su vez influyen en las funciones de células vecinas, especialmente en el músculo liso vascular.

Datos recientes obtenidos en nuestro laboratorio en células endoteliales de aorta de rata en cultivo, demostraron que el 17β -estradiol actúa directamente como un agonista de actividad endotelial, incrementando la concentración de calcio intracelular, a través de mecanismos

no genómicos. Sin embargo, la testosterona no induce ningún efecto directo sobre la cinética intracelular de calcio en este mismo tipo celular, pero es capaz de bloquear el efecto de los agonistas de actividad endotelial como la bradicinina. Demostrando que ambas hormonas esteroides sexuales son capaces de influir de forma importante la cinética intracelular de calcio en células endoteliales.

El endotelio de aorta pertenece a una arteria de conductancia. Se ha asumido que el flujo de sangre a los tejidos es controlado por cambios en el diámetro de vasos pequeños ($>300\mu$) de resistencia en la red vascular. Debido a la heterogeneidad endotelial es importante explorar los efectos de las hormonas sexuales esteroides en endotelio de otros lechos vasculares. Actualmente es aceptado que las células endoteliales en la red vascular difieren en estructura, función y expresión molecular, la cual puede ser muy diversa. Se han considerado dos causas principales para tal heterogeneidad. Primero, el medio ambiente en el cual residen las células endoteliales ejerce un papel importante en la determinación de sus funciones. Segundo, existen evidencias que indican que el origen embriológico del endotelio macro- y microvascular dentro de ciertos órganos es distinto, en donde los segmentos macrovasculares pueden surgir de la angiogénesis y los segmentos microvasculares pueden surgir de la vasculogénesis. Juntos, el medio ambiente de residencia de las células y su función genéticamente programada, establecen las respuestas celulares a diferentes tipos de estímulos, tales como la estimulación con hormonas sexuales esteroides.

Otro aspecto importante, es que el 17β -estradiol actúa como un agonista de actividad endotelial, incrementando la concentración de calcio intracelular y es reconocido como un agente vasodilatador en una variedad de lechos vasculares, y ya que la testosterona es rápidamente convertida en 17β -estradiol a través de la enzima aromatasa, este representa otro mecanismo potencial por medio del cual la testosterona pudiera inducir sus efectos en el metabolismo endotelial. La enzima aromatasa se encuentra ampliamente expresada en tejidos gonadales y extragonadales, incluyendo músculo liso vascular y células endoteliales de algunos lechos vasculares, dentro de estos sitios, la acción de la aromatasa puede generar altos niveles de 17β -estradiol localmente que actúan de forma paracrina o inclusive intracrina, sin afectar significativamente los niveles de estrógenos circulantes. Las

evidencias de que los estrógenos formados endógenamente en tejidos extragonadales ejercen un papel importante en la fisiología vascular continúan acumulándose.

Nosotros estudiamos los efectos diferenciales inducidos por las hormonas sexuales esteroides en endotelio aórtico y células endoteliales obtenidas de microvasculatura coronaria. Por lo tanto, la propuesta del presente estudio fue analizar el incremento en $[Ca^{2+}]_i$ inducido por las hormonas sexuales esteroides en células endoteliales microvasculares coronarias (CEMC) de rata en cultivo, analizando las vías intracelulares involucradas en estos efectos, así como su posible metabolismo, además de la inmunexpresión del receptor estrogénico alfa ($ER\alpha$) y el receptor androgénico (AR) en CEMC. Para investigar posibles diferencias de género, este estudio fue realizado tanto en CEMC de rata macho como de hembra.







HIPÓTESIS.

Las células endoteliales muestran heterogeneidad estructural, funcional y de expresión molecular dependiendo del origen del lecho vascular y presentan diferentes respuestas hormonales dependiendo del género, entonces las hormonas sexuales esteroideas; Testosterona y 17β -estradiol ejercerán efectos diferenciales en la cinética intracelular de calcio en células endoteliales de microvasculatura coronaria (CEMC) de rata en cultivo comparado con células endoteliales provenientes de aorta, los efectos de testosterona en CEMC son ejercidos a través de su aromatización a 17β -estradiol.

OBJETIVO GENERAL.

Caracterizar los efectos de las hormonas sexuales esteroideas; Testosterona y 17 β -estradiol sobre la cinética intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$) en células endoteliales microvasculares coronarias (CEMC) de rata en cultivo. Además, analizar las vías intracelulares involucradas en estos efectos, así como su posible metabolismo y la inmunoexpresión del receptor estrogénico alfa (ER α) y el receptor androgénico (AR) en CEMC. Determinar posibles diferencias de género.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

-  Determinar el efecto del 17 β -estradiol y Testosterona sobre la cinética intracelular de calcio en CEMC de rata macho y hembra en cultivo.
-  Analizar la participación de la enzima fosfolípasa C β (PLC β) en la cinética intracelular de calcio inducida por la Testosterona y el 17 β -estradiol en CEMC de rata macho y hembra en cultivo.
-  Determinar la inmunoexpresión de los receptores; alfa estrogénicos y androgénico en CEMC de rata macho y hembra en cultivo.
-  Determinar la participación de la enzima aromatasa en los efectos inducidos por la Testosterona sobre la cinética $[Ca^{2+}]_i$ en CEMC de rata macho y hembra en cultivo.
-  Determinar la inmunoexpresión de la enzima aromatasa en CEMC de rata macho y hembra en cultivo.
-  Evaluar las diferencias asociadas al género en los efectos inducidos por Testosterona y 17 β -estradiol en la cinética $[Ca^{2+}]_i$ en CEMC de rata en cultivo.

MATERIAL Y METODOS.

Aislamiento y cultivo de células endoteliales microvasculares coronarias de rata macho y hembra.

Los cultivos fueron obtenidos a partir de un método previamente descrito.⁽¹⁰⁷⁾ Brevemente, se utilizan ratas Wistar machos y hembras (de 200 a 300g de peso) las cuales son manejadas por separado, se anestesian con una inyección intraperitoneal de fentobarbital (50mg/kg) y heparina (150U/kg). Los corazones son extraídos rápidamente, lavados con solución balanceada en sales Hank's y diseccionados para descartar aurículas, ventrículo derecho y tejido conectivo y valvular. Posteriormente los ventrículos derechos se abren por la pared anterior, se lavan y sumergen en solución de etanol (70%) por 40s con la finalidad de desvitalizar mesotelió epicardico y células endoteliales endocardicas. El tejido remanente se corta en pequeños pedazos y se coloca en solución de colagenasa tipo 1A y IV (2mg/ml) incubando a 37°C por 40min. El tejido digerido enzimáticamente es pasado a través de una malla metálica (70µM). Las células disociadas en el filtrado son centrifugadas a 3000RPM (10min) en un gradiente de Percoll previamente preparado (Percoll al 30% en DMEM centrifugado por 2h a 14,000 x g). Finalmente, las células endoteliales son aisladas, lavadas y resuspendidas en medio de cultivo [Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)] suplementado con 20% suero fetal bovino (SFB), factor de crecimiento endotelial (2ml/100ml) y antibiótico/antimicótico (2ml/100ml, Gibco BRL), sembradas en frascos de cultivo cubiertos con fibronectina y colocadas en una cámara de incubación (estufa de incubación con cámara de agua, capaz de regular la concentración de CO₂) con ambiente húmedo a 37°C, bajo una atmósfera de 5% de CO₂. Las células endoteliales microvasculares coronarias (CEMC) se utilizan entre los pasajes 4 a 11, debido a que en este periodo mantienen sus características fenotípicas.

Caracterización.

Los principales criterios para la caracterización de este tipo celular fueron: La morfología celular típica en “adoquín” y la expresión del antígeno relacionado con el factor VIII (von Willebrand) utilizando procedimientos inmunocitoquímicos y microscopia confocal

(Confocal LEICA TCS SP2)⁽⁹⁸⁾ Más del 99% de las CEMC expresaron el factor de von Willebrand.

Protocolo experimental para la cuantificación de las concentraciones intracelulares de calcio.

Las CEMC fueron tripsinizadas y resuspendidas en medio de cultivo [DMEM suplementado con 2% de SFB y antibiótico/antimicótico (2ml/100ml, Gibco BRL] a una concentración final de 2.4×10^5 células/ml. Se colocó una gota de 25 μ l en el centro de un cubreobjetos del no.1 (pegado a una caja de Petri de plástico perforada). Después de la fijación de las células, se les agregó medio de cultivo adicional al platillo a un volumen final de 2ml y se incubó en condiciones óptimas. El ciclo celular fue sincronizado a través de la deprivación de suero.

Las CEMC fueron cargadas por 2h con 3 μ M de Fura-2AM en solución HEPES-Krebs-Henseleit (K-H) (pH 7.4 a 37°C) compuesto por (mM): 117.8 NaCl, 6 KCl, 1.75 CaCl₂, 1.2 NaH₂PO₄, 1.2 MgSO₄, 5 glucosa, 5 piruvato de sodio y 20 HEPES, a temperatura ambiente en la oscuridad. Las células fueron lavadas y post-incubadas en el mismo buffer por 1h. Los platillos experimentales fueron colocados en un sistema de microscopía inversa (Dual-wavelength fluorescence imaging system InCyt Im2; Intracellular Imaging Inc., Cincinnati, OH, USA), para medir la fluorescencia emitida por el complejo Fura 2-Ca²⁺ cuando es estimulado por luz ultravioleta. La emisión de FURA 2, en respuesta a la concentración intracelular de calcio, se calibro en proporción de los valores de fluorescencia emitida a 510nm, en respuesta a la estimulación con la luz UV a 340 y 380nm, después de la substracción de la fluorescencia de fondo, usando estándares de calcio (Molecular Probes Kit II, Eugene, OR, USA) en ausencia de células como describió Grynkiewicz et al.⁽¹⁰⁸⁾ La constante de disociación para el complejo fura2-Ca²⁺ se tomó a 224nM. Los valores para R_{max} and R_{min} fueron calculados de medidas usando 25 μ M de digitonina y 4mM EGTA, hasta alcanzar el pH de 8.3.

Efectos del 17β-estradiol sobre la concentración intracelular de calcio.

Se realizó una serie de experimentos para caracterizar los efectos rápidos del E₂ a concentraciones de 0.01nM a 1μM, sobre la [Ca²⁺]_i en CEMC de rata macho y hembra en cultivo.

Efectos de la Testosterona sobre la concentración intracelular de calcio.

Se realizaron curvas concentración-respuesta a testosterona, a concentraciones de 0.01nM a 1μM para evaluar su efecto sobre la [Ca²⁺]_i en CEMC de rata macho y hembra en cultivo.

Efecto del U73122 sobre las respuestas de Testosterona y 17β-estradiol

En otra serie de experimentos, Las CEMC fueron incubadas con el inhibidor específico de la enzima PLC, U73122 [1μM] para determinar la participación de los depósitos intracelulares de calcio en los efectos inducidos por testosterona y 17β-estradiol.

Ensayos inmunocitoquímicos para análisis de expresión de receptores α-Estrogénico (αER) y Androgénico (AR).

Para determinar la expresión y distribución de receptores a testosterona (AR) y E₂ (αER) en CEMC de rata macho y hembra en cultivo utilizamos un procedimiento inmunocitoquímico de doble marcaje y microscopía confocal en la siguiente forma: Las CEMC se siembran en cubreobjetos, después de 48 a 72h de privación de suero, son lavadas con buffer salino de fosfatos (PBS) 0.1M, y fijadas con paraformaldehído (4%) por 30min. Se lavan e incuban por 30min con solución bloqueadora (albúmina bovina 0.5% libre de IgG). Posteriormente, las células son incubadas con el anticuerpo primario anti-αER (desarrollado en conejo, 1:100, Santa Cruz Biotechnology) por 24h a 4°C. Después de este periodo, se lavan y post-incuban con el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con fluoresceína (FICT, desarrollado en cabra, 1:250, Santa Cruz Biotechnology) por 1h a temperatura ambiente y en una cámara oscura. Para determinar la co-expresión de αER y AR, se realiza una

segunda serie de incubaciones, en las mismas condiciones, utilizando el anticuerpo primario anti-AR (desarrollado en conejo, 1:100, Santa Cruz Biotechnology) y el anticuerpo secundario anti-conejo conjugado con rodamina (desarrollado en cabra, 1:250, Santa Cruz Biotechnology), utilizando los mismos tiempos de incubación para anticuerpos primarios y secundarios respectivamente, con la finalidad de evitar diferencias en las condiciones de difusión de los anticuerpos. Finalmente, la fluorescencia es evaluada a través de microscopia confocal (Confocal LEICA TCS SP2)

Efecto de los inhibidores específicos de Aromatasa (P450_{AROM}) sobre las respuestas de Testosterona.

Exploramos la participación de la enzima aromatasa en los efectos inducidos por testosterona sobre la $[Ca^{2+}]_i$, preincubando las CEMC con los inhibidores selectivos; aminoglutetimida [4 μ M] y 4-hidroxiandrostenediona [4 μ M], por 10min, previos a la estimulación con testosterona.

Ensayos inmunocitoquímicos para aromatasa.

La expresión de aromatasa en CEMC de rata macho y hembra en cultivo fue evaluada a través de ensayos inmunocitoquímicos y microscopia confocal, como se describió con anterioridad. Para la preparación de anticuerpos primarios anti-aromatasa se realizó una serie de inoculaciones a un conejo new Zeland con el péptido de 20 aminoácidos correspondiente a los residuos 379-398 de la proteína P450_{AROM} de rata (Figura 23) que presenta homología idéntica con la proteína de humano y pollo, la cual fue deducida de la secuencia nucleotídica del correspondiente DNA, como describió Sanghera et al. ⁽¹⁰⁹⁾

El suero obtenido fue tratado como sigue; Las fracciones IgG's fueron removidas utilizando cromatografía de afinidad, los picos cromatográficos fueron dializados, y los títulos inmunoreactivos fueron determinados por ELISA (1:500-1:10,000). Los fragmentos F(ab')₂ se obtuvieron por digestión enzimática de IgG's (immobilized pepsin, Pierce) y se almacenaron a -20°C.

Las CEMC's fueron colocadas en cubreobjetos, fijadas con paraformaldehído 4% por 30min, lavadas, incubadas con solución de bloqueo (albúmina bovina libre de IgG's 0.5%)

por 30min, y posteriormente incubadas con el fragmento F(ab')₂ de los anticuerpos policlonales generados contra el péptido de P450_{AROM} de rata (dilución 1:100) por 24h a 4°C. Las células fueron lavadas y post-incubadas con un anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína anti-conejo (FICT, Santa Cruz Biotechnology) por 1h a temperatura ambiente en una cámara oscura. Finalmente la expresión de P450_{AROM} fue evaluada a través de la fluorescencia y microscopia confocal (TCS SP2; Leica).

Preparación de los homogenizados de CEMC's de rata que contienen aromatasas.

Los homogenizados de CEMC de rata macho y hembra fueron preparados a través de la separación mecánica de las células en los frascos de cultivo con un raspador de células y por centrifugación a baja velocidad, a temperatura ambiente, por 5min. Los pellets fueron lavados con PBS, y se les agregó buffer de lisis frío [que contiene; PBS, Nonidet P-40 1%, Deoxicolato de sodio 0.5%, y Dodecil sulfato de sodio (SDS) 0.1%], junto con un cocktail de inhibidores de proteasas (Sigma), se incubaron por 30min a 4°C. Posteriormente, las células se rompen y se homogenizan en particular de aproximadamente 0.4µm a través de sonicación y homogenización (Politron, Daigger). El contenido proteico de los homogenizados fue cuantificado utilizando el método de Bradford.^(111, 112) Los homogenizados fueron alícuotados y almacenados a -70°C hasta su uso en los ensayos de actividad de P450_{AROM} e inmunoblot.

Inmunoblot.

Se obtuvieron microsomas de placenta humana como control positivo, de acuerdo a un método publicado anteriormente.⁽¹¹⁰⁾ Se obtiene además lisados de CEMC de rata macho y hembra como se describió previamente. Los homogenizados fueron transferidos a tubos de microcentrifuga y centrifugados a 10,000 x g por 10min a 4°C, el líquido sobrenadante (S1) (que contiene partículas de tamaño menor a 0.4µm) fue centrifugado a 100,000 x g por 30min a 4°C para aislar las vesículas de la membrana plasmática. Tanto el pellet (P1 y P2) como el sobrenadante (S1 y S2) de las centrifugaciones a 10,000 y 100,000 x g fueron

probadas para inmunoblot de P450_{AROM}. El contenido de proteína fue determinado a través del método de Bradford.^(111, 112)

El homogenizado tisular (120µg) mezclado con buffer de muestra Laemmli (que contiene; SDS 4%, Glicerol 20%, 2-mercaptoetanol 10%, Azul de Bromofenol 0.0004% y Tris-HCl 0.125 M, pH 6.8; Bio-Rad) fueron hervidos por 5min. Las muestras se cargaron los carriles del gel de electroforesis SDS-PAGE al 10% con 30µg de proteína/carril y se corrió a 100 mV. Se transfirió a membranas de nitrocelulosa de 0.45µm (BIORAD), para la realización del inmunoblot; se bloqueó los sitios inespecíficos con Blotto (PBS, 5% leche, 0.05% Tween-20) e incubó con el anticuerpo primario [fragmento F(ab')₂ de los anticuerpos policlonales generados contra el péptido de P450_{AROM} (Figura 23) de rata, dilución 1:250] por 1h. Posteriormente se realizó una post-incubación con el anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (HRP, 1:500 x 1h). Finalmente se realizó la reacción de peroxidación con un Kit (sustrato DAB, VECTOR laboratories). En experimentos control en los cuales el anticuerpo primario fue omitido, no se detectaron bandas.

Hibridación in situ

Se utilizaron oligonucleótidos de 24 bases de un fragmento del exon I, como sondas con sentido y antisentido para el análisis de mRNA de P450_{AROM} en los experimentos de hibridación *in situ* en CEMC de rata macho y hembra en cultivo, a través de un método previamente descrito.^(90, 113) Las sondas conjugadas con fluoresceína fueron obtenidas comercialmente (Accesolab). Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados como sondas para el análisis de los 5'-transcritos terminales P450_{AROM} se obtuvieron de los tres principales subtipos de exon I, expresados en placenta (5'-TTCTTCACCTTC CTGTTTGCCT-3'); ovario (5'-TTACAAGTCAAAACAAGGAAGCC-3'); y próstata/testículo(5'-CAAAGG-GACAGGAAAATTACAGAA-3'). Brevemente, las CEMC's fueron sembradas en cubreobjetos y fijadas con Paraformaldehido 4%, lavadas, permeabilizadas con Triton X-100 por 90s, lavadas e incubadas con Proteínasa K (100µg/ml) por 10min a 37°C, y luego lavadas e incubadas por 5min con Glicina. Posteriormente, los cubreobjetos fueron preincubados con buffer de hibridación el cual contenía; Formamida deionizada (5ml), SSC 20X (2ml), solución de Denhart's 1X (0.2ml),

DNA de esperma de salmón [0.5ml (10mg/ml)], tRNA de levadura (0.25ml) y Dextran Sulfato (2ml), por 20min a 70°C. Las sondas fueron aplicadas en el buffer de hibridación (10µl/200µl de buffer) y se incubaron en una cámara húmeda a 37°C, en la oscuridad por 8-12h Después de la hibridación, los cubreobjetos fueron lavados con SSC 1X -SDS 0.1% a temperatura ambiente y fueron visualizadas usando microscopia fluorescente. Las sondas con sentido y el tratamiento con RNasa I (0.5mg/ml) fueron utilizados como controles negativos, y el tratamiento con DNasa I (0.5mg/ml) fue utilizado como control positivo.

Preparación de microsomas placentarios que contienen aromatasa.

La placenta humana, obtenida inmediatamente después del parto, fue procesada a 4°C de acuerdo a un método previamente publicado.⁽¹¹⁰⁾ Brevemente, para obtener P450_{AROM} parcialmente purificado de placenta humana, el tejido fue lavado con solución salina 0.9% fría, se diseccionan para descartar membranas fetales y vasos sanguíneos grandes, el tejido remanente es pesado y homogenizado en una licuadora por 1min en buffer que contiene; sacarosa 0.25M, fosfato 0.05M y nicotinamida 0.04M, pH 7.0. Un volumen de buffer por tres partes de tejido pesado demostró proporcionar a las preparaciones la actividad óptima. Los homogenizados fueron centrifugados a 800 x g por 15min a 4°C, y el sobrenadante fue recuperado y centrifugado a 10,000 x g, por 15min a 4°C. Nuevamente el sobrenadante se recupero y se centrifugo a 80,000 x g, por 1h a 4°C para obtener el pellet de microsomas placentarios. Los pellets fueron resuspendidos en 12ml de buffer de fosfatos 0.05M, pH 7.0 y el contenido de proteína de los homogenizados fue cuantificado utilizando azul brillante de Coomassie (Sigma) y albúmina serica como controles^(111, 112) Los microsomas placentarios fueron alicuotados y almacenados a -70°C hasta su uso como control positivo en los ensayos de actividad P450_{AROM} e inmunoblot.

Análisis de la actividad de aromatasa.

La actividad de la enzima aromatase fue cuantificada por la pérdida estéreo-específica del átomo de tritio del sustrato [1β -³H] androstenediona en la reacción de aromatización. La frecuencia de conversión puede ser determinada por el aislamiento y cuantificación de agua

tritiada.⁽¹¹⁴⁾ La mezcla de incubación estándar fue preparada como sigue; 1) una fuente de P450_{AROM} (2.5µg de la fracción microsomal placentaria ò 600µg de los homogenizados de CEMC de rata macho o hembra); 2) Cofactores: MgCl₂ 6.25mM, Glucosa 6 fosfato 7.6mM, Glucosa 6 fosfato deshidrogenada 1.4U, β-NADPH 200µM (Sigma); y 3) una concentración de saturación del sustrato [1β-³H] androstenediona (New England Nuclear; Boston, MA); 1pM en un volumen total de 1,100µl de buffer de fosfatos 0.05 M, pH 7.0. Se realizo la incubación en agitación a 37°C por 1h. La reacción se detuvo con la adición de 300µl de la mezcla de carbón activado 2.5% y Dextrano T-70 0.25% (Sigma) y fue colocada en el vortex por 40s. La mezcla se centrifugo a 800 x g, por 15min y el sustrato residual [1β-³H] androstenediona se removió. El ³H₂O formada fue cuantificada a través de un contador de centelleo. En experimentos de control negativo en los cuales la fuente de enzima aromatasas fue omitida (fracciones de microsomas placentarios o lisados de CEMC de rata macho o hembra) o fue substituida con albúmina bovina (100 µM, Sigma) el nivel de actividad de P450_{AROM} fue insignificante, se utilizo como control positivo a los microsomas placentarios.

Análisis estadístico.

Los datos en los cambios en [Ca²⁺]_i (concentración máxima alcanzada en la espiga de la curva) son expresados como media ± SEM, y son analizados por análisis de variancia (ANOVA), el análisis individual entre concentraciones fue hecho a través de la prueba de comparación múltiple de Bonferroni. Cada experimento se realizó en aproximadamente 25 células que fueron elegidas al azar, el numero de células (N) fue limitado únicamente por el campo visual del objetivo del microscopio, sin embargo, estas fueron representativas de la población total (6 x 10³ células). Los ensayos de actividad de la enzima P450_{AROM} se repitieron al menos 4 veces, los resultados fueron expresados como media ± SEM; los datos fueron comparados contra experimentos control. Se consideraron diferencias significativas con p < 0.05.

RESULTADOS.

Efecto del 17 β -estradiol sobre la concentración intracelular de calcio.

Se ha reportado que los agonistas de actividad endotelial, como la bradicinina, inducen un incremento en $[Ca^{2+}]_i$, la cinética de calcio presenta dos componentes; un incremento rápido en $[Ca^{2+}]_i$ en forma de espiga que es seguido por una segunda fase en forma de meseta que retorna lentamente a su estado basal.^(9, 42)

La adición de E_2 [0.01nM a 1 μ M] tanto en CEMC de rata macho como de rata hembra induce un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ en forma rápida y no genómica (milisegundos). La Figura 10 muestra un trazo representativo del incremento rápido en la $[Ca^{2+}]_i$ inducido por E_2 [1nM], que es similar al inducido por agonistas de actividad endotelial. Sin embargo, la fase de meseta no retorna a niveles basales, al menos durante el tiempo experimental.

La Figura 11 muestra el efecto inducido por E_2 en CEMC de rata macho y hembra, en curvas concentración-respuesta, cada punto de la grafica representa el promedio de 6 experimentos (~ 25 células por platillo) en el que se consideró el incremento máximo alcanzado en la fase de espiga de la cinética intracelular de calcio inducida por E_2 a concentraciones de 0.01nM a 1 μ M. Se observa una curva concentración-respuesta en forma bifásica (campana). La respuesta máxima se alcanzó con 1nM. No existieron diferencias estadísticas significativas en las respuestas ejercidas por CEMC de rata macho y rata hembra.

Efecto de la Testosterona sobre la concentración intracelular de calcio.

La adición de testosterona a los cultivos celulares, induce en un incremento rápido en $[Ca^{2+}]_i$ (milisegundos). La Figura 10 muestra un trazo representativo de la cinética $[Ca^{2+}]_i$ inducida por testosterona (1nM) que es similar al inducido por agonistas de actividad endotelial.

No existieron diferencias en los efectos iniciales (espiga) después de la adición de E_2 o T a las CEMC de rata macho y hembra (Figura 8, inserto).

En la Figura 12 se observa el efecto inducido por testosterona en la cinética $[Ca^{2+}]_i$, en CEMC de rata macho y hembra, en curvas concentración respuesta, se presenta un efecto

dependiente de la concentración aplicada [0.01nM - 1µM]. No existieron diferencias estadísticas significativas entre las respuestas de las células de rata macho y hembra.

Inmunocitoquímica de los receptores alfa estrogénico (ERα) y androgénico (AR)

Intensa inmunoexpresión de ERα (verde) se localizó tanto en CEMC de rata macho como de rata hembra, la fluorescencia parece estar asociada con la periferia de las células, quizás a nivel de plasmalema, así como en el citoplasma (Figura 13). Se observó también inmunoreactividad de AR (rojo) en CEMC de rata macho y hembra. Sin embargo, la fluorescencia parece estar asociada únicamente a nivel citoplasmático. Los sitios de co-expresión de ERα y AR muestran una coloración amarilla (Figura 13). No se observó reactividad cuando las CEMC de rata macho y hembra fueron procesadas sin los anticuerpos primarios (datos no mostrados).

Efecto del U73122 sobre el incremento en $[Ca^{2+}]_i$ inducido por Testosterona y 17β-Estradiol

La pre-incubación (10min) de las CEMC de rata macho y hembra con el inhibidor específico de la enzima PLC $_{\beta}$, U73122 [1µM], inducen un bloqueo del incremento en $[Ca^{2+}]_i$ inducido por T o E $_2$. Estos efectos no son el resultado de la depleción de los depósitos intracelulares de calcio ya que la adición de cafeína [20mM], 4min después de la estimulación con la hormona esteroide, induce un incremento rápido en $[Ca^{2+}]_i$ (Figura 14). No existieron diferencias entre las respuestas de las CEMC de rata macho y hembra. El U73122 por si mismo no modifica la $[Ca^{2+}]_i$.

Efectos de aminoglutetimida y 4-hidroxiandrostenediona, inhibidores selectivos de la enzima Aromatasa, sobre el incremento en $[Ca^{2+}]_i$ inducido por Testosterona.

El pre-tratamiento (10min) de las CEMC de rata macho y hembra con aminoglutetimida [4µM] (Figura 15) o 4-hidroxiandrostenediona [4µM] (Figura 16), inhibidores selectivos de P450 $_{AROM}$, resulta en el bloqueo del incremento en $[Ca^{2+}]_i$ inducido por testosterona. Este

efecto no es inespecífico, debido a que la adición de E_2 [1nM] induce un incremento en $[Ca^{2+}]_i$. No existen diferencias entre las respuestas de las CEMC de rata macho y hembra. La aminoglutetimida y la 4-hidroxiandrostenediona no produce efectos directos sobre $[Ca^{2+}]_i$.

Inmunocitoquímica de la enzima Aromatasa.

Se observó intensa inmunoreactividad para $P450_{AROM}$ tanto en CEMC de rata macho como de rata hembra. La fluorescencia fue evidente a nivel citoplasmático y en la periferia de las células (Figura 17). No existieron diferencias en la inmunoexpresión de $P450_{AROM}$ asociadas al género. Se observó inmunoreactividad para $P450_{AROM}$ en 96-98% de las CEMC de rata.

Inmunoblot.

Se localizó expresión de $P450_{AROM}$ en CEMC de rata macho y hembra. La inmunoreactividad fue evidente en una sola banda, con el peso molecular aparentemente correcto, alrededor de 50 kDa, en los homogenizados de CEMC de rata macho y hembra (Figura 18). Se observó tanto en el líquido sobrenadante de 10,000 x g (S1) y 100,000 x g (S2), como en el pellet de 10,000 x g (P1) y 100,000 x g (P2). Se utilizó la proteína ribosomal S6 (RPS6) como control (presencia de una banda simple de alrededor de 30 kDa) (Figura 18). No existieron diferencias en la inmunoexpresión de $P450_{AROM}$ asociadas al género. No se detectaron bandas cuando el anticuerpo primario fue omitido. Se detectó una banda inmunoreactiva correspondiente a una proteína simple de características y peso molecular similar a $P450_{AROM}$ en microsomas de placenta humanos, utilizados como control positivo (datos no mostrados).

Hibridación in situ.

Se analizó la expresión tejida específica de la enzima aromatasa en CEMC de rata macho y hembra a nivel de RNAm, a través de estudios de hibridación *in situ*, utilizando sondas

específicas del exon I del gen de aromatasa (CYP19). Se utilizaron las sondas antisentido de oligonucleótidos conjugadas con fluoresceína de tres de las principales especies de cDNA de aromatasa correspondiente a la secuencia del extremo 5' del exon I; 1) Placenta, 2) Ovario y 3) Próstata / Testículo. Como se observa en la Figura 19, se localizó una señal fluorescente de la hibridación del RNAm con la sonda específica de Ovario principalmente a nivel citoplasmático. No se detectó reactividad con el uso de las sondas antisentido correspondientes a Placenta y Próstata / Testículo. No existieron diferencias asociadas al género en la reactividad de aromatasa. Se utilizaron las sondas de oligonucleótidos con sentido, conjugadas con fluoresceína, como controles negativos.

Ensayos de liberación de agua tritiada.

La actividad de la enzima P450_{AROM} fue medida a través el aislamiento y cuantificación de agua tritiada (como una medida indirecta de aromatización) originada a partir de la pérdida estéreo-específica del átomo de tritio localizado en el carbono 1, posición β del sustrato. La incubación del sustrato, [1 β -³H] androstenediona (1pM), con los diferentes cofactores (NADPH, glucosa 6 fosfato, Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa y MgCl₂) y diferentes concentraciones de microsomas de placenta humana [0.05-5 μ g], resulta en la formación de agua tritiada en forma dependiente de la concentración (Figura 20, círculos negros). La incubación la [1 β -³H] androstenediona (1pM), con los cofactores y los homogenizados de CEMC de rata macho (círculos blancos) y CEMC de rata hembra (triángulos negros) a diferentes concentraciones [130-1300 μ g], resulta también en la formación de agua tritiada en forma dependiente de la concentración (Figura 20). Como se observa en la Figura 21, los homogenizados de CEMC de rata macho y hembra inducen de forma significativa la formación de agua tritiada. Se detectó actividad insignificante en estudios de control negativo, los cuales se realizaron en ausencia de una fuente de la enzima P450_{AROM} (microsomas placentarios o lisado de CEMC de rata macho o hembra) o substituyendo está con albúmina bovina (100 μ M).

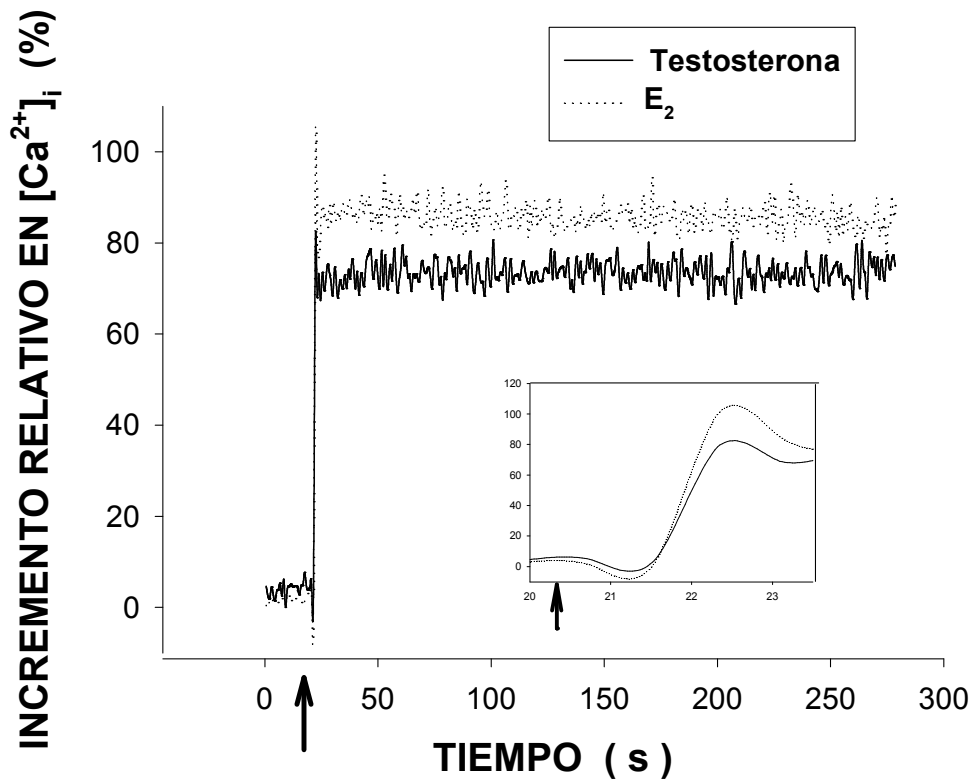


Figura 10. Trazo representativo del incremento en la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$) inducido por 17β -Estradiol (E_2) y Testosterona en células endoteliales microvasculares coronarias (CEMC) de rata macho y hembra en cultivo, cargadas con Fura-2. Las líneas continua y punteada muestran la cinética $[Ca^{2+}]_i$ inducida por testosterona (1nM) y E_2 (1nM) respectivamente. La flecha representa el tiempo de adición de testosterona o E_2 .

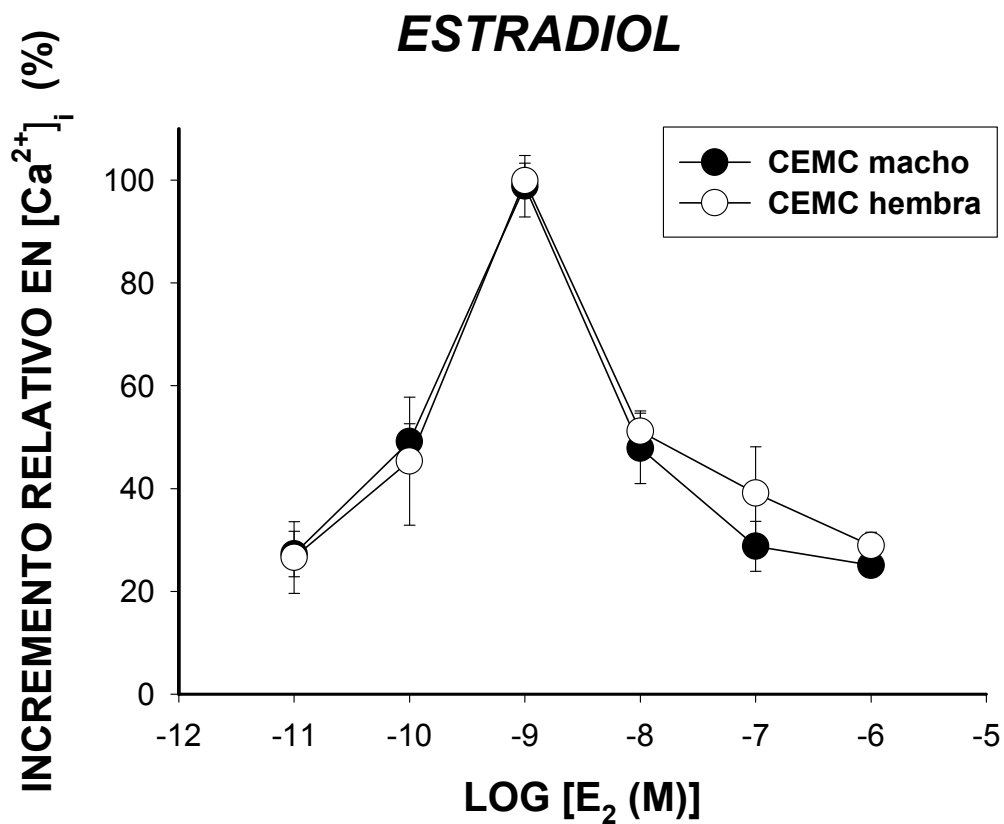


Figura 11. Efecto del 17β -Estradiol (E_2) sobre la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$) en CEMC de rata macho y hembra, en el que se consideró el incremento máximo alcanzado en la fase de espiga de la cinética $[Ca^{2+}]_i$ inducida por la aplicación de E_2 [0.01nM a 1μ M]. La grafica muestra un comportamiento dependiente de la concentración, de forma bifásica (campana). Cada punto de la grafica representa 6 experimentos. Los valores son expresados como media \pm SEM ($n=25$, por cada experimento). No existieron diferencias estadísticas significativas entre las respuestas a E_2 en las CEMC de rata macho y hembra.

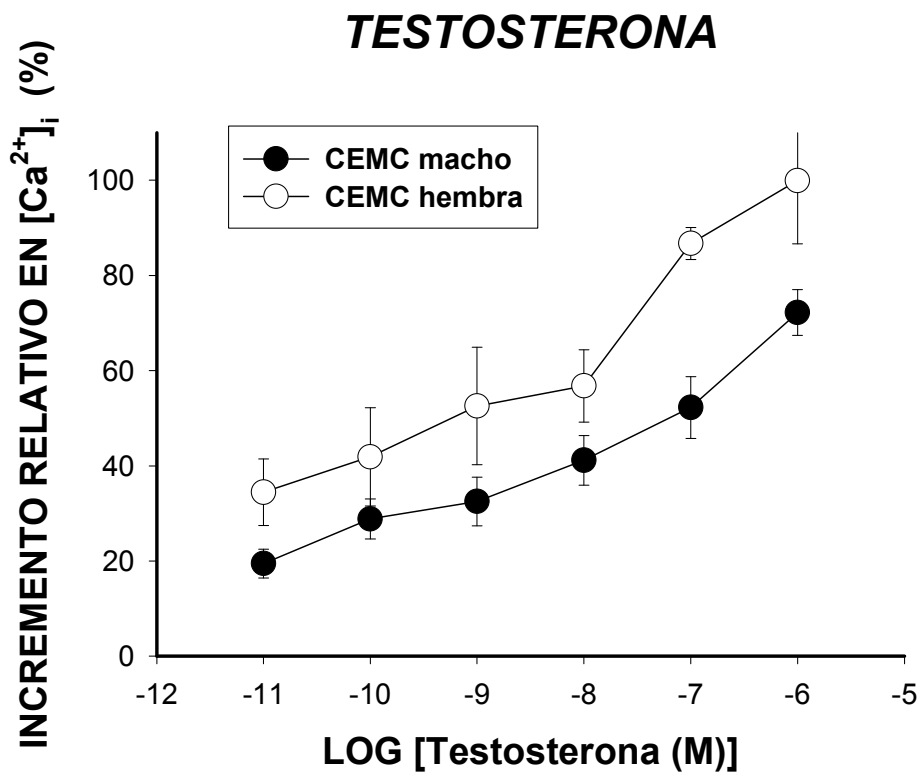


Figura 12. Efecto de la testosterona (T) sobre la concentración intracelular de calcio ($[Ca^{2+}]_i$) en CEMC de rata macho y hembra, en el que se consideró el incremento máximo alcanzado en la fase de espiga de la cinética $[Ca^{2+}]_i$ inducida por la aplicación de T [0.01nM a 1 μ M]. La grafica muestra un comportamiento dependiente de la concentración. Cada punto de la grafica representa 6 experimentos. Los valores son expresados como media \pm SEM (n=25, por cada experimento). No existieron diferencias estadísticas significativas entre las respuestas inducidas por T en CEMC de rata macho y hembra.

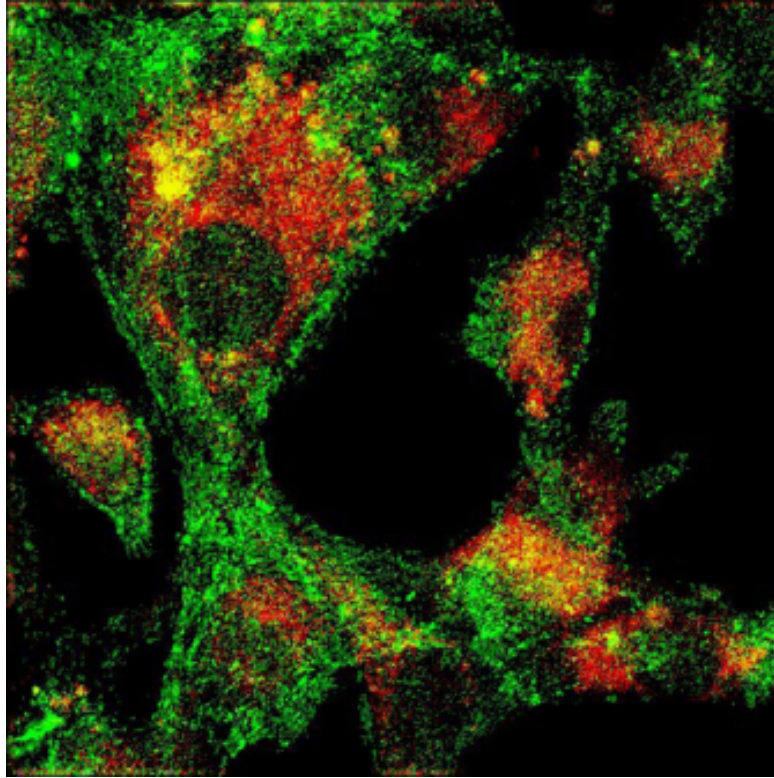


Figura 13. Imagen confocal (Sistema Confocal Modelo TCS SP2, Marca LEICA) de la expresión de los receptores; androgénico (AR) y alfa estrogénico (ER α) en células endoteliales microvasculares coronarias (CEMC) de rata macho y hembra. Se localizó intensa reactividad inmunocitoquímica para ER α (Verde, marcaje con fluoresceína, FICT) en la periferia celular y a nivel citoplasmático. También se observó inmunoreactividad para AR (Rojo, marcaje con rodamina) localizada únicamente a nivel citoplasmático. La co-expresión de ER α y AR (amarillo) se localizó solo en el compartimiento citoplasmático. No existieron diferencias en CEMC de rata macho y hembra.

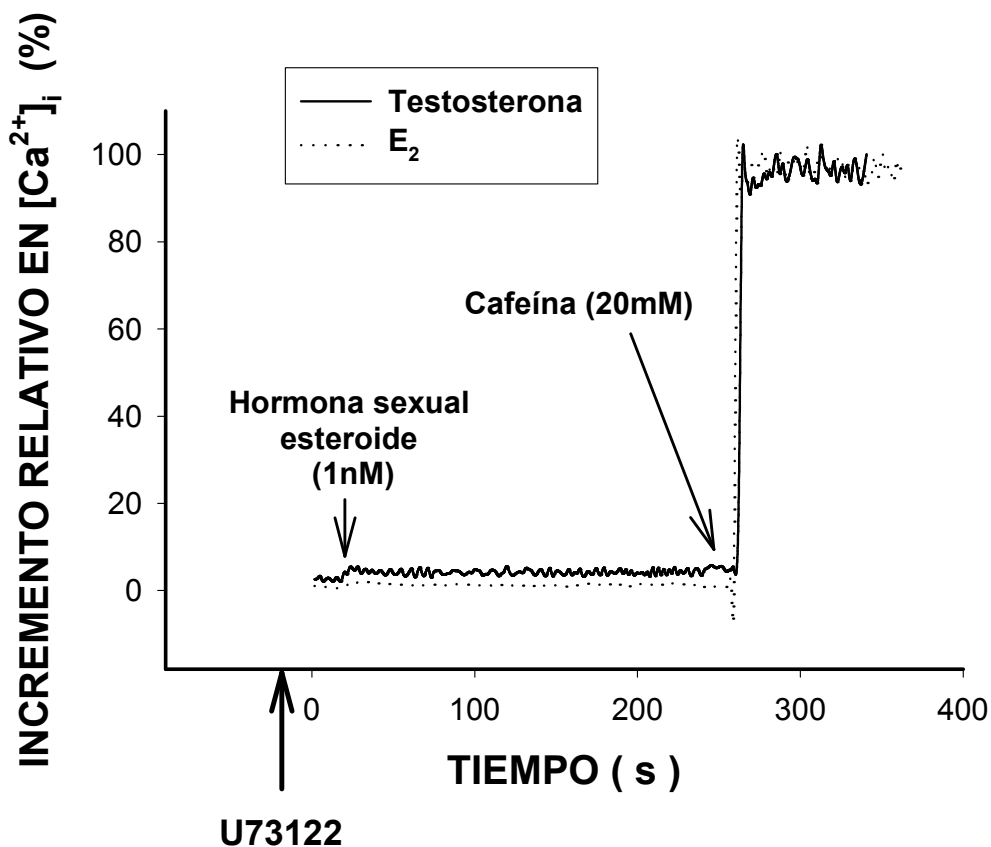


Figura 14. Trazo representativo de los efectos de la Testosterona (1nM) y el 17 β -Estradiol (1nM) sobre el incremento en $[Ca^{2+}]_i$ en presencia del inhibidor específico de la enzima fosfolípasa C_β (PLC), U73122 (1 μ M), en CEMC de rata macho y hembra. Los efectos inducidos por Testosterona y 17 β -Estradiol fueron abolidos con el U73122, este efecto no se debió a la depleción de los depósitos intracelulares de calcio, ya que la adición de cafeína (20mM), 4min después de la estimulación con el esteroide sexual, induce un incremento rápido en $[Ca^{2+}]_i$. El U73122 no produce incrementos en $[Ca^{2+}]_i$ por si mismo. No existieron diferencias entre las respuestas de CEMC de rata macho y hembra.

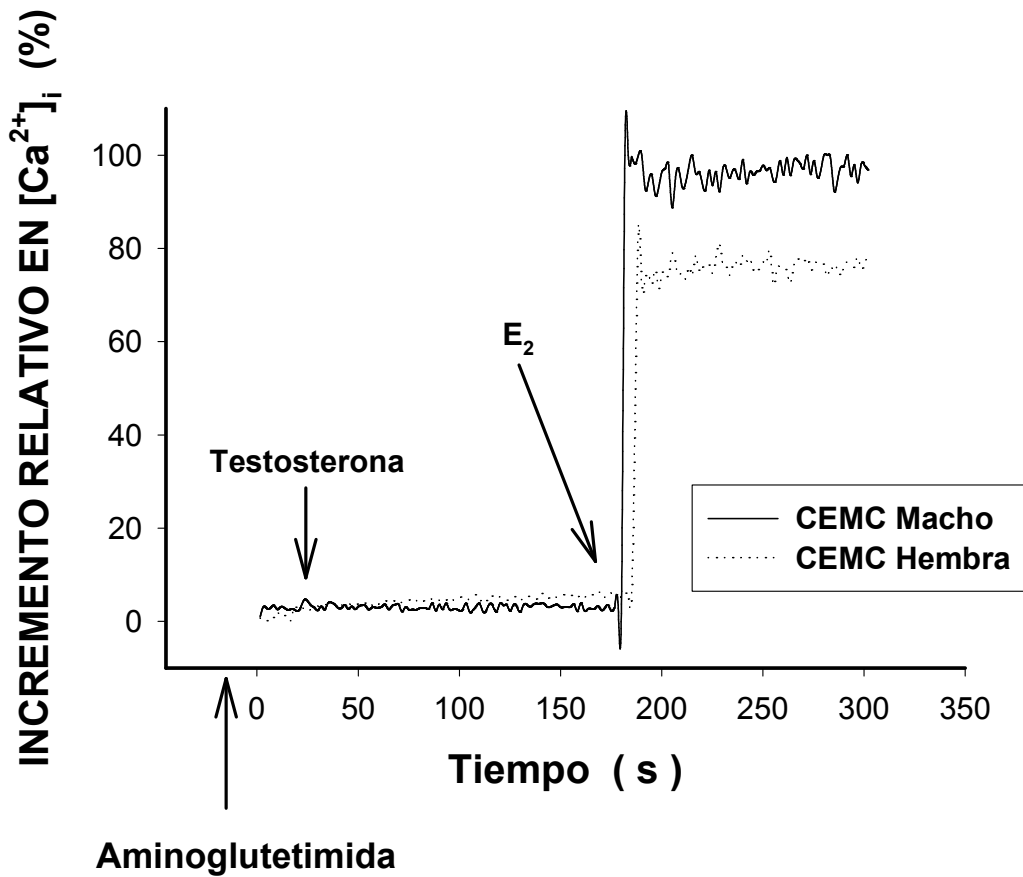


Figura 15. Trazo representativo de los efectos de la Testosterona (1nM) sobre el incremento en $[Ca^{2+}]_i$ en presencia del inhibidor específico de la enzima Aromatasa, aminoglutetimida (4 μ M), en CEMC de rata macho y hembra. El efecto inducido por la Testosterona fue abolido por la aminoglutetimida, este efecto no se debió a la depleción de los depósitos intracelulares de calcio, ya que la aplicación de E_2 (1nM) induce un incremento rápido en $[Ca^{2+}]_i$. La aminoglutetimida no afecta la $[Ca^{2+}]_i$ por si misma.

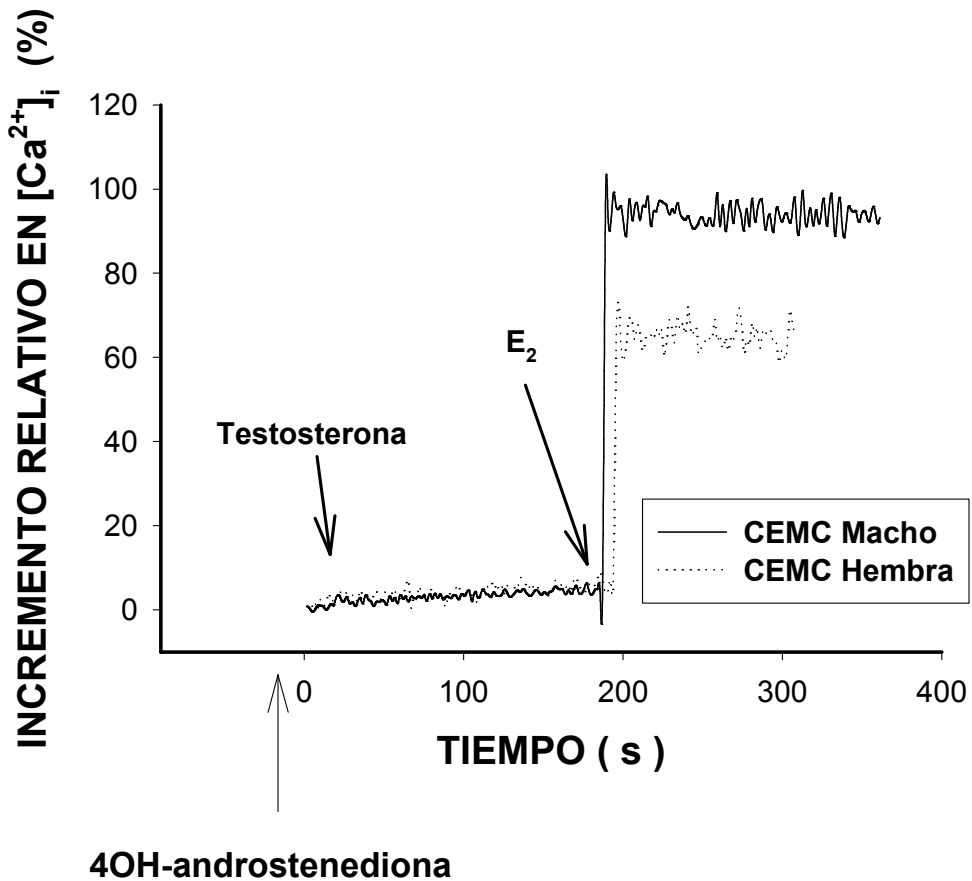


Figura 16. Trazo representativo de los efectos de la Testosterona (1nM) sobre el incremento en $[Ca^{2+}]_i$ en presencia del inhibidor específico de la enzima Aromatasa, 4-hidroxi-androstenediona (4 μ M), en CEMC de rata macho y hembra. El efecto inducido por la Testosterona fue abolido en presencia de 4-hidroxiandrostenediona, este efecto no se debió a la depleción de los depósitos intracelulares de calcio, ya que la aplicación de E₂ (1nM) induce un incremento rápido en $[Ca^{2+}]_i$. 4-hidroxiandrostenediona no afecta la $[Ca^{2+}]_i$ por si misma. No existió diferencia en las respuestas de CEMC de rata macho y hembra.



Figura 17. Imagen confocal (Sistema Confocal Modelo TCS SP2, Marca LEICA) de la inmunoeexpresión de P450_{AROM}, utilizando el fragmento F(ab')₂ de los anticuerpos policlonales generados contra el péptido de P450_{AROM}, en CEMC de rata macho y hembra en cultivo. Se localizó intensa reactividad inmunocitoquímica de P450_{AROM} (gris) a nivel de la periferia celular y en citoplasma. No se observó tinción cuando las células se procesaron sin el fragmento F(ab')₂ del anticuerpo primario (datos no mostrados).

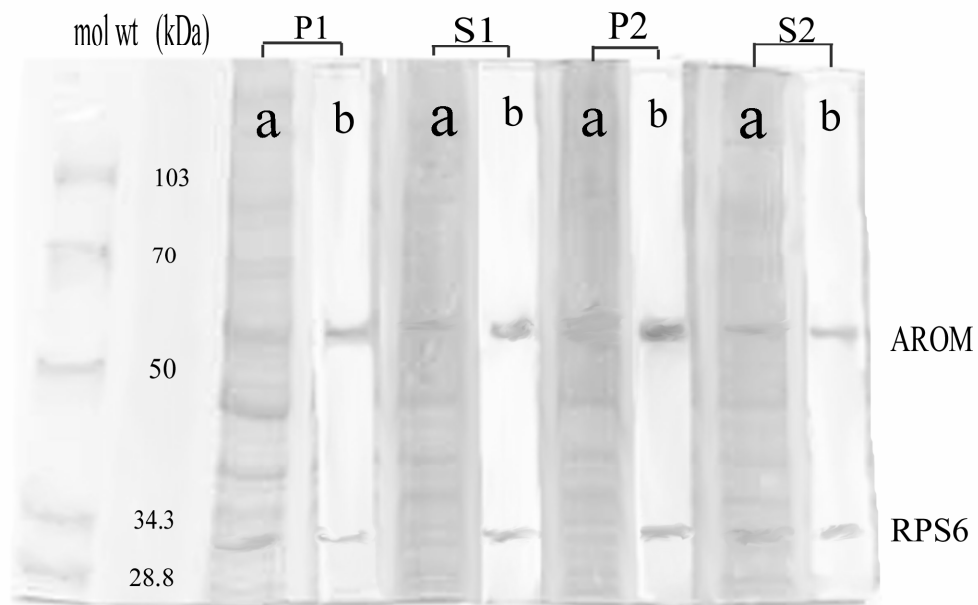


Figura 18. Inmunoblot de los lisados de CEMC de rata macho y hembra, utilizando el fragmento $F(ab')_2$ de las IgG's policlonales generados contra el péptido del citocromo $P450_{AROM}$ de rata. Las membranas fueron incubadas por una 1h con el fragmento $F(ab')_2$ del IgG's anti-aromatasa (dilución 1:250) y por 2h con el fragmento $F(ab')_2$ del anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa (Horse Radish Peroxidase, HRP)(SIGMA, dilución 1:500). Finalmente, las bandas fueron teñidas con un kit (VECTOR laboratories, substrato para peroxidasa; Diaminobenzidina, DAB) según especificaciones del proveedor. La reactividad fue evidente con la presencia de una banda proteica simple de peso molecular alrededor de 50KDa en CEMC de rata macho y hembra, esta banda fue observada en el liquido sobrenadante [S1 (10,000 x g), S2 (100,000 x g)] así como en el pellet [P1 (10,000 x g), P2 (100,000 x g), electroforesis (a), inmunoblot (b)]. Se utilizó como control la proteína ribosomal (RPS6).

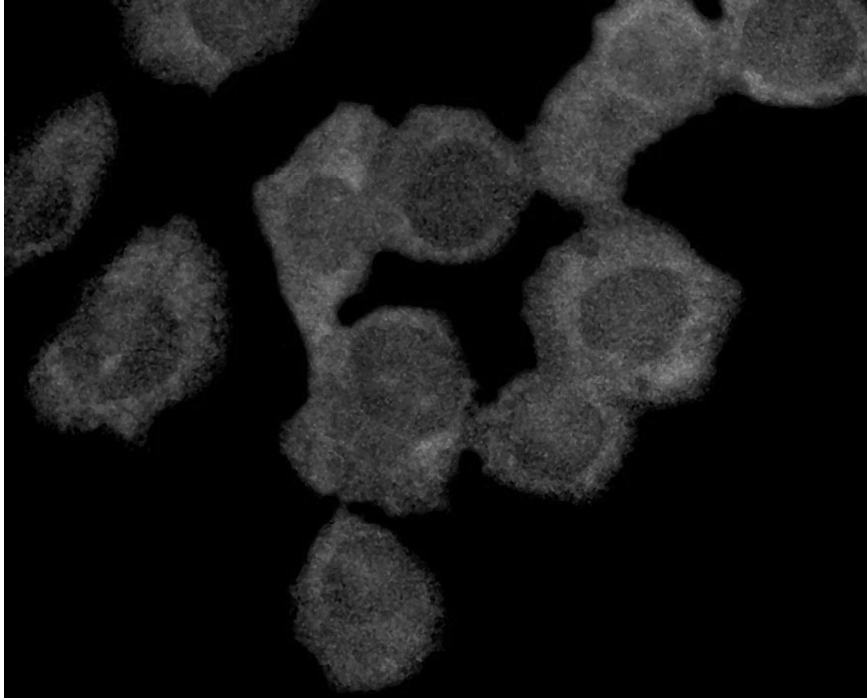


Figura 19. Hibridación in situ del RNAm de aromatasa en CEMC de rata macho y hembra. La expresión tejido específica de P450_{AROM} en CEMC fue evidente a través del uso de las sondas de oligonucleótidos antisentido conjugadas con fluoresceína de ovario del cDNA de aromatasa correspondiente a la región del extremo 5' del exon I. La señal fluorescente de hibridación del RNAm de la sonda específica de ovario se localizó principalmente a nivel citoplasmático en CEMC de rata macho y hembra. No existieron diferencias en la hibridación asociadas al género. No se detectó reactividad con el uso de las sondas antisentido de Placenta y Próstata/Testículo. Las sondas de oligonucleótidos con sentido conjugadas con fluoresceína fueron utilizadas como controles negativos.

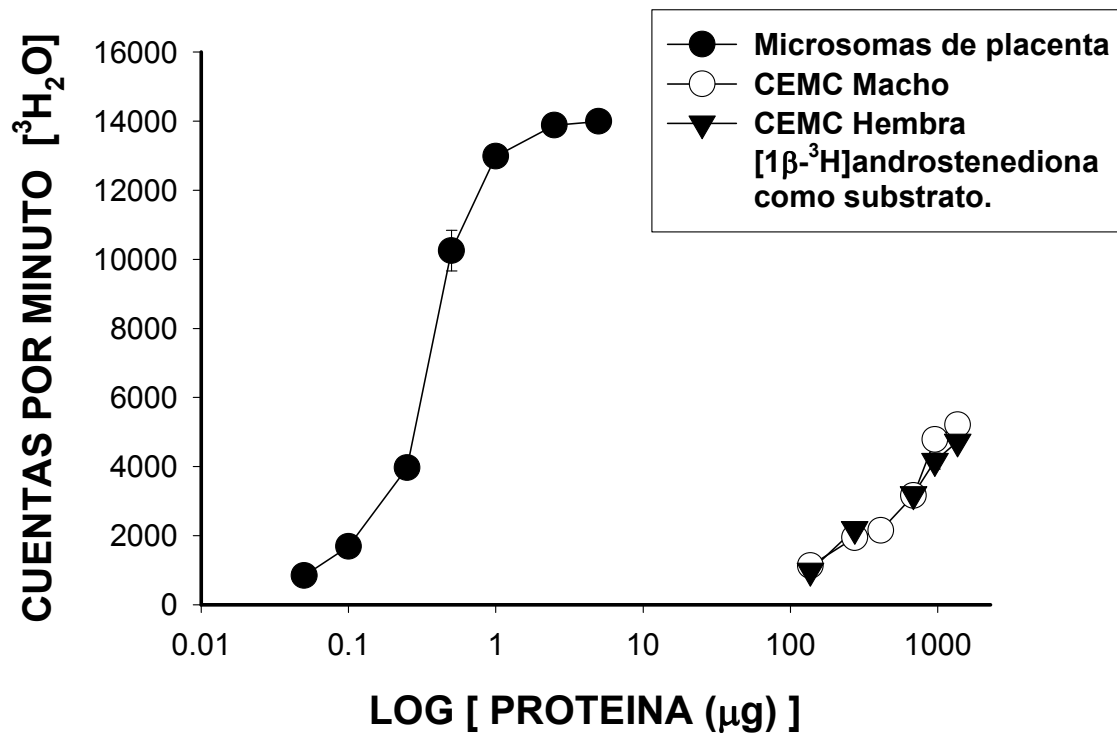


Figura 20. La aromatización de andrógenos en estrógenos fue medida a través del aislamiento y cuantificación de agua tritiada. Se observa un efecto dependiente de la concentración de microsomas de placenta humanos (círculos negros), CEMC de rata macho (círculos blancos) y hembra (triángulos negros). La incubación del sustrato, $[1\beta\text{-}^3\text{H}]$ androstenediona (1pM), y los cofactores (NADPH , glucosa 6 fosfato, Glucosa 6 fosfato deshidrogenasa y MgCl_2) con diferentes concentraciones de microsomas placentarios $[0.05\text{-}5\mu\text{g}]$ o homogenizados de CEMC de rata $[130\text{-}1300\mu\text{g}]$ resulta en la formación de agua tritiada en forma dependiente de la concentración. No existieron diferencias en los efectos inducidos por las CEMC de rata macho y hembra.

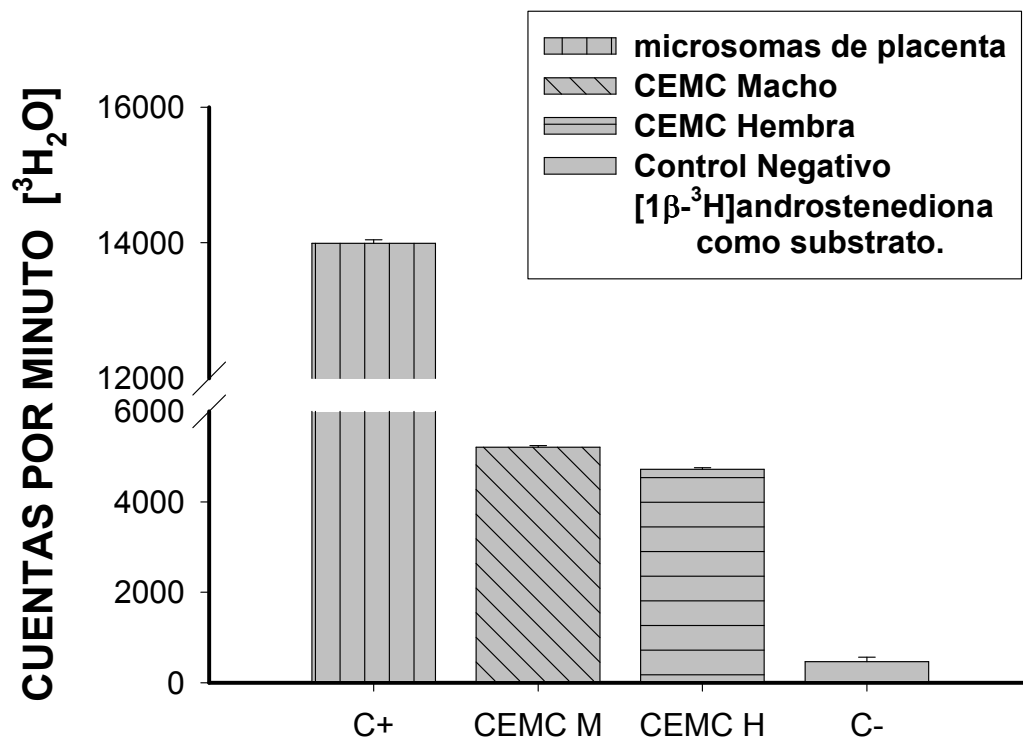


Figura 21. Formación de agua tritiada (prueba indirecta de aromatización) en CEMC de rata macho (barra con líneas diagonales) y hembra (barra con líneas verticales). La incubación del sustrato, $[1\beta\text{-}^3\text{H}]$ androstenediona (1pM), y cofactores con los homogenizados de CEMC ($1300\mu\text{g}$) resulta en una producción significativa de agua tritiada. No existieron diferencias en los efectos inducidos por CEMC de rata macho y hembra. Se detectó actividad insignificante en ensayos de control negativo, en donde la fuente de enzima $P450_{\text{AROM}}$ fue omitida o substituida con albúmina bovina ($100\mu\text{M}$; barra sin líneas). En los ensayos de control positivo, microsomas de placenta humana ($2.5\mu\text{g}$; barra con líneas horizontales), se detectó actividad enzimática importante.

DISCUCION.

El endotelio vascular forma la cubierta interna de los vasos sanguíneos, es una barrera selectivamente permeable para macromoléculas y se encuentra localizado estratégicamente entre el torrente sanguíneo y la pared vascular, esta involucrado en la regulación de múltiples funciones, lo que nos da una nueva apreciación de su importancia en diversos procesos fisiopatológicos.⁽⁹⁹⁾

Las células endoteliales eran consideradas únicamente como una barrera inerte que separaba la sangre del intersticio. Sin embargo, Estudios recientes han demostrado claramente que el endotelio es un “órgano endocrino dinámico”, capaz de actuar tanto en forma autócrina como parácrina, desempeñando múltiples funciones e influenciando diversos procesos homeostáticos en el lumen vascular. El endotelio esta involucrado en la regulación de la coagulación, adhesión leucocitaria, en el crecimiento de células de músculo liso vascular y angiogénesis, participa además en la regulación del tono vascular en donde ejerce una función dual secretando factores relajantes como oxido nítrico, prostaciclina, factor hiperpolarizante derivado de endotelio y adenosina, así como factores contráctiles tales como endotelinas y prostanoïdes, el tono vascular es dependiente del balance entre estos factores. Las células endoteliales son capaces de influenciar el comportamiento y la actividad de otros tipos celulares.^(99 - 103)

Debido a que las funciones de los diferentes segmentos del árbol vascular (arterias, arteriolas, capilares, venulas y venas) son diferentes, es de esperarse que las células endoteliales puedan mostrar también adaptaciones funcionales y especialización de acuerdo a su localización y origen embrionario.^(104 - 106) Además de los determinantes genéticos para la función endotelial, los factores ambientales (que incluyen; a los parámetros biofísicos o mecánicos inherentes a un lecho vascular específico, la presencia o ausencia de estímulos inflamatorios y el micro-medioambiente único presente en los diferentes tejidos) parecen ser fundamentales en la determinación tanto de su morfología como de su expresión molecular y en consecuencia de la función endotelial, dando como resultado la presencia de heterogeneidad endotelial en los diferentes sitios de la red vascular.^(105, 115)

Se conoce como microdominio vascular a la segregación de los vasos en grupos anatómica y funcionalmente distintivos dentro de áreas específicas, siendo además dominios

proteínicos que proporcionan especialización de funciones. Por ejemplo, el agua y los solutos son intercambiados principalmente en capilares y venulas postcapilares, mientras que la resistencia vascular reside predominantemente en arteriolas.^(115, 116) La organización de los microdominios vasculares parece ser influenciada por factores que inducen una especialización fenotípica de células endoteliales y de músculo liso. De tal forma que la expresión molecular (receptores, enzimas, canales iónicos, etc.) y en consecuencia la función, pueden diferir a lo largo de la red vascular, siendo influenciada por estímulos específicos en cada región vascular.^(117,118)

Las células endoteliales se encuentran situadas idealmente como sensores de cambios en la velocidad del flujo sanguíneo, alteran su morfología de “adoquin” y su orientación, a formas de crecimiento más alargadas, que son alineadas en dirección al flujo, los cambios en las fuerzas de roce (shear stress) son responsables directos de numerosas respuestas celulares como liberación de autacoides tales como óxido nítrico (ON), prostaciclina y factor hiperpolarizante derivado de endotelio, necesarios para la rápida adaptación del diámetro vascular.⁽¹¹⁹⁾ Asimismo, las arteriolas coronarias con diámetros entre 120 y 150 μ m son los segmentos más sensibles al flujo, mientras que las arteriolas pequeñas (30 - 60 μ m de diámetro) parecen mostrar una mayor respuesta miogénica, finalmente, las arteriolas coronarias de menos de 30 μ m de diámetro parecen ser las más sensibles a estímulos metabólicos, mostrando así una respuesta heterogénea a lo largo de la circulación coronaria.⁽¹¹⁶⁾

El endotelio no solo influye en las funciones de otros tipos celulares sino que también es influenciado por las células adyacentes, la comunicación intercelular puede ejercer un papel importante en las respuestas fisiológicas. Por ejemplo, los astrocitos tienen influencia directa sobre la homeostasis de varias moléculas y enzimas endoteliales en el cerebro, así como en los perfiles de transporte de la barrera hematoencefálica.^(120, 121) Sin embargo, los efectos de los astrocitos no están restringidos a células endoteliales del cerebro, pueden ejercerse también sobre células endoteliales de cualquier otro origen.⁽¹²²⁾

En consecuencia, el origen celular y los factores ambientales pueden permitirle a una sola molécula tener diferentes efectos en un mismo tipo celular.

En este trabajo proponemos que el endotelio de vasos de conductancia puede responder diferente al estímulo con los esteroides sexuales; Testosterona y 17 β -estradiol (E₂) que el

endotelio de vasos de resistencia. En un trabajo previo realizado en endotelio de aorta de rata en cultivo, reportamos que E_2 induce incremento en la concentración intracelular de calcio por medio de un mecanismo rápido no-genómico, el cual fue ejercido a través de la vía de señalización intracelular de la enzima Fosfolipasa C (PLC_β) (es bloqueado por el inhibidor específico, U73122), mostrando una curva bifásica. El 17α -estradiol (que es un metabolito menor en la especie humana) y el tamoxifen (que se une al ER intracelular tradicional induciendo cambios morfológicos con lo cual bloquea los efectos genómicos de los estrógenos) no indujeron efecto alguno en la cinética intracelular de calcio en esas células. El ICI 182,780 [que es un antiestrógeno puro (derivado 7α sustituido del E_2)] bloquea el incremento en $[Ca^{2+}]_i$. Estos efectos prevalecieron aún con el uso de E_2 unido con albúmina serica bovina (E_2 -BSA) demostrando mecanismos asociados a membrana plasmática.⁽⁹⁸⁾ Nuestros datos actuales en células endoteliales microvasculares coronarias (CEMC) de rata macho y hembra en cultivo no fueron diferentes a los encontrados en endotelio aórtico, los cuales también muestran una curva bifásica, pero interesantemente, no existieron diferencias asociadas al género, (ver figura 11) de tal modo, E_2 parece inducir incrementos en la $[Ca^{2+}]_i$ en la misma forma tanto en endotelio de vasos de conductancia como en endotelio de vasos de resistencia, y quizás a través de la misma vía de señalización intracelular.

En contraste, en las células endoteliales de aorta de rata, la testosterona no indujo por si misma, efecto alguno en la concentración intracelular de calcio, pero fue capaz de bloquear la primera fase en el incremento en $[Ca^{2+}]_i$ (fase de espiga) inducida por la estimulación con bradicinina, modulando de alguna forma la respuesta inducida por este agonista de actividad endotelial.⁽⁵²⁾

Los efectos de testosterona en CEMC fueron diferentes a los encontrados en endotelio aórtico, debido a que la testosterona indujo un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$, en forma dependiente de la concentración e independiente del género, actuando por si misma como un agonista de actividad endotelial. (Figura 12) estos efectos fueron obtenidos tanto a concentraciones cercanas a las encontradas fisiológicamente, así como a concentraciones mayores consideradas como farmacológicas (0.01nM-1 μ M), se presentaron en forma rápida (milisegundos), por lo que son considerados como de origen no-genómico, y ejercidos a través de la vía de señalización intracelular de la PLC_β , ya que son inhibidos por el U73122

(Figura 14), lo que sugiere también que existen mecanismos asociados a membrana plasmática.

Ambos esteroides sexuales, testosterona y E_2 , inducen un incremento rápido en la $[Ca^{2+}]_i$ (milisegundos) en CMEC, el cual se presenta en dos fases; un incremento inicial en la $[Ca^{2+}]_i$ en forma de espiga, seguido de una meseta sostenida que no retorna a niveles basales, al menos durante el tiempo experimental (ver figura 10). Se ha reportado que el incremento en el calcio citosólico, inducido por agonistas de actividad endotelial, se debe principalmente a su liberación rápida de calcio desde los depósitos intracelulares, que es mediada por inositol trifosfato (IP_3), seguida por el flujo extracelular de calcio a través canales iónicos membranales.^(52, 93, 94, 98) El incremento inicial en espiga inducido por testosterona y E_2 , en CMEC de rata macho y hembra en cultivo, fue totalmente bloqueado por el compuesto U-73122 (Figura 12), que es un inhibidor específico de procesos dependientes de la enzima fosfolípasa C_β (PLC_β)^(123, 124) sugiriendo que esta vía metabólica y el metabolismo de fosfolípidos de membrana son activados en estas respuestas.

El U-73122 (1-[6-[17 β -3-metoxiestra-1,3,5(10)-trien-17-yl]amino]hexil]-1H-pirrole-2,5-dione) es un amino esteroide similar al estradiol, con un anillo aromático A y una modificación estructural en el carbono 17 del esqueleto esteroideo (amino hexil-pirrole-2,5-diona)^(98, 123, 124) Estos datos sugieren que el U73122 puede inhibir un componente en la señal de transducción común al mecanismo de acción de las hormonas sexuales esteroides. Así podemos especular sobre la posibilidad de un sitio modulador para esteroides en la molécula de la PLC_β capaz de bloquear o inducir su propia actividad, quizás a través de la inducción de cambios conformacionales.

El segundo componente de la cinética de $[Ca^{2+}]_i$ inducida por testosterona y E_2 , la meseta sostenida, no retornó a niveles basales durante el tiempo experimental (5min) (Figura 10), no tenemos explicación para este fenómeno, sin embargo, esta fase es dependiente de la entrada de calcio, y el flujo de entrada a través de canales iónicos puede ser regulado por propiedades membranales tales como; la fluidez, el micro-medioambiente de proteínas de membrana o el potencial de reposo.^(52, 93, 94, 98) Es posible que las hormonas esteroides puedan alterar en alguna forma estas propiedades de la membrana plasmática.

Las hormonas sexuales esteroides están involucradas en un gran número de procesos fisiológicos y fisiopatológicos. Tradicionalmente, su efecto se ha descrito como

modulatorios de la transcripción nuclear. Sin embargo, otros efectos de estas hormonas se han reconocido como de origen no-genómico ya que ocurren en tiempos muy cortos. Estos efectos pueden modular vías de señalización intracelular y quizás influir en la acción genómica de los esteroides, integrándose de esta forma las vías genómica y no-genómicas.^(57- 61)

A la fecha, se ha acumulado evidencia a favor de efectos estrogénicos y androgénicos rápidos, no genómicos, después de su interacción con la superficie celular. Las proteínas de membrana involucradas en las acciones rápidas de los esteroides pueden incluir; receptores específicos, canales iónicos, enzimas membranales y otros receptores.^(58, 61)

Muchos miembros de la familia de receptores esteroideos/tiroideos (α ER y AR) van y vienen entre citoplasma y núcleo en ausencia de ligando, cuando se unen a un agonista, se trasladan al núcleo donde actúan como factores de transcripción. Los efectos rápidos, no-genómicos de los esteroides sexuales son atribuidos a vías de señalización iniciadas a nivel de membrana celular. Involucran cascadas de segundos mensajeros convencionales, incluyendo; foslipasa C (PLC), proteínas G, metabolismo de fosfoinositidos de membrana, pH intracelular, calcio libre intracelular, protein cinasa C (PKC) entre otros, los cuales son claramente incompatibles con los mecanismos de acción de tipo genómico y posiblemente sean mediados a través de receptores con propiedades farmacológicas distintivas de aquellos receptores esteroideos intracelulares clásicos.^(58, 60, 61)

Con la finalidad de analizar la posible asociación a membrana y la co-expresión de los receptores alfa estrogénico (α ER) y androgénico (AR), en CEMC de rata macho y hembra, realizamos ensayos inmunocitoquímicos y microscopia confocal, con un método de doble tinción. La expresión de α ER (complejo IgG anti- α ER y anticuerpo secundario conjugado-FICT) fue evidente por la intensa fluorescencia (verde) localizada en la periferia celular así como en citoplasma en CMEC en cultivo de rata macho y hembra. (Figura 13)

Por otra parte, se observó también la expresión intensa de AR (complejo IgG anti-AR y anticuerpo secundario conjugado-Rodaminado), sin embargo esta inmunoreactividad fue localizada solo a nivel citoplasmático (Figura 13) sugiriendo que no existe asociación a nivel membranal. La co-expresión de ambos receptores resulta en coloración amarilla que se observa solo a nivel citoplasmático. Es importante enfatizar que utilizamos los mismos tiempos de incubación para los anticuerpos primarios y los anticuerpos secundarios unidos

al fluorocromo con la finalidad de evitar diferencias en la difusión de los IgGs a través de la membrana celular.

Algunos estudios han reportado efectos estrogénicos rápidos iniciados a nivel membranal, y asociación de α ER a la membrana plasmática. Los ERs son expresados y funcionales en tejidos cardiovasculares.^(32, 35, 65, 69, 70, 72) Chen et al⁽⁶⁸⁾ demostraron la existencia de α ER localizados a nivel de membrana plasmática endotelial, los cuales funcionan en forma no-genómica. Además, Goetz et al⁽⁶⁴⁾ demostraron que ERs regulan la activación de la sintasa de ON endotelial (eNOS) a través de procesos dependientes de calcio, y Chambliss et al⁽⁶⁵⁾ localizaron α ER and eNOS acoplados en un modulo de señalización membranal localizado en la “caveola” de la célula endotelial (que es un microdominio en la membrana plasmática, enriquecido con diversas moléculas de señalización) que pueden regular el medio ambiente de calcio local.

Existen dos tipos de receptores esteroideos membranales específicos que pueden estar involucrados en estas respuestas: 1) un receptor membranal con una estructura molecular relacionada con los receptores esteroideos nucleares clásicos (α ER y β ER) y 2) un receptor membranal esteroideo no clásico (mER). El mER involucrado parece ser muy similar en estructura al subtipo α ER. Derblade et al⁽⁷¹⁾ demostraron con el uso de ratones transgénicos, que los α ER, pero no los β ER, son responsables del efecto benéfico mediado por el E_2 en la producción de óxido nítrico (ON). Mientras que Pauline Dan et al,⁽⁷²⁾ demostraron una distribución del α ER en el núcleo y en la periferia celular dependiente de un epítipo del receptor, no localizado en β ER, la localización de β ER fue predominantemente intranuclear, con una pequeña co-localización en el núcleo de ambos subtipos ER. Postulando además, la posibilidad de que diferentes estados conformacionales del α ER en la membrana, en el núcleo y entre los diferentes tipos celulares, permitan al E_2 disparar cascadas de señalización específicas de la localización y la célula. Así, en células endoteliales el α ER puede ser considerado como un blanco primordial en estudios farmacológicos que conciernen ECV.

Otros estudios han revelado que cerca del 3% de ambos receptores α ER y β ER se encuentran localizados en fracciones enriquecidas de membrana plasmática.⁽⁶⁹⁾ Sin

embargo, existen reportes que muestran que mER es diferente a α ER y β ER pero se encuentra acoplado a proteínas G y es secuestrado bajo la estimulación con el agonista.⁽⁷⁰⁾

Por otra parte, los efectos vasculares de la testosterona no son bien definidos y sus acciones en el sistema cardiovascular son contradictorias. Los andrógenos se han asociado con un incremento en el riesgo de enfermedades cardiovasculares en hombres.^(1, 6, 13, 37, 40, 41) La literatura revela numerosas asociaciones cardiovasculares perjudiciales, asociadas a el uso de esteroides androgénicos, incluyendo; incremento del colesterol total y de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), reducción de lipoproteínas de alta densidad (HDL) y de la relación HDL/LDL,⁽¹²⁵⁾ vasoconstricción inducida por tromboxanos⁽¹²⁶⁾ e incremento en la expresión de receptores de tromboxano.⁽¹²⁷⁾ En contraste, otros reportes sugieren efectos benéficos de la testosterona en el sistema cardiovascular tales como; efecto antianginoso,⁽⁴²⁾ efecto antiaterosclerótico significativo con la terapia de reemplazo con testosterona,⁽⁴⁵⁾ e inducción de dilatación arterial coronaria e incremento del flujo sanguíneo coronario en hombres con enfermedad arterial coronaria establecida.⁽⁴⁴⁾

La testosterona causa vasodilatación de forma rápida y no-genómica que parece ser mediada por más de un mecanismo; La síntesis de NO derivado de endotelio,^(46, 47) así como por la activación de canales de potasio en músculo liso vascular.⁽⁴⁸⁻⁵¹⁾ De esta forma, la testosterona parece ser un agente regulador en diversos procesos metabólicos, probablemente a través de un efecto regulador de la $[Ca^{2+}]_i$.^(52, 53, 54)

Los efectos no-genómicos de los esteroides pueden ser inducidos potencialmente por el mismo esteroide en ausencia de un receptor específico, a través de un efecto no transcripcional de un receptor esteroideo clásico, o por un receptor no clásico distintivo que este asociado posiblemente a la membrana plasmática.^(70, 128, 58) Los esteroides hidrofóbicos pueden interactuar con las cabezas polares de los fosfolípidos de membrana para influenciar la fluidez membranal. Sin embargo en estos estudios, la fluidez de la membrana fue solamente alterada a concentraciones elevadas, no fisiológicas, de los esteroides (10 a 10 μ M),⁽¹²⁹⁾ cuestionando si esto podría contribuir con un efecto significativo *in vivo*. A la fecha, los datos sugieren que los efectos no-genómicos reportados de los esteroides a concentraciones fisiológicas parecen ser mediados por receptores.⁽⁵⁷⁻⁶⁰⁾

La posibilidad de la existencia de un nuevo receptor androgénico (AR) unido a la membrana plasmática ha sido postulada por un gran número de autores, basados en la

detección de sitios de unión específicos para andrógenos en membrana plasmática.^(13, 128) Además, la habilidad de los andrógenos para modular en forma rápida la actividad de los canales iónicos y los niveles de calcio intracelular, ha sido observada en diversos tipos celulares.^(46 – 54, 98)

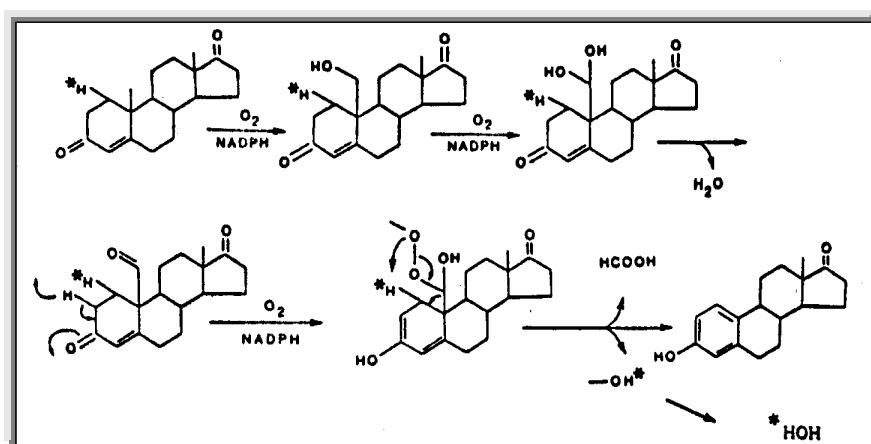
En la actualidad no se ha caracterizado un AR a nivel de membrana, pero existen datos preliminares de sitios de unión membranales microsomales de baja afinidad para andrógenos⁽⁷⁶⁾ y un sitio de unión para dehidroepiandrosterona (DHEA) en la membrana plasmática de células endoteliales.⁽⁷⁷⁾ Además, un receptor en la superficie celular para globulinas de unión de hormonas sexuales (SHBG) ha sido funcionalmente identificado en diversos tejidos, incluyendo próstata, testículo, mama e hígado, a la fecha el receptor SHGB no ha sido clonado, pero se piensa que es un receptor acoplado a proteínas G o funcionalmente ligado a uno, el cual es capaz de modular la acción androgénica en la membrana plasmática e iniciar la señalización intracelular a través del AMPc.⁽⁷⁸⁾

En este trabajo no fuimos capaces de localizar asociación membranal del AR (Figura 13). Sin embargo, otra posibilidad para explicar los efectos de testosterona en la cinética de calcio en CEMC, puede estar relacionada con su metabolismo. La testosterona es una pro-hormona convertida *in situ* en estrógenos activos por los tejidos esteroideogénicos. La relación Andrógenos/Estrógenos puede ser más importante que la acción de una sola hormona, esta relación, en ambos sexos, es controlada por la enzima aromatasa.

La aromatasa (estrógeno sintetasa) cataliza el paso clave en la biosíntesis de estrógenos y ejerce un papel importante en los procesos reproductivos en el ovario y la placenta. Es un miembro microsomal de la súper familia de citocromo P450, llamada también, citocromo P450 aromatasa (P450_{AROM}, producto del gen CYP19),⁽⁸¹⁾ esta hemo-proteína es responsable de la unión de esteroides androgénicos de C₁₉, y cataliza la serie de reacciones que conducen a la aromatización del anillo A para obtener el anillo fenólico característico de los estrógenos (ver Figuras 22 y 23).^(82, 84, 114)

Los estrógenos son sintetizados a través de la actividad de P450_{AROM} en una amplia variedad de tejidos extragonadales y actúan localmente estimulando a las células adyacentes o inclusive a las células en las cuales es producido.^(83, 84, 91, 92) Estas fuentes de actividad de P450_{AROM} están presentes en todo el cuerpo y pueden ser responsables de las concentraciones tisulares locales de estrógenos, que pueden a su vez mediar eventos

fisiológicos importantes, por ejemplo, la producción local de E_2 en células mesenquimales del tejido adiposo y piel parece ejercer un papel importante en la diferenciación de los adipositos,^(130, 131) en el hueso (osteoblastos y quizás osteoclastos) puede ejercer un papel crucial en el mantenimiento de la mineralización ósea tanto en hombres como en mujeres,^(132, 133) y en diferentes zonas cerebrales, ejerce un papel clave en la regulación de procesos reproductivos, en el comportamiento, y quizás en funciones cognitivas.^(91, 92, 134)



Lephart DE and Simpson RE. (1991) Assay of aromatase activity. Academic Press. 206:477-483

Figura 22. Secuencia de la reacción de aromatización. La conversión de andrógenos en estrógenos requiere del consumo de tres moléculas de NADPH y O_2 por cada molécula de estrógeno formado. El NADPH proporciona los equivalentes reducidos, mientras que el O_2 es insertado en la molécula a través de 3 hidroxilaciones secuenciales. Resultando en la pérdida del grupo metilo del C-19 en forma de ácido fórmico ($HCOOH$) y la aromatización del anillo A, con la consecuente pérdida estereoespecífica de los hidrógenos 1β y 2β del sustrato.

(*H denota $1\beta\text{-}^3H$).

En este trabajo evaluamos la posibilidad de que los efectos de la testosterona, induciendo un incremento en la $[Ca^{2+}]_i$ en CEMC's de rata, pueda deberse a su conversión a estrógenos, con este objetivo en mente, utilizamos inhibidores selectivos del $P450_{AROM}$; del

tipo 1, un compuesto esteroidal, 4-hidroxiandrostenediona ($4\mu\text{M}$) (Figura 16), el cual se une a la enzima en el mismo sitio de el sustrato androgénico, puede ser un inhibidor competitivo puro o irreversible “sustrato suicida”, y de tipo 2, un compuesto no esteroideo, aminoglutetimida ($4\mu\text{M}$) (Figura 15), el cual interfiere con el grupo prostético de la enzima, se une a el grupo hemo de la aromatasa por coordinación a través del átomo de nitrógeno básico.^(135, 136) La cinética de calcio inducida por testosterona fue totalmente bloqueada por ambos inhibidores, este efecto no fue inespecífico, ni fue el resultado de la depleción de los depósitos intracelulares de calcio, debido a que al estimular a las células con E_2 (1nM) se induce un incremento rápido en $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (ver figuras 15 y 16). Estos resultados señalan la existencia de aromatización en CEMC de rata macho y hembra en cultivo. Además, muestran que la testosterona en CEMC's de rata actúa movilizandoo Ca^{2+} del retículo endoplásmico a través de su conversión a estrógenos.

En el suero, solo del 0.5 – 4% de las hormonas esteroides sexuales se encuentran libres, sin formar complejos con proteínas sericas. La mayoría de la testosterona y dihidrotestosterona (DHT) (aproximadamente el 60%) se encuentran formando complejos con SHBG, el resto se unen a albúmina. Las SHGB son también capaces de unir E_2 pero con menor afinidad que los andrógenos.^(7, 13, 128, 137)

Dado que la mayor parte del E_2 circulante esta unido a globulinas fijadoras de hormonas sexuales, es poco probable tener un gran impacto en la transactivación de los receptores estrogénicos, en comparación con los estrógenos producidos localmente como consecuencia del metabolismo de la testosterona circulante. Esto apoya la idea que la producción local de E_2 por aromatización de testosterona en tejidos dependientes de estrógenos, actúa en el mismo sitio regulando sus funciones, la cantidad de estrógenos sintetizados por estos sitios extragonadales puede ser pequeña, pero las concentraciones locales alcanzadas en los tejidos son probablemente suficientes para ejercer una influencia biológica significativa localmente y quizás ejercen un papel fisiológico y fisiopatológico importante en forma paracrina, autocrinao inclusive intracrina.^(84, 138)

Para evaluar la presencia de aromatasa en CEMC's, desarrollamos anticuerpos policlonales contra un péptido sintético de 20 aminoácidos correspondiente a los residuos 379-398 de la proteína $\text{P450}_{\text{AROM}}$ de rata (Figura 23), la cual se dedujo a partir de la secuencia nucleotídica del cDNA, y utilizamos procedimientos inmunocitoquímicos. Este segmento

de la proteína P450_{AROM} fue elegido debido a que la secuencia de aminoácidos es homóloga e idéntica con las secuencias deducidas para el humano, la rata y el pollo, pero muestra baja homología con regiones correspondientes en otras proteínas del tipo citocromo P450.⁽¹⁰⁹⁾

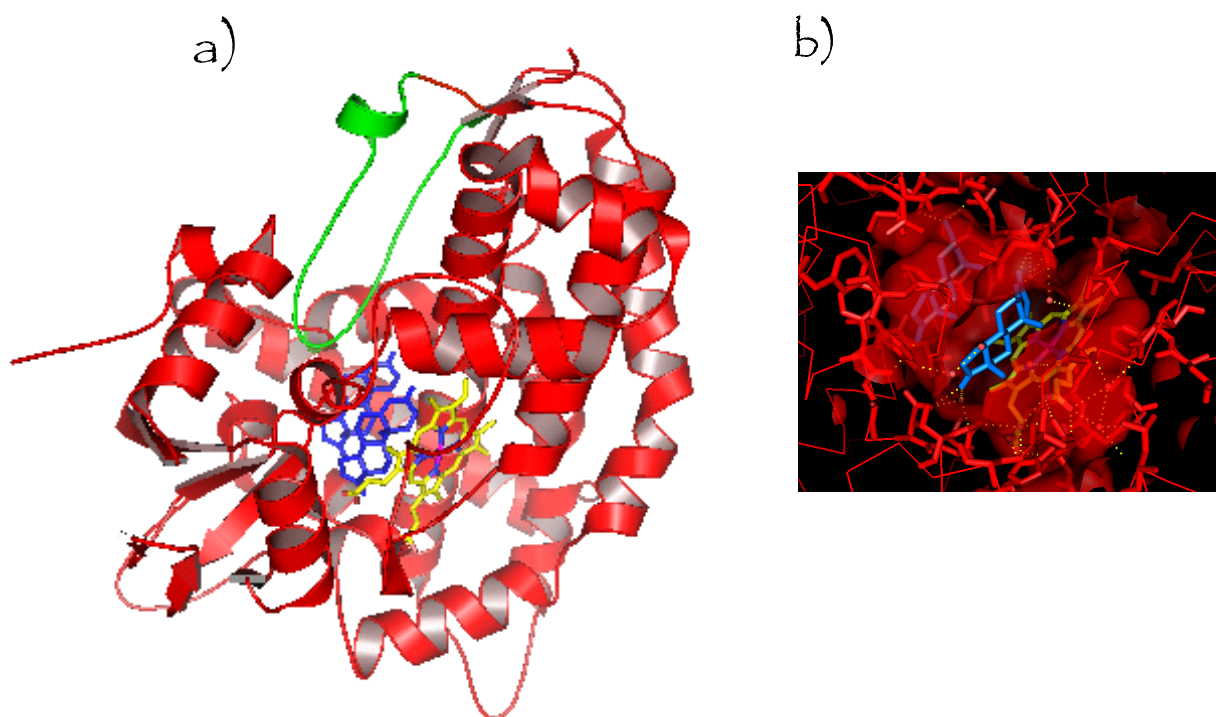


Figura 23. a) Cristalografía de rayos X de la enzima P450_{AROM}, unida a dos moléculas de sustrato (androstenediona, azul), la aromatasa es una hemo-proteína (grupo hemo en amarillo), perteneciente a la superfamilia de los citocromos P450. En verde observamos el péptido correspondiente a los residuos 379-398 de la proteína P450_{AROM} (496 aminoácidos), utilizado para la producción del fragmento F(ab')₂ de los anticuerpos policlonales contra la P450_{AROM}, para los ensayos inmunecitoquímicos y Westernblot. b) Sitio activo de la enzima P450_{AROM}, en donde observamos la apertura del sitio activo, por donde entra el sustrato (testosterona o androstenediona).

La especificidad del procedimiento inmunocitoquímico fue establecido por: 1) el bloqueo de la inmunoreactividad del anticuerpo generado contra el péptido, a través de la incubación previa con un exceso de péptido sin el acarreador (proteína hemocianina) que fue usado como antígeno en los ensayos de ELISA. 2) la omisión del anticuerpo primario en el proceso inmunocitoquímico en CMEC no permite observar ninguna tinción. 3) se detectó intensa inmunoreactividad de la proteína P450_{AROM} en CEMC's con el uso del fragmento F(ab')₂ de las IgG's digeridas (immobilized pepsin, Pierce). Los títulos inmunoreactivos fueron determinados por ELISA (1:500-1:10,000). Estos datos proporcionan evidencia substancial para la especificidad del fragmento F(ab')₂ del anticuerpo, capaz de teñir los componentes celulares y reconocer a la proteína de peso molecular aparentemente correcta, en tejidos que contienen la enzima P450_{AROM}.

La aplicación del fragmento F(ab')₂ del anticuerpo contra el péptido (aromatasa) en CMEC de rata macho y hembra en cultivo, resulta en la identificación de intensa inmunoreactividad en más del 99% de las células, (Figura 17) aportando evidencias de la expresión de aromatasa en este tipo endotelial de vasos de resistencia. La reactividad inmunoquímica se observa localizada tanto a nivel citoplasmático, como en la periferia de las células, a pesar de que nuestros estudios de inmunolocalización a través de fluorescencia y microscopia confocal, no son concluyentes respecto a la asociación membranal del P450_{AROM}, los resultados son altamente sugerentes de esta posibilidad. (Figura 17)

Los resultados obtenidos en el inmunoblot revelan la expresión de P450_{AROM} en CEMC's de rata (ver Figura 18). Una sola banda inmunoreactiva con un peso molecular apropiado (~50Kda) fue detectada en los homogenizados de CEMC de rata macho y hembra, tanto a nivel del sobrenadante de la centrifugación de 10,000 x g (S1) que contiene las partículas subcelulares menores de 0.4µm (endosomas, vesículas de retículo endoplásmico rugoso, vesículas de membrana plasmática), como en el pellet de la centrifugación de 10,000 x g (P1), que contiene las partículas subcelulares mayores de 0.4µm (mitocondrias, membrana nuclear, fragmentos grandes de membrana plasmática, lisosomas y peroxisomas), y en el sobrenadante (S2) y pellet (P2) de la centrifugación de 100,000 x g. El tamaño estimado de la banda única de los homogenizados de CEMC's de rata es similar al tamaño predicho para la proteína P450_{AROM} deducida por su respectivo cDNA.^(84, 90, 109) La aromatasa

(estrógeno sintetasa) es un miembro microsomal de la superfamilia de los citocromos P450.^(82, 84) Nosotros localizamos inmunoreactividad en el pellet de la centrifugación de 100,000 x g (vesículas de membrana plasmática), este hecho sugiere fuertemente una posible asociación membranal de P450_{AROM} en este tipo celular.

Otro hecho importante es que los estrógenos sintetizados dentro de fuentes extragonadales son probablemente biológicamente activos solo a nivel local en forma paracrina, autocrina o intracrina en los tejidos dependientes de estrógenos. Por ejemplo, En los miocitos cardiacos la biosíntesis local de estrógenos puede activar los receptores estrogénicos α y β .⁽⁸⁸⁾ La testosterona también inhibe la expresión del mRNA y la proteína de la molécula-1 de adhesión celular en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVEC) por su conversión a E₂.⁽¹³⁹⁾

Se ha reportado biosíntesis local de estrógenos en tejidos vasculares. La expresión y actividad de aromatasas se ha demostrado en células de músculo liso arterial de rata⁽¹⁴⁰⁾ y endoteliales de aorta de bovino,⁽¹⁴¹⁾ células de músculo liso de arteria pulmonar y aorta humanas,⁽¹⁴²⁾ en músculo liso y endotelio de vena cava humana,⁽¹⁴³⁾ y en células endoteliales de vena de cordón umbilical humana.⁽¹³⁹⁾

Respecto a P450_{AROM}, la enzima clave en la biosíntesis de E₂, es codificada por una copia simple del gen CYP19, localizado en la banda 21.2 del brazo corto del cromosoma 15 (15q21.2), esta compuesto por 10 exones de los cuales solo se codifican 9, iniciando con el exon II (Figura 7). Existen una amplia variedad de primeros exones alternativos, que están localizados en la región 5'-no traducida del transcrito, de forma específica para cada tejido. Esta expresión tejido específica de P450_{AROM} es dependiente de los promotores presentes en cada tejido, que son regulados diferencialmente por una amplia variedad de cofactores estimuladores o inhibidores, y que emplean vías de señalización completamente diferentes^(90, 113) Este uso alternativo de diferentes tipos de exon I, flanqueados a su vez con promotores específicos en cada tejido puede explicar la compleja regulación por diversos factores, cabe señalar que este mecanismo no es único para el gen de la aromatasas.^(82 - 92) Además, la proteína codificada muestra un alto grado de homología con otras especies animales como el ratón, la rata, el pollo y el humano⁽¹⁰⁹⁾

El mRNA de P450_{AROM} es expresado por splicing alternativo, utilizando un exon I diferente en cada tejido, así las secuencias de los mRNA's codificados para P450_{AROM} presentan

diferencias específicas dependiendo del tejido en su región 5'-no traducida.^(82,84,90) En el presente estudio, utilizamos tres tipos diferentes de sondas (secuencias de oligonucleótidos) que corresponden a un segmento del exon I, de tres diferentes fuentes de tejido (que son algunos de los principales tejidos donde se realiza el proceso de aromatización): 1) Placenta, 2) Ovario y 3) Próstata/Testículo, para realizar la búsqueda y el análisis de mRNA de los transcritos terminales de P450_{AROM} en CEMC's a través de estudios de hibridación *in situ*. Las sondas de oligonucleótidos con Sentido fueron utilizadas como controles negativos. La aplicación de la sonda Antisentido de Ovario resulta en la identificación de una intensa reactividad localizada principalmente a nivel citoplasmático (ver figura 19). La hibridación con las sondas de oligonucleótidos Antisentido de Placenta y Próstata/Testículo fueron negativas. Estos datos sugieren que las CEMC de rata macho y hembra expresan mRNA específico de Ovario.

Por otra parte, A través de los ensayos enzimáticos *in vitro*, demostramos también que la enzima P450_{AROM} es catalíticamente activa en CEMC's de rata y demostramos de forma indirecta (a través del método de liberación de agua tritiada,⁽¹¹⁰⁾ Figura 22) que tanto CEMC de rata macho como de rata hembra producen cantidades significativas de estrógenos. La incubación del sustrato [1β -³H]androstenedione más los cofactores, con diferentes concentraciones de homogenizados de CEMC de rata macho y hembra, resulta en la formación de agua tritiada en forma dependiente de la concentración (ver figura 20). Nosotros no pudimos encontrar diferencias asociadas al género (ver figuras 20 y 21). Como experimentos de control positivo, utilizamos una fuente enriquecida de P450_{AROM} (microsomos de placenta humanos), los cuales muestran aromatización activa y reproducible. En experimentos de control negativo, en los cuales la fuente de P450_{AROM} (microsomos de placenta humana o lisados de CEMC's) fue omitida o reemplazada por una fuente de proteína carente de actividad de P450_{AROM} (albúmina sérica bovina) no fue detectada aromatización significativa (ver figura 21), lo cual indica que no existe pérdida espontánea significativa del átomo de tritio del sustrato. Tomando todos nuestros resultados en conjunto, los datos confieren evidencia suficiente para demostrar la presencia, expresión y actividad de la enzima P450_{AROM} en CEMC's de rata.

La aromatización de andrógenos probablemente represente un sistema complejo. En conclusión, nuestros resultados muestran que en CMEC de rata macho y hembra en cultivo,

la testosterona y el E₂ actúan como agonistas de actividad endotelial, incrementando la [Ca²⁺]_i a través de la actividad de la enzima PLC β, estos efectos son de origen no-genómico y están relacionados con mecanismos asociados a membrana plasmática. La testosterona puede ejercer efectos diferenciales dependiendo del origen de la célula endotelial. Las CEMC de rata macho y hembra en cultivo expresan la enzima P450_{AROM}, y su actividad es bloqueada con el uso de inhibidores selectivos. La enzima P450_{AROM} en CEMC's esta asociada con procesos membranales que median el efecto no-genómico en el incremento rápido de la [Ca²⁺]_i inducido por testosterona. Aparentemente, el exon 1c (ovario específico) fue utilizado por los transcritos terminales de mRNA de P450_{AROM} en CEMC's. En este tipo celular, P450_{AROM} muestra actividad enzimática significativa. No pudimos encontrar diferencias relacionadas con el género. Las CEMC's parecen ser un sitio potencial para la biosíntesis de E₂ a partir de la testosterona circulante, que media los cambios en la [Ca²⁺]_i y puede influir en las respuestas fisiológicos de este tipo endotelial.

BIBLIOGRAFÍA.

1. **Kalin FM and Zumoff B.** Sex hormones and coronary disease: a review of the clinical studies. *Steroids.* 55:330-352, 1990.
2. **Lobo AR and Speroff L.** International consensus conference on postmenopausal hormone therapy and the cardiovascular system. *Fertility and Sterility.* 61:592-595, 1994.
3. **Skafar FD, Xu R, Morales J, Ram J. and Sowers RJ.** Female sex hormones and cardiovascular disease in women. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82:3913-3918, 1997.
4. **Mendelsohn EM, Karas HR.** The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *New England Journal of Medicine.* 340:1801-1811, 1999.
5. **Colditz AG, Willett CW, Stampfer JM, Rosner B, Speizer EF, Hennekens HC.** Menopause and the risk of coronary heart disease in women. *N Engl J Med.* 316:1105-1110, 1987.
6. **Leinwand A Leslie.** Sex is a potent modifier of the cardiovascular system. *J. Clin. Invest.* 112:302-307, 2003.
7. **Baxter DJ, Young FW Jr., and Webb P.** Cardiovascular endocrinology: Introduction. *Endocrine Reviews.* 24:253-260, 2003.
8. **Farhat YM, Lavigne CM. and Ramwell WP.** The vascular protective effects of estrogen. *FASEB.* 10:615-624, 1996.
9. **Vischer U.** Estrogens and atherosclerosis: a direct protective effect on the vascular wall. *Eur J Endocrinol* 137:343-344, 1997.
10. **Subbiah MTR.** Estrogen replacement therapy and cardioprotection: mechanisms and controversies. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 35:271-276. 2002.
11. **Barrett-Connor E.** Estrogen and estrogen-progestogen replacement: therapy and cardiovascular diseases.
12. **INEGI.** Dirección general de estadística. Dirección de estadísticas demográficas y sociales. Sistema nacional de salud. Boletín de información estadística No. 15, vol. 2. 1997.
13. **Liu YP, Death KA and Handeksnab JD.** Androgens and cardiovascular disease. *Endocrine reviews.* 24:313-340, 2003.

14. **Hayward SC, Kelly PR; Collins P.** The roles of gender, the menopause and hormone replacement on cardiovascular function. *Cardiovascular Research.* 46:28-49, 2000.
15. **de Simone G., et al.** Gender differences in left ventricular growth. *Hypertension.* 26:979-983, 1995.
16. **Grandi AM., et al.** Influence of age and sex on left ventricular anatomy and function in normals. *Cardiology.* 81:8-13, 1992.
17. **Levy D, Anderson KM, Savage DD, et al.** Echocardiographically detected left ventricular hypertrophy: prevalence and risk factors. *Ann Int Med.* 108:7-13, 1988.
18. **Celermajer DS, Sorensen KE, Spiegelhalter DJ, et al.** Ageing is associated with endothelial dysfunction in healthy men years before the age-related decline in women. *J Am Coll Cardiol.* 24:471-476, 1994.
19. **Tostes RC, Nigro D, Fortes ZB and Carvalho MHC.** Effects of estrogen on the vascular system. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36:1143-1158, 2003.
20. **Wilson PWF, Garrison RJ, Castelli WP.** Postmenopausal estrogen use, cigarette smoking, and cardiovascular morbidity in women over 50: the Framingham Study. *N. Engl. J. Med.* 313:1038-1043, 1985.
21. **Hulley S, Grady D and Bush T.** Heart and estrogen/progestin replacement study (HERS). Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. *Journal of the American Medical Association.* 280:605-612, 1988.
22. **Eaker ED, Castelli WP.** Coronary heart disease and its risk factors among women in the Framingham Study. In: Eaker E, Packard B, Wenger NK, Clarkson TB, Tyroler HA, eds. *Coronary heart disease in women.* New York: Haymarket Doyma, 1987: 122-132.
23. **Bush TL, Miller VT.** Effects of pharmacologic agents used during menopause: impact on lipids and lipoproteins. In: Mishell D, ed. *Menopause: physiology and pharmacology.* Chicago: Year Book Medical, 1986:187-208.
24. **Stampfer JM, Colditz GA, Willet CW, Manson EJ, Rosner B, Speizer EF and Hennekens HC.** Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the Nurses' Health Study. *N. Eng. J. Med.* 325:756-762, 1991.

25. **Herrington DM, Reboussin DM, Brosnihan KB, Sharp PC, Schumaker SA, Snyder TE, Furberg CD, Kowalchuk CJ, Stuckey TJ, Rogers W, Givens DH, and Water D.** Effects of estrogen replacement on the progression of coronary artery atherosclerosis. *N. Eng. J. Med.* 343:522-529, 2000.
26. **McGowan JA and Pottern L.** Commentary on the Women's Health Initiative. *Maturitas.* 34:109-112, 2000.
27. **Glueck CJ, Wang P, Fontaine RN, Tracy T, Sieve-Smith L and Lang JE.** Effect of exogenous estrogen on atherothrombotic vascular disease risk related to the presence or absence of the factor V Leiden mutation (resistance to activated protein C). *Am. J. Cardiol.* 84:549-554, 1999.
28. **Gardemann A, Lohre J, Katz N, Tillmans H, Hehrlein FW and Haberbosch W.** The 4G/4G genotype of the plasminogen activator inhibitor 4G/5G gene polymorphism is associated with coronary atherosclerosis in patients at high risk for the disease. *Thrombosis and Hemostasis.* 82:1121-1126, 1999.
29. **Stevens RE, Hanford C, Wasan S, Cusack SL and Phelps KV.** A 12 week clinical trial determining the efficacy of synthetic conjugated estrogen A (SCE) in the treatment of vasomotor symptoms in African American and Caucasian postmenopausal women. *International Journal of Fertility.* 45:264-272, 2000.
30. **Davison S and Davis RS.** New markers for cardiovascular disease risk in women: impact of endogenous estrogen status and exogenous postmenopausal hormone therapy. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88:2470-2478, 2003
31. **Nilson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M and Gustafsson J.** Mechanisms of estrogen action. *Physiol. Rev.* 81:1535-1565, 2001.
32. **Nadal A, Díaz M. and Valverde AM.** The estrogen trinity: membrane, cytosolic, and nuclear effects. *News Physiol. Sci.* 16:251-255, 2001.
33. **Christ M. and Wehling M.** Cardiovascular steroid actions: swift swallows or sluggish snails? *Cardiovascular Research.* 40:34-44, 1998.
34. **Brann WD, Hendry BL. and Mahesh BV.** Emerging diversities in the mechanism of action of steroid hormones. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 52:113-133, 1995.

35. **Ciocca RD and Riog VLM.** Estrogen receptors in human nontarget tissues: biological and clinical implications. *Endocrine Reviews.* 16:35-61, 1995.
36. **Coronary Drug Project Research Group.** The coronary drug project. Findings leading to discontinuation of the 2.5mg day estrogen group. *JAMA.* 226:652-657, 1973.
37. **Alexandersen P, Haarbo J, and Christiansen C.** The relationship of natural androgen to coronary heart disease in males: a review. *Atherosclerosis.* 125:1-13, 1996.
38. **Khaw KT, and Barrett-Connor E.** Endogenous sex hormones, high density lipoprotein cholesterol, and other lipoprotein fraction in men. *Atheroscler. Thromb.* 11:489-494, 1991.
39. **English KM, Steeds R, Jones TH, and Channer KS.** Testosterone and coronary heart disease: is there a link? *Q. J. Med.* 90:-787 791, 1997.
40. **Weidemann W, Hanke H.** Cardiovascular effects of androgens. *Cardiovasc. Drug. Rev.* 20:175-198, 2002.
41. **Sullivan ML, Martinez CM, Gennis P, Gallagher EJ.** The cardiac toxicity of anabolic steroids. *Prog. Cardiovasc. Dis.* 41:1-15, 1998.
42. **Levine SA, Likoff WB.** The therapeutic value of testosterone propionate in angina pectoris. *N. Engl. J. Med.* 229 7707 72, 1943.
43. **Webb CM, McNeil JG, Hayward CS, De Zeigler D and Collins P.** Effects of testosterone on myocardial ischemia in men with coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* 83:437-439, 1999.
44. **Webb CM, McNeil JG, Hayward CS, De Zeigler D and Collins P.** Effects of testosterone on coronary vasomotor regulation in men with coronary heart disease. *Circulation.* 100:1690 -1696, 1999.
45. **Alexandersen P, Haarbo J, Byrjalsen I, Lawaetz H, Christiansen C.** Natural androgens inhibit male atherosclerosis. *Circ Res.* 84:813-819, 1999.
46. **Chou MT, Sudhir K, Hutchison JS, Ko E, Amidon MT, Collins P, Chatterjee K.** Testosterone induces dilatation of canine coronary conductance and resistance arteries in vivo. *Circulation.* 94:2614-2619, 1996.

47. **Costarella EC, Stallone NJ, Rutecki WG and Whittier CF.** Testosterone causes direct relaxation of rat thoracic aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 273:4 -39, 1996.
48. **Yue P, Chatterjee K, Beale C, Poole-Wilson AP and Collins P.** Testosterone relaxes rabbit coronary arteries and aorta. *Circulation.* 91:1154-1160, 1995.
49. **Ding QA and Stallone NJ.** Testosterone-induced relaxation of rat aorta is androgen structure specific and involves K⁺ channel activation. *J. Appl. Physiol.* 91:2742-2750, 2001.
50. **Tep-areenan P, Kendall DA and Randall MD.** Testosterone-induced vasorelaxation bed is mediated predominantly via potassium channels. *Br. J. Pharmacol.* 136(3):735 -740, 2002.
51. **Deenadayalu PV, White ER, Stallone NJ, Gao X and Garcia JA.** Testosterone relaxes coronary arteries by opening the large-conductance, calcium activated potassium channel. *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.* 28:H1720 H1727, 2001.
52. **Rubio GI, García RO, Serdan GR, Balcazar GG, Muñoz GO, Morato T, Zamora GM, Ceballos RG.** Testosterone inhibits bradykinin-induced intracellular calcium kinetics in rat aortic endothelial cells in culture. *Steroids.* 67:393-397, 2002.
53. **Lieberherr M and Grosse B.** Androgens increase intracellular calcium concentration and inositol 1,4,5-trisphosphate and diacylglycerol formation via a pertussis toxin-sensitive G-protein. *J. Biol. Chem.* 269:217 -7223, 1994.
54. **Jones DR, Pugh JP, Jones HT and Channer SK.** The vasodilatory action of testosterone: a potassium-channel opening or a calcium antagonistic action? *Br. J. Pharmacol.* 138-733 744, 2003.
55. **Brinkmann OA and Trapman J.** Genetic analysis of androgen receptors in development and disease. *Hormones and Signaling.* 47:317-341, 2000.
56. **Jänne AO, Palvimo JJ, Kallio P and Merja M.** Androgen receptor and mechanism of androgen action. *Annals of Medicine.* 25:83-89, 1993.
57. **Falkenstein E, Tillmann CH, Christ M, Feuring M and Wehling M.** Multiple actions of steroid hormones- a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol. Rev.* 52:513-555, 2000.
58. **Watson SC and Gametchu B.** Membrane-initiated steroid actions and the proteins that mediate them. *P.S.E.B.M.* 220:9-19, 1999.

59. **Revelli A, Massobrio M and Tesarik J.** Nongenomic actions of steroid hormones in reproductive tissues. *Endocrine review.* 19:3-17, 1998.
60. **Wehling M.** Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu. Rev. Physiol.* 59:365-393, 1997.
61. **Pedram A, Razandi M, Aitkenhead M, Hughes CWC and Levin RE.** Integration of the nongenomic and genomic actions of estrogen. *J. Biol. Chem.* 277:50768-50775, 2002.
62. **Botwood N, Hamilton-Fairley D, Kiddy D, Robinson S and Franks S.** Sex hormone-binding globulin and female reproductive function. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 53:529-531, 1995.
63. **Russell SK, Haynes PM, Sinha D, Clerisme E and Bender RJ.** Human vascular endothelial cells contain membrane binding sites for Estradiol, which mediate rapid intracellular signaling. *PNAS.* 97:5930-5935, 2000.
64. **Goetz MR, Thatte SH, Prabhakar P, Cho RM, Michel T. and Golan ED.** Estradiol induces the calcium-dependent translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96:2788-2793, 1999.
65. **Chambliss LK, Yuhanna SI, Mineo C, Pingsheng L, German Z, Sherman ST, Mendelsohn EM, Anderson WGR. and Shaul WP.** Estrogen receptor α and endothelial nitric oxide synthase are organized into a functional signaling module in caveolae. *Circ Res.* 87:e44-e52, 2000.
66. **Zhang Z, Maier B, Santen JR and Song XDR.** Membrane association of estrogen receptor alpha mediates estrogen effect on MAPK activation. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 294:926-933, 2002.
67. **Razandi M, Pedram A and Levin ER.** Estrogen signals to the preservation of endothelial cells form and function. *J. Biol. Chem.* 275:38540-38546, 2000.
68. **Chen Z, Yuhanna SI, Galcheva-Gargova Z, Karas HR, Mendelsohn EM and Shaul WP.** Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J. Clin. Invest.* 103:401-406, 1999.
69. **Razandi M, Pedram A, Greene GL, Levin ER.** Cell membrana and nuclear estrogen receptors (ERs) originate from a single transcript: studies of ER α and ER β expressed in Chinese hamster ovary cells. *Mol. Endocrinol.* 13:307-319, 1999.

70. **Benten MWP, Stephan C, Lieberherr M and Wunderlich F.** Estradiol signaling via sequestrable surface receptors. *Endocrinology.* 142:1669-1677, 2001.
71. **Darblade B, Pendaries C, Krust A, Dupont S, Fouque M-J, Rami J, Chambon P, Bayard F and Arnal JF.** Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the α , but not β , estrogen receptor. *Circ. Res.* 90:413-419, 2002.
72. **Dan P, Cheung CYJ, Scriven RLD and Moore DWE.** Epitope-dependent localization of estrogen receptor α , but not β , in en face arterial endothelium. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 284:H1295 H1306, 2003.
73. **Ceballos G, Figueroa L, Rubio I, Gallo G, García A, Martínez A, Yañez R, Pérez J, Morato T and Chamorro G.** Acute and nongenomic effects of testosterone on isolated and perfused rat heart. *J. Cardiovas. Pharmacol.* 33:691-697, 1999.
74. **Ong PJ, Patrizi G, Chong WC, Webb CM, Hayward CS and Collins P.** Testosterone enhances flow-mediated brachial artery reactivity in men with coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* 85:269-272, 2000.
75. **Kang SM, Jang Y, Kim JY, Chung N, Cho SY, Chae JS and Lee JH.** Effect of oral administration of testosterone on brachial arterial vasoreactivity in men with coronary artery disease. *Am. J. Cardiol.* 89:862-864, 2002.
76. **Luzardo OP, Machin RP, Diaz-Chico BN, Fernandez L.** Photoaffinity labeling identification of a specific binding protein for the anabolic steroids stanozolol and danazol: an oligomeric protein regulated by age, pituitary hormones, and ethinyl Estradiol. *Endocrinology.* 141:3377-3387, 2000.
77. **Liu D and Dillon JS.** Dehydroepiandrosterone activates endothelial cell nitric oxide synthase by a specific plasma membrane receptor coupled to $G\alpha(i2,3)$. *J. Biol. Chem.* 277:21379-21388, 2002.
78. **Kahn SM, Hryb DJ, Nakhla AM, Romas NA and Rosner W.** Sex hormone binding globulin is synthesized in target cells. *J. Endocrinol.* 175:113-120, 2002.
79. **Eicheler W, Tuohimaa P, Andermann K, Forssman WG, Aumuller G.** Immunocytochemical localization of human 5α -reductase 2 with polyclonal antibodies in androgen target and non-target human tissues. *J. Histochem. Cytochem.* 42:667-675, 1994.

80. **Fujimoto R, Morimoto I, Morita E, Sugimoto H, Ito Y, Eto S.** Androgen receptors, 5 α -reductase activity and androgen-dependent proliferation of vascular smooth muscle cells. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 50:169-174, 1994.
81. **Sebastian S and Bulun SE.** A highly complex organization of the regulatory region of the human CYP19 (aromatase) gene revealed by the human genome project. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 86:4600-4602, 2001.
82. **Simpson ER, Meandro MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Lorence-Graham S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD, Mendelson CR and Bulun SE.** Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for Estrogen Biosynthesis. *Endocrine Rev.* 15:342-355, 1994.
83. **Harada N, Sasano H, Murakami H, Ohkuma T, Nagura H. and Takagi Y.** Localized expression of aromatase in human vascular tissues. *Circ. Res.* 84:1285-1291, 1999.
84. **Simpson ER, Clyne C, Rubin G, Boon CW, Robertson K, Britt K, Speed C and Jones M.** Aromatase- a brief overview. *Annu Rev Physiol.* 64:93-127, 2002.
85. **Bayard F, Clamens S, Delsol G, Blaes N, Maret A. and Faye J.** Oestrogen synthesis, oestrogen metabolism and functional oestrogen receptors in bovine aortic endothelial cells. *Ciba Foundation Symposium* 191. P122-138, 1995.
86. **Bayard F, Clamens S, Meggetto F, Blaes N, Delsol G and Faye J.** Estrogen synthesis, estrogen metabolism, and functional estrogen receptors in rat arterial smooth muscle cells in culture. *Endocrinology.* 136:1523-1529, 1995.
87. **Diano S, Horvath TL, Mor G, Register T, Adams M, Harada N, Naftolin F.** Aromatase and estrogen receptor immunoreactivity in the coronary arteries of monkeys and human subjects. *Menopause.* 6:21-28, 1999.
88. **Grohö C, Kahlert S, Löbbert K and Vetter H.** Expression of oestrogen receptor α and β in rat heart: role of local oestrogen synthesis. *J. Endocrinol.* 156:R1-R7, 1998.
89. **Castagnetta LA, Lo Casto M, Granata OM, Polito L, Calabro M, Lo BA, Bellavia V, Carruba G.** Estrogen content and metabolism in human breast tumor tissue and cells. *Ann. NY Acad. Sci.* 784:314-324, 1996.
90. **Harada N, Utsumi T and Takagi Y.** Tissue-specific expression of the human aromatase cytochrome P450 gene by alternative use of multiple exons 1 and

- promoters, and switching of tissue-specific exons 1 in carcinogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 90:11312-11316, 1993.
91. **Simpson RE and Davis RS.** Minireview: Aromatase and the regulation of estrogen biosynthesis-some new perspectives. *Endocrinology.* 142:4589-4594, 2001.
 92. **Simpson E, Rubin G, Clyne C, Robertson K, O'Donnell L, Davis S and Jones M.** Local estrogen biosynthesis in males and females. *Endocrine-Related Cancer.* 6:131-137, 1999.
 93. **Carter DT. and Ogden D.** Kinetics of Ca^{2+} release by $InsP_3$ in pig single aortic endothelial cells: evidence for an inhibitory role of cytosolic Ca^{2+} in regulating hormonally evoked Ca^{2+} spikes. *J. Physiol.* 504.1:17-33, 1997.
 94. **Adams JD, Barakeh J, Laskey R and Van Breemen C.** Ion channels and regulation of intracellular calcium in vascular endothelial cells. *FASEB J.* 3:2389-2400, 1989.
 95. **Mooren ChF, Kinne K-HR.** Cellular calcium in health and disease. *Biochimica et Biophysica Acta.* 1406:127-151, 1998.
 96. **Hûser J and Blatter AL.** Elementary events of agonist-induced Ca^{2+} release in vascular endothelial cells. *Am. J. Physiol. (Cell Physiol. 42).* 273:C1775-1782, 1997.
 97. **Pohl U, De Wit C and Gloe T.** Large arteriole in the control of blood flow: role of endothelium-dependent dilation. *Acta Physiol. Scand.* 168:505-510, 2000.
 98. **Rubio GI, Sierra RJA, García VA, Martínez MA, Muñoz GO, Morato T. and Ceballos RG.** 17β -estradiol increases intracellular calcium concentration through a short-term and non-genomic mechanism in rat vascular endothelium in culture. *J Cardiovasc Pharmacol.* 36:196-202, 2000.
 99. **Rehman HU.** Vascular endothelium as an endocrine organ. *Proc. R. Coll Physicians Edinb.* 31:149-154, 2001.
 100. **Grienddliing KK. and Alexander WR.** Endothelial control of the cardiovascular system: recent advances. *FASEB J.* 10:283-292, 1996.
 101. **Liao KJ.** Endothelial and acute coronary syndromes. *Clinical Chemistry.* 44:1799-1808, 1998.

102. **Gerritsen ME.** Functional heterogeneity of vascular endothelial cells. *Biochem. Pharmacol.* 36:2701-2711, 1987.
103. **Page C, Rose M, Yacoub M, and Pigott R.** Antigenic heterogeneity of vascular endothelium. *Am. J. Pathol.* 141:673-683, 1992.
104. **Mikawa T and Fischman DA.** Retroviral analysis of cardiac morphogenesis: discontinuous formation of coronary vessels. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 89:9504-9508, 1992.
105. **Stevens T, Rosenberg R, Aird W, Quertermous T, Johnson LF, Garcia GNJ, Hebbel PR, Tudor MR and Garfinkel S.** NHLBI workshop report: endothelial cell phenotypes in heart, lung, and blood diseases. *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 281:C1422-C1433, 2001.
106. **Aird WC, Edelberg JM, Weiler-Guettler H, Simmons WW, Smith TW and Rosenberg RD.** Vascular bed-specific expression of an endothelial cell gene is programmed by the tissue microenvironment. *J. Cell Biol.* 138:1117-1124, 1997.
107. **Nishida M., Carley W.W., Gerritsen E.M., Ellingsen O., Kelly A.R. and Smith W.T.** Isolation and characterization of human and rat cardiac microvascular endothelial cells. *Heart Circ. Physiol.* 33:H639-H652, 1993.
108. **Grynkiewicz G., Poenie M., Tsien R.Y.** A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescent properties. *J. Biol. Chem.* 260:3440-3450, 1985.
109. **Sanghera k.M., Simpson R.E., McPhaul J.M., Kozlowski G., Conley J.A. and Lephart D.E.** Immunocytochemical distribution of aromatase cytochrome P450 in the rat brain using peptide-generated polyclonal antibodies. *Endocrinology.* 129:2834-2844, 1991.
110. **Ryan J.K.** Biological aromatization of steroids. *J Biol Chem.* 234:268-272, 1959.
111. **Bradford MM.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem.* 72:248-254, 1976.
112. **Sedmak JJ and Grossberg ES.** A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Anal Biochem.* 79:544-552, 1977.

113. **Harada N., Sasano H., Murakami H., Ohkuma T., Nagura H. and Takagi Y.** Localized expression of aromatase in human vascular tissues. *Circ. Res.* 84:1285-1291, 1999.
114. **Lephart DE and Simpson RV.** Assay of aromatase activity. *Methods in Enzymology.* 206:477-483, 1991.
115. **William M. Chilian, with contribution from the NHLBI workshop participants.** Coronary microcirculation in health and disease. Summary of an NHLBI workshop. *Circulation.* 95:522-528, 1997.
116. **Kuo L, Davis MJ, Chilian WM.** Longitudinal gradients for endothelium-dependent and -independent vascular responses in the coronary circulation. *Circulation.* 92:518-525, 1995.
117. **Chilian WM.** Functional distribution of α 1- and α 2- adrenergic receptors in the coronary microcirculation. *Circulation.* 84:2108-2122, 1991.
118. **Lundberg MS, Sadhu DN, Grumman VE, Chilian WM, Ramos KS.** Actin isoform and α_{1b} - adrenoceptor gene expression in aortic and coronary smooth muscle is influenced by cyclical stretch. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* 31:115-121, 1995.
119. **Gloe Torsen and Pohl Ulrich.** Laminin binding conveys mechanosensing in endothelial cells. *News Physiol Sci.* 17:166-169, 2002.
120. **Beck DW, Vinters HV, Hart MN and Cancilla PA.** Glial cells influence polarity of the blood brain barrier. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 43:219-224, 1984.
121. **DeBault LF. and Cancilla PA.** γ -Glutamyl transpeptidase in isolated brain endothelial cells: induction by glial cells in vitro. *Science* 207:653-655, 1980.
122. **Ceballos G. and Rubio R.** Coculture of astroglial and vascular endothelial cells as apposing layers enhances the transcellular transport of hypoxanthine. *J. Neurochem.* 64:991-999, 1995.
123. **Jin W, Lo TM, Loh HH, Thayer SA.** U73122 Inhibits phospholipase C-dependent calcium mobilization in neuronal cells. *Brain Res.* 642(1-2):237-243, 1994.
124. **Smallridge RC, Kiang JG, Gist ID, Fein HG, Galloway RJ.** U-73122, an aminosteroid phospholipase C antagonist, noncompetitively inhibits thyrotropin-releasing hormone effects in GH3 rat pituitary cells. *Endocrinology.* 131(4):1883-1888, 1992.

125. **Bagatell CJ, Knopp RH, Vale WW, River JE. and Bremner WJ.** Physiologic testosterone levels in normal men suppress high-density lipoproteins cholesterol levels. *Ann Intern Med.* 116:967-973, 1992.
126. **Schork A, Morinelli A, Masuda A.** Testosterone treatment enhances thromboxane A₂-mimetic, induced coronary artery vasoconstriction in guinea pigs. *Eur J Clin Invest.* 24(Suppl 1):50-52, 1994.
127. **Masuda A, Mathur R, Halushka P.** Testosterone increases thromboxane A₂ receptors in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res.* 69:638-643, 1991.
128. **Heinlein CA, Chang C.** The roles of androgen receptors and androgen-binding proteins in nongenomic androgen actions. *Mol. Endocrinol.* 16 (10):2181-2187, 2002.
129. **Duval D, Durant S, Homo-Delarche F.** Nongenomic effects of steroids: interactions of steroid molecules with membrane structures and functions. *Biochim Biophys Acta.* 737:409-442, 1983.
130. **Zhao Y, Mendelson CR, Simpson ER.** Characterization of the sequences of the human CYP (aromatase) gene that mediate regulation by glucocorticoids in adipose stromal cells and fetal hepatocytes. *Mol. Endocrinol.* 9:340-349, 1995.
131. **Simpson ER, Ackerman GE, Smith ME and Mendelson CR.** Oestrogen formation in stromal cells of adipose tissues of women: induction by glucocorticoids. *PNAS.* 78:5690-5694, 1981.
132. **Nawata H, Tanaka S, Takayanagi R, Sakai Y, et al.** Aromatase in bone cells: association with osteoporosis in postmenopausal women. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.* 53:165-174, 1995.
133. **Sasano H, Uzuki M, Sawai T, Nagura H, Matsunaga G, Kashimoto O, Harada N.** Aromatase in human bone tissue. *J. Bone Miner. Res.* 12(9):1416-1423, 1997.
134. **Sasano H, Tagashashi K, Satoh F, Nagura H, Harada N.** Aromatase in the human central nervous system. *Clin. Endocrinol. (Oxf)* 48(3):325-329, 1998.
135. **Harada N, Honda S-I. and Hatano O.** Aromatase inhibitors and enzyme stability. *Endocrine-Related Cancer.* 6:211-218, 1999.
136. **Santen J. Richard.** Recent progress in development of aromatase inhibitors. *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* 37:1029-1035, 1990.

137. **Muller M, Van Der Schouw TY, Thijssen HHJ and Grobbee ED.** Endogenous sex hormones and cardiovascular disease in men. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 88(11):5076-5086, 2003.
138. **Simpson ER.** Role of aromatase in sex steroid action. *J. Mol. Endocrinol.* 25:149-156, 2000.
139. **Mukherjee KT, Dinh H, Chaudhuri G and Nathan L.** Testosterone attenuates expression of vascular cell adhesion molecule-1 by conversion to estradiol by aromatase in endothelial cells: implication in atherosclerosis. *PNAS.* 99(6):4055-4060, 2002.
140. **Bayard F., Clamens S., Meggetto F., Blaes N., Delsol G. and Faye J.** Estrogen synthesis, estrogen metabolism, and functional estrogen receptors in rat arterial smooth muscle cells in culture. *Endocrinology.* 136:1523 -1529, 1995.
141. **Bayard F., Clamens S., Delsol G., Blaes N., Maret A. and Faye J.** Oestrogen synthesis, oestrogen metabolism and functional oestrogen receptors in bovine aortic endothelial cells. *Ciba Foundation Symposium* 191. P122-138, 1995.
142. **Harada N., Sasano H., Murakami H., Ohkuma T., Nagura H. and Takagi Y.** Localized expression of aromatase in human vascular tissues. *Circ. Res.* 84:1285-1291, 1999.
143. **Sasano H., Murakami H., Shizawa S., Satomi S., Nagura H. and Harada N.** Aromatase and sex steroid receptors in human vena cava. *Endocr. J.* 46:233-242, 1999.

Acute effects of testosterone on intracellular Ca^{2+} kinetics in rat coronary endothelial cells are exerted via aromatization to estrogens

Alfredo Sierra-Ramírez,^{1,2} Tomás Morato,³ Rafael Campos,¹ Iván Rubio,¹
Claudia Calzada,¹ Enrique Méndez,¹ and Guillermo Ceballos¹

¹Laboratorio Multidisciplinario, Sección de Posgrado, Escuela Superior de Medicina, Instituto Politécnico Nacional de México, Santo Tomas, 11340; ²Instituto Nacional de Perinatología, México City, 11000; and ³Departamento de Biología de la Reproducción, Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, México City, 09340 México

Submitted 13 August 2003; accepted in final form 30 December 2003

Sierra-Ramírez, Alfredo, Tomás Morato, Rafael Campos, Iván Rubio, Claudia Calzada, Enrique Méndez, and Guillermo Ceballos. Acute effects of testosterone on intracellular Ca^{2+} kinetics in rat coronary endothelial cells are exerted via aromatization to estrogens. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H63–H71, 2004. First published January 15, 2004; 10.1152/ajpheart.00784.2003.—The objective of this work was to evaluate the effects of testosterone (T) and 17β -estradiol (E_2) on coronary microvascular endothelial cells (CMECs) of male and female rats. To analyze the short-term effects of such sex steroid hormones on intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) kinetics, we used the chelating agent fura-2 acetoxyethyl ester. We also explored the possibility of testosterone aromatization by using selective inhibitors of the aromatase enzyme cytochrome *P*-450 aromatase ($P450_{\text{arom}}$), aminoglutethimide (4 μM), and 4-hydroxyandrostenedione (4 μM). The presence of $P450_{\text{arom}}$ was investigated by immunocytochemical and immunoblot assays using peptide-generated polyclonal antibodies raised against a 20-amino acid synthetic fragment of rat $P450_{\text{arom}}$ and by in situ hybridization to locate the aromatase mRNA in such cells. The activity of $P450_{\text{arom}}$ was demonstrated by the stereospecific loss of the tritium atom of $[1\beta\text{-}^3\text{H}]\text{androstenedione}$. Our results indicate that both T and E_2 induced a rapid increase in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. The fact that the effects of E_2 and T were carried out within milliseconds suggests that they were exerted at the membrane level and not through intracellular receptors. The possibility of involvement of PLC- β in these effects is suggested because U-73122 (a PLC inhibitor) blocked the effects of both T and E_2 . Immunocytochemical assays indicated the expression of androgenic and estrogenic receptors in these cells. The effects of T were blocked by the selective aromatase inhibitors. We also demonstrated membrane association of $P450_{\text{arom}}$, expression of the ovary-specific mRNA after in situ hybridization, and E_2 formation resulting from a significant activity of $P450_{\text{arom}}$ in CMECs. There were no gender-based differences.

phospholipase C- β ; cytochrome *P*-450 aromatase; stereospecific

MEN HAVE A GREATER INCIDENCE of cardiovascular disease than women during their reproductive years, and these gender differences diminish after menopause (30, 35). There are many experimental and epidemiological studies suggesting the cardiovascular protective effects of estrogen (7, 19, 37, 39, 55, 57). These beneficial effects are exerted by direct and indirect actions on blood vessels including a positive effect on plasma lipoproteins by a decrease in low-density lipoprotein cholesterol and an increase in high-density lipoprotein cholesterol (57), an antioxidant effect (19, 37), inhibition of fibrosis (19),

and a vasodilating effect that is achieved by increased production of nitric oxide (NO) and prostacyclin and by a direct inhibitory effect on vascular smooth muscle (19, 37).

On the other hand, the vascular effects of testosterone (T) are not well defined, and reported effects of androgens on the cardiovascular system are conflicting. Androgens are associated with an increased risk of cardiovascular disease in men (20, 30, 35). The literature reveals numerous deleterious cardiovascular associations of androgenic steroids (2, 36, 48). Other reports support beneficial effects of T on the cardiovascular system such as antianginal effects (33), significant antiatherosclerotic effects (1), induction of coronary artery dilation, and increased coronary blood flow (58).

Sex steroid hormones are involved in many physiological and pathophysiological processes. Steroid hormones have been described as modulators of nuclear transcription. However, other effects of these hormones have been recognized as nongenomic in origin because they occur in a very short time. These effects may modulate intracellular signaling pathways and perhaps influence genomic actions of steroids and in this way integrate genomic and nongenomic pathways (14).

In fact, the mechanism(s) behind sex steroid hormone effects at the cardiovascular level is controversial and may include several processes. T and 17β -estradiol (E_2) play an important role in Ca^{2+} flux in several cell types. Data from our laboratory obtained from male rat aorta endothelial cells in culture showed that E_2 induces an increase in intracellular Ca^{2+} concentration ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) and acts as an agonist of endothelial activity in a nongenomic manner (42), whereas T has no direct effects on $[\text{Ca}^{2+}]_i$ kinetics but blocks bradykinin-induced increases in $[\text{Ca}^{2+}]_i$. These results suggest direct steroid stimulation of an intracellular second-messenger pathway (41). However, aorta is a conduit artery, and due to endothelial heterogeneity, it is necessary to explore the steroidal effects on the endothelium of other arterial sources such as coronary vasculature.

Endothelium is a dynamic tissue that secretes and modifies vasoactive substances. These cell type responses influence and are influenced by the cells they are in relation with (14, 23), such that it is expected that endothelial cells would show functional specialization depending on the origin of the vascular bed. We hypothesized that there are differential sex steroid-induced effects in aortic endothelium and in endothelial cells of the microvascular coronary area. Therefore, the purpose of the

Address for reprint requests and other correspondence: G. Ceballos, Laboratorio Multidisciplinario, Escuela Superior de Medicina, Plan de San Luis y Diaz Mirón S/N, col. Santo Tomas, México, DF, CP 11340 (E-mail: manrey44@hotmail.com).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. The article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

present study was to analyze the steroid hormone-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ kinetics in cultured rat coronary microvascular endothelial cells (CMECs). We also analyzed the intracellular pathways involved in these effects, the possibility of T metabolism in the short-term effects of $[Ca^{2+}]_i$ kinetics, as well as immunoeexpression of the α -estrogenic (ER- α) and androgenic (AR) receptors in CMECs. Furthermore, to investigate the possible gender differences in response to sex steroids, this study included male and female rat CMECs.

Our results show that E_2 and T induce an increase in $[Ca^{2+}]_i$ and that the effects of T are exerted through its aromatization. Male and female rat CMECs also show mRNA and protein expression and activity of cytochrome P-450 aromatase ($P450_{arom}$), which shows that T metabolism could have an important role in cardiovascular response to this sex steroid.

MATERIALS AND METHODS

The protocols for this study were approved by institutional ethical and research committees.

Isolation and culture of male and female rat CMECs. Cultures were obtained according to a previously described method (40). Briefly, adult male and female Wistar rats (body wt, 250–300 g; handled separately) were anesthetized with pentobarbital sodium (50 mg/kg ip) and heparin (150 U/kg). Hearts were rapidly excised, washed in Hanks' balanced salt solution, and dissected to discard atria, right ventricle, and connective and valvular tissues. Left ventricles were then opened by the anterior wall, washed, and immersed in 70% ethanol for 40 s to devascularize epicardial mesothelial and endocardial endothelial cells. The remaining tissue was chopped and placed in types IA and IV collagenase solution (2 mg/ml) for 40 min at 37°C. Digested tissue was passed through a 70- μ m metallic mesh. Dissociated cells in the filtrate were centrifuged at 3,000 rpm for 3 min in a 30% Percoll gradient. Finally, cells were resuspended in DMEM supplemented with 20% FBS, endothelial growth factor (2 ml/100 ml), and an antibiotic/antimycotic solution (2 ml/100 ml; GIBCO-BRL). Cells were then plated in fibronectin-covered flasks and incubated in a humidified chamber at 37°C in a 5% CO_2 atmosphere.

Characterization. Criteria for characterization of this cell type included identification of a typical "cobblestone" cell morphology and expression of factor VIII-related antigen (von Willebrand) using immunofluorescence cell staining (42). More than 99% of cells expressed the von Willebrand factor.

Experiments for $[Ca^{2+}]_i$ measurement. CMECs were trypsinized and resuspended in culture medium [DMEM supplemented with 2% FBS and antibiotic/antimycotic solution (2 ml/100 ml; GIBCO-BRL)] to a final concentration of 2.4×10^5 cells/ml. A droplet of $\sim 25 \mu$ l was placed in the center of coverslip dishes (no. 1, glued to a perforated plastic petri dish). After the cells were attached to the slide, additional medium was added to the well to a final volume of 2 ml and cells were incubated. The cell cycle was synchronized by serum deprivation.

CMECs were loaded with 3 μ M fura-2 acetoxymethyl ester (AM) for 2 h in HEPES-Krebs-Henseleit solution (pH 7.4 at 37°C) composed of (in mM) 117.8 NaCl, 6 KCl, 1.75 $CaCl_2$, 1.2 NaH_2PO_4 , 1.2 $MgSO_4$, 5 glucose, 5 sodium pyruvate, and 20 HEPES at room temperature in the dark. The cells were washed and postincubated in the same buffer for 1 h. The experimental dishes were placed on an inverted microscope (dual-wavelength fluorescence-imaging system InCyt Im2; Intracellular Imaging; Cincinnati, OH) to measure the fluorescence emitted by the fura-2/ Ca^{2+} complex when stimulated by UV light. The fura-2 fluorescence response to the $[Ca^{2+}]_i$ was calibrated from the ratio of 340:380-nm-wavelength fluorescence values after subtraction of background fluorescence using Ca^{2+} standards (Kit II; Molecular Probes; Eugene, OR) in the absence of cells and as described by Grynkiewicz et al. (25). The dissociation constant for the

fura-2/ Ca^{2+} complex was taken as 224 nM. The values for maximal and minimal rates (R_{max} and R_{min} , respectively) were calculated from measurements using 25 μ M digitonin and 4 mM EGTA and raising the pH to 8.3.

Effects of E_2 on $[Ca^{2+}]_i$. A series of experiments were carried out to characterize the short-term effects of E_2 (0.01 nM to 1 μ M) on $[Ca^{2+}]_i$ in both male and female rat CMECs in culture.

Effects of T on $[Ca^{2+}]_i$. Dose-response curves to T (0.01 nM to 1 μ M) were performed to evaluate the effects of T on $[Ca^{2+}]_i$ in both male and female rat CMECs in culture.

Immunoeexpression of androgenic and α -estrogenic receptors. To determine the expression of T (AR) and E_2 (ER- α) receptors in male and female rat CMECs, we used an immunocytochemical process and confocal microscopy as follows: after 48–72 h of serum deprivation, cells were washed with ice-cold 0.1 M PBS and fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min. The cells were washed and incubated for 30 min with a blocking solution (0.5% bovine albumin free of IgG). The cells were then incubated for 24 h (at 4°C) with ER- α or AR antibodies (1:100 dilution, developed in rabbit; Santa Cruz Biotechnology). After this period, cells were washed and postincubated for 1 h at room temperature in a dark chamber with fluorescein-conjugated or rhodamine secondary antibodies (goat anti-rabbit Ig, 1:250 dilution). To evaluate the coexpression of ER- α and ARs after incubation with the ER- α antibodies (including a FITC-labeled secondary antibody), we performed a second incubation, this time with the anti-AR antibodies and using a rhodamine-labeled secondary antibody. Finally, the immunoeexpression was evaluated by confocal microscopy (confocal TCS SP2; Leica).

Effects of U-73122 on T and E_2 responses. In another set of experiments to determine the participation of intracellular Ca^{2+} stores in T- and E_2 -induced effects, CMECs were incubated with the PLC inhibitor U-73122 (1 μ M).

Effects of aromatase inhibitors on T response. We explored the participation of the aromatase enzyme $P450_{arom}$ in the T-induced effects by preincubating the cells for 10 min with the selective inhibitors aminoglutethimide (4 μ M) and 4-hydroxyandrostenedione (4 μ M).

Immunocytochemical assay of aromatase. The expression of $P450_{arom}$ in male and female rat CMECs was evaluated by the use of immunocytochemical assays and confocal microscopy. A 20-amino acid peptide corresponding to residues 379–398 of the rat $P450_{arom}$ protein was synthesized. The peptide was coupled to the hemocyanin protein carrier (GIBCO-BRL). Antibody preparation was performed by immunizing adult male New Zealand White rabbits using a standard protocol as described by Sanghera et al. (44).

The obtained serum was treated as follows: IgG fractions were removed using affinity chromatography, peak fractions were dialyzed, and the immunoreactive titer was determined by ELISA. The $F(ab')_2$ fragment was obtained by enzymatic digestion of IgG (immobilized pepsin; Pierce). Polyclonal antibodies were stored at $-20^\circ C$.

CMECs were plated on coverslips, fixed in 4% paraformaldehyde for 30 min, washed, incubated for 30 min with blocking solution (0.5% bovine albumin free of IgG), and then incubated for 24 h at 4°C with the $F(ab')_2$ fragment of peptide-generated polyclonal antibodies to rat $P450_{arom}$ (1:100 dilution). Cells were washed and postincubated for 1 h at room temperature in a dark chamber with FITC secondary antibody (goat anti-rabbit Ig, 1:250 dilution; Santa Cruz Biotechnology). Finally, $P450_{arom}$ expression was evaluated by fluorescence and confocal microscopy (confocal TCS SP2; Leica).

Preparation of rat CMEC homogenates that contain aromatase. Homogenates of male and female rat CMECs were prepared by mechanical separation from plates with a cell scraper and low-speed centrifugation at room temperature for 5 min. The pellet was washed with PBS, added to an ice-cold radioimmunoprecipitation assay buffer (that contained PBS, 1% Nonidet P-40, 0.5% sodium deoxycholate,

and 0.1% SDS) with freshly added protease inhibitors (Sigma), incubated on ice for 30 min at 4°C, disrupted, and homogenized further by sonication and Polytron homogenization (Daigger). The protein content of the homogenates was measured using a standard Bradford assay (6, 50). Homogenates were aliquoted and stored at -70°C until use for $P450_{arom}$ activity assay.

Immunoblotting. Lysates of male and female rat CMECs were obtained as previously described. The homogenate was transferred to microcentrifuge tubes and centrifuged at 10,000 g for 10 min at 4°C. The supernatant fluid (particle size, <0.4 μm) was centrifuged at 100,000 g for 30 min at 4°C to isolate plasma membrane vesicles. Both the pellet and supernatant from the 10,000 and 100,000 g centrifugations were tested with $P450_{arom}$ immunoblotting. Protein content was measured using a standard Bradford assay (6, 50). The tissue homogenates (120 μg) mixed with Laemmli sample buffer (that contained 4% SDS, 20% glycerol, 10% 2-mercaptoethanol, 0.004% bromophenol blue, and 0.125 M Tris·HCl, pH 6.8; Bio-Rad) were boiled for 5 min. Samples were loaded into wells (30 μg/lane), and proteins were resolved by electrophoresis via SDS-PAGE in a 10% gel and then transferred to 0.45-μm nitrocellulose membranes (Bio-Rad). The nonspecific binding was blocked by incubating the membranes in Blotto (that contained PBS, 5% milk, and 0.05% Tween 20) for 1 h. Blocked membranes were incubated in primary antibody [F(ab')₂ fragment of peptide-generated polyclonal antibodies to $P450_{arom}$] diluted in Blotto (1:250 dilution) for 1 h, washed, and incubated for 2 h with F(ab')₂-horseradish peroxidase (HRP)-conjugated secondary antibody (Sigma) diluted in Blotto (1:500 dilution), washed three times with PBS-0.05% Tween 20 and once with PBS, and finally stained by the use of a diaminobenzidine substrate kit (Vector Laboratories). We used purified goat polyclonal antibody raised against the ribosomal protein S6 (molecular mass, 27.5 kDa) as control.

In situ hybridization. Aromatase antisense fluorescein-conjugated oligonucleotide probes were commercially obtained (Accessolab) from three major species of aromatase cDNA sequences on the 5' region corresponding to exon I: placenta (5'-TTCTTCACCTTC CTGTTT-GCCT-3'), ovary (5'-TTACAAGTCAAAAACAAGGAAGCC-3'), and prostate/testis (5'-CAAAGG-GACAGGAAAATTACAGAA-3'). These were used in *in situ* hybridization analyses of $P450_{arom}$ mRNA in male and female rat CMECs as previously described (8, 27). Briefly, CMECs were plated on coverslips and fixed in 4% paraformaldehyde, washed, treated with 0.01% Triton X-100 for 90 s, washed, incubated with 100 μg/ml proteinase K for 10 min at 37°C, and then washed and incubated for 5 min with 2 mg/ml glycine. Later, slides were preincubated with hybridization buffer that contained 5 ml of deionized formamide, 2 ml of 20× SSC, 0.2 ml of 1× Denhart's solution, 0.5 ml of salmon sperm DNA (10 mg/ml), 0.25 ml of yeast tRNA (10 mg/ml), and 2 ml of dextran sulfate at 70°C for 20 min. Probes were applied in hybridization buffer (10 μl/200 μl of buffer) and incubated in a humidified chamber at 37°C for 8–12 h. After the hybridization, slides were washed with 0.1% of 1× SSC-SDS at room temperature and were visualized using fluorescence microscopy. Sense oligonucleotide probes and RNase I treatment (0.5 mg/ml) were used as negative controls, and DNase I treatment (0.5 mg/ml) was used as the positive control.

Preparation of placenta microsomes that contain aromatase. Human placenta, obtained immediately after delivery, was processed at 4°C according to a published method (43). Briefly, to obtain partially purified $P450_{arom}$, tissue was washed with cold 0.9% saline solution, dissected free of fetal membranes and large blood vessels, and weighed. The remaining tissue was homogenized in a blender for 1 min in buffer that contained (in M) 0.25 sucrose, 0.05 phosphate, and 0.04 nicotinamide, pH 7.0. One volume of buffer to three parts of tissue by weight was found to provide preparations of optimal activity. The homogenates were centrifuged at 800 g for 15 min at 4°C, and the supernatant was recovered and centrifuged at 10,000 g for 15 min at 4°C. Again the supernatant was recovered and centrifuged at 80,000

g for 1 h at 4°C to obtain microsomal pellets. The pellets were resuspended in 12 ml of 0.05 M phosphate buffer, pH 7.0, and the protein contents of the homogenates were measured using Coomassie brilliant blue G250 (Sigma) and human serum albumin as a standard (6, 50). Homogenates were aliquoted and stored at -70°C until use as a positive control for $P450_{arom}$ activity.

Analysis of aromatase activity. $P450_{arom}$ activity was quantified by the stereospecific loss of the tritium atom of the [1β -³H]androstenedione substrate in the aromatization reaction. The conversion rate was determined by the isolation and quantification of tritiated water (32). The standard incubation mixture was prepared with the following: 1) a $P450_{arom}$ source (2.5 μg of placenta microsomal fraction or 600 μg of CMEC homogenate); 2) cofactors: 6.25 mM MgCl₂, 7.6 mM glucose-6-phosphate, 1.4 U of glucose-6-phosphate dehydrogenase, and 200 μM β-NADPH (Sigma); and 3) a saturating concentration of [1β -³H]androstenedione (New England Nuclear; Boston, MA): 1 pM in a total volume of 1,100 μl of 0.05 M phosphate buffer, pH 7.0. The mixture was incubated under agitation at 37°C for 60 min. The reaction was stopped by the addition of 300 μl of 2.5% activated charcoal and 0.25% Dextran T-70 (Sigma) and was vortexed for 40 s. The mixture was centrifuged at 800 g for 15 min and the residual substrate ([1β -³H]androstenedione) was removed. The ³H₂O formed was quantified by scintillation counting. Control experiments were made excluding the $P450_{arom}$ source (placenta microsomal fraction or CMEC homogenates) or by substituting it with 100 μM bovine albumin.

Statistical analysis. Data on the changes in [Ca^{2+}]_i (maximal concentration reached was indicated by a spikelike component of the curve) are expressed as means ± SE and were analyzed by one-way ANOVA. The individual contrast between treatments was made by the Bonferroni multiple-comparison test. Each experiment was performed in ~25 cells that were randomly chosen; the cell numbers (*n*) were limited only by the view field on the microscope objective, but they were representative of the total population (6 × 10³ cells). $P450_{arom}$ activity assays were repeated at least four times. Results are expressed as means ± SE; data are compared vs. control experiments. Differences were considered significant at *P* < 0.05.

RESULTS

Effects of E_2 on [Ca^{2+}]_i. It has been reported that agonists of endothelial activity (such as bradykinin) induce an increase in [Ca^{2+}]_i, and the Ca^{2+} kinetics has two components: a spikelike increase in [Ca^{2+}]_i is followed by a plateau-like second phase that slowly returns to the basal state (9, 42).

Our results show that the addition of E_2 to CMECs induces an increase in [Ca^{2+}]_i. E_2 -induced effects are similar to those induced by agonists of endothelial activity. However, the second phase did not return to the basal state, at least not during the experimental time.

Figure 1 is a representative tracing of the short-term increase in [Ca^{2+}]_i induced by 1 nM E_2 . The dose-response curves (analysis of maximal increase of the spikelike component) for E_2 (0.01 nM to 1 μM; Fig. 2) show a bell-shaped biphasic pattern in CMECs from male and female rats.

Effects of T on [Ca^{2+}]_i. The addition of T to the cultures induced a short latency (in milliseconds) increase in [Ca^{2+}]_i. Figure 1 is a representative tracing of the increase in [Ca^{2+}]_i induced by 1 nM T. There were no differences in the onset of effects after addition of E_2 or T to CMECs (Fig. 1, inset).

Addition of T (0.01 nM to 1 μM) to male and female rat CMECs induced a dose-dependent effect (see Fig. 2). There were no statistical differences between male and female cell responses.

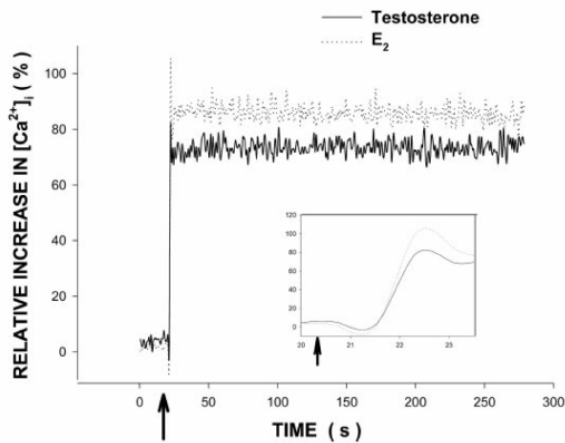


Fig. 1. Representative tracing of the increase in intracellular Ca^{2+} concentration ($[Ca^{2+}]_i$) induced by 1 nM 17 β -estradiol (E_2) and testosterone (T) on coronary microvascular endothelial cells (CMECs) loaded with fura-2. Arrow indicates time of T or E_2 addition. After addition of T or E_2 to CMECs, there were no differences in the onset of effects (*inset*).

Immunocytochemistry of AR and ER- α . We found intense expression of ER- α (Fig. 3, green areas) in male and female rat CMECs. Fluorescence seemed to be associated with the cell periphery and may include the plasmalemma as well as the cytoplasm. AR immunoreactivity (Fig. 3, red areas) was also observed in male and female cells. However, fluorescence seemed to be associated only with the cytoplasm level. The sites where the receptors were coexpressed showed as yellow (Fig. 3). No staining was observed when male and female rat CMECs were processed without the primary antibody (data not shown).

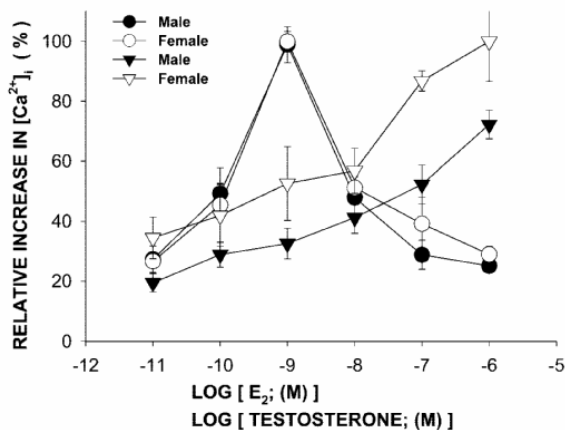


Fig. 2. Effects of E_2 and T on $[Ca^{2+}]_i$ kinetics. Biphasic, bell-shaped, concentration-dependent behavior of the spikelike increase in $[Ca^{2+}]_i$ induced by the application of E_2 (0.01 nM to 1 μ M) on male (\bullet) and female (\circ) rat CMECs is shown. T (0.01 nM to 1 μ M) induced a concentration-dependent increase in $[Ca^{2+}]_i$ in both male (\blacktriangle) and female (\triangle) rat CMECs. All data represent the spikelike component of increase in $[Ca^{2+}]_i$. Values are means \pm SE ($n = 25$ for each concentration and treatment assayed). There were no significant differences between male and female responses to T and E_2 .

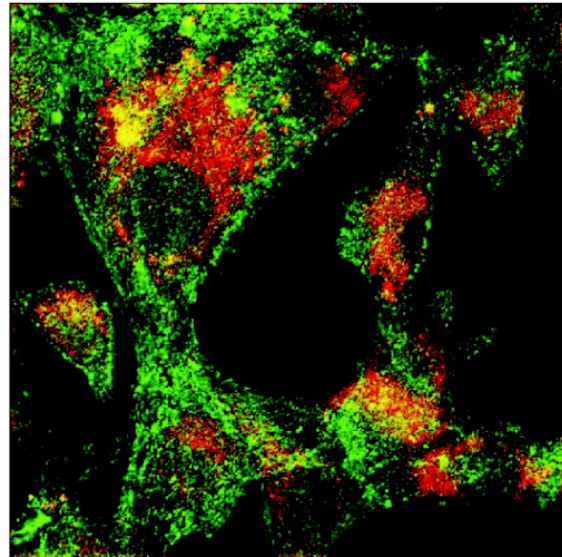


Fig. 3. Confocal imaging (Leica microscope) of androgenic receptors (ARs) and estrogenic receptors- α (ER- α) expression in male and female rat CMECs. Intense immunocytochemical reactivity of ER- α (green, FITC) was located at cell periphery and cytoplasm. AR immunoreactivity (red, rhodamine) was also observed but only at the cytoplasm level. The coexpression of ER- α and ARs (yellow) was observed only at the cytoplasm compartment. There were no differences between male and female CMECs.

Effects of U-73122 on E_2 - and T-induced increases in $[Ca^{2+}]_i$. Preincubation of male and female rat CMECs for 10 min with 1 μ M U-73122 (a PLC inhibitor) induced complete blockade of T- or E_2 -induced increases in $[Ca^{2+}]_i$. These effects were not the result of depletion of intracellular Ca^{2+} stores, because the addition of 20 nM caffeine 4 min after the steroid stimulation induced a short-term increase in $[Ca^{2+}]_i$ (Fig. 4). There were no differences between male and female cell responses. Alone, U-73122 did not modify the $[Ca^{2+}]_i$.

Effects of aromatase-selective inhibitors aminoglutethimide and 4-hydroxyandrostenedione on $[Ca^{2+}]_i$ response to T. Pre-treatment (10 min) of male or female cells with either 4 μ M aminoglutethimide or 4 μ M 4-hydroxyandrostenedione (Fig. 5) resulted in blockade of the T-induced increase in $[Ca^{2+}]_i$. These effects were not unspecific, because the addition of 1 nM E_2 induced an increase in $[Ca^{2+}]_i$. There were also no differences between male and female cell responses. Aminoglutethimide and 4-hydroxyandrostenedione produced no effects in $[Ca^{2+}]_i$.

Immunocytochemistry of aromatase. Intense P450_{arom} immunoreactivity was observed in male and female rat CMECs. Fluorescence was evident in the cytoplasm and cell periphery (Fig. 6). There were no gender-based differences. The P450_{arom} immunoreactivity was expressed in 96–98% of rat CMECs.

Immunoblotting. We found expression of P450_{arom} in male and female rat CMECs. Immunoreactivity was made evident in a single protein band with an apparent molecular mass of \sim 50 kDa in homogenates of male and female rat CMECs. It was

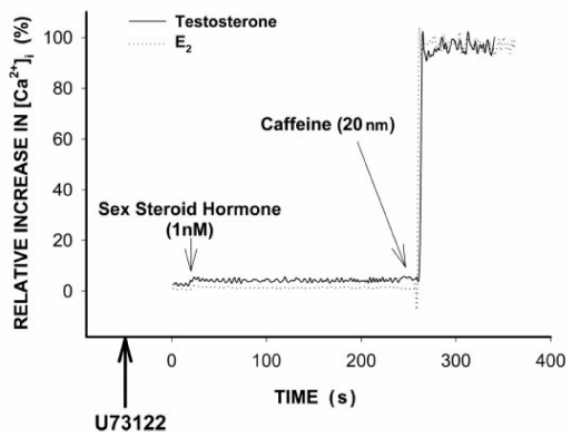


Fig. 4. Representative tracing of the effects of T (1 nM) and E₂ (1 nM) on the [Ca²⁺]_i increase in the presence of the specific PLC-β inhibitor U-73122 (1 μM) in male and female rat CMECs. Abolition of the T- and E₂-induced effects was not due to depletion of intracellular Ca²⁺ stores elicited by U-73122, because the addition of caffeine (20 nM) to the steroid stimulation after 4 min induced a short-term [Ca²⁺]_i increase.

observed in the supernatant fluid from 10,000 g (S1) and 100,000 g (S2) centrifugations as well as in the pellet of 10,000 g (P1) and 100,000 g (P2) centrifugations. The ribosomal protein S6 was used as a control (single band, ~30 kDa; Fig. 7). There were no gender-based differences. No bands were detected when the primary antibody was omitted. We also detected a similar single-protein band in human placenta microsomes (data not shown).

In situ hybridization. Tissue-specific expression of aromatase by utilization of specific exon I probes in male and female rat CMECs was investigated at the mRNA level

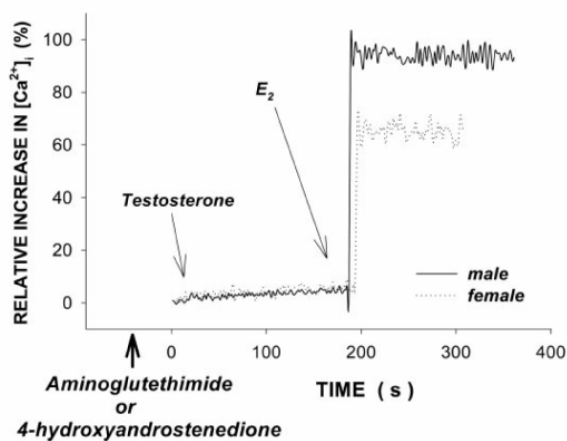


Fig. 5. Representative tracing of the effects of T (1 nM) on [Ca²⁺]_i increase in the presence of the specific aromatase inhibitors aminoglutethimide (4 μM) or 4-hydroxyandrostenedione (4 μM) in male and female rat CMECs. Abolition of the T-induced effect was not due to depletion of intracellular Ca²⁺ stores elicited by the nonsteroidal compound aminoglutethimide or the steroidal compound 4-hydroxyandrostenedione, because E₂ (1 nM) application induced an increase in [Ca²⁺]_i.

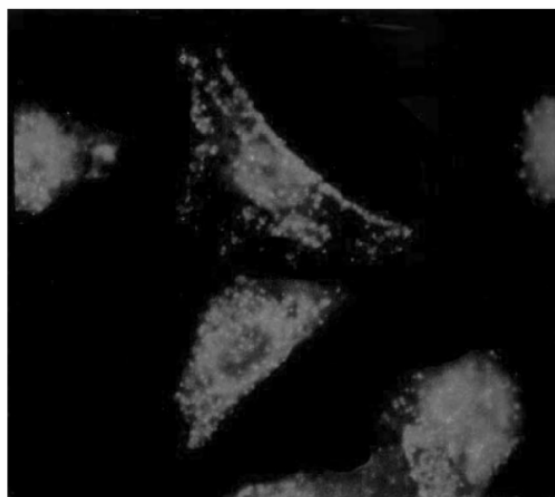


Fig. 6. Confocal imaging of the cytochrome *P*-450 aromatase (*P450_{arom}*) immunoreactivity explored with the F(ab')₂ fragment of peptide-generated polyclonal antibodies to *P450_{arom}* in male and female rat CMECs. Intense immunocytochemical reactivity of *P450_{arom}* (gray) was located at the periphery and cytoplasm of cells. No staining was observed when the cells were processed without the primary F(ab')₂ fragment antibody (data not shown).

through *in situ* hybridization. We used antisense fluorescein-conjugated oligonucleotide probes from three major species of aromatase cDNA sequences of the 5' region corresponding to exon I: placenta, ovary, and prostate/testis. As shown in Fig. 8, a fluorescent mRNA hybridization signal by an ovary-specific probe was found mainly at the cytoplasm level. No reactivity was detected by the use of placenta and prostate/testis probes. There were no gender-based differences. Sense fluorescein-

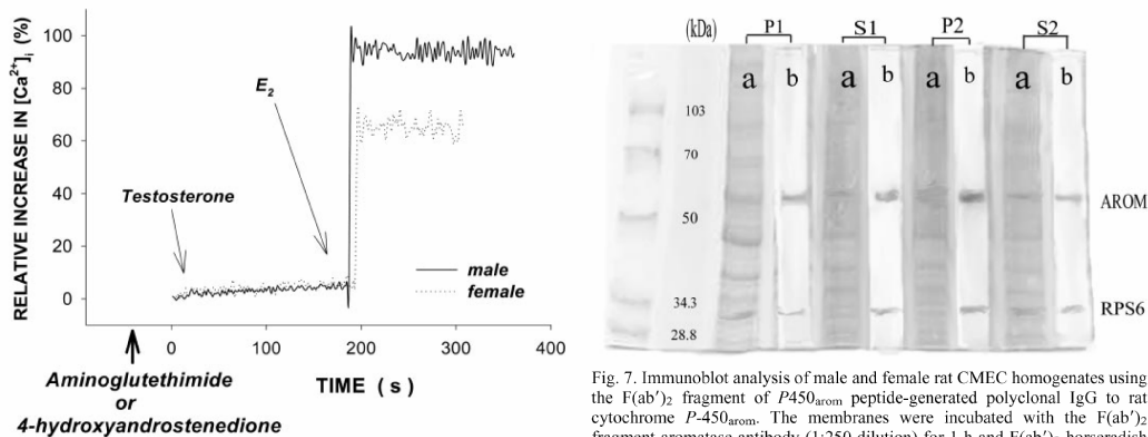


Fig. 7. Immunoblot analysis of male and female rat CMEC homogenates using the F(ab')₂ fragment of *P450_{arom}* peptide-generated polyclonal IgG to rat cytochrome *P*-450_{arom}. The membranes were incubated with the F(ab')₂ fragment aromatase antibody (1:250 dilution) for 1 h and F(ab')₂-horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (1:500 dilution) for 2 h. Finally, bands were stained using a diaminobenzidine substrate kit. Reactivity was made evident in a single protein band with an apparent molecular mass of ~50 kDa in homogenates of male and female rat CMECs. It was observed in supernatant fluids S1 (10,000 g) and S2 (100,000 g) as well as pellets P1 (10,000 g) and P2 (100,000 g) after centrifugation as shown by electrophoresis (a) and immunoblot (b). Ribosomal protein S6 (RPS6) was used as a control.

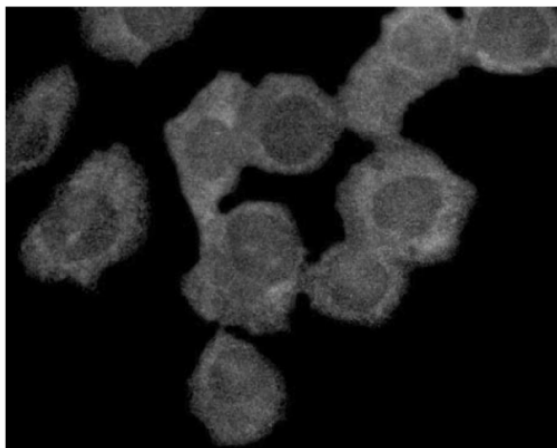


Fig. 8. In situ hybridization of aromatase mRNA in male and female rat CMECs. Tissue-specific expression of $P450_{arom}$ in rat CMECs was evidenced by the utilization of an antisense fluorescein-conjugated oligonucleotide probe from ovary of aromatase cDNA sequences of the 5' region corresponding to exon 1. Fluorescence mRNA hybridization signal by ovary-specific probe was found mainly at the cytoplasm level in male as well as female rat CMECs. There were no gender-based differences. No reactivity was detected by the use of placenta and prostate/testis probes. Sense fluorescein-conjugated oligonucleotide probes were used as negative controls.

conjugated oligonucleotide probes were used as negative controls.

Assay for 3H_2O release. Aromatization of androgens to form phenolic estrogens was measured by the isolation and quantification of tritiated water, which originated from stereospecific loss of the tritium atom from the substrate. Incubation of 1 pM [1β - 3H]androstenedione with cofactors (NADPH, glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and $MgCl_2$) and different concentrations of placenta microsomes (0.05–5 μg) resulted in the formation of tritiated water in a concentration-dependent manner (Fig. 9). The incubation of 1 pM [1β - 3H]androstenedione with cofactors and homogenates of male and female rat CMECs at different concentrations (130–1,300 μg) also resulted in the formation of tritiated water in a concentration-dependent manner (Fig. 9). As shown in Fig. 10, male and female rat CMEC homogenates significantly induced the formation of tritiated water. Insignificant activity was detected in background control assays that lacked a $P450_{arom}$ source or substituted it with albumin (100 μM).

DISCUSSION

Because the functions of the distinct segments of the vascular tree (arteries, arterioles, capillaries, venules, and veins) are different, it might be expected that endothelial cells would also show functional adaptations and even some specializations according to their origin. The environments surrounding endothelial cells appear to be important for their morphology, molecular expression, and function (21, 31).

Endothelium not only influences the function of other cell types but also is influenced by its neighboring cells; endothelium adapts to environmental signals. Therefore, cell-to-cell communication may play an important role in physiological responses. For example, astrocytes have a direct influence on

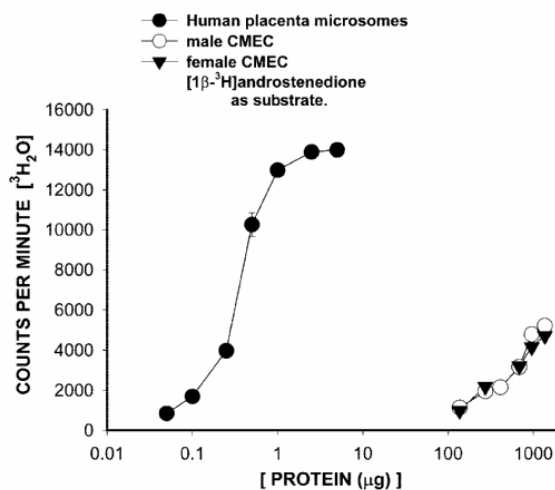


Fig. 9. Concentration-dependent effects of placenta microsomes and male and female rat CMECs on aromatization of androgens to phenolic estrogens measured by the isolation and quantification of tritiated water. Incubation of the substrate [1β - 3H]androstenedione (1 pM) and cofactors (NADPH, glucose-6-phosphate, glucose-6-phosphate dehydrogenase, and $MgCl_2$) with different concentrations of placenta microsomes (0.05–5 μg) or rat CMECs (130–1,300 μg) resulted in the formation of tritiated water in a concentration-dependent manner. There were no gender-based differences in male and female rat CMEC effects.

brain homeostasis of various molecules and on the endothelial enzymatic and transport profiles of the brain at the blood-brain barrier (5, 16). However, the effects of astrocytes are not restricted to the endothelial cells of the brain: they can also be exerted on endothelial cells that originate elsewhere (10). Thus the cell origin could allow a single molecule to have different effects within the same cell type. In this work, we proposed

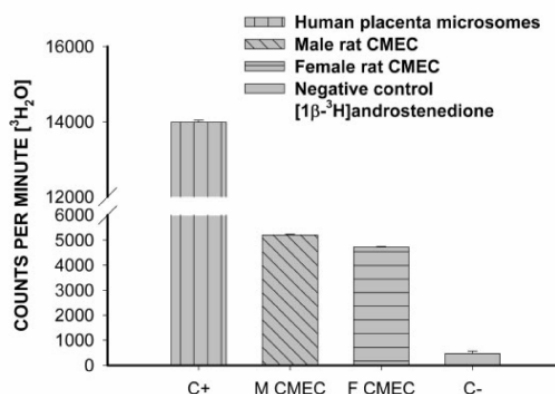


Fig. 10. Formation of tritiated water (indirect proof of aromatization) by male and female rat CMECs. Incubation of [1β - 3H]androstenedione (1 pM) and cofactors with homogenates of male or female rat CMECs (1,300 μg) resulted in the significant production of tritiated water (M CMEC, F CMEC). There were no gender-based differences in male and female rat CMEC effects. Insignificant activity was detected in background control assays without the $P450_{arom}$ enzyme source or with the enzyme substituted with bovine albumin (100 μM ; C-). In positive control assays with human placenta microsomes (2.5 μg ; C+), an important enzymatic activity was detected.

that the endothelium of conduit vessels may respond differently to sex steroids than the endothelium of resistant vessels. We previously reported that E_2 induced increases in $[Ca^{2+}]_i$ through a short-term and nongenomic mechanism, and showed a biphasic curve pattern to suggest membrane-associated processes. E_2 induced no effects on Ca^{2+} kinetics, whereas ICI-182780, a pure antiestrogen, blocked the E_2 -induced increase in $[Ca^{2+}]_i$ (42). Our present data on male and female rat CMECs are similar to those found in rat aortic endothelium in culture, but interestingly, there were no differences in gender responses (see Fig. 2). Thus E_2 seems to affect endothelium of both conduit and resistant vessels perhaps through the same pathway.

Effects of T on male and female rat CMECs are different from those found in rat aorta (41) because T increased $[Ca^{2+}]_i$ (see Fig. 1) in concentration-dependent and gender-independent manners by acting directly as an agonist of endothelial activity (see Fig. 2). These effects were obtained with physiological and pharmacological T concentrations (0.01 nM to 1 μ M) and were of rapid onset (milliseconds) and nongenomic origin. The initial spikelike phenomena induced by T and E_2 in both male and female rat CMECs was totally blocked by U-73122, which is an inhibitor of PLC-dependent processes (9, 29, 42; see Fig. 4); this suggests membrane-associated mechanisms.

The second component of $[Ca^{2+}]_i$ kinetics, a sustained plateau induced by T and E_2 , did not return to basal levels during the experimental time (5 min; see Fig. 1). We do not have a clear explanation for this phenomenon. However, this phase is dependent on Ca^{2+} influx, and the rate of Ca^{2+} entry through ion pathways can be modulated by membrane properties. It is possible that steroid hormones may disturb the plasmalemma. Likewise, the mechanisms of action associated with Ca^{2+} modulation by E_2 and T are not fully understood, but modulation of intracellular Ca^{2+} stores as well as regulation of plasmalemmal Ca^{2+} channels may be considered (9, 41, 42).

To analyze the possible membrane association and/or coexpression of ER- α and AR in male and female rat CMECs, we performed immunocytochemical assays and confocal microscopy using a double-stain method. The expression of ER- α was made evident by the strong (green) fluorescence located in the cell periphery as well as the cytoplasm in both male and female rat CMECs (see Fig. 3). Intense AR expression was also observed in CMECs, but immunoreactivity was located only at the cytoplasm level with no expression at the periphery (see Fig. 3), which suggests no association to the membrane. The coexpression of both receptors resulted in a yellow stain, and this was observed only at the cytoplasm. It is pertinent to emphasize that we used the same conditions and incubation times for both primary and fluorochrome secondary antibodies to avoid differences in IgG diffusion through the cells.

Several studies have reported rapid membrane-initiated estrogen effects linked to ER- α and the membrane (7, 11, 12, 22, 39). Whereas the vascular effects of T are not well defined, the literature refers to deleterious cardiovascular associations with androgenic steroid use (2, 30, 36, 48). Meanwhile, some reports support beneficial actions of T on the vascular system including antianginal (33) and antiatherosclerotic (1) effects and coronary artery dilatation (58). Moreover, T causes vasorelaxation in a rapid and nongenomic manner mediated in

part by nitric oxide (13, 15) or vascular smooth muscle K^+ channel activation (17, 18, 56, 59). Indeed, T seems to be a modulator of several metabolic processes that is exerted mainly in a regulatory role on $[Ca^{2+}]_i$ (34, 41).

Presently there is no evidence that demonstrates a direct association of ARs with the membrane. We were unable to locate ARs at the membrane level. However, another possibility to explain the effects of T on Ca^{2+} kinetics in CMECs may be related to its metabolism. T is a prohormone converted in situ in active estrogens by steroidogenic tissues.

E_2 is synthesized through $P450_{arom}$ activity in a variety of extragonadal sites and acts locally to stimulate adjacent cells or even the cells in which it is produced (51, 53). These sources of $P450_{arom}$ activity are present throughout the body and may be responsible for local tissue concentrations of estrogens that may mediate important physiological events (47, 52, 60).

On the other hand, local estrogen biosynthesis has been reported in vascular tissues (3, 4, 27, 38, 46). In the present work, using highly selective aromatase inhibitors, we evaluated whether T induced an increase in $[Ca^{2+}]_i$ in male and female rat CMECs through its conversion to estrogen. We investigated two types of inhibitors: type 1, 4-hydroxyandrostenedione (4 μ M; see Fig. 5), which is a steroidal compound that binds to the androgen substrate-binding site of the enzyme and may be a purely competitive inhibitor or irreversible "suicide substrate," and type 2, aminoglutethimide (4 μ M; see Fig. 5), which is a nonsteroidal compound that interferes with the cytochrome $P-450$ prosthetic group on the enzyme and binds to the heme group of the aromatase enzyme by coordination through a basic nitrogen atom (26, 45). The Ca^{2+} kinetics of T were totally blocked by both of these inhibitors. This effect was not the result of intracellular Ca^{2+} store depletion, because the addition of 1 nM E_2 induced an increase in $[Ca^{2+}]_i$. These results show that T in male or female rat CMECs, through its conversion to estrogens, acts by mobilizing Ca^{2+} from the endoplasmic reticulum.

Given that much of the circulating E_2 is bound to sex hormone-binding globulin, it is not likely to have a major impact on transactivation of the estrogen receptor, unlike estrogen produced locally as a consequence of circulating-T metabolism. This supports the idea that local production of E_2 by aromatization of T in estrogen-dependent tissues occurs within the same site to affect its functions. The amount of estrogen synthesized by these extragonadal sites may be small, but the local tissue concentrations achieved are probably quite high and likely exert significant biological influence locally and play important physiological or pathophysiological roles in paracrine, autocrine, and indeed intracrine fashions (24, 38, 51, 52).

In this work, to examine the presence of $P450_{arom}$ in CMECs, we developed polyclonal antibodies against a peptide of 20 amino acids that corresponds to residues 379–398 of rat $P-450$ protein as deduced from the nucleic acid sequence of rat $P450_{arom}$ cDNA. This segment was chosen because the amino acid sequence has identical homology to the human, rat, and chicken $P450_{arom}$ proteins but exhibits low homology with the corresponding region of other $P-450$ proteins (44).

More than 99% of male and female rat CMECs show immunoreactivity, which supplies evidence of the expression of $P450_{arom}$ in these endothelial cell types (see Fig. 6). Results showed immunopositivity located at the cytoplasm level as

well as the periphery of the cells. This suggests a possible membrane association.

Immunoblotting results revealed the expression of $P450_{arom}$ in rat CMECs (see Fig. 7). A single immunoreactive band of ~50 kDa was detected in male and female rat CMEC homogenates in the supernatant of the 10,000 g S1 centrifugation, which contained subcellular particles <0.4 μ m, in the pellet of the 10,000 g P1 centrifugation, which contains subcellular particles >0.4 μ m, and in the S2 supernatant and the P2 pellet of the 100,000 g centrifugation. The estimated size of the single band from the homogenate of rat CMECs is similar to the predicted size of the $P450_{arom}$ protein as deduced from the respective cDNAs (8, 27, 49) and previous size determinations (32, 44, 54). Aromatase (estrogen synthetase) is a microsomal member of the cytochrome P-450 superfamily (49, 52, 54). We found immunoreactivity in the pellet of the 100,000 g centrifugation (plasma membrane vesicles), and this fact strongly suggests membrane association of aromatase.

In the present study, we assayed three different oligonucleotide probes that correspond to part of exon I of different tissue sources (placenta, ovary, and prostate/testis) to screen aromatase mRNA in rat CMECs by in situ hybridization assays (28). Aromatase mRNA is expressed by alternative splicing using tissue-specific exon I. Sense oligonucleotide probes were used as negative controls. The application of an antisense oligonucleotide probe for ovary resulted in identification of intense reactivity located mainly at the cytoplasm level (see Fig. 8). Hybridization with oligonucleotide probes for placenta and prostate/testis were negative. These data suggest that male and female rat CMECs express ovary-specific mRNA.

We also demonstrated that $P450_{arom}$ is catalytically active in rat CMECs and showed indirectly that both male and female rat CMECs produce significant amounts of estrogens. The incubation of the substrate [1β - 3H]androstenedione and cofactors with different concentrations of rat CMECs resulted in the formation of tritiated water in a concentration-dependent manner (see Fig. 9). We could not find gender-linked differences (see Figs. 9 and 10). We used human placenta microsomes in positive control experiments, which showed an active and reproducible aromatization. In background control experiments in which the source of $P450_{arom}$ (placenta microsomes or rat CMEC homogenates) was omitted or replaced by bovine serum albumin, no significant aromatization was detected (see Fig. 10), which indicates no significant spontaneous loss of tritium from the substrate. Taken together, our results confer evidence for the presence, expression, and activity of $P450_{arom}$ in rat CMECs.

Aromatization of androgens probably represents a complex system. In conclusion, our results show that in male and female rat CMECs in culture, T and E_2 behave as agonists of endothelial activity by increasing $[Ca^{2+}]_i$ through PLC- β activity. These effects are of nongenomic origin and are related to the membrane-associated mechanism. T could have different effects depending on endothelial origin. Male and female rat CMECs in culture express $P450_{arom}$, and its activity is blocked with selective inhibitors. $P450_{arom}$ in rat CMECs is associated with membrane processes that mediate the rapid and nongenomic increase in $[Ca^{2+}]_i$ induced by T. Apparently, exon I (ovary specific) was mainly used for the aromatase mRNA of rat CMECs. In rat CMECs, $P450_{arom}$ shows significant enzymatic activity. We did not find gender-based differences.

CMECs may be a potential site of E_2 synthesis from circulating T that mediates the $[Ca^{2+}]_i$ changes and influences the physiological responses in this endothelial type.

GRANTS

This work was supported by Instituto Politécnico Nacional and Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología Grants 31423M, 634998-N, and 04343-N.

REFERENCES

- Alexandersen P, Haarlo J, Byrjalsen I, Lawaetz H, and Christiansen C. Natural androgens inhibit male atherosclerosis. *Circ Res* 84: 813–819, 1999.
- Bagatell CJ, Knopp RH, Vale WW, River JE, and Bremner WJ. Physiologic testosterone levels in normal men suppress high-density lipoproteins cholesterol levels. *Ann Intern Med* 116: 967–973, 1992.
- Bayard F, Clamens S, Delsol G, Blaes N, Maret A, and Faye J. Oestrogen synthesis, oestrogen metabolism and functional oestrogen receptors in bovine aortic endothelial cells. *Ciba Found Symp* 191: P122–P138, 1995.
- Bayard F, Clamens S, Meggetto F, Blaes N, Delsol G, and Faye J. Estrogen synthesis, estrogen metabolism, and functional estrogen receptors in rat arterial smooth muscle cells in culture. *Endocrinology* 136: 1523–1529, 1995.
- Beck DW, Vinters HV, Hart MN, and Cancilla PA. Glial cells influence polarity of the blood-brain barrier. *J Neuropathol Exp Neurol* 43: 219–224, 1984.
- Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72: 248–254, 1976.
- Brann WD, Hendry BL, and Mahesh BV. Emerging diversities in the mechanism of action of steroid hormones. *J Steroid Biochem Mol Biol* 52: 113–133, 1995.
- Bulun SE, Simpson ER, and Word A. Expression of the CYP19 gene and its product aromatase cytochrome P450 in human uterine leiomyoma tissues and cells in culture. *J Clin Endocrinol Metab* 78: 736–743, 1994.
- Carter DT and Ogden D. Kinetics of Ca^{2+} release by $InsP_3$ in pig single aortic endothelial cells: evidence for an inhibitory role of cytosolic Ca^{2+} in regulating hormonally evoked Ca^{2+} spikes. *J Physiol* 504: 17–33, 1997.
- Ceballos G and Rubio R. Coculture of astroglial and vascular endothelial cells as apposing layers enhances the transcellular transport of hypoxanthine. *J Neurochem* 64: 991–999, 1995.
- Chambless LK, Yuhanna SI, Mineo C, Pingsheng L, German Z, Sherman ST, Mendelsohn EM, Anderson WGR, and Shaul WP. Estrogen receptor- α and endothelial nitric oxide synthase are organized into a functional signaling module in caveolae. *Circ Res* 87: e44–e52, 2000.
- Chen Z, Yuhanna SI, Galcheva-Gargova Z, Karas HR, Mendelsohn EM, and Shaul WP. Estrogen receptor- α mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest* 103: 401–406, 1999.
- Chou MT, Sudhir K, Hutchison JS, Ko E, Amidon MT, Collins P, and Chatterjee K. Testosterone induces dilatation of canine coronary conductance, and resistance arteries in vivo. *Circulation* 94: 2614–2619, 1996.
- Christ M and Wehling M. Cardiovascular steroid actions: swift swallows or sluggish snails? *Cardiovasc Res* 40: 34–44, 1998.
- Costarella EC, Stallone NJ, Rutecki WG, and Whittier CF. Testosterone causes direct relaxation of rat thoracic aorta. *J Pharmacol Exp Ther* 277: 34–39, 1996.
- DeBault LF and Cancilla PA. γ -Glutamyl transpeptidase in isolated brain endothelial cells: induction by glial cells in vitro. *Science* 207: 653–655, 1980.
- Deenadayalu PV, White ER, Stallone NJ, Gao X, and Garcia JA. Testosterone relaxes coronary arteries by opening the large-conductance, calcium-activated potassium channel. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 281: H1720–H1727, 2001.
- Ding QA and Stallone NJ. Testosterone-induced relaxation of rat aorta is androgen structure specific and involves K^+ channel activation. *J Appl Physiol* 91: 2742–2750, 2001.
- Farhat YM, Lavigne CM, and Ramwell WP. The vascular protective effects of estrogen. *FASEB J* 10: 615–624, 1996.
- Foreman MD. Cardiovascular disease: a men's health hazard. *Nurs Clin North Am* 21: 65–73, 1986.

21. **Gloe T and Pohl U.** Laminin binding conveys mechanosensing in endothelial cells. *News Physiol Sci* 17: 166–169, 2002.
22. **Goetz MR, Thatté SH, Prabhakar P, Cho RM, Michel T, and Golan ED.** Estradiol induces the calcium-dependent translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 2788–2793, 1999.
23. **Grienddli KK and Alexander WR.** Endothelial control of the cardiovascular system: recent advances. *FASEB J* 10: 283–292, 1996.
24. **Grohé C, Kahlert S, Löbber K, and Vetter H.** Expression of oestrogen receptor- α and - β in rat heart: role of local oestrogen synthesis. *J Endocrinol* 156: R1–R7, 1998.
25. **Grynkiewicz G, Poenie M, and Tsien RY.** A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescent properties. *J Biol Chem* 260: 3440–3450, 1985.
26. **Harada N, Honda SI, and Hatano O.** Aromatase inhibitors and enzyme stability. *Endocr Relat Cancer* 6: 211–218, 1999.
27. **Harada N, Sasano H, Murakami H, Ohkuma T, Nagura H, and Takagi Y.** Localized expression of aromatase in human vascular tissues. *Circ Res* 84: 1285–1291, 1999.
28. **Harada N, Utsumi T, and Takagi Y.** Tissue-specific expression of the human aromatase cytochrome P450 gene by alternative use of multiple exons 1 and promoters, and switching of tissue-specific exons 1 in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 11312–11316, 1993.
29. **Jin W, Lo TM, Loh HH, and Thayer SA.** U73122 inhibits phospholipase C-dependent calcium mobilization in neuronal cells. *Brain Res* 642: 237–243, 1994.
30. **Kalin FM and Zumoff B.** Sex hormones and coronary disease: a review of the clinical studies. *Steroids* 55: 330–352, 1990.
31. **Kuo L, Davis JM, and Chilian MW.** Longitudinal gradients for endothelium-dependent and -independent vascular responses in the coronary microcirculation. *Circulation* 92: 518–525, 1995.
32. **Lephart DE and Simpson RV.** Assay of aromatase activity. *Methods Enzymol* 206: 477–483, 1991.
33. **Levine SA and Likoff WB.** The therapeutic value of testosterone propionate in angina pectoris. *N Engl J Med* 229: 770–772, 1943.
34. **Lieberherr M and Grosse B.** Androgens increase intracellular calcium concentration and inositol 1,4,5-trisphosphate and diacylglycerol formation via a pertussis toxin-sensitive G-protein. *J Biol Chem* 269: 7217–7223, 1994.
35. **Lobo AR and Speroff L.** International consensus conference on postmenopausal hormone therapy and the cardiovascular system. *Fertil Steril* 61: 592–595, 1994.
36. **Masuda A, Mathur R, and Halushka P.** Testosterone increases thromboxane A₂ receptors in cultured rat aortic smooth muscle cells. *Circ Res* 69: 638–643, 1991.
37. **Mendelsohn EM and Karas HR.** The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 340: 1801–1811, 1999.
38. **Mukherjee TK, Dinh H, Chaudhuri G, and Hathan L.** Testosterone attenuates expression of vascular cell adhesion molecule-1 by conversion to estradiol by aromatase in endothelial cells: implications in atherosclerosis. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 4055–4060, 2002.
39. **Nadal A, Diaz M, and Valverde AM.** The estrogen trinity: membrane, cytosolic, and nuclear effects. *News Physiol Sci* 16: 251–255, 2001.
40. **Nishida M, Carley WW, Gerritsen EM, Ellingsen O, Kelly AR, and Smith WT.** Isolation and characterization of human and rat cardiac microvascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 264: H639–H652, 1993.
41. **Rubio GI, Garcia RO, Serdan GR, Balcazar GG, Muñoz GO, Morato T, Zamora GM, and Ceballos RG.** Testosterone inhibits bradykinin-induced intracellular calcium kinetics in rat aortic endothelial cells in culture. *Steroids* 67: 393–397, 2002.
42. **Rubio GI, Sierra RJA, García VA, Martínez MA, Muñoz GO, Morato T, and Ceballos RG.** 17 β -Estradiol increases intracellular calcium concentration through a short-term and non-genomic mechanism in rat vascular endothelium in culture. *J Cardiovasc Pharmacol* 36: 196–202, 2000.
43. **Ryan JK.** Biological aromatization of steroids. *J Biol Chem* 234: 268–272, 1959.
44. **Sanghera KM, Simpson RE, McPhaul JM, Kozłowski G, Conley JA, and Lephart DE.** Immunocytochemical distribution of aromatase cytochrome P450 in the rat brain using peptide-generated polyclonal antibodies. *Endocrinology* 129: 2834–2844, 1991.
45. **Santen RJ.** Recent progress in development of aromatase inhibitors. *J Steroid Biochem* 37: 1029–1035, 1990.
46. **Sasano H, Murakami H, Shizawa S, Satomi S, Nagura H, and Harada N.** Aromatase and sex steroid receptors in human vena cava. *Endocr J* 46: 233–242, 1999.
47. **Sasano H, Takashashi K, Satoh F, Nagura H, and Harada N.** Aromatase in the human central nervous system. *Clin Endocrinol (Oxf)* 48: 325–329, 1998.
48. **Schork A, Morinelli A, and Masuda A.** Testosterone treatment enhances thromboxane A₂-mimetic, induced coronary artery vasoconstriction in guinea pigs. *Eur J Clin Invest* 24, Suppl 1: 50–52, 1994.
49. **Sebastian S and Bulun SE.** A highly complex organization of the regulatory region of the human CYP19 (aromatase) gene revealed by the human genome project. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 4600–4602, 2001.
50. **Sedmak JJ and Grossberg ES.** A rapid, sensitive and versatile assay for protein using Coomassie brilliant blue G250. *Anal Biochem* 79: 544–552, 1977.
51. **Simpson E, Rubin G, Clyne C, Robertson K, O'Donnell L, Davis S, and Jones M.** Local estrogen biosynthesis in males and females. *Endocr Relat Cancer* 6: 131–137, 1999.
52. **Simpson ER, Clyne C, Rubin G, Boon CW, Robertson K, Britt K, Speed C, and Jones M.** Aromatase: a brief overview. *Annu Rev Physiol* 64: 93–127, 2002.
53. **Simpson ER, Clyne C, Speed C, Rubin G, and Bulun S.** Tissue-specific estrogen biosynthesis and metabolism. *Ann NY Acad Sci* 949: 58–67, 2001.
54. **Simpson ER, Meandro MS, Means GD, Kilgore MW, Hinshelwood MM, Lorence-Graham S, Amarneh B, Ito Y, Fisher CR, Michael MD, Mendelson CR, and Bulun SE.** Aromatase cytochrome P450, the enzyme responsible for estrogen biosynthesis. *Endocr Rev* 15: 342–355, 1994.
55. **Skafar FD, Xu R, Morales J, Ram J, and Sowers RJ.** Female sex hormones and cardiovascular disease in women. *J Clin Endocrinol Metab* 82: 3913–3918, 1997.
56. **Tepe-areenan P, Kendall DA, and Randall MD.** Testosterone-induced vasorelaxation bed is mediated predominantly via potassium channels. *Br J Pharmacol* 135: 735–740, 2002.
57. **Vischer U.** Estrogens and atherosclerosis: a direct protective effect on the vascular wall. *Eur J Endocrinol* 137: 343–344, 1997.
58. **Webb MC, McNeil GJ, Hayward SC, Zeigler D, and Collins P.** Effects of testosterone on coronary vasomotor regulation in men with coronary heart disease. *Circulation* 100: 1690–1696, 1999.
59. **Yue P, Chatterjee K, Beale C, Poole-Wilson AP, and Collins P.** Testosterone relaxes rabbit coronary arteries and aorta. *Circulation* 91: 1154–1160, 1995.
60. **Zhao Y, Mendelson CR, and Simpson ER.** Characterization of the sequences of the human CYP19 (aromatase) gene that mediate regulation by glucocorticoids in adipose stromal cells and fetal hepatocytes. *Mol Endocrinol* 9: 340–349, 1995.