

DEPARTAMENT DE FISIOLOGIA

INFLUENCIA DE LA DIABETES EXPERIMENTAL SOBRE
LA REACTIVIDAD DE LAS ARTERIAS CARÓTIDA Y
RENAL DE CONEJO A LA TESTOSTERONA.

ANTONIO MIGUEL PÉREZ MUÑOZ

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2011

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 26 de setembre de 2011 davant un tribunal format per:

- Dr. Enrique Alborch Domínguez
- Dr. Luis Rivera de los Arcos
- Dra. Silvia Llorens Folgado
- Dra. Inmaculada Posadas Mayo
- Dra. Teresa Jover Mengual

Va ser dirigida per:

Dr. Francisco Javier Miranda Alonso

Dr. José Maria Centeno Guil

Dra. Vannina González Marrachelli

©Copyright: Servei de Publicacions
Antonio Miguel Pérez Muñoz

I.S.B.N.: 978-84-370-8513-5

Edita: Universitat de València

Servei de Publicacions

C/ Arts Gràfiques, 13 baix

46010 València

Spain

Telèfon:(0034)963864115



UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
DEPARTAMENT DE FISIOLÒGIA

**INFLUENCIA DE LA DIABETES EXPERIMENTAL SOBRE LA
REACTIVIDAD DE LAS ARTERIAS CARÓTIDA Y RENAL DE
CONEJO A LA TESTOSTERONA**

Tesis Doctoral, presentada por:

D. Antonio Miguel Pérez Muñoz

Dirigida por los profesores:

D. Francisco Javier Miranda Alonso

D. José María Centeno Guil

D^a Vannina González Marrachelli

Valencia, marzo de 2011

D. **FRANCISCO JAVIER MIRANDA ALONSO**, Profesor Titular de Fisiología de la Universitat de València, D. **JOSÉ MARÍA CENTENO GUIL**, Profesor Contratado Doctor de Fisiología de la Universitat de València, y D^a **VANNINA GONZÁLEZ MARRACHELLI**,

CERTIFICAN:

Que D. **ANTONIO MIGUEL PÉREZ MUÑOZ**, Licenciado en Farmacia, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo experimental para la realización de su Tesis Doctoral que lleva por título: **“INFLUENCIA DE LA DIABETES EXPERIMENTAL SOBRE LA REACTIVIDAD DE LAS ARTERIAS CARÓTIDA Y RENAL DE CONEJO A LA TESTOSTERONA”** en el Departament de Fisiologia de la Universitat de València.

Y para que así conste, expedimos el presente en Valencia, a 23 de marzo de 2011

Dr. Francisco J. Miranda Dr. José M. Centeno Dra. Vannina González

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar deseo expresar mi agradecimiento al Prof. Dr. Enrique Alborch Domínguez, director del grupo de investigación, por haberme dado la oportunidad de hacer esta Tesis y por confiar en mí.

No tengo suficientes palabras para poder expresar toda mi gratitud y reconocimiento hacia Francisco Javier Miranda Alonso, José M^a Centeno Guil y Vannina González Marrachelli: realizar la tesis bajo vuestra dirección ha sido para mí un gran reto personal y una gran satisfacción. Os manifiesto mi agradecimiento por haber confiado en mí. También por la gran paciencia, por teneros siempre a mi disposición, por darme respuesta a las innumerables preguntas y sobre todo por vuestro apoyo incondicional, en toda clase de cuestiones que se han planteado. Javier, Jose y Vannina, sois vosotros los que habéis escrito poco a poco con vuestro trabajo y ejemplo los cimientos de esta Tesis. Sois los que me habéis arropado en el día a día y habéis logrado que la nave pueda llegar a puerto, por ello, todo mi reconocimiento y agradecimiento. También me habéis aceptado y ayudado en todo lo relacionado con la docencia. Especialmente a ti Javier por ser el responsable de la publicación de los dos artículos que avalan esta Tesis y muchas más cosas tanto profesionales como personales. Lugar muy destacado guardo para Vannina por tu infinito interés en que avanzara esta Tesis, por tus ayudas en el laboratorio y tus consejos con todo lo relacionado con los temas de investigación. No olvidaré las tardes en la farmacia con tus estancias.

Gracias a Agustín Llopis González y María M. Morales Suarez-Varela por ser los que me iniciasteis en esta carrera de fondo del doctorado, fuisteis

mis Tutores de los cursos de Doctorado y por todo ello siempre os recordaré con gratitud.

Gracias a Salvador Banacloche por enseñarme todo lo que sé sobre el manejo de los animales. Por su paciencia y buen humor, por tener respuesta a casi todo, por ayudarme a encontrarlo todo y por ser compañero senderista.

Gracias a Tere Jover, Joan Salom y Germán Torregrosa, integrantes de mi grupo de investigación por la ayuda recibida, tanto en la Tesis como en la docencia, por sus consejos, su experiencia, su buen hacer y el compañerismo demostrado.

Gracias al Departamento de Fisiología, especialmente a los profesores (os nombraré por orden alfabético): Antonio Alberola, Miguel Asensi, Julián Carretero, José María Estrela, Andrés Irurzun , Esperanza Martín de Aguilera, Elena Obrador, Ángel Ortega, Javier Pereda, Juan Sastre, y José Vila por la ayuda recibida para la docencia, haciéndome un hueco en el Departamento, por el interés demostrado y por el ánimo que me habéis infundido.

Gracias a Pilar Laso por su simpatía, su interés y por tenerlo todo siempre a punto en la Secretaría del Departamento en Farmacia.

Gracias a Desiré Ruiz, compañera de doctorado y amiga, por haberme ayudado y animado. ¡Esos mensajes de móvil tan reconfortantes!

Gracias a mis compañeros de las distintas Juntas de Gobierno del M.I.C.O.F., por su amistad, su colaboración y de los cuales siempre he aprendido alguna cosa.

Gracias a Salvador Gimeno, mi maestro en todos los temas científicos, por tu confianza, tus enseñanzas y por tu amistad.

Gracias a Salvador Ibáñez, que aunque no presente, me dio su amistad, su confianza y me enseñó muchas cosas de esta vida, fundamentalmente a llevar con orgullo y dignidad la profesión de farmacéutico.

Gracias a M^a Eugenia Rueda por tu amistad, tu cariño, por animarme a continuar hacia delante y “por estar siempre”.

Gracias a Pilar Machancoses, amiga de toda la vida, por haberme animado siempre a continuar hacia adelante. Me acuerdo de tantas cosas, de las determinaciones de γ -GT y de los antibiogramas de última hora.

Gracias a M^a Teresa Guardiola, compañera de muchas fatigas, por su aprecio y consideración y por infundirme siempre ánimo para seguir la Tesis. El corazón de becario siempre está vivo, permanece y teje una amistad eterna. Me acuerdo del famoso mechero de micro, de los toxoplasmas y de los pinchos de tortilla en Alberto.

No quisiera olvidar a nadie, así que gracias a todos los que en algún momento se interesaron por “cómo iba la Tesis”, en especial a Salva Mena, María Rodríguez, Fátima Feddi, Javier Escobar, Alessandro Arduini, M^a Dolores Royo, Mari Luz Moreno y Sonia Priego.

Gracias a Nuria Mas, por tu aprecio y por resolverme todas las incidencias y dudas informáticas e idiomáticas.

Gracias a M^a José Romero por tu aprecio y por tu entera disposición para resolverme cualquier situación.

Gracias a mis sobrinos María, Javier y Anna por demostrarme siempre el cariño que me tienen.

Gracias a M^a José, Rami, Raúl y Juanpe, mis cuñados, por el aprecio que me tienen, por su disposición y por hacérmelo pasar bien. La “torrà” y otras actividades de Calles estuvieron muy bien.

Gracias a María, mi madre política, que aunque no está presente, me dio su cariño y me enseñó cosas que no dicen los libros.

Gracias a Alicia, mi hermana, por serlo, por su cariño, por haberme apoyado en todo y por haberme animado siempre a seguir adelante.

Gracias a Antonia, mi madre, que ya no está presente, por haberme traído al mundo, por su cariño, por sus consejos y por animarme siempre.

Gracias a Miguel, mi padre, que aunque no está presente, siempre está en mi memoria, por su cariño, por lo que me enseñó y por el carácter que me hizo forjar.

Gracias a mis hijos Salva y Raquel por todo vuestro cariño, apoyo incondicional, ánimos, colaboración y comprensión en todo momento. Por estar siempre a mi lado. Sois unos “chotos sufridores a la enésima”.

Gracias a Julia, mi esposa, por tu amor, por tu paciencia, por estar siempre preocupada por mi felicidad, por infundirme ánimos, por alentarme y reconfortarme en el día a día, en los momentos bajos y estar siempre detrás de

todo y detrás de mí. Eres mi guía, luz y referencia en la vida. Sin ti no lo habría conseguido.

*A Julia
A Salva y Raquel*

La realización de esta Tesis Doctoral ha tenido como fruto la publicación de sus resultados en los siguientes artículos:

Marrachelli VG, Miranda FJ, Centeno JM, Burguete MC, Castelló-Ruiz M, Jover-Mengual T, Pérez AM, Salom JB, Torregrosa G, Alborch E. Mechanisms involved in the relaxant action of testosterone in the renal artery from male normoglycemic and diabetic rabbits. *Pharmacol Res.* 2010;61:149-56.

Marrachelli VG, Miranda FJ, Centeno JM, Salom JB, Torregrosa G, Jover-Mengual T, Pérez AM, Moro MA, Alborch E. Role of NO-synthases and cyclooxygenases in the hyperreactivity of male rabbit carotid artery to testosterone under experimental diabetes. *Pharmacol Res.* 2010;61:62-70.

RESUMEN

En este trabajo hemos estudiado las modificaciones producidas por la diabetes inducida por el aloxano en los mecanismos que regulan la respuesta de las arterias carótida y renal de conejo a la testosterona. La concentración plasmática de testosterona libre y total de los conejos diabéticos fue significativamente menor que la de los conejos control.

ARTERIA CARÓTIDA. En la arteria carótida, la testosterona produjo una relajación de magnitud dependiente de la concentración, que fue mayor en conejos diabéticos que en conejos control. En conejos control, ni la eliminación del endotelio ni la incubación con el inhibidor del enzima óxido nítrico sintasa (NOS), N^G -nitro-L-arginina, modificó la relajación arterial a la testosterona, pero el inhibidor de la ciclooxigenasa (COX), indometacina, aumentó dicha relajación. En contraste, en arteria carótida de animal diabético la eliminación del endotelio, N^G -nitro-L-arginina e indometacina inhibieron la relajación a la testosterona. En arterias carótidas de conejo diabético tanto la expresión de eNOS, iNOS y COX-2 como la liberación de prostaciclina en respuesta a la testosterona fue mayor que en arterias de conejo control. La testosterona inhibió la contracción arterial inducida por $CaCl_2$, tanto en animales control como animales diabéticos. Estos resultados sugieren que la testosterona relaja la arteria carótida al bloquear la entrada de calcio extracelular. La diabetes aumenta la respuesta vasodilatadora de la testosterona por un mecanismo que al menos incluye un aumento de la actividad moduladora del óxido nítrico endotelial y un aumento de la liberación del vasodilatador COX-2, prostaciclina, más que la ausencia de vasoconstrictor COX-1 tromboxano A_2 .

ARTERIA RENAL. La testosterona relajó la arteria renal de conejo control y diabético, sin diferencias significativas entre ambos. Tanto en arteria renal de conejo control como de diabético, la eliminación del endotelio inhibió la relajación arterial a la testosterona. En arterias con endotelio, la incubación con indometacina, N^G -nitro-L-arginina, o con el inhibidor de los canales de K^+ tetraetilamonio, no modificó significativamente la relajación arterial a la testosterona en ambos grupos de animales. En arterias sin endotelio, la indometacina aumentó la relajación a la testosterona, tanto en conejos control como en conejos diabéticos. La expresión de eNOS, iNOS y COX-1 y la liberación de tromboxano A_2 y prostaciclina en respuesta a la testosterona fue similar en arterias de conejo control y de conejo diabético. Sin embargo, la expresión de COX-2 fue significativamente menor en arteria renal de conejo diabético que en conejo control. La testosterona inhibió la contracción de la arteria renal inducida por $CaCl_2$ en ambos grupos de conejos. Estos resultados sugieren que la testosterona relaja la arteria renal de conejo. Esta relajación está modulada por tromboxano A_2 de origen muscular, y está mediada parcialmente por prostaciclina endotelial, e implica el bloqueo de la entrada de Ca^{2+} al interior celular. A diferencia de lo observado en arteria carótida, la diabetes no modifica los mecanismos implicados en la relajación de la arteria renal a la testosterona.

ABREVIATURAS

AGEs	Productos finales de la glicosilación avanzada
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
BK _{Ca}	Canales de potasio dependientes de calcio de gran conductancia
COX	Ciclooxigenasa
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
EEM	Error estándar de la media
EGTA	Ácido etilenglicol tetraacético
EIA	Enzimoinmunoanálisis
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
GMP	Guanosín monofosfato
GTP	Guanosín trifosfato
IK _{Ca}	Canales de potasio dependientes de calcio de conductancia intermedia
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
IP ₃	Inositol 1,4,5 trifosfato
K _{Ca}	Canales de potasio dependientes de calcio
K _{IR}	Canales rectificadores de K ⁺
K _V	Canales de potasio dependientes de voltaje
L-NOArg	N ^G -nitro-L-arginina
nNOS	Óxido nítrico sintasa neuronal
NO	Óxido nítrico
NOS	Óxido nítrico sintasa
OMS	Organización mundial de la salud
SK _{Ca}	Canales de potasio dependientes de calcio de baja conductancia
TEA	Tetraetilamonio

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
1. Diabetes mellitus	2
1.1. Generalidades	2
1.2. Tipos de diabetes mellitus	4
1.2.1. Diabetes tipo 1	4
1.2.2. Diabetes tipo 2	5
1.2.3. Diabetes gestacional	7
1.3. Complicaciones de la diabetes	7
1.3.1. Complicaciones vasculares asociadas a la diabetes mellitus	9
1.3.2. Diabetes y afectación renal	10
1.3.3. Diabetes y afectación cerebrovascular	14
1.4. Modelos experimentales de diabetes	15
2. Mecanismos reguladores de la reactividad vascular	21
2.1. Óxido nítrico	24
2.2. EDHF	28
2.3. Prostanoides	32
3. Disfunción endotelial en la diabetes	37
4. Andrógenos	44
4.1. Generalidades	44
4.2. Testosterona y enfermedad vascular	47
5. Diabetes mellitus y andrógenos	54
OBJETIVOS	57
MATERIAL Y MÉTODOS	59
1. Inducción de la diabetes experimental	60
2. Determinación de la concentración plasmática de glucosa y testosterona	61
3. Registro de la tensión isométrica desarrollada por segmentos de arteria carótida y renal de conejo	62
3.1. Obtención y montaje de los segmentos arteriales	62
3.2. Técnicas de registro y medición	63
3.3. Procedimiento experimental	64
4. Western blot	67
5. Enzimoimmunoanálisis (EIA)	68
6. Análisis de los resultados	68
7. Fármacos y soluciones	69

RESULTADOS	71
1. Valores de glucosa y testosterona plasmáticos	72
2. Curvas concentración-respuesta	73
2.1. Arteria carótida de conejo	73
2.2. Arteria renal de conejo	79
3. Western blot y EIA	86
3.1. Arteria carótida de conejo	86
3.2. Arteria renal de conejo	88
DISCUSIÓN	91
1. Efecto de la testosterona sobre la arteria carótida	94
2. Efecto de la testosterona sobre la arteria renal	99
3. Consideraciones finales	103
CONCLUSIONES	104
BIBLIOGRAFÍA	107

INTRODUCCIÓN

1. Diabetes mellitus

1.1. Generalidades

La OMS define la diabetes como una enfermedad crónica, causada por un déficit, heredado o adquirido, en la producción pancreática de insulina o por una falta de respuesta de la hormona. La insulina es una de las hormonas que regula la concentración de glucosa en la sangre, por lo que la diabetes se caracteriza por una hiperglucemia crónica, que con el tiempo daña gravemente muchos órganos y sistemas. Entre otros, puede dañar el corazón, los vasos sanguíneos, ojos, riñones y nervios. Además no sólo afecta a la calidad de vida y al bienestar económico del paciente sino también al sistema sanitario por el incremento del uso de los servicios médicos y las bajas laborales relacionadas con la enfermedad y sus complicaciones.

Los síntomas característicos de esta enfermedad son polidipsia, polifagia, poliuria, visión borrosa y pérdida de peso. En las formas severas puede desarrollarse cetoacidosis o un estado hiperosmolar no cetoacidótico que pueden llevar al individuo a un estado de estupor y coma, que conducen a la muerte en caso de que no se proporcione el tratamiento adecuado. En cualquier caso, los síntomas no son tan severos o pueden no presentarse y, como consecuencia, la hiperglucemia que conlleva puede causar cambios funcionales y patológicos durante mucho tiempo antes de que se diagnostique.

Según estimaciones de la OMS, la diabetes se duplicará en la población mundial en los próximos 25 años, alcanzando la cifra de 366 millones de afectados en el año 2030. Estos datos se basan en el incremento de población

y en el envejecimiento de la misma, junto con el incremento del sedentarismo, la dieta no saludable y la obesidad.

España ocupa, tras Rusia, Italia y Turquía, el cuarto puesto de país europeo con mayor número de diabéticos (unos 2.7 millones), y se prevé que en 2030, la cifra de afectados se incremente en un millón.

La diabetes mellitus es una enfermedad relativamente común cuya prevalencia, incidencia, mortalidad y morbilidad asociadas hacen de esta afección uno de los principales problemas de salud pública del siglo XXI. Su impacto económico para el sistema de salud y la sociedad es muy elevado. Esta enfermedad crónica desarrolla a lo largo de su evolución una serie de complicaciones y representa un número muy importante de consultas médicas, hospitalizaciones, pensiones de invalidez y muerte. Además del sufrimiento del paciente, que no se puede cuantificar, se estima que el gasto sanitario total derivado de la prevención, control y tratamiento de la diabetes es del 5 al 10% del presupuesto sanitario global. En 2010, los gastos derivados de los conceptos mencionados anteriormente, así como de las complicaciones derivadas de la diabetes, se elevarán a un total de unos 418 billones de dólares internacionales (valor en dólares corregido en función del poder adquisitivo). Hacia 2030 se espera que esta cifra supere los 561 billones de dólares internacionales (International Diabetes Federation. Diabetes Atlas, 4th Edition, 2009, <http://www.diabetesatlas.org/>).

El coste estimado de la diabetes en España en el 2002 osciló entre 2400 y 2675 millones de euros, es decir, el 6.3-7.4% del gasto total del Sistema Nacional de Salud (Oliva *et al.*, 2004). Aproximadamente un 60% de los costes

directos son debidos a hospitalización, siendo su mayor parte debida a complicaciones de tipo cardiovascular (Hart *et al.*, 1997).

1.2. Tipos de diabetes mellitus

La diabetes engloba un conjunto de trastornos heterogéneos que tienen como elementos comunes la hiperglucemia y la intolerancia a la glucosa, debidas a una deficiencia de insulina, a la alteración de la efectividad de la acción de la insulina o a ambas cosas. En el Atlas de la Diabetes, de la Federación Internacional de Diabetes, de 2009 se recogen 4 tipos de diabetes mellitus, en base a su etiología y la presentación clínica del trastorno: diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, diabetes mellitus gestacional y otros tipos específicos.

1.2.1. Diabetes tipo 1

La diabetes tipo 1 se denomina a veces insulinodependiente, de origen inmune o juvenil. Está causada por la destrucción de las células productoras de insulina del páncreas, debido normalmente a una reacción autoinmune, que hace que se vean atacadas por el sistema de defensas del organismo. Las células beta pancreáticas, por lo tanto, producen poca o ninguna insulina, que es la hormona que permite que la glucosa pase a las células del organismo. La razón por la que esto sucede no acaba de comprenderse.

La enfermedad puede afectar a personas de cualquier edad, pero suele desencadenarse en niños o adultos jóvenes. La diabetes tipo 1 es una de las afecciones endocrinas y metabólicas más frecuentes en la infancia. Las personas con diabetes tipo 1 necesitan inyectarse insulina todos los días a fin de controlar sus niveles de glucosa en sangre. Sin insulina, las personas con

diabetes tipo 1 mueren.

La aparición de diabetes tipo 1 suele ser repentina y abrupta y puede incluir síntomas como sed anormal y sequedad de boca, micción frecuente, cansancio extremo/falta de energía, apetito constante, pérdida de peso repentina, lentitud en la curación de heridas, infecciones recurrentes y visión borrosa. La cetoacidosis diabética puede llevar al diagnóstico inicial de diabetes tipo 1, ya que a menudo es el primer síntoma que hace que una persona acuda al médico. También puede ser el resultado del aumento de las necesidades de insulina en alguien a quien ya se le ha diagnosticado la diabetes tipo 1. En tales casos, una infección, un traumatismo, un ataque cardíaco o una cirugía pueden llevar a que se presente cetoacidosis diabética. La omisión de dosis de insulina también puede llevar a cetoacidosis en personas con diabetes.

La incidencia de diabetes tipo 1 está en aumento, aunque las razones para que ello suceda están poco claras, pero es probable que se deba principalmente a los cambios de los factores de riesgo medioambiental. Los factores de riesgo medioambiental, el aumento de la altura y el desarrollo del peso, el aumento de la edad materna en el momento del parto y, posiblemente, algunos aspectos de la dieta y la exposición a algunas infecciones virales podrían iniciar la autoinmunidad o acelerar una destrucción de las células beta que ya se esté produciendo.

1.2.2. Diabetes tipo 2

La diabetes tipo 2 se caracteriza por la resistencia a la insulina y una

deficiencia relativa de dicha hormona; cualquiera de estos dos rasgos podría estar presente en el momento en el que la diabetes se manifiesta clínicamente. El diagnóstico de diabetes tipo 2 suele producirse a partir de los 40 años, aunque podría darse antes, especialmente en poblaciones con una alta prevalencia de esta afección. Cada vez aparecen más informes de niños que desarrollan diabetes tipo 2. Ésta puede permanecer sin ser detectada, es decir, ser asintomática, durante muchos años y el diagnóstico suele producirse a partir de complicaciones asociadas o casualmente mediante un análisis de sangre u orina.

La diabetes tipo 2 a menudo va, aunque no siempre, asociada a la obesidad, que en sí misma puede causar resistencia a la insulina y generar altos niveles de glucosa. Es hereditaria, aunque los principales genes de susceptibilidad aún no han sido identificados. Hay varios factores posibles en el desarrollo de diabetes tipo 2. Estos son: obesidad, dieta y falta de actividad física; edad avanzada; resistencia a la insulina; antecedentes familiares de diabetes; desarrollo intrauterino por debajo del nivel óptimo; y origen étnico.

En contraste a la diabetes tipo 1, las personas con diabetes tipo 2 no dependen de insulina exógena y no son propensas a la cetosis, pero podrían necesitar insulina para controlar la hiperglucemia si no lo consiguen mediante una dieta y agentes hipoglucemiantes orales.

El aumento de la prevalencia de diabetes tipo 2 va asociado a cambios rápidos culturales y sociales, al envejecimiento de la población, a los cambios de dieta, a la disminución de la actividad física y a otros patrones poco saludables de estilo de vida y comportamiento.

1.2.3. Diabetes gestacional

La diabetes mellitus gestacional es una intolerancia a la glucosa de distintos grados de gravedad que comienza o se detecta por primera vez durante el embarazo. La definición se aplica independientemente de si se utiliza insulina en su tratamiento o de si la afección persiste tras el embarazo.

Mantener el control de los niveles de glucemia reduce notablemente el riesgo para el feto, ya que el aumento del nivel de glucosa en la madre podría generar complicaciones en el bebé, como gran tamaño al nacer, trauma durante el parto, hipoglucemia e ictericia. Las mujeres que han tenido diabetes gestacional corren un mayor riesgo de desarrollar diabetes tipo 2 con el paso del tiempo. La diabetes gestacional también va asociada a un aumento del riesgo de obesidad y metabolismo anormal de la glucosa durante la infancia y la vida adulta en los hijos.

1.3. Complicaciones de la diabetes

Antes del descubrimiento de la insulina en el año 1921 la principal causa de muerte en paciente diabéticos era la cetoacidosis diabética; hoy en día, la mayor causa de mortalidad y morbilidad recae sobre las complicaciones crónicas que pueden afectar a muchos sistemas orgánicos. En prácticamente todos los países desarrollados, la diabetes está clasificada entre las causas principales de ceguera, insuficiencia renal y amputación de extremidades inferiores. La diabetes es también hoy día una de las causas principales de muerte, debido en gran parte a un marcado aumento del riesgo de enfermedad cardiovascular. Además del sufrimiento humano que causan las

complicaciones de origen diabético, tanto a quienes tienen diabetes como a quienes les cuidan, sus costes económicos son enormes. Entre dichos costes se incluyen los gastos sanitarios, la pérdida de ingresos y los costes económicos para la sociedad en general por pérdida de productividad, que a su vez van asociados a la pérdida de oportunidades de desarrollo económico.

La elevación crónica de la glucosa en sangre, incluso cuando no hay síntomas presentes que alerten al individuo sobre la presencia de diabetes, generará tarde o temprano daños en los tejidos, que provocarán enfermedades, a menudo graves. Aunque se encuentran pruebas de lesiones en los tejidos en muchos sistemas orgánicos, son los riñones, los ojos, los nervios periféricos y el árbol vascular los que manifiestan las complicaciones diabéticas más notables, a veces fatales (Figura 1).

Un control metabólico insatisfactorio en niños puede provocar una atrofia del crecimiento y la exposición, tanto a hipoglucemias graves como a hiperglucemia crónica, puede tener efectos adversos sobre el desarrollo neurológico. Los niños son más sensibles a la falta de insulina que los adultos y corren un mayor riesgo de desarrollar de manera rápida y abrupta cetoacidosis diabética (coma diabético).

El mecanismo por el cual la diabetes genera estas complicaciones es complejo y no se entiende plenamente, pero está implicado el efecto tóxico directo de los altos niveles de glucosa, sumado al impacto de la hipertensión, el nivel anormal de lípidos y los trastornos tanto funcionales como estructurales de los pequeños vasos sanguíneos.

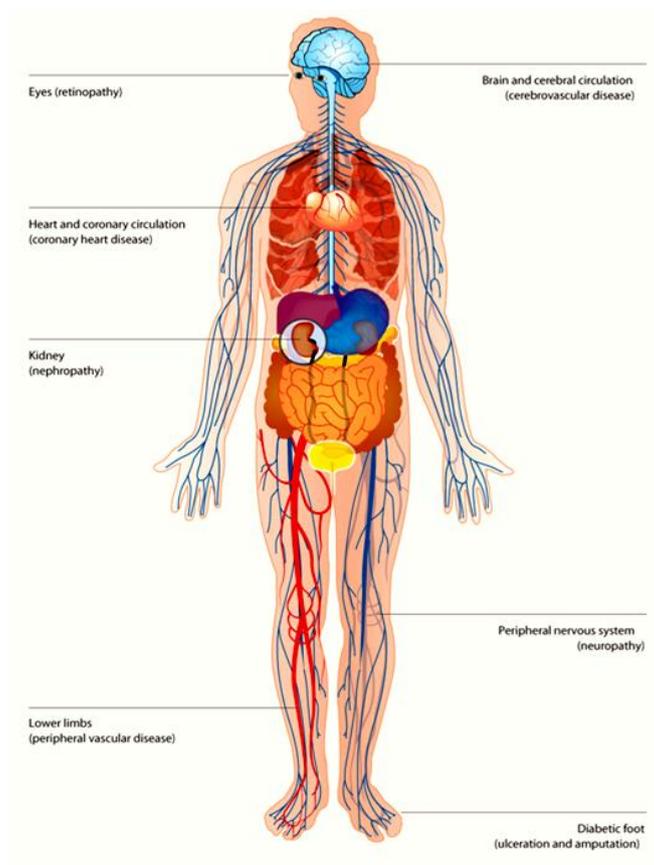


Figura 1. Principales complicaciones de la diabetes (Tomado de International Diabetes Federation Diabetes Atlas, 4th edition, 2009).

1.3.1. Complicaciones vasculares asociadas a la diabetes mellitus

Las complicaciones vasculares pueden ser de dos tipos dependiendo del calibre de los vasos a los que afecta (Orasanu y Plutzky, 2009): la macroangiopatía (ictus, cardiopatía isquémica e infarto de miocardio) y las microangiopatías (retinopatía, nefropatía, neuropatía, isquemia de los miembros inferiores). Es importante resaltar la clara relación que existe entre las complicaciones crónicas y la magnitud y duración de la hiperglucemia, que afecta tanto al endotelio como al músculo liso de la pared vascular (Orasanu y Plutzky, 2009). La mitad de los pacientes diabéticos mueren de enfermedad

cardiovascular (principalmente cardiopatía e ictus). Las macroangiopatías afectan fundamentalmente a los grandes vasos (coronarias, carótida, arterias de los miembros inferiores) que muestran grandes cambios parecidos a los de la arteriosclerosis con depósito de grandes placas de lípidos en las arterias y calcificación de la túnica media. Son la principal causa, en pacientes diabéticos, de infarto de miocardio, isquemia e infarto cerebral y gangrena isquémica de los miembros inferiores. Sin embargo, la mayoría de las complicaciones circulatorias de la diabetes ocurren en la microcirculación y se denominan genéricamente microangiopatías. El cambio morfológico más característico en los vasos afectados es el engrosamiento de la membrana basal. Esto provoca una disminución del aporte de nutrientes a los tejidos y de la eliminación de los productos de desecho, lo que conduce a lesiones tisulares irreparables. Este hecho constituye una de las causas más frecuentes de amputaciones no traumáticas de los miembros inferiores. La retinopatía diabética y la nefropatía son las principales manifestaciones de la microangiopatía, con ceguera y fallo renal como últimas consecuencias. La microangiopatía de los *vasa nervorum* es importante en la neuropatía diabética, afectando principalmente los nervios sensitivos y el sistema autónomo (Yuan *et al.*, 1999). Ciertas complicaciones diabéticas no son fatales para la vida del enfermo pero pueden alterar de forma significativa su calidad de vida. En los hombres puede producirse impotencia y en ambos sexos es frecuente la disfunción de la vejiga y del intestino grueso (Stehouwer, 1997).

1.3.2. Diabetes y afectación renal

La nefropatía diabética es una de las principales causas de fallo renal en

los países desarrollados. En pacientes con diabetes tipo 1 la nefropatía se desarrolla a partir de los primeros 10 años de la enfermedad. Sin embargo, como el inicio de la diabetes tipo 2 es incierto, ya que muchas veces se diagnostica tardíamente, no es raro encontrar pacientes con función renal anormal en el momento del diagnóstico. Se considera una enfermedad progresiva caracterizada en una primera fase por la microalbuminuria, seguida por la progresión a macroalbuminuria (excreción urinaria de albúmina superior a 300 mg/24 horas), aumento de la concentración sérica de creatinina, hipertensión y, por último, fallo renal (Figura 2, Seaquist e Ibrahim, 2010).

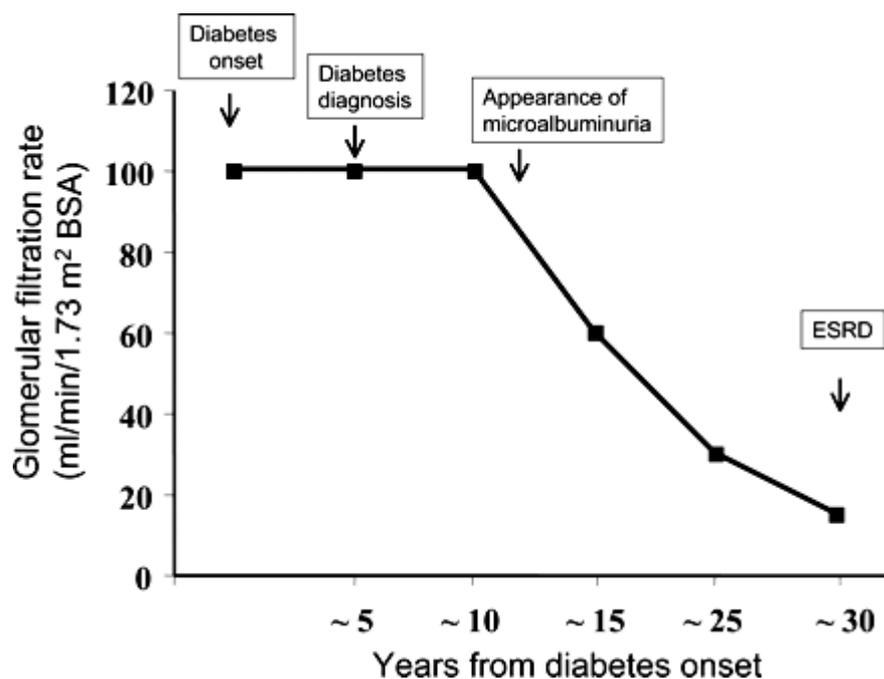


Figura 2. Progresión típica de la enfermedad renal del enfermo diabético (Tomado de Seaquist e Ibrahim, 2010).

La progresión a insuficiencia renal terminal ocurre en el transcurso de unos años, aunque no todos los pacientes siguen la progresión temporal

descrita. Si la progresión es mucho más rápida, hay que pensar en que el paciente diabético tiene otra patología asociada. Un correcto control de la glucemia, la hipertensión y los lípidos plasmáticos puede retrasar la fase de insuficiencia renal terminal (Seaquist e Ibrahim, 2010).

Clínicamente la nefropatía diabética se caracteriza por un riñón hipertrófico, un incremento progresivo de la proteinuria y una disminución de la tasa de filtración glomerular. Estas modificaciones precoces pueden ser producidas por una vasodilatación renal, especialmente de la arteriola aferente, lo que conducirá al aumento del flujo y de la presión intraglomerular, aún cuando deben influir también los cambios estructurales y de superficie que pudieran producirse por la hipertrofia renal concomitante. Es importante resaltar las alteraciones de las sustancias vasoactivas y el consecuente desequilibrio entre los sistemas vasodilatador y vasoconstrictor que resulta en un predominio de los primeros dando lugar a un riñón hiperfiltrante y a un aumento de la presión intraglomerular. La nefropatía asociada con otras complicaciones de la diabetes tiene como consecuencia un elevado riesgo de morbilidad y una tasa de mortalidad treinta veces superior a la población general (Mogyorosi y Ziyadeh, 1996).

El desarrollo de la enfermedad es paulatino. El 10-30% de diabéticos desarrollan microalbuminuria y, sin intervención terapéutica, el 80% de los diabéticos tipo 1 que desarrollan microalbuminuria aumentan su excreción en 10 a 15 años llegando a la fase de nefropatía clínica. De ellos, en otros 10 años, el 50% llegan a padecer insuficiencia renal terminal y, en 20 años, más del 75%. De los diabéticos tipo 2 que desarrollan microalbuminuria, entre el 20

y 40% progresan a la fase de nefropatía clínica. De ellos sólo un 20% llegan a la insuficiencia renal terminal pero esto es debido fundamentalmente a que fallecen por causas cardiovasculares antes de comenzar un tratamiento sustitutivo (diálisis o trasplante renal) (Breyer, 1992).

Según la Asociación Americana de Diabetes, en USA la nefropatía diabética representó el 44% de nuevos casos de enfermedad renal terminal en el año 2005; en ese año, más de cuarenta y seis mil diabéticos iniciaron el tratamiento para la insuficiencia renal terminal, mientras que unos ciento ochenta mil estaban con diálisis o esperando un trasplante de riñón (<http://www.diabetes.org/diabetes-statistics/kidney-disease.jsp>). Según datos del Informe Diálisis y Trasplante en España, Informe Preliminar del Registro Español de Enfermos Renales 2007, en España el porcentaje de diabéticos en pacientes con enfermedad renal crónica terminal es del 14,4%, y se sitúa en la zona media baja, con el Reino Unido y los países mediterráneos, muy por debajo de los países centroeuropeos, como Alemania (23,5%) y Austria (21%). Según el informe citado, en España la diabetes mellitus supuso el 22,4% de las inclusiones en diálisis del año 2007, siendo la causa más frecuente en los grupos de edad de 45 a 74 años. En la Comunidad Valenciana la nefropatía diabética supuso en el año 2008 el 16.86% de las enfermedades renales, el 13.16% de los trasplantes renales del año 2006, y el 15.75% de los fallecimientos por enfermedad renal del año 2006 (Registro de los enfermos renales de la Comunidad Valenciana, 2008, <http://www.sp.san.gva.es/DgspPortal/docs/RenalesInforme2008.pdf>).

1.3.3. Diabetes y afectación cerebrovascular

La enfermedad cerebrovascular es una complicación importante de la diabetes mellitus. Los pacientes diabéticos tienen de dos a cuatro veces más riesgo de padecer accidentes cerebrovasculares así como una mayor mortalidad y menor recuperación tras el accidente cerebrovascular. Los pacientes diabéticos tienen doce veces más posibilidades de ser hospitalizados por problemas cerebrovasculares y el 15% de los costes de la enfermedad cerebrovascular se atribuye a la diabetes (Lukovits *et al.*, 1999). El riesgo relativo de accidente cerebrovascular de la diabetes alcanza el punto más elevado entre los cincuenta y los sesenta años de edad y disminuye después de esta edad, presentándose en los hombres a edades más tempranas que en las mujeres.

Datos estadísticos en varios países de occidente, muestran que el 85% de los accidentes cerebrovasculares son isquémicos. De estos, aproximadamente el 80 a 90% son causados por aterotrombosis y embolias que afectan a vasos mayores (Mohr *et al.*, 1997). Entre los vasos de mayor calibre, la enfermedad de la bifurcación carotídea causa el 25 a 30% de todos los casos, y el resto ocurren por compromiso de las arterias vertebrales extracraneales y de los vasos mayores intracraneales (arterias vertebrales, basilar, cerebrales medias, etc.). Para evaluar la gravedad del problema de salud que representa la enfermedad cerebrovascular debe considerarse la evolución natural de los eventos cerebrovasculares: la mortalidad de un ataque agudo es de 25 a 30% y durante el primer año de 15 a 25%, y hasta de 60% a los cinco años, por lo que la enfermedad cerebrovascular disminuye en forma

notable la esperanza de vida. La recurrencia de enfermedad cerebrovascular es de 5 a 15% durante el primer año y hasta de 40% a los cinco años; entre 25 y 40% de los sobrevivientes padecen secuelas que llevan a la incapacidad total o parcial.

1.4. Modelos experimentales de diabetes

Los modelos experimentales de diabetes mellitus exhiben muchas características de la diabetes clínica, siendo la más común la hiperglucemia. Esta es la razón por la que no sólo se han usado para entender la etiología de la enfermedad sino también para investigar los mecanismos implicados en las complicaciones diabéticas. Estos modelos utilizan animales que, o bien sufren espontáneamente un síndrome similar a la diabetes, o bien se les induce experimentalmente con productos químicos, virus o extirpando el páncreas. De todas formas, ninguno de los modelos experimentales utilizado es totalmente igual a la enfermedad humana. Pero los organismos intactos tienen una gran complejidad que imposibilita un estudio detallado de mecanismos moleculares o la interacción agonistas/antagonistas a sus receptores. Estas limitaciones pueden superarse gracias a modelos *in vitro* donde la contribución de los componentes de la sangre se eliminan y donde la temperatura del tejido, el medio extracelular e incluso la biodisponibilidad de nutrientes e iones, pueden estar estandarizados. Las especies de animales utilizadas están determinadas por distintos factores. En general, cuanto más pequeño sea el animal, más manejable y barato será el experimento. Uno de los principios fundamentales de la experimentación animal es utilizar el menor número posible de animales, evitando al máximo procedimientos que produzcan dolor, sufrimiento, estrés o

lesión prolongada innecesaria y del nivel más bajo en la escala evolutiva.

La investigación en animales ha sido crucial para el entendimiento de la compleja patogénesis de la diabetes: en 1859, Claude Bernard demostró en el perro que el glucógeno hepático es la fuente de la glucosa circulante. En 1889 von Mering estaba trabajando en la absorción intestinal de grasas cuando Oscar Minkowski sugirió extirpar el páncreas a un perro. El animal desarrolló poliuria y polidipsia, permitiendo establecer el vínculo entre el páncreas y la diabetes. Siguió muchos experimentos en conejos y perros, aunque la historia ha reservado un lugar especial a Marjorie, uno de los perros usados por Banting y Best en el que, en 1921, aislaron la insulina y la emplearon en el tratamiento de la diabetes humana. Las tablas 1-3 presentan de forma esquemática los diversos modelos experimentales para el estudio de la diabetes. Para una revisión del tema ver Öztürk *et al.*, 1996; Rees y Alcolado, 2005; Srinivasan y Ramarao, 2007; von Herrath y Nepom, 2009.

Entre los modelos más utilizados están los de diabetes química. Entre las distintas drogas y sustancias químicas, los diabetógenos más usados y eficaces son el aloxano y la estreptozotocina. Otros compuestos tienen una actividad diabetógena débil y su efecto no es específico de las células beta pancreáticas. Desde que en 1943 se descubrió la capacidad del aloxano para destruir las células beta productoras de insulina del páncreas del conejo, se ha usado en infinidad de trabajos para conseguir un modelo experimental de diabetes. Se trata de un compuesto hidrofílico que a pH neutro se reduce rápidamente a ácido dialúrico, que es la forma tóxica del compuesto. Inhibe enzimas dependientes de grupos tiol como la glucoquinasa y la hexoquinasa y

sufre ciclaciones redox en presencia de agentes reductores fisiológicos, generando especies reactivas del oxígeno. Se piensa que son estas últimas las implicadas en el comienzo de los cambios tóxicos que llevan a la muerte de las células beta pancreáticas. Tras la inyección vía intravenosa de aloxano, los animales muestran una hipoglucemia transitoria que revierte a hiperglucemia al cabo de 24-48 horas. Teóricamente se esperaría que los animales inyectados con aloxano o estreptozotocina mostraran una falta total de insulina proveniente de sus células beta pancreáticas y necesitaran obligatoriamente la administración exógena de insulina para vivir. Sin embargo, a pesar de presentar niveles insignificantes de insulina endógena, pueden sobrevivir durante meses sin tratamiento. La administración de aloxano o estreptozotocina al animal adulto ha sido ampliamente aceptada por causar en el animal de experimentación un estado similar al visto en pacientes con diabetes tipo 1: hiperglucemia, polidipsia, polifagia, poliuria, así como la mayoría de las complicaciones asociadas a la diabetes como son las cardiomiopatías, neuropatías, disfunciones coronarias, alteraciones hepáticas, traqueales, del tejido conectivo, etc. Cuando estos agentes químicos se administran a animales neonatos en dosis bajas y repetidas producen un modelo que se asemeja a la diabetes tipo 2. El aloxano tiene la desventaja frente a la estreptozotocina que el porcentaje de incidencia de la diabetes es bastante variable y la incidencia de cetosis y consiguiente mortalidad es relativamente alta. Además, en algunos animales la hiperglucemia revierte espontáneamente al cabo de unas semanas. No obstante, el aloxano es el diabetógeno más comúnmente usado en el conejo.

Tabla 1. Modelos animales de diabetes tipo 1 (modificado de Rees y Alcolado, 2005)

Tipo de modelo	Son diabéticos debido a:	Características del modelo:
Animales diabéticos no seleccionados genéticamente	<ol style="list-style-type: none"> 1. Estreptozotocina 2. Aloxano 3. Nutricional 4. Quirúrgico 	Se trata de animales de diversas cepas, pueden ser ratones, ratas, conejos y perros. Se les puede inducir un cuadro "diabético" por medio de fármacos (1,2); por medio de una dieta rica en azúcares (3); y por manipulación quirúrgica (4).
Animales diabéticos manipulados o seleccionados genéticamente	Ratón NOD (non-obese diabetic)	Insulinitis y destrucción céls. beta a las 4-5 semanas, presentando diabetes a las 12-30 semanas de edad.
	Rata BB (bio breeding)	Estos ejemplares, presentan diabetes espontánea, con una incidencia del 77% en los machos y 87% en las hembras antes de los 120 días de vida. Son obesos, presentan insulinitis en el 100% de los animales.
	Rata LETL (Long Evans Tokushima lean) Conejo blanco Nueva Zelanda Perro Keeshond Hámster chino Mono negro Célebes (<i>Macacca nigra</i>)	

Tabla 2. Modelos animales de diabetes tipo 2 (tomado de Srinivasan y Ramarao, 2007)

Categoría del modelo	Modelos de diabetes tipo 2	
	Obeso	No obeso
I. Animales diabéticos de forma espontánea o por selección genética	Ratón <i>ob/ob</i> Ratón <i>db/db</i> Ratón KK Ratón KK/A ^y Ratón NZO Ratón NONcNZO10 Ratón TSOD Ratón M16 Rata Zucker fatty Rata ZDF Rata SHR/N-cp Rata JCR/LA-cp Rata OLEFT Mono rhesus obeso	Rata Cohen diabética Rata GK Rata Torri no-obesa C57BL/6 Ratón mutante (Akita) Ratón ALS/Lt
II. Animales con diabetes inducida por dieta/nutrición	Rata Sand Ratón C57/BL 6J Ratón Spiny	---
III. Animales con diabetes inducida químicamente	Ratón obeso tratado con GTC	Ratas, ratones, etc., adultos tratados con bajas dosis de aloxano, o STZ Rata neonatal tratada con STZ
IV. Animales con diabetes quirúrgica	Rata diabética obesa por dieta con lesión hipotálamo ventromedial	Perros, primates, cerdos y ratas parcialmente pancreatectomizados
V. Animales diabéticos transgénicos/KO	Ratón KO receptor β_3 Ratón KO para proteína UCP1	Ratones transgénicos o KO con afectación de genes de insulina o receptor de insulina y de las componentes de la vía de señalización aguas abajo: IRS-1, IRS-2, GLUT-4, PTP-1B y otros Ratón KO para PPAR- γ específica de tejido Ratón KO para los genes glucocinasa o GLUT-4 Rata que sobreexpresa el polipéptido amiloide de islote humano (HIP)

KK, Kuo Kondo; KK/A^y, yellow KK obese; ZDF, Zucker diabetic fatty; NZO, New Zealand obese; TSOD, Tsumara Suzuki obese diabetes; SHR/N-cp, spontaneously hypertensive rat/NIH-corpulent; JCR, James C Russel; OLETF, Otuska Long Evans Tokushima fatty; GTC, gold thioglucose; STZ, streptozotocin; GLUT-, glucose transporter; IRS, insulin receptor substrate; GK, Goto-Kakizaki; PPAR, Peroxisome proliferator activated receptor; PTP, phosphotyrosine phosphatase; ALS, alloxan sensitive

Tabla 3. Ventajas y desventajas de las diferentes categorías de modelos animales de diabetes tipo 2 (tomado de Srinivasan y Ramarao, 2007)

Categoría del modelo	Ventajas	Desventajas
I. Animales diabéticos de forma espontánea o por selección genética	Desarrollo de la diabetes tipo 2 es de origen espontáneo e implican factores genéticos, y los animales presentan características propias de la diabetes tipo 2 humana	La homogeneidad y herencia monogénica de estos modelos no se parece a la heterogeneidad de la diabetes humana
	La mayoría de los modelos animales tienen una carga genética homogénea y los factores ambientales son controlables, lo que permite una fácil disección genética de esta enfermedad multifactorial	Disponibilidad limitada y elevado coste La mortalidad debida a la cetosis es elevada en el caso de los animales con páncreas frágil (ratón db/db, rata ZDF, primate obeso, etc) y requiere tratamiento precoz con insulina para la supervivencia
	La variabilidad de los resultados es mínima y permiten un tamaño de la muestra pequeño	Requiere un sofisticado mantenimiento
II. Animales con diabetes inducida por dieta/nutrición	El desarrollo de la diabetes asociado a la obesidad como resultado de la sobrenutrición, como ocurre en la población humana	La mayoría necesita un periodo largo de tratamiento dietético No desarrollan una hiperglucemia elevada en animales normales genéticamente, por lo que no son adecuados para evaluar el efecto de agentes antidiabéticos sobre la glucemia
	Permite evitar la toxicidad de los agentes químicos sobre otros órganos vitales	
III. Animales con diabetes inducida químicamente	Destrucción selectiva de las células beta pancreáticas (aloxano/STZ)	La hiperglucemia es la consecuencia de la ausencia de insulina y no a la resistencia a la insulina
	La secreción residual de insulina permite a los animales vivir largo tiempo sin necesidad de insulina	La diabetes es a veces poco estable, y a veces reversible por regeneración espontánea de las células beta. Se debe comprobar la función beta pancreática en experimentos a largo plazo
	La cetosis y consecuente mortalidad es relativamente baja	
	Barato y fácil	Los agentes químicos son tóxicos sobre otros órganos La variabilidad de los resultados sobre el desarrollo de la hiperglucemia puede ser alta

IV. Animales con diabetes quirúrgica	Evita los efectos tóxicos de los agentes químicos sobre otros órganos	Las técnicas quirúrgicas y los cuidados postquirúrgicos son complejos
	Se asemeja a la diabetes humana tipo 2 debida a la reducción de la masa celular beta pancreática	Problemas digestivos por resección páncreas exocrino Posible afectación de los islotes alfa Mortalidad elevada
V. Animales diabéticos transgénicos/KO	Permite investigar <i>in vivo</i> el efecto de un único gen o mutación	Procedimientos para la producción y mantenimiento altamente costosos y sofisticados
	La disección de la compleja genética de la diabetes tipo 2 se hace más fácil	Experimentos para screening muy caros

2. Mecanismos reguladores de la reactividad vascular

La reactividad vascular está regulada por una compleja interacción entre diversas sustancias, vasoconstrictoras y vasodilatadoras, liberadas desde el endotelio, el músculo liso de la pared vascular, las terminaciones nerviosas perivasculares y las células sanguíneas. En condiciones patológicas, la alteración de la regulación de los diferentes agentes vasoactivos puede provocar disfunción endotelial, remodelado vascular e inflamación vascular, pudiendo desempeñar un importante papel en la fisiopatología de enfermedades cardiovasculares como arterioesclerosis, hipertensión arterial, vasculopatía diabética (Grover-Páez y Zavalza-Gómez, 2009).

Los vasos sanguíneos están formados por una capa externa o adventicia y una capa media formada por células musculares lisas de potencia variable. Además, en la parte más interna se localiza la capa íntima, formada por el endotelio y una membrana basal. El endotelio presenta una estructura variable según el tipo de vaso (arterial o venoso, grandes vasos, medianos o

microvasos) y el territorio (cerrado, continuo, discontinuo o fenestrado). Las células endoteliales forman una monocapa continua que tapiza la cara luminal interna de las arterias, las venas, los capilares y los vasos linfáticos de los mamíferos, con una estructura muy organizada que asegura el acoplamiento funcional entre ellas. En la célula endotelial podemos encontrar dos zonas especializadas, la apical o luminal y la basal que interacciona con las proteínas de la matriz extracelular de la lámina basal a la que está firmemente adherida, anclando las células al subendotelio. La matriz extracelular está compuesta fundamentalmente por glucoproteínas (laminina, fibronectina, vitronectina, trombospondina, entactina, trombomodulina, heparan sulfato y factor von Willebrand, entre otros).

Inicialmente se pensaba que el endotelio era una simple barrera inerte entre la sangre y la pared vascular. Sin embargo, a partir de la década de los 80 el endotelio es considerado como un verdadero órgano con importantísimas funciones. El endotelio tiene un peso estimado de casi 3.5 kg (5% del peso corporal total en un adulto de 70 kg), y sus células consumen gran cantidad de energía, fruto de su activo metabolismo. En condiciones fisiológicas, el endotelio actúa como un regulador de la contracción vascular, adhesión leucocitaria, crecimiento de las células del músculo liso vascular y agregación plaquetar a través de la producción de una serie de moléculas activas biológicamente (Palmer *et al.*, 1987). El endotelio mantiene un balance entre la inhibición y la estimulación de la proliferación y migración de las células musculares lisas, entre la prevención y la promoción de la adhesión y agregación plaquetar y entre la trombogénesis y trombolisis, y también mantiene un equilibrio entre los vasodilatadores y vasoconstrictores (Félétou y

Vanhoutte 2009; Figura 3). El endotelio también desempeña otro tipo de acciones fisiológicas como son la recaptación y metabolización de la 5-HT y de la noradrenalina circulante, la conversión de la angiotensina I en angiotensina II, el metabolismo de la bradiquinina, así como la liberación de noradrenalina por las terminaciones nerviosas adrenérgicas (Cohen y Weisbrod, 1988)

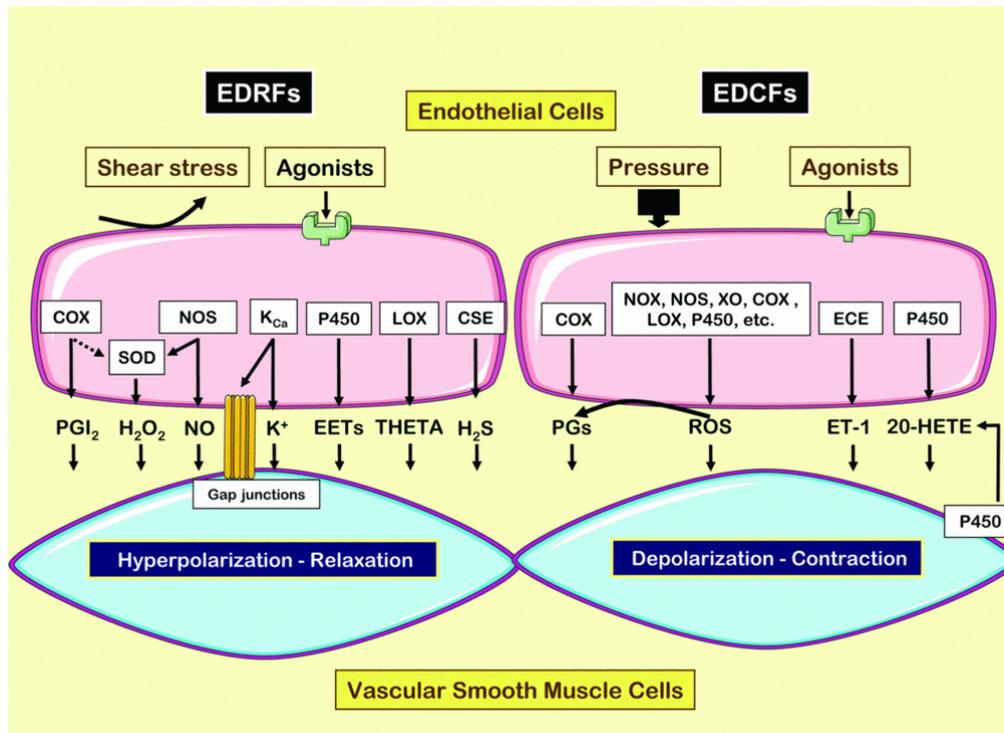


Figura 3. Relajaciones y contracciones dependientes del endotelio (tomado de Félétou y Vanhoutte, 2009)

La membrana de las células endoteliales tiene una gran variedad de receptores frente a numerosas sustancias vasoactivas, lo que hace que numerosas actividades fisiológicas tengan al endotelio como escenario, y que la disfunción endotelial esté involucrada en numerosas patologías.

Las células endoteliales producen tres sustancias principales con acción vasodilatadora: óxido nítrico (NO), factor hiperpolarizante (EDHF) y prostanoïdes como la prostaciclina (prostaglandina I₂). Pero el tono y la estructura del sistema vascular están regulados también por sustancias vasoconstrictoras sintetizadas por el mismo endotelio, manteniendo un delicado equilibrio con las sustancias vasodilatadoras. Los representantes más interesantes, si bien no los únicos, son la endotelina, la angiotensina II y los prostanoïdes vasoconstrictores (tromboxano A₂, prostaglandina F_{2α}, etc.). El NO y los prostanoïdes intervienen en multitud de procesos fisiopatológicos, y entre ellos la inflamación y la arterioesclerosis. El NO modula la actividad de la ciclooxigenasas (COX) y altera la producción de prostanoïdes (Upmacis *et al.*, 2006).

2.1. Óxido nítrico

En 1980, Furchgott y Zawadski descubrieron que la relajación de los segmentos arteriales de aorta en respuesta a los agonistas se producía solamente si la capa de células endoteliales permanecía intacta. Concluyeron que las células endoteliales liberaban un agente capaz de relajar el músculo liso subyacente que denominaron factor de relajación derivado del endotelio o EDRF. Siete años después, Palmer y colaboradores identificaron este agente como el NO (Palmer *et al.*, 1987).

El NO es una molécula pequeña, en estado gaseoso, compuesta por un átomo de nitrógeno y uno de oxígeno y que contiene un electrón desapareado. Estas características hacen que el NO sea un mensajero ideal: por ser una molécula no cargada puede difundir libremente a través de las membranas.

Además, el hecho de poseer un electrón desapareado hace que sea un radical y por tanto que sea muy reactivo (Lowenstein *et al.*, 1994) Por último, tras transmitir una señal, su tiempo de vida es muy corto, apenas 3 a 5 seg., transformándose en formas inactivas como el nitrito y el nitrato. La oxihemoglobina y los radicales libres del O₂ son las principales moléculas que catalizan esta reacción. Esta es la razón por la que el NO no puede actuar a distancia y sólo lo hace a nivel local (acción paracrina). A su vez actúa sobre la propia célula endotelial generadora, limitando su formación (acción autocrina) en un típico mecanismo autoregulator de retroalimentación negativa.

El NO se sintetiza por la enzima NO-sintasa (NOS) que convierte el aminoácido L-arginina y el oxígeno en citrulina y NO. Existen tres isoformas de la NOS (Moncada *et al.*, 1997): la endotelial (eNOS) y la neuronal (nNOS) que son constitutivas, y una isoforma inducible (iNOS). Las isoformas constitutivas se sitúan en el endotelio vascular, son Ca²⁺ y calmodulina dependientes (Veelken *et al.*, 2000). Son inactivas hasta que los niveles de calcio intracelulares aumentan, la proteína de unión al calcio, calmodulina, se une al calcio y el complejo se une y activa la óxido nítrico sintasa. Las isoformas constitutivas sintetizan entonces pequeñas cantidades de NO hasta que los niveles de calcio disminuyen. La isoforma iNOS, calcio independiente, se expresa tras varios estímulos inflamatorios en las células endoteliales, células musculares lisas de la pared vascular y macrófagos. La cantidad de NO generado por la NOS inducible es siempre mayor que la generada por la NOS constitutiva (Moncada *et al.*, 1987).

El NO se produce normalmente en muchos tipos de células, entre ellas

las endoteliales, y es capaz de regular una gran cantidad de procesos biológicos. Al revés de lo que sucede con la mayoría de las moléculas que transmiten señales entre células (hormonas, neurotransmisores y factores de crecimiento), el NO difunde fuera de la célula que lo ha generado y penetra en las células diana donde interacciona con sus dianas moleculares específicas a través de receptores específicos asociados a la membrana plasmática. Tiene funciones que varían desde la neurotransmisión hasta la vasodilatación. En muchos casos lleva a cabo sus efectos biológicos bien activando la guanilato ciclasa e incrementando la síntesis de GMP cíclico a partir de GTP, bien a través de mecanismos independientes de GMP cíclico: interacción con metales de transición, radicales libres, ácidos grasos insaturados y otras moléculas. Algunas de estas reacciones dan como resultado la oxidación del óxido nítrico a nitritos o nitratos para finalizar su acción mientras que otras pueden alterar la estructura de proteínas, su función y/o capacidad catalítica.

Los vasos sanguíneos se encuentran en un estado constante de dilatación activa mediada por NO. El NO liberado basalmente por las células endoteliales, ejerce una acción tónica relajante sobre el músculo liso vascular que va a mantener un cierto tono de vasorrelajación necesario para preservar el flujo sanguíneo local. Por tanto el NO tiene un papel preponderante en el mantenimiento del tono basal del sistema cardiovascular. Esta importante acción del NO se demuestra utilizando análogos de L-Arginina que inhiben competitivamente su síntesis, como el LNMMA o el LNAME (Tolins *et al.*, 1990; Cardillo *et al.*, 2000). El NO es un autorregulador del flujo sanguíneo; regula el flujo sanguíneo en el cerebro (Toda *et al.*, 1990; Tanaka *et al.*, 1991), corazón (Amezcuca *et al.*, 1989; Jones y Brody, 1992), pulmón (Fineman *et al.*, 1991),

tracto gastrointestinal (Iwata *et al.*, 1992) y riñones (Yukimura *et al.*, 1992). Ajusta de forma automática el flujo sanguíneo en respuesta a cambios locales en algunas regiones del sistema vascular. Algunos de estos factores físicos a los que las células endoteliales responden con un aumento de la producción de NO son: la isquemia, estrés por fricción o cizallamiento, incremento del flujo sanguíneo a través del vaso. Factores liberados localmente por el tejido adyacente, como bradiquinina o acetilcolina, también pueden inducir la liberación de NO en algunos vasos pero no en otros. La liberación de NO en el sistema vascular también está controlada por el sistema nervioso autónomo. Los nervios parasimpáticos expresan óxido nítrico sintasa y terminan en la adventicia de algunos vasos, como las arterias cerebrales y retinianas (Nozaki *et al.*, 1993). Los nervios liberan NO y difunden en la túnica media muscular del vaso, causando vasorrelajación (Lowenstein *et al.*, 1994).

La síntesis de L-arginina, el sustrato de la óxido nítrico sintasa y por tanto el precursor del NO, es producida principalmente por el túbulo contorneado proximal del riñón y entra en la circulación sistémica contribuyendo al mantenimiento de los niveles constantes de L-arginina para que puedan ser utilizados por otros órganos. (Levillain *et al.*, 1990).

Son muchas las enfermedades que son debidas a una deficiencia cuantitativa o funcional de NO. Una insuficiencia de NO se caracteriza por un déficit neto de NO tisular, inactivación de NO aumentada, biodisponibilidad de NO reducida o catálisis de NOS alterada. En todos estos casos, una deficiencia de NO limitaría la señal de transducción dependiente de NO en detrimento de la función celular normal (Napoli y Ignarro, 2003).

2.2. EDHF

Además del NO y la prostaciclina, el endotelio puede liberar uno o varios factores no identificados todavía que inducen la relajación vascular al producir la hiperpolarización de la membrana de las células del músculo liso y que se han denominado como EDHF (Félétou y Vanhoutte, 2005). La primera referencia que se tiene del factor hiperpolarizante de las células del músculo liso dependiente de endotelio (EDHF) es de 1984 (Bolton *et al.*, 1984). Sucesivos estudios revelaron que el EDHF era responsable de la respuesta vasodilatadora mantenida cuando se bloqueaba la acción de la NO sintasa y la ciclooxigenasa (Chen *et al.*, 1988; Taylor y Weston, 1988 Corriu *et al.*, 1996; Murphy y Brayden, 1995). La característica que define la respuesta atribuida al EDHF es que la relajación del músculo liso vascular siempre va acompañada de una hiperpolarización de gran amplitud que produce vasorrelajación a través de la apertura de los canales de potasio.

A pesar de los numerosos estudios realizados para identificar el factor específico responsable de la hiperpolarización dependiente de endotelio se desconoce su estructura química. Se ha propuesto una amplia variedad de factores para desempeñar este papel (Fitzgerald *et al.*, 2005; Félétou y Vanhoutte, 2005): iones potasio (K^+), el ácido epoxieicosatrienoico (EETs), el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el péptido natriurético tipo C, el monóxido de carbono (CO), etc.

A diferencia del NO que produce una relajación mantenida del músculo liso vascular, la relajación que produce el EDHF es transitoria (Suzuki *et al.*, 1992). La hiperpolarización inducida por el EDHF parece ser debida a un

incremento en la conductancia al K^+ en la membrana del músculo liso vascular, ya que el EDHF liberado por las células endoteliales va a activar determinados canales de K^+ en las células musculares lisas. El NO o la prostaciclina también pueden producir hiperpolarización en algunos vasos sanguíneos pero esta respuesta es bloqueada por la glibenclamida (Corriu *et al.*, 1996; Murphy y Brayden, 1995), sugiriendo la implicación de los canales de K^+ dependientes de ATP en este efecto. Sin embargo, la hiperpolarización inducida por el EDHF es insensible a la glibenclamida pero dependiendo del tejido es inhibida por tetraetilamonio (TEA) (Kamata *et al.*, 1995), apamina (Murphy y Brayden, 1995) o la combinación de apamina y charibdotoxina (Córriu *et al.*, 1996), indicando que serían los canales de K^+ dependientes de calcio (K_{Ca}) probablemente los que estarían implicados en esta respuesta. Hay tres tipos de K_{Ca} : canales de gran conductancia (BK_{Ca}), canales de conductancia intermedia (IK_{Ca}) y de baja conductancia (SK_{Ca}). Todos ellos están presentes en la pared vascular pero con una localización celular y subcelular muy específica. Los BK_{Ca} se expresan principalmente en las células del músculo liso vascular y muy poco en las células endoteliales. Por el contrario, los canales IK_{Ca} y SK_{Ca} se expresan muy poco en las células del músculo liso vascular pero se expresan constitutivamente en las células endoteliales (Félétou y Vanhoutte, 2009; Figura 4). Los canales SK_{Ca} se encuentran abundantemente distribuidos sobre la membrana plasmática, con una localización preferencial en los sitios donde existen uniones tipo GAP y dominios de conexinas (Cx) entre las células endoteliales. Los canales IK_{Ca} se localizan preferentemente en las proyecciones endoteliales a través de la lámina elástica interna y que forma las uniones mioendoteliales de tipo GAP.

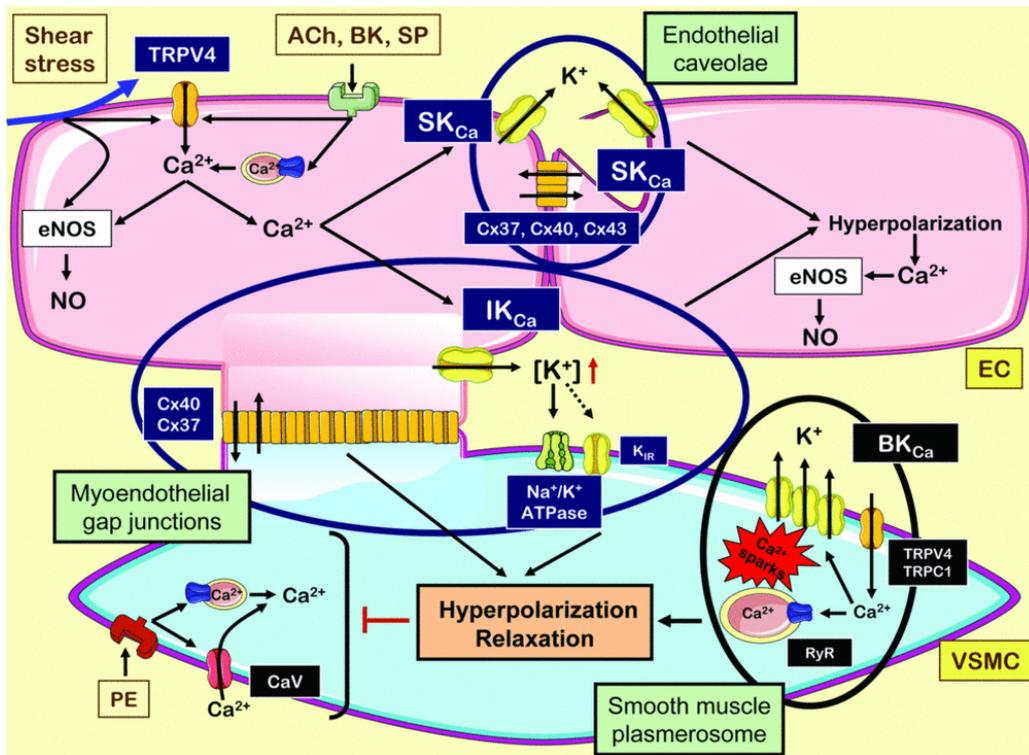


Figura 4. Canales de K^+ dependientes del Ca^{2+} (K_{Ca}) en el lecho vascular y respuestas mediadas por EDHF (tomado de Félétou y Vanhoutte, 2009; explicación: ver texto)

Los canales SK_{Ca} y IK_{Ca} de las células endoteliales pueden activarse por distintos estímulos, aunque todos tienen en común que producen un aumento del Ca^{2+} intracelular en la célula endotelial. La apertura de dichos canales provoca la salida de K^+ desde el interior de la célula endotelial al líquido extracelular, con la consiguiente hiperpolarización de la membrana de la célula endotelial. Las uniones mioendoteliales de tipo GAP juegan un papel fundamental en la transmisión de la despolarización de la membrana endotelial a la célula muscular lisa. Cuanto menor es el calibre del vaso, mayor es la cantidad de uniones mioendoteliales de tipo GAP y mayor es la contribución del EDHF en la relajación mediada por el endotelio (Félétou y Vanhoutte, 2009).

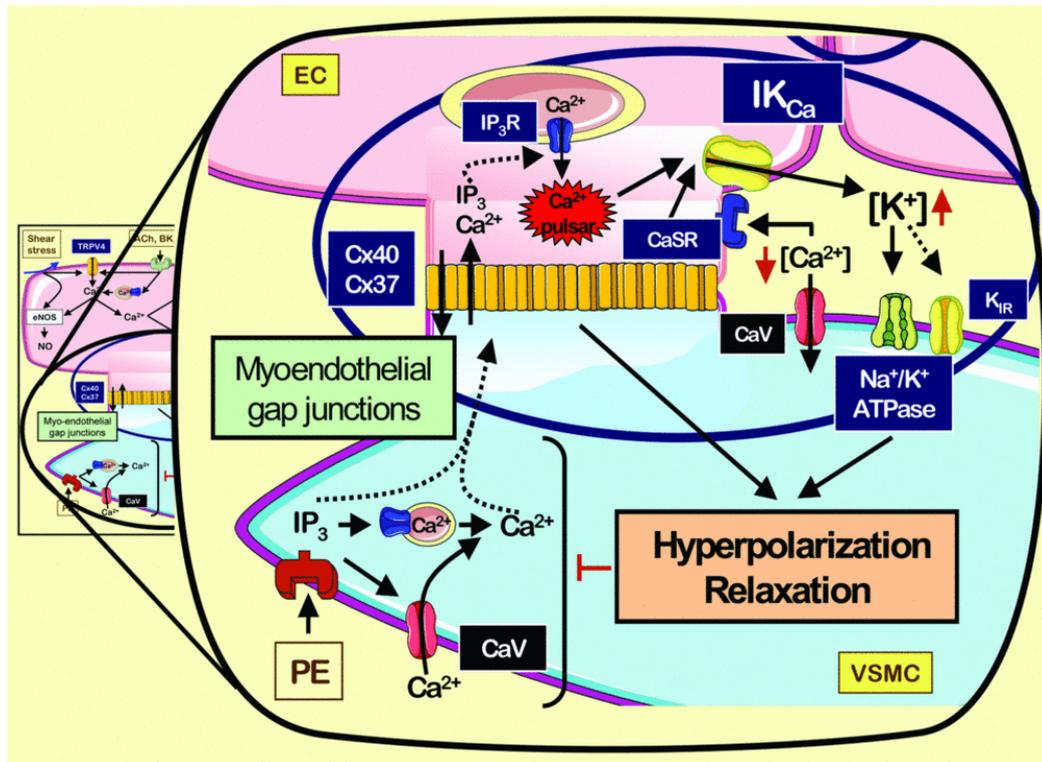


Figura 5. Proyecciones mioendoteliales (tomado de Félétou y Vanhoutte, 2009; explicación: ver texto)

Las uniones mioendoteliales de tipo GAP permiten la comunicación entre la célula endotelial y la célula muscular lisa, bien físicamente, ya que el Ca²⁺ y el inositol 1,4,5 trifosfato (IP₃) pueden difundir a su través de una célula a otra, o bien eléctricamente, ya que tanto la despolarización como la hiperpolarización se conducen a su través bidireccionalmente (Félétou y Vanhoutte, 2009; Figura 5). Adicionalmente, la salida de K⁺ asociada con la activación de los canales K_{Ca} endoteliales puede contribuir a la relajación inducida por EDHF, ya que al aumentar moderadamente la concentración extracelular de K⁺ (de 1 a 15 mmol/l) puede provocar la relajación de la célula muscular lisa como consecuencia de la apertura de canales de K⁺ rectificadores de entrada (K_{IR}) y consiguiente hiperpolarización por entrada de

K⁺ al interior de la célula muscular.

Las uniones mioendoteliales de tipo GAP pueden jugar un importante papel en la regulación "fina" de la reactividad vascular. Así, por ejemplo, la estimulación de la célula muscular lisa por agentes contráctiles, por ejemplo, fenilefrina, aumenta la concentración intracelular de Ca²⁺ vía formación de IP₃ y liberación de Ca²⁺ del retículo sarcoplásmico y vía entrada de Ca²⁺ a través de canales de Ca²⁺ dependientes de voltaje. Con el fin de evitar una contracción excesiva, se ponen en marcha una serie de mecanismos de retroalimentación (feedback) negativa que tienden a producir la hiperpolarización del músculo liso, disminuyendo el tono vascular. Estos mecanismos implican la difusión del IP₃ y Ca²⁺ desde la célula muscular al endotelio, con la consiguiente activación de los canales IK_{Ca} y SK_{Ca} y posterior hiperpolarización endotelial que activaría, por los mecanismos antes descritos, la hiperpolarización muscular y relajación (Félétou y Vanhoutte, 2009; Figura 5).

2.3. Prostanoides

En 1930 Kurzrok y Lieb notificaron que el semen humano producía cierto estado de relajación en algunos segmentos del útero de la mujer si ésta ya había estado embarazada, pero ejercía el efecto contrario en mujeres estériles. Posteriormente, Ulf von Euler demostró que ciertas sustancias lipídicas extraídas de las glándulas prostáticas del carnero eran capaces de estimular ciertos músculos lisos no vasculares. Las denominaron prostaglandinas (von Euler, 1936).

Se han denominado eicosanoides a las familias de prostaglandinas,

leucotrienos y compuestos similares que derivan de ácidos grasos esenciales poliinsaturados de 20 carbonos que contienen 3, 4 ó 5 enlaces dobles. En los seres humanos, el ácido araquidónico es el precursor más abundante y proviene del ácido linoleico de los alimentos o se ingiere como parte de la dieta. El ácido araquidónico se esterifica hasta generar fosfolípidos en las membranas celulares u otros lípidos complejos. En la célula su concentración libre es muy pequeña y, por ello, la biosíntesis de eicosanoides depende de su disponibilidad para que sobre ellos actúen enzimas que los sintetizan; esto es consecuencia de su liberación desde los depósitos celulares de lípidos por acción de la fosfolipasa A₂. El ácido araquidónico, liberado por los fosfolípidos de la membrana celular, es el precursor de un conjunto de sustancias fisiológicamente activas, obtenidas a través de dos vías metabólicas, la ciclooxigenasa (COX) y la lipooxigenasa. La vía de la ciclooxigenasa es inhibida por la aspirina y la indometacina y produce una serie de prostaglandinas, entre las que se encuentran la prostaciclina, el tromboxano A₂ y la prostaglandina F_{2α}. La vía de la lipooxigenasa lleva a la formación de diversos endoperóxidos y leucotrienos entre los que se encuentran el ácido epoxieicosatrienoico (EET) y el ácido graso 20-hidroxieicosatetraenoico (20-HETE) (Figura 6). Estas sustancias tienen, con frecuencia, acciones antagónicas, entre las que cabe destacar vasodilatación y vasoconstricción, broncodilatación y broncoconstricción, estimulación e inhibición de la agregación plaquetaria, etc.

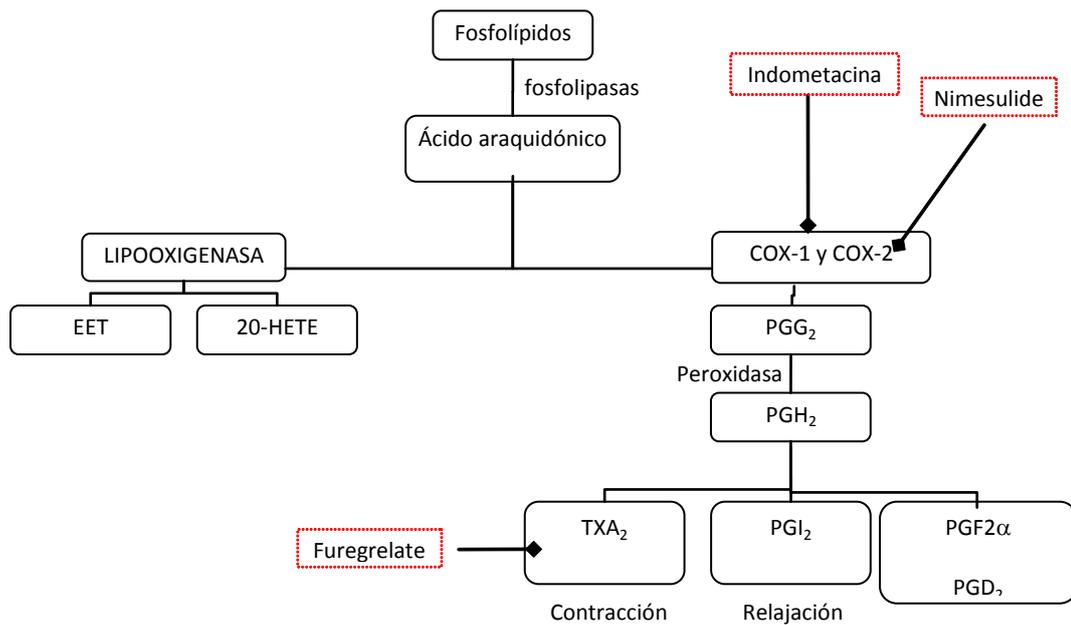


Figura 6. Metabolismo del ácido araquidónico

A principios de los años 90, Needleman y sus colaboradores descubrieron la existencia de dos isoformas de ciclooxigenasa, con diferencias notables entre ellas, tanto en distribución en los diferentes tejidos como en su papel fisiológico: COX-1 y COX-2 (Salvemini *et al.*, 1993). Los dos metabolitos vasoactivos más importantes de la vía de la COX son el tromboxano A₂, que se forma fundamentalmente por la isoforma constitutiva COX-1, y la prostaciclina, que se sintetiza fundamentalmente en las células vasculares por la COX-1 y la COX-2. El enzima COX-1 se expresa de forma constitutiva en la mayoría de los tejidos, mientras que la isoforma COX-2 es altamente inducible (Foudi *et al.*, 2009), aunque también se expresa de forma constitutiva (Dias Pereira *et al.*, 2009; Wong *et al.*, 2009).

COX-1 realiza funciones homeostáticas, manteniendo el normal

funcionamiento del riñón, la integridad de la mucosa gástrica y la hemostasia. Se localiza en altas concentraciones en las plaquetas, células del endotelio vascular, mucosa gástrica y en el túbulo colector de las nefronas. Dichas concentraciones permanecen constantes, aunque también pueden incrementarse levemente por el estímulo de factores de crecimiento y ciertas hormonas.

COX-2 se localiza en numerosos tejidos (cerebro, órganos reproductores, hígado, hueso, aparato digestivo, riñón) a unas concentraciones bajas y constantes, pero determinados estímulos (interleuquina-1, factor de necrosis tumoral, liposacáridos, mitógenos, AMPc) son capaces de inducir una elevación importante de su concentración en los tejidos. Por ello, a la COX-2 se la considera un enzima inducible, capaz de incrementar sus niveles frente a estímulos inflamatorios o fisiológicos. Además de desempeñar funciones fisiológicas en los tejidos, la COX-2 es la responsable de la producción de las prostaglandinas que median en la inflamación, el dolor, el edema y la fiebre.

A nivel renal, COX-2 adquiere mayor relevancia por su papel en el mantenimiento del tono vasodilatador aferente y eferente a través de la síntesis de prostaglandinas. Recientemente se ha visto que ambas isoformas (COX-1 y COX-2) se expresan de forma constitutiva en todas las regiones del riñón humano adulto pero con una localización celular distinta. COX-1 se asocia con los túbulos colectores mientras que COX-2 se asocia con la túnica media del músculo liso y los pericitos vasculares de todos los segmentos vasculares pre y postglomerulares (Therland *et al.*, 2004). Tras el nacimiento, se ha demostrado que la baja expresión renal de COX-2 se incrementa rápidamente en las dos

primeras semanas postnatales y disminuye progresivamente hasta niveles más bajos en los conejos adultos normales (Schumacher *et al.*, 2002).

La diversidad de los efectos de los prostanoïdes se explica por la existencia de receptores característicos que median sus acciones. Las prostaglandinas E_2 e I_2 generadas localmente, modulan el tono vascular. La prostaglandina I_2 (prostaciclina) producida por el endotelio vascular es liberada por fuerzas de fricción y también por autacoides vasoconstrictores y vasodilatadores; al parecer, antagoniza los efectos de autacoides vasoconstrictores circulantes para conservar el flujo arterial a órganos vitales y para mediar una parte de la dilatación causada por otros autacoides (Aiken y Vane, 1973).

Los endoperóxidos de prostaglandina generan efectos variables en los lechos vasculares; sus manifestaciones mayores son consecuencia de su actividad vasoconstrictora intrínseca, asociada a la vasodilatación por conversión rápida en prostaglandina vasodilatadora (tal vez prostaciclina). El tromboxano A_2 es un vasoconstrictor potente y participa en la agregación plaquetar y contracción vascular; *in vitro* contrae el músculo liso vascular (Bhagwat *et al.*, 1985) y es un vasoconstrictor en el animal entero y en lechos vasculares aislados y aumenta la producción de endotelina-1. Algunos estudios sugieren un importante papel para el tromboxano A_2 en el control del tono vascular en determinadas situaciones fisiopatológicas. Teniendo en cuenta que la producción de tromboxano A_2 , así como la de su precursor la prostaglandina H_2 , puede ser estimulada por la mayoría de los sistemas presores y potenciar las respuestas vasoconstrictoras de estos sistemas, un incremento de su

síntesis podría participar en el desarrollo y las complicaciones vasculares.

La prostaciclina es soluble en lípidos y muy inestable en el organismo. Tras su producción en las células endoteliales actúa como vasodilatador y anticoagulante local. Produce vasorrelajación predominantemente por la vía de la adenilato ciclasa y el sistema de transducción del AMP cíclico (Kukovetz *et al.*, 1979; Ignarro *et al.*, 1985). Aunque la prostaciclina es capaz de relajar el músculo liso vascular mediante mecanismos independientes del cambio del potencial de membrana (por ejemplo, reduciendo el calcio citoplasmático y suprimiendo la sensibilidad del aparato contráctil al Ca^{2+}), la hiperpolarización juega un papel importante (Parkington *et al.*, 2002). La prostaciclina actúa a través del aumento del AMP cíclico en sinergia con el NO, a nivel del músculo liso vascular y plaquetas.

3. Disfunción endotelial en la diabetes

Como se ha dicho anteriormente, el endotelio juega un papel clave en la regulación del tono arterial y del flujo mediante la liberación de sustancias vasoconstrictoras (endotelina, angiotensina II, tromboxano A_2 , etc.), que mantienen un delicado equilibrio con las sustancias vasodilatadoras (prostaciclina, NO, EDHF, etc.). Se denomina disfunción endotelial a la pérdida de la capacidad del endotelio para mantener adecuadamente la homeostasis vascular (Grover-Páez y Zavalza-Gómez, 2009; Ding y Triggle, 2010; Tabit *et al.*, 2010). Aunque este término se usa a menudo para referirse a una menor biodisponibilidad de NO, la disfunción endotelial también incluye un aumento en la producción de vasoconstrictores y una alteración en la regulación de la inflamación, la trombosis y el crecimiento celular en la pared vascular que

pueden acabar condicionando la aterosclerosis, caracterizada por un engrosamiento de la túnica íntima con placas que contienen macrófagos llenos de lípidos, grasas, principalmente el colesterol. En la disfunción endotelial hay una pérdida de vasodilatadores, con lo que el tono vascular aumenta. Como además en esas condiciones suele haber un aumento en la producción endotelial de endotelina-1 y otros vasoconstrictores endoteliales, se produce un vasoespasmo y un aumento de la rigidez arterial.

Un factor clave para la producción endotelial de NO es la fuerza de fricción ("shear stress"), que se refiere a la fricción que se produce en las células endoteliales como consecuencia del flujo de sangre. Esta fuerza de fricción es directamente proporcional al flujo arterial, e inversamente proporcional a la tercera potencia del diámetro arterial (Malek *et al.*, 1999; Figura 7A). Por tanto, para un nivel dado de flujo, un pequeño cambio de diámetro produce una gran modificación de esta fuerza. Diversos estudios han demostrado que el "shear stress" oscila entre 1-6 dyn/cm² en el sistema venoso, y entre 10-70 dyn/cm² en el sistema arterial (Figura 7B). En arterias de conductancia sanas, un aumento del flujo arterial estimula una dilatación mediada por flujo. El aumento resultante del diámetro del vaso actúa de una manera homeostática para limitar el aumento de la fuerza de fricción consecuencia del aumento del flujo. Esta dilatación mediada por flujo es un buen indicador de función endotelial en estudios clínicos, y se ha observado que está alterada en enfermos diabéticos (Widlansky *et al.*, 2003).

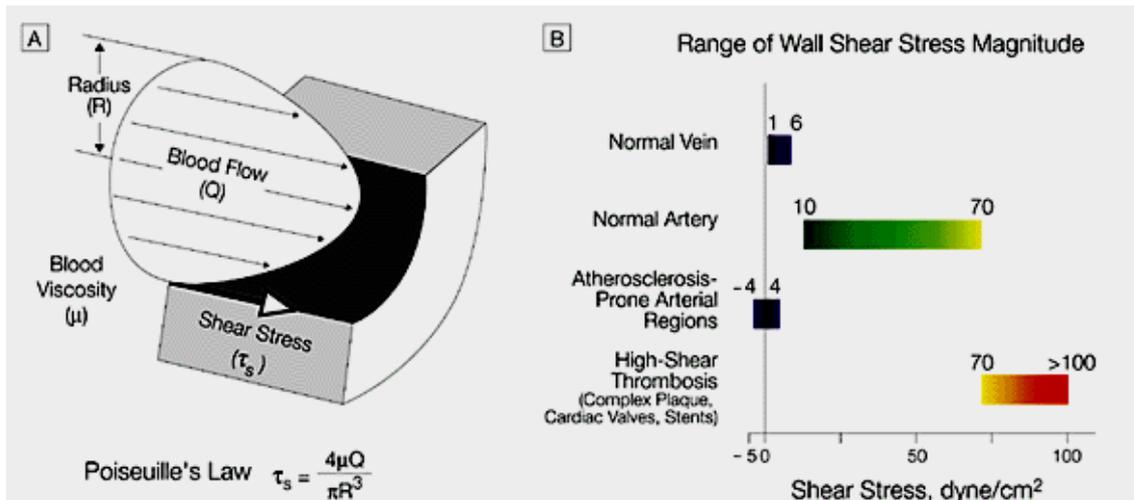


Figura 7. "Shear stress" hemodinámico (Malek *et al.*, 1999). A, sección transversal de un vaso sanguíneo representando el "shear stress", donde τ_s es la fuerza de fricción por unidad de superficie actuando sobre la cara interna del vaso y sobre la superficie del endotelio como consecuencia del flujo de sangre viscosa.. B, diagrama que representa el rango de valores de "shear stress" de las venas, arterias, y en estados patológicos de bajo y alto "shear stress".

El endotelio también juega un papel importante en el remodelado vascular en respuesta a cambios crónicos de flujo sanguíneo (Silver y Vita, 2006; Korshunov *et al.*, 2007). Este remodelado es estimulado por cambios en las fuerzas de fricción, e implica una compleja interacción entre factores vasodilatadores, inflamación local y factores que modifican la matriz intercelular. En la diabetes se produce también una alteración de esta función de remodelado, y explica que la aterosclerosis se produzca de forma difusa estrechando y reduciendo el calibre vascular (Silver y Vita, 2006).

Otra función importante del endotelio es la regulación del tono en los vasos de resistencia que controlan el flujo sanguíneo tisular y mantienen el balance entre flujo sanguíneo y necesidades tisulares (Tabit *et al.*, 2010). Este complejo proceso depende en gran parte de vasodilatadores endotelio-

independientes, como la adenosina, que dilata los vasos de resistencia y aumenta el flujo tisular en respuesta a un aumento de la demanda de oxígeno. Sin embargo, el NO endotelial también contribuye a la vasodilatación mediada por la isquemia y a la respuesta hiperémica al ejercicio. Por este mecanismo, la disfunción endotelial puede afectar a la regulación de flujo local, y puede contribuir a la mala adaptación al ejercicio que ocurre en ciertos estados patológicos como insuficiencia cardíaca o vasculopatía periférica (diabetes).

En la patogenia de la aterosclerosis también juega un papel importante la inflamación. En condiciones fisiológicas el NO previene la adhesión leucocitaria y mantiene al endotelio en un estado quiescente, antiinflamatorio. En presencia de factores de riesgo, el endotelio puede expresar moléculas de adhesión, tales como la molécula de adhesión a la célula vascular 1 (VCAM-1) y la molécula de adhesión intercelular-1 (ICAM-1) que son necesarias para la adhesión de los leucocitos a la superficie endotelial. El endotelio activado también expresa factores quimiotácticos, como la proteína quimioatrayente de los monocitos 1 y otras citocinas proinflamatorias (factor de necrosis tumoral beta, TNF- β) que contribuyen a la inflamación de la pared arterial y promueve la aterosclerosis.

El endotelio produce una serie de factores protrombóticos, como el inhibidor del activador del plasminógeno 1 (PAI-1), tromboxano, factor tisular y factor von Willebrand, que están en equilibrio con una serie de factores antitrombóticos, como el NO, heparanos, prostaciclina, activador del plasminógeno tisular y trombomodulina (Widlansky *et al.*, 2003; Tabit *et al.*, 2010). Diversos factores de riesgo, incluyendo la diabetes, están asociados con

un cambio en este balance hacia un estado protrombótico antifibrinolítico.

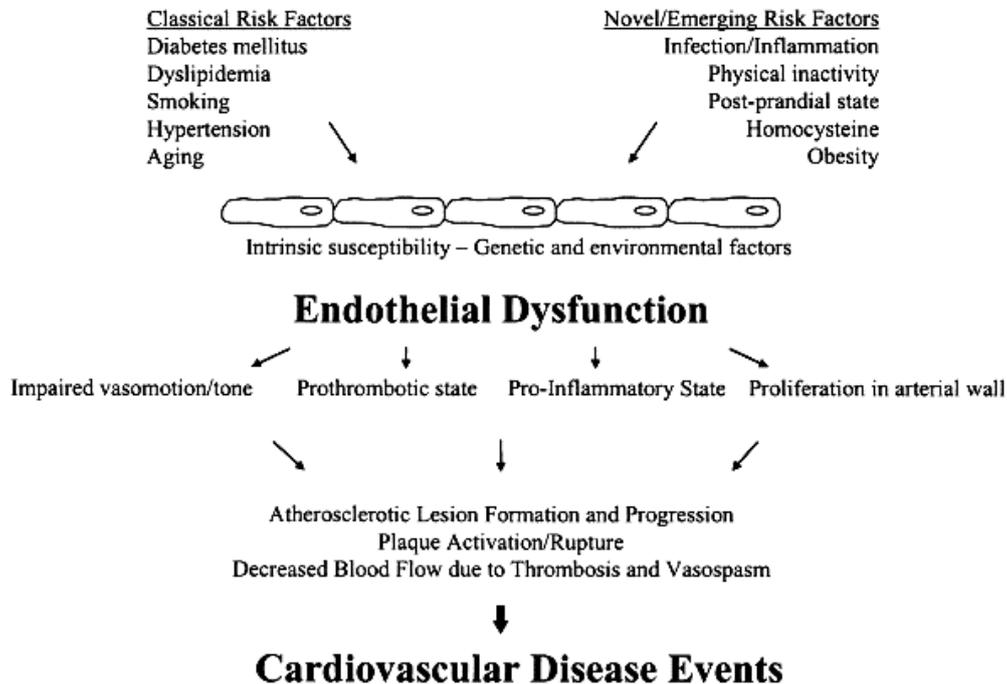


Figura 8. Papel de la disfunción endotelial en la patogénesis de la enfermedad cardiovascular (tomado de Widlansky *et al.*, 2003).

En resumen (Figura 8), la disfunción endotelial contribuye a la patogénesis de la enfermedad vascular arterioesclerótica promoviendo inflamación vascular, mitogénesis, adhesión de leucocitos, trombosis, estrechamiento de la luz arterial, y alteración de la regulación del tono arterial y del flujo. La disfunción endotelial se ha descrito en diversas alteraciones metabólicas y cardiovasculares, tales como hipertensión, enfermedad coronaria, dislipemia y diabetes tipo 1 y 2. Teniendo en cuenta que la diabetes es un importantísimo factor de riesgo cardiovascular no es sorprendente que numerosos estudios clínicos hayan establecido la relación entre la diabetes y la disfunción endotelial (Grover-Páez y Zavalza-Gómez, 2009; Tabit *et al.*, 2010).

Los mecanismos implicados en la disfunción endotelial en la diabetes son (Figura 9): 1) formación de productos finales de la glicosilación avanzada (AGEs); 2) disminución de la biodisponibilidad de NO mediada por la dislipemia y la hiperglucemia; 3) cambios en la liberación de Ca^{2+} operada por depósitos (SOCE, store-operated Ca^{2+} entry); y 4) memoria hiperglucémica (Ding y Triggle, 2010).

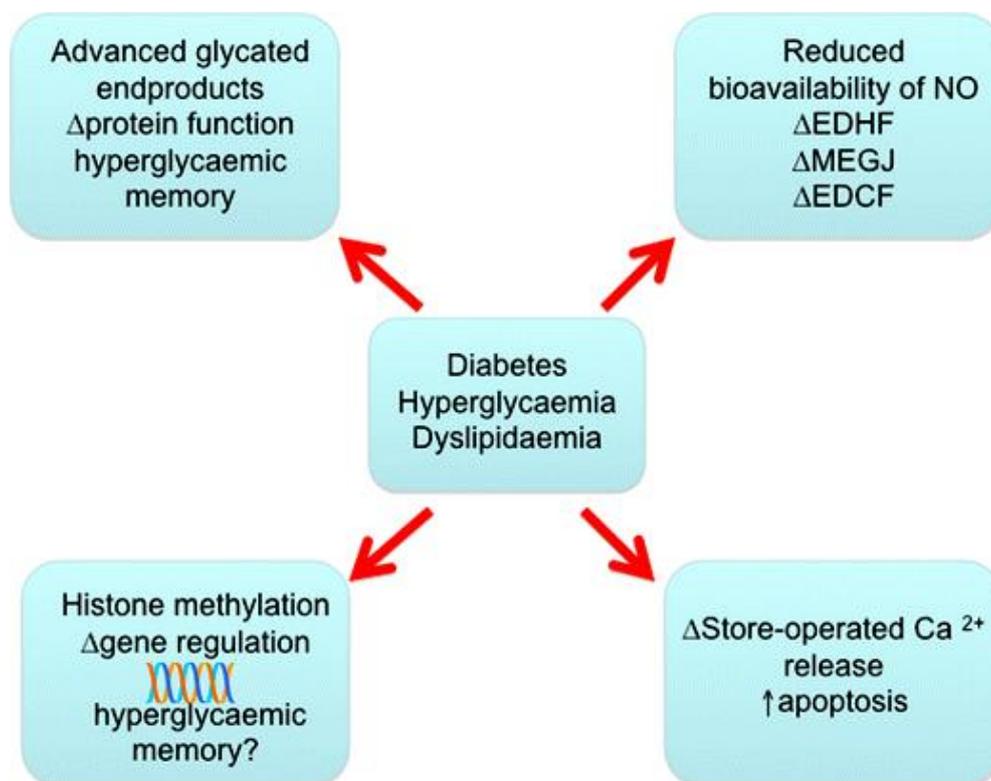


Figura 9. Disfunción endotelial en diabetes (Ding y Triggle, 2010)

Uno de los factores claves del daño endotelial en la diabetes es la hiperglucemia crónica a través de la producción de AGEs, que se forman como resultado de la glicosilación no enzimática de proteínas. La glicosilación no enzimática consiste en la reacción química de la glucosa con los grupos amino

-NH₂ de las proteínas, formando bases de Schiff. La proporción de estos productos es proporcional a la concentración de glucosa en sangre y, en cuestión de horas, se reorganizan para formar los compuestos de Amadori, más estables, alcanzándose un equilibrio en unas semanas. Un ejemplo de esta reacción de glicosilación no enzimática es la experimentada por la hemoglobina HbA1. La glicosilación de algunas proteínas puede comprometer su funcionalidad, como en el caso de las proteínas de las paredes vasculares que pueden aumentar la captación de LDL favoreciendo la aterogénesis. Además, los productos finales de la glicosilación de algunas proteínas pueden experimentar reacciones de autooxidación, conduciendo a la formación de radicales libres. Algunos productos de la glicosilación no enzimática pueden ser degradados o revertir a los productos de partida, pero los formados sobre el colágeno, el DNA y otras moléculas no sólo son irreversibles sino que incluso forman los llamados AGEs, que son estables y que se van acumulando sobre los tejidos y vasos, permaneciendo en los mismos incluso si los niveles de glucemia vuelven a la normalidad. Por este motivo los AGEs contribuyen a la llamada "memoria hiperglucémica", un fenómeno en el que, incluso después de restablecido el control glucémico en un paciente diabético, los efectos del episodio de hiperglucemia persisten durante largo tiempo debido a la activación persistente de diversos genes, y que contribuye al desarrollo de la angiopatía diabética.

4. Andrógenos

4.1. Generalidades

La testosterona es el esteroide con capacidad androgénica más importante, y se sintetiza mayoritariamente en las células de Leydig del testículo (95%), y el resto (5%) se sintetiza a nivel periférico a partir de la androstendiona producida en la corteza suprarrenal (Matsumoto, 1994). La secreción diaria de testosterona es de 5-7 mg y presenta ritmo circadiano, siendo los niveles más altos por la mañana. No está relacionado con el sueño ni con las variaciones de LH, ni con el ritmo de prolactina. Podría ser consecuencia de un ritmo circadiano endógeno a nivel de los testículos.

La testosterona tiene diversas acciones fisiológicas que se manifiestan en músculos, huesos, sistema hematopoyético, cerebro, órganos reproductores y sexuales y tejido adiposo: 1) estimula el crecimiento y mantenimiento muscular; 2) favorece el desarrollo óseo e inhibe su resorción; 3) aumenta la producción de glóbulos rojos; 4) aumenta la libido; 5) mejora el estado de ánimo y la función cognitiva; 6) favorece la función eréctil; y 7) aumenta la lipólisis. El hipogonadismo es una condición clínica en la que la hipotestosteronemia se asocia a una serie de signos y síntomas específicos, como disminución de la masa y la fuerza muscular, osteoporosis, y aumento de la grasa central; otros síntomas son más difíciles de diferenciar de los cambios derivados del envejecimiento pero no relacionados específicamente con la disminución de la concentración plasmática hormonal: cansancio, disminución de la capacidad de trabajo, pérdida de la motivación, deterioro cognitivo, disminución de la autoestima, depresión, irritabilidad, anemia, etc. (Bassil *et al.*,

2009; Bain *et al.*, 2010).

La testosterona actúa principalmente a través de 4 vías (Figura 10, Liu *et al.*, 2003). La vía de acción directa es característica del músculo esquelético, en el cual la testosterona se une y activa directamente el receptor de andrógenos citosólico. La vía de amplificación local es característica de la próstata y del folículo piloso, donde la testosterona se convierte, a través del enzima 5-alfa-reductasa, en el andrógeno más potente, la dihidrotestosterona, por su mayor capacidad de unión estable al receptor. El conocimiento de esta vía ha permitido el desarrollo de fármacos inhibidores selectivos de la 5-alfa-reductasa para el tratamiento de la hipertrofia prostática. La vía de diversificación, característica de huesos y cerebro, implica la conversión de la testosterona, a través del enzima aromatasa, en estradiol, el cual interacciona a través de los receptores ER- α o ER- β . La vía de diversificación permite a la testosterona modular sus efectos biológicos a través de los efectos que implican la vía estrogénica, que a menudo difieren de los efectos mediados por los receptores androgénicos. Finalmente, la vía de inactivación se produce principalmente en el hígado a través de su oxidación y conjugación a metabolitos biológicamente inactivos excretados por el hígado a la bilis y por los riñones a la orina en forma de 17- cetosteroides.

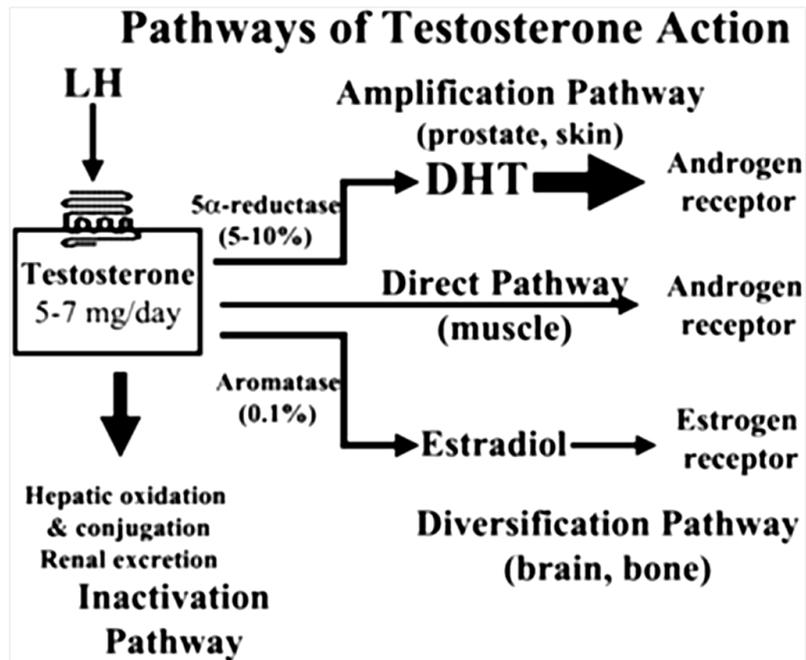


Figura 10. Vías de acción de la testosterona (Tomado de Liu *et al.*, 2003).

En el varón, la testosterona se encuentra en el plasma en tres formas: por un lado, unida con alta afinidad a la globulina transportadora de hormonas sexuales (SHBG) o también denominada globulina transportadora de testosterona y estradiol (TeBG); por otro lado, también la encontramos unida débilmente a la albúmina y otras proteínas plasmáticas; y por último, una mínima proporción se encuentra en forma de testosterona libre. Sólo la fracción de testosterona libre, que supone entre el 1 y 3 % de la testosterona total es capaz de penetrar en las células diana y unirse a su receptor (Bassas Arnau, 2009). Debido a la unión lábil entre la testosterona y la albúmina existe un fácil intercambio de ésta con la libre, por lo que tiene una alta actividad biológica. Por ello a estas dos fracciones se las denomina también testosterona biodisponible o bioactiva. La unión de la testosterona con la SHBG es muy fuerte, por lo que su actividad biológica es escasa, considerándose un depósito

circulante de hormona.

4.2. Testosterona y enfermedad vascular

El papel de los andrógenos sobre el sistema cardiovascular es controvertido. Durante mucho tiempo han estado estigmatizados por su indeseable asociación con el mal uso y abuso de esteroides anabolizantes, principalmente de los derivados 17-alquilados que tienen efectos adversos metabólicos (aumentar el LDL-colesterol), cardíacos y renales, aunque ninguno de estos efectos debe atribuirse a la testosterona (Bain, 2010). Además, existen numerosos estudios que indican la existencia de un marcado dimorfismo sexual en gran cantidad de enfermedades cardiovasculares humanas (Perusquía y Stallone, 2010): la hipertensión y la enfermedad coronaria son mucho más frecuentes en varones que en mujeres premenopáusicas, de lo que se puede deducir que la testosterona tiene efectos deletéreos sobre el corazón y el sistema vascular. Diversos estudios han sugerido una posible relación de las hormonas sexuales con los mecanismos renales que participan en el control cardiovascular que están alterados en la hipertensión, particularmente el sistema renina-angiotensina (Kienitz y Quinkler, 2008; Yanes *et al.*, 2009). Por otra parte, la mayor longevidad y el incremento de la población anciana ha aumentado enormemente el número de varones con hipogonadismo de inicio tardío, y ha atraído la atención sobre las consecuencias negativas del déficit de testosterona en diferentes sistemas orgánicos, y entre ellos, el sistema cardiovascular. Además, también es relativamente frecuente la utilización de la terapia antiandrogénica en el tratamiento del cáncer de próstata, y en especial

en aquellos que tienen metástasis, y en estos pacientes aparecen también las consecuencias negativas de la disminución de andrógenos. Numerosos estudios realizados en las dos últimas décadas han demostrado que el déficit de andrógenos está asociado a un aumento de la mortalidad y a un aumento de la enfermedad cardiovascular, existiendo una relación inversa entre la concentración plasmática de testosterona y la mortalidad por enfermedad cardiovascular (Liu *et al.*, 2003; Traish *et al.*, 2009a). La hipotestosteronemia en el anciano también está asociada con un mayor riesgo de padecer un accidente cerebrovascular (Yeap *et al.*, 2009). El tratamiento con testosterona en pacientes varones con insuficiencia cardíaca crónica mejora los síntomas y su capacidad para realizar ejercicio físico (Pugh *et al.*, 2004). No obstante, existe una cierta controversia sobre la utilidad de la terapia hormonal sustitutiva en la prevención y tratamiento de la enfermedad coronaria y de la enfermedad cerebrovascular en el varón, y sobre si los posibles beneficios superan los riesgos potenciales de dicha terapia (Bassil *et al.*, 2009; Bain *et al.*, 2010).

Existen datos clínicos y preclínicos que relacionan la disfunción endotelial y la deficiencia de andrógenos (Traish *et al.*, 2009a). Los efectos de los bajos niveles plasmáticos de andrógenos en el sistema cardiovascular son: 1) agravamiento de otros factores de riesgo cardiovascular (por ej., diabetes, obesidad, etc.); 2) engrosamiento de la capa íntima-media de la pared arterial; 3) disminución de la presencia de células progenitoras endoteliales en la circulación; y 4) disminución de la vasodilatación mediada por flujo (Traish *et al.*, 2009a). En un estudio clínico realizado en 187 pacientes se observó que, con independencia de otros factores de riesgo, los valores bajos de

testosterona plasmática se asocian a una menor vasodilatación dependiente de flujo de la arteria braquial, indicativa de disfunción endotelial (Akishita *et al.*, 2007). En otro estudio clínico llevado a cabo con jóvenes con hipogonadismo hipogonadotrófico idiopático se observó que existe una disminución de las células progenitoras endoteliales circulantes y que el tratamiento con testosterona normaliza esta situación (Foresta *et al.*, 2008). Las células progenitoras endoteliales son necesarias para la reparación endotelial, y sus niveles circulantes son bajos en situaciones de disfunción endotelial y constituyen un importante factor de riesgo cardiovascular. Los andrógenos aumentan la proliferación, migración y formación de colonias de las células progenitoras endoteliales a través de su acción sobre receptores androgénicos localizados en el núcleo de dichas células (Foresta *et al.*, 2008). En ratas castradas se ha observado la presencia de daños estructurales en el endotelio que desaparecen con el tratamiento con testosterona o dihidrotestosterona (Lu *et al.*, 2007).

La relación entre deficiencia de andrógenos, disfunción endotelial y enfermedad vascular es muy compleja (Figura 11, Traish *et al.*, 2009a). La resistencia a la insulina, que se agrava con la deficiencia androgénica, podría contribuir a la disfunción endotelial y a la enfermedad vascular, ya que provoca dislipemia, hiperglucemia, hipertensión, inflamación vascular y mayor riesgo de trombosis. La dislipemia y la hiperglucemia provocan estrés oxidativo y activación de citocinas proinflamatorias. El colesterol LDL promueve la arterioesclerosis. La hiperglucemia, además, aumenta los productos finales de

la glicosilación avanzada y activa la vía de la hexosamina. El tratamiento con testosterona mejora todos estos factores.

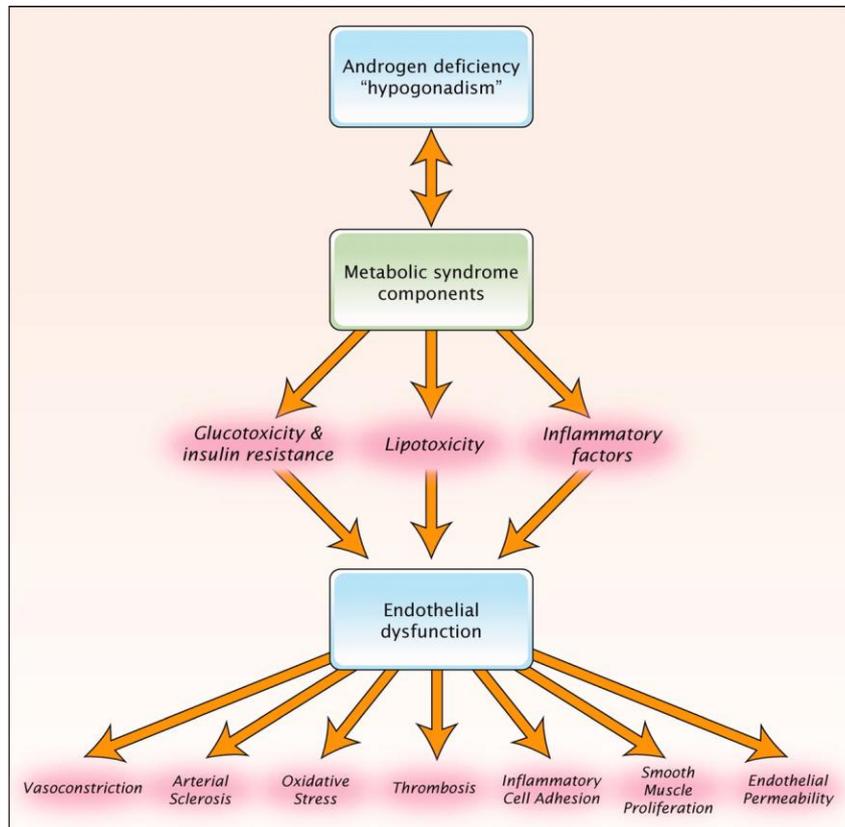


Figura 11. Mecanismos de afectación vascular en el hipogonadismo (Tomado de Traish *et al.*, 2009a).

Los mecanismos por los cuales los andrógenos regulan la producción y liberación de mediadores endoteliales implican la participación del receptor clásico androgénico citosólico que media la transcripción de genes (mecanismo genómico), y de un receptor de membrana que inicia procesos rápidos de señalización intracelular (mecanismos no genómicos) (Figura 12, Miller y Mulvagh, 2007). Como se representa en la Figura 12 existe una gran interacción entre la testosterona y los estrógenos. La testosterona se sintetiza a

partir de la dehidroepiandrosterona en el tejido extravascular. Tanto en hombres como en mujeres, la testosterona puede ser aromatizada a 17-beta-estradiol en el sistema vascular, el cual posteriormente es metabolizado a otros compuestos activos o inactivos. Esto hace que los efectos de la testosterona exógena o de las terapias con testosterona sean difíciles de interpretar.

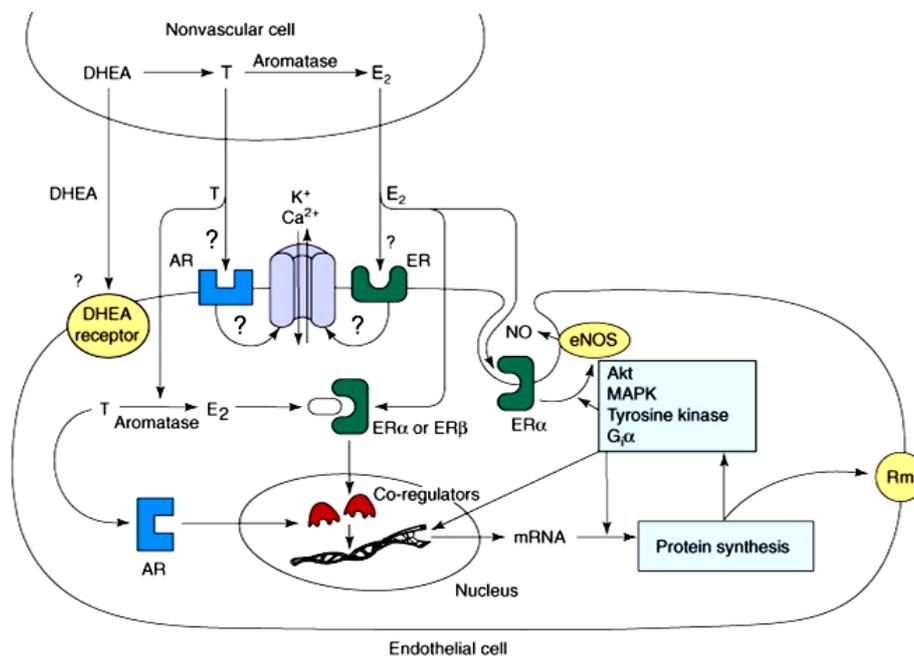


Figura 12. Mecanismos de afectación endotelial de las hormonas sexuales (Tomado de Miller y Mulvagh, 2007)

Los receptores para estrógenos y testosterona están presentes tanto en las células endoteliales como en las células musculares lisas de la pared vascular, y median sus acciones sobre el tono vascular, adhesión de macrófagos, agregación plaquetar, diferenciación y proliferación celular y apoptosis. Algunas de estas acciones ocurren rápidamente, en el transcurso de minutos, no requieren de cambios en la transcripción génica y se producen a

través de los receptores de membrana (acciones no genómicas), mientras que otras se producen más lentamente a través de cambios en la transcripción génica e implican los receptores clásicos citosólicos (acciones genómicas) (Figura 13).

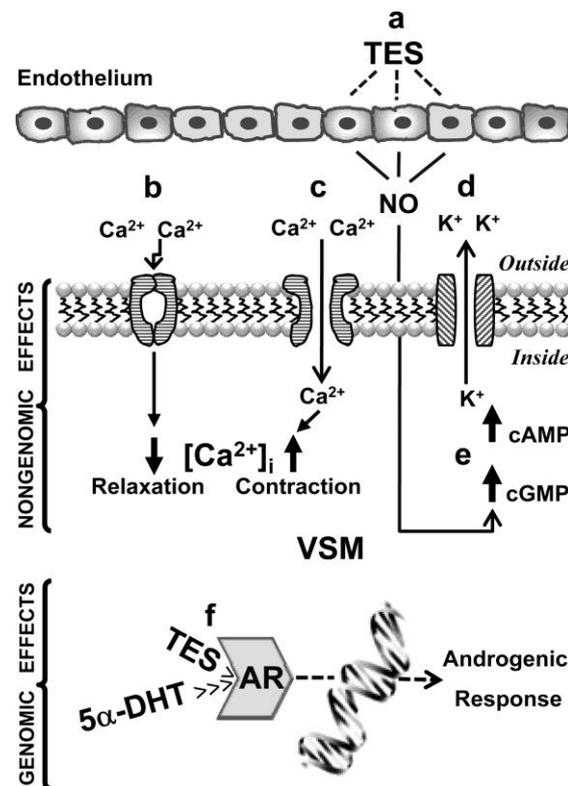


Figura 13. Acciones genómicas y no genómicas de los andrógenos en el músculo liso vascular (Tomado de Perusquía y Stallone, 2010)

El mecanismo de acción de los andrógenos sobre la función del sistema cardiovascular es controvertido, ya que, como se ha dicho, la testosterona puede actuar por mecanismos genómicos y no genómicos. Los efectos vasoactivos agudos, no genómicos, de la testosterona tienen cada vez mayor interés y han sido objeto de diversas revisiones (Liu *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2003; Jones *et al.*, 2004; Perusquía y Stallone 2010). La testosterona actúa

como un vasodilatador coronario en gran variedad de especies, incluyendo conejo, perro, cerdo y rata, tanto *in vivo* como *in vitro*. También se ha observado esta acción vasodilatadora en aorta torácica y en vasos mesentéricos y pulmonares. Además, en pacientes varones con enfermedad coronaria, la administración aguda intravenosa de testosterona aumenta la respuesta vasodilatadora de la arteria braquial al flujo y a los nitratos.

La vasodilatación inducida por la testosterona se produce, probablemente, por mecanismos no genómicos e implican cambios en la conductancia de canales del músculo liso vascular, en concreto, la inactivación de canales de Ca^{2+} tipo L operados por voltaje o la activación de canales de K^+ , particularmente los canales de K^+ operados por voltaje (K_v) y/o canales de K^+ de alta conductancia operados por Ca^{2+} (BK_{Ca}) (Figura 13, Perusquía y Stallone, 2010). Éste sería el mecanismo de acción de la vasodilatación independiente de endotelio que se ha observado a concentraciones suprafisiológicas en diferentes lechos. Por otra parte, también se ha observado que a dosis fisiológicas (<100 nM) la testosterona puede provocar una vasodilatación dependiente de endotelio mediada por NO. La influencia del endotelio, el NO y los prostanoïdes en la acción vasodilatadora de la testosterona no está completamente dilucidada, y existen estudios que muestran que esta relajación no está relacionada, o sólo se relaciona parcialmente, con el NO endotelial y con los prostanoïdes, dependiendo de la especie y del lecho vascular (Jones *et al.*, 2003).

5. Diabetes mellitus y andrógenos

Diversos estudios epidemiológicos muestran que la prevalencia de la diabetes es mayor en varones que en mujeres (Grant *et al.*, 2009). El hipogonadismo y la diabetes están frecuentemente asociados, y las dos situaciones representan importantes factores de riesgo para la enfermedad cardiovascular. En este sentido, se ha observado que la prevalencia de diabetes en varones con hipotestosteronemia es mayor que en varones con eugonadismo, y también se ha descrito que hay una mayor prevalencia de hipogonadismo en los varones diabéticos que en los normoglucémicos (Mulligan *et al.*, 2006). Los enfermos diabéticos varones tienen frecuentemente hipotestosteronemia (Grossman *et al.*, 2008): el 43% de los varones con diabetes tipo 2 y el 7% de los de tipo 1 tienen valores plasmáticos reducidos de testosterona total, mientras que los porcentajes aumentan hasta el 57% de los diabéticos tipo 2 y 20% de los de tipo 1 si se consideran los que tienen disminuidos los valores plasmáticos de testosterona libre. Existe una estrecha interrelación entre los niveles plasmáticos reducidos de testosterona, la hiperglucemia, la resistencia a la insulina, la obesidad y el síndrome metabólico (Figura 14, Traish *et al.*, 2009b). Así, los varones obesos, que tienen un mayor riesgo de padecer diabetes, síndrome metabólico y enfermedad cardiovascular, suelen tener un cierto grado de hipogonadismo. Las causas son varias, pero el factor clave es el aumento de conversión de testosterona en estradiol por la elevada concentración del enzima aromatasa en el tejido adiposo (Hammoud *et al.*, 2006). El estradiol, a su vez, reduce la hormona LH induciendo un estado de hipogonadismo hipogonadotrópico (Vermeulen *et al.*, 1993).

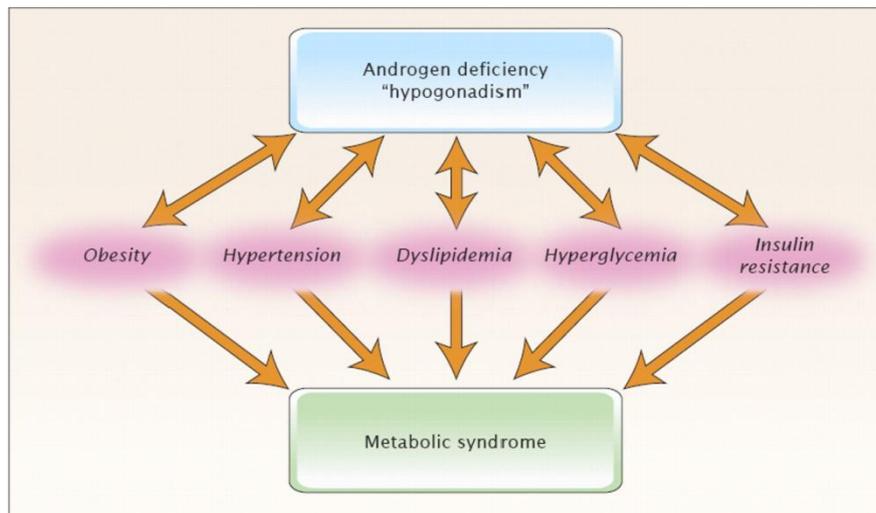


Figura 14. Deficiencia androgénica y síndrome metabólico (Tomado de Traish *et al.*, 2009b).

Valorando conjuntamente todas estas interrelaciones, se ha sugerido que la hipotestosteronemia puede tener un papel en la patogénesis de la resistencia a la insulina y que la terapia sustitutiva con testosterona podría ser útil para mejorar el control de la glucemia y para reducir el riesgo cardiovascular, especialmente en varones diabéticos (Kapoor *et al.*, 2005; Traish *et al.*, 2009b).

Por otra parte, la enfermedad renal es una complicación frecuente en los pacientes diabéticos, y se ha observado que existen diferencias entre hombres y mujeres (Marshall y Flyvberg, 2006). Las mujeres tienden a desarrollar nefropatía tras el inicio de la diabetes más precozmente que los hombres (Harjutsalo *et al.*, 2004), pero el riesgo de fracaso renal terminal es dos veces mayor en hombres que en mujeres (Jones *et al.*, 2005). También se ha observado que el hipoandrogenismo es un factor de riesgo cardiovascular en

los varones (Maggio y Basaria, 2009) y que aumenta el riesgo de padecer diabetes y viceversa, la diabetes aumenta el riesgo de hipoandrogenismo (Corona *et al.*, 2009). Las concentraciones plasmáticas de testosterona se correlacionan inversamente con la mortalidad por causa cardiovascular, así como con marcadores de inflamación, y además pueden contribuir a empeorar el pronóstico de la enfermedad renal en el varón (Ajayi y Fidelis, 2006; Carrero *et al.*, 2009). Además se ha observado en los enfermos renales que la ausencia de testosterona es renoprotectora en los no diabéticos, mientras que en los diabéticos los bajos niveles plasmáticos de testosterona empeoran la progresión de la enfermedad renal (Bellinghieri *et al.*, 2008; Xu *et al.*, 2008), y que el tratamiento hormonal sustitutivo con andrógenos puede ser potencialmente útil, en especial en el diabético varón (Kapoor *et al.*, 2005). Estos datos sugieren un papel importante de la testosterona en la fisiopatología de la nefropatía diabética.

Si bien es conocido que la testosterona provoca vasodilatación, existe poca información sobre las acciones directas vasculares y endoteliales de la testosterona en el territorio cerebrovascular y renal, más aún en la diabetes.

OBJETIVOS

El objetivo genérico del presente proyecto de investigación consiste en analizar los cambios que produce la diabetes experimental en los mecanismos que regulan la respuesta de las arterias carótida y renal de conejo a la testosterona.

Para ello se plantean los siguientes objetivos concretos:

1. Determinar la influencia de la diabetes en la concentración plásmatica de testosterona libre y testosterona total.
2. Determinar la respuesta de las arterias carótida y renal de conejo a la testosterona, tanto en conejos normoglucémicos como diabéticos.
3. Estudiar la función moduladora del endotelio, del óxido nítrico y de derivados del ácido araquidónico en la respuesta de las arterias carótida y renal de conejo a la testosterona, analizando los posibles cambios inducidos por la diabetes experimental en dicha función.
4. Estudiar el papel de los canales de K^+ y del bloqueo de los canales de Ca^{2+} en la respuesta de las arterias carótida y renal de conejo a la testosterona, analizando los posibles cambios inducidos por la diabetes experimental en dicha actividad.

MATERIAL Y MÉTODOS

Para la realización del presente trabajo se han utilizado 23 conejos blancos machos de Nueva Zelanda, los cuales se dividieron en dos grupos al azar, con valores de peso y glucemia similares. A 11 animales no se les realizó ninguna manipulación experimental y constituyeron el grupo de conejos control, mientras que a los otros 12 animales se les indujo la diabetes de forma experimental y constituyeron el grupo de conejos diabéticos. Los estudios se han llevado a cabo con segmentos de arteria carótida común y renal. Las condiciones de estabulación y los procedimientos experimentales utilizados se han realizado respetando la normativa europea (86/609/EEC, Artículo 5, Apéndice II) y española (RD 1201/2005) que regula el uso de animales en la investigación científica.

1. Inducción de la diabetes experimental

La inducción de la diabetes se realiza mediante la inyección, en la vena marginal de la oreja, de una dosis única de un tóxico selectivo de las células β -pancreáticas, el aloxano. Tras un ayuno de 24 horas, la inyección de aloxano (100 mg/kg disueltos en 10 mL de solución salina) se realiza al animal previamente sedado con 40 mg de clorhidrato de Ketamina (Ketolar[®]). Debido a la destrucción de las células β -pancreáticas provocada por el aloxano, en las primeras horas posteriores a la inyección del mismo se produce una liberación masiva de insulina y un estado de hipoglucemia. Con el fin de evitar los graves problemas que la hipoglucemia puede acarrear para la vida del animal, tras el aloxano se le administran 10 mL de solución glucosada al 5% por vía intravenosa, y al cabo de 15-20 minutos otros 10 mL de la misma solución

glucosada por vía subcutánea. Durante las primeras horas se mantiene al conejo con agua de bebida glucosada al 10% hasta que alcanza el estado hiperglucémico (normalmente entre 24 y 48 horas después de la inyección del aloxano). Posteriormente, la solución glucosada se sustituye por agua de bebida normal y los animales permanecen estabulados durante seis semanas.

2. Determinación de la concentración plasmática de glucosa y testosterona

En el periodo de estabulación a todos los animales (controles y diabéticos) se les realizan controles de peso y glucemia semanalmente. La concentración de glucosa plasmática fue medida por el método de la glucosa oxidasa mediante un analizador de glucosa (Glucometer Elite, Bayer). Para ello se utiliza una tira reactiva que aspira por capilaridad una pequeña cantidad de sangre y la lleva a una cámara de reacción. Los resultados se obtienen tras 60 segundos.

La determinación de la testosterona plasmática se determinó justo antes de la muerte de los animales. Se obtuvieron muestras de sangre (3 ml) de la arteria central de la oreja en tubos preparados con EDTA. Todas las muestras se tomaron a la misma hora de la mañana para evitar la influencia de las variaciones del ritmo circadiano en los niveles plasmáticos de testosterona. La sangre se centrifugó a 1900 rpm durante 15 min, y el plasma se almacenó a -80°C. Posteriormente se determinó por duplicado la testosterona plasmática libre y total mediante radioinmunoanálisis y quimioluminiscencia, respectivamente (Gestión Sanitaria Integral SL, Valencia).

3. Registro de la tensión isométrica desarrollada por segmentos de arteria carótida y renal de conejo

3.1. Obtención y montaje de los segmentos arteriales

Los animales se sacrifican mediante una inyección, en la vena marginal de la oreja, de una solución de 10 mEq de KCl (0,5 mL/kg) previa anestesia con inyección i.v. al 2% de 100 mg de tiopental sódico (Tiobarbital Braun). La muerte se produce por parada cardíaca como consecuencia de la despolarización miocárdica. Para aislar las arterias carótidas se sitúa al animal en posición de decúbito supino y se le practica una incisión longitudinal amplia en la región anterior del cuello a cada lado de la tráquea, extrayendo ambas carótidas mediante disección roma, obteniéndose así segmentos arteriales de unos 3-4 cm de longitud. Para aislar las arterias renales, se mantiene al animal en la misma posición, se le practica una incisión longitudinal amplia en la línea media del abdomen, se apartan las vísceras abdominales, y se diseccionan y extraen las dos arterias renales. Inmediatamente las arterias se sumergen en una solución salina fisiológica fría (4°C) y a continuación, con la ayuda de una lupa binocular (Wild M3B Heerbrugg) y utilizando una fuente de luz fría (Euromex EK-1) para no deteriorar el tejido, se eliminan los restos de sangre de su interior y se cortan en segmentos de aproximadamente 3-4 mm de longitud.

Para el registro de la tensión isométrica desarrollada por los segmentos arteriales, se introducen los extremos finos y rígidos de dos alambres de acero inoxidable (207 μm de diámetro) a través de la luz vascular. Uno de los alambres queda unido a un soporte fijo, de tal forma que la arteria queda en posición horizontal. El otro se conecta a un transductor de tensión isométrica,

de forma que puede traccionar verticalmente, en sentido perpendicular al eje mayor del segmento arterial, en respuesta a los cambios de tensión que se producen en la pared del vaso. La tensión isométrica es convenientemente amplificadora, digitalizada, registrada y almacenada para su posterior análisis.

Cada segmento vascular, con los alambres en el interior de su luz, se aloja en un baño de órganos que contiene 5 mL de una solución que simula las condiciones fisiológicas (solución nutritiva de Ringer-Locke). Esta solución se encuentra burbujeada continuamente con gas carbógeno (95% de O₂ y 5% de CO₂), lo que le confiere un pH de 7.3-7.4. Un circuito de agua caliente, que rodea las copas de los baños, permite mantener las soluciones con los tejidos vasculares a una temperatura constante de $37 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$. Se dispone de una reserva de la solución, en condiciones idénticas a las descritas, que se utiliza para renovar el medio en que se hallan inmersos los segmentos arteriales.

3.2. Técnicas de registro y medición

El sistema de medida y registro consta, para cada uno de los segmentos arteriales, de un transductor de tensión isométrica (Panlab Mod. UF-1/ Letica TRI 201), un tornillo micrométrico adaptado al transductor y capaz de desplazar el conjunto transductor-alambre, un amplificador de tensión (Amplifier Panlab 40154/Letica ISO 506), y un sistema informatizado de digitalización y registro (PowerLab 8sp y software Chart 5, ADInstruments).

Los cambios de tensión isométrica producidos por los diferentes estímulos aplicados sobre los segmentos arteriales se cuantifican midiendo, a partir del trazado basal o del trazado de tono activo, el desplazamiento

producido hasta el efecto máximo desarrollado por cada una de las dosis. Las cantidades obtenidas pueden expresarse en términos absolutos (mg) o relativos, es decir, porcentualmente, respecto del tono activo o de la tensión producida por un estímulo previo.

3.3. Procedimiento experimental

Una vez situados los segmentos arteriales en el baño de órganos, previa calibración del aparato, se les aplica mediante rotación del tornillo micrométrico, una tensión basal de 2 g. Dado que la tendencia inmediata de los segmentos arteriales es relajarse, la tensión debe reajustarse periódicamente hasta que se estabilizan a dicha tensión. Durante este período el líquido nutritivo se renueva cada 20 minutos. Una vez alcanzada una tensión basal estable, y con el fin de analizar la reactividad de los segmentos arteriales, éstos se someten a un estímulo despolarizante con una solución de KCl 50 mM. Posteriormente, tras varios lavados en solución nutritiva se verifica la funcionalidad endotelial administrando un tono activo con fenilefrina (10^{-6} M) y comprobando la relajación a la acetilcolina (10^{-5} M). Por último, tras realizar varios lavados de las arterias con la solución nutritiva durante un período de 45-60 minutos, se inician las curvas concentración-respuesta a la testosterona.

Los experimentos se llevan a cabo en arterias carótida y renal de conejos control y diabéticos. Las curvas concentración-respuesta a la testosterona (10^{-8} - 10^{-4} M) se obtienen de forma acumulativa en arterias a tensión basal y en arterias previamente contraídas con noradrenalina (10^{-7} - 3×10^{-6} M). El tono activo inducido por la noradrenalina en arterias carótida (2388 ± 198 mg) y renal (4206 ± 395 mg) de conejo control fue similar al

obtenido en arterias carótida (2344 ± 190 mg) y renal (4022 ± 427 mg) de conejo diabético. Se inician las curvas concentración-respuesta a la testosterona (10^{-8} - 10^{-4} M) en las diversas situaciones experimentales. Dichas curvas se obtienen mediante la adición al baño de órganos de dosis acumulativas de testosterona. Cada dosis se añade cuando la inmediatamente anterior ha desarrollado su efecto máximo, siendo la concentración del fármaco en el baño cuando se aplica una dosis, la suma de esta última con las dosis administradas con anterioridad a ella. En cada segmento arterial se realizó una única curva concentración-respuesta de testosterona.

Para el estudio del papel del endotelio en la respuesta arterial, se realizaron curvas concentración-respuesta a la testosterona en arterias precontraídas previamente sometidas a la eliminación mecánica del endotelio mediante el raspado de la superficie luminal.

Para el estudio del papel del óxido nítrico se realizaron curvas concentración-respuesta a la testosterona en arterias precontraídas previamente incubadas (20 minutos) con el inhibidor de la síntesis de NO, N^G -nitro-L-arginina (L-NOArg, 10^{-5} M).

Para el estudio del papel de los derivados del ácido araquidónico se realizaron curvas concentración-respuesta a la testosterona en arterias precontraídas previamente incubadas (20 minutos) con el inhibidor de la ciclooxigenasa, indometacina (10^{-5} M).

En arteria carótida, para ver la participación de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} se realizaron curvas concentración-respuesta de

testosterona en arterias precontraídas y preincubadas con la clásica combinación de apamin (10^{-6} M), un inhibidor selectivo de los canales de K^+ dependientes del Ca^{2+} de pequeña conductancia, y charibdotoxina (10^{-8} M), un inhibidor no selectivo de los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} de mediana y gran conductancia y de algún canal de K^+ dependiente de voltaje. En arteria renal, para ver la participación de los canales de K^+ de gran conductancia activados por Ca^{2+} (BK_{Ca}) y de los canales de K^+ sensibles a voltaje (K_v), se realizaron curvas concentración-respuesta de testosterona en arterias precontraídas y preincubadas con el inhibidor de dichos canales, tetraetilamonio (TEA, 10^{-5} M).

Finalmente, para investigar la posible acción inhibidora de la entrada de Ca^{2+} de la testosterona se realizaron curvas concentración-respuesta de $CaCl_2$ (10^{-5} - 10^{-2} M) en presencia y en ausencia de testosterona (10^{-4} M). Para ello, los segmentos arteriales se lavan tres veces, con 10 min de intervalo, en una solución Ringer-Locke libre de Ca^{2+} que contiene 1 mM de ácido etilenglicol tetraacético (EGTA), y a continuación se reemplaza la solución de lavado por un medio libre de Ca^{2+} + 50 mM de KCl con/sin testosterona (10^{-4} M); al cabo de 30 min se realizan las curvas de $CaCl_2$.

Todos los experimentos se realizaron utilizando segmentos arteriales procedentes de conejos control y segmentos arteriales procedentes de conejos diabéticos con el fin de estudiar el efecto de la diabetes experimental sobre cada uno de los aspectos objeto de estudio.

4. Western blot

Complementando los estudios funcionales, se examinó la expresión de eNOS, iNOS, COX-1 y COX-2 en las arterias carótida y renal de conejo. Para ello se utilizaron 22 arterias carótidas y 22 renales ultracongeladas (11 de cada grupo de conejos), que se pulverizaron en nitrógeno líquido y posteriormente se homogenaron con tampón de lisis (ProteoJet™ Mammalian Cell Lysis Reagent, Fermentas) que contiene un cocktail de inhibidores de proteasas (1%, Sigma). El polvo fue resuspendido con un vórtex e incubado durante 10 min a temperatura ambiente en un agitador (1200 rpm), y el lisado fue purificado por centrifugación a 8255 rpm durante 15 min. El lisado celular resultante fue almacenado a -80°C hasta su uso. La concentración de proteínas se determinó con el kit BCA (Pierce, Rockford, IL). Los extractos de proteínas (80 µg) se disolvieron en tampón de carga (NuPAGE LDS, Invitrogen), y se cargaron en un gel de gradiente (NuPAGE 4-12 Bis-TRIS GEL, Invitrogen) para electroforesis y se transfirieron a membranas de nitrocelulosa para inmunomarcado. A continuación, las membranas se bloquearon durante una hora a temperatura ambiente en una solución con leche desnatada al 5% en TBS con 100 µl de Tween 20. Después, se incubaron durante toda la noche con el correspondiente anticuerpo primario policlonal: 1) eNOS (1:200; Abcam); 2) iNOS (1:200; Abcam); 3) COX-1 (1:3000; Cayman); y COX-2 (1:3000; Cayman). A la mañana siguiente, las membranas se incubaron (1:5000) con el correspondiente anticuerpo secundario conjugado a la peroxidasa de rábano picante, durante 1 hora a temperatura ambiente, y posteriormente se trataron con reactivos para potenciar la quimioluminiscencia (ECL, Amersham Life Science) y se revelaron sobre un film de rayos X XAR-5 (Eastman Kodak Co.,

Rochester, NY). La comparación entre los diferentes grupos se llevó a cabo por cuantificación densitométrica. Las bandas de los Western blots se analizaron con un densitómetro Scan Jet 4-C usando el software NIH IMAGE 1.61. Las densidades relativas de las bandas inmunorreactivas fueron normalizadas con la densidad de las correspondientes bandas de β -actina.

5. Enzimoinmunoanálisis (EIA)

La liberación de tromboxano A_2 y prostaciclina inducida por testosterona (10^{-4} M) se estudió mediante EIA. Para determinar la producción de tromboxano B_2 (metabolito estable de tromboxano A_2) y 6-keto-PGF $_{1\alpha}$ (metabolito estable de la prostaciclina), los segmentos de arteria carótida y renal de conejo se incubaron en 200 μ l de solución de Ringer-Locke con noradrenalina (10^{-6} M) y testosterona (10^{-4} M) durante 4 horas a 37°C, y posteriormente, el medio de incubación se procesó en los correspondientes kits (EIAs; Cayman Chemical, Ann Arbor, MI). Las muestras se procesaron por triplicado, y las concentraciones de eicosanoides se estandarizaron en relación al peso seco de cada segmento arterial.

6. Análisis de los resultados

La respuesta relajante a la testosterona se expresa como porcentaje respecto al tono activo previamente inducido por noradrenalina. La contracción inducida por el $CaCl_2$ se expresa como porcentaje de la despolarización previa con KCl 50 mM. Para cada situación experimental, las curvas concentración-respuesta se repiten en segmentos arteriales procedentes de animales diferentes. Los datos se agrupan posteriormente según el tipo de experimento y

a partir de los resultados obtenidos para cada una de las concentraciones se calcula la media aritmética, la desviación típica y el error estándar de la media (EEM). Estos valores nos permiten obtener las curvas concentración-respuesta medias para cada una de las situaciones experimentales. El análisis estadístico para determinar las posibles diferencias entre las distintas situaciones experimentales planteadas, se realiza mediante un análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías, seguido del test *post hoc* de comparaciones múltiples Bonferroni. La comparación de los resultados obtenidos en los ensayos de Western blot y EIA entre el grupo de animales control y el grupo de animales diabéticos se realiza con el test de la t de Student. Las diferencias se consideran significativas si $P < 0,05$.

7. Fármacos y soluciones

Aloxano, acetilcolina, fenilefrina, noradrenalina, testosterona, L-NOArg, indometacina, apamin, charibdotoxina, TEA y EGTA proceden de RBI-Sigma–Aldrich Química. Todos los fármacos se disuelven en solución salina fisiológica, excepto la testosterona e indometacina que se disuelven y diluyen en etanol y el apamin que se disuelve en agua destilada. En estudios previos hemos comprobado la ausencia de efecto sobre el tono vascular de la concentración más alta de etanol que se alcanza en el baño de órganos (0.69%, v/v). La composición de la solución Ringer-Locke es (mM): NaCl, 120; KCl, 5.4; CaCl₂, 2.2; MgCl₂, 1.0; NaHCO₃, 25; y glucosa, 5.6. Para preparar la solución nutritiva de Ringer Locke en primer lugar se prepara una solución concentrada (20x) de cloruros (NaCl, KCl, CaCl₂, MgCl₂) que se diluye en el momento de su uso, añadiendo entonces el NaHCO₃ y la glucosa. La solución despolarizante de

KCl 50 mM, se prepara del mismo modo que la solución de Ringer Locke, pero sustituyendo parte del NaCl por una cantidad equimolar de KCl. En la solución libre de Ca^{2+} , el CaCl_2 se omitió y se añadió 1 mM de EGTA.

RESULTADOS

1. Valores de glucosa y testosterona plasmáticos

Los conejos del grupo diabético mostraron un aumento significativo en la concentración plasmática de glucosa (5.7 ± 0.02 y 18.4 ± 1.2 mM en conejo control y diabético, respectivamente), y un menor peso final, 6 semanas después de la administración del aloxano, en comparación con los conejos del grupo control (3.71 ± 0.17 y 3.35 ± 0.07 kg en conejo control y conejo diabético, respectivamente).

La concentración plasmática de testosterona total y de testosterona libre de conejos diabéticos fue significativamente menor que en conejos control (Figura 15).

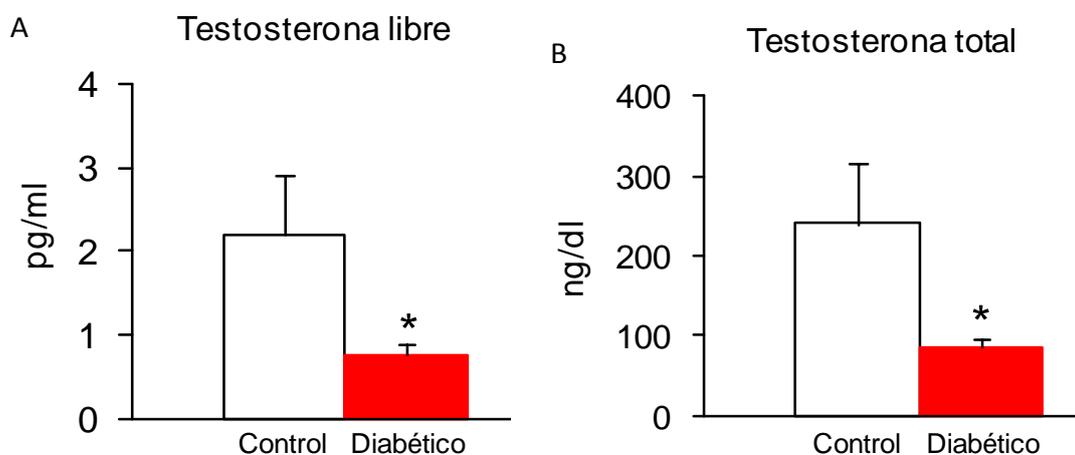


Figura 15. Concentración plasmática de testosterona libre (A) y testosterona total (B) en conejos control (n=8) y diabéticos (n=12). Los valores representan la media \pm EEM de "n" conejos. Significativamente diferente, * P<0.05

2. Curvas concentración-respuesta

2.1. Arteria carótida de conejo

El tono basal de los segmentos de arteria carótida, tanto de animales control como diabéticos, no se modificó con la adición de dosis acumulativas de testosterona (10^{-8} - 10^{-4} M). Sin embargo, en arterias carótidas aisladas de conejo control o de conejo diabético, precontraídas con noradrenalina (10^{-6} M), la testosterona (10^{-8} - 10^{-4} M) produjo una respuesta relajante, de magnitud dependiente de la concentración utilizada (Figura 16). En arterias de conejo diabético, la relajación fue significativamente mayor que en arterias de animal control. Dicha relajación fue significativamente mayor en el grupo de diabetes inducida frente al grupo control (Figura 16)

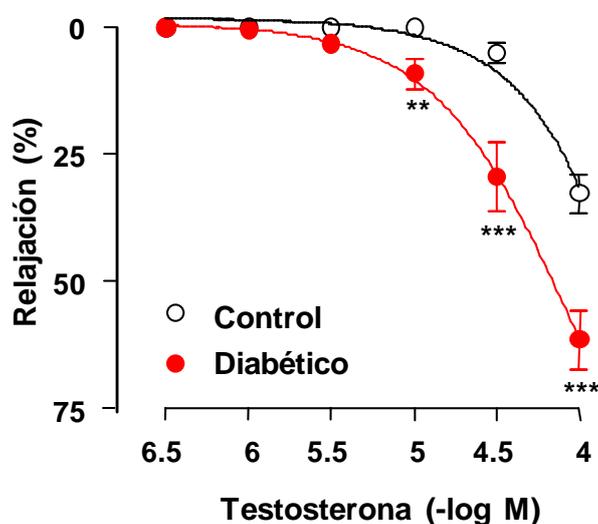


Figura 16. Curvas concentración-respuesta de testosterona en arterias carótidas, precontraídas con noradrenalina, procedentes de conejo control (n=17) y diabético (n=20). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, ** P<0.01; *** P<0.005

En arterias de conejo control, la eliminación del endotelio no modificó la respuesta relajante arterial a la testosterona (Figura 17A). En arterias de conejo diabético, la eliminación del endotelio inhibió significativamente la acción relajante de la testosterona (Figura 17B).

En arterias de conejo control, la incubación de los segmentos arteriales con L-NOArg (10^{-5} M) no modificó la respuesta relajante arterial a la testosterona (Figura 18A). En arterias de conejo diabético, la L-NOArg (10^{-5} M) inhibió significativamente la acción relajante de la testosterona (Figura 18B).

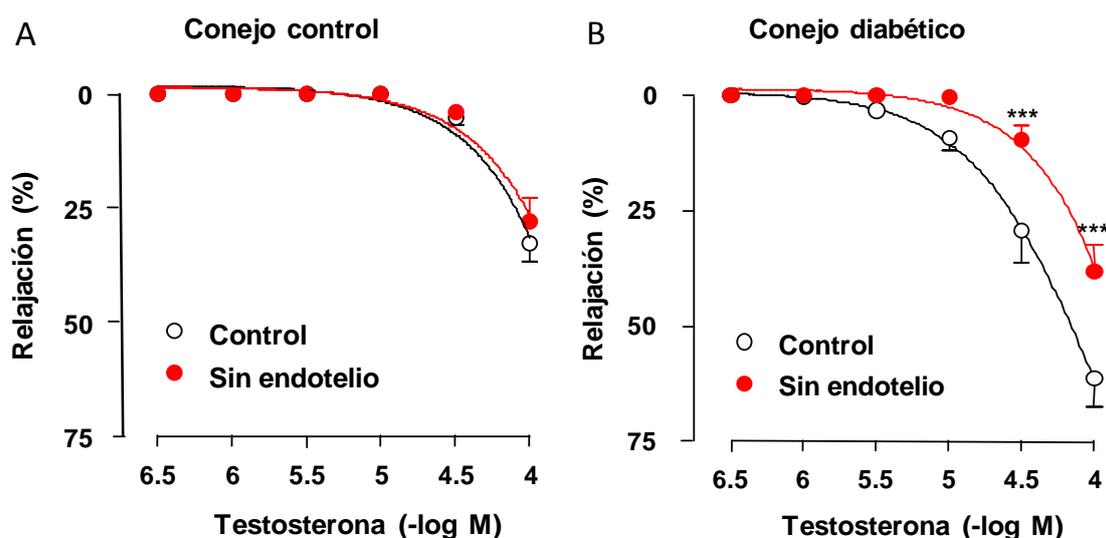


Figura 17. Curvas concentración-respuesta de testosterona en arterias carótidas, precontraídas con noradrenalina, procedentes de conejo control (A) y diabético (B) en situación control y en arterias sin endotelio (n=18 conejo control; n=16 conejo diabético). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, *** $P < 0.005$

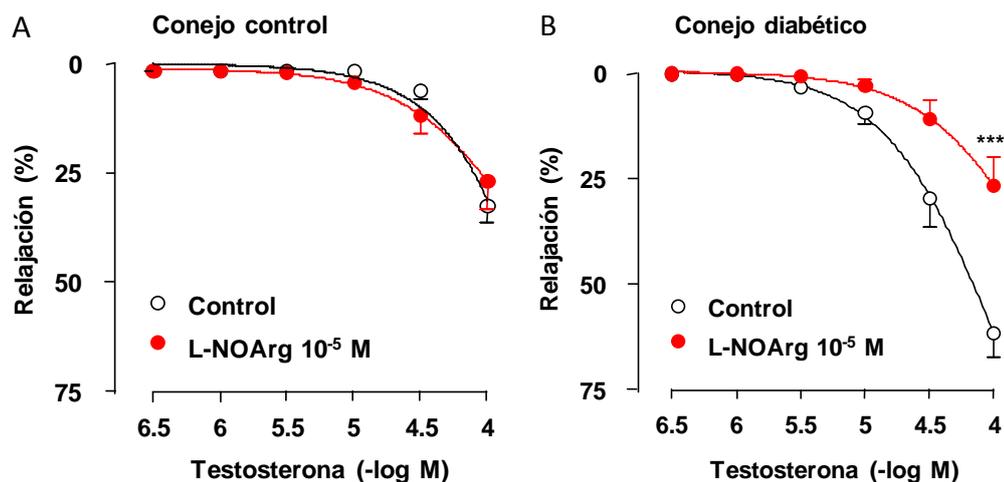


Figura 18. Curvas concentración-respuesta de testosterona en arterias carótidas sin endotelio, precontraídas con noradrenalina, procedentes de conejo control (A) y diabético (B) en situación control y tras incubación con L-NOArg 10^{-5} M (n=12 conejo control; n=11 conejo diabético). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, *** P<0.005

En conejos control, la incubación de los segmentos arteriales con indometacina (10^{-5} M) aumentó la relajación arterial a la testosterona, tanto en arterias con endotelio (Figura 19A) como en arterias sin endotelio (Figura 20A). Por contra, en conejos diabéticos la indometacina inhibió significativamente la relajación a la testosterona de arterias con endotelio (Figura 19B) pero no modificó la relajación en arterias sin endotelio (Figura 20B).

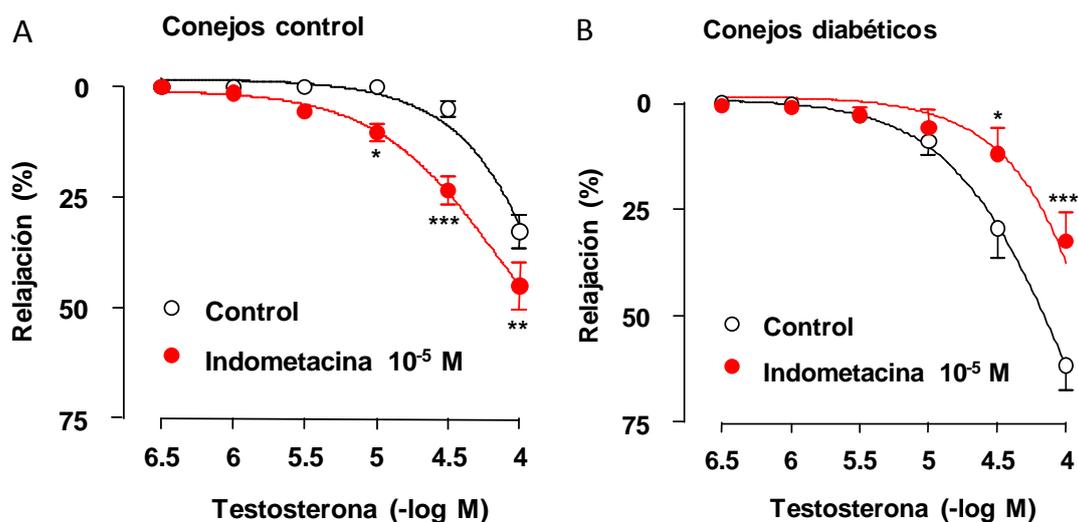


Figura 19. Curvas concentración-respuesta de testosterona en arterias carótidas, precontraídas con noradrenalina, procedentes de conejo control (A) y diabético (B) en situación control y tras incubación con indometacina 10^{-5} M (n=10 conejo control; n=10 conejo diabético). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.005$

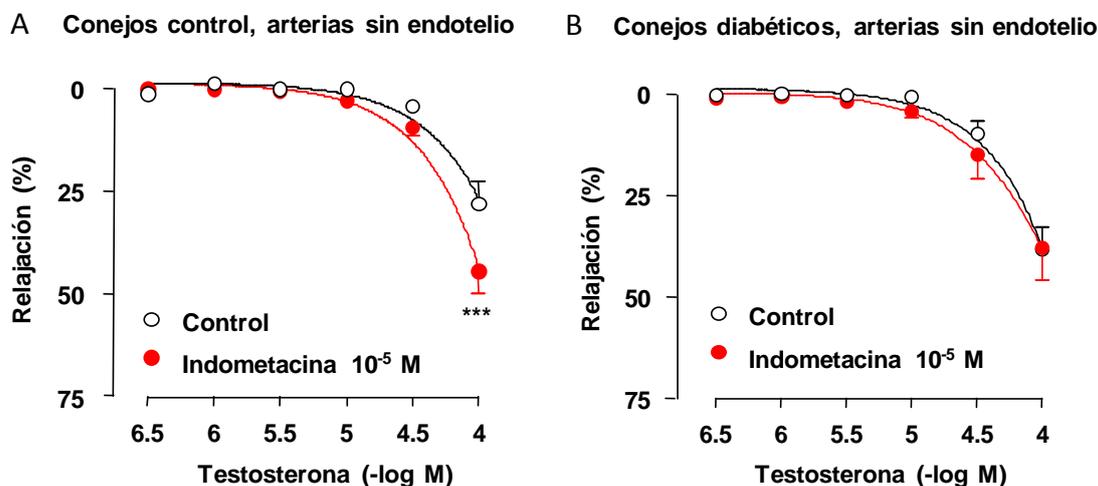


Figura 20. Curvas concentración-respuesta de testosterona en arterias carótidas sin endotelio, precontraídas con noradrenalina, procedentes de conejo control (A) y diabético (B) en situación control y tras incubación con indometacina 10^{-5} M (n=9 conejo control; n=10 conejo diabético). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, *** $P < 0.005$

La incubación de los segmentos de arteria carótida con charibdotoxina (10^{-8} M) y apamina (10^{-6} M) no inhibió significativamente la curva de relajación a testosterona, ni en animales control (Figura 21A) ni en animales diabéticos (Figura 21B).

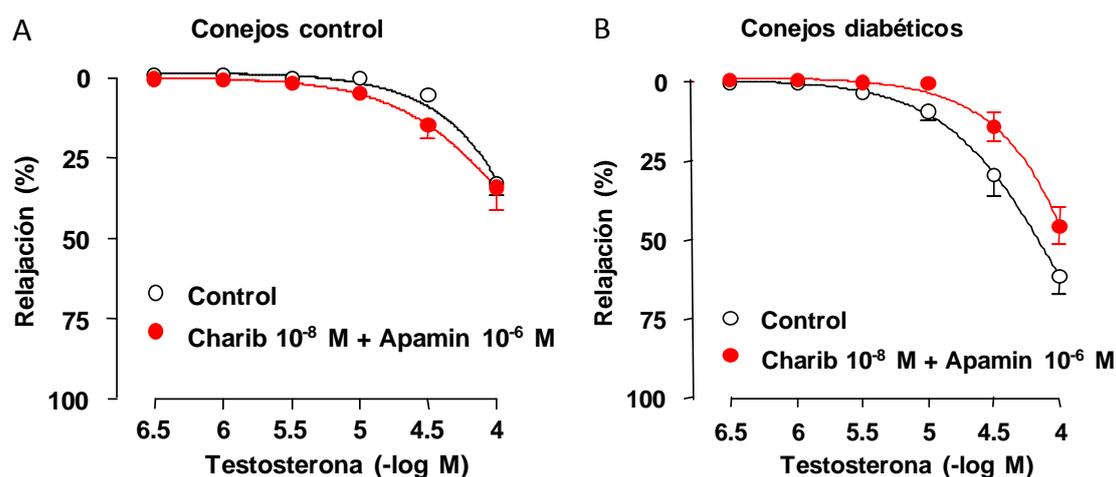


Figura 21. Curvas concentración-respuesta de testosterona en arterias carótidas, precontraídas con noradrenalina, procedentes de conejo control (A) y diabético (B) en situación control y tras incubación con apamin 10^{-6} M y charibdotoxina 10^{-8} M (n=12 conejo control; n=9 conejo diabético). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales.

Por último, en ambos grupos de animales, concentraciones acumulativas de CaCl_2 (10^{-5} - 10^{-2} M) en arterias despolarizadas con KCl 50 mM e incubadas en un medio libre de Ca^{2+} produjo una contracción de magnitud dependiente de la concentración, sin diferencias significativas entre la respuesta obtenida en arterias de conejo control y la obtenida en arterias de conejo diabético (Figura 22).

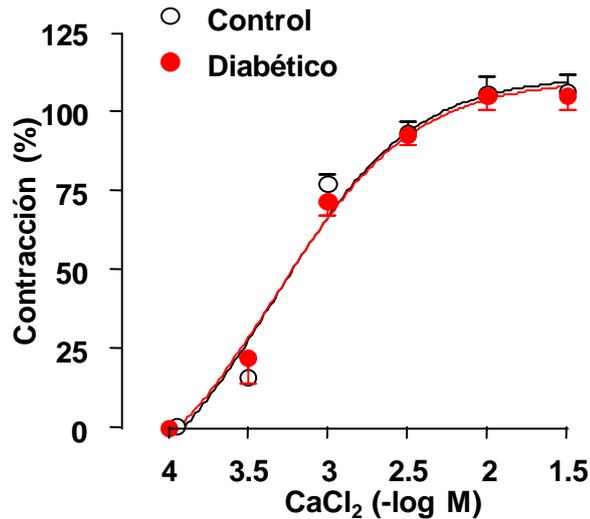


Figura 22. Curvas concentración-respuesta de CaCl_2 en arterias carótidas despolarizadas con KCl 50 mM e incubadas en un medio sin Ca^{2+} , procedentes de conejo control (n=13) y diabético (n=14). Los valores se expresan como porcentaje de la despolarización previamente producida por KCl 50 mM y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales.

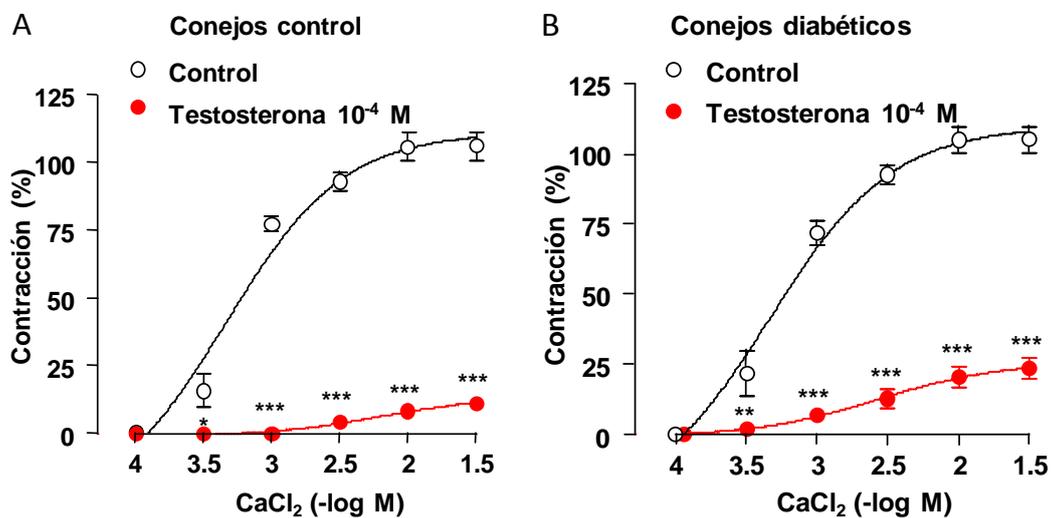


Figura 23. Curvas concentración-respuesta de CaCl_2 en arterias carótidas despolarizadas con KCl 50 mM e incubadas en un medio sin Ca^{2+} , procedentes de conejo control (A) y diabético (B) en situación control e incubadas con testosterona 10^{-4} M (n=9 conejo control; n=14 conejo diabético). Los valores se expresan como porcentaje de la despolarización previamente producida por KCl 50 mM y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.005$.

En arterias procedentes de ambos grupos de animales, la incubación con testosterona (10^{-4} M) inhibió fuertemente la contracción producida por CaCl_2 (Figura 23). Esta inhibición fue significativamente menor en arterias de conejo diabético que en las de conejo control (Figura 24).

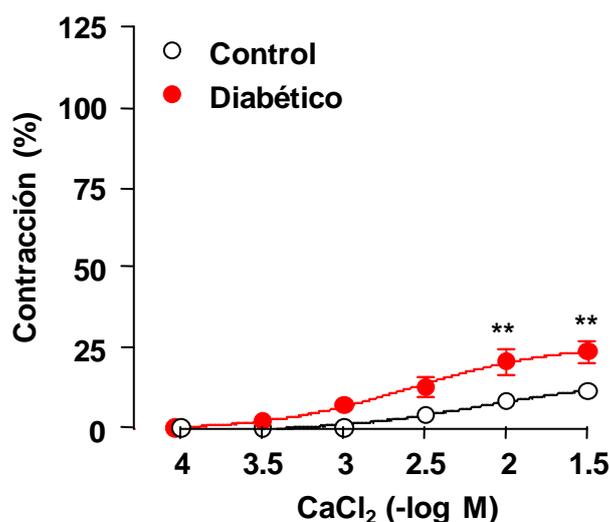


Figura 24. Curvas concentración-respuesta de CaCl_2 en arterias carótidas despolarizadas con KCl 50 mM e incubadas en un medio sin Ca^{2+} , en presencia de testosterona (10^{-4} M) procedentes de conejo control (n=9) y diabético (n=14). Los valores se expresan como porcentaje de la despolarización previamente producida por KCl 50 mM y representan la media \pm EEM de "n" segmentos arteriales. Significativamente diferente, ** $P < 0.01$

2.2. Arteria renal de conejo

El tono basal de los segmentos de arteria renal, tanto de animales control como diabéticos, no se modificó con la adición de dosis acumulativas de testosterona (10^{-8} - 10^{-4} M). Sin embargo, en arterias renales precontraídas, aisladas de conejo control, la testosterona (10^{-8} - 10^{-4} M) produjo una respuesta relajante, de magnitud dependiente de la concentración utilizada (Figura 25).

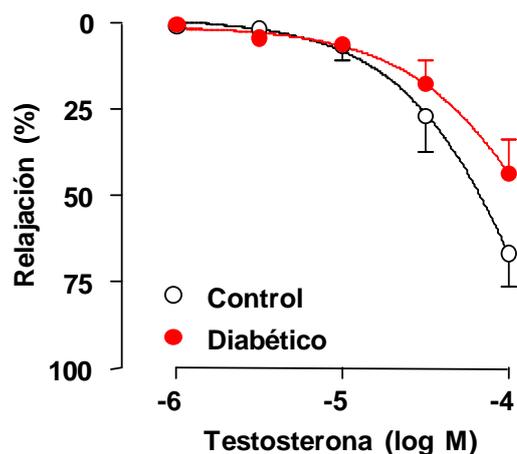


Figura 25. Curvas concentración-respuesta de testosterona en arterias renales, precontraídas con noradrenalina, procedentes de conejo control (n=6) y diabético (n=10). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" animales.

En arterias de conejo diabético, la testosterona también produjo una relajación que no fue significativamente diferente a la obtenida en arterias de animal control (Figura 25).

En arterias de conejo control (Figura 26A) y de conejo diabético (Figura 26B), la eliminación del endotelio inhibió intensamente la respuesta relajante arterial a la testosterona.

La incubación de los segmentos arteriales con L-NOArg (10^{-5} M) no modificó la respuesta relajante arterial a la testosterona en arterias de conejo control (Figura 27A) ni en arterias de conejo diabético (Figura 27B).

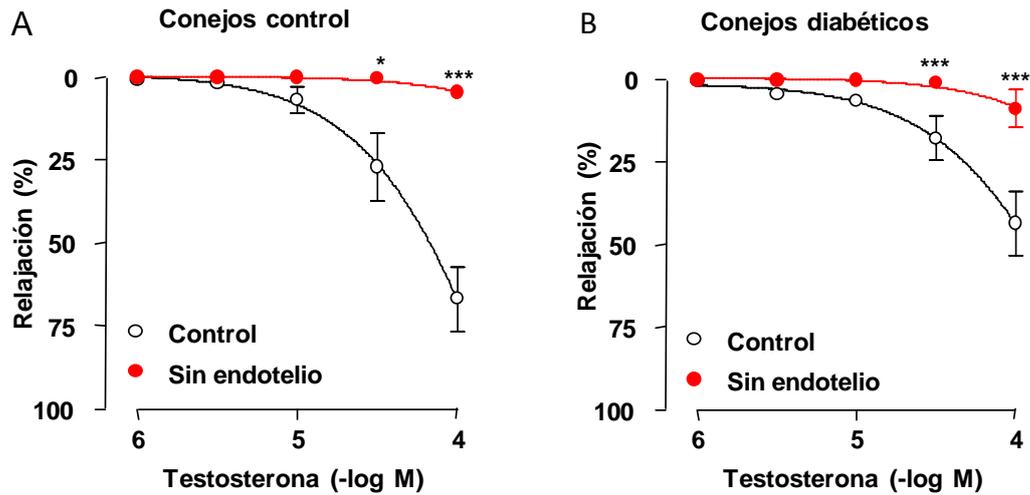


Figura 26. Curvas concentración-respuesta de testosterona en arterias renales, precontraídas con noradrenalina, procedentes de conejo control (A) y diabético (B) en situación control y en arterias sin endotelio (n=5 conejo control; n=5 conejo diabético). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" animales. Significativamente diferente, * P<0.05; *** P<0.005

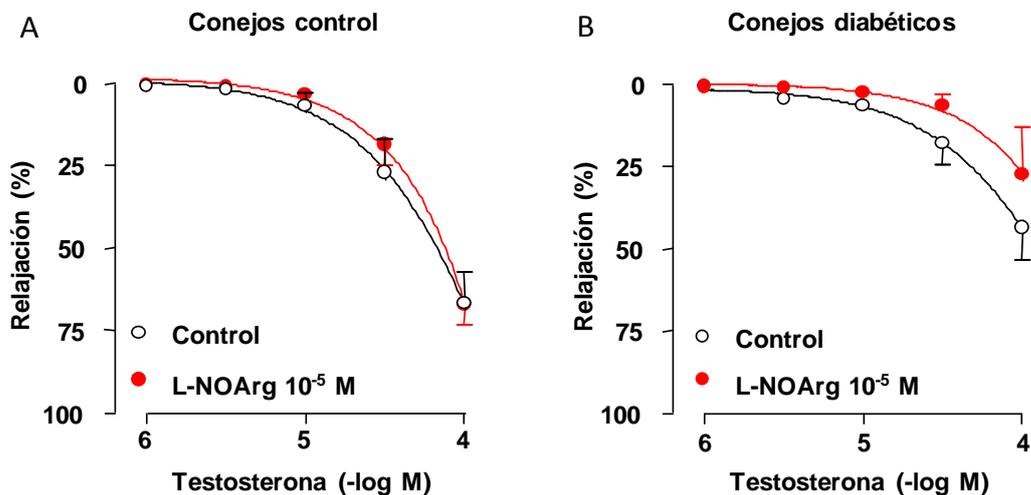


Figura 27. Curvas concentración-respuesta de testosterona en arterias renales sin endotelio, precontraídas con noradrenalina, procedentes de conejo control (A) y diabético (B) en situación control y tras incubación con L-NOArg 10⁻⁵ M (n=4 conejo control; n=5 conejo diabético). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" animales.

En arterias con endotelio, la incubación de los segmentos arteriales con indometacina (10^{-5} M) no modificó la relajación arterial a la testosterona tanto en conejos control (Figura 28A) como en conejos diabéticos (Figura 28B). Por contra, en arterias sin endotelio la indometacina aumentó significativamente la relajación a la testosterona de arterias de conejos control (Figura 29A) y de conejos diabéticos (Figura 29B).

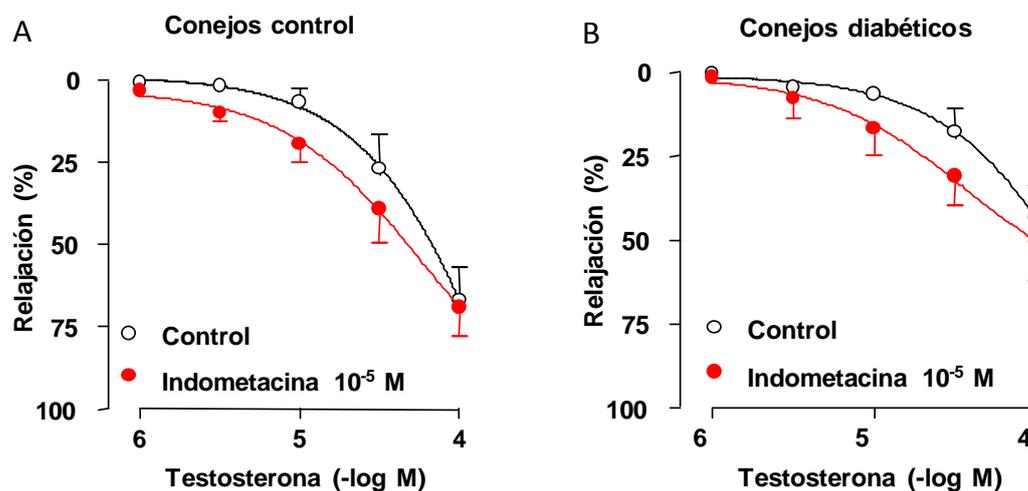


Figura 28. Curvas concentración-respuesta de testosterona en arterias renales, precontraídas con noradrenalina, procedentes de conejo control (A) y diabético (B) en situación control y tras incubación con indometacina 10^{-5} M (n=4 conejo control; n=6 conejo diabético). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" animales.

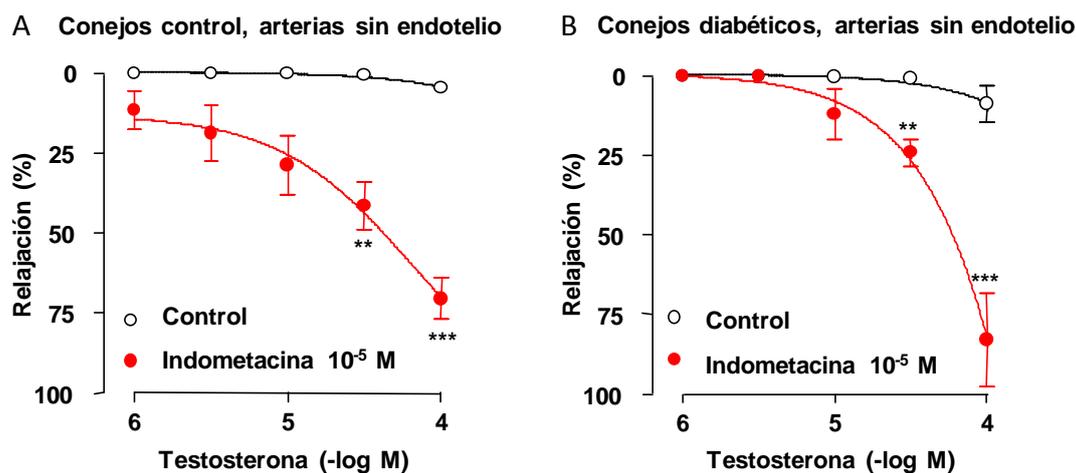


Figura 29. Curvas concentración-respuesta de testosterona en arterias renales sin endotelio, precontraídas con noradrenalina, procedentes de conejo control (A) y diabético (B) en situación control y tras incubación con indometacina 10^{-5} M (n=4 conejo control; n=4 conejo diabético). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" animales. Significativamente diferente, ** P<0.01; *** P<0.005

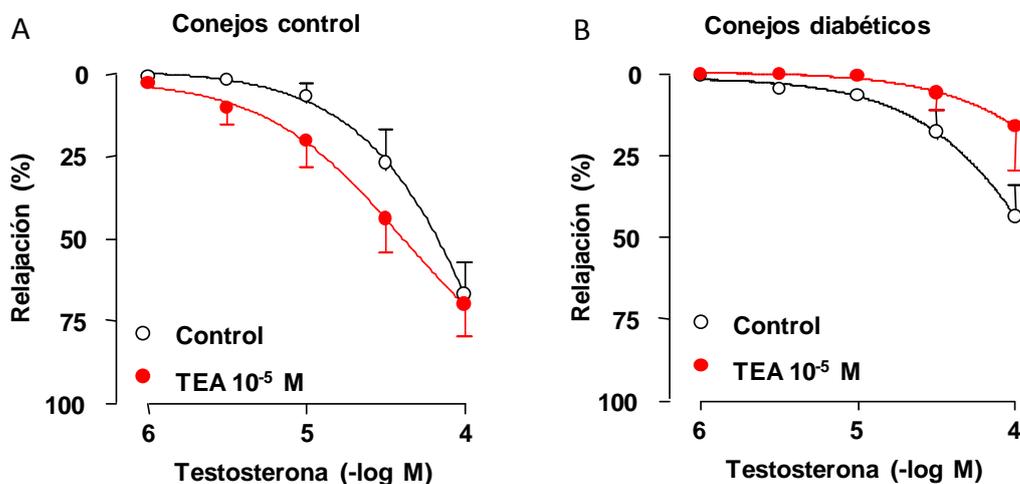


Figura 30. Curvas concentración-respuesta de testosterona en arterias renales, precontraídas con noradrenalina, procedentes de conejo control (A) y diabético (B) en situación control y tras incubación con TEA 10^{-5} M (n=6 conejo control; n=5 conejo diabético). Los valores se expresan como porcentaje del tono activo y representan la media \pm EEM de "n" animales.

La incubación de los segmentos de arteria renal con TEA (10^{-5} M) no inhibió significativamente la curva de relajación a testosterona, ni en animales control (Figura 30A) ni en animales diabéticos (Figura 30B).

Por último, en ambos grupos de animales, concentraciones acumulativas de CaCl_2 (10^{-5} - 10^{-2} M) en arterias despolarizadas con KCl 50 mM e incubadas en un medio libre de Ca^{2+} produjo una contracción de magnitud dependiente de la concentración, que fue significativamente mayor en arterias de conejo diabético que en arterias de conejo control (Figura 31).

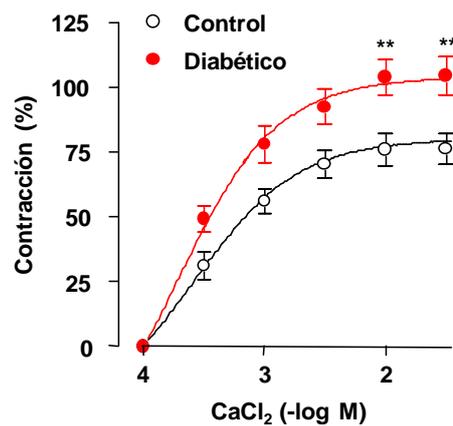


Figura 31. Curvas concentración-respuesta de CaCl_2 en arterias renales despolarizadas con KCl 50 mM e incubadas en un medio sin Ca^{2+} , procedentes de conejo control (n=4) y diabético (n=5). Los valores se expresan como porcentaje de la despolarización previamente producida por KCl 50 mM y representan la media \pm EEM de "n" animales. Significativamente diferente, ** $P < 0.01$

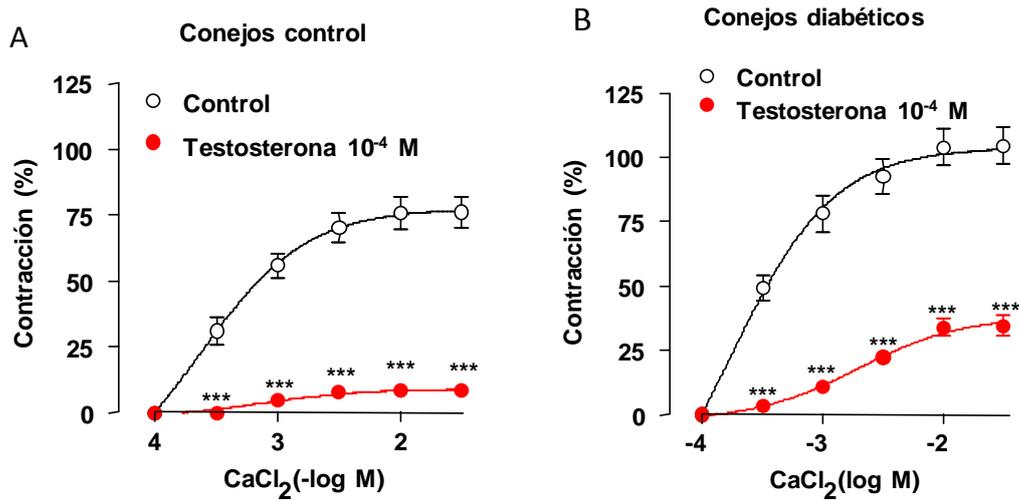


Figura 32. Curvas concentración-respuesta de CaCl_2 en arterias renales despolarizadas con KCl 50 mM e incubadas en un medio sin Ca^{2+} , procedentes de conejo control (A) y diabético (B) en situación control e incubadas con testosterona 10^{-4} M (n=6 conejo control; n=6 conejo diabético). Los valores se expresan como porcentaje de la despolarización previamente producida por KCl 50 mM y representan la media \pm EEM de "n" animales. Significativamente diferente, *** $P < 0.005$

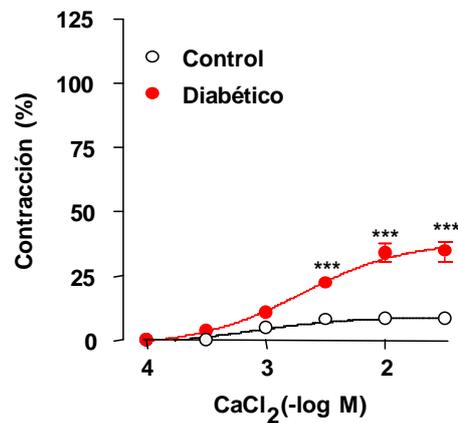


Figura 33. Curvas concentración-respuesta de CaCl_2 en arterias renales despolarizadas con KCl 50 mM e incubadas en un medio sin Ca^{2+} , en presencia de testosterona (10^{-4} M) procedentes de conejo control (n=6) y diabético (n=6). Los valores se expresan como porcentaje de la despolarización previamente producida por KCl 50 mM y representan la media \pm EEM de "n" animales. Significativamente diferente, *** $P < 0.005$

En arterias procedentes de ambos grupos de animales, la incubación con testosterona (10^{-4} M) inhibió fuertemente la contracción producida por CaCl_2 (Figura 32). En presencia de testosterona (10^{-4} M) la contracción inducida por CaCl_2 fue significativamente mayor en arterias de conejo diabético que en las de conejo control (Figura 33).

3. Western blot y EIA

3.1. Arteria carótida de conejo

El análisis por Western blot de la isoforma constitutiva eNOS (Figura 34A) y de la inducible iNOS (Figura 34B) reveló que la arteria carótida de conejo sobreexpresa estas proteínas en conejos diabéticos, y mucho más en la iNOS que en la eNOS. En arteria carótida, la expresión de COX-1 no fue diferente en conejos diabéticos en comparación con los conejos control (Figura 35A), pero la expresión de COX-2 fue significativamente mayor en conejos diabéticos (Figura 35B).

El estudio por enzimoimmunoensayo reveló que la testosterona provoca liberación de tromboxano A_2 (Figura 36A) y prostaciclina (Figura 36B) en la arteria carótida de conejo. La diabetes no modificó significativamente la liberación de tromboxano A_2 (Figura 36A) pero aumentó la liberación de prostaciclina (Figura 36B).

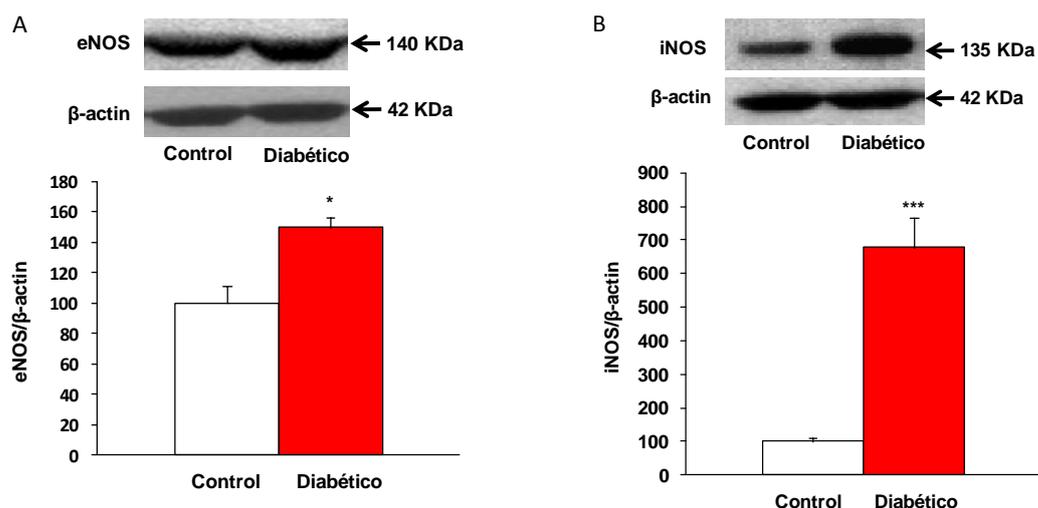


Figura 34. Western blot representativo y expresión relativa de eNOS (A) y de iNOS (B) en arteria carótida de conejo control (n=6) y conejo diabético (n=6). La β-actina se muestra como control de la carga de proteína. La densidad relativa de las bandas inmunorreactivas se han normalizado respecto de la densidad de las correspondientes bandas de β-actina y los valores representan la media ± EEM de "n" conejos. Significativamente diferente, * P<0.05; *** P<0.005

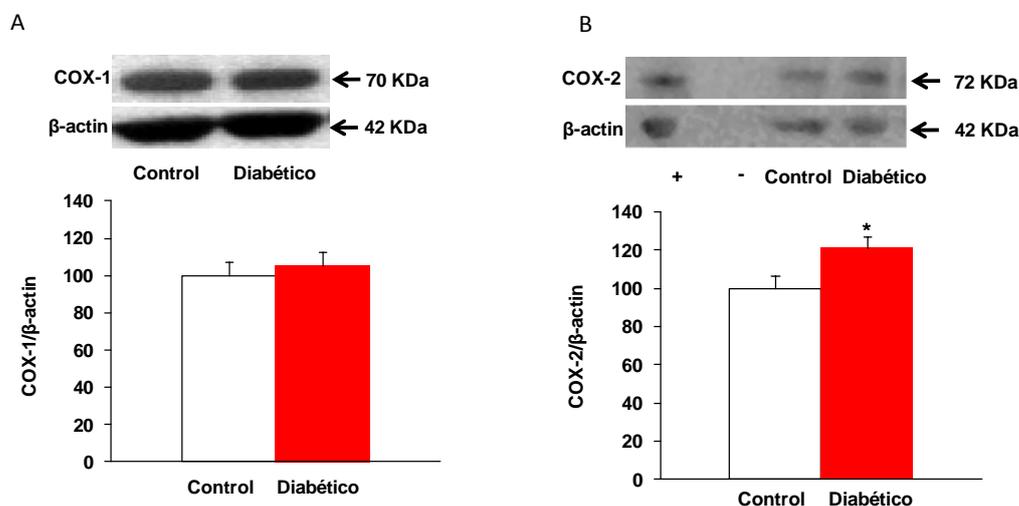


Figura 35. Western blot representativo y expresión relativa de COX-1 (A) y de COX-2 (B) en arteria carótida de conejo control (n=8) y conejo diabético (n=8). La β-actina se muestra como control de la carga de proteína. La densidad relativa de las bandas inmunorreactivas se han normalizado respecto de la densidad de las correspondientes bandas de β-actina y los valores representan la media ± EEM de "n" conejos. El control positivo es la fracción total de macrófagos RAW 264.7 de ratón estimulados con LDS 24 horas. En el control negativo sólo hay tampón de carga sin muestra. Significativamente diferente, * P<0.05

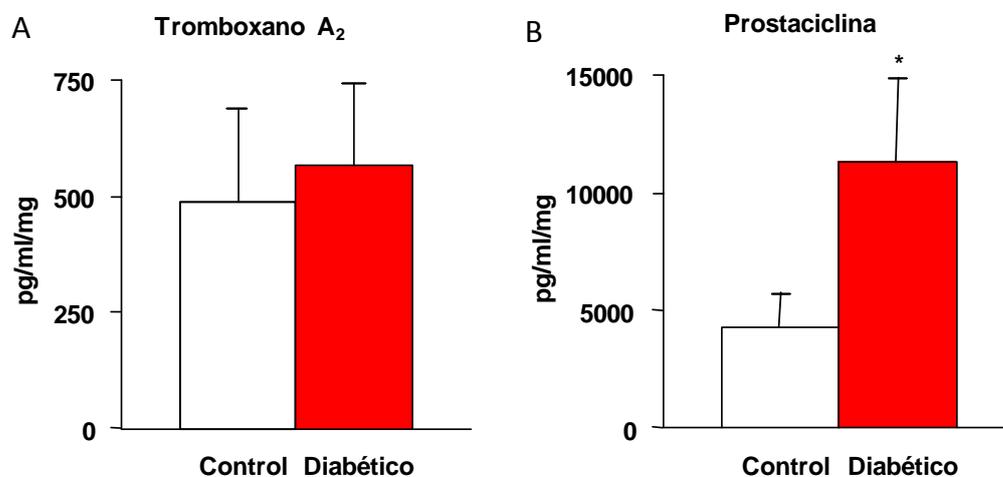


Figura 36. Liberación inducida por testosterona (10^{-4} M) de tromboxano A₂ (A) y prostaciclina (B) en arteria carótida de conejo control (n=6) y conejo diabético (n=10). La liberación se expresa en pg de eicosanoide por ml por mg de tejido y los valores representan la media \pm EEM de "n" conejos. Significativamente diferente, * P<0.05

3.2. Arteria renal de conejo

El análisis por Western blot de la isoforma constitutiva eNOS (Figura 37A) y de la inducible iNOS (Figura 37B) reveló que la arteria renal de conejo expresa estas proteínas y que no existen diferencias significativas entre conejos diabéticos y conejos control. En arteria renal, la expresión de COX-1 no fue diferente en conejos diabéticos en comparación con los conejos control (Figura 38A), pero la expresión de COX-2 fue significativamente menor en conejos diabéticos (Figura 38B).

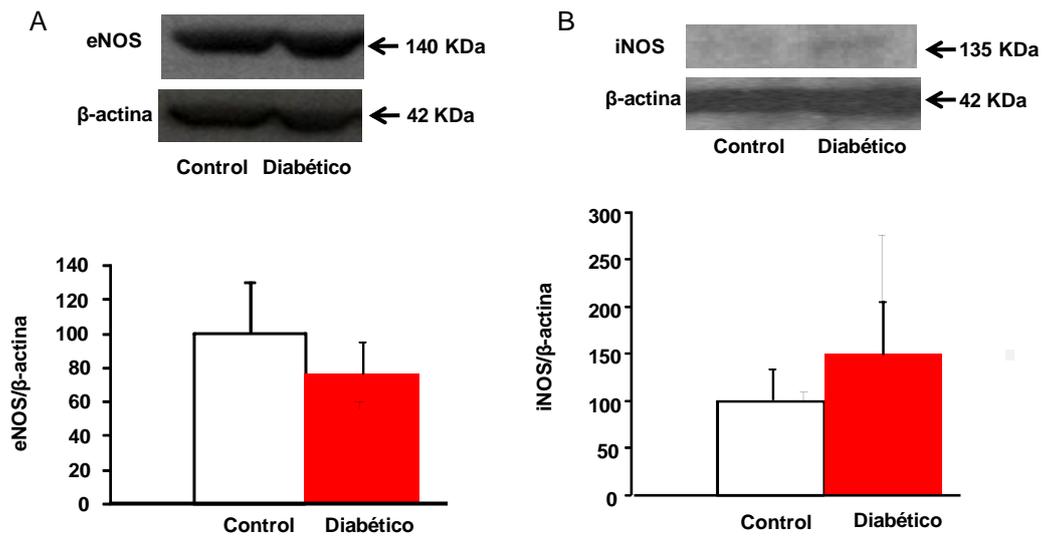


Figura 37. Western blot representativo y expresión relativa de eNOS (A) y de iNOS (B) en arteria renal de conejo control (n=6) y conejo diabético (n=6). La β-actina se muestra como control de la carga de proteína. La densidad relativa de las bandas inmunorreactivas se han normalizado respecto de la densidad de las correspondientes bandas de β-actina y los valores representan la media ± EEM de "n" conejos.

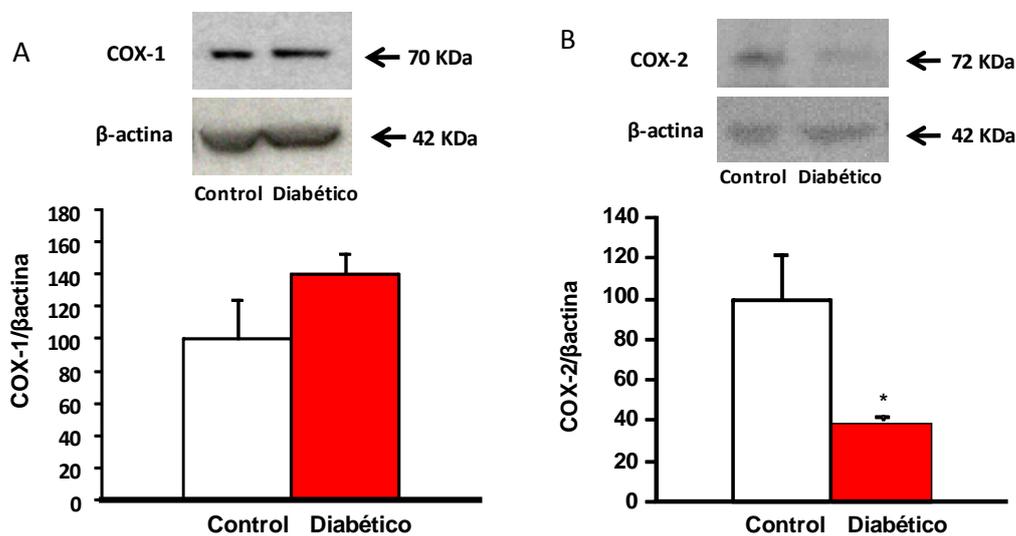


Figura 38. Western blot representativo y expresión relativa de COX-1 (A) y de COX-2 (B) en arteria renal de conejo control (n=4) y conejo diabético (n=4). La β-actina se muestra como control de la carga de proteína. La densidad relativa de las bandas inmunorreactivas se han normalizado respecto de la densidad de las correspondientes bandas de β-actina y los valores representan la media ± EEM de "n" conejos. Significativamente diferente, * P<0.05

El estudio por enzimoimmunoensayo reveló que la testosterona provoca liberación de tromboxano A₂ (Figura 39A) y prostaciclina (Figura 39B) en la arteria renal de conejo. La diabetes no modificó significativamente la liberación de tromboxano A₂ (Figura 39A) ni la liberación de prostaciclina (Figura 39B).

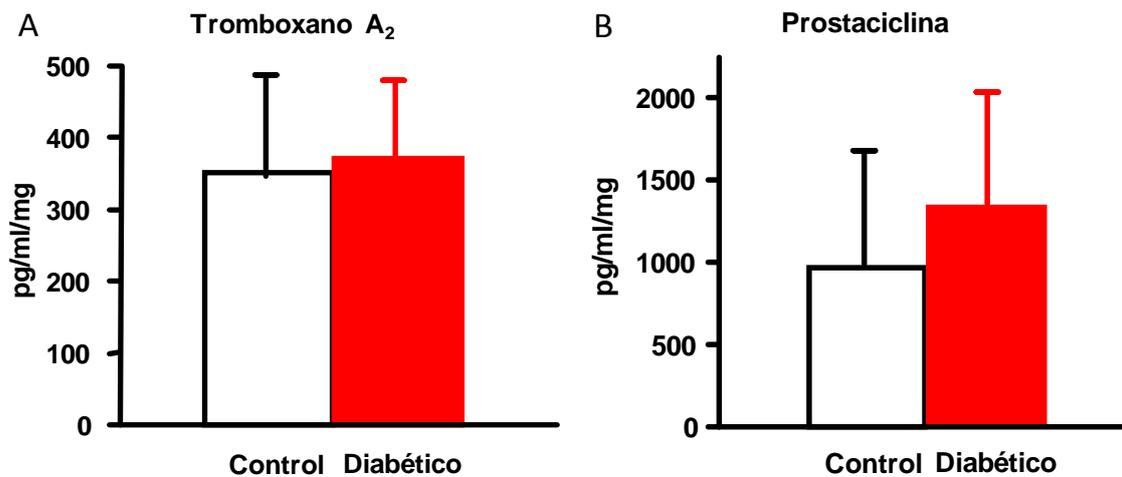


Figura 39. Liberación inducida por testosterona (10^{-4} M) de tromboxano A₂ (A) y prostaciclina (B) en arteria renal de conejo control (n=4) y conejo diabético (n=4). La liberación se expresa en pg de eicosanoide por ml por mg de tejido y los valores representan la media \pm EEM de "n" conejos.

DISCUSIÓN

Para el estudio experimental de la diabetes se han usado, tradicionalmente, modelos animales que permiten, por un lado, el estudio de la etiología de la diabetes mellitus, y por otro, el estudio de los mecanismos involucrados en las complicaciones diabéticas. Las características generales de la diabetes inducida experimentalmente en animales son similares a las de la diabetes humana. Entre los modelos más utilizados están los que inducen la diabetes mediante la inyección de un tóxico (aloxano o estreptozotocina) al animal de experimentación (Öztürk *et al.*, 1996). La inyección de aloxano produce una destrucción de las células β -pancreáticas ocasionando en el animal un síndrome equivalente a la diabetes insulino-dependiente o tipo 1, con hiperglucemia, polidipsia, glucosuria, poliuria y pérdida de peso (Öztürk *et al.*, 1996). En el presente trabajo hemos utilizado un modelo de diabetes experimental en conejos por aloxano. Este modelo se adapta muy bien a la infraestructura disponible, ya que existe un animalario perfectamente equipado para la estabulación de los conejos, y frente al modelo en rata tiene la ventaja de que el tamaño de las arterias se adapta muy bien al sistema de baño de órganos utilizado por el grupo de investigación. Los conejos diabéticos presentan poliuria, polidipsia, hiperglucemia y menor aumento ponderal que los conejos del grupo control, confirmando la conocida eficacia del aloxano en la inducción experimental de la diabetes.

Se ha observado que existe una clara asociación entre diabetes e hipogonadismo que incrementa el riesgo de sufrir cualquier complicación cardiovascular, con la consiguiente afectación de la calidad y la esperanza de vida del paciente. En humanos se ha visto que los niveles plasmáticos de testosterona libre y testosterona total están inversamente asociados con

factores de riesgo cardiovascular, en particular con la severidad del ictus y la mortalidad a los 6 meses post ictus y con la resistencia a la insulina (Jeppesen *et al.*, 1996), y también con la progresión de la enfermedad renal del diabético (Xu *et al.*, 2008). También se ha visto que existe una asociación entre bajos niveles de testosterona total y libre con el incremento del riesgo de mortalidad en pacientes varones sometidos a diálisis sugiriendo que el tratamiento del hipogonadismo podría ser efectivo para aquellos pacientes con una afectación renal crónica (Carrero *et al.*, 2009). Estos datos indican por tanto que la testosterona tiene un importante papel en la fisiopatología de las enfermedades cardiovasculares y de la nefropatía del enfermo diabético. En el presente trabajo hemos estudiado esta interacción entre diabetes e hipogonadismo midiendo los niveles plasmáticos de testosterona libre y testosterona total. Nuestros resultados apoyan esta interrelación, ya que la concentración plasmática de testosterona libre y total fue más baja en los conejos diabéticos que en los conejos control. Se ha sugerido la posibilidad de que el trastorno primario sea el hipogonadismo, ya que la liberación de una cantidad deficiente de testosterona va seguida de resistencia periférica a la insulina, que además puede ser mejorada mediante terapia sustitutiva con testosterona (Miner y Seftel, 2007). Teniendo en cuenta el protocolo experimental que hemos usado en este trabajo, nuestros resultados sugieren que el hipogonadismo es consecuencia de la diabetes y no al revés. Además, los resultados obtenidos también coinciden con la marcada reducción de los niveles de andrógenos que aparece en ratas con diabetes inducida por estreptozotocina (Centol *et al.*, 1988).

1. Efecto de la testosterona sobre la arteria carótida

Nuestros resultados muestran que la testosterona, a concentraciones suprafisiológicas, relaja la arteria carótida de conejo. Aunque la vasodilatación inducida por la testosterona *in vivo* se observa a concentraciones alrededor de 10 nM, en vasos aislados la relajación a la testosterona se evidencia para concentraciones micromolares (10-100 μ M) similares a las del presente estudio (Jones *et al.*, 2004; Seyrek *et al.*, 2007; Malkin *et al.*, 2006; Unemoto *et al.*, 2007; Perusquía y Stallone, 2010). La relajación máxima a la testosterona fue mayor en arteria carótida de animales diabéticos (61%) que en animales control (33%). Como la diabetes inhibe la relajación dependiente del endotelio inducida por acetilcolina en arteria carótida (Miranda *et al.*, 2000) podríamos pensar que la hiperreactividad de la arteria carótida a la testosterona en la diabetes se debería más a la existencia de hipotestosteronemia que a la diabetes en sí misma. Además, este argumento estaría reforzado por los resultados obtenidos *ex vivo* en pacientes con deficiencia androgénica en los que se ha constatado que la testosterona provoca un incremento de la vasodilatación en arterias de resistencia, efecto que se elimina mediante una apropiada terapia sustitutiva de la testosterona (Malkin *et al.*, 2006).

La respuesta relajante de la arteria carótida a la testosterona se puso de manifiesto de forma rápida, en el transcurso de unos pocos minutos, lo que sugiere que esta acción se lleva a cabo por mecanismos no genómicos. Nuestros resultados también muestran que la vasodilatación inducida por la testosterona en la arteria carótida de conejos control no depende del endotelio ni de la liberación endotelial de NO. Resultados similares se han observado

previamente en arterias coronarias de conejo (Won *et al.*, 2003), por lo que puede concluirse que la diana primaria de la testosterona en la arteria carótida es el músculo liso y no el endotelio vascular. Sin embargo, otros estudios han observado la existencia de una contribución del endotelio en la modulación de la respuesta relajante a la testosterona en arteria coronaria en perro (Chou *et al.*, 1996) y en arteria mesentérica de rata (Tep-areenan *et al.*, 2002). Es interesante resaltar que en el animal diabético la contribución endotelial modulando el efecto de la testosterona en la arteria carótida es significativamente diferente que en conejos control. En el animal diabético el endotelio y el NO median parcialmente la relajación arterial a la testosterona. Además, la inhibición de la síntesis de NO mediante L-NOArg, revierte la hiperreactividad de la arteria carótida a la testosterona observada en el conejo diabético, lo que sugiere que esta hiperreactividad podría deberse, al menos en parte, a la mayor liberación de NO. En nuestro laboratorio se ha descrito previamente el incremento de la actividad moduladora del NO en la respuesta relajante a acetilcolina en arteria carótida de conejo (Miranda *et al.*, 2000). Además, este incremento de actividad del NO queda reforzado por los datos que se han obtenido en los ensayos de Western Blot, en los que hay sobreexpresión de los enzimas eNOS y, sobre todo, iNOS, en arterias procedentes del grupo de animales diabéticos. Resultados semejantes se han obtenido en aorta de conejo diabético, en la que se muestra un incremento de la expresión de eNOS (Zanetti *et al.*, 2000), así como en corazón y arterias mesentéricas de rata donde se muestra una sobreexpresión de iNOS (Nagareddy *et al.*, 2006). Por otro lado, la isoforma inducible iNOS está directamente implicada en la supresión de la biosíntesis de testosterona en

ratón (Weissman *et al.*, 2007), por lo que podemos especular que los fenómenos inflamatorios que se ha comprobado que se asocian a la diabetes (Lafuente *et al.*, 2008), podrían incluir la sobreexpresión de iNOS que hemos observado en nuestros conejos diabéticos, lo cual podría a su vez ser el mecanismo responsable de sus bajos niveles plasmáticos de testosterona.

En este trabajo también se ha estudiado la participación de los derivados del ácido araquidónico en la respuesta de la arteria carótida a la testosterona y los posibles cambios inducidos por la diabetes. En arterias de animales control, con independencia de la presencia o ausencia de endotelio, la indometacina aumentó la respuesta relajante a la testosterona. Este resultado sugiere una modulación de la respuesta vascular a la testosterona por parte del músculo liso, mediante la liberación de un prostanoide vasoconstrictor. En animales diabéticos, la incubación con indometacina redujo la relajación de la arteria carótida con endotelio a la testosterona, pero no se observó esta inhibición en las arterias sin endotelio, evidenciando la liberación endotelial de un prostanoide vasodilatador. En este sentido, hay trabajos que indican que la COX-2 está sobreexpresada bajo determinadas condiciones patológicas, como es el caso de la diabetes (Wong *et al.*, 2009), y también se ha demostrado en algunos estudios que la inducción de COX-2 se acompaña de un incremento preferente de la síntesis de prostaciclina pero no de tromboxano A₂ (Bishop-Bailey *et al.*, 1997; Caughey *et al.*, 2001). Sin embargo, otros estudios llevados a cabo en humanos y en animales reflejan un descenso en la producción de prostaciclina en la diabetes (De Meyer y Herman, 1997). Los experimentos de Western blot y de enzimoinmunoanálisis muestran que la expresión de COX-1 en arteria carótida fue similar en animales control y en diabéticos, y que la

liberación de tromboxano A_2 inducida por testosterona no fue significativamente diferente en ambos grupos experimentales. Por el contrario, la expresión de COX-2 obtenida en arterias procedentes de animales diabéticos fue superior a la obtenida en controles, y además, la incubación de los segmentos carotídeos con testosterona incrementó significativamente la producción de prostaciclina en ambos grupos experimentales, pero lo hizo en mucha mayor medida en el grupo de conejos diabéticos. Es posible que sea la presencia de niveles más altos de prostaciclina más que la ausencia de un vasoconstrictor derivado de COX-1, como es el tromboxano A_2 , el factor clave de la hiperreactividad de la arteria carótida a la testosterona en la diabetes.

Es evidente que la relación entre COX-1 y COX-2 que este estudio pone en evidencia plantea posibles implicaciones en clínica que deben de ser tenidas en cuenta. Las funciones biológicas llevadas a cabo por estos dos enzimas son complejas y se interrelacionan más de lo que tradicionalmente se ha pensado. La expresión aumentada de COX-2 y el incremento en la producción de prostaciclina pueden tener acciones proinflamatorias, aunque, por otro lado, esta prostaciclina formada por la vía de la COX-2 parece presentar una importante acción protectora del miocardio. De acuerdo con otros autores (Parente *et al.*, 2003), proponemos que a la hora de plantearse un tratamiento antiinflamatorio debería tenerse muy presente las complejas interacciones entre los mediadores derivados de COX.

Los canales de K^+ de gran conductancia activados por Ca^{2+} (BK_{Ca}), que se expresan abundantemente en las células musculares lisas de los vasos, juegan un papel crucial en el control del tono vascular y en la reactividad de los

vasos sanguíneos cerebrales y periféricos (Sobey, 2001; Mayhan *et al.*, 2004; Tanaka *et al.*, 2004). Se ha sugerido que la activación de los canales de K^+ en las fibras musculares lisas de los vasos está implicada con los efectos vasorrelajantes de la testosterona. En la arteria coronaria de conejo la vasodilatación independiente de endotelio y de NO, inducida por testosterona implica la activación de canales de potasio en las fibras musculares lisas vasculares (Won *et al.*, 2003; Yue *et al.*, 1995). Sin embargo, en la actualidad se conoce muy poco acerca de la regulación de los canales de potasio en la diabetes. La disfunción vascular en animales diabéticos está asociada a una alteración de la vasodilatación mediada por los canales de potasio activados por Ca^{2+} de alta, intermedia y pequeña conductancia (Lu *et al.*, 2006). Nosotros hemos investigado el papel de estos canales de K^+ en la relajación inducida por testosterona. Tanto en animales control como diabéticos, la incubación de los segmentos arteriales conjuntamente con charibdotoxina y apamina no inhibió la relajación inducida por testosterona. Puede concluirse que los canales de K^+ activados por Ca^{2+} no participan en la regulación de la respuesta de la arteria carótida a la testosterona y que, por tanto, estos canales no están relacionados con la hiperreactividad a la testosterona que hemos observado en el grupo de animales diabéticos.

Varios trabajos han propuesto que el efecto vasodilatador agudo de la testosterona es debido a su interacción con canales de calcio transmembrana no genómicos presentes en el músculo liso vascular (Jones *et al.*, 2003; Scragg *et al.*, 2004). Los resultados obtenidos en este trabajo indican que los segmentos de arteria carótida de ambos grupos de animales muestran vasoconstricción en respuesta a $CaCl_2$. La incubación de los segmentos

arteriales con testosterona inhibió de forma potente la contracción inducida por CaCl_2 tanto en animales control como diabéticos, por lo que parece claro que la testosterona puede estar interfiriendo con el influjo de calcio extracelular, y que este mecanismo podría explicar la acción relajante de la testosterona. Estos resultados coinciden con los obtenidos en otros laboratorios, que muestran que la testosterona produce la inhibición del influjo de calcio extracelular, sin modificar la liberación de calcio desde los depósitos intracelulares, en la aorta de rata (Tep-areenan *et al.*, 2002; Crews y Khalil, 1999b), arteria coronaria porcina (Crews y Khalil, 1999a; Murphy y Khalil, 1999), a través de canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes (Crews y Khalil, 1999a) y/o canales de Ca^{2+} activados por receptor (Perusquía *et al.*, 1996).

2. Efecto de la testosterona sobre la arteria renal

El presente trabajo muestra que la testosterona relaja la arteria renal de conejo, sin diferencias significativas entre conejos diabéticos y control. Al igual que en la arteria carótida, la relajación inducida por la testosterona se puso de manifiesto a concentraciones relativamente elevadas, y de forma rápida, en el transcurso de unos pocos minutos, lo que sugiere que esta acción se lleva a cabo por mecanismos no genómicos.

En el caso de la arteria renal, son escasos los datos existentes acerca de la acción directa que la testosterona posee sobre este lecho vascular, y todavía menos en el caso concreto de la diabetes. La infusión intraarterial de testosterona que permite mantener una concentración estable en sangre de $1\mu\text{M}$ aumenta el flujo renal en el cerdo (Busse *et al.*, 2002).

En ambos grupos de conejos, la eliminación del endotelio prácticamente abolió la acción relajante de la testosterona en la arteria renal, indicando una fuerte dependencia endotelial en la relajación inducida por testosterona, a diferencia de lo observado en la arteria carótida. Esto confirma, tal como se ha sugerido (Kienitz y Quinkler, 2008) que la dependencia endotelial de la relajación inducida por la testosterona depende no sólo de la especie sino también del lecho vascular.

En la arteria renal, el bloqueo de la síntesis de NO no inhibió la relajación a la testosterona ni en animales control ni en diabéticos, indicando que esta acción no está mediada por el NO endotelial. Esto contrasta con resultados obtenidos en el cerdo (Molinari *et al.*, 2002), donde el NO desempeña un papel importante en la vasorelajación renal inducida por testosterona. Además, y al contrario de los resultados de arteria carótida, la expresión de iNOS y eNOS en arteria renal de animal diabético no fue diferente de la de conejo control. Resultados obtenidos previamente en nuestro laboratorio muestran que la diabetes experimental incrementa la actividad moduladora de la eNOS en la respuesta de la arteria renal de conejo a la acetilcolina (Alabadí *et al.*, 2001) y endotelina-1 (Marrachelli *et al.*, 2006). Además, hemos demostrado que la diabetes no modifica la sensibilidad del músculo liso de la arteria renal de conejo al NO (Alabadí *et al.*, 2001). Estos resultados sugieren por tanto, que la diabetes no influye sobre la actividad moduladora del NO en la respuesta de la arteria renal a testosterona, y que dicha ausencia de influencia se debe al hecho de que el NO no media la acción relajante de la testosterona en este lecho vascular.

En este estudio también hemos investigado el papel de los derivados del ácido araquidónico en la respuesta de la arteria renal a la testosterona. Al contrario de lo observado en la arteria carótida, en la arteria renal la indometacina no modificó significativamente la respuesta a la testosterona ni en el grupo control ni en el diabético. Sin embargo, la eliminación mecánica del endotelio ocasionó un incremento de la respuesta relajante de la arteria renal a la testosterona en ambos grupos de animales. Además, los ensayos inmunoenzimáticos muestran que una combinación de noradrenalina y testosterona induce la liberación de tromboxano A₂ y prostaciclina en arterias renales de ambos grupos experimentales. En conjunto, estos resultados sugieren que en la modulación de la respuesta de la arteria renal a la testosterona existe un equilibrio entre la vasodilatación producida por la prostaciclina de origen endotelial y la vasoconstricción producida por el tromboxano A₂ liberado a nivel muscular. También puede sugerirse que la diabetes no altera el balance existente entre prostanoïdes vasoconstrictores y vasodilatadores, a pesar de que en los ensayos de Western blot se evidencia que la diabetes disminuye la expresión de COX-2 sin que modifique la de COX-1. En estudios previos observamos que la diabetes altera el balance entre los prostanoïdes vasoconstrictores de origen muscular (dependiente de COX-1) y los prostanoïdes vasodilatadores de origen endotelial (derivado de COX-2) que modulan la respuesta de la arteria renal de conejo a la 5-hidroxitriptamina (Miranda *et al.*, 2002) y a la endotelina-1 (Marrachelli *et al.*, 2006) en favor de los prostanoïdes vasoconstrictores. En la arteria carótida hemos observado que la diabetes aumenta la expresión de COX-2 y el papel de la prostaciclina. Por tanto, todos estos trabajos demuestran que la influencia de la diabetes sobre

los prostanoideos que regulan la reactividad vascular depende del agente vasoactivo y del lecho vascular.

Como se ha comentado anteriormente, se ha sugerido que la acción vasodilatadora de la testosterona puede estar mediada por la activación de canales de K^+ o la inhibición de canales de Ca^{2+} dependiendo de la especie o del lecho vascular (Kienitz y Quinkler, 2008; Chou *et al.*, 1996; Jones *et al.*, 2003; Scragg *et al.*, 2004). En la arteria renal, la inhibición de los canales de K^+ mediante TEA no inhibió la relajación producida por testosterona en ninguno de los dos grupos de animales, indicando que la respuesta relajante a dicha hormona no está mediada ni por canales de K^+ activados por Ca^{2+} de gran conductancia (BK_{Ca}), ni tampoco por canales de K^+ dependientes de voltaje (K_V). En este caso, los resultados son coincidentes con los obtenidos en el lecho vascular carotideo. Además, se ha comprobado que en aorta torácica de ratas Wistar-Kyoto, la respuesta relajante a la testosterona tampoco es inhibida por TEA (Unemoto *et al.*, 2007).

En arteria renal, $CaCl_2$ indujo una contracción dosis dependiente en arterias de ambos grupos de conejos. La testosterona inhibió intensamente las contracciones inducidas por $CaCl_2$ también en ambos grupos, lo que sugiere que la testosterona actúa bloqueando la entrada de Ca^{2+} extracelular, lo cual explicaría, al menos en parte, la acción relajante de la testosterona. Este efecto bloqueante de la entrada de Ca^{2+} también lo hemos puesto de manifiesto en la arteria carótida. Esta acción calcioantagonista explicaría los efectos beneficiosos asociados a la terapia con testosterona en hombres que presentan enfermedades cardiovasculares. Además, tanto en ausencia como

en presencia de testosterona, y en ambos lechos vasculares estudiados, las contracciones inducidas por CaCl_2 fueron superiores en arterias de animales diabéticos, lo que indica que la diabetes aumenta la respuesta contráctil arterial al Ca^{2+} que entra al interior de la célula desde el líquido extracelular.

3. Consideraciones finales

Los resultados que se presentan en este estudio indican la existencia de diferencias en los mecanismos que regulan la reactividad de ambos lechos vasculares y en la influencia que la diabetes tiene sobre esos mecanismos, poniendo de manifiesto la importancia de las diferencias regionales en la regulación del tono vascular. El conocimiento del impacto que la diabetes causa en las acciones de la testosterona sobre los vasos sanguíneos requiere estudios de mayor profundidad, que proporcionen un mayor entendimiento de la forma en que la diabetes se asocia a la hipotestosteronemia en la patología vascular, así como la base para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas que pudieran incluir el uso de testosterona en pacientes con hipogonadismo para disminuir la morbilidad y mortalidad del paciente diabético.

CONCLUSIONES

La diabetes modifica de forma diferente los mecanismos implicados en la respuesta de las arterias carótida y renal de conejo a la testosterona:

1. La diabetes disminuye los niveles plasmáticos de testosterona libre y total.
2. La testosterona produce una relajación de las arterias carótida y renal de conejo, tanto en animales control como diabéticos. La diabetes aumenta la acción relajante de la testosterona en la arteria carótida pero no la modifica en la arteria renal.
3. En la arteria carótida la relajación a la testosterona es independiente de endotelio, no está mediada por óxido nítrico, y está modulada por tromboxano A_2 muscular y por prostaciclina endotelial. La diabetes aumenta la expresión de eNOS, iNOS y COX-2 en la arteria carótida, y aumenta la actividad moduladora del NO endotelial, y la liberación de prostaciclina endotelial, lo que explicaría, al menos en parte, la hiperreactividad de la arteria carótida a la testosterona en el animal diabético.
4. En la arteria renal la relajación a la testosterona es dependiente de endotelio, no está mediada por óxido nítrico, y está modulada por tromboxano A_2 muscular y por prostaciclina endotelial. La diabetes no modifica estos mecanismos moduladores.
5. La relajación de las arterias carótida y renal de conejo a la testosterona no está mediada por activación de canales de K^+ pero está mediada por el bloqueo de la entrada de Ca^{2+} al interior celular a

través de canales de Ca^{2+} de la membrana de la célula muscular. La diabetes no modifica la participación de estos canales en la respuesta relajante arterial a la testosterona.

BIBLIOGRAFÍA

- Aiken JW, Vane JR. Intrarenal prostaglandin release attenuates the renal vasoconstrictor activity of angiotensin. *J Pharmacol Exp Ther.* 1973;184:678-87.
- Ajayi AA, Fidelis P. The effect of flutamide on systemic and renal hemodynamics in Zucker diabetic rats: paradoxical renal vasodilator response to endothelin-1 and TXA₂ receptor activation in female sex. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006;48:191-8.
- Akishita M, Hashimoto M, Ohike Y, Ogawa S, Iijima K, Eto M, Ouchi Y. Low testosterone level is an independent determinant of endothelial dysfunction in men. *Hypertens Res.* 2007;30:1029-34.
- Alabadí JA, Miranda FJ, Lloréns S, Ruiz de Apodaca RF, Centeno JM, Alborch E. Diabetes potentiates acetylcholine-induced relaxation in rabbit renal arteries. *Eur J Pharmacol.* 2001;415:225-32.
- Amezcuca JL, Palmer RM, de Souza BM, Moncada S. Nitric oxide synthesized from L-arginine regulates vascular tone in the coronary circulation of the rabbit. *Br J Pharmacol.* 1989;97:1119-24.
- Bain J. Testosterone and the aging male: to treat or not to treat? *Maturitas.* 2010;66:16-22.
- Bassas Arnau L. Exploration of testicular function. *Endocrinol Nutr.* 2009;56:18-31.
- Bassil N, Alkaade S, Morley JE. The benefits and risks of testosterone replacement therapy: a review. *Ther Clin Risk Manag.* 2009;5:427-48.

-
- Bellinghieri G, Santoro D, Mallamace A, Savica V. Sexual dysfunction in chronic renal failure. *J Nephrol.* 2008;21 Suppl 13:S113-7.
- Bhagwat SS, Hamann PR, Still WC, Bunting S, Fitzpatrick FA. Synthesis and structure of the platelet aggregation factor thromboxane A₂. *Nature.* 1985;315:511-3.
- Bishop-Bailey D, Pepper JR, Haddad EB, Newton R, Larkin SW, Mitchell JA. Induction of cyclooxygenase-2 in human saphenous vein and internal mammary artery. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997;17:1644-8.
- Bolton TB, Lang RJ, Takewaki T. Mechanisms of action of noradrenaline and carbachol on smooth muscle of guinea-pig anterior mesenteric artery. *J Physiol.* 1984;351:549-72.
- Breyer JA. Diabetic nephropathy in insulin-dependent patients. *Am J Kidney Dis.* 1992;20:533-47.
- Busse R, Edwards G, Félétou M, Fleming I, Vanhoutte PM, Weston AH. EDHF: bringing the concepts together. *Trends Pharmacol Sci.* 2002;23:374-80.
- Cardillo C, Kilcoyne CM, Cannon RO 3rd, Panza JA. Interactions between nitric oxide and endothelin in the regulation of vascular tone of human resistance vessels in vivo. *Hypertension.* 2000;35:1237-41.
- Carrero JJ, Qureshi AR, Parini P, Arver S, Lindholm B, Bárány P, Heimbürger O, Stenvinkel P. Low serum testosterone increases mortality risk among male dialysis patients. *J Am Soc Nephrol.* 2009;20:613-20.

- Caughey GE, Cleland LG, Penglis PS, Gamble JR, James MJ. Roles of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in prostanoid production by human endothelial cells: selective up-regulation of prostacyclin synthesis by COX-2. *J Immunol* 2001;167:2831-8.
- Centol I, López-Blanco F, Deniz A, Benítez L, Marrero-Arencibia I, Fanjul L, Ruiz de Galarreta CM. Serum androgen levels after streptozotocin administration in the male rat. *Rev Esp Fisiol* 1988;44:31-4.
- Chen G, Suzuki H, Weston AH. Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels. *Br J Pharmacol.* 1988;95:1165-74.
- Chou TM, Sudhir K, Hutchison SJ, Ko E, Amidon TM, Collins P, Chatterjee K. Testosterone induces dilation of canine coronary conductance and resistance arteries in vivo. *Circulation* 1996;94:2614-9.
- Cohen RA, Weisbrod RM. Endothelium inhibits norepinephrine release from adrenergic nerves of rabbit carotid artery. *Am J Physiol.* 1988;254(5 Pt 2):H871-8.
- Corona G, Mannucci E, Forti G, Maggi M. Following the common association between testosterone deficiency and diabetes mellitus, can testosterone be regarded as a new therapy for diabetes? *Int J Androl.* 2009;32:431-41.
- Corriu C, Félétou M, Canet E, Vanhoutte PM. Endothelium-derived factors and hyperpolarization of the carotid artery of the guinea-pig. *Br J Pharmacol.* 1996;119:959-64.

- Crews JK, Khalil RA. Antagonistic effects of 17 β -estradiol, progesterone, and testosterone on Ca^{2+} entry mechanisms of coronary vasoconstriction. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999a;19:1034-40.
- Crews JK, Khalil RA. Gender-specific inhibition of Ca^{2+} entry mechanisms of arterial vasoconstriction by sex hormones. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1999b;26:707-15.
- De Meyer GR, Herman AG. Vascular endothelial dysfunction. *Prog Cardiovasc Dis* 1997;39:325-42.
- Dias Pereira P, Lopes CC, Matos AJ, Santos M, Gärtner F, Medeiros R, Lopes C. COX-2 expression in canine normal and neoplastic mammary gland. *J Comp Pathol* 2009;140:247-53.
- Ding H, Triggle CR. Endothelial dysfunction in diabetes: multiple targets for treatment. *Pflugers Arch.* 2010;459:977-94
- Féléto M, Vanhoutte PM. EDHF: the Complete Story, CRC Press. 2005.
- Féléto M, Vanhoutte PM. EDHF: an update. *Clin Sci (Lond)*. 2009;117:139-55.
- Fineman JR, Heymann MA, Soifer SJ. N omega-nitro-L-arginine attenuates endothelium-dependent pulmonary vasodilation in lambs. *Am J Physiol.* 1991;260:H1299-306.
- Fitzgerald SM, Kemp-Harper BK, Tare M, Parkington HC. Role of endothelium-derived hyperpolarizing factor in endothelial dysfunction during diabetes. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 2005;32:482-7.

- Foresta C, Zuccarello D, De Toni L, Garolla A, Caretta N, Ferlin A. Androgens stimulate endothelial progenitor cells through an androgen receptor-mediated pathway. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 2008;68:284-9.
- Foudi N, Louedec L, Cachina T, Brink C, Norel X. Selective cyclooxygenase-2 inhibition directly increases human vascular reactivity to norepinephrine during acute inflammation. *Cardiovasc Res* 2009;81:269-77.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature*. 1980;288:373-6.
- Grant JF, Hicks N, Taylor AW, Chittleborough CR, Phillips PJ; The North West Adelaide Health Study Team. Gender-specific epidemiology of diabetes: a representative cross-sectional study. *Int J Equity Health* 2009;8:6.
- Grossmann M, Thomas MC, Panagiotopoulos S, Sharpe K, Macisaac RJ, Clarke S, Zajac JD, Jerums G. Low testosterone levels are common and associated with insulin resistance in men with diabetes. *J Clin Endocrinol Metab*. 2008;93:1834-40.
- Grover-Páez F, Zavalza-Gómez AB. Endothelial dysfunction and cardiovascular risk factors. *Diabetes Res Clin Pract*. 2009;84:1-10.
- Hammoud AO, Gibson M, Peterson CM, Hamilton BD, Carrell DT. Obesity and male reproductive potential. *J Androl*. 2006;27:619-26.
- Hart WM, Espinosa C, Rovira J. Costs of known diabetes mellitus in Spain. *Med Clin (Barc)*. 1997;109:289-93.

- Harjutsalo V, Katoh S, Sarti C, Tajima N, Tuomilehto J. Population-based assessment of familial clustering of diabetic nephropathy in type 1 diabetes. *Diabetes*. 2004;53:2449-54.
- Ignarro LJ, Harbison RG, Wood KS, Wolin MS, McNamara DB, Hyman AL, Kadowitz PJ. Differences in responsiveness of intrapulmonary artery and vein to arachidonic acid: mechanism of arterial relaxation involves cyclic guanosine 3':5'-monophosphate and cyclic adenosine 3':5'-monophosphate. *J Pharmacol Exp Ther*. 1985;233:560-9.
- Iwata F, Joh T, Kawai T, Itoh M. Role of EDRF in splanchnic blood flow of normal and chronic portal hypertensive rats. *Am J Physiol*. 1992;263:G149-54.
- Jeppesen LL, Jørgensen HS, Nakayama H, Raaschou HO, Olsen TS, Winther K. Decreased serum testosterone in men with acute ischemic stroke. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1996;16:749-54.
- Jones CA, Krolewski AS, Rogus J, Xue JL, Collins A, Warram JH. Epidemic of end-stage renal disease in people with diabetes in the United States population: do we know the cause? *Kidney Int*. 2005;67:1684-91.
- Jones LF, Brody MJ. Coronary blood flow in rats is dependent on the release of vascular nitric oxide. *J Pharmacol Exp Ther*. 1992;260:627-31.
- Jones RD, Hugh Jones T, Channer KS. The influence of testosterone upon vascular reactivity. *Eur J Endocrinol* 2004;151:29-37.
- Jones RD, Pugh PJ, Jones TH, Channer KS. The vasodilatory action of

testosterone: a potassium-channel opening or a calcium antagonistic action? *Br J Pharmacol* 2003;138:733-44.

Kamata K, Chikada S, Umeda F, Kasuya Y. Effects of phorbol ester on vasodilation induced by endothelium-dependent or endothelium-independent vasodilators in the mesenteric arterial bed. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1995;26:645-52.

Kapoor D, Malkin CJ, Channer KS, Jones TH. Androgens, insulin resistance and vascular disease in men. *Clin Endocrinol (Oxf)* 2005;63:239-50.

Kienitz T, Quinkler M. Testosterone and blood pressure regulation. *Kidney Blood Press Res*. 2008;31:71-9.

Korshunov VA, Schwartz SM, Berk BC. Vascular remodeling: hemodynamic and biochemical mechanisms underlying Glagov's phenomenon. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007;27:1722-8.

Kukovetz WR, Holzmann S, Wurm A, Pösch G. Prostacyclin increases cAMP in coronary arteries. *J Cyclic Nucleotide Res*. 1979;5:469-76.

Lafuente N, Matesanz N, Azcutia V, Romacho T, Nevado J, Rodríguez-Mañas L, Moncada S, Peiró C, Sánchez-Ferrer CF. The deleterious effect of high concentrations of D-glucose requires pro-inflammatory preconditioning. *J Hypertens* 2008;26:478-85.

Levillain O, Hus-Citharel A, Morel F, Bankir L. Localization of arginine synthesis along rat nephron. *Am J Physiol*. 1990;259:F916-23

Liu PY, Death AK, Handelsman DJ. Androgens and cardiovascular disease.

Endocr Rev. 2003;24:313-40.

Lowenstein CJ, Dinerman JL, Snyder SH. Nitric oxide: a physiologic messenger. *Ann Intern Med.* 1994;120:227-37.

Lu T, He T, Katusic ZS, Lee HC. Molecular mechanisms mediating inhibition of human large conductance Ca^{2+} -activated K^+ channels by high glucose. *Circ Res* 2006;99:607-16.

Lu YL, Kuang L, Zhu H, Wu H, Wang XF, Pang YP, Wang NJ, Yu DL. Changes in aortic endothelium ultrastructure in male rats following castration, replacement with testosterone and administration of 5alpha-reductase inhibitor. *Asian J Androl.* 2007;9:843-7.

Lukovits TG, Mazzone TM, Gorelick TM. Diabetes mellitus and cerebrovascular disease. *Neuroepidemiology.* 1999;18(1):1-14.

Maggio M, Basaria S. Welcoming low testosterone as a cardiovascular risk factor. *Int J Impot Res.* 2009;21:261-4.

Malek AM, Alper SL, Izumo S. Hemodynamic shear stress and its role in atherosclerosis. *JAMA.* 1999;282:2035-42.

Malkin CJ, Jones RD, Jones TH, Channer KS. Effect of testosterone on ex vivo vascular reactivity in man. *Clin Sci (Lond)* 2006;111:265-74.

- Marrachelli VG, Miranda FJ, Alabadí JA, Lloréns S, Alborch E. Contribution of endothelin receptors and cyclooxygenase-derivatives to the altered response of the rabbit renal artery to endothelin-1 in diabetes. *Eur J Pharmacol.* 2006;534:178-86.
- Marshall SM, Flyvbjerg A. Prevention and early detection of vascular complications of diabetes. *BMJ.* 2006;333:475-80.
- Matsumoto AM. Hormonal therapy of male hypogonadism. *Endocrinol Metab Clin North Am.* 1994;23:857-75.
- Mayhan WG, Mayhan JF, Sun H, Patel KP. In vivo properties of potassium channels in cerebral blood vessels during diabetes mellitus. *Microcirculation* 2004;11:605-13.
- Miller VM, Mulvagh SL. Sex steroids and endothelial function: translating basic science to clinical practice. *Trends Pharmacol Sci.* 2007;28:263-70.
- Miner MM, Seftel AD. Centrally acting mechanisms for the treatment of male sexual dysfunction. *Urol Clin North Am* 2007;34:483-96.
- Miranda FJ, Alabadí JA, Llorens S, Ruiz de Apodaca RF, Centeno JM, Alborch E. Influence of experimental diabetes on regulatory mechanisms of vascular response of rabbit carotid artery to acetylcholine. *Life Sci* 2000;66:2071-80.
- Miranda FJ, Alabadí JA, Lloréns S, Ruiz de Apodaca RF, Centeno JM, Alborch E. Experimental diabetes induces hyperreactivity of rabbit renal artery to 5-hydroxytryptamine. *Eur J Pharmacol.* 2002;439:121-7.

- Mogyorosi A, Ziyadeh FN. Diabetes and hypertension. Australian Diabetes Society position statement. *Med J Aust.* 1996;164:571-2.
- Mohr JP, Albers GW, Amarenco P, Babikian VL, Biller J, Brey RL, Coull B, Easton JD, Gomez CR, Helgason CM, Kase CS, Pullicino PM, Turpie AG. American Heart Association Prevention Conference. IV. Prevention and Rehabilitation of Stroke. Etiology of stroke. *Stroke.* 1997;28:1501-6.
- Molinari C, Battaglia A, Grossini E, Mary DA, Vassanelli C, Vacca G. The effect of testosterone on regional blood flow in prepubertal anaesthetized pigs. *J Physiol.* 2002;543:365-72.
- Moncada S, Higgs A, Furchgott R. International Union of Pharmacology Nomenclature in Nitric Oxide Research. *Pharmacol Rev* 1997;49:137-42.
- Mulligan T, Frick MF, Zuraw QC, Stemhagen A, McWhirter C. Prevalence of hypogonadism in males aged at least 45 years: the HIM study. *Int J Clin Pract* 2006;60:762-9.
- Murphy ME, Brayden JE. Nitric oxide hyperpolarizes rabbit mesenteric arteries via ATP-sensitive potassium channels. *J Physiol.* 1995;486:47-58.
- Murphy JG, Khalil RA. Decreased $[Ca^{2+}]_i$ during inhibition of coronary smooth muscle contraction by 17β -estradiol, progesterone, and testosterone. *J Pharmacol Exp Ther* 1999;291:44-52.
- Nagareddy PR, Xia Z, MacLeod KM, McNeill JH. N-acetylcysteine prevents nitrosative stress-associated depression of blood pressure and heart rate in streptozotocin diabetic rats. *J Cardiovasc Pharmacol* 2006;47:513-20.

-
- Napoli C, Ignarro LJ. Nitric oxide-releasing drugs. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2003;43:97-123.
- Nozaki K, Moskowitz MA, Maynard KI, Koketsu N, Dawson TM, Bredt DS, Snyder SH. Possible origins and distribution of immunoreactive nitric oxide synthase-containing nerve fibers in cerebral arteries. *J Cereb Blood Flow Metab.* 1993;13:70-9.
- Oliva J, Lobo F, Molina B, Monereo S. Estudios de los costes directos sanitarios de los pacientes con diabetes mellitus en España. Universidad Carlos III de Madrid, Working Paper 04-03. Economics Series 01. Febrero 2004.
- Orasanu G, Plutzky J. The pathologic continuum of diabetic vascular disease. *J Am Coll Cardiol.* 2009;53(5 Suppl):S35-S42.
- Öztürk Y, Altan VM, Yildizoglu-Ari N. Effects of experimental diabetes and insulin on smooth muscle functions. *Pharmacol Rev.* 1996;48:69-112.
- Palmer RM, Ferrige AG, Moncada S. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature.* 1987;327:524-6.
- Parkington HC, Chow JA, Evans RG, Coleman HA, Tare M. Role for endothelium-derived hyperpolarizing factor in vascular tone in rat mesenteric and hindlimb circulations in vivo. *J Physiol.* 2002;542:929-37.

- Parente L, Perretti M. Advances in the pathophysiology of constitutive and inducible cyclooxygenases: two enzymes in the spotlight. *Biochem Pharmacol* 2003;65:153-9.
- Perusquía M, Hernández R, Morales MA, Campos MG, Villalón CM. Role of endothelium in the vasodilating effect of progestins and androgens on the rat thoracic aorta. *Gen Pharmacol* 1996;27:181-5.
- Perusquía M, Stallone JN. Do androgens play a beneficial role in the regulation of vascular tone? Nongenomic vascular effects of testosterone metabolites. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2010;298:H1301-7.
- Pugh PJ, Jones RD, West JN, Jones TH, Channer KS. Testosterone treatment for men with chronic heart failure. *Heart* 2004;90:446-7.
- Rees DA, Alcolado JC. Animal models of diabetes mellitus. *Diabet Med*. 2005;22:359-70.
- Salvemini D, Misko TP, Masferrer JL, Seibert K, Currie MG, Needleman P. Nitric oxide activates cyclooxygenase enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90:7240-4.
- Schumacher K, Castrop H, Strehl R, de Vries U, Minuth WW. Cyclooxygenases in the collecting duct of neonatal rabbit kidney. *Cell Physiol Biochem*. 2002;12:63-74.
- Scragg JL, Jones RD, Channer KS, Jones TH, Peers C. Testosterone is a potent inhibitor of L-type Ca²⁺ channels. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;318:503-6.

- Seaquist ER, Ibrahim HN. Approach to the patient with type 2 diabetes and progressive kidney disease. *J Clin Endocrinol Metab.* 2010;95:3103-10.
- Seyrek M, Yildiz O, Ulusoy HB, Yildirim V. Testosterone relaxes isolated human radial artery by potassium channel opening action. *J Pharmacol Sci* 2007;103:309-16.
- Silver AE, Vita JA. Shear-stress-mediated arterial remodeling in atherosclerosis: too much of a good thing? *Circulation.* 2006;113:2787-9.
- Sobey CG. Potassium channel function in vascular disease. *Arterioscler ThrombVasc Biol* 2001;21:28-38.
- Srinivasan K, Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian J Med Res.* 2007;125:451-72.
- Stehouwer CD, Lambert J, Donker AJ, van Hinsbergh VW. Endothelial dysfunction and pathogenesis of diabetic angiopathy. *Cardiovasc Res.* 1997;34:55-68.
- Suzuki H, Chen G, Yamamoto Y, Miwa K. Nitroarginine-sensitive and -insensitive components of the endothelium-dependent relaxation in the guinea-pig carotid artery. *Jpn J Physiol.* 1992;42:335-47
- Tabit CE, Chung WB, Hamburg NM, Vita JA. Endothelial dysfunction in diabetes mellitus: molecular mechanisms and clinical implications. *Rev Endocr Metab Disord.* 2010;11:61-74.

- Tanaka K, Gotoh F, Gomi S, Takashima S, Mihara B, Shirai T, Nogawa S, Nagata E. Inhibition of nitric oxide synthesis induces a significant reduction in local cerebral blood flow in the rat. *Neurosci Lett.* 1991;127:129-32.
- Tanaka Y, Koike K, Toro L. MaxiK channel roles in blood vessel relaxations induced by endothelium-derived relaxing factors and their molecular mechanisms. *J Smooth Muscle Res* 2004;40:125-53.
- Taylor SG, Weston AH. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: a new endogenous inhibitor from the vascular endothelium. *Trends Pharmacol Sci.* 1988;9:272-4.
- Tep-areenan P, Kendall DA, Randall MD. Testosterone-induced vasorelaxation in the rat mesenteric arterial bed is mediated predominantly via potassium channels. *Br J Pharmacol* 2002;135:735-40.
- Therland KL, Stubbe J, Thiesson HC, Ottosen PD, Walter S, Sørensen GL, Skøtt O, Jensen BL. Cyclooxygenase-2 is expressed in vasculature of normal and ischemic adult human kidney and is colocalized with vascular prostaglandin E2 EP4 receptors. *J Am Soc Nephrol.* 2004;15:1189-98.
- Toda N, Okamura T. Mechanism underlying the response to vasodilator nerve stimulation in isolated dog and monkey cerebral arteries. *Am J Physiol.* 1990;259:H1511-7.
- Tolins JP, Palmer RM, Moncada S, Raji L. Role of endothelium-derived relaxing factor in regulation of renal hemodynamic responses. *Am J Physiol.* 1990;258:H655-62.

- Traish AM, Saad F, Feeley RJ, Guay A. The dark side of testosterone deficiency: III. Cardiovascular disease. *J Androl.* 2009a;30:477-94.
- Traish AM, Saad F, Guay A. The dark side of testosterone deficiency: II. Type 2 diabetes and insulin resistance. *J Androl.* 2009b;30:23-32.
- Unemoto T, Matsushita M, Tamura K, Tanaka Y, Koike K, Kogo H. Role of BK channels in testosterone-induced relaxation of the aorta in spontaneously hypertensive rats. *Biol Pharm Bull.* 2007;30:1477-80.
- Upmacis RK, Deeb RS, Hajjar DP. Oxidative alterations of cyclooxygenase during atherogenesis. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 2006;80:1-14.
- Veelken R, Hilgers KF, Hartner A, Haas A, Böhmer KP, Sterzel RB. Nitric oxide synthase isoforms and glomerular hyperfiltration in early diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol.* 2000;11:71-9.
- Vermeulen A, Kaufman JM, Deslypere JP, Thomas G. Attenuated luteinizing hormone (LH) pulse amplitude but normal LH pulse frequency, and its relation to plasma androgens in hypogonadism of obese men. *J Clin Endocrinol Metab.* 1993;76:1140-6.
- von Herrath M, Nepom GT. Animal models of human type 1 diabetes. *Nat Immunol.* 2009;10:129-32.
- von Euler US. On the specific vaso-dilating and plain muscle stimulating substances from accessory genital glands in man and certain animals (prostaglandin and vesiglandin). *J Physiol.* 1936;88:213-34.

- Weissman BA, Sottas CM, Zhou P, Iadecola C, Hardy MP. Testosterone production in mice lacking inducible nitric oxide synthase expression is sensitive to restraint stress. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2007;292:E615-20.
- Widlansky ME, Gokce N, Keaney JF Jr, Vita JA. The clinical implications of endothelial dysfunction. *J Am Coll Cardiol*. 2003;42:1149-60.
- Won E, Won J, Kwon S, Lee Y, Nam T, Ahn D. Testosterone causes simultaneous decrease of $[Ca^{2+}]_i$ and tension in rabbit coronary arteries: by opening voltage dependent potassium channels. *Yonsei Med J* 2003;44:1027-33.
- Wong SL, Leung FP, Lau CW, Au CL, Yung LM, Yao X, Chen ZY, Vanhoutte PM, Gollasch M, Huang Y. Cyclooxygenase-2-derived prostaglandin $F_{2\alpha}$ mediates endothelium-dependent contractions in the aortae of hamsters with increased impact during aging. *Circ Res* 2009;104:228-35.
- Xu Q, Wells CC, Garman JH, Asico L, Escano CS, Maric C. Imbalance in sex hormone levels exacerbates diabetic renal disease. *Hypertension*. 2008;51:1218-24.
- Yanes LL, Sartori-Valinotti JC, Iliescu R, Romero DG, Racusen LC, Zhang H, Reckelhoff JF. Testosterone-dependent hypertension and upregulation of intrarenal angiotensinogen in Dahl salt-sensitive rats. *Am J Physiol Renal Physiol*. 2009;296:F771-9.

-
- Yeap BB, Hyde Z, Almeida OP, Norman PE, Chubb SA, Jamrozik K, Flicker L, Hankey GJ. Lower testosterone levels predict incident stroke and transient ischemic attack in older men. *J Clin Endocrinol Metab.* 2009;94:2353-9.
- Yuan S, Liu Y, Zhu L. Vascular complications of diabetes mellitus. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 1999;26:977-8.
- Yue P, Chatterjee K, Beale C, Poole-Wilson PA, Collins P. Testosterone relaxes rabbit coronary arteries and aorta. *Circulation* 1995;91:1154-60.
- Yukimura T, Yamashita Y, Miura K, Okumura M, Yamanaka S, Yamamoto K. Renal effects of the nitric oxide synthase inhibitor, L-NG-nitroarginine, in dogs. *Am J Hypertens.* 1992;5:484-7.
- Zanetti M, Sato J, Katusic ZS, O'Brien T. Gene transfer of endothelial nitric oxide synthase alters endothelium-dependent relaxations in aortas from diabetic rabbits. *Diabetologia* 2000;43:340-7.