



**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

TESIS DE DOCTORADO EN BIOQUÍMICA

**“Efectos del estrógeno estrona en la biología ósea y  
calcificaciones vasculares”**

María Carla Crescitelli

BAHIA BLANCA

ARGENTINA

2022

**Directora de tesis**

Dra. Virginia L. Massheimer

**Co-directora de tesis**

Dra. María Belén Rauschemberger

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR  
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el ..../..../..... , mereciendo  
la calificación de .....(.....)

## **PREFACIO**

Esta Tesis se presenta como parte de los requisitos para optar al grado Académico de Doctor en Bioquímica, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Biología Bioquímica y Farmacia, durante el período comprendido entre el 9 de agosto del 2016 y el 30 de septiembre del 2022, bajo la dirección de Dra. Virginia Massheimer, Profesora Asociada de la Cátedra de Bioquímica Clínica II e Investigadora Principal del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la co-dirección de la Dra. María Belén Rauschemberger, Asistente de la Cátedra de Bioquímica Clínica II e Investigadora Adjunta del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

Farm. María Carla Crescitelli

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

**UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR**

## **DEDICATORIA**

Con todo mi amor, a mis papás y a mi hermano, por haberme inculcado valores, importantes en lo cotidiano y en la vida profesional, por haberme motivado a desafiarme, por haberme enseñado a amar lo que hago y haber acompañado incondicionalmente cada paso de este camino. Todos mis logros se los debo a ustedes. Dedicada a las mujeres de la familia, mis referentes en la vida. También le dedico este trabajo a Rofi, su compañía y amor hicieron que todo fuera más fácil.

## AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional del Sur y al Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, por otorgarme la posibilidad de realizar mis estudios de grado y posgrado.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) por otorgarme la beca que me permitió llevar a cabo mis estudios de posgrado.

A la Dra. Virginia Massheimer por su dirección, predisposición permanente para formarme científicamente, por guiarme a la hora de crecer en la profesión, por su gran calidad científica.

A la Dra. Belén Rauschemberger por contagiarme su entusiasmo por la ciencia, por su calidad humana. Gracias por ser más que lo estrictamente académico, por ser apoyo, por ser amiga y familia. Gracias a ambas por hacer que el proyecto de tesis, sea hoy realidad.

A mis compañeros de laboratorio y demás compañeros del INBIOSUR, con quienes compartí charlas, viajes, mates y experimentos. A Emma Casanave por su calidad humana y académica.

A todo el grupo de investigación del IBGM, con quienes tuve el placer de trabajar y compartir tiempo libre, charlas de pasillo, salidas, cafés. Gracias por hacerme sentir como en casa siempre; hicieron mis estancias hermosas a pesar de los momentos difíciles. A Marisa Nieto por la invitación, por el apoyo y por confiar. Por su gran calidad humana además de científica.

A toda mi familia. A mis papás, Marilí y Antonio, a Franco, Sofía, France y Carme; a Rufi, Moi y Becky. Fueron verdaderos coautores de esta tesis, gracias por apoyarme siempre y ser incondicionales. A mis tías, tíos, abuela y primos, gracias por acompañarme.

A mis compañeros y amigos de docencia. A todo el grupo de Inmuno, en particular a Marcelo y Ma. Inés, por seguir enseñándome el verdadero amor por la docencia. Al Departamento de Química, donde comencé mi camino en la investigación. Gracias Marcelo y Carina. A mis compañeros de Química General.

A la familia que se elige. Los que están más cerca, y los que quedaron un poco más lejos.

A los que me acompañan desde el principio: Cin, Mari, Pau, Emi, Ivo, Clau, Jaqui, Negra, Juli, Brune, Juampi, Lucho, Andrés. A Dami: a lo largo de estos años de tesis juntos fuiste compañía, apoyo y familia en todo momento. Gracias.

A los que fui conociendo en el camino: Juan, Deby, Inma, Sandri, Patri, Jony, Lau, Tere, Álvaro, Juan Cruz, Clau, Javi, Michi, Orlando, Marianita, Sole, Jorge, Pablo, Ile, Ivo. Gracias por ser parte y hacerme parte de sus vidas también.

A todos aquellos que de alguna forma estuvieron, acompañaron e hicieron posible la concreción de esta tesis.

Eternamente agradecida.

## RESUMEN

Los estrógenos juegan un papel importante en la remodelación ósea y en la aterogénesis. Se sabe que la disminución de los niveles de estrógenos durante la menopausia impacta negativamente en el tejido óseo y en la función vascular. Sin embargo, si bien durante este período de la vida de la mujer los niveles circulantes del estradiol son bajos, existen concentraciones séricas sostenidas del estrógeno estrona.

La osteoporosis y las calcificaciones vasculares son enfermedades con mecanismos fisiopatológicos compartidos, de alta prevalencia en mujeres posmenopáusicas. La contribución de la estrona a la homeostasis ósea y vascular no ha sido profundamente estudiada. El objetivo general de este trabajo de tesis fue investigar el efecto de la estrona sobre procesos celulares claves para la homeostasis ósea y vascular, cuya alteración pudieran inducir el deterioro tisular y la génesis de patologías específicas. Nuestra hipótesis plantea que este estrógeno es activo a nivel vascular y óseo. La estrona posee un impacto positivo en el tejido óseo promoviendo la diferenciación de las células formadoras de hueso. A nivel vascular, si exhibe acciones equivalentes a las óseas, resultaría en la inducción de la calcificación vascular.

Se aportó evidencia de que, en cultivos primarios de osteoblastos, la estrona promueve la osteoblastogénesis a través de la estimulación de la expresión de Runx2, de la proliferación, migración celular, y de la síntesis de NO. A su vez, el estrógeno estimula la diferenciación osteoblástica, incrementando la actividad FAL, el depósito extracelular de colágeno y la mineralización de la matriz extracelular. La hormona mostró poseer una capacidad osteoblastogénica semejante a la estimulada por el raloxifeno y estradiol.

Al igual que lo evidenciado a nivel óseo, en el sistema vascular, la estrona induce la transformación ósea de las células musculares lisas vasculares. En el modelo de transdiferenciación, se demostró que la hormona estimula la expresión de marcadores tempranos de diferenciación ósea (Runx2 y REx), la actividad fosfatasa alcalina, el depósito de colágeno y la mineralización de la matriz extracelular.

Desde un punto de vista molecular, el mecanismo de acción de la estrona incluye la participación de los receptores de estrógenos citosólicos /nucleares y de membrana, y de las vías mensajeras óxido nítrico sintasa y MAPK. La estrona exhibió una actividad por sí misma y no a través de su conversión al estradiol.

Las investigaciones de este trabajo de tesis revelaron acciones biológicas del estrógeno estrona a nivel vascular y óseo no descritas hasta el momento. Los aportes más destacados proveen evidencia de que la hormona exhibe una acción similar en los tejidos evaluados. Tanto a nivel óseo como vascular, el estrógeno promueve los procesos celulares que conducen a un mismo fin: generación, diferenciación y mineralización osteoblástica, como así también de células musculares lisas vasculares, tendiente a la formación ósea y a la calcificación vascular, respectivamente.

Si bien los resultados reportados corresponden a ensayos *in vitro* en sistemas celulares aislados, estos datos aportan conocimiento básico, con potencial aplicabilidad clínica, a favor de diseñar estrategias terapéuticas dirigidas a la prevención de patologías como la osteoporosis y aterosclerosis, así como también en beneficio de promover nuevas terapias hormonales de reemplazo. A su vez, estos aportes podrían utilizarse en la prevención del inicio del depósito de calcio dentro de la pared del vaso o, en el caso de etapas más avanzadas, intervenir en la promoción de un proceso controlado de reparación de tejidos, incluso con la desventaja del aumento del depósito de calcio, con el fin de limitar los efectos adversos de calcificación aterosclerótica establecida.

## **ABSTRACT**

It is widely known that estrogens play a key role in bone remodeling and atherogenesis. During menopause, the decline in plasmatic estrogen levels is recognized to negatively impact bone and vascular tissue function. Osteoporosis and vascular calcification are diseases highly prevalent in postmenopausal women, with shared pathophysiological mechanisms.

Although systemic levels of estradiol markedly decrease during menopause, plasmatic concentration of estrone could be sustained. The contribution of estrone to bone and vascular homeostasis has not been deeply studied. In view of the scarce information about the biochemical action of estrone on bone and vascular homeostasis, the general objective of the present thesis work was to investigate the effect of the hormone on key cellular processes for bone and vascular homeostasis, whose alteration could induce tissue deterioration and the genesis of specific pathologies. Our hypothesis is that estrone is an active estrogen at vascular and bone levels. The hormone has a positive impact on bone tissue by promoting bone-forming cells differentiation. At vascular level, if it exhibits actions equivalent to those of bone, it would result in the induction of vascular calcification.

On calvarial bone cells, estrone promotes osteoblastogenesis, through the stimulation of Runx2 expression, proliferation, cell migration, and NO synthesis, as well as alkaline phosphatase activity, extracellular collagen deposition, and extracellular matrix mineralization. The hormone exhibits an osteoblastogenic activity, similar to raloxifene or estradiol treatment.

At vascular level, the transdifferentiation experimental system employed, exhibited the enhancement in expression of early differentiation markers (Runx2 and ER $\alpha$ ), alkaline phosphatase activity, collagen deposition, and extracellular matrix mineralization. Estrone induces bone transformation of vascular smooth muscle cells, by stimulating those parameters.

From a molecular point of view, the mechanism displayed by the estrogen involves cytosolic/nuclear and membrane estrogen receptors, and the nitric oxide synthase and MAPK pathways participation. Indeed, estrone acts by its own, and not through its conversion to estradiol.

The evidence provided reveals biological actions of estrone at vascular and bone level, not described until now, allowing to establish similarities in its mechanisms of action. At bone and vascular level, the estrogen promotes cellular processes that lead to the same goal: osteoblastic and transdifferentiated vascular smooth muscle cells generation, differentiation and mineralization, tending to bone formation and vascular calcification, respectively.

Although the reported results come from *in vitro* assays, these data provide basic knowledge, with potential clinical applicability, in order to design therapeutic strategies aimed to prevent pathologies such as osteoporosis and atherosclerosis, as well as in favor of promoting new hormone replacement therapies. Moreover, these inputs could be used to prevent the onset of vascular calcium deposition, or to interplay in the promotion of a controlled tissue repair process. In the case of more advanced stages, they could be useful to limit the adverse effects of established atherosclerotic calcification.

Certifico que fueron incluidos los cambios y correcciones sugeridas por los jurados.

INTRODUCCIÓN.....	1
ESTRÓGENOS.....	2
BIOSÍNTESIS DE ESTRÓGENOS.....	3
ESTRONA.....	6
MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ESTRÓGENOS.....	6
MODULADORES SELECTIVOS DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS .....	9
SISTEMA ÓSEO.....	13
ESQUELETO.....	13
HUESOS.....	12
COMPOSICIÓN DEL TEJIDO ÓSEO.....	15
CELULAS ÓSEAS.....	15
OSTEOBLASTOGÉNESIS.....	16
REMODELADO ÓSEO.....	18
OSTEOPOROSIS.....	21
SISTEMA VASCULAR.....	24
ESTRUCTURA DE LOS VASOS SANGUÍNEOS.....	24
ENDOTELIO.....	24
CELULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES.....	25
ATEROSCLEROSIS.....	26
CALCIFICACIÓN VASCULAR ATROSCLERÓTICA.....	28
ESTRÓGENOS Y SALUD VASCULAR.....	29
MENOPAUSIA.....	30
ATEROSCLEROSIS Y OSTEOPOROSIS.....	30
TERAPIA HORMONAL DE REEMPLAZO.....	31
MODULADORES SELECTIVOS DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS Y MENOPAUSIA.....	32
EFFECTOS VASCULARES DE LA ESTRONA.....	33
OBJETIVOS E HIPOTESIS.....	34
MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
1. DISEÑO EXPERIMENTAL.....	38
2. SISTEMA EXPERIMENTAL.....	39
2.1 CULTIVOS CELULARES PRIMARIOS MURINOS.....	39
2.1.1 CULTIVO PRIMARIO DE PREOSTEOBLÁSTOS.....	39
2.1.2 CULTIVO PRIMARIO DE CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES.....	42
2.1.3 TRANSFERENCIACIÓN DE CULTIVOS DE CMLV A LINAJE ÓSEO.....	44

2.2 TRATAMIENTOS IN VITRO DE CULTIVOS CELULARES.....	44
3. ENSAYOS Y METODOLOGÍA EMPLEADOS.....	46
3.1 MEDICIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ÓXIDO NÍTRICO.....	46
3.2 TINCIÓN CON GIEMSA.....	46
3.3 PROLIFERACIÓN CELULAR.....	47
3.3.1 CONTEO CELULAR EN CÁMARA DE NEUBAUER.....	47
3.3.2 CONTEO MICROSCÓPICO DE CÉLULAS POR CAMPO.....	47
3.3.3 ENSAYO MTT.....	47
3.4 MIGRACIÓN CELULAR.....	48
3.5 RT-PCR.....	49
3.6 ACTIVIDAD DE LA ENZIMA FOSFATASA ALCALINA.....	49
3.7 ESTUDIO DE LA MATRIZ EXTRACELULAR.....	50
3.7.1 DEPÓSITO DE COLÁGENO: TINCIÓN CON ROJO SIRIO.....	50
3.7.2 MINERALIZACIÓN.....	51
3.7.2.a DEPÓSITO DE CALCIO: CUANTIFICACIÓN ESPECTROFOTOMÉTRICA.....	51
3.7.2.b NÚCLEOS DE CALCIFICACIÓN: TINCIÓN CON ROJO ALIZALINA.....	51
3.8 MEDICIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE ESTRADIOL.....	51
4. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	52
RESULTADOS.....	53
CAPÍTULO 1: SISTEMA ÓSEO.....	54
1.1 CARACTERIZACIÓN DEL SISTEMA EXPERIMENTAL.....	54
1.2 ESTUDIO DEL EFECTO DE LA ESTRONA EN EL ESTADIO PROLIFERATIVO DE OB.....	56
1.2.1 EFECTO DE LA ESTRONA SOBRE LA PRODUCCIÓN DE NO.....	63
1.3 EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ESTRONA EN EL ESTADIO DIFERENCIATIVO DE OB.....	68
CAPÍTULO 2: RALOXIFENO.....	85
2.1 EFECTO DEL RALOXIFENO EN EL ESTADIO PROLIFERATIVO DE OB.....	86
2.2 EFECTO DEL RALOXIFENO EN EL ESTADIO DIFERENCIATIVO DE OB.....	91
CAPÍTULO 3: SISTEMA VASCULAR-CALCIFICACIÓN VASCULAR.....	98
3.1 EFECTO DE LA ESTRONA SOBRE LA TRANSDIFERENCIACIÓN DE CMLV A CMLV-OB.....	99
3.2 EFECTO DE LA ESTRONA SOBRE LA MATRIZ EXTRACELULAR DE CMLV-OB.....	100
DISCUSIÓN.....	118
CONCLUSIONES.....	134

<b>REPRESENTACIÓN ESQUEMÁTICA DE LOS PRINCIPALES APORTES DE ESTA TESIS.....</b>	<b>137</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>138</b>
<b>PRODUCCIÓN DERIVADA DE ESTA TESIS.....</b>	<b>150</b>

**AA:** anillos de aorta

**ARNm:** ácido ribonucleico mensajero

**BMPs:** proteínas morfogénicas óseas

**BSP:** sialoproteína ósea

**CAMs:** moléculas de adhesión celular

**CE:** células endoteliales

**CMLV:** células musculares lisas vasculares

**CMLV-OB:** células musculares lisas vasculares transdiferenciadas a linaje óseo

**COX:** ciclooxigenasa

**CREB:** elemento de respuesta a AMPc

**DMEM:** medio de cultivo

**DMEM-  $\beta$ GP:** medio de cultivo enriquecido en  $\beta$ -glicerofosfato

**DMEM-OB:** medio de cultivo enriquecido en ác. ascórbico y  $\beta$ -glicerofosfato

**ELISA:** ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas

**Eq:** equilin

**ERE:** elementos de respuesta al estrógeno

**E<sub>1</sub>:** estrona

**E<sub>1</sub>-S:** sulfato de estrona

**E<sub>2</sub>:** estradiol

**E<sub>3</sub>:** estriol

**FAL:** fosfatasa alcalina

**FGF:** factor de crecimiento de fibroblastos

**FvW:** factor von Willebrand

**GADPH:** gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa

**GMPC:** guanosín monofosfato cíclico

**GPR30:** receptor estrogénico de membrana acoplado a proteína G

**h:** horas

**HDL:** lipoproteínas de alta densidad

**ICAMs:** moléculas de adhesión intracelular

**IGF-1:** factor de crecimiento insulínico tipo 1

**LDL:** lipoproteínas de baja densidad

**MSCs:** células mesenquimales multipotenciales de la médula ósea

**MTT:** bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol

**MAPK:** proteína quinasa activada por mitógenos

**NFkB:** factor nuclear kB

**NO:** óxido nítrico

**NOS:** óxido nítrico sintasa

**OB:** osteoblastos

**OC:** osteoclastos

**OCN:** osteocalcina

**OPN:** osteopontina

**OPG:** osteoprotegrina

**Osx:** osterix

**PKC:** proteína quinasa C

**PreOB:** preosteoblasto

**PTH:** parathormona

**RANKL:** el ligando del factor activador de receptor nuclear NFkB

**RE:** receptor de estrógenos

**RE $\alpha$ :** receptor de estrógenos  $\alpha$

**RE $\beta$ :** receptor de estrógenos  $\beta$

**RT-PCR:** reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa

**Runx2:** factor de transcripción relativo Runx2

**Ral:** raloxifeno

**SFB:** suero fetal bovino

**SERM:** modulador selectivo del receptor de estrógeno

**TGF- $\beta$ :** factor de crecimiento tumoral  $\beta$

**THR:** terapia hormonal de remplazo

**TNAP:** fosfatasa alcalina no especifica de tejido

## ***ABREVIATURAS***

**URO:** unidad de remodelado óseo

**VEGF:** factor de crecimiento del endotelio vascular

**VEGFR:** receptor del factor de crecimiento vascular

**VCAMs:** moléculas de adhesión vascular

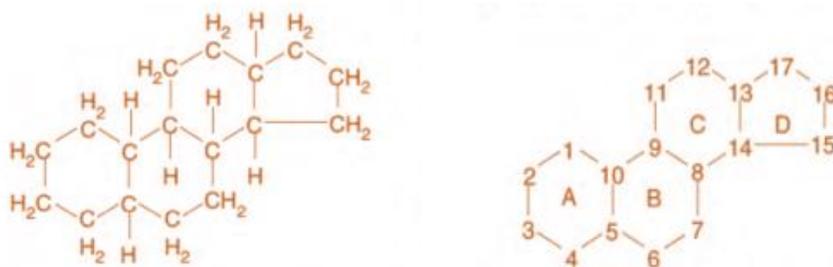
**Wnt:** proteína Wingless

**17 $\beta$ -HSD:** 17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa

# ***INTRODUCCIÓN***

## ESTRÓGENOS

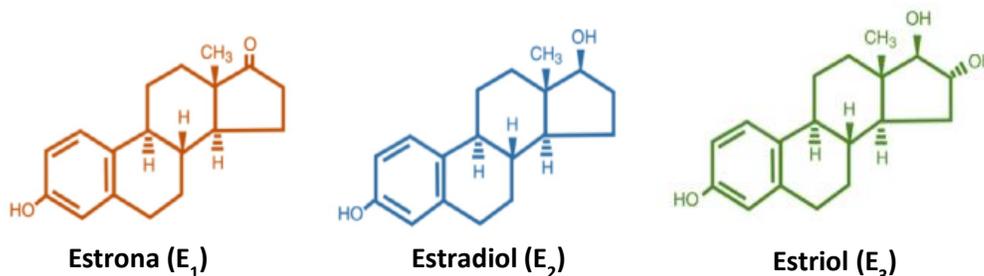
Los estrógenos, estrona ( $E_1$ ), estradiol ( $E_2$ ), y estriol ( $E_3$ ) son un grupo de hormonas, las cuales químicamente, pertenecen a la familia de compuestos orgánicos conocidos como esteroides. Como tales, la estructura de su núcleo se compone de 17 enlaces carbono-carbono dispuestos como cuatro anillos fusionados: núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno (tres anillos de ciclohexano y un anillo de ciclopentano). La numeración de los carbonos de este ciclo, como así también el sistema de letras con el que se designan los anillos se presentan en la Figura 1.



**Núcleo ciclopentanoperhidrofenantreno Numeración de carbonos y anillos**

**Figura 1: Estructura básica de las hormonas esteroideas.**

Las hormonas esteroideas se clasifican en función del número de carbonos que contienen, distinguiéndose fácilmente entre las hormonas sexuales los andrógenos (C 19), estrógenos (C18) y esteroides progestacionales o suprarrenales (C21). No debemos olvidar que los sustituyentes en el sistema de anillo son característicos. Los estrógenos contienen 18 carbonos ( $C_{18}H_{24}O_2$ ) y se conocen colectivamente como esteroides C18. Éstos consisten en un anillo de benceno, un grupo hidroxilo y un grupo cetona (estrona), o dos ( $17\beta$ -estradiol) o tres (estriol) grupos hidroxilo (**Farooq y col., 2015**). Sus estructuras están representadas en la Figura 2.



**Figura 2: Estructura química de los estrógenos.**

La conversión de hormonas esteroideas a formas con mayor o menor actividad biológica implica modificaciones de los sustituyentes del anillo en lugar de la estructura del anillo. Los tres estrógenos pueden unirse tanto a receptores de estrógeno presentes en el núcleo como en la membrana, con diferente afinidad y fuerza de la respuesta (**Watson y col., 2008**). Si bien debido a su relevancia fisiológica y predominio durante los años reproductivos el término “estrógeno” se usa comúnmente para referirse al estradiol, el término comprende a todos los estrógenos (**Samavat y Kurzer, 2015**).

### BIOSÍNTESIS DE ESTRÓGENOS

En el ovario, la principal fuente de producción de hormonas es el folículo en maduración. Los componentes de los folículos son las células de la teca, las células granulosas y los ovocitos primarios. Las células de la teca producen andrógenos y progestágenos, en tanto que las células granulosas producen estrógenos. Las otras células del estroma que contribuyen a la producción de andrógenos pueden dividirse en dos poblaciones: células intersticiales secundarias (derivadas de la teca) y células del hilio.

Las hormonas esteroideas se derivan del colesterol. A través del proceso llamado esteroidogénesis (Figura 3), el colesterol se convierte en hormonas esteroideas de 21 carbonos (pregnanos, progestágenos), 19 carbonos (androstanos) y 18 carbonos (estranos). Las células esteroidogénicas adquieren el sustrato de colesterol de una de tres fuentes; la fuente más común es el colesterol transportado por lipoproteínas plasmáticas, principalmente lipoproteínas de baja densidad (LDL) (**Carr y col., 1982**). Otras fuentes

menores incluyen la síntesis *de novo* a partir del acetato y la liberación de gotículas de lípido almacenadas (ésteres de colesterol).

El paso limitante para la síntesis de esteroides es la reacción enzimática de fragmentación de la cadena lateral del colesterol (P450<sub>scc</sub>). Esta reacción convierte el colesterol en pregnenolona, precursora de las hormonas esteroideas, y ocurre en la mitocondria. La pregnenolona se transporta fuera de la mitocondria, y los pasos restantes en la producción de los esteroides sexuales ocurren principalmente dentro del retículo endoplásmico liso. La pregnenolona, por la vía  $\Delta 5$  o  $\Delta 4$ , se convierte en androstenediona por la acción sucesiva de las enzimas 3 $\beta$ -HSD (3 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa) y liasa. La androstenediona puede convertirse en testosterona por acción de la 17 $\beta$ -HSD (17 $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa), o en E<sub>1</sub> por aromatización. Los esteroides sexuales se pueden sintetizar en las gónadas predominantemente, y en menor proporción en la corteza suprarrenal y el tejido adiposo (**Barakat y col., 2016; Miller, 2017**). Una vez que se ha formado la pregnenolona, las hormonas específicas que se sintetizan dependen del órgano endocrino y del tipo de célula (**Miller y col., 1999**). En las células tecaes del ovario, la androstenediona se puede convertir en otros andrógenos, como la testosterona y la dihidrotestosterona, o difundir a las células de la granulosa a través de la lámina basal. En las células de la granulosa, la androstenediona se convierte en estrona por la enzima CYP19A1 (aromatasa), para luego convertirse en estradiol por la enzima 17 $\beta$ -HSD.

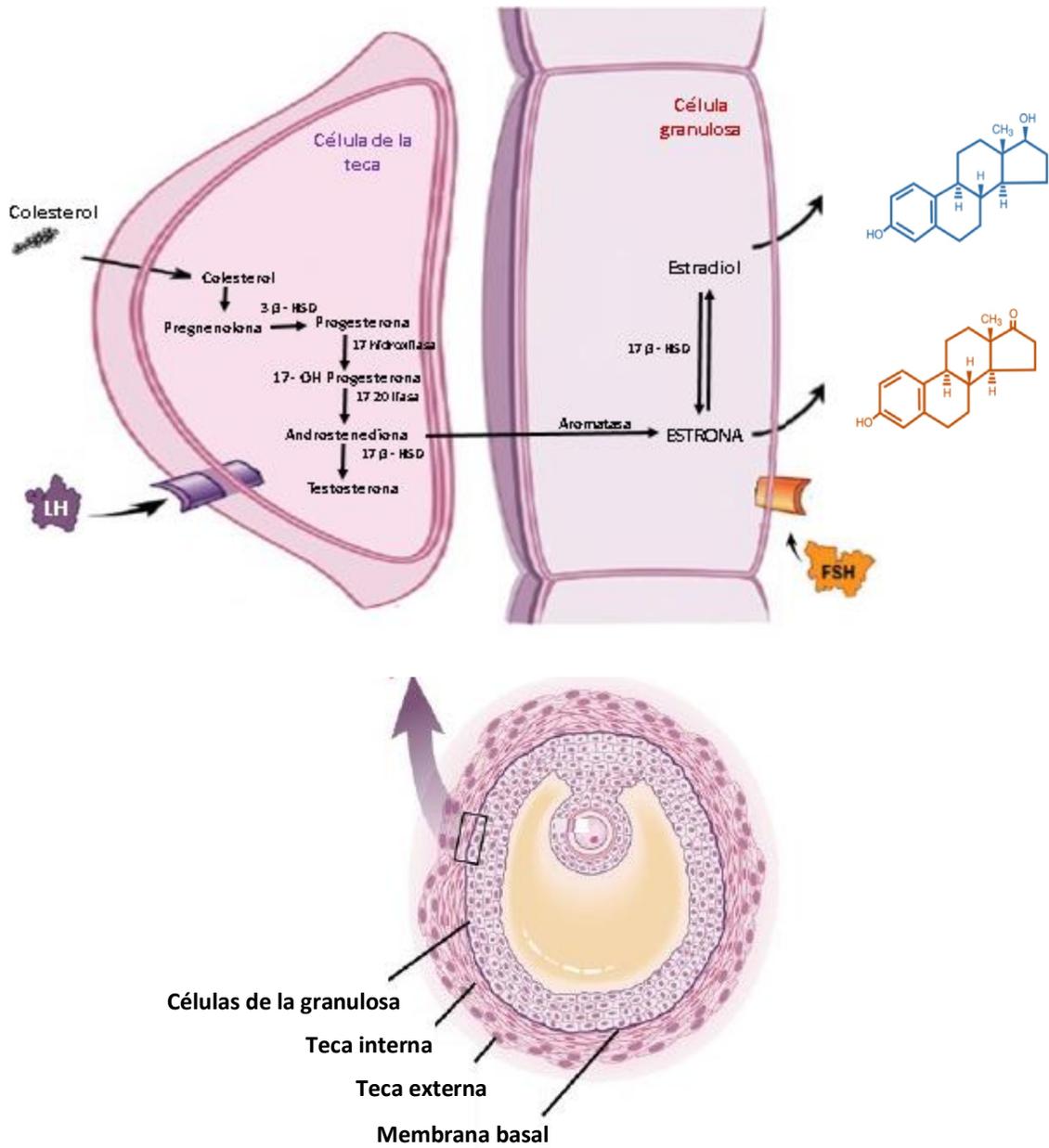


Figura 3: Esteroidogénesis ovárica. Figura modificada de Pitkin y Magowan, (Pitkin y Magowan, 2012).

## **ESTRONA**

En la edad reproductiva, el estrógeno circulante predominante en mujeres es el estradiol, principalmente secretado por las células de la granulosa de los folículos ováricos. La síntesis de los estrógenos ováricos está regulada por eje hipotálamo hipófisis. En las mujeres perimenopáusicas, la disminución progresiva de la dotación folicular provoca que la producción de E<sub>2</sub> fluctúe, siendo sus concentraciones muy variables, con patrones caóticos y, en ocasiones, con niveles muy altos o muy bajos. En general, los niveles de E<sub>2</sub> circulante no disminuyen de modo significativo hasta el final de la menopausia. En la posmenopausia sus niveles son muy bajos y predomina la síntesis *in situ* en ciertos tejidos por aromatización de andrógenos.

En las mujeres posmenopáusicas el estrógeno predominante es E<sub>1</sub>, con una actividad biológica menor **(Kuiper y col, 1998)**, respecto a la del E<sub>2</sub>. La E<sub>1</sub> se produce principalmente por aromatización de androstenediona en tejidos extraglandulares, donde puede actuar localmente como un factor paracrino o intracrino. Esta actividad de la aromatasa aumenta de dos a cuatro veces con el envejecimiento, y se amplifica adicionalmente al aumentar la adiposidad que, de manera típica, acompaña al proceso de envejecimiento. La tasa de producción de E<sub>1</sub> permanece constante, en comparación con la de E<sub>2</sub>, la cual cae abruptamente durante los años de la posmenopausia en comparación con los valores durante los años reproductivos.

La E<sub>1</sub> puede metabolizarse a E<sub>2</sub> por acción de la enzima 17β-HSD, la cual se expresa localmente principalmente en tejido adiposo y mamario, y en menor proporción en endotelio vascular, células musculares lisas vasculares, cerebro y células óseas **(Nelson y Bulun, 2001; Simpson y col, 2003)**.

## **MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ESTRÓGENOS**

Los estrógenos actúan a través de mecanismos que dependen de receptores intracelulares, como así también de mecanismos iniciados en la membrana celular **(Bonnelye y Aubin, 2002; Kang y col., 2015)**. Como hormona esteroidea, el estrógeno atraviesa la membrana plasmática e interactúa con los receptores de estrógenos (RE) intracelulares, regulando la

transcripción génica a través de la unión del complejo hormona-receptor al promotor de genes específicos. Existen dos tipos de receptores: citosólico/nuclear,  $\alpha$  y  $\beta$ , producidos por genes diferentes, ubicados en cromosomas distintos (cromosoma 6 para el RE $\alpha$  y cromosoma 14 para el RE $\beta$ ).

Los RE  $\alpha$  y  $\beta$  pertenecen a la superfamilia de los RE intracelulares para hormonas esteroideas. Presentan una estructura molecular con varios dominios funcionales y diferente grado de homología entre dichos receptores (**Schwabe y Teichmann, 2004**). Los principales dominios funcionales se denominan A/B, C, D y E/F, y están presentes en ambos receptores. Como se ve en la Figura 4, la región A/B representa el dominio aminoterminal, que está involucrado en la transactivación de la transcripción génica y contiene los sitios AF1 de unión para coactivadores o correpresores. La región C corresponde al dominio de unión al ADN; contiene dos dedos zinc los que contribuyen a la dimerización y unión del RE a secuencias específicas conocidas como elementos de respuesta al estrógeno (ERE). El dominio D es una región bisagra que conecta los dominios C y E, y es capaz de unirse a proteínas chaperonas. Esta región también contiene la señal de localización nuclear, lo que permite que los complejos receptor-ligando se transloquen al núcleo. La región E/F carboxi-terminal, también conocida como dominio de unión al ligando, corresponde al sitio de unión del estrógeno, junto con la región AF2 de transactivación (**Kumar y col., 2011**).

Los RE nucleares (RE  $\alpha$  y  $\beta$ ) pueden modular la expresión génica mediante mecanismos genómicos directos e indirectos. La señalización genómica directa se conoce como el mecanismo clásico de señalización de estrógenos. En este proceso, los RE $\alpha$  y  $\beta$  actúan como factores de transcripción activados por ligandos. Tras la unión del estrógeno, los receptores dimerizan pudiendo formar homodímeros y heterodímeros, asociándose a los ERE, donde atraen maquinaria transcripcional y cofactores para regular la expresión génica (**Le Dily y Beato, 2018**). Estas hormonas también pueden modular genes que carecen de las secuencias ERE (señalización genómica indirecta), mediante la interacción de los RE con factores de transcripción como el NF $\kappa$ B, CREB o fos/jun, regulando la transcripción a través de la proteína activadora 1 (AP-1) (**Morissette y col, 2008**).

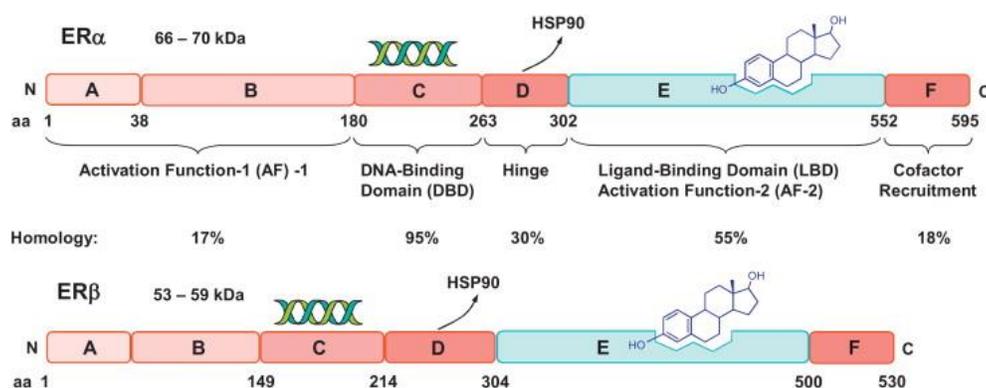


Figura 4: Esquema de los RE  $\alpha$  y  $\beta$ . Figura de Khalil y col. (Khalil y col., 2013).

Recientemente se ha descrito la existencia de RE asociado a membrana, denominado GPR30, cuyo gen se encuentra localizado en el cromosoma 7 (Hazell y col., 2009). En términos de estructura (Figura 5), el GPR30 no comparte similitudes con RE $\alpha$  o  $\beta$ . Como un típico receptor acoplado a proteína G, su estructura consta de 7 regiones transmembrana  $\alpha$ -helicoidal, 4 segmentos extracelulares y 4 segmentos citosólicos (Barton y col., 2018). Este receptor tiene menor afinidad de unión (17 $\beta$ -estradiol) en comparación con los otros RE (O'Lone y col., 2004; Bjomstrom y Sjoberg, 2005; Filardo y col., 2012; Prossnitz y col., 2014).

El RE de membrana GPR30 está involucrado en los efectos no genómicos de los estrógenos. Estas acciones implican la activación de mecanismos de transducción de señales con la subsiguiente producción de segundos mensajeros intracelulares. Estas cascadas de señalización intracelulares son responsables de generar respuestas celulares inmediatas, o indirectamente, regular la expresión génica (Prossnitz y Barton, 2011). En resumen, los estrógenos actúan en las diferentes células blanco, a través de acciones genómicas, no genómicas, o por una combinación de ambas (Silva y col., 2010).

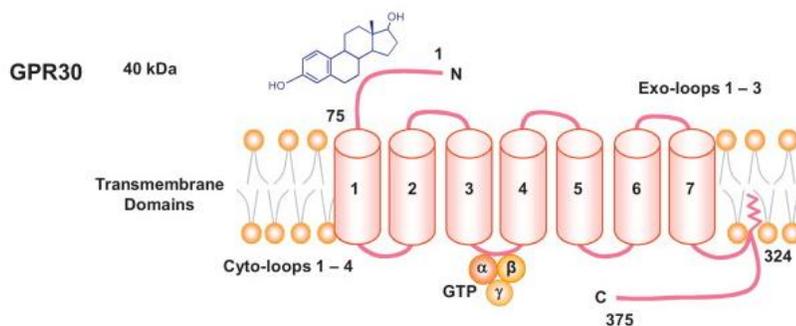


Figura 5: Esquema de los RE GPR30. Figura de Khalil y col. (Khalil col., 2013).

### MODULADORES SELECTIVOS DE LOS RECEPTORES DE ESTRÓGENOS

Los moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERMs) son otro tipo de ligandos de receptores de estrógenos. Los SERMs son capaces de actuar como agonistas o como antagonistas dependiendo del tejido y del tipo celular (**Martinkovich y col., 2014**), pudiendo ser activos en determinadas células, e inactivos en otros tejidos clásicamente respondedores a estrógenos.

El mecanismo de acción de los SERMs no está totalmente establecido (**Martín-Santamaría y col., 2010**). A nivel molecular, compiten con los ligandos endógenos por la unión a un bolsillo hidrofóbico interno dentro del dominio de unión al ligando del RE (**Wearnmark y col., 2002**). La interacción induce un cambio en la conformación del dominio que permite que se expongan o no sitios de transactivación. Esta unión da como resultado la activación de las vías estrogénicas (efecto agonista de los estrógenos) y el bloqueo (efecto antagonista de los estrógenos) en tejidos que expresan RE. Si bien la mayoría de los SERMs son principalmente selectivos para RE $\alpha$ , algunos pueden regular las acciones del RE $\beta$  y del GPR30 (Figura 6) (**Blizzard y col., 2007; Liu 2020**).

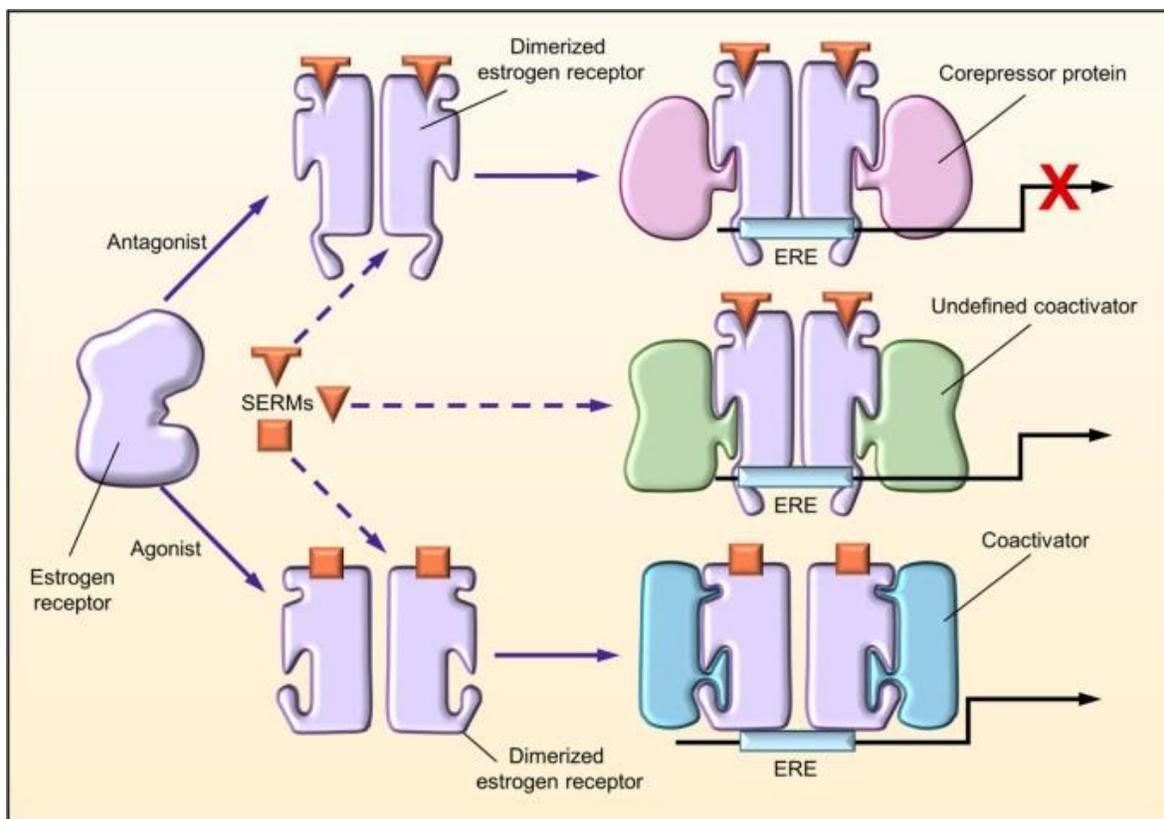


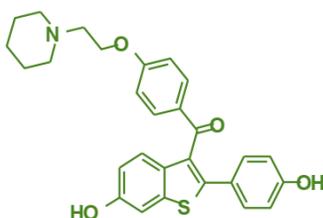
Figura 6: Interacciones moleculares de los SERMs. Figura de Smith y col. (Smith y col., 2014).

Estos compuestos no actúan de la misma manera en todos los tejidos blanco; su acción depende del subtipo de RE predominante en el tejido, de la naturaleza del ligando que se une a ellos, del tipo de factores transcripcionales reclutados; y de la presencia o ausencia de proteínas reguladoras (Rigs y Hartmann., 2003). Esto podría explicar las diferentes funciones de los SERMs dependiendo del tejido diana en cuestión: agonista cuando la interacción con RE $\alpha$  es predominante, y antagonista cuando predomina la interacción del con el RE $\beta$  (Rey y col., 2009; Shughrue y col., 1998).

Los SERMs farmacológicos disponibles se clasifican en trifeniletlenos y benzotiofenos. El raloxifeno (Ral) es un benzotiofeno que ha sido aprobado para el tratamiento de la osteoporosis posmenopáusica, y actualmente se encuentra en estudio para otras posibles indicaciones terapéuticas (Farooq, 2015; Liu, 2020). A pesar que los mecanismos por los cuales los SERMs exhiben sus complejas acciones no han sido dilucidados completamente, la caracterización de la estructura cristalográfica de rayos X del RE cuando está unido al Ral,

proporcionó información sobre la interacción de este receptor-ligando (**Martín-Santamaría y col., 2010**).

En relación a la acción ósea del Ral, estudios preclínicos han demostrado que mejora las propiedades a nivel de la estructura del hueso independientemente de la densidad mineral ósea. A su vez, trabajos *ex vivo* han demostrado que, durante la carga mecánica, el SERM altera la transferencia de carga entre el colágeno y la hidroxiapatita, lo que reduce las tensiones en el mineral y aumenta la resistencia del hueso (**Berman y col., 2020**). Este aumento en la resistencia de la estructura ósea parece estar relacionado con la presencia, disposición espacial y orientación de dos grupos hidroxilo en la molécula (Figura 7), grupos altamente reactivos con la capacidad de formar puentes de hidrógeno, importantes incluso para la unión de la molécula al RE $\alpha$  (**Burr y Phipps, 2022**).



**Figura 7: Estructura química del Raloxifeno.**

Recientemente se demostró que la molécula de Ral se une entre las fibrillas de colágeno, alterando la distribución del agua en la matriz. Esta estructura es hidrófoba, y empuja el agua lejos de otras áreas de la molécula de colágeno, lo que genera regiones locales de hiper e hipo hidratación, que afectan la mecánica del hueso, mejorando la ductilidad y reduciendo la fragilidad ósea, incluso sin alteraciones significativas en su densidad mineral ósea (**Aref y col., 2013; Gallant y col., 2014**).

Esto sugiere que el Ral imparte sus efectos no sólo a través de su afinidad por los RE (**Allen y col., 2016**), sino también por un efecto físico directo sobre la matriz ósea. Por lo tanto, este fármaco posee la capacidad de contrarrestar la disminución de la dureza ósea posmenopáusica relacionada con la edad, alterando la nanomorfología de la fibrilla de

colágeno y la interfaz colágeno-mineral, que a su vez contribuyen a la disminución de riesgo de fractura observado clínicamente (**Azami y col., 2020; Berman y col., 2022**).

## **ESQUELETO**

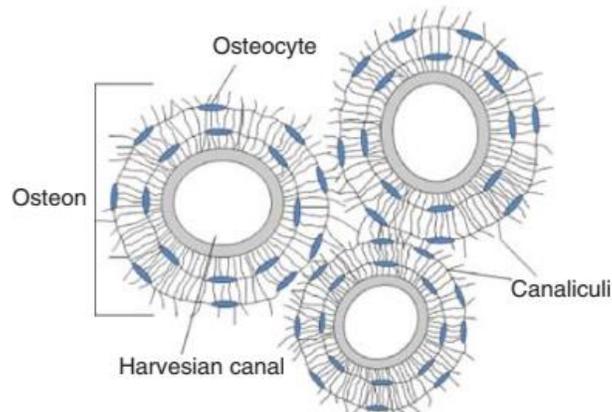
El esqueleto fue originalmente catalogado como una estructura con funciones mecánicas, restringidas a la locomoción del cuerpo y el sostén, y protectoras de órganos y cavidades internas.

Con el pasar de los años, esta estructura comienza a ser vista como un sistema mucho más complejo, con funciones metabólicas como reserva de calcio y fósforo (**Harada y Rodan, 2003**), necesarios para mantener la homeostasis fosfocálcica esencial del organismo, siendo además capaz de modificar su masa y morfología a las demandas funcionales, autorrepararse, e incluso, cumplir funciones hematopoyéticas y endócrinas (**Lee y Karsenty, 2008; Sommerfeldt y Rubin, 2011; Titorencu y col., 2014; Florencio-Silva y col. 2015**). Consta de 206 elementos óseos, o huesos, los cuales presentan diversas formas, tamaños y ubicaciones (**Karsenty y col., 2009**).

## **HUESOS**

De acuerdo a su anatomía, los huesos han sido clasificados en cortos, largos, irregulares y planos, mientras que morfológicamente se pueden distinguir el hueso esponjoso o trabecular, y el compacto o cortical. El hueso cortical es duro, rodea el espacio medular y posee funciones mecánicas y protectoras, mientras que el hueso trabecular se encuentra en el interior de todos los huesos, y además de poseer funciones metabólicas, tiene una disposición especial de espículas óseas llamadas trabéculas las cuales le dan flexibilidad al tejido. Tanto el hueso cortical como el trabecular están compuestos de osteonas (Figura 8). Las osteonas del hueso compacto, o sistemas haversianos, representan el componente básico del hueso cortical. Una osteona es una estructura cilíndrica con un diámetro de aproximadamente 200  $\mu\text{m}$ , alineada a lo largo del eje de los huesos largos (**Rho y col., 1998**). Consiste en un canal Haversiano central, rodeado circunferencialmente por un conjunto de varias capas de láminas óseas. Estos canales están conectados entre sí por otros canales llamados canales de Volkmann que perforan el periostio. Ambos canales son recorridos por vasos sanguíneos, linfáticos y nervios para extenderse a lo largo del hueso (**Marks y Popoff, 1988**). El periostio es un tejido delgado que recubre la superficie externa del hueso, cuya

capa exterior consiste principalmente en colágeno y elastina, alineados con el eje longitudinal, teniendo un papel mecánico. (Allen y col 2004; Yiannakopoulos y col, 2008).



**Figura 8: Diagrama de corte transversal de la corteza de un hueso largo. Figura de Pérez-Amodio y Engel (Pérez-Amodio y Engel, 2014).**

En el hueso esponjoso, en cambio, las láminas intersticiales están dispuestas de forma irregular formando unos tabiques llamados trabéculas. Estos dejan espacios donde se aloja la médula ósea, y los osteocitos, que yacen en sus lagunas con canaliculos que irradian desde las mismas. En este tipo de hueso, la irrigación ingresa directamente permitiendo el intercambio de nutrientes con los osteocitos (Klein-Nulend y col., 2003; Colnot y col., 2009).

Respecto a la formación y desarrollo de este tejido, se evidencian dos tipos de procesos, la osificación endocondral y la osificación intramembranosa. En el primero de éstos, la formación ósea ocurre sobre un sustrato cartilaginoso preexistente generado a partir de la condensación de células madre mesenquimales (MSCs), las cuales se diferencian en condrocitos que comienzan a secretar los componentes de la matriz cartilaginosa extracelular. Luego, ésta es invadida por vasos sanguíneos, osteoclastos y osteoblastos, conformándose los centros de osificación primario y secundario. (Karsenty y col., 2009; Dirckx y col., 2013). Aquí comienza la síntesis de tejido óseo, hasta abarcar el resto del modelo cartilaginoso, el cual será reemplazado en toda su extensión excepto en la

superficie articular (**Mackie y col., 2008**). La osificación intramembranosa difiere del proceso recién descrito en el hecho de que las MSCs, que predeterminan la forma y localización del futuro elemento esquelético, soslayan la formación del intermediario cartilaginoso y se diferencian directamente en células maduras formadoras de hueso (**Karsenty y Wagner, 2002**).

### COMPOSICIÓN DEL TEJIDO ÓSEO

El tejido óseo está formado por diversos tipos celulares, y componentes extracelulares calcificados que forman la matriz ósea, además de agua (5%).

La matriz posee un componente orgánico, denominado osteoide, el cual comprende alrededor del 35% del total. Éste está compuesto por diversas proteínas, entre las que destaca por su cantidad el colágeno tipo 1 (proteína mayoritaria), y las restantes representadas por proteoglicanos (sulfato de condroitina y de heparán), proteínas de anclaje (sialoproteína ósea, osteopontina, fibronectina), proteínas gamma-carboxiladas (osteocalcina) y factores de crecimiento (TGF- $\beta$ , IGF). Algunas de estas proteínas, dado su gran poder para atraer iones, son fundamentales para el proceso de mineralización. En la estructura tridimensional de la matriz orgánica delimitada por las fibrillas de colágeno, se deposita el componente inorgánico: hidroxapatita (cristales inorgánicos de fosfato de calcio), que representa alrededor del 65% de la matriz ósea (**Sommerfeldt y Rubin, 2001; Titorencu y col., 2014**).

### CÉLULAS ÓSEAS

En el tejido óseo coexisten tres tipos celulares principales: los osteoclastos (OC), osteoblastos (OB) y osteocitos. Los primeros son células gigantes, multinucleadas, con gran capacidad lítica, cuya función principal es la eliminación de hueso, o resorción ósea. Derivan de las células madre hematopoyéticas, al igual que los monocitos-macrófagos. Tienen alta capacidad migratoria, un arsenal de enzimas lisosomales líticas y gran cantidad de mitocondrias (**Sommerfeldt y Rubin, 2001**). Los osteoblastos son las células encargadas de sintetizar la matriz extracelular sobre superficies óseas en formación. Representan el 4-6%

del total de las células residentes en el hueso (**Capulli y col., 2014**). Se trata de entidades de forma cuboidal, con núcleo basal, retículo endoplasmático rugoso y aparato de Golgi muy desarrollados, y gran cantidad de vesículas de secreción conteniendo estructuras fibrilares. Estas células están preparadas para secretar gran cantidad de proteínas y otros metabolitos (**Titorencu y col., 2014**). Además de la función tradicional de producir hueso, los osteoblastos son capaces de regular el desarrollo mieloide y hematopoyético, al secretar diversas citoquinas y factores de crecimiento (**Panaroni y col., 2014**).

Por último, los osteocitos son osteoblastos completamente diferenciados, que han quedado atrapados en lagunas rodeadas de matriz mineralizada. De tamaño más pequeño que sus predecesores y con menor cantidad de organelas, son capaces de emitir prolongaciones citoplasmáticas, a través de canaliculos, adoptando una morfología dendrítica, de manera de comunicarse con el resto y formar así una intrincada red de señalización intercelular, encargada de evaluar el estado de salud/integridad del tejido. Así, cuando es requerido, son capaces de poner en marcha la maquinaria de las unidades de remodelación óseas, representadas por osteoclastos y osteoblastos, las cuales eliminarán hueso viejo o dañado para reemplazarlo por uno nuevo (**Sommerfeldt y Rubin, 2001**).

### OSTEOBLASTOGÉNESIS

Se entiende por osteoblastogénesis al proceso a través del cual un progenitor mesenquimal diferencia hacia un osteoblasto maduro. Como mencionamos anteriormente, los osteoblastos son células formadoras de hueso, las cuales derivan de las mesenquimales multipotenciales de la médula ósea (MSCs) a través de un proceso de varios pasos de diferenciación. Las MSCs dan lugar a osteoprogenitores, que se diferencian en preosteoblastos y luego osteoblastos maduros (**Caplan y Bruder, 2001; Jiang y col., 2002**). En este proceso de proliferación y diferenciación de los osteoprogenitores en osteoblastos, los precursores de osteoblastos cambian su morfología ahusada, a grandes osteoblastos cúbicos diferenciados.

El compromiso de las MSCs para convertirse en células osteoprogenitoras está regulado por los factores de transcripción Runx2 y Osterix (**Komori, 2009**), por el factor de crecimiento

tumoral  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), por la vía Wnt, por las proteínas morfogénicas óseas (BMP) **(Chen y col., 2012)**, así como también los factores de crecimiento de fibroblastos (FGF). La señal Wnt conduce a la diferenciación de progenitores hacia linaje óseo por la liberación de  $\beta$ -catenina que se dirige al núcleo donde inicia la transcripción de genes de la matriz, como colágeno tipo I y osteopontina **(Zouani y col., 2013)**. Runx2 es además un gen clave en la diferenciación de osteoblastos al regular la expresión de genes tales como Colágeno tipo I, fosfatasa alcalina (FAL), BSP, proteína Gla de la matriz, y osteocalcina **(Gilbert y col., 2001)**. Una vez que las células progenitoras de osteoblastos comienzan a expresar Runx2, éstas inician un periodo de alta proliferación y comienzan a tener actividad FAL y expresan a su vez receptores para PTH, Vitamina D, glucocorticoides y RE, que dirigen la regulación endócrina de la osteoblastogénesis. La transición de preosteoblastos a osteoblastos maduros se caracteriza por un aumento en la expresión de Osterix y en la secreción de proteínas de la matriz ósea como la osteocalcina (OCN), sialoproteína ósea (BSP) I/II y el colágeno tipo I **(Capuli y col., 2014; Florencio-Silva y col., 2015)**.

Los OB dirigen la disposición de la red de fibras de colágeno, la cual proporciona el andamio sobre el que se deposita el mineral óseo. Estas células también secretan proteínas no colágenas que junto con el colágeno tipo I, constituyen el osteoide: osteonectina, osteopontina, sialoproteína ósea, fibronectina y osteocalcina.

La síntesis de la matriz ósea se produce en dos pasos principales: depósito de matriz orgánica, y su posterior mineralización, la cual se produce en dos fases:

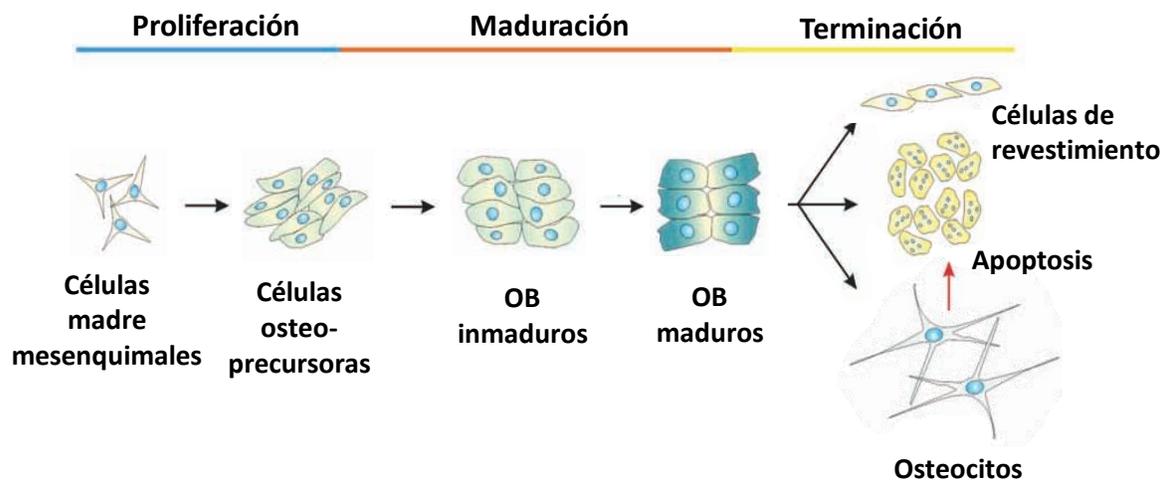
- una fase vesicular, en donde porciones de la parte apical de la membrana de los osteoblastos (vesículas de la matriz) se unen a proteoglicanos y otros componentes orgánicos de la matriz recién formada, inmovilizando los iones de calcio almacenados dentro de las vesículas. Posteriormente el calcio se separa de estas proteínas por acción enzimática, y los compuestos que contienen fosfato son degradados por la FAL secretada por los OB, liberando iones de fosfato dentro de las vesículas de la matriz, para luego junto al calcio formar cristales de hidroxipatita
- una fase fibrilar ocurre cuando la sobresaturación de iones de calcio y fosfato dentro del

vesículas de matriz conduce a la ruptura de estas estructuras, y los cristales de hidroxiapatita se extienden a la matriz circundante (**Anderson, 2003**).

Una vez finalizada esta etapa, la formación y función de los OB aún continúa para garantizar un equilibrio entre la resorción y la formación ósea, regulando la actividad de los osteoclastos a través de la síntesis de citoquinas específicas y factores de crecimiento.

Durante la formación del hueso, algunos OB se incorporan a la matriz y permanecen ocultos como osteocitos en espacios llamados lagunas. Así es que, durante la transformación de osteoblasto a osteocito, la forma del osteoblasto cúbico cambia a una célula con forma más dendrítica. A su vez, otros osteoblastos pueden mantenerse como células de revestimiento o ser eliminados por apoptosis (**Hock y col., 2001; Harada y Rodan, 2003; Nakashima y de Crombrughe, 2003; Pérez-Amodino y Enge, 2014**).

La Figura 9 muestra una representación esquemática de la osteoblastogénesis.



**Figura 9: Modelo esquemático de diferenciación de MSC hacia el linaje osteoblástico. Figura modificada de Gasser y Kneissel (Gasser and Kneissel, 2017).**

## **REMODELADO ÓSEO**

La remodelación ósea es un proceso de autorrenovación constante del hueso a través de un equilibrio dinámico entre formación y resorción, permitiendo el mantenimiento del volumen óseo, la reparación del daño tisular y la regulación del metabolismo fosfocálcico.

Este proceso se basa en la acción concertada, estrechamente regulada, de poblaciones celulares con capacidad de resorción o de formación ósea, con el fin de reemplazar el tejido óseo viejo con hueso nuevo. Este proceso es esencial para la adaptación del tejido a la carga mecánica y el mantenimiento de su fuerza, como así también para la homeostasis fosfocálcica. Tiene lugar en la unidad de remodelado óseo (URO), requiriendo la actividad coordinada de los cuatro tipos celulares antes nombrados: células de revestimiento óseo, osteocitos, osteoclastos, y osteoblastos (**Väänänen, 1993; Parfitt, 2001**).

El proceso de remodelación consta de cuatro fases (Figura 10):

Fase 1: Inicio/activación de la remodelación ósea en un sitio específico; reclutamiento de monocitos y osteoclastogénesis

Fase 2: resorción ósea

Fase 3: reclutamiento de MSCs y diferenciación de osteoblastos

Fase 4: formación y mineralización del osteoide - quiescencia

Inicialmente, cuando el hueso se encuentra en un estado de reposo, la superficie ósea está cubierta por una monocapa de células de revestimiento, y los osteocitos están situados profundo dentro de la matriz ósea. Una vez comienza la fase de activación (Fase 1), el osteocito sensa las señales mecánicas y endócrinas, e inicia el remodelado óseo. La laguna que los contiene cambia de forma, este cambio se transmite por prolongaciones citoplasmáticas a la superficie. El primer fenómeno que tiene lugar es la retracción de los OB de revestimiento y la digestión de la membrana endocítica por la acción de las colagenasas (formación de "canopy"). Al quedar expuesta la superficie mineralizada se produce la atracción de precursores hematopoyéticos, los que luego de ser reclutados, se transforman en osteoclastos (OC) maduros a través del proceso de osteoclastogénesis. El OC diferenciado se activa.

Durante la fase de resorción (Fase 2), los OC se movilizan hacia la zona a resorber y se adhieren a la superficie ósea mineralizada por el ribete en cepillo, sellando los bordes del área mediante las integrinas. Seguidamente, los OC activados liberan enzimas líticas y generan un pH ácido, que disuelve la matriz mineral e hidroliza el compuesto proteico de la matriz osteoide. Finalmente, los osteoclastos mueren por apoptosis.

Simultáneamente, en las zonas de resorción se produce el fenómeno de reclutamiento de preOB, atraídos por los factores de crecimiento que se liberaron desde la matriz, y que actúan como quimiotácticos estimulando su proliferación (formación o Fase 3). Los preOB se diferencian a OB y sintetizan una sustancia cementante sobre la que se va a adherir el nuevo tejido. A los pocos días, los OB sintetizan colágeno tipo I y proteínas no colágenas como osteocalcina y osteopontina, factor de crecimiento de fibroblastos y factor de crecimiento insulínico tipo 1 (IGF-I) que se incorporan a la matriz, induciendo la formación del osteoide que rellenará las zonas horadadas.

La etapa final de la remodelación, fase de mineralización o Fase 4, corresponde al depósito de hidroxapatita. Finalizada la mineralización, el hueso viejo es reemplazado por hueso nuevo. Los OB mueren por apoptosis, o bien se transforman en osteocitos o en células de revestimiento. Las etapas comprendidas entre la formación y mineralización completa son las más lentas de todo el proceso y comprenden aproximadamente 4 meses.

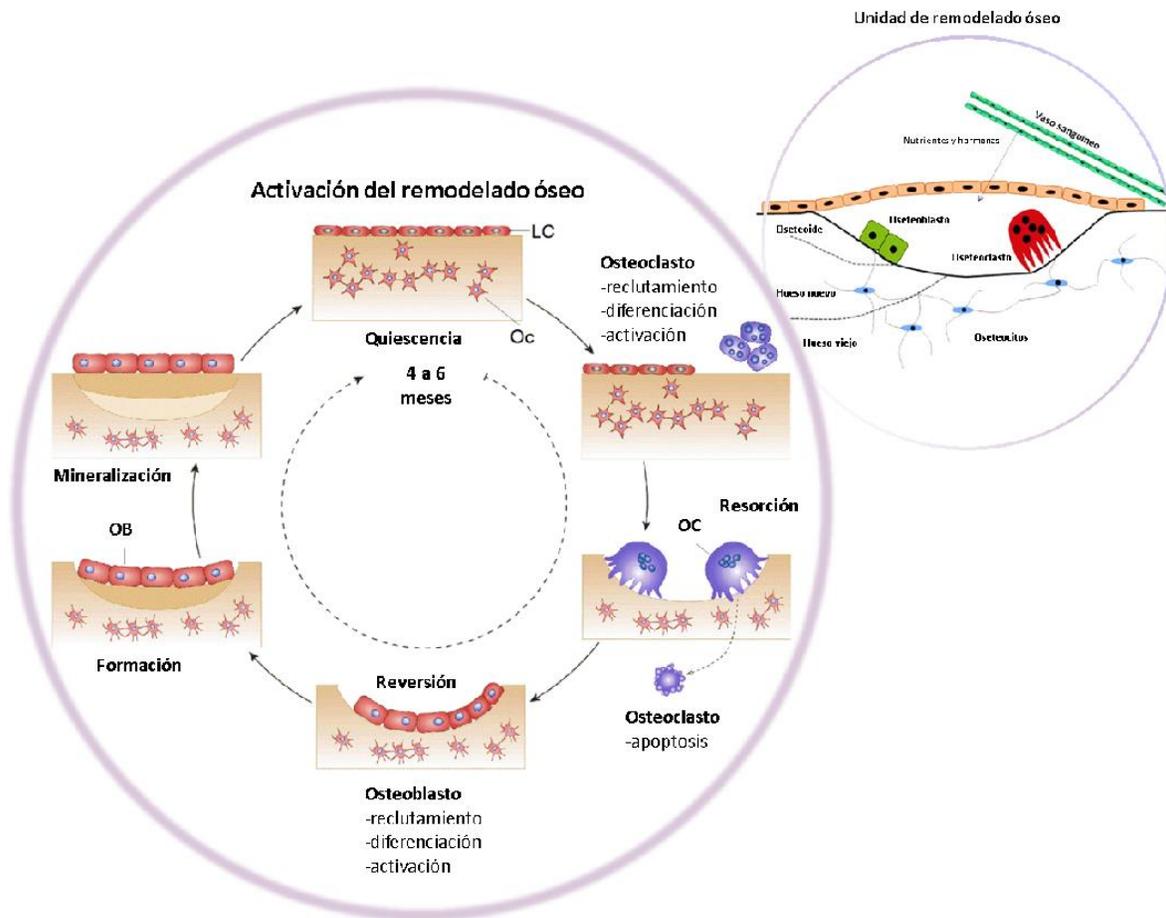


Figura 10: Unidad de remodelado óseo y fases implicadas en el proceso; figuras modificadas de Pérez-Amodio y col, y Bonjour y col. (Pérez-Amodio y col., 2014; Bonjour y col., 2014).

## OSTEOPOROSIS

La osteoporosis es la enfermedad metabólica ósea más frecuente y la principal causa de fragilidad y riesgo de fracturas en mujeres posmenopáusicas y adultos mayores (Lin y col., 2004). Ésta se define como un trastorno esquelético caracterizado por un compromiso de la resistencia ósea (NIH 1993), y se caracteriza por un deterioro sistémico de la masa, fuerza y microarquitectura ósea, lo que aumenta la propensión a las fracturas por fragilidad (Kling y col., 2014). En todo el mundo, uno de cada tres mujeres y uno de cada cinco hombres poseen el riesgo de sufrir una fractura osteoporótica. Se conoce como osteoporosis “primaria” al trastorno esquelético de mujeres posmenopáusicas (osteoporosis posmenopáusica) o de hombres y mujeres mayores (osteoporosis senil); y como

osteoporosis “secundaria”, a la pérdida ósea consecuente a enfermedades endócrinas, neoplásicas o del metabolismo fosfocálcico **(Marcus y Majumder, 2001)**.

En esta patología, el equilibrio en la remodelación ósea se encuentra alterado, de manera que la resorción predomina por sobre la formación y produce una pérdida neta de masa ósea. Los principales mecanismos que causan la osteoporosis son el haber alcanzado un pico de masa ósea insuficiente durante el proceso de crecimiento, la resorción ósea excesiva mediada por osteoclastos, y la formación inadecuada de hueso nuevo por parte de los osteoblastos durante el proceso continuo de recambio óseo. La osteoporosis posmenopáusica se caracteriza por un aumento marcado de la resorción ósea, cuya causa principal es el descenso de los niveles de estradiol circulantes, y la consecuente pérdida del efecto protector óseo de los estrógenos. Las citoquinas (Interleuquinas 1 y 6, y factor estimulante de migración M-SF) se hallan aumentadas estimulando la proliferación, diferenciación y activación de células precursoras de OC, resultando en un balance positivo hacia la resorción ósea **(Zhao, 2012; Black y Rosen, 2016)**.

La acción de los estrógenos sobre la conservación de la masa ósea se ha atribuido tanto a sus efectos antirresortivos como anabólicos **(Syed y col., 2005)**. Ejercen un rol clave promoviendo la proliferación, diferenciación y supervivencia osteoblástica, así como la síntesis de Runx2, osteoprotegerina y colágeno, estimulando la formación ósea. A su vez, inhiben la osteoclastogénesis e inducen la apoptosis osteoclástica, y aumentan la sensibilidad a señales mecánicas en osteocitos, reduciendo la expresión y secreción de esclerotina y RANKL **(Frenkel y col., 2010; Ralston y Uitterlinden, 2010; Rachner y col., 2011; Eastell y col., 2017; Kim y col, 2021)**. La Figura 11 esquematiza el proceso de remodelación ósea en presencia o ausencia de estrógenos.

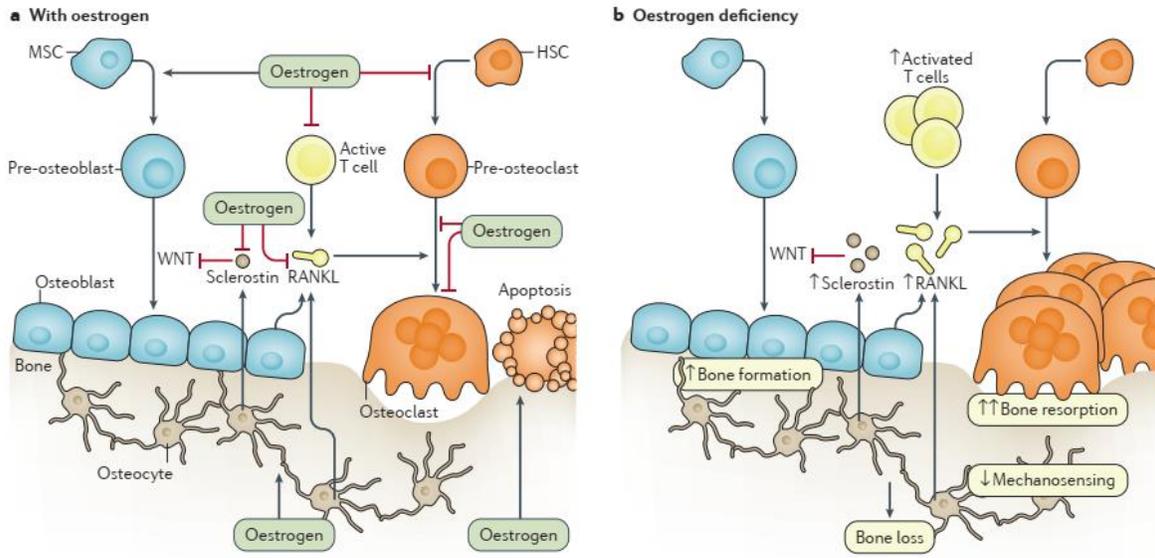


Figura 11: Representación esquemática del rol de los estrógenos en la remodelación ósea. Figura de Eastell y col. (Eastell y col., 2016).

## **SISTEMA VASCULAR**

### **ESTRUCTURA DE LOS VASOS SANGUÍNEOS**

La estructura del sistema vascular es altamente especializada para adaptarse a sus funciones individuales y relaciones anatómicas. Con la excepción de los capilares, todos los vasos sanguíneos tienen la misma estructura básica, compuesta por tres capas concéntricas, reconociéndose histológicamente: una túnica íntima interna, una túnica media, y una túnica externa o adventicia. Cada capa tiene una composición celular distinta y un tejido conectivo de apoyo.

La túnica íntima representa la separación entre la sangre y la pared del vaso. Está compuesta por una sola capa de células endoteliales que rodean la luz interna del vaso, tejido conjuntivo subendotelial, y está sostenida por una membrana basal subyacente la cual separa esta túnica de la media. La túnica media provee la fuerza mecánica y el poder contráctil. Representa la capa más voluminosa en las arterias; contiene predominantemente láminas de células musculares lisas concéntricas, y está sostenida por una membrana basal y una matriz extracelular compuesta principalmente de fibras de colágeno y elastina. Está separada de la túnica íntima por la lámina elástica interna y de la adventicia externa por la lámina elástica externa. En las venas esta túnica es menos voluminosa. La túnica adventicia, representa el recubrimiento más externo del vaso; está formado por tejido conjuntivo laxo compuesto principalmente por fibroblastos y colágeno, terminales nerviosas y capilares (**Geneser y col., 2000; Munjal y Bordoni, 2021**).

### **ENDOTELIO**

El endotelio vascular tapiza todo el árbol vascular. Constituye una barrera entre la sangre y la pared del vaso, la cual posee permeabilidad selectiva, regulan el paso de sustancias y mantienen la homeostasis vascular. Además de ello, la visión actual considera al endotelio como un verdadero órgano de secreción endócrina (**Galley y Wester, 2004**). Las células endoteliales (CE) que lo forman controlan la función vascular respondiendo a diversas hormonas, neurotransmisores, secretando factores vasoactivos (óxido nítrico,

prostagandina, endotelina) y sintetizando fibronectina, laminina, colágeno, elastina y otros componentes del subendotelio. Los factores/hormonas derivadas del endotelio regulan la hemostasia a través de la interacción plaquetas-endotelio, y de la síntesis de factores de la coagulación von Willebrand, contribuyendo al mantenimiento de las propiedades antiaterogénicas y antitrombóticas del lecho vascular (**Orshal y Khalil, 2004; Satish y Tadi, 2021**), y el tono vascular a través de la síntesis de endotelina y otras sustancias vasoactivas. La injuria vascular conduce a una disfunción endotelial y a un desequilibrio en la producción de vasoactivos, evento temprano inductor de la principal enfermedad vascular, la aterosclerosis (**Khazaei y col., 2008; Sandoo y col., 2010**).

### CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES

Las células musculares lisas vasculares (CMLV), son células uninucleadas que poseen funciones contráctiles (distensibilidad, rigidez, elasticidad y constricción concéntrica de los vasos) que les permiten mantener la estructura vascular. Constituyen las células mayoritarias de las paredes arteriales, disponiéndose en capas concéntricas en la túnica media. Son células dinámicas y multifuncionales que en condiciones de estrés promueven la remodelación arterial a través de procesos como la proliferación, elongación, redistribución y migración celular, y apoptosis. A su vez, pueden alterar la composición de la matriz extracelular al sintetizar elastina, colágeno y mucopolisacáridos (**Levick, 1991; Clark y Pyne-Geithman, 2005; Renna y col., 2013**).

Las CMLV propias de un vaso sanguíneo sano constituyen un fenotipo completamente diferenciado, contráctil, y no son particularmente sensibles a los factores de crecimiento o moléculas reguladoras del crecimiento que inducen la proliferación y la migración celular. El fenotipo contráctil del músculo liso está regulado por hormonas, capaces de actuar mediante mecanismos autocrinos o paracrinos, así como señales físicas y químicas locales. En cambio, en respuesta a estrés o a la lesión del endotelio, estas células pierden su capacidad contráctil, aumentan la secreción proteica y se vuelven más sensibles a los factores de crecimiento autocrinos y paracrinos, cambiando entonces a un fenotipo activo

sintético asociado a procesos patológicos tales como la aterosclerosis (**Johnson, 2014; Munjal y Bordoni, 2021**).

## **ATEROSCLEROSIS**

La enfermedad cardiovascular aterosclerótica es una enfermedad inmunoinflamatoria, caracterizada por la formación de placas ateromatosas, responsables del engrosamiento de la pared arterial asociado al estrechamiento de la luz vascular y oclusión del vaso afectado. Es una enfermedad que consiste en procesos degenerativos y regenerativos, que inicialmente afectan la íntima y en una etapa posterior, a la capa media muscular. Junto con otras enfermedades cardiovasculares constituyen una de las principales causas de muerte en el mundo (**Libby, 2021**).

En las últimas décadas se han descrito cinco teorías acerca del origen de la aterogénesis: la teoría lipídica, la teoría hemodinámica, la teoría de la incrustación de fibrina, la hipótesis mesenquimal inespecífica y la hipótesis de respuesta a la lesión endotelial (**Tegos y col., 2001**). Los datos experimentales y clínicos de los últimos estudios indican que, más allá de la dislipidemia, la inflamación participa fundamentalmente en la aterogénesis y en la fisiopatología de los eventos isquémicos. De hecho, las respuestas inflamatorias proporcionan una serie de vías que vinculan los lípidos y otros factores de riesgo tradicionales de la aterosclerosis (**Libby, 2021**).

La fase temprana de generación de la lesión ateromatosa se caracteriza por una alteración de la permeabilidad selectiva endotelial, seguida de reducción de la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO) y aumento de la expresión de moléculas de adhesión celular (CAMs) por el endotelio activado, lo cual origina el reclutamiento de leucocitos sobre la pared vascular y su internalización en la túnica íntima del vaso afectado (**Manduteanu y col., 2012**). La respuesta inicial al daño vascular es la adhesión de plaquetas al endotelio, las que liberan citoquinas que promueven la quimiotaxis de monocitos. El reclutamiento de leucocitos sobre la pared vascular comprende múltiples etapas: inicialmente ocurre una interacción primaria débil y “rodamiento” de los leucocitos sobre la superficie endotelial, luego tiene lugar una adhesión celular más firme, y finalmente se produce la transendotelización de los

leucocitos hacia el espacio subendotelial. Las CAMs endoteliales P-selectina y E-selectina son responsables de la etapa inicial de adhesión monocítica, mientras que moléculas de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y de adhesión vascular 1 (VCAM-1) intervienen en la adhesión firme y la transendotelización. Los leucocitos que migraron se activan, expresan citoquinas proinflamatorias y receptores adecuados para la captación de lípidos modificados, y transforman su fenotipo para convertirse en macrófagos cargados de lípidos o “células espumosas”, cuyo depósito en la íntima arterial genera el núcleo del ateroma. Las citoquinas inflamatorias inducen la migración de CMLV desde la túnica media hacia la íntima (**Libby y col., 2002; Galkina y Ley, 2009; Hahn y col., 2009; Johnson, 2014; Aziz y Yadav, 2016**).

El ambiente proinflamatorio desde las lesiones más tempranas crea un efecto de retroalimentación positiva, reclutando más leucocitos desde la circulación y tejidos adyacentes y estimulando una mayor migración, proliferación y cambio fenotípico: transdiferenciación de las CMLV, con disminución de las propiedades contráctiles e inducción de un fenotipo sintético. Se ha propuesto que en la placa ateromatosa el tejido vascular es más susceptible a la apoptosis. Cuando la lesión progresa, se desarrolla una capa fibrosa formada por CMLV y matriz que recubren el núcleo necrótico de la placa constituida por leucocitos, lípidos y detritus celular. Los macrófagos activados ocasionalmente pueden liberar enzimas hidrolíticas que degradan la matriz originando hemorragias de la microvasculatura desarrollada dentro de la lesión (**Kockx y Herman, 2000; Glass y Witztum, 2001**). En la Figura 12 se observa la representación del proceso de formación de la placa aterosclerótica.

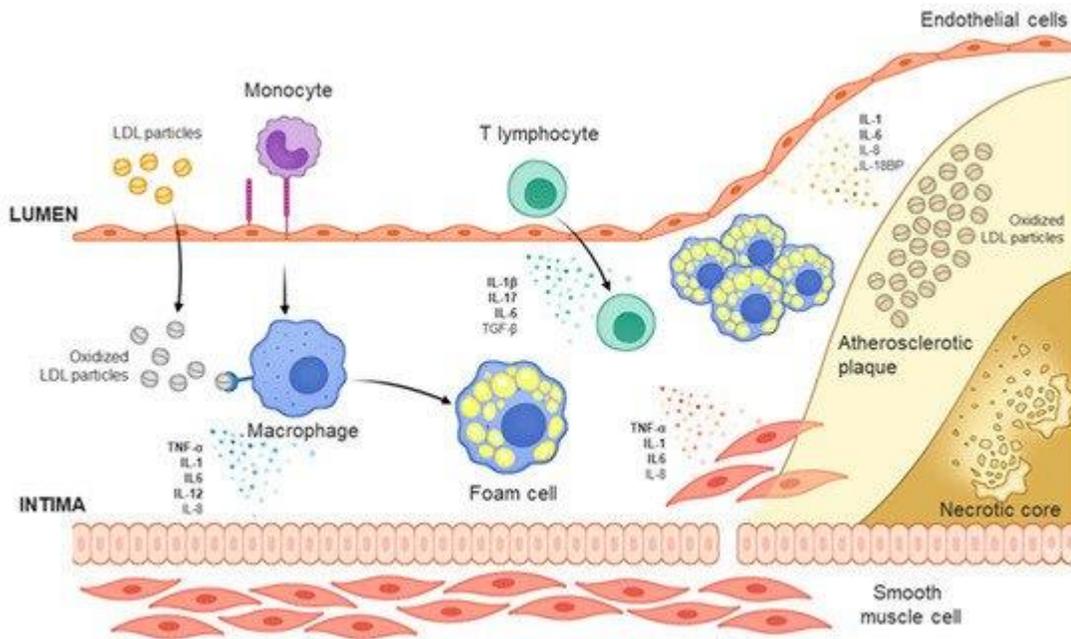


Figura 12: Representación esquemática del mecanismo de formación de la lesión aterosclerótica. Figura de Ji y Lee, (Ji y Lee, 2021).

### CALCIFICACIÓN VASCULAR ATEROSCLERÓTICA

La calcificación vascular de la íntima constituye la etapa final de la lesión aterosclerótica. Es un proceso activo mediado por células que implica la transdiferenciación de las CMLV a un fenotipo símil óseo (**Abbasian, 2021**). Se define como el depósito patológico de fosfato de calcio en la vasculatura sistémica, y puede ocurrir tanto en la íntima arterial como en la túnica media. La patogénesis de la calcificación vascular es compleja e implica inflamación, defectos de autofagia, estrés del retículo endoplásmico y disfunción mitocondrial (**Lee y col., 2020**).

Los últimos estudios en el tema demostraron que el primer paso en el proceso de calcificación vascular sería la conversión de las CMLV en células similares a los osteoblastos, las que sintetizan y secretan proteínas de la matriz extracelular ósea y posteriormente promueven la mineralización a través del depósito calcio y fósforo en forma de hidroxapatita. Este proceso incluye la pérdida de marcadores de linaje de células de músculo liso (SM22- $\alpha$  y  $\alpha$ -actina) y la obtención de marcadores osteogénicos que incluyen

la sobreexpresión Runx2, aumento de los factores de transcripción de osteopontina, osteocalcina, BMP2 y FAL (**Abbasian, 2021, Singh y col., 2021**). Estudios recientes sugieren que la calcificación de la íntima también puede ocurrir en las primeras etapas de la enfermedad (**Elango y col., 2021**).

La calcificación vascular está ampliamente regulada, distinguiéndose inductores de naturaleza proteica (BMP2, osteocalcina, sialoproteína ósea, TNF, ósterix, Runx2, enzima FAL), mineral (calcio y fosfato), y otros factores como el estrés oxidativo, citoquinas inflamatorias (IL-1 y 6), vesículas de matriz/exosomas, lípidos modificados, glucocorticoides, cuerpos apoptóticos, hiperglucemia y algunos fármacos como warfarina. Como inhibidores de este proceso encontramos a la proteína Gla de la matriz, al NO, osteopontina, osteoprotegrina, BMP-7, a la enzima anhidrasa carbónica, al magnesio, pirofosfato, tiosulfato de sodio, vitaminas K y D, y las estatinas (**Singh y col., 2021**).

### ESTRÓGENOS Y SALUD VASCULAR

Los estrógenos ejercen efectos directos sobre los vasos sanguíneos, así como efectos sistémicos que pueden retrasar el desarrollo y la progresión de la aterosclerosis. Numerosos estudios han demostrado que la activación de ambos RE nucleares clásicos y del GPR30 son importantes en los efectos beneficiosos del estrógeno (**Murphy, 2011**). Éstos tienen acciones clave en la vasculatura manteniendo un tono vasorrelajado a través de una mayor producción de NO y prostaciclina; inhibiendo la proliferación y cambio fenotípico de las CMLV, disminuyendo la expresión de moléculas de adhesión, adhesión de monocitos y el estrés inflamatorio (**Naftolin y col., 2019**). A su vez a nivel sistémico son importantes reguladores de la peroxidación lipídica; de la dislipidemia (reducción del colesterol LDL y aumento del colesterol HDL) (**Savonitto y col., 2018; Novella y col., 2019**) y de la hemostasia contribuyendo a mantener el estado antitrombótico (**Nakamura y col., 2004; Lowe y Kararigas, 2020**).

La disminución de estrógenos en la menopausia implica una pérdida de las propiedades vasoprotectoras, antiaterogénicas y antitrombóticas, considerándose a la menopausia

como un factor de riesgo adicional de enfermedad cardiovascular (**Meng y col., 2021; Vakhtangadze y col., 2021**).

## **MENOPAUSIA**

La menopausia es el cese definitivo de los ciclos menstruales debido a la pérdida de la función folicular ovárica, que ocurre alrededor de los 48-50 años de edad en mujeres sanas. La disminución en la producción de hormonas ováricas es gradual y comienza varios años antes del último ciclo menstrual. Cambios en la masa ósea, la vasculatura y el metabolismo del calcio son algunos de los signos y síntomas que se evidencian durante esta transición perimenopáusica (**Reid y col., 2013**). La reducción en los niveles de estrógeno circulante se asocia con un mayor riesgo futuro de enfermedad cardíaca y osteoporosis, y conduce a su vez, a una reducción de la expresión de los RE (**Newson, 2018**).

## **ATEROSCLEROSIS Y OSTEOPOROSIS**

Numerosos estudios han reportado una asociación entre la osteoporosis y la enfermedad aterosclerótica, independientemente de la edad de los pacientes. Los estudios más recientes en la literatura informan una relación inversa entre la densidad mineral ósea y la calcificación aórtica.

Se ha propuesto al riesgo de fractura ósea como predictor de riesgo de cardiopatía coronaria y enfermedades causadas por la calcificación aórtica, así como una asociación entre la aparición de placas coronarias de alto rango y baja densidad mineral ósea (**Güvenç y col., 2021**). Esto destaca a su vez aspectos epidemiológicos y similitudes fisiopatológicas entre la calcificación arterial y la osteogénesis, resultado de mecanismos fisiopatológicos y moleculares comunes entre estas dos condiciones (**Lopes, 2018**). La deficiencia de estrógenos durante la postmenopausia provoca un incremento de los niveles de RANKL que puede desencadenar en un aumento de los niveles de BMP-2, y disminución de los niveles de la proteína Gla de la matriz, favoreciendo de esta forma la calcificación vascular. De manera similar, la deficiencia de estrógenos causa osteoporosis en mujeres

posmenopáusicas mediante la regulación positiva de la vía de señalización de RANKL (Güvenç y Col, 2021).

### **TERAPIA HORMONAL DE REEMPLAZO**

La terapia hormonal de reemplazo (THR) en base a estrógenos, o combinada (estrógenos más progestágenos) surgió como alternativa para prevenir las enfermedades frecuentes en la postmenopausia (Pinkerton y Santen, 1999). Si bien a nivel óseo ha sido eficaz para prevenir pérdida de masa ósea, a nivel vascular los resultados obtenidos de ensayos clínicos randomizados (PEPI; HOPE; WHI) fueron contradictorios (Ouyang y col., 2006), y su utilidad clínica es controvertida. De hecho, el estudio Women`s Health Initiative (WHI) debió ser suspendido prematuramente debido al aumento de la incidencia de eventos cardiovasculares en un grupo de pacientes participantes del estudio tratadas con THR (Hsia y col., 2006). Recientemente el estudio multicéntrico, randomizado KEEPS (Kronos Early Estrogen Prevention Study) revalorizó y reposicionó la utilidad clínica de la THR. A diferencia del WHI, KEEPS empleó una dosis menor de estrógenos conjugados equinos (0,45 vs 0,625 mg/día) y progesterona micronizada en lugar de medroxiprogesterona. El grupo control recibió placebo. Luego de 4 años de seguimiento se evidencian efectos beneficiosos sobre signos y síntomas asociados a menopausia, no detectándose efectos adversos cardiovasculares, por lo que se postula la necesidad de profundizar los estudios traslacionales y clínicos que permitan determinar el riesgo/beneficio de la THR (Miller y col., 2019).

El uso de TRH en mujeres perimenopáusicas y posmenopáusicas ha disminuido mucho en las últimas dos décadas debido a sus efectos secundarios y riesgos asociados, en particular, su asociación con cáncer de endometrio y de mama (Patel y col., 2021). Hoy en día está más claro que el balance riesgo-beneficio de la THR depende del perfil de riesgo individual de cada mujer, así como del tipo de estrógenos y progestágenos o las dosis y vías de administración utilizadas. Cabe recordar que la osteoporosis y la enfermedad vascular aterosclerótica son patologías crónicas, y que, en ausencia de contraindicaciones, la THR debería ser considerada como una opción para el mantenimiento de la salud ósea y vascular

en mujeres posmenopáusicas de reciente inicio sin riesgo cardiovascular ni oncológico **(Gosset y col., 2021)**.

### **SERMs Y MENOPAUSIA**

Como se mencionó anteriormente, los SERMs son agonistas del RE. Los efectos no deseados de la THR, activó y aceleró la investigación sobre estos compuestos como posible alternativa terapéutica para las mujeres postmenopáusicas. En particular, el raloxifeno ha sido estudiado durante los últimos años y los datos respaldan un perfil agonista de estrógenos en el sistema esquelético. En el modelo de rata ovariectomizada, el Ral mostró actuar como antirresortivo, con preservación tanto de la densidad mineral como de la fuerza ósea, en igual magnitud a la observada con etinilestradiol **(Frolik y col., 1996)**. Ensayos realizados en mujeres posmenopáusicas con osteoporosis, mostraron que el Ral aumentó la densidad mineral ósea en un 2% - 3% y redujo la incidencia de nuevas fracturas vertebrales en un 30% y un 50% (en mujeres con y sin fracturas vertebrales, respectivamente) comparado con el grupo control **(Pérez y col., 2008)**. Estudios más recientes también reportaron efectos beneficiosos del SERM respecto al riesgo de fractura vertebral y sobre la densidad ósea del cuello femoral **(Simpson y col., 2020)**, al restaurar la pérdida de hueso esponjoso presente en la deficiencia estrogénica **(Ichimaru y col., 2018)**, mejorar la recuperación de fracturas **(Jian-ping y col., 2021)**, con una menor incidencia de efectos adversos graves en comparación con otras terapias **(Migliorini y col., 2021)**.

En relación con la acción celular del Ral en mujeres postmenopáusicas, se han demostrado efectos similares a E<sub>2</sub> en modelos animales con dispilidemias, disminuyendo el colesterol total y LDL **(Pérez y col., 2008)**. En contraste con algunos regímenes de terapias de estrógenos que aumentan el colesterol HDL y los triglicéridos, el SERM no cambia significativamente estos parámetros, y disminuye los niveles séricos de homocisteína de manera similar a la THR, pero sin afectar los niveles de proteína C reactiva, ambos reconocidos como importantes factores de riesgo no lipídicos para la aterosclerosis **(Muchmore, 2000)**.

Sin embargo, estudios más recientes han reportado efectos no tan beneficiosos. Debido a sus efectos estrogénicos, el fármaco puede aumentar el riesgo de eventos tromboembólicos como la trombosis venosa profunda y la embolia pulmonar, al aumentar la concentración de fibrinógeno plasmático y activar la agregación plaquetaria **(Lu y col., 2020; Ma y col., 2021)**. Por lo tanto, los estudios adicionales tendrían que centrarse en la farmacogenómica de los eventos tromboembólicos en usuarios de Ral, considerando su edad y la concentración sistémica del fármaco. Además, el mecanismo celular y molecular de este SERM, a nivel de células óseas y vasculares, ha sido muy poco explorado.

### EFFECTOS VASCULARES DE LA ESTRONA

Aunque la contribución ósea-vascular del estradiol se ha estudiado en profundidad, hasta el momento poco se sabe sobre la acción de la estrona. Nuestro grupo de investigación ha sido pionero en la temática, reportando acciones directas de la  $E_1$  a nivel vascular. Se demostró que esta hormona se comporta como un SERM, ya que sus acciones son mediadas por el receptor de estrógenos. Demostramos que sus efectos son específicos de  $E_1$  y no por interconversión a  $E_2$ , siendo este reporte la primera evidencia en la literatura científica internacional acerca de las acciones vasculares de este estrógeno **(Selles y col., 2005)**. A través de acciones genómicas y no genómicas, la  $E_1$  estimula el crecimiento y la supervivencia del endotelio, promueve la síntesis de NO y bloquea la interacción monocito-plaqueta-endotelio, inhibiendo la expresión de moléculas de adhesión celular. En condiciones de estrés oxidativo previene la apoptosis de las células endoteliales **(Rauschemberger y col., 2011; Cutini y col., 2012)**. Se demostró la participación de las vías de señalización intracelular NOS y COX, MAPK y PKC dependientes **(Rauschemberger y col., 2008)**. Parte de estos efectos vasculares de  $E_1$  se detectaron en ratas bilateralmente ovariectomizadas sujetas a terapia de sustitución hormonal con el estrógeno. Este conjunto acciones celulares de la  $E_1$  podrían considerarse como protectores de la homeostasis vascular; sin embargo, se reportó una inducción de la síntesis de tromboxano, potente vasoconstrictor **(Massheimer y col., 2006)**.

## ***OBJETIVOS E HIPÓTESIS***

## OBJETIVO GENERAL

Considerando que la menopausia implica niveles sistémicos bajos de estradiol y concentraciones sostenidas de estrona, que la contribución de la E<sub>1</sub> a los signos y síntomas de la postmenopausia no ha sido estudiada, la alta prevalencia en esta etapa de la vida de la mujer de enfermedades con mecanismos fisiopatológicos compartidos como osteoporosis y aterosclerosis, la estrecha vinculación entre los sistemas óseo y vascular, la capacidad del E<sub>2</sub> de ejercer efectos beneficiosos en hueso y en el lecho vascular, y los resultados previos del grupo de investigación, el **objetivo general** de este trabajo de tesis fue investigar el efecto de la E<sub>1</sub> sobre procesos celulares claves para la homeostasis ósea y vascular, cuya alteración pudieran inducir el deterioro tisular y la génesis de patologías específicas.

## HIPÓTESIS DE TRABAJO

Nuestra hipótesis de trabajo plantea que la E<sub>1</sub> es un estrógeno activo a nivel vascular y óseo. Posee un impacto positivo en el tejido óseo promoviendo la diferenciación de las células formadoras de hueso (OB). A nivel vascular, si exhibe acciones equivalentes a las óseas, resultaría en la inducción de la calcificación vascular.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Empleando como sistema experimental cultivos celulares primarios expuesto a tratamientos *in vitro* con concentraciones fisiológicas de estrona, se plantearon los siguientes objetivos específicos.

1- *Para contrastar la hipótesis que la estrona es activa a nivel óseo*, en cultivos primarios de preosteoblastos murinos, estudiar la acción hormonal sobre el proceso de osteoblastogénesis evaluando:

- la proliferación y diferenciación celular
- la expresión de marcadores de diferenciación osteoblástica
- la conformación proteica y mineral de la matriz extracelular
- el mecanismo de acción involucrado
- estudiar la participación del RE en la acción hormonal de la estrona
- comparar la acción ósea de la E<sub>1</sub> con la del SERM raloxifeno

2- Para contrastar la hipótesis que a nivel vascular la estrona exhibe acciones equivalentes a las óseas resultando en la inducción de la calcificación vascular, empleando cultivos primarios de CMLV, estudiar la acción hormonal sobre:

- los eventos celulares que conducen a la calcificación
- la transdiferenciación de CMLV a linaje símil osteoblástico
- el mecanismo de acción hormonal involucrado

## ***MATERIALES Y MÉTODOS***

## **1. DISEÑO EXPERIMENTAL**

### **ANIMALES:**

#### **Para el desarrollo del objetivo 1 se emplearon:**

Ratas Wistar hembras neonatas (1 a 5 días de edad) a partir de las cuales se obtuvieron cultivos primarios de preosteoblastos (preOB) de calvaria.

#### **Para el desarrollo del objetivo 2 se emplearon:**

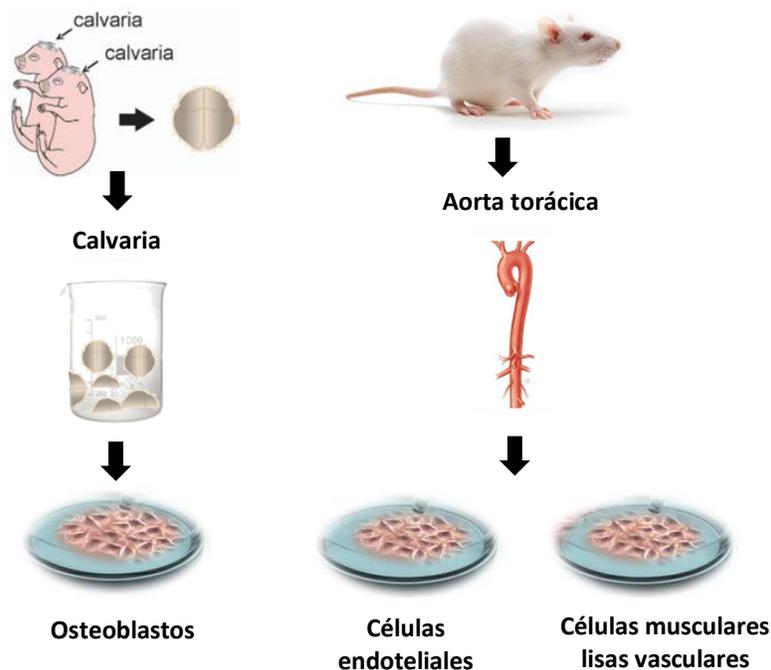
Ratas Wistar hembras jóvenes (3-6 semanas) a partir de los cuales se obtuvieron cultivos primarios de células musculares lisas vasculares a partir de aorta (CMLV).

Todos los animales utilizados fueron alimentados con una dieta estándar para roedores, con suministro de agua *ad libitum* y mantenidos en ciclo de doce horas de luz y doce horas de oscuridad. Los ensayos con ratas Wistar se realizaron en las instalaciones del Bioterio del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia (BByF) de la Universidad Nacional del Sur (UNS) y los protocolos de trabajo fueron avalados por el Comité Institucional de Cuidado y Uso de Animales de Experimentación (CICUAE-BByF-UNS).

## 2. SISTEMA EXPERIMENTAL: cultivos celulares

### 2.1 Cultivos celulares primarios murinos

Las CMLV y preOB de rata fueron aisladas como se muestra en el siguiente esquema, a partir de tejidos diferentes.

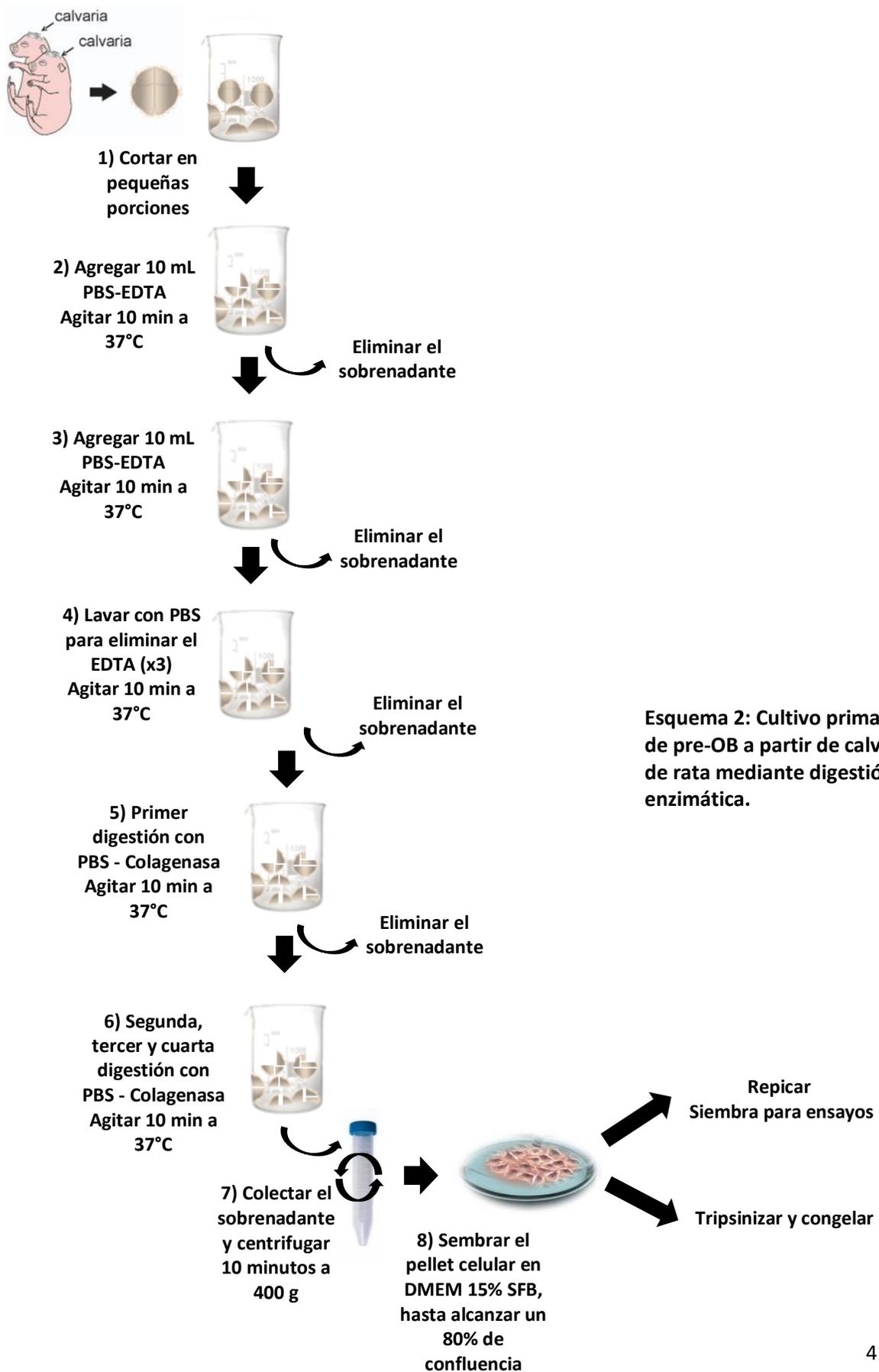


Esquema 1: Tejidos de origen de los distintos cultivos primarios.

#### 2.1.1 Cultivo primario de preOB

Los preOB se aislaron a partir de calvaria de ratas neonatas según lo descrito por Bellows y col. (Bellows y col., 1986), implementado y validado previamente en nuestro laboratorio (Cepeda y col., 2017). Se eliminó el tejido conectivo de los huesos de la calota craneana y se los incubó con PBS/EDTA 4mM a 37°C durante 10 min (dos períodos). El sobrenadante de estas incubaciones se descartó. Las calvarias se lavaron en PBS (tres veces) y se sometieron a digestión con colagenasa (200 UI/mL en PBS) durante 15 min (cinco períodos). Las células liberadas durante la primera digestión se descartaron; se colectaron las células

liberadas al sobrenadante durante las subsiguientes digestiones para una posterior centrifugación (10 minutos a 400g). El pellet celular obtenido se resuspendió en DMEM sin rojo fenol. Los preOB se cultivaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en DMEM suplementado con SFB al 15% y antimicrobianos (60 µg/mL de penicilina, 10 µg/mL de estreptomina). Después de 24 horas de cultivo, el medio se reemplazó por DMEM fresco conteniendo SFB al 10% hasta alcanzar el 80% de confluencia (Esquema 2). Los preOB se tripsinizaron y se congelaron en DMEM con DMSO-SFB 10%. Para los ensayos de diferenciación las células se repicaron y el medio de cultivo se suplementó con ácido ascórbico 0.05 g/L y β-glicerolfosfato 10 mM (DMEM-OB) con SFB al 1%.



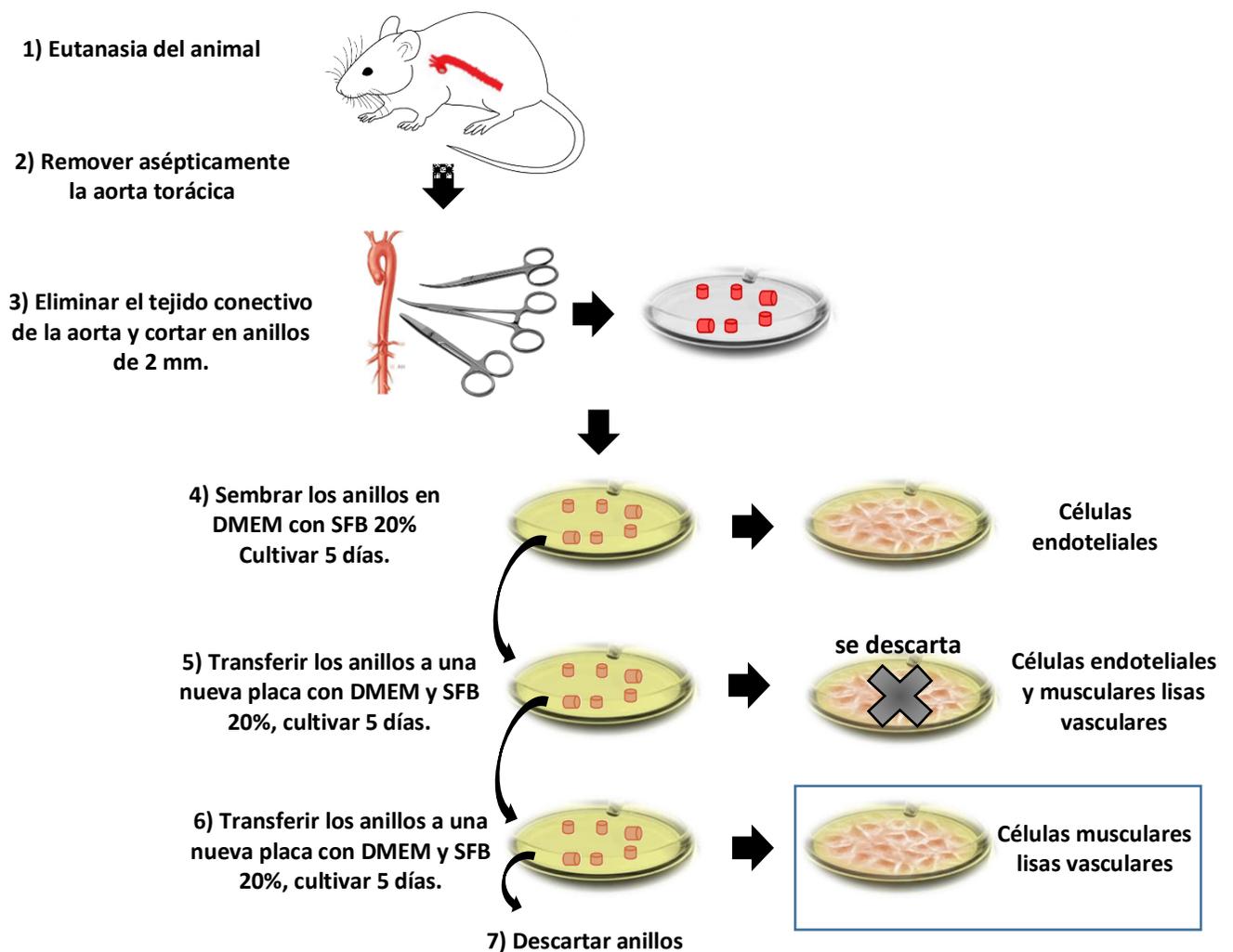
Esquema 2: Cultivo primario de pre-OB a partir de calvaria de rata mediante digestión enzimática.

**2.1.2 Cultivo primario de células musculares lisas vasculares**

Mediante la técnica de explante se obtuvieron los cultivos primarios de CE y CMLV a partir de anillos de aorta (AA) aislados de ratas Wistar jóvenes, de acuerdo a lo descrito en trabajos previos de nuestro grupo de investigación (**Rauschemberger y col., 2008 y 2011**). Para este procedimiento, el quirófano del Bioterio (BByF-UNS) se sometió a desinfección por irradiación UV durante 12 horas. Los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se disectó asépticamente la aorta torácica, para posteriormente sumergirla en PBS estéril frío para traslado al laboratorio de cultivo celular. A partir de este momento, el procesamiento se continuó en el gabinete de seguridad biológica (Telstar Bio-II-A) ubicado en el Laboratorio de Cultivo Celular (BByF-UNS). Se eliminó el tejido conectivo y adiposo adherente, y se cortó en pequeños segmentos en forma de anillos de 2 mm de longitud. Los mismos se sembraron en placas de Petri (NUNC) conteniendo DMEM sin rojo fenol, suplementado con 20% de SFB, L-glutamina 2 mM, bicarbonato de sodio 1.7 g/L y antimicrobianos (penicilina 60 µg/mL, estreptomycin 10 µg/mL y anfotericina-B 2.5 µg/mL). Los anillos se incubaron a 37°C en atmósfera de 5% de CO<sub>2</sub> en un incubador metabólico (Revco Habitat, Asheville, USA) con control automático de temperatura y CO<sub>2</sub>. Durante los primeros cinco días de cultivo se liberaron las CE, siendo éste un cultivo de alta pureza. Finalizado este periodo los anillos se transfirieron a una segunda placa con DMEM fresco suplementado con 10 % de SFB y antimicrobianos para ser incubados por otros cinco días, obteniéndose en esta etapa un cultivo mixto de CE y CMLV. Los anillos se transfirieron nuevamente a una tercera placa en la que se los incubó durante otros cinco días, obteniendo de este modo un cultivo puro de CMLV. A los 15 días de iniciado el procedimiento finalmente los anillos se descartaron (Esquema 3).

A los cultivos de interés, (CMLV), se les reemplazó el medio cada 72 horas, hasta alcanzar confluencia del 90% (aproximadamente una semana después). Los cultivos se repicaron previa tripsinización controlada de 2 minutos a 37 °C (solución tripsina-EDTA 0.05 mg/L-0.02 g/L) con posterior resiembra en una nueva placa con DMEM fresco, suplementado con 10 % de SFB y antimicrobianos. Se usaron cultivos de CE y de CMLV de pasajes 2 a 4 para todos los experimentos.

La pureza de los cultivos de ambos tipos celulares se estableció, tal como fue descrito en trabajos previos de nuestro laboratorio. Las CE adoptan una morfología característica de “empedrado” con grandes núcleos y formas redondeadas en cultivos confluentes, poseen la capacidad de sintetizar NO, y de expresar el factor von Willebrand (FvW), el receptor del factor de crecimiento vascular 2 (VEGFR2) y el marcador CD34 (Cutini y col., 2014); mientras que las CMLV poseen una forma cilíndrica y alargada con extremos ahusados, no expresan FvW, pero sí se evidencia la expresión de alfa actina.



**Esquema 3. Cultivos primarios de CMLV a partir de aorta de rata mediante la técnica de explante.**

### **2.1.3 Transdiferenciación de cultivos de CMLV a linaje óseo**

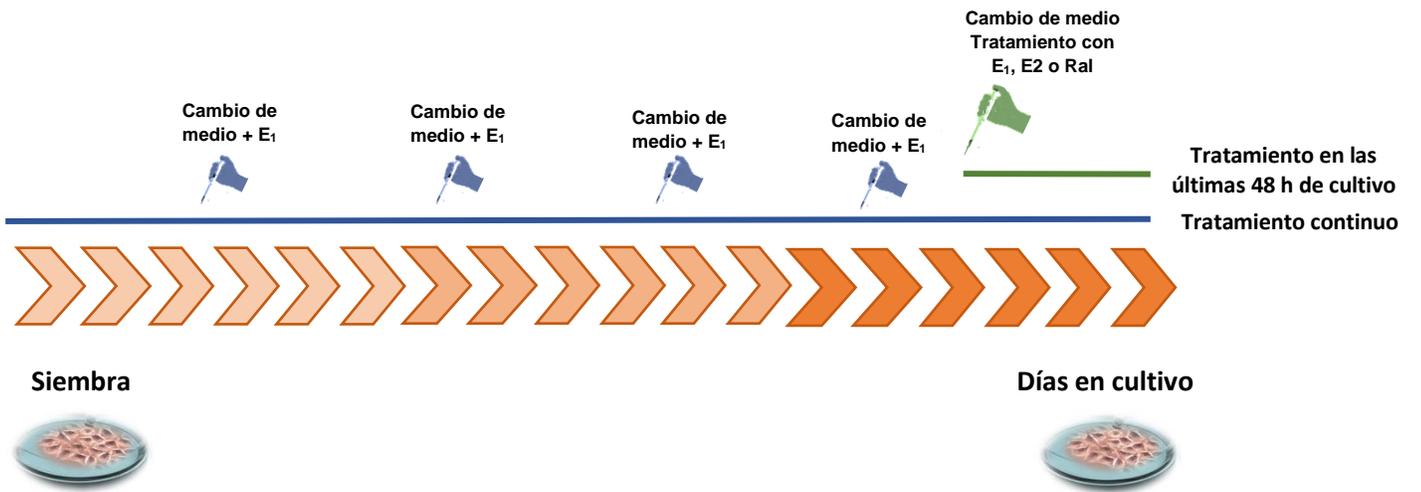
La inducción a transdiferenciación osteogénica de las CMLV se realizó de acuerdo a lo descrito por Kanno y col. (**Kanno y col., 2008**). Las células se sembraron en placas de 24 y 48 pocillos, y se cultivaron durante 21 días en DMEM suplementado con  $\beta$ -glicerofosfato 10 mM (medio osteogénico: DMEM- $\beta$ GP), SFB 4% y de antibiótico y antimicótico 1%. El medio osteogénico se reemplazó por medio fresco cada 4 días.

### **2.2 Tratamientos *in vitro* de cultivos celulares**

Las monocapas de células (OB, CMLV, CMLV-OB) se incubaron en los respectivos medios de cultivo hasta alcanzar el porcentaje de confluencia acorde a cada ensayo (50% - 90%). Para los tratamientos, el medio de cultivo se reemplazó por medio fresco que contiene SFB al 1%. El tratamiento se inició por el agregado de estrona, estradiol o raloxifeno (isopropanol < 0.01%) en concentraciones e intervalos de tiempo correspondientes a cada ensayo. En todos los experimentos se procesó siempre un grupo control, que recibió solamente el vehículo. En los casos en que se requirió sincronizar las células, las mismas se privaron de suero durante 24 horas, reemplazando luego con DMEM fresco suplementado con SFB al 1%, medio en el cual se realizaron los tratamientos correspondientes con la hormona o el SERM. En los ensayos en los cuales se emplearon inhibidores y/o antagonistas, estos se agregaron al medio de cultivo 1 hora antes de comenzar el tratamiento. Se realizaron dos tipos de tratamientos:

- tratamiento de 48 horas, realizado 48 horas antes del procesamiento del experimento;
- tratamiento continuo durante 21 días de incubación (CMLV y CMLV-OB), donde la hormona se agrega a las concentraciones requeridas en cada cambio de medio (cada cuatro días).

Las soluciones de hormona o fármaco empleadas en todos los ensayos se prepararon en el día de la realización del experimento.



### 3. METODOLOGÍA y ENSAYOS EMPLEADOS

#### 3.1 Medición de la producción de óxido nítrico en cultivos celulares

La determinación de la producción de NO se realizó en forma indirecta, empleando el método de Griess. Se midió la generación de nitritos ( $\text{NO}_2^-$ ), uno de los dos productos primarios estables y no volátiles del NO. El fundamento de la reacción química se basa en que los nitritos reaccionan en forma secuencial con el reactivo de Griess (ácido sulfanílico y dimetil- $\alpha$ -naftilamina 0.1%) para formar un diazo compuesto coloreado cuya intensidad de color se determina a 520 nm (**Griess 1879**).

Las células se sembraron en placas de 12 pocillos con una densidad de  $8 \times 10^4$  células/pocillo en 1 mL de medio de cultivo (DMEM) suplementado con 10% de SFB. Se permitió el crecimiento celular hasta alcanzar una confluencia del 90%. Luego del tratamiento con la hormona o SERM durante el periodo de tiempo correspondiente, se tomaron alícuotas del sobrenadante por duplicado (400  $\mu\text{L}$ ), las cuales se hicieron reaccionar secuencialmente con los reactivos A y B de Griess (Laboratorios Britania, Argentina). Se adicionan en forma sucesiva de 40  $\mu\text{L}$  del reactivo "Griess A" (solución acética de ácido sulfanílico al 1%) y 40  $\mu\text{L}$  del reactivo "Griess B" (solución acética de dimetil- $\alpha$ -naftilamina 0.1%). Se incubaron durante 5 minutos a temperatura ambiente, y se midió la absorbancia a 520 nm en un lector de placa Synergy-HT (Biotek) dentro de los 30 minutos siguientes (tiempo de estabilidad de la reacción). La concentración de nitritos en las muestras se determinó empleando una curva estándar realizada en la misma matriz de las muestras (DMEM). Posteriormente las células se disolvieron en NaOH 1 N para determinar el contenido de proteínas por el método de Lowry. Los resultados se expresaron como nmoles NO/mg de proteína (**Lowry y col., 1951**).

#### 3.2 Tinción con Giemsa

Se descartó el medio de cultivo de las células y estas se fijaron con formol al 10% durante 5 minutos. Luego de descartar el aldehído se dejó secar completamente a temperatura ambiente. Se agregó la solución de Giemsa (diluida 1:20 con agua destilada desionizada)

durante 20 minutos con agitación suave. Se eliminó el colorante, se lavó exhaustivamente con agua (pH 6,4) para eliminar el exceso de colorante, y se secó a temperatura ambiente.

### **3.3 Proliferación celular**

#### **3.3.1 Conteo celular en cámara de Neubauer**

Para contar el número de células en cultivo post-tratamiento, las monocapas celulares se lavaron con PBS 1X, se tripsinizaron y se resuspendieron en DMEM con 10% SFB para evitar la proteólisis. Se realizó el recuento de células en cámara de Neubauer, utilizando los cuatro cuadrantes de los extremos. Finalmente se determinó la cantidad de células presentes en la suspensión llevando a cabo el siguiente cálculo:

$\text{N}^\circ \text{ de células viables/mL} = \text{promedio de células contadas por cuadrante} \times 10^4 \times \text{factor de dilución}$ .

#### **3.3.2 Conteo microscópico de células por campo**

Después de la tinción de Giemsa, el número de células de cada monocapa se cuantifica en al menos siete campos microscópicos diferentes (400 ×) representativos de cada pocillo. Los resultados se presentaron como media ± SD de células / campo de tres experimentos independientes donde cada condición individual se realizó por cuadruplicado.

#### **3.3.3 Ensayo MTT**

Otra alternativa para medir **(Cutini y col. 2016)** proliferación celular es mediante el ensayo de conversión de MTT. El mismo se basa en la reducción metabólica del Bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol (MTT) a un compuesto de color azul (formazan) por acción de la enzima mitocondrial succinato deshidrogenasa, permitiendo así determinar la funcionalidad mitocondrial de las células tratadas. La sal coloreada formada es insoluble en agua, por ello para cuantificar dicho compuesto se lo suele disolver en un compuesto orgánico, como el DMSO.

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos con DMEM suplementado con SFB al 10% (v/v) y se dejaron crecer hasta confluencia del 50-60%. Luego los cultivos se sincronizaron con DMEM en ausencia de suero durante 24 horas. A continuación, se expusieron a la

hormona/SERM o vehículo (control) en DMEM fresco con SFB al 1% por el tiempo requerido para cada ensayo. Finalizado el tratamiento, se retiró el medio y se añadió solución de MTT (5 mg/mL) a cada pocillo y se incubó en oscuridad durante 4 horas a 37°C. Inmediatamente después, el sobrenadante se retiró cuidadosamente, los cristales de formazan intracelulares resultantes se disolvieron en DMSO, y se midió el valor de absorbancia a 550 nm en un lector de placas (Biotek Synergy-HT). Un aumento en el número de células vivas da como resultado un aumento en la actividad metabólica total de la muestra. Este aumento se correlaciona directamente con la cantidad de cristales púrpura de formazan formados y con la absorbancia determinada.

### **3.4 Migración celular**

La movilización celular se evaluó utilizando dos procedimientos diferentes:

- a) Eliminación de una hemicapa de células en cada pocillo
- b) Realizando un corte transversal a lo largo de la monocapa de células en cada pocillo

Las células se sembraron en placas de 12 pocillos. Después de alcanzar 90% de confluencia, las células se privaron de suero durante 24 horas. En a) las células se levantaron con la ayuda de un scraper; en b) se realizó el corte con la punta de un tip. Se procedió a lavar con PBS (dos veces) para eliminar las células removidas. Se agregó medio DMEM fresco suplementado con 1% de SFB. Se realizó el tratamiento correspondiente y se incubó a 37°C hasta finalizar el ensayo. Las células se fijaron con metanol durante 7 minutos y tiñeron con colorante Giemsa durante 20 min. La migración celular se cuantificó por recuento del número de células que se movilaron al área desnuda. Se contaron al menos siete campos microscópicos de cada condición experimental y se calculó el promedio del número de células por campo. Las fotografías fueron registradas utilizando una cámara digital (Nikon D3100) acoplada a un microscopio óptico Nikon TS100F. Los resultados se expresaron como número de células migrantes por campo.

### **3.5 RT-PCR**

Las células se cultivaron según cada diseño experimental y se les permitió crecer hasta un 90% de confluencia. Las monocapas se privaron de suero durante 24 horas y luego se trataron con estrona. La extracción de ARN total y la obtención del cDNA se realizó empleando el kit comercial Superscript III Cells Direct de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Invitrogen™). El ADN complementario de cada marcador/receptor de interés se amplificó mediante PCR utilizando un termociclador (Biometra Uno II, Biometra, Göttingen, Alemania). Los ciclos y secuencias de cebadores para la realización de PCR fueron los siguientes:

Er $\alpha$ : 94°C, 3 min, 94°C, 60 s, 62°C, 60 s, 72°C, 60 s, 72°C, 7 min, 32 ciclos; directa: 5'-AAT TCT GAC AAT CGA CGC CAG 3', inversa: 5'-GTG CTT CAA CAT TCT CCC TCC TC-3'.

BMP2: 95°C, 3 min, 95°C, 60 s, 60°C, 60 s, 72°C, 60 s, 72°C, 7 min, 32 ciclos; directa: 5'-CAG AGC TCC AGA TTT TTC GG-3', inversa: 5'-CTG GAC TTA AGA CGC TTC CG-3'.

Runx2: 95°C, 3 min, 95°C, 60 s, 60°C, 60 s, 72°C, 60 s, 72°C, 7 min, 32 ciclos; directa: 5'-GTT ATG AAA AAC CAA GTA GCC AGG T-3', inversa: 5'-GTA ATC TGA CTC TGT CCT TGT GGA T-3'.

La expresión del gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se utilizó como control de expresión y fue corroborado para cada conjunto de experimentos de RT-PCR (cebador directo: 5'-TCC CTC AAG ATT GTC AGC AA-3', cebador inverso: 5'-AGA TCC ACA ACG GAT ACA TT-3'; pasos de amplificación: 95°C, 3 min, 94°C, 30 s, 53°C, 30 s, 72°C, 45 s, 72°C, 7 min, 35 ciclos). También se procesaron controles negativos (reacción de PCR sin muestra). Los productos de amplificación se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. La densidad de cada banda en el gel de RT-PCR se cuantificó utilizando el software ImageJ (versión 1.43 c, NIH, Rasband). El ARNm de cada muestra se normalizó frente al ARNm de GAPDH.

### **3.6 Actividad de la enzima fosfatasa alcalina**

La actividad de la enzima fosfatasa alcalina (FAL) se midió usando un kit comercial (Wiener lab. Argentina) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (**Kanno y col., 2008**). Se empleó como sustrato el p-nitrofenilfosfato (p-NFF) incoloro, el cual es hidrolizado por la

enzima FAL, produciendo fosfato y p-nitrofenol a pH 9.8. La velocidad de aparición del p-nitrofenol (amarillo), es proporcional a la actividad enzimática de la muestra.

Las determinaciones se realizaron intracelularmente (a) o en el medio extracelular (b). Las monocapas se cultivaron y trataron según cada condición experimental. Se extrajo el medio de cultivo y se reservó (b), o se lavaron las células con PBS 1X y permeabilizaron usando 100  $\mu$ L Tris-Tritón 0.1% en PBS (10 min) a 37°C (a). A todas las muestras se les agregó 50  $\mu$ L de sustrato seguido de una incubación de 10 min a 37°C, para posteriormente agregar el reactivo de color y cuantificar el producto a 520 nm. El contenido de proteínas se cuantificó por el método Lowry. Los resultados se expresaron en UI x 10<sup>-3</sup> /mg de proteína.

### **3.7 Estudio de la matriz extracelular:**

#### **3.7.1 Depósito de colágeno: tinción con rojo sirio**

La presencia de colágeno en la matriz extracelular se analizó mediante tinción con rojo sirio. El colorante empleado se disolvió en ácido pícrico acuoso saturado a una concentración de 100 mg/100 mL. La solución de Bouin (fijador) se preparó mezclando 15 partes de ácido pícrico acuoso saturado con 5 partes de formaldehído al 35% y 1 parte de ácido acético glacial. Las células se lavaron exhaustivamente con PBS durante una hora antes de fijarlas con solución de Bouin. El fijador se eliminó y las células se lavaron por inmersión en agua durante 15 minutos. Las placas de cultivo se secaron a temperatura ambiente. Se añadió 1 mL de solución del colorante Rojo Sirio durante 1 hora bajo agitación suave. El colorante se eliminó y se lavó exhaustivamente con agua para eliminar el exceso de colorante. Se tomaron fotos de campos representativos de los cultivos teñidos usando una cámara digital (Nikon D3100) acoplada a un microscopio óptico (Nikon TS100F). Se adicionó NaOH (1N) para solubilizar el colorante. Los niveles de colágeno se determinaron midiendo la absorbancia a 550 nm en un lector de placas (Biotek Synergy-HT). Los resultados se expresaron como Abs/well (**Tullberg-Reinert y col., 1999**).

### 3.7.2 Mineralización

#### 3.7.2.a Depósito de calcio: cuantificación espectrofotométrica

Las matrices extracelulares se descalcificaron con HCl 0.6 mol/L durante 24 horas, y el contenido de calcio en el sobrenadante se midió por espectrofotometría usando el método de o-cresolftaleína complexona (Wiener lab, Argentina). Se midió absorbancia a 550 nm en un lector de placas (Biotek Synergy-HT). Después de la descalcificación, las células se lavaron con PBS, se solubilizaron con NaOH 1N y se midió el contenido proteico mediante el método de Lowry. Los resultados se expresaron como  $\mu\text{g}$  de calcio/mg de proteína.

#### 3.7.2.b Núcleos de calcificación: tinción con rojo de alizarina

La presencia de nódulos de calcio se analizó mediante tinción con rojo de alizarina (**Viale-Bouroncle y col., 2014**). Las células en monocapa se fijaron con formol al 10% durante 10 minutos, se tiñeron con solución de Rojo de Alizarina 2% durante 30 minutos a 37° C, y se lavaron con agua destilada la cantidad de veces necesarias para eliminar residuos del colorante. Las placas de cultivo teñidas se fotografiaron utilizando una cámara digital (Nikon D3100) acoplada a un microscopio óptico NikonTS100F. Se adicionó NaOH 1N para solubilizar el colorante. Los niveles de calcio se determinaron midiendo la absorbancia a 560-590 nm en un lector de placas (Biotek Synergy-HT). Los resultados se expresan como abs/pocillo (**Tullberg-Reinert y col., 1999**).

### **3.8 Medición de la concentración de estradiol**

Los OB fueron preincubados (1 hora) con equilin en DMEM libre de rojo fenol, luego se realizaron varios lavados con PBS y se expusieron a estrona  $10^{-8}$  M. Se recogió el medio de incubación y se midieron los niveles de estradiol utilizando un enzimoimmunoensayo competitivo quimioluminiscente (Analizadores de sistemas IMMULITE® 2000). El kit disponible comercialmente muestra una reactividad de ensayo del 100% con 17-beta estradiol, 0,69% o 0,38% de reactividad cruzada con estrona o equilin respectivamente.

#### **4. ANALÍISIS ESTADÍSTICO**

Los resultados presentados se obtuvieron a partir de tres experimentos independientes llevados a cabo con distintos lotes de animales y distintos cultivos celulares, donde cada condición experimental individual se realizó por cuadruplicado ( $n = 4$ ). Todos los datos se presentaron como media  $\pm$  desvío estándar. Las comparaciones entre dos medias se realizaron utilizando la prueba test t-Student (**Snedecor y col., 1967**). Para comparaciones múltiples se empleó ANOVA de una o dos vías, seguido de la prueba de diferencia mínima significativa de Fisher. Los valores de p inferiores a 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

# ***RESULTADOS***

## ***Capítulo 1***

## **CAPÍTULO 1: SISTEMA ÓSEO**

En este capítulo estudiamos el efecto de la estrona sobre la osteoblastogénesis empleando cultivos de OB desde los 3 hasta 21 días en cultivo.

### **1.1 Caracterización del sistema experimental**

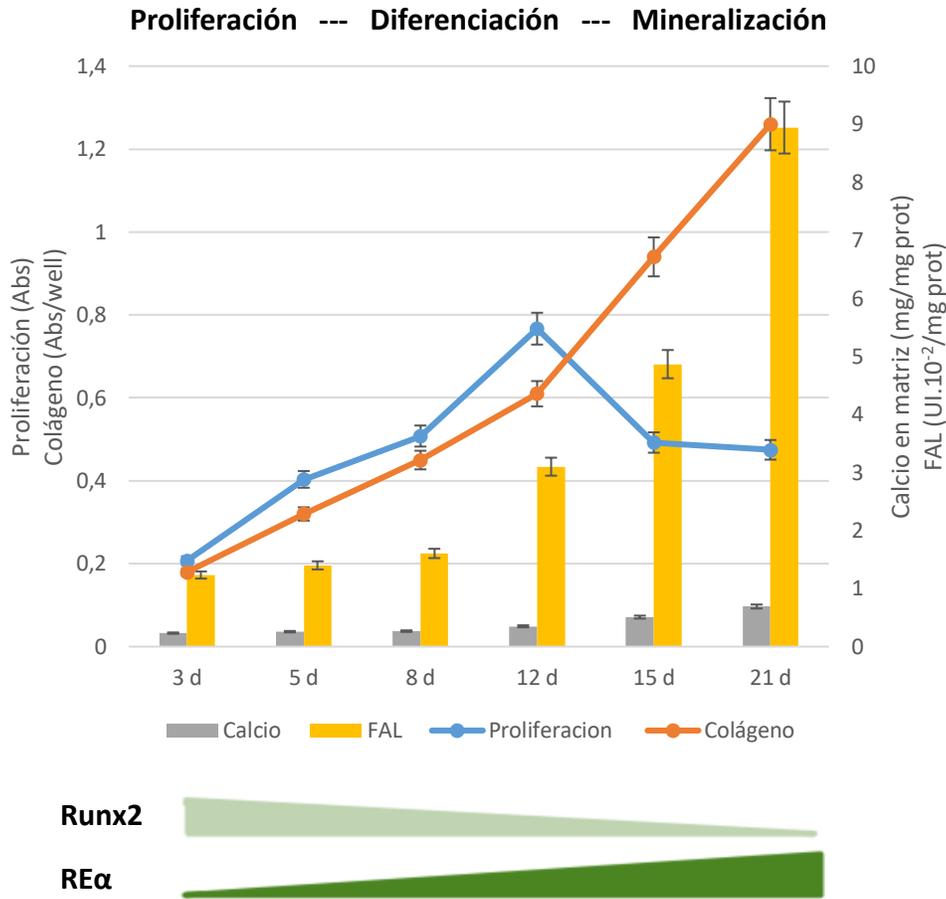
Para caracterizar el sistema experimental para los diferentes estadios de crecimiento y diferenciación OB, seleccionamos los siguientes parámetros.

Estadio proliferativo: ensayos de MTT y conteo celular, expresión de Runx2 y RE  $\alpha$ .

Estadio diferenciativo: RE  $\alpha$ , actividad FAL, depósito de colágeno y contenido de calcio de la matriz extracelular.

La caracterización del sistema experimental se muestra en la Figura 1. Podemos observar que la proliferación celular aumentó hasta el día 11-12, y luego las células ingresaron en periodo de menor crecimiento. A su vez, la actividad FAL aumentó marcadamente a partir del día 8 hasta el día 21 de cultivo. El depósito de colágeno en la matriz extracelular se incrementó desde el tercer día de cultivo, siendo este aumento de mayor magnitud a partir de los 12 días. Los niveles de calcio son significativamente mayores a partir de los 15 días hasta los 21 días de cultivo. Mediante la técnica de RT-PCR se evaluó el perfil de expresión de Runx2 y RE $\alpha$  a tres tiempos de cultivo; éstas proteínas y la variación de su síntesis en función del tiempo son característicos del linaje osteoblástico. Los niveles de mensajero de Runx2 disminuyeron conforme transcurrían los días de cultivo, lo que concuerda con el hecho de ser un marcador temprano, contrariamente a la expresión del RE $\alpha$ , aumenta con los días de cultivo.

Esta figura resume la evolución de los marcadores de osteoblastogénesis estudiados, pudiéndose delimitar una etapa inicial de alta proliferación en la vida de los OB (1 a 7 días de cultivo), con posterior predominio de diferenciación celular. Durante este segundo período, estas células expresan marcadores de diferenciación (8 a 14 días de cultivo), para luego en una última etapa producirse la mineralización de la matriz (15 a 21 días de cultivo).



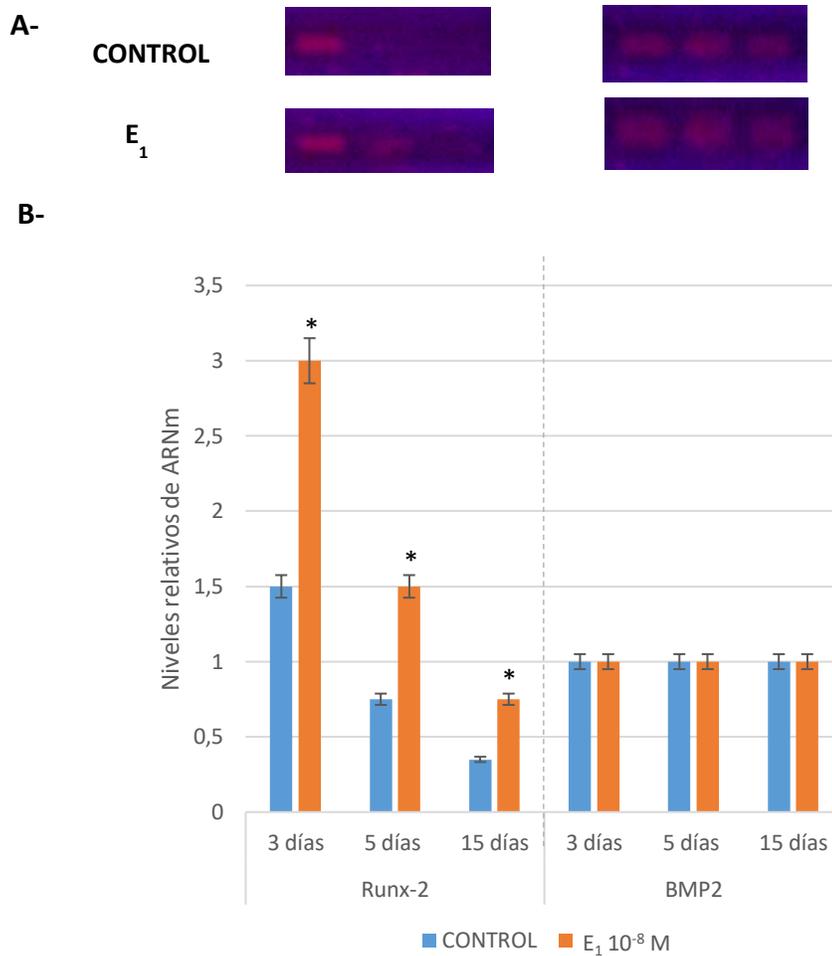
**Figura 1: Evolución temporal de marcadores de osteoblastogénesis.**

Los resultados representan el promedio ± desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4).

Los parámetros estudiados concuerdan con lo descrito en literatura para el proceso de osteoblastogénesis (**Gasser y Kneissel, 2017**). El análisis de estos parámetros nos permitió validar nuestro modelo experimental, observando que éste es aplicable al estudio del proceso de osteoblastogénesis. A continuación, procedimos a evaluar el efecto de la E<sub>1</sub> en los diferentes estadios de diferenciación osteoblástica.

**1.2 Estudio del efecto de la E<sub>1</sub> en el estadio proliferativo de OB**

Estudiamos el efecto de la E<sub>1</sub> sobre la expresión de Runx2 y BMP2 en cultivos de preOB de 3, 5 y 15 días tratados con la hormona durante las últimas 48 hs de cultivo. Al finalizar los experimentos las células se lisaron y el ARNm se aisló y amplificó empleando la técnica de RT-PCR. En la Figura 2 se observa que los niveles de ARNm para Runx2 aumentaron significativamente en los tres tiempos de cultivo luego del tratamiento con E<sub>1</sub>, mientras que la hormona no afectó la expresión de BMP2.



**Figura 2: Efecto de la  $E_1$  en el perfil temporal de expresión de ARNm de Runx2 y BMP2.**

Se presentan fotografías de un ensayo representativo (A) y el gráfico de barras de la respectiva cuantificación (B). Los resultados se expresan como la intensidad relativa de cada banda normalizada sobre los niveles del ARNm de GADPH por análisis densitométrico usando el software ImageJ. Los resultados representan el promedio  $\pm$  desvío estándar de dos experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4) \*p<0,01 vs control.

Para estudiar la acción de la  $E_1$  sobre la proliferación celular empleamos el ensayo de MTT y conteo celular. En la Tabla 1 se muestran los resultados de ensayos dosis-respuesta del efecto del estrógeno, a diferentes tiempos de cultivo. El tratamiento con  $E_1$  ( $10^{-10}$  M- $10^{-7}$  M) se realizó durante las últimas 48 horas del cultivo.

**Tabla 1: Efecto de la E<sub>1</sub> en la proliferación de OB**

Cultivos de OB semiconfluentes y sincronizados se incubaron con las dosis indicadas de E<sub>1</sub>. Se midió la proliferación a los tiempos indicados mediante el ensayo de MTT, como se describe en Metodología. Los resultados representan el porcentaje de estímulo frente al control de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4); \*\*p<0,001 y \*p<0,01 vs control.

Tratamiento	% de estímulo sobre el control			
	Días de cultivo			
	5	7	11	15
E <sub>1</sub> 10 <sup>-7</sup> M	-	-	-	-
E <sub>1</sub> 10 <sup>-8</sup> M	↑5,8 *	↑8,5 *	↑5,2 *	↑38,2 **
E <sub>1</sub> 10 <sup>-9</sup> M	-	↑3,0 *	-	↑21,3 **

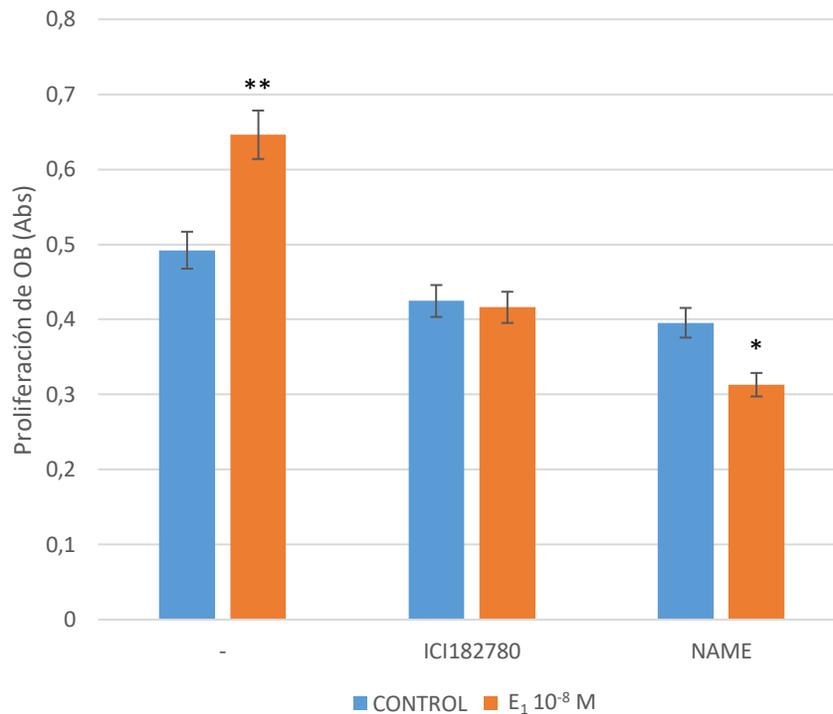
Como se puede observar, el tratamiento con el estrógeno en concentración 10<sup>-7</sup> M no modificó el crecimiento celular, mientras que el tratamiento con E<sub>1</sub> 10<sup>-8</sup> M lo incrementó significativamente respecto al control a partir de los 5 días de cultivo, con un aumento máximo a los 15 días de cultivo. El efecto estimulador de E<sub>1</sub> 10<sup>-9</sup> M sobre el número de células se detectó a los 7 y 15 días de cultivo.

El hecho de que los mayores estímulos sobre la proliferación celular se detectaran a los 15 días de cultivo, nos sugiere que la E<sub>1</sub> favorece el crecimiento de OB diferenciados.

En vista de los resultados obtenidos seleccionamos la dosis de E<sub>1</sub> 10<sup>-8</sup> M y 15 días de cultivo para estudiar el mecanismo a través del cual la hormona modula el crecimiento celular. Para ello, los tratamientos hormonales se realizaron en presencia o ausencia de inhibidores/antagonistas específicos. Se emplearon los siguientes compuestos:

- ICI182780: antagonista del RE
- NAME: inhibidor de la NOS
- PD98059 y UO126: inhibidores de la vía MAPK
- Equilin: inhibidor de la enzima 17β-HSD 1

En la Figura 3 puede observarse que la presencia del compuesto ICI182780 suprimió el efecto proliferativo inducido por E<sub>1</sub>. A su vez, el compuesto NAME también bloqueó la acción hormonal.

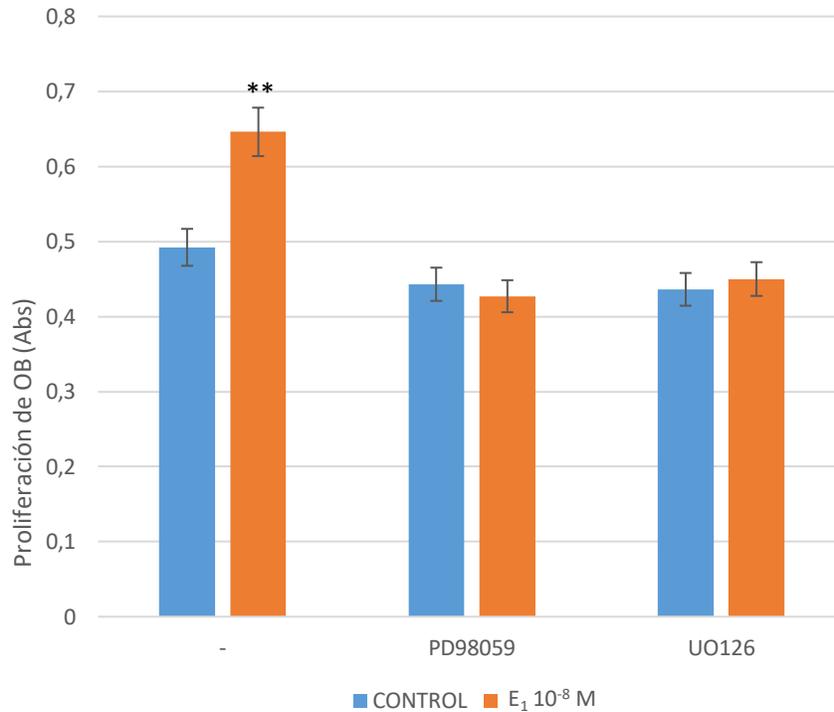


**Figura 3: Participación del RE y la NOS en la proliferación mediada por E<sub>1</sub>.**

Cultivos de OB semiconfluentes y sincronizados de 15 días fueron tratados con la hormona durante las últimas 48 horas en presencia o ausencia de ICI182780 y NAME 10µM, agregados una hora antes del tratamiento. Se utilizó el ensayo de MTT como se describe en Metodología. Los resultados representan el promedio ± desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4); \*\*p<0,001 y \*p<0,01 vs control.

Continuando con el estudio del mecanismo molecular de E<sub>1</sub>, en la Figura 4 se evidencia que antagonistas de la vía de señalización MAPK (PD98059 y UO126, inhibidores de MEK1 y MEK1/2 respectivamente), antagonizaron el aumento en el número de células inducido por la E<sub>1</sub>, sugiriendo la participación de esta vía mensajera en el efecto del estrógeno. Estos

resultados obtenidos por MTT fueron posteriormente confirmados por conteo celular (Tabla 2).



**Figura 4: Participación de la vía de señalización MAPK en la proliferación estimulada por E<sub>1</sub>.**

Cultivos de OB de 15 días sincronizados semiconfluentes fueron tratados con la hormona durante las últimas 48 horas de cultivo en presencia o ausencia de PD98059 y UO126 10µM, agregados una hora antes del tratamiento. Se realizó el ensayo de MTT como se describe en Metodología. Los resultados representan el promedio ± desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4); \*\* p<0,001 vs control.

**Tabla 2: Efecto mitogénico de E<sub>1</sub>: ensayo de conteo celular.**

OB sincronizados semiconfluentes, cultivados durante 15 días fueron tratados con la hormona durante las últimas 48 horas de cultivo en presencia o ausencia del antagonista ICI182780, y los inhibidores NAME y PD98059 10µM., agregados una hora antes del tratamiento Se contaron células por campo como se describe en la Metodología. Los resultados representan el promedio ± desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4); \*\*p<0.02 vs control.

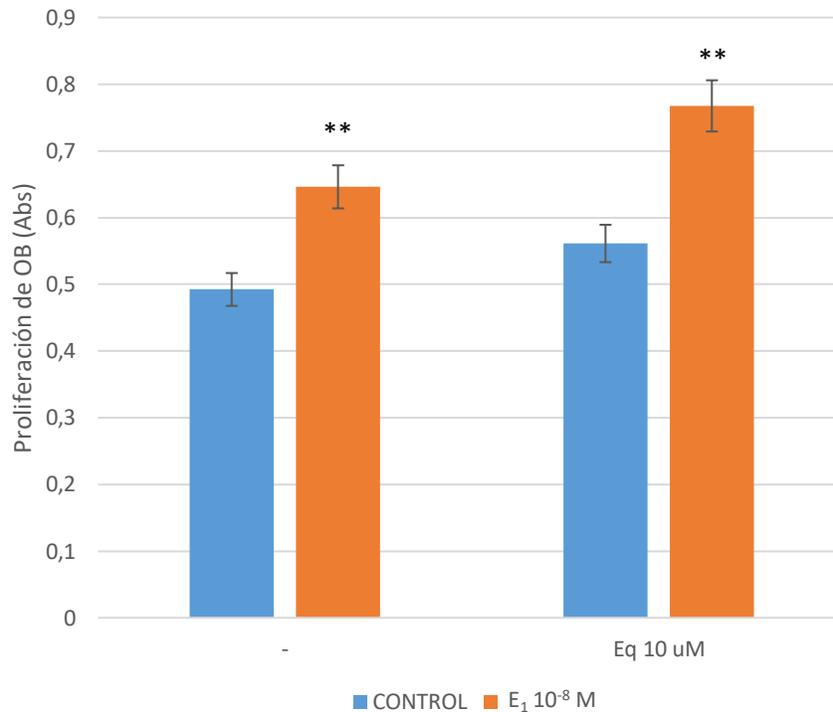
Tratamiento	Número de células/campo
CONTROL	86 ± 11
E <sub>1</sub> 10 <sup>-8</sup> M	121 ± 9 **
CONTROL + ICI182780 10µM	59 ± 8
E <sub>1</sub> 10 <sup>-8</sup> M + ICI182780 10µM	56 ± 8
CONTROL + NAME 10µM	57 ± 6
E <sub>1</sub> 10 <sup>-8</sup> M + NAME 10µM	40 ± 5
CONTROL + PD98059 10µM	56 ± 9
E <sub>1</sub> 10 <sup>-8</sup> M + PD98059 10µM	44 ± 9

Posteriormente, decidimos evaluar la acción estimuladora de la hormona sobre la proliferación, con el objetivo de analizar si el efecto se debe a E<sub>1</sub> o a su conversión a E<sub>2</sub>. Para ello seleccionamos el compuesto equilin, inhibidor de la 17β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (17β-HSD) tipo I, enzima responsable de la conversión de E<sub>1</sub> en E<sub>2</sub>.



Cabe destacar que, previamente en nuestro laboratorio, se demostró la especificidad del equilin (Eq) como inhibidor de la 17β-HSD 1 (Rauschemberger y col., 2008).

Siendo que la enzima se expresa en OB, evaluamos si el estímulo sobre la proliferación inducido por estrona era dependiente de la conversión a estradiol. En la Figura 5 mostramos que en presencia de Eq, la acción estimulante de la hormona sobre el crecimiento celular se sostiene (31% vs 37%, E<sub>1</sub>-Eq vs E<sub>1</sub>+Eq). Estos datos demuestran que el efecto proliferativo se debe a la acción de la hormona *per se*, y no a su conversión a E<sub>2</sub>.



**Figura 5: Efecto proliferativo de E<sub>1</sub> en presencia de Eq.**

Cultivos de OB de 15 días fueron tratados con la hormona durante las últimas 48 horas de cultivo en presencia o ausencia de Eq 10µM, agregado una hora antes del tratamiento. Se estudió el efecto sobre la proliferación mediante el ensayo de MTT. Los resultados representan el promedio ± desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4); \*\*p<0,001 vs control.

Para corroborar la capacidad del Eq para inhibir la síntesis de E<sub>2</sub> a partir de la E<sub>1</sub> empleada en los tratamientos de las monocapas celulares, se midieron los niveles de E<sub>2</sub> en el medio de cultivo. Los resultados de la Tabla 3 muestran que, en ausencia del Eq, los niveles de E<sub>2</sub> aumentan significativamente luego del tratamiento con E<sub>1</sub>. En presencia de Eq, no hay

cambios respecto al control, lo q demuestra que el compuesto suprimió la síntesis de E<sub>2</sub> a partir de E<sub>1</sub>.

**Tabla 3: Dosaje de niveles de E<sub>2</sub> en medio de cultivo de OB.**

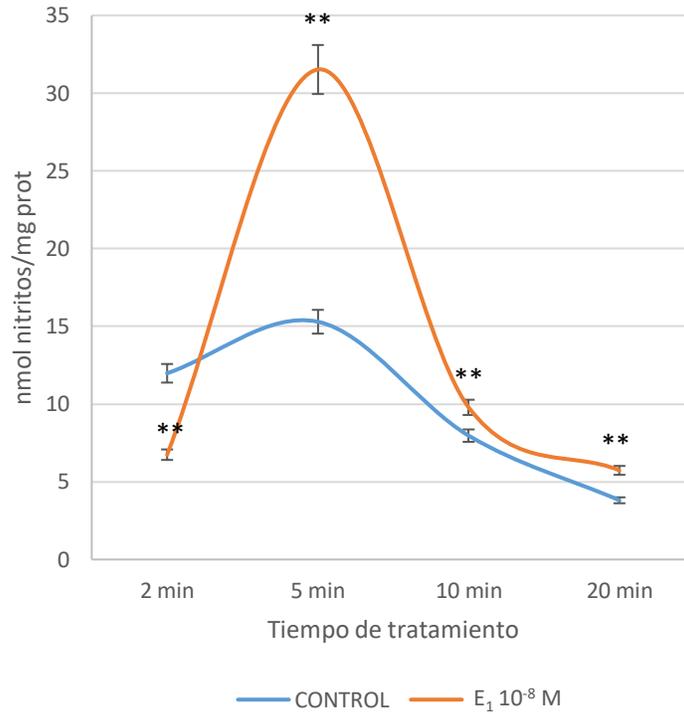
OB cultivados durante 15 días fueron pretratados con equilin 10 µM durante una hora, y luego tratados con la hormona durante las últimas 48 horas de cultivo. Se dosaron los niveles de E<sub>2</sub> en el medio de cultivo en cada una de las condiciones. Los resultados se expresan en pg de E<sub>2</sub> /mL, y representan el promedio ± desvío estándar de dos experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4); \*p<0,05 respecto a cada control.

Tratamiento	Niveles de E <sub>2</sub> (pg/mL)	
	-	Eq 10 µM
CONTROL	23,5 ± 1.8	21,2 ± 1.5
E <sub>1</sub>	34,07 ± 3.6 *	23,9 ± 2.1 n.s

Con los datos presentados hasta aquí podemos sugerir que la E<sub>1</sub> *per se* estimula la proliferación de los OB, a través de un mecanismo que comprende la participación del RE y de las vías de señalización NOS y MAPK. La acción de la hormona es independiente de la conversión de E<sub>1</sub> a E<sub>2</sub>.

### **1.2.1 Efecto de la E<sub>1</sub> sobre la producción de NO**

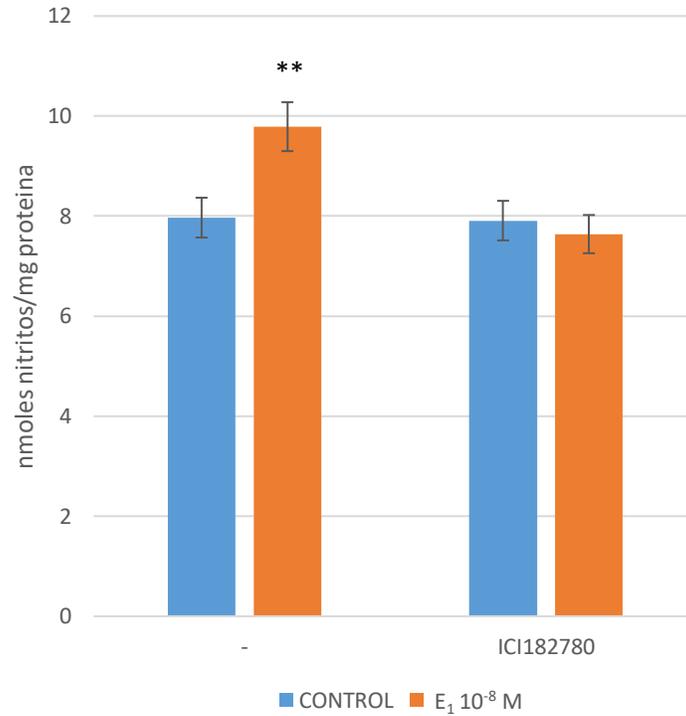
En vista de los resultados obtenidos en la Figura 3 con el inhibidor de la vía mensajera NOS (NAME), estudiamos si la hormona regula la producción de NO en cultivos de OB. La producción de este mensajero es una medida de la activación de la enzima NOS, evento que se produce en intervalos de tiempo muy cortos. Es por ello que luego de 48 horas de tratamiento con E<sub>1</sub>, se realizó un nuevo pulso hormonal a los tiempos indicados (Figura 6) para activar la enzima presente en las células y posteriormente cuantificar el NO producido. Observamos que E<sub>1</sub> estimuló la producción de NO a los 5, 10 y 20 minutos en un 106%, 23% y 50% respectivamente (Figura 6).



**Figura 6: Efecto de la E<sub>1</sub> sobre la producción de NO en OB de 9 días de cultivo: ensayo tiempo-respuesta.**

OB cultivados durante 9 días en DMEM-OB suplementado con 1% de SFB, fueron tratados durante las últimas 48 horas de cultivo con E<sub>1</sub> 10<sup>-8</sup>M, más un pulso de 2, 5, 10 y 20 minutos con la misma concentración de la hormona. La producción de NO se midió mediante la técnica de Griess. Los resultados corresponden al promedio ± desvío estándar de cuatro experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4); \*\*p<0,01 respecto al valor de cada control.

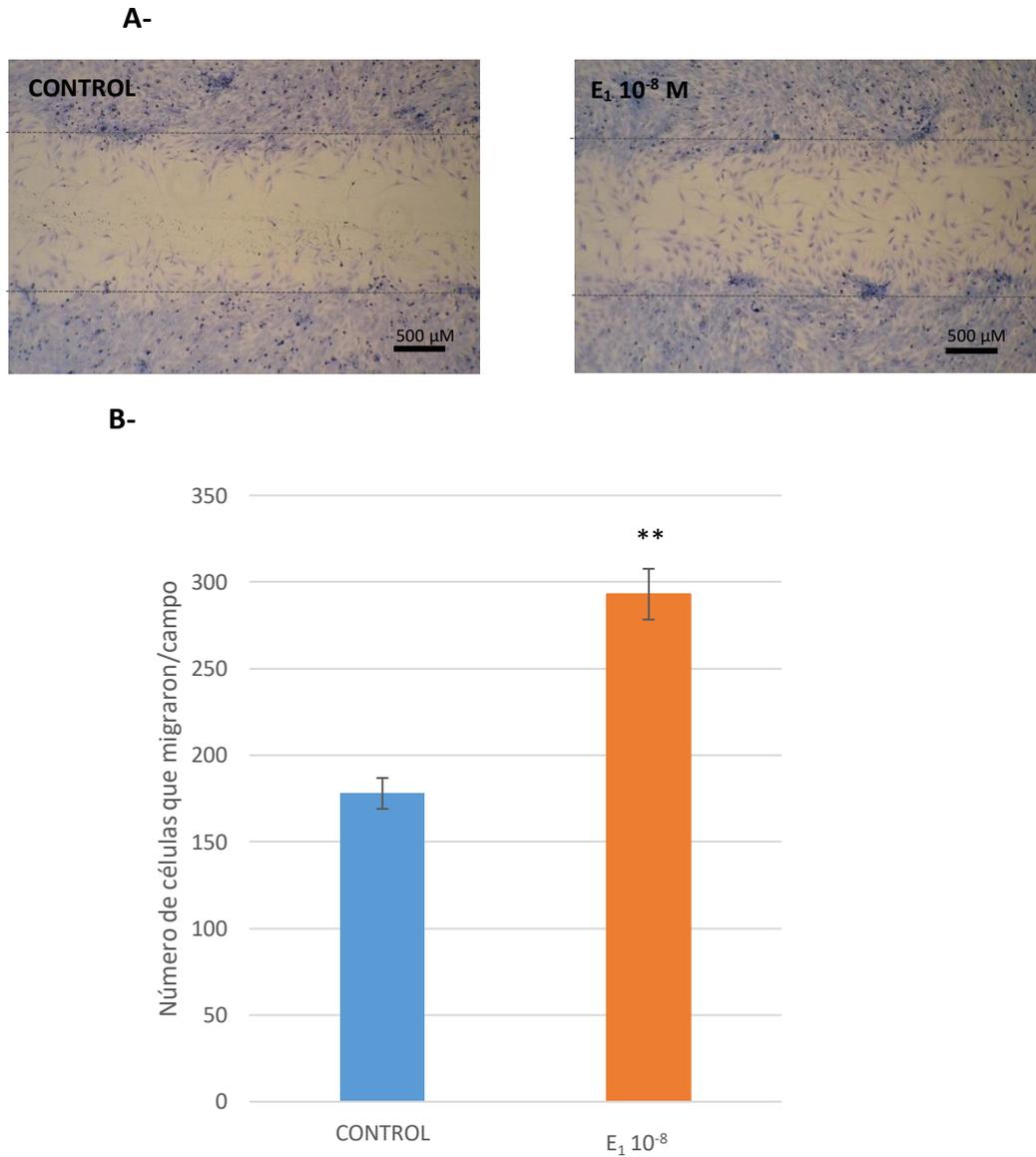
Evaluamos la participación del RE en el aumento sobre la producción de NO inducido por E<sub>1</sub>. Para ello, monocapas de OB de 9 días de cultivo fueron tratadas con la hormona durante 10 minutos, en presencia y ausencia del antagonista ICI182780. En la Figura 7 observamos que el estímulo en la producción de NO ejercido por la hormona fue suprimido en presencia del antagonista del RE. Los resultados presentados en esta figura nos sugieren que la E<sub>1</sub> modula la actividad de la NOS, a través de una vía que es dependiente del RE.



**Figura 7: Efecto del antagonista ICI182780 en la producción de NO estimulada por E<sub>1</sub>.**

Los OB cultivados durante 9 días en DMEM-OB suplementado con 1% de SFB, fueron tratados durante las últimas 48 horas de cultivo con E<sub>1</sub> 10<sup>-8</sup>M, más un pulso de 10 minutos con la misma concentración de la hormona, en presencia o ausencia de ICI182780 10 μM, agregado una hora antes del tratamiento. La producción de NO se midió mediante la técnica de Griess. Los resultados corresponden al promedio ± desvío estándar de cuatro experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4); \*\*p<0,01 respecto al valor de cada control.

Seguidamente estudiamos la acción de la E<sub>1</sub> sobre la migración de los OB, utilizando el ensayo de reparación de la herida. La Figura 8A muestra que 72 horas luego del tratamiento con E<sub>1</sub>, las células se movilaron hacia el área denudada cerrando casi completamente la herida. El gráfico de barras de la Figura 8B muestra la cuantificación del ensayo. Observamos que la hormona estimuló significativamente la movilidad celular en un 65% sobre el control.



**Figura 8: Efecto de la  $E_1$  sobre la migración de OB.**

Los OB fueron cultivados por 7 días en DMEM-OB suplementado con 1% de SFB. Se realizó un corte transversal y se removió un sector de la monocapa como se describe en Metodología. Las células se trataron con  $E_1 10^{-8}$  M durante las últimas 72 horas de cultivo. A- Fotos de campos representativos de cultivos teñidos con Giemsa; las líneas punteadas delimitan el sector desnudo de células (la escala representa 500  $\mu$ m, 40X). B- Cuantificación de la migración: los resultados representan el promedio  $\pm$  desvío estándar del número de células migrantes por campo de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4). \*\*p<0,01 respecto al control.

**Resumen**

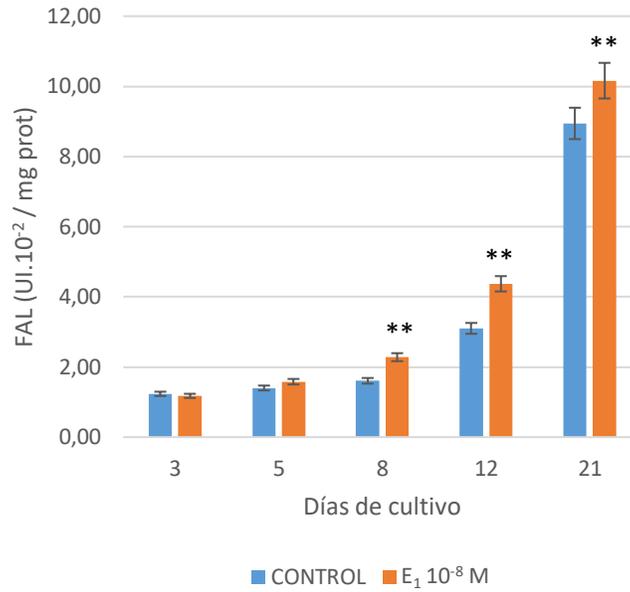
***Los datos obtenidos nos muestran que en células osteoblásticas la E<sub>1</sub> estimula el crecimiento, migración y producción de NO, en forma específica y no por conversión a E<sub>2</sub>. El mecanismo de acción de la hormona involucra la participación del RE y de las vías de señalización MAPK y NOS.***

### **1.3 Evaluación efecto de la E<sub>1</sub> en el estadio diferenciativo de OB**

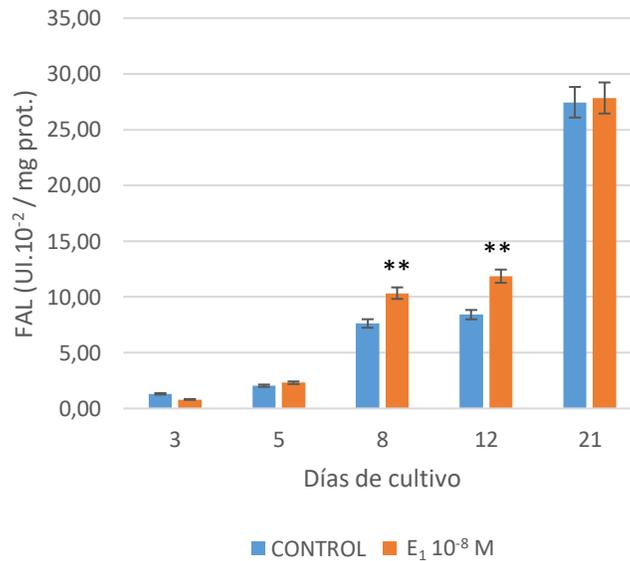
Inicialmente, evaluamos la acción de la hormona sobre la actividad FAL. Dado que FAL es una enzima intracelular que se libera al medio intersticial, procedimos a determinar su actividad tanto en lisados celulares como en el medio de incubación celular. Inicialmente, evaluamos el efecto de la E<sub>1</sub> 10<sup>-8</sup> M sobre la actividad enzimática en OB de distintos estadios de crecimiento celular: 5, 8, 12 y 21 días de cultivo.

En la Figura 9A se muestran los resultados de la medición de FAL en los lisados celulares. Podemos ver que a tiempos cortos de cultivo no se observaron diferencias significativas en la actividad FAL entre control y tratado. A partir del día 8 evidenciamos que la actividad es estimulada por la E<sub>1</sub>, siendo máxima a los 12 días, con un incremento del 40 % sobre el control. La Figura 9B muestra la actividad enzimática en el medio de cultivo. Al igual que se observa en la Figura 9A, la hormona no modificó la actividad FAL a los 3 y 5 días de cultivo. En el medio de cultivo de OB de 8 y 12 días, la E<sub>1</sub> estimuló la actividad de la enzima en un 35% y 41% respectivamente, sin mostrar diferencias significativas en los cultivos de 21 días.

A-



B-

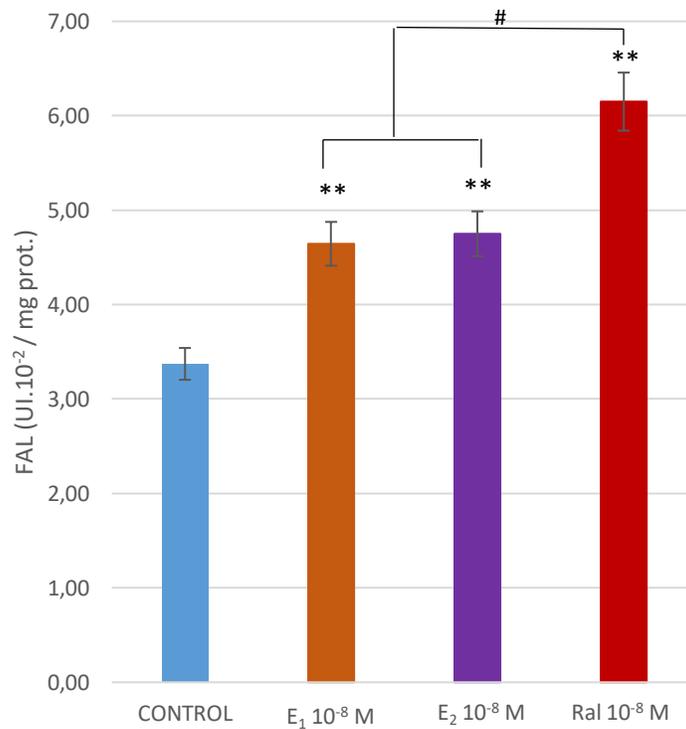


**Figura 9: Efecto de la E<sub>1</sub> en la actividad FAL osteoblástica.**

OB de 3, 5, 8, 12 y 21 días, fueron cultivados en DMEM-OB y se trataron con E<sub>1</sub> 10<sup>-8</sup> M durante las últimas 48 horas de cultivo. Los resultados corresponden a la actividad FAL detectada en lisados celulares (A) y en medio de cultivo (B) ± desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4); \*\*p< 0,001 respecto a cada control.

Posteriormente realizamos un estudio comparativo de la acción de la E<sub>1</sub> sobre la actividad FAL, con la de otros agonistas del RE como el E<sub>2</sub> y el SERM Raloxifeno (Ral). A partir de los datos de la Figura 9, seleccionamos cultivos de OB de 12 días ya que es el tiempo donde se observaron los mayores efectos de la E<sub>1</sub>.

La Figura 10 muestra que ambos estrógenos nativos, E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub>, estimularon la actividad FAL en magnitudes equivalentes (38% y 41% respectivamente). Paralelamente el tratamiento con el SERM Ral aumentó la actividad FAL en una magnitud significativamente mayor (82% sobre control).



**Figura 10: Comparación de los efectos de E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> y Ral, en la actividad FAL de OB en cultivo.**

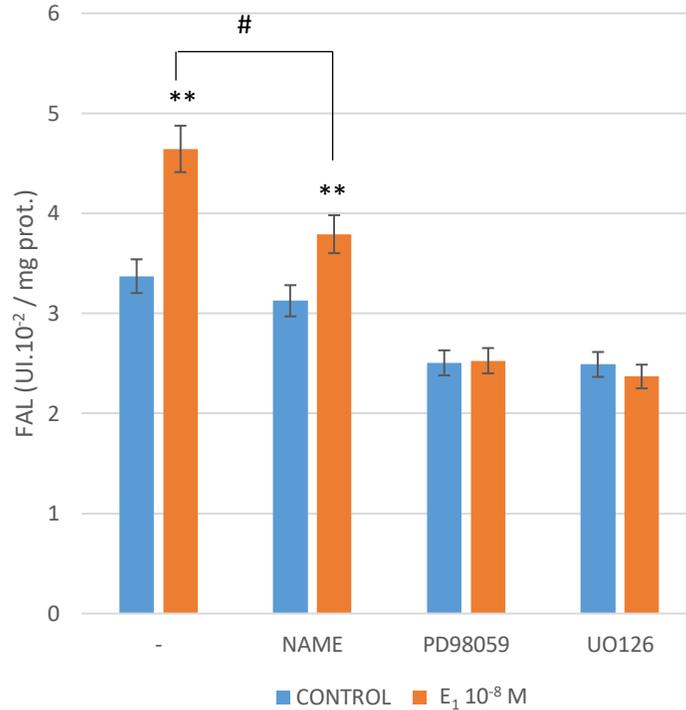
OB fueron cultivados por 12 días en presencia o ausencia de E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> o Ral 10<sup>-8</sup> M, adicionados durante las últimas 48 horas de cultivo. Los resultados corresponden al promedio ± desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4).

\*\*p< 0,001 respecto al control; # p< 0,001.

A continuación, para evaluar las vías de señalización implicadas en el mecanismo de acción de la estrona sobre la actividad FAL, empleamos la estrategia descrita anteriormente. Se utilizaron los compuestos:

- NAME: inhibidor de la NOS
- PD98059 y UO126: inhibidores de la vía de señalización MAPK
- ICI182780: antagonista del RE citosólico/nuclear
- G15: antagonista del RE de membrana GPR30
- Equilin: inhibidor de la enzima  $17\beta$ -HSD 1

Como se observa en la Figura 11, la presencia de los inhibidores PD98059 y UO126 suprimió completamente el efecto estimulador de la  $E_1$  en la actividad FAL. A su vez, los resultados muestran que la vía mensajera NOS modula parcialmente la actividad enzimática inducida por la hormona, ya que el compuesto NAME redujo parcialmente el incremento en la actividad FAL (#  $p < 0,001$ ).

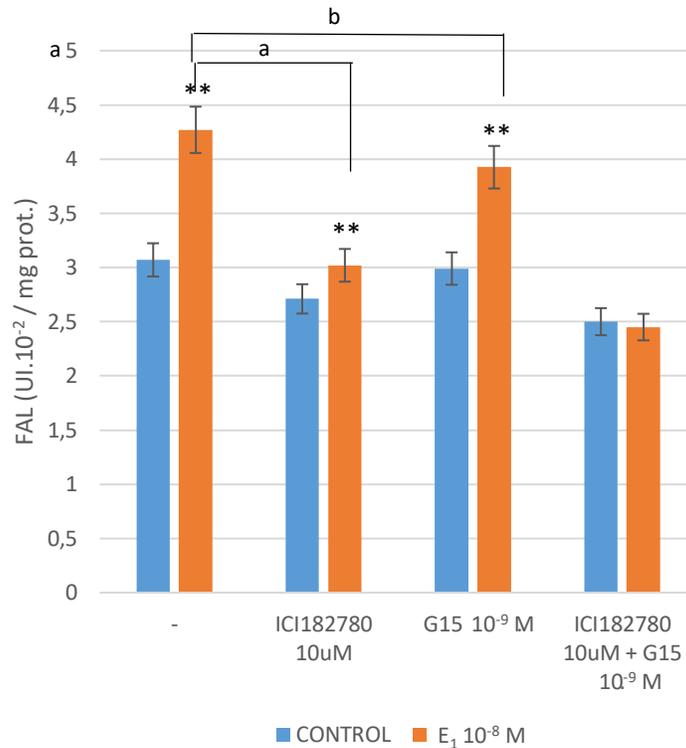


**Figura 11: Estudio de la vía de señalización NOS y MAPK en la actividad FAL estimulada por E<sub>1</sub>.**

OB de 12 días fueron tratados con la hormona durante las últimas 48 horas de cultivo en presencia o ausencia de NAME, PD98059 y UO126 10 $\mu$ M, agregados una hora antes del tratamiento. Se cuantificó la actividad FAL en el lisado celular como se describe en Metodología. Los resultados representan el promedio  $\pm$  desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4); \*\*p<0,001 vs control, # p<0,001.

Para estudiar la participación del RE consideramos no sólo al receptor citosólico /nuclear, sino también al GPR30 localizado en membrana, es por ello que se emplearon los antagonistas ICI182780 y G15, respectivamente. En la Figura 12 observamos que ICI182780 suprimió parcialmente el efecto de la E<sub>1</sub> sobre FAL, manteniéndose un estímulo significativo del 11% respecto al control. Cuando las células se preincubaron con G15 también se detectó una reducción parcial de este parámetro, manteniéndose un estímulo del 31% respecto al control correspondiente. El tratamiento combinado con ambos antagonistas mostró una supresión total del efecto mediado por la hormona en la actividad FAL. Estos resultados nos

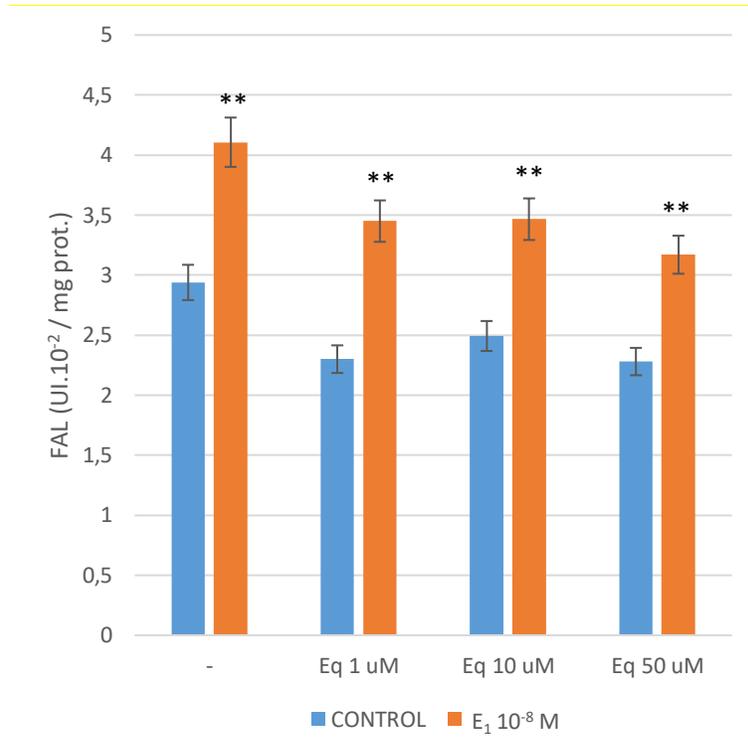
sugieren que la  $E_1$  estimula esta actividad enzimática mediante la participación de ambos tipos de RE: citosólicos/nucleares, y de membrana, GPR30.



**Figura 12: Estudio de la participación de los RE citosólicos/nucleares y del GPR30 en la actividad FAL estimulada por  $E_1$ .**

Los OB se cultivaron en DMEM-OB durante 12 días, y se trataron con la hormona durante las últimas 48 horas de cultivo en presencia o ausencia de: ICI182780 10 µM, G15 10<sup>-9</sup> M o ICI182780 10 µM + G15 10<sup>-9</sup> M, agregados una hora antes del tratamiento. Se cuantificó la actividad FAL en el lisado celular como se describe en Metodología. Los resultados representan el promedio ± desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4); \*\*p<0,001 vs control, a p<0,001, b p<0,01.

A continuación, se evaluó la especificidad de la acción de  $E_1$ , sobre la actividad FAL en presencia de diferentes concentraciones de equilin. Los resultados de la Figura 13 muestran que el estímulo inducido por la hormona no se modificó en presencia de Eq, lo que sugiere que el efecto es propio de la  $E_1$  y no por conversión al  $E_2$ .



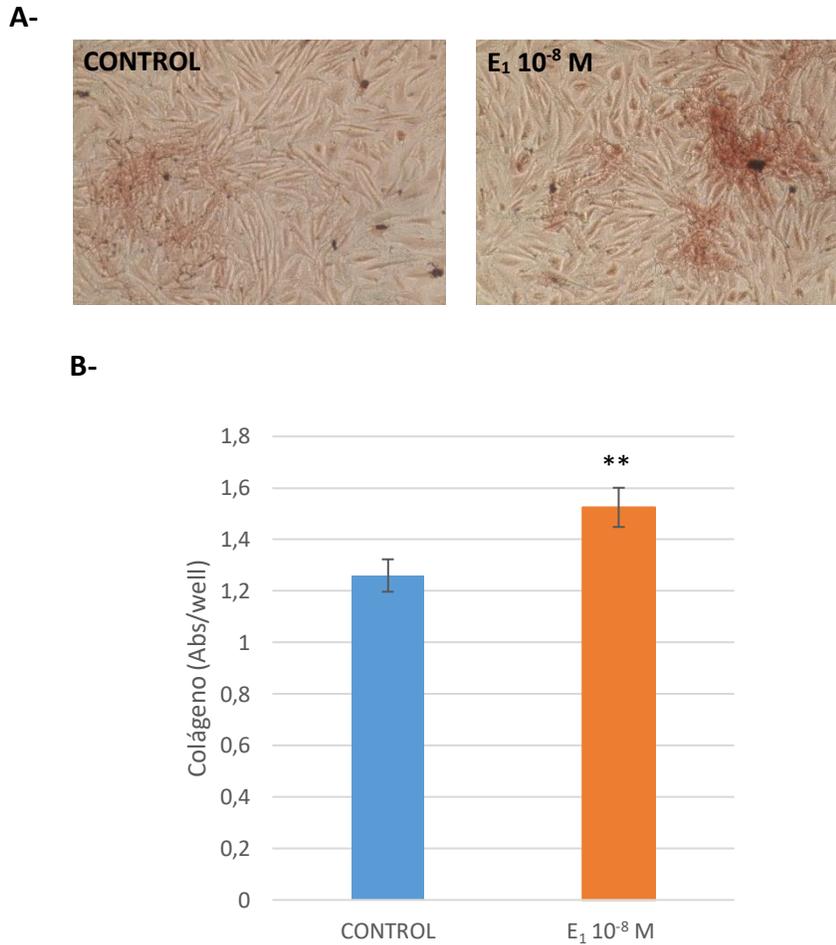
**Figura 13: Actividad FAL: efecto de la E<sub>1</sub> en presencia de Eq**

OB de 12 días fueron cultivados en DMEM-OB, y tratados con la hormona durante las últimas 48 horas de cultivo, en presencia o ausencia de equilin 1, 10 o 50  $\mu$ M, agregado una hora antes del tratamiento. La actividad FAL se midió en el lisado celular como se describe en Metodología. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4); \*\*p< 0,001 respecto a cada control.

Seguidamente procedimos a estudiar la matriz extracelular. Es sabido que ésta está constituida por componentes proteicos que otorgan estabilidad, rigidez y estructura ósea. De estos componentes, seleccionamos la proteína mayoritaria: el colágeno. Se evaluó el efecto de la E<sub>1</sub> sobre el depósito extracelular de colágeno. Para ello las monocapas celulares se sometieron a los tratamientos indicados y luego se visualizó la presencia de colágeno en la matriz extracelular por tinción con rojo sirio. El color rojo pardizo identifica las redes de colágeno.

En la Figura 14 A se observa que en los cultivos tratados con la hormona hay una mayor intensidad de coloración rojiza, correspondiente a un aumento en el depósito de la proteína luego del tratamiento. En la Figura 14 B, el gráfico de barras muestra la cuantificación

correspondiente. La hormona estimuló significativamente el depósito de colágeno en un 21% sobre el control.



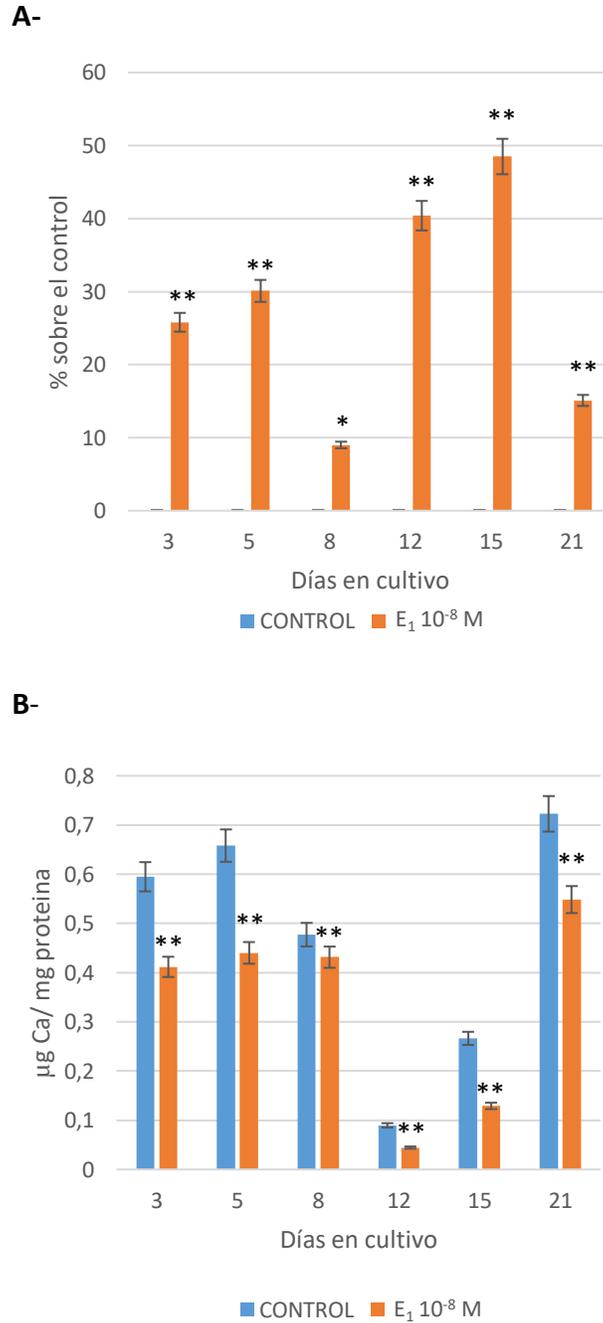
**Figura 14: Efecto de E<sub>1</sub> sobre el depósito de colágeno extracelular.**

Los OB cultivados en DMEM-OB durante 21 días se trataron durante las últimas 48 horas de cultivo con la hormona. El depósito de colágeno se determinó por tinción del colorante rojo sirio, como se describe en Metodología. A- Fotos de campos representativos de las condiciones experimentales (100X). B- Cuantificación por solubilización del colorante. Los resultados corresponden al promedio (Abs/well) ± desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4). \*\*p< 0,01 respecto al control.

Como se mencionó en la introducción, la matriz extracelular está formada por proteínas y, en un 65%, por un componente mineral constituido por nódulos de calcio formados por

cristales de hidroxiapatita. Para evaluar el contenido mineral, empleamos dos estrategias:  
a) cuantificar los niveles de calcio por extracción ácida y cuantificación espectrofotométrica,  
b) evidenciar la presencia de nódulos de calcio por tinción con rojo de alizarina.

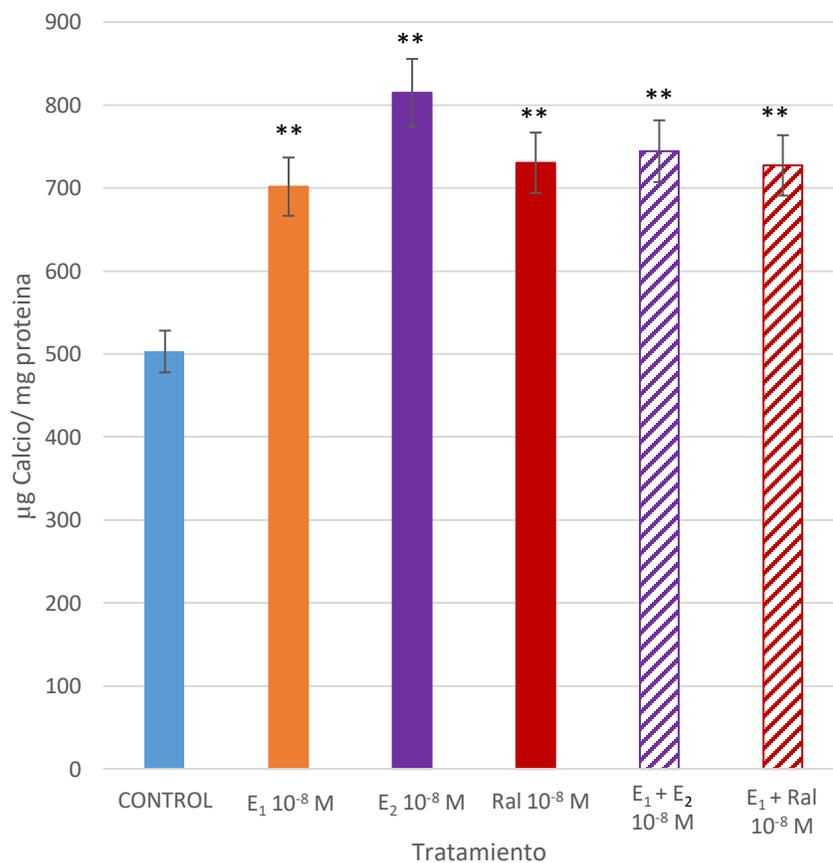
Primero, se estudió el efecto de  $E_1$   $10^{-8}$  M sobre la calcificación de la matriz de OB a distintos tiempos de cultivo: 3, 5, 8, 12, 15 y 21 días. En la Figura 15 se observa que el tratamiento con la hormona estimuló significativamente el depósito del mineral, desde los 3 días de cultivo (15 A), observándose el mayor efecto de la  $E_1$  entre los días 12 y 15 de cultivo (40% y 48% respectivamente). Estos resultados se correlacionan con una disminución en el contenido de calcio en el medio de cultivo (15 B).



**Figura 15: Efecto de E<sub>1</sub> en la calcificación de la matriz osteoblástica.**

Los OB se cultivaron en DMEM-OB durante 3, 5, 8, 12, 15 y 21 días, y se trataron con E<sub>1</sub> 10<sup>-8</sup> M durante las últimas 48 horas de cultivo. El calcio se cuantificó como se describe en la Metodología. A- niveles de calcio depositados en matriz; B- niveles de calcio en medio de cultivo. Los resultados corresponden al promedio ± desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4); \*p<0,05, \*\*p<0,01 respecto a cada control.

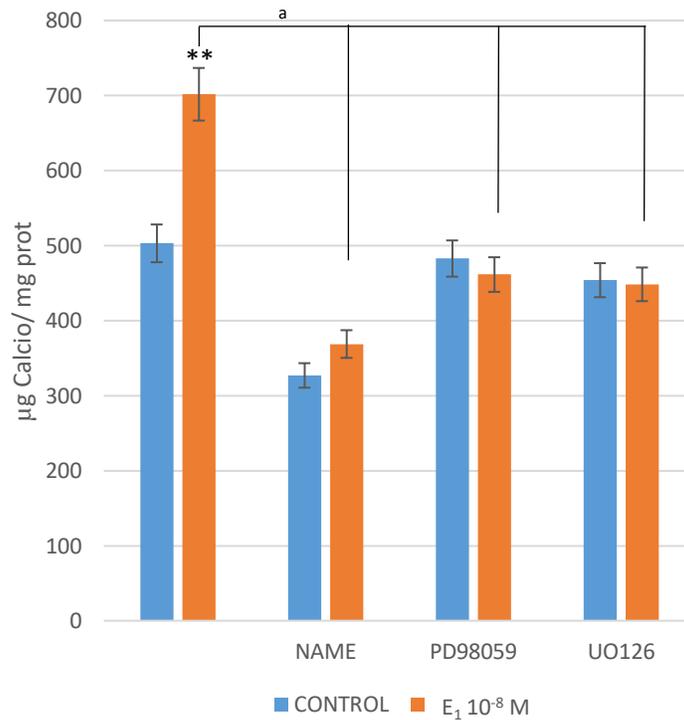
A continuación, realizamos un estudio comparativo de la acción estimuladora de la estrona sobre la mineralización, con la de otros agonistas del RE como el E<sub>2</sub> y el SERM Ral. Como se puede observar en la Figura 16, tanto los estrógenos nativos E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub> como el SERM, estimularon en una magnitud semejante el depósito del mineral en la matriz extracelular. Los tratamientos combinados de E<sub>1</sub> con E<sub>2</sub> o E<sub>1</sub> con Ral, también exhibieron un estímulo significativo en el depósito de calcio, sin detectarse efectos aditivos, sinérgicos o antagonicos.



**Figura 16: Comparación de los efectos de E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> y Ral, en el depósito de calcio en matriz.**

Cultivos de OB de 15 días se trataron con E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub>, Ral 10<sup>-8</sup> M, o combinaciones de éstos, durante las últimas 48 horas de cultivo. El calcio se cuantificó en la matriz extracelular, como se describe en Metodología. Los resultados corresponden al promedio ± desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4). \*\*p< 0,01 respecto al control.

Procedimos a estudiar el mecanismo de la acción mineralizadora de la estrona siguiendo la misma estrategia empleada en los ensayos de actividad FAL. En la Figura 17 podemos observar que la presencia de los inhibidores NAME, PD98059 y UO126, suprimió totalmente el estímulo de la E<sub>1</sub> sobre el depósito de calcio en la matriz extracelular. Estos datos nos sugieren que la hormona favorece la mineralización a través de un mecanismo de acción hormonal que comprende la participación de la NOS y de la vía mensajera MAPK.

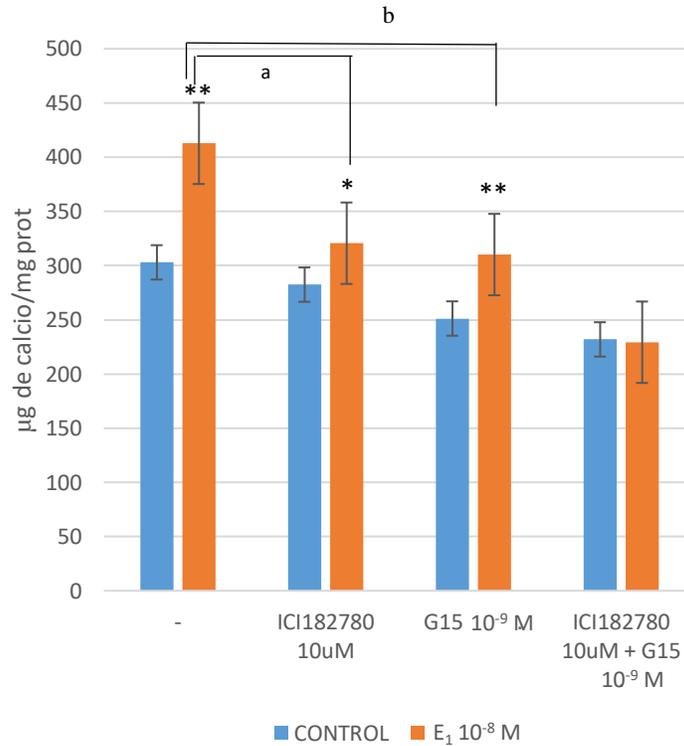


**Figura 17: Estudio de la participación de la vía de señalización NOS y MAPK en el depósito de calcio estimulado por E<sub>1</sub>.**

Cultivos de OB de 15 días fueron tratados con la hormona durante las últimas 48 horas de cultivo, en presencia o ausencia de NAME, PD98059 y UO126 10 µM, agregados una hora antes del tratamiento. Se cuantificó el calcio en matriz extracelular como se describe en la Metodología. Los resultados representan el promedio ± desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4); \*\* p<0,001 vs control, a p<0,001 vs E<sub>1</sub>.

Al evaluar la participación de los RE, observamos (Figura 18) que la presencia del compuesto ICI182780 suprimió parcialmente el efecto de la E<sub>1</sub> sobre el depósito de calcio, persistiendo

un aumento del 14% respecto al control. Cuando se preincubó con el compuesto G15, también se detectó una inhibición parcial, con una acción estimuladora remanente del 24% respecto al control. Al utilizar ambos antagonistas en forma simultánea, la supresión fue total. Estos resultados nos sugieren que  $E_1$  estimula el depósito de calcio en la matriz extracelular mediante la participación de los RE citosólicos/nucleares y del GPR30.

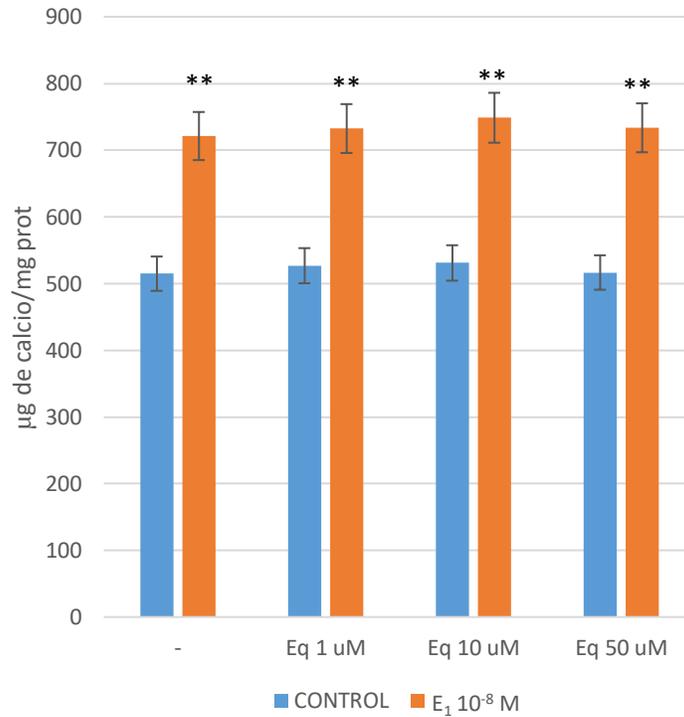


**Figura 18: Participación de los RE nucleares y del GPR30 en el depósito mineral estimulado por  $E_1$ .**

Los OB se cultivaron en DMEM-OB durante 15 días, y se trataron con la hormona durante las últimas 48 horas de cultivo, en presencia o ausencia de: ICI182780 10 µM, G15  $10^{-9}$  M o ICI182780 10 µM + G15  $10^{-9}$  M, compuestos agregados una hora antes del tratamiento. El calcio se cuantificó en la matriz extracelular, como se describe en la Metodología. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4). \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$  respecto a cada control, a  $p < 0,01$ , b  $p < 0,01$ .

A continuación, evaluamos el efecto de la  $E_1$  en presencia y ausencia del inhibidor equilin. En la Figura 19 podemos observar que el estímulo inducido por la hormona no se modificó

al inhibir la enzima  $17\beta$ -HSD con equilin, a ninguna de las dosis ensayadas. Esto sugiere que el aumento en el depósito mineral es propio de la  $E_1$  y no por conversión a  $E_2$ .



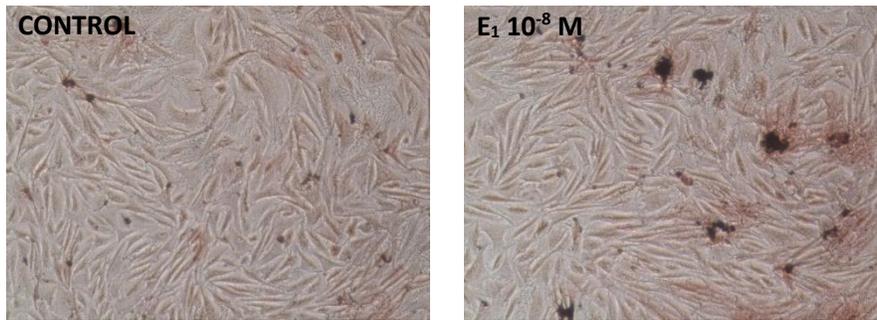
**Figura 19: Calcificación de la matriz extracelular: efecto de la  $E_1$  en presencia de Eq.**

OB de 15 días fueron cultivados en DMEM-OB, y tratados con la hormona durante las últimas 48 horas de cultivo, en presencia o ausencia de equilin (1, 10 o 50  $\mu$ M) agregado una hora antes del tratamiento. El calcio se cuantificó en matriz extracelular como se describe en la Metodología. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4). \*\*p<0,01 respecto a cada control.

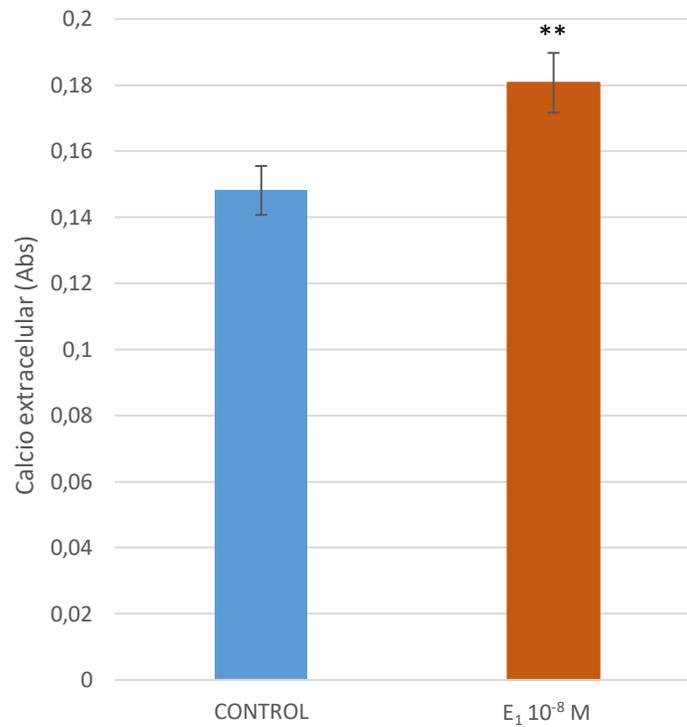
Finalmente estudiamos el proceso de mineralización de la matriz a través de la visualización de la presencia de nódulos de calcio, empleando la tinción de rojo de alizarina. Para ello, utilizamos OB de 21 días, los cuales fueron tratados con  $E_1$  durante las últimas 48 horas de cultivo. La Figura 20 muestra imágenes de un ensayo representativo (A) y la cuantificación del contenido de calcio de los nódulos luego de la extracción del colorante con NaOH 1 N (B). En la Figura 20 A se distingue un aumento en el número de núcleos de calcificación en

los cultivos tratados con E<sub>1</sub>; el gráfico de barras de la Figura 20 B muestra que la hormona estimuló la formación de nódulos de calcificación en un 22% sobre el control.

A-



B-



**Figura 20: Efecto de la E<sub>1</sub> sobre la calcificación de la matriz.**

OB cultivados durante 21 días en DMEM-OB, se trataron durante las últimas 48 horas con E<sub>1</sub> 10<sup>-8</sup>M. El calcio depositado se cuantificó por resuspensión del colorante rojo de alizarina con NaOH como se describe en la Metodología. Las fotos muestran campos representativos de las condiciones experimentales (100X). Los resultados corresponden al promedio (Abs/well) ± desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4). \*\*p<0,01 respecto al control.

**Resumen**

***Los resultados presentados en esta segunda parte del Capítulo 1 acerca del estudio de la acción de la  $E_1$  sobre la diferenciación de OB, muestran que la hormona estimula la actividad FAL, promueve el depósito extracelular de colágeno y la mineralización de la matriz. La acción diferenciadora es propia de la  $E_1$ , y comprende la participación de los dos tipos de RE y las vías mensajeras NOS y MAPK.***

# ***RESULTADOS***

## ***Capítulo 2***

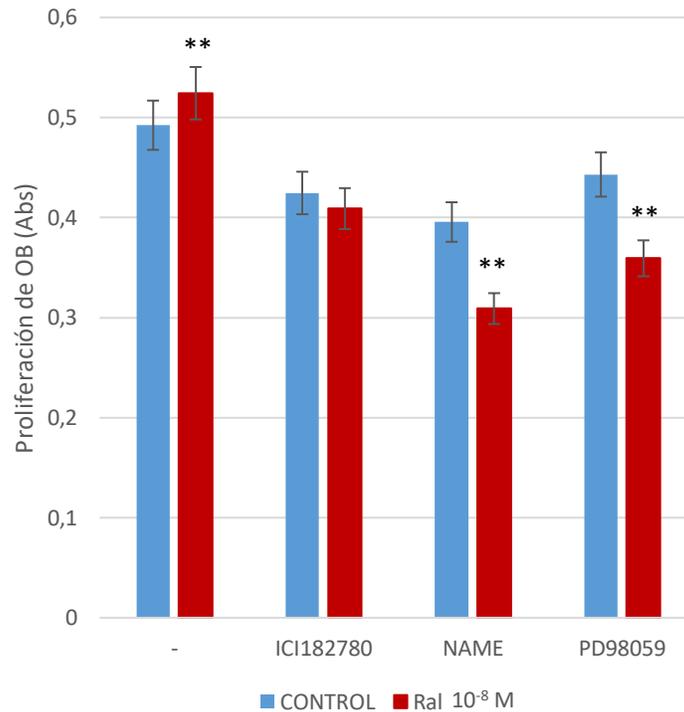
## **CAPÍTULO 2: RALOXIFENO**

Los resultados presentados en el Capítulo 1 constituyeron el primer reporte en la literatura internacional que evidenció una acción directa de la estrona como reguladora de la osteoblastogénesis. Nos planteamos investigar si en nuestro sistema experimental (cultivos primarios de OB) esos mismos parámetros podrían ser modulados por otro agonista del RE. Seleccionamos al raloxifeno (Ral), un modulador selectivo de los receptores de estrógeno (SERM), fármaco que a nivel óseo disminuye la resorción ósea. Clínicamente su uso está indicado para la prevención de fracturas vertebrales en mujeres postmenopáusicas con osteoporosis. Si bien su acción terapéutica sobre la densidad mineral ósea ha sido claramente establecida, el mecanismo celular y molecular del Ral sobre la osteoblastogénesis ha sido objeto de escasas investigaciones.

En este capítulo presentamos los resultados del efecto del Ral sobre los parámetros de osteoblastogénesis que son modulados por la E<sub>1</sub>. Empleamos la misma estrategia experimental que en el capítulo anterior: cultivos OB tratados 48 horas con Ral en presencia o ausencia de los antagonistas o inhibidores (ICI182780; NAME; PD98059) según el objetivo del experimento.

### **2.1 Efecto del Ral en el estadio proliferativo de OB**

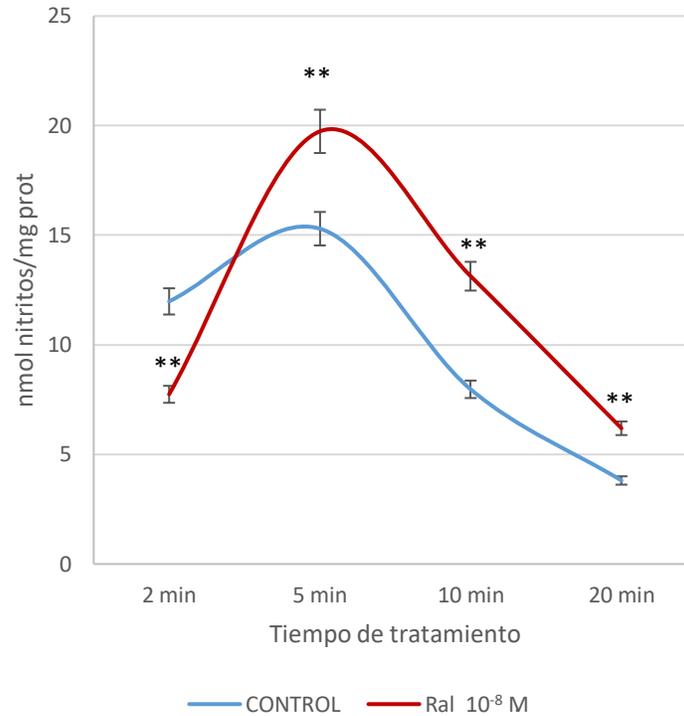
Comenzamos evaluando el efecto del SERM sobre el crecimiento celular y las vías mensajeras involucradas. La Figura 21 muestra que el SERM ejerció un estímulo moderado (7%  $p < 0,001$  vs control) en la proliferación de cultivos de OB de 15 días. La presencia del compuesto ICI182780 suprimió la acción mitogénica del Ral, evidenciando la participación del RE. Por su parte, en presencia de los compuestos NAME o PD98059, el estímulo inducido por el Ral fue suprimido. Estos resultados sugieren que la acción proliferativa de SERM involucra la participación de las vías de señalización NOS y MAPK.



**Figura 21: Efecto del Ral sobre la proliferación celular: participación del RE y las vías NOS y MAPK.**

OB sincronizados semiconfluentes de 15 días fueron tratados con Ral 10<sup>-8</sup> M durante las últimas 48 horas de cultivo en presencia o ausencia de ICI182780, NAME o PD98059 10μM, agregados una hora antes del tratamiento. Se estudió el efecto en la proliferación mediante el ensayo de MTT como se describe en la Metodología. Los resultados representan el promedio ± desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4); \*\*p<0,001 vs control.

Dado que los datos de la figura anterior postulan la participación de la NOS, procedimos a estudiar la acción del Ral sobre la producción de NO. La Figura 22 muestra el perfil de la producción de este mensajero. El SERM estimuló su síntesis (29% - 65%) a todos los tiempos de tratamiento ensayados, exhibiendo una cinética semejante a la del grupo control. El perfil temporal de la acción del Ral sobre la producción de NO es semejante al exhibido por la E<sub>1</sub> (Figura 6, Capítulo 1).



**Figura 22: Efecto del Ral sobre la producción de NO en OB de 9 días de cultivo: ensayo tiempo-respuesta.**

Monocapas de OB cultivados durante 9 días en DMEM-OB suplementado con 1% de SFB, fueron tratadas durante las últimas 48 horas de cultivo con Ral 10<sup>-8</sup> M, más un pulso de 2, 5, 10 y 20 minutos con la misma concentración del SERM. La producción de NO se midió mediante la técnica de Griess. Los resultados corresponden al promedio ± desvío estándar de cuatro experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4), \*\*p<0,01 respecto al valor de cada control.

El estímulo del fármaco se evaluó también en un estadio de mayor diferenciación (15 días de cultivo). Como se observa en la Tabla 4, el SERM indujo un incremento del 140 % en la producción de NO (44% y 140%, 9 y 15 días respectivamente).

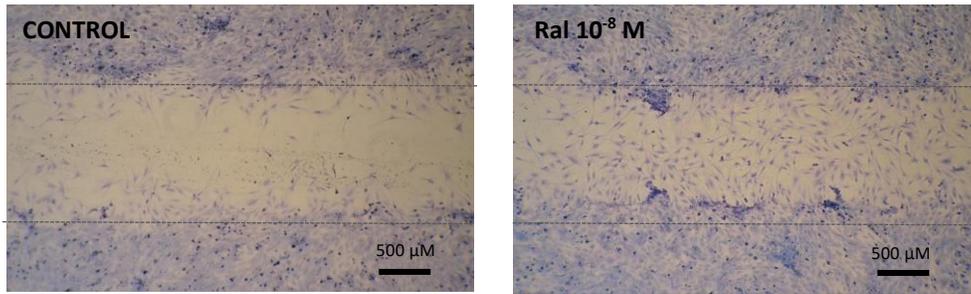
**Tabla 4: Efecto del Ral en la producción de NO, en OB de distintos tiempos de cultivo.**

Cultivos confluentes de OB, incubados durante 9 y 15 días en DMEM-OB suplementado con 1% de SFB, fueron tratados durante las últimas 48 horas de cultivo con Ral  $10^{-8}$  M, más un pulso de 15 minutos con la misma concentración del fármaco. La producción de NO se midió mediante la técnica de Griess. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  desvío estándar de cuatro experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4); \*\*p<0,01 vs cada control.

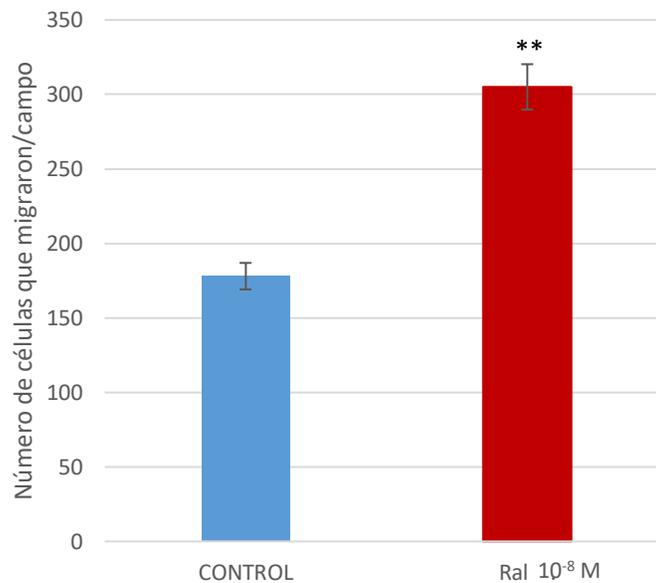
	Tratamiento	Días de cultivo	
		9	15
nmol nitritos / mg prot	CONTROL	6,45 $\pm$ 0,32	19,37 $\pm$ 0,97
	Ral $10^{-8}$ M	9,28 $\pm$ 0,29 **	46,90 **

A continuación, evaluamos la acción del SERM sobre la migración celular empleando el ensayo de reparación de la herida. Luego de realizar el corte, las monocapas de OB fueron expuestas al SERM durante 72 horas. La Figura 23 A muestra que los OB se movilaron hacia el área denudada luego de 72 horas de tratamiento con Ral, cerrando parcialmente la herida. La cuantificación del ensayo muestra que el estímulo en la movilidad celular fue del 71% sobre el control.

A-



B-



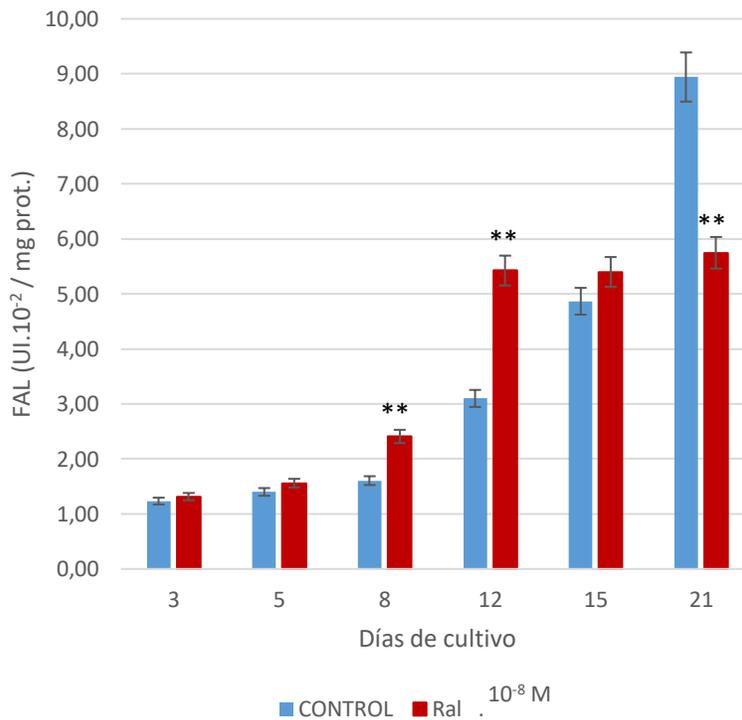
**Figura 23: Efecto del Ral sobre la migración de OB.**

Los OB fueron cultivados 7 días en DMEM-OB suplementado con 1% de SFB. Se realizó un corte transversal y se removió un sector de la monocapa de OB como se describe en la Metodología. Las células se trataron con Ral 10<sup>-8</sup> M durante las últimas 72 h de cultivo. A- Se muestran fotos de campos representativos de cultivos teñidos con Giemsa. Las líneas punteadas delimitan el sector denudado de células (la escala representa 500 μm, 40X). B- Los resultados representan el promedio ± desvío estándar del número de células migrantes por campo de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4). \*\*p<0,01 respecto al control.

**2.2 Efecto del Ral en el estadio diferenciativo de OB**

Para evaluar la acción del SERM sobre el proceso de diferenciación osteoblástica, en primera instancia, analizamos la acción del fármaco sobre la actividad FAL. Se midió la actividad enzimática en el lisado celular (3, 5, 8, 12, 15 y 21 días). En todos los casos, los OB fueron tratados con Ral  $10^{-8}$  M durante las últimas 48 horas.

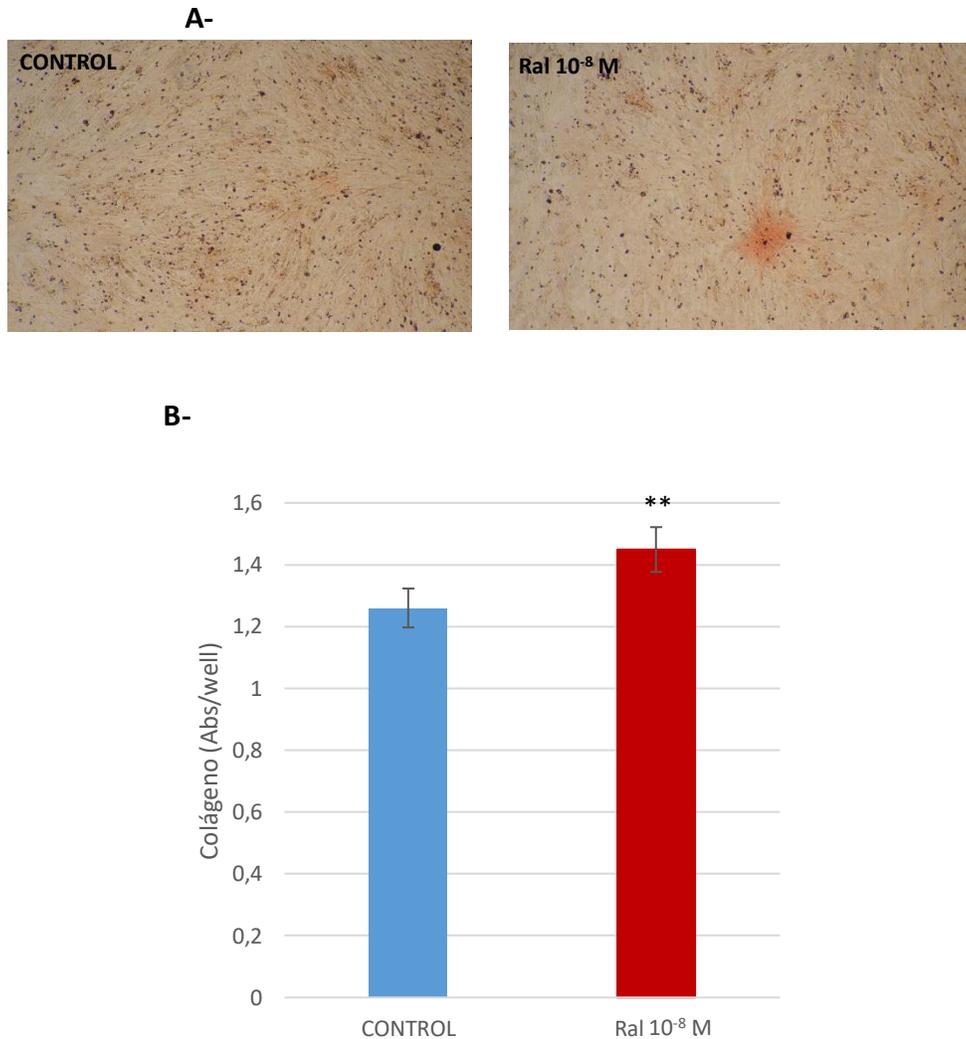
En la Figura 24 podemos ver que, a tiempos cortos de cultivo, no se observaron diferencias significativas en la actividad FAL entre el control y el tratado. A partir de los 8 días, la actividad enzimática aumentó marcadamente, y fue estimulada por el Ral. El máximo efecto del SERM (75% respecto al control) se observó a los 12 días de cultivo.



**Figura 24: Efecto del Ral en la actividad FAL de cultivos de OB.**

OB de 3, 5, 8, 12, 15 y 21 días, fueron cultivados en DMEM-OB y tratados con Ral  $10^{-8}$  M durante las últimas 48 horas de cultivo. La actividad FAL se cuantificó como se describe en la Metodología. Los resultados corresponden a la actividad FAL detectada en lisados celulares  $\pm$  desvío estándar de tres experimentos independientes, donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4), \*\*p<0,01 respecto a cada control.

Para evaluar el efecto del fármaco sobre la matriz extracelular, estudiamos la acción del Ral sobre el depósito de colágeno. Las imágenes de la Figura 25A revelan un mayor depósito de colágeno en el grupo tratado con Ral, evidenciado por una mayor intensidad de coloración. La Figura 25 B muestra la cuantificación correspondiente, detectándose un incremento del 20% sobre el control.

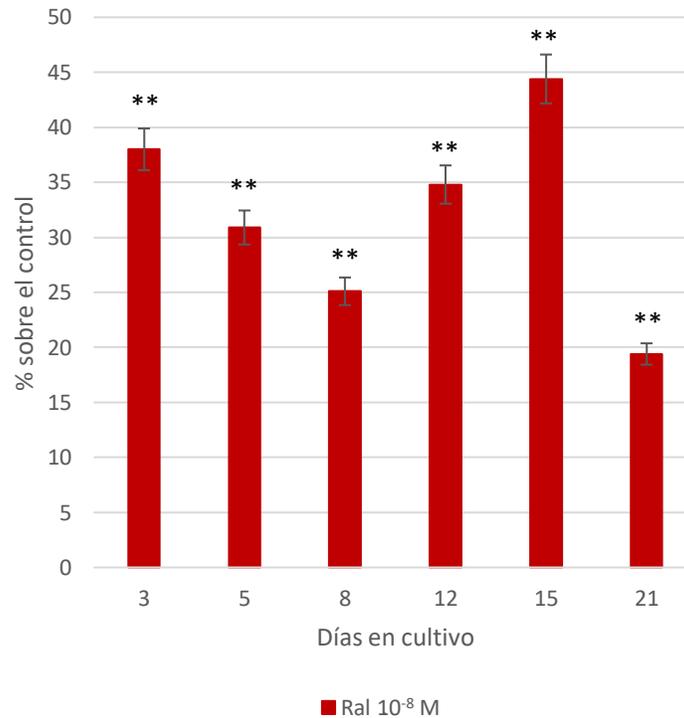


**Figura 25: Efecto del Ral sobre el depósito de colágeno extracelular.**

Los OB cultivados en DMEM-OB durante 21 días se trataron con Ral durante las últimas 48 horas de cultivo. El depósito de colágeno se determinó por tinción del colorante rojo sirio como se describe en la Metodología. A- Fotos representativas de campos según condiciones experimentales (100X). B- Cuantificación por solubilización del colorante. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4), \*\*p< 0,01 respecto al control.

Para finalizar, estudiamos el efecto del SERM sobre la mineralización de la matriz. cultivos de OB de 3, 5, 8, 12, 15 y 21 días, se trataron con Ral 10<sup>-8</sup> M durante las últimas 48 horas de cultivo, y se procedió a medir el calcio depositado por cuantificación espectrofotométrica.

En la Figura 26 observamos que luego del tratamiento con el fármaco, aumentó significativamente el contenido de calcio en la matriz respecto al control, a todos los tiempos de cultivo. La mayor acción estimuladora se detectó a los 15 días (44% respecto al control).

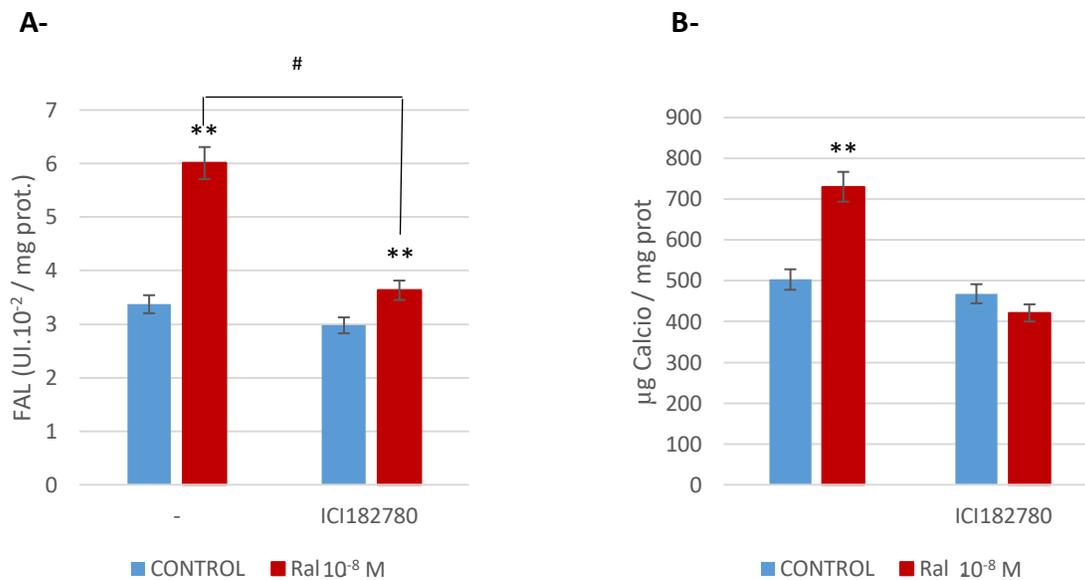


**Figura 26: Efecto del Ral en la calcificación de la matriz osteoblástica.**

Los OB se cultivaron en DMEM-OB durante 3, 5, 8, 12, 15 y 21 días, y se trataron con Ral 10<sup>-8</sup> M durante las últimas 48 horas de cultivo. El calcio se cuantificó como se describe en la Metodología. Los resultados corresponden al porcentaje de calcio depositado en la matriz extracelular respecto al control ± desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4). \*\*p< 0,01 respecto a cada control.

Evaluamos la participación del RE en la acción del SERM sobre la actividad FAL y la mineralización extracelular. La Figura 27A muestra que la presencia del compuesto ICI182780 suprimió parcialmente el estímulo inducido por el Ral en la actividad FAL, persistiendo un 22% de incremento sobre el control en presencia del antagonista. En cambio, la supresión dada por el ICI182780 fue total cuando se evaluó la mineralización

(Figura 27B). El aumento en el depósito de calcio provocado por el Ral se anuló por completo en presencia del antagonista. Ambos resultados sugieren la participación del RE citosólico/nuclear en el mecanismo de acción por el cual el fármaco activa la FAL y estimula la mineralización.

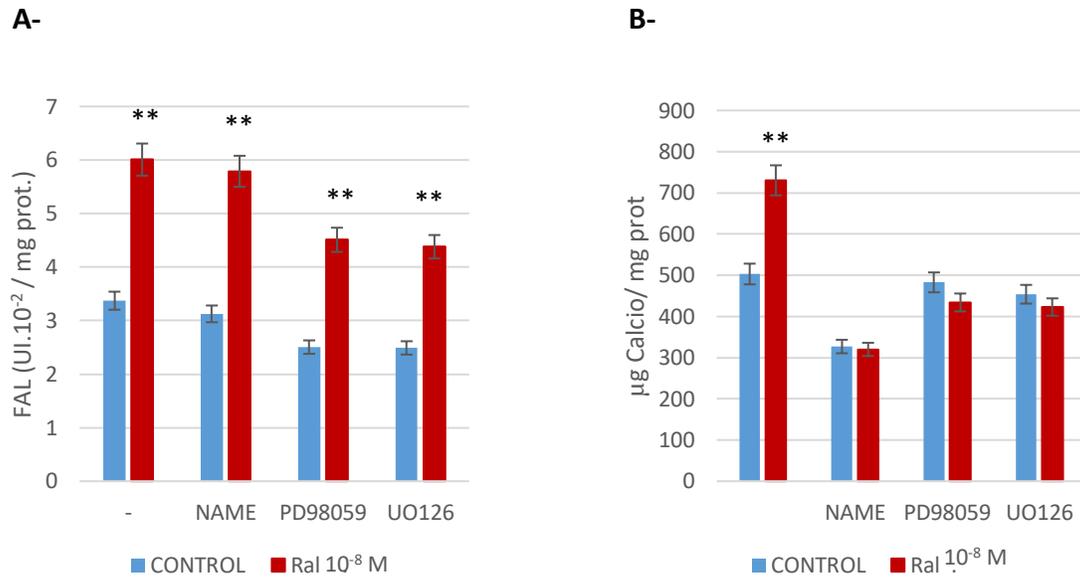


**Figura 27: Participación del RE en la actividad FAL y el depósito mineral estimulados por Ral.**

Los OB se cultivaron en DMEM-OB durante 12 días (A) o 15 días (B), y se trataron con el SERM durante las últimas 48 horas de cultivo en presencia o ausencia de ICI182780 10 µM, agregado una hora antes del tratamiento. La actividad FAL se cuantificó en el lisado celular (A); el depósito de calcio en matriz se midió por extracción ácida (B), como se describe en la Metodología. Los resultados corresponden al promedio ± desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4); \*\*p<0,01 respecto a cada control, #p<0,01.

Respecto a las vías de señalización involucradas en la acción del fármaco, en la Figura 28A podemos ver que, respecto a la activación de la enzima FAL, ninguna de las vías analizadas participaría en la acción estimuladora del Ral ya que la presencia de los compuestos NAME, PD98059 y UO126 no afectó la acción del SERM. En cambio, en la Figura 28 B observamos un resultado opuesto. Sobre la mineralización, la acción estimuladora del Ral sí involucra la

participación de las vías mensajeras NOS y MAPK, ya que en presencia de los compuestos NAME, PD98059 o UO126 se suprimió la acción del fármaco.



**Figura 28: Participación de las vías NOS y MAPK en la actividad FAL y el depósito mineral, estimulados por Ral.**

Los OB se cultivaron en DMEM-OB durante 12 días (A) o 15 días (B), y se trataron con el SERM durante las últimas 48 horas de cultivo en presencia o ausencia de NAME, PD98059 y UO126 10 µM, agregados una hora antes del tratamiento. La actividad FAL se cuantificó en el lisado celular (A); el depósito de calcio en la matriz se midió por extracción ácida (B), como se describe en la Metodología. Los resultados corresponden al promedio ± desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4); \*\*p<0,01 respecto a cada control.

**Resumen**

***Estos datos evidencian que el Ral promueve el crecimiento y la diferenciación osteoblástica. El SERM estimuló la proliferación, migración celular y producción de NO. A su vez, el fármaco indujo la actividad FAL, el depósito de colágeno y mineralización de la matriz de cultivos de OB. El mecanismo de acción del SERM involucra al RE, las vías de señalización NOS y MAPK. Los resultados muestran un efecto del SERM semejante al de la E<sub>1</sub>.***

Por último, realizamos un análisis comparativo de la acción de los moduladores del receptor de estrógenos sobre la osteoblastogénesis. En la Tabla 5 se compara el efecto de los tres agonistas del RE (Ral, E<sub>2</sub> y E<sub>1</sub>) sobre los parámetros de diferenciación osteoblástica estudiados en este trabajo de tesis. Observamos que, si bien las magnitudes de estímulo son ligeramente diferentes, todos los marcadores de diferenciación fueron activados luego del tratamiento.

**Tabla 5: Efecto del Ral, E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub> sobre la osteoblastogénesis.**

OB fueron tratados durante las últimas 48 horas de cultivo con Ral, E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub> 10<sup>-8</sup> M. Se midió la actividad FAL, proliferación - calcio extracelular, y depósito de colágeno, a los 12, 15 y 21 días respectivamente, y los resultados corresponden al porcentaje de estímulo observado en cada tratamiento, y para cada parámetro, respecto a sus correspondientes controles; \*\*p<0,01.

	Ral	E <sub>1</sub>	E <sub>2</sub>
<b>Proliferación</b>	↑7% **	↑38% **	↑39% **
<b>Actividad FAL</b>	↑82% **	↑38% **	↑41% **
<b>Depósito de colágeno</b>	↑15% **	↑21% **	↑28% **
<b>Calcio extracelular</b>	↑45% **	↑40% **	↑62% **

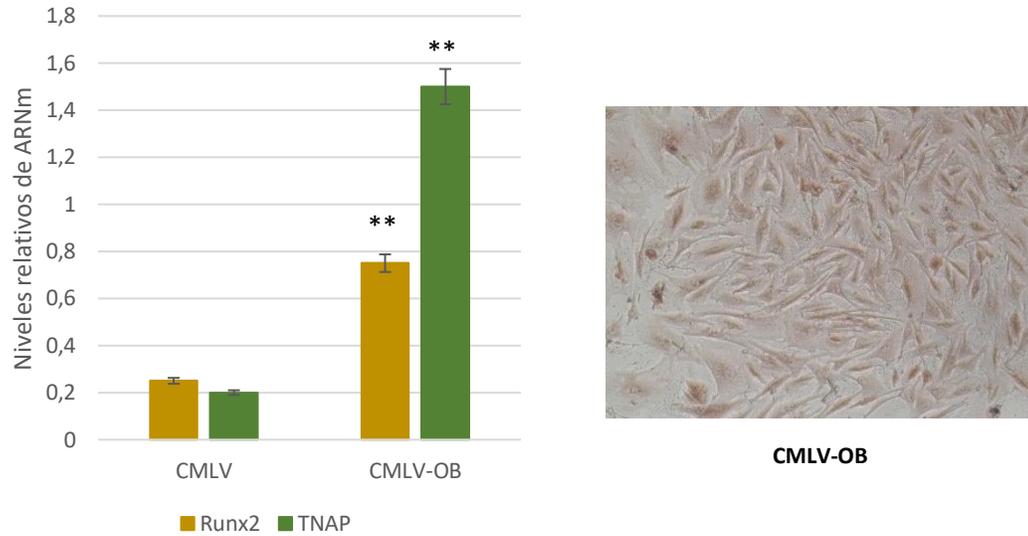
# ***RESULTADOS***

## ***Capítulo 3***

### CAPÍTULO 3: SISTEMA VASCULAR

En este Capítulo estudiamos el efecto de la  $E_1$  sobre procesos celulares y moleculares involucrados en la calcificación vascular. Como se describe en la introducción, la calcificación vascular comprende varios pasos, siendo la transdiferenciación de CMLV uno de los eventos cruciales. Como modelo experimental, en nuestro laboratorio se implementó y validó una técnica de transdiferenciación, la cual consiste en realizar cultivos prolongados de CMLV en un medio procalcificante, constituido por DMEM con el agregado de  $\beta$ -glicerofosfato a concentración final 10 mM (DMEM- $\beta$ GP). De esta forma se induce la expresión del gen maestro de la osteoblastogénesis Runx2, y de la fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP). Estos cambios resultan irreversibles y confirman el pase definitivo de las células musculares al fenotipo óseo. A manera ilustrativa, la Figura 29 muestra la variación de estos marcadores óseos en células nativas y transdiferenciadas. También puede observarse la mineralización extracelular de las CMLV-OB. Por convención, para la descripción de los resultados emplearemos la sigla CMLV-OB para identificar a las células musculares transdiferenciadas a linaje óseo.





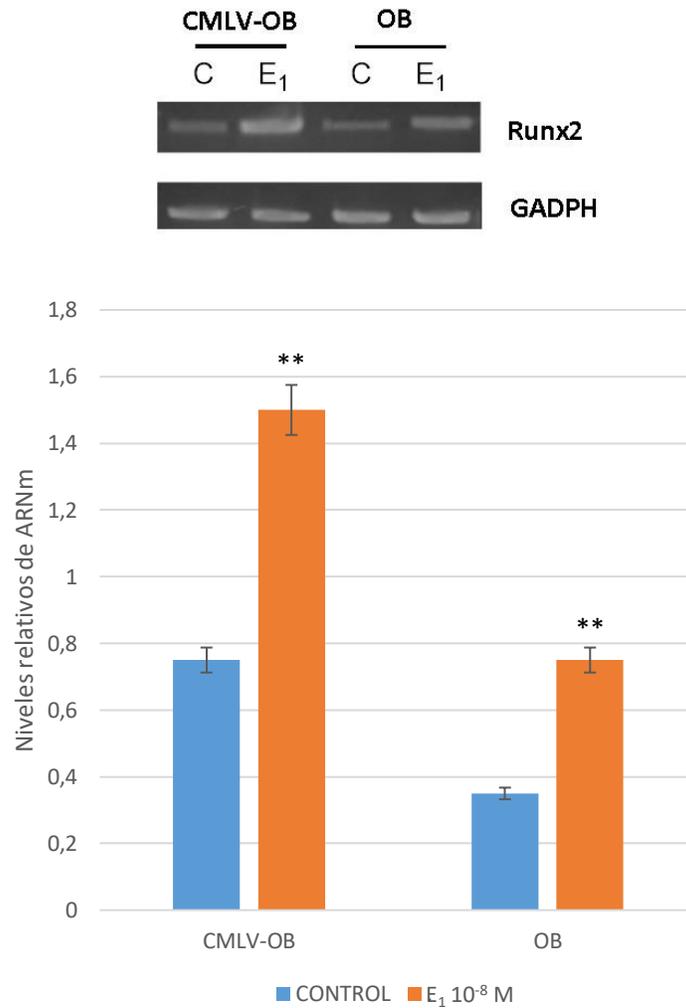
**Figura 29: Expresión de ARNm de Runx2 y TNAP en CMLV y CMLV-OB.**

Las CMLV se incubaron durante 27 días en DMEM o en medio procalcificante. Los niveles de expresión del ARNm de Runx2 y TNAP se midieron por RT-PCR. (n=4), \*\*p<0,01 respecto al valor de CMLV. Reproducido de Cutini y col. (Cutini y col., 2016).

### **3.1 Efecto de la E<sub>1</sub> sobre la transdiferenciación de CMLV a CMLV-OB**

Para esta parte del trabajo de tesis empleamos la misma concentración de E<sub>1</sub> que la utilizada en el Capítulo 1, niveles fisiológicos de la E<sub>1</sub> inductores de la osteoblastogénesis. Inicialmente evaluamos el efecto de la hormona en la expresión del marcador óseo Runx2. Mediante la técnica de RT-PCR estudiamos la expresión del ARNm de este factor de transcripción temprano, clave en la diferenciación de los preOB.

En la Figura 30 se muestra un gel representativo y el gráfico de su cuantificación. Se observa que en los cultivos de CMLV transdiferenciadas a linaje óseo, la E<sub>1</sub> estimuló la expresión de Runx2. Comparamos la acción de la hormona sobre la expresión del marcador respecto a lo observado en células osteoblasticas (barras de la derecha). Si bien los niveles de Runx2 en cada tipo celular son diferentes, el estrógeno estimuló su expresión en una magnitud equivalente en ambos sistemas celulares (100% respecto al cada control).

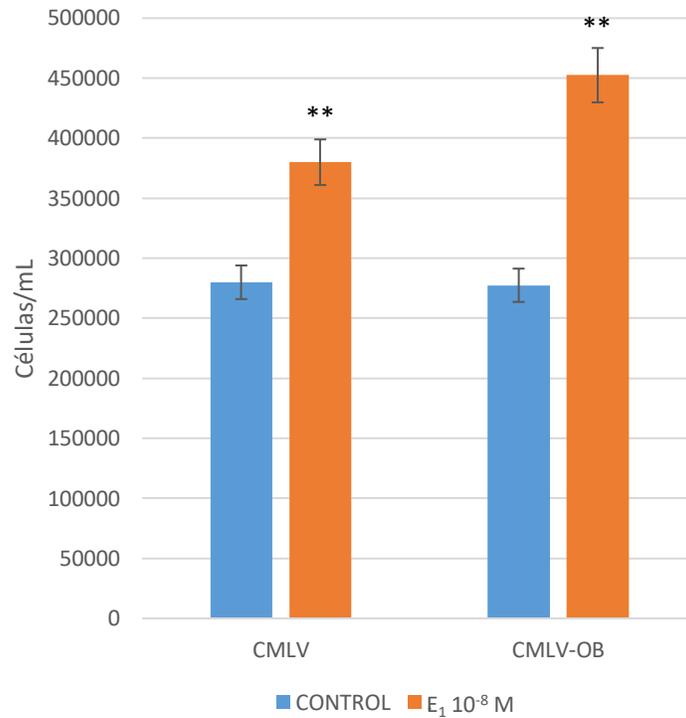


**Figura 30: Efecto de la E<sub>1</sub> en la expresión de ARNm de Runx2 en CMLV-OB y OB.**

CMLV-OB y OB de 21 días de cultivo fueron utilizadas. Los niveles de expresión del ARNm de Runx2 se estudiaron por RT-PCR según se describe en la Metodología. Los resultados representan la intensidad relativa de cada banda normalizada sobre los niveles del ARNm de GADPH por análisis densitométrico usando el software ImageJ. Los resultados representan al promedio ± desvío estándar de dos experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4) \*\*p<0,01 vs control.

Sabiendo que una de las primeras modificaciones que induce el estrés calcificante está vinculada al cambio de fenotipo de las CMLV de contráctil a proliferativo, evaluamos el efecto de la E<sub>1</sub> sobre la proliferación celular. Empleamos el ensayo de MTT, analizando el crecimiento de las células nativas (incubadas con DMEM) y de las CMLV-OB (incubadas con

DMEM-βGP). Comenzamos estudiando la proliferación en cultivos de CMLV Y CMLV-OB de 21 días, a los cuales se les adicionó la hormona durante las últimas 48 horas. Como se observa en la Figura 31, la E<sub>1</sub> estimuló significativamente el crecimiento celular en ambos sistemas experimentales. El estrógeno aumentó el número de CMLV nativas en un 36%, y el número de CMLV-OB en un 63%, respecto a cada control.



**Figura 31: Comparación del efecto de la E<sub>1</sub> en la proliferación de CMLV y CMLV-OB.**

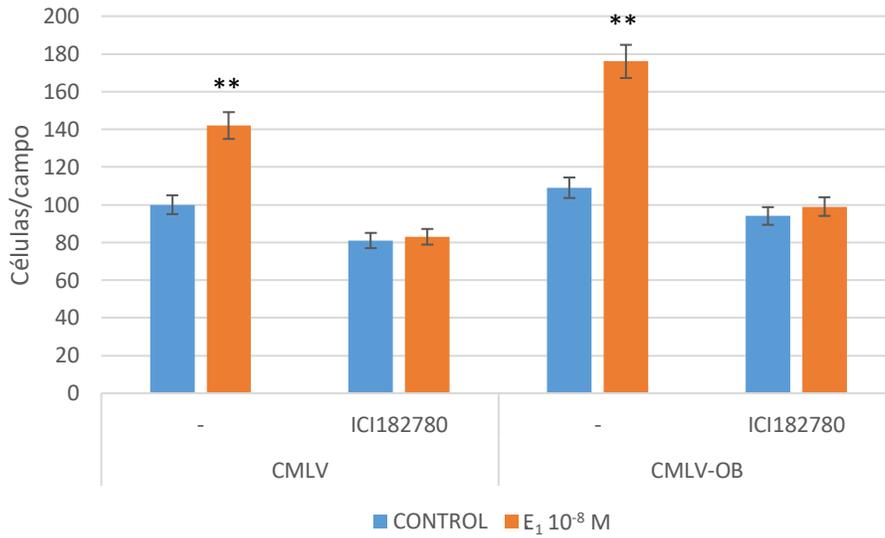
Cultivos sincronizados semiconfluentes de CMLV y CMLV-OB de 21 días fueron tratados con E<sub>1</sub> 10<sup>-8</sup> M durante las últimas 48 horas de cultivo. Se realizó el recuento de células en cámara para cada condición, como se describe en la Metodología. Los resultados representan el promedio (células/mL) ± desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4); \*\*p<0,01 vs control.

A continuación, estudiamos el mecanismo a través del cual la hormona modula la proliferación celular. Para ello, siguiendo la estrategia ya descrita en el Capítulo 1, se seleccionaron los siguientes compuestos:

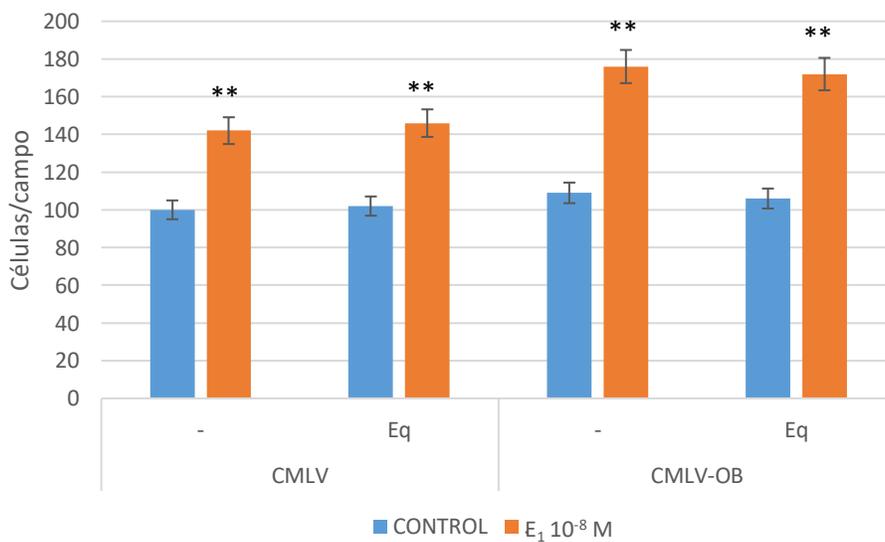
- ICI182780: antagonista del RE
- G15: antagonista del RE de membrana GPR30
- Equilin: inhibidor de la enzima  $17\beta$ -HSD 1

En la Figura 32 A podemos ver que, tanto en los cultivos de CMLV nativas, como transdiferenciadas, la presencia del compuesto ICI182780 suprimió el estímulo inducido por la  $E_1$  (36% y 63% respectivamente), llevando el número de células /campo a valores del control. La figura 32 B muestra que en presencia de Eq, el estímulo de la hormona sobre la proliferación de CMLV y CMLV-OB se mantuvo, demostrando que la conversión al  $E_2$  no es requerida para la acción de la  $E_1$ . Se analizó la participación del receptor GPR30 en el efecto proliferativo mostrado por el estrógeno empleando el compuesto G15; sin embargo, obtuvimos mucha variabilidad en los resultados, impidiéndonos establecer una conclusión.

A-



B-

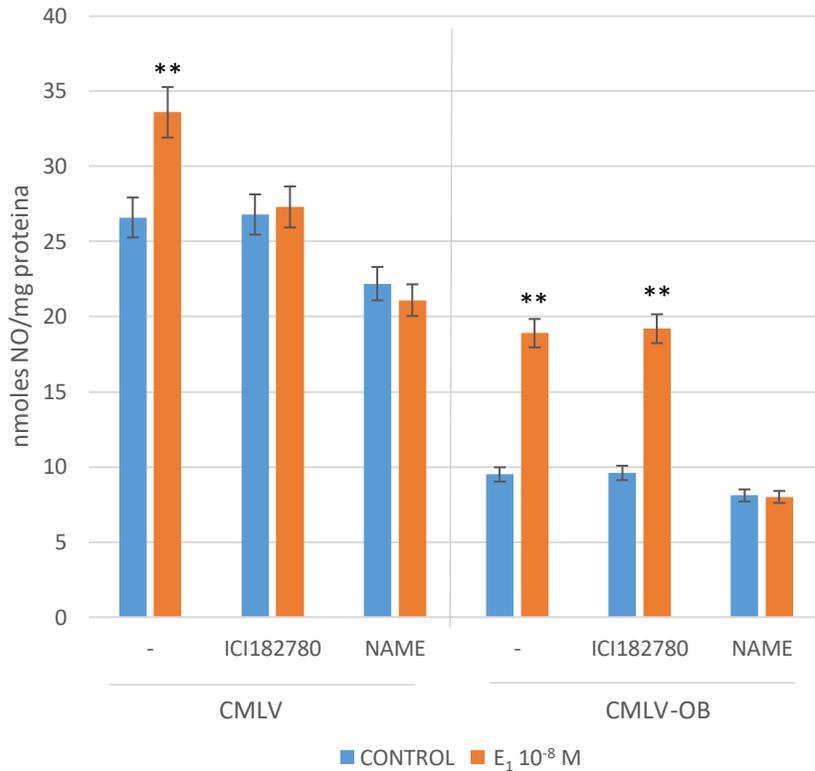


**Figura 32: Efecto mitogénico de la  $E_1$  en CMLV y CMLV-OB: mecanismo de acción.**

Cultivos de CMLV y CMLV-OB sincronizados semiconfluentes de 21 días fueron tratados con  $E_1$   $10^{-8}$  M durante las últimas 48 horas de cultivo, en presencia o ausencia de los compuestos ICI182780  $10 \mu\text{M}$ (A), o equilin  $10 \mu\text{M}$  (B), agregados una hora antes del tratamiento. Se contaron células por campo como se describe en la Metodología. Los resultados representan el promedio (células/campo)  $\pm$  desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4); \*\*p<0,001 vs control.

Es ampliamente conocido que el óxido nítrico tiene rol crucial en la homeostasis vascular, comportándose como un importante inhibidor de la calcificación. A su vez, en el Capítulo 1 demostramos que este mensajero participa en el proceso de osteoblastogénesis. Teniendo en cuenta esto, se estudió la capacidad de la E<sub>1</sub> de estimular la síntesis de NO en CMLV nativas y CMLV-OB de 21 días.

La enzima NOS al activarse, produce NO en intervalos de tiempo muy cortos; es por ello que además del tratamiento hormonal durante 48 horas, se realizó un pulso de tratamiento con E<sub>1</sub>. Se procedió de la misma manera que en el Capítulo 1: los cultivos se trataron con E<sub>1</sub> 10<sup>-8</sup> M durante las últimas 48 horas de cultivo, y se les dio un pulso extra de la hormona en igual concentración durante 10 minutos, previo a medir el NO liberado al medio de cultivo. En la Figura 33 podemos ver que la hormona aumentó la producción de NO en ambos tipos celulares, siendo un efecto de mayor magnitud respecto al control en CMLV-OB (99% sobre el control). Observamos también una divergencia respecto a la participación del RE: mientras que en presencia del antagonista ICI182780 el efecto del estrógeno fue inhibido en las CMLV, en las CMLV-OB esto no sucedió. La inhibición por el compuesto NAME corrobora la especificidad de la respuesta NOS que se midió en ambos sistemas.



**Figura 33: Efecto de la E<sub>1</sub> sobre la producción de NO en CMLV y CMLV-OB: participación del RE.**

CMLV y CMLV-OB cultivadas durante 21 días fueron tratadas durante las últimas 48 horas de cultivo con E<sub>1</sub> 10<sup>-8</sup>M, en presencia o ausencia de ICI182780 y NAME 10 μM, agregados una hora antes del tratamiento, más un pulso de 10 minutos con la misma concentración de la hormona. La producción de NO se midió mediante la técnica de Griess. Los resultados corresponden al promedio ± desvío estándar de cuatro experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4); \*\*p<0,01 respecto al valor de cada control.

**Resumen**

***La E<sub>1</sub> estimula la expresión de Runx2 en cultivos de CMLV transdiferenciadas, al igual que se observó en OB. La hormona posee un efecto proliferativo sobre las CMLV nativas y CMLV-OB, a través de un mecanismo de acción que involucra la participación de los receptores estrogénicos, siendo éste un efecto propio de la E<sub>1</sub>. El estrógeno también estimula la actividad de la NOS en ambos sistemas. El aumento en producción de NO ejercido sobre las CMLV fue a través de los RE, a diferencia de lo observado en las CMLV-OB.***

**3.2 Efecto de la E<sub>1</sub> sobre la matriz extracelular de CMLV-OB**

Para caracterizar nuestro sistema experimental de transdiferenciación, comparamos los valores basales de los parámetros de diferenciación osteoblástica estudiados en el Capítulo 1 (actividad FAL, depósito de colágeno, contenido de calcio en la matriz extracelular) en cultivos nativos de OB de 15 y 21 días, con los de CMLV-OB transdiferenciados de 21 días. La Tabla 6 muestra que las CMLV-OB exhibieron valores equivalentes a los observados en cultivos de OB de 15 días en los 3 parámetros estudiados, lo que avala que, bajo nuestras condiciones experimentales, las células CMLV-OB son capaces de sintetizar una matriz extracelular equivalente a la ósea.

**Tabla 6: Niveles de marcadores óseos en CMLV-OB y OB nativos.**

Cultivos confluentes de CMLV-OB de 21 días y de OB de 15 y 21 días, fueron utilizados para cuantificar la actividad FAL en el lisado celular, el depósito de colágeno por resuspensión del colorante rojo sirio, y el contenido de calcio en la matriz por extracción ácida, como se describe en la Metodología. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4).

	<b>CMLV-OB 21 días</b>	<b>OB 15 días</b>	<b>OB 21 días</b>
<b>Actividad FAL (U.I. 10<sup>-2</sup>/mg prot)</b>	<b>5,95 <math>\pm</math> 0,30</b>	<b>4.63 <math>\pm</math> 0.25</b>	<b>9.05 <math>\pm</math> 0.28</b>
<b>Colágeno (Abs/well)</b>	<b>0,9 <math>\pm</math> 0,04</b>	<b>0.98 <math>\pm</math> 0.05</b>	<b>1.26 <math>\pm</math> 0.10</b>
<b>Calcio extracelular (<math>\mu</math>g /mg prot)</b>	<b>380,2 <math>\pm</math> 18,9</b>	<b>519.1 <math>\pm</math> 43.3</b>	<b>668.0 <math>\pm</math> 27.5</b>

Validado el sistema, procedimos a estudiar el efecto de la E<sub>1</sub> y su mecanismo molecular de acción, analizando la contribución de:

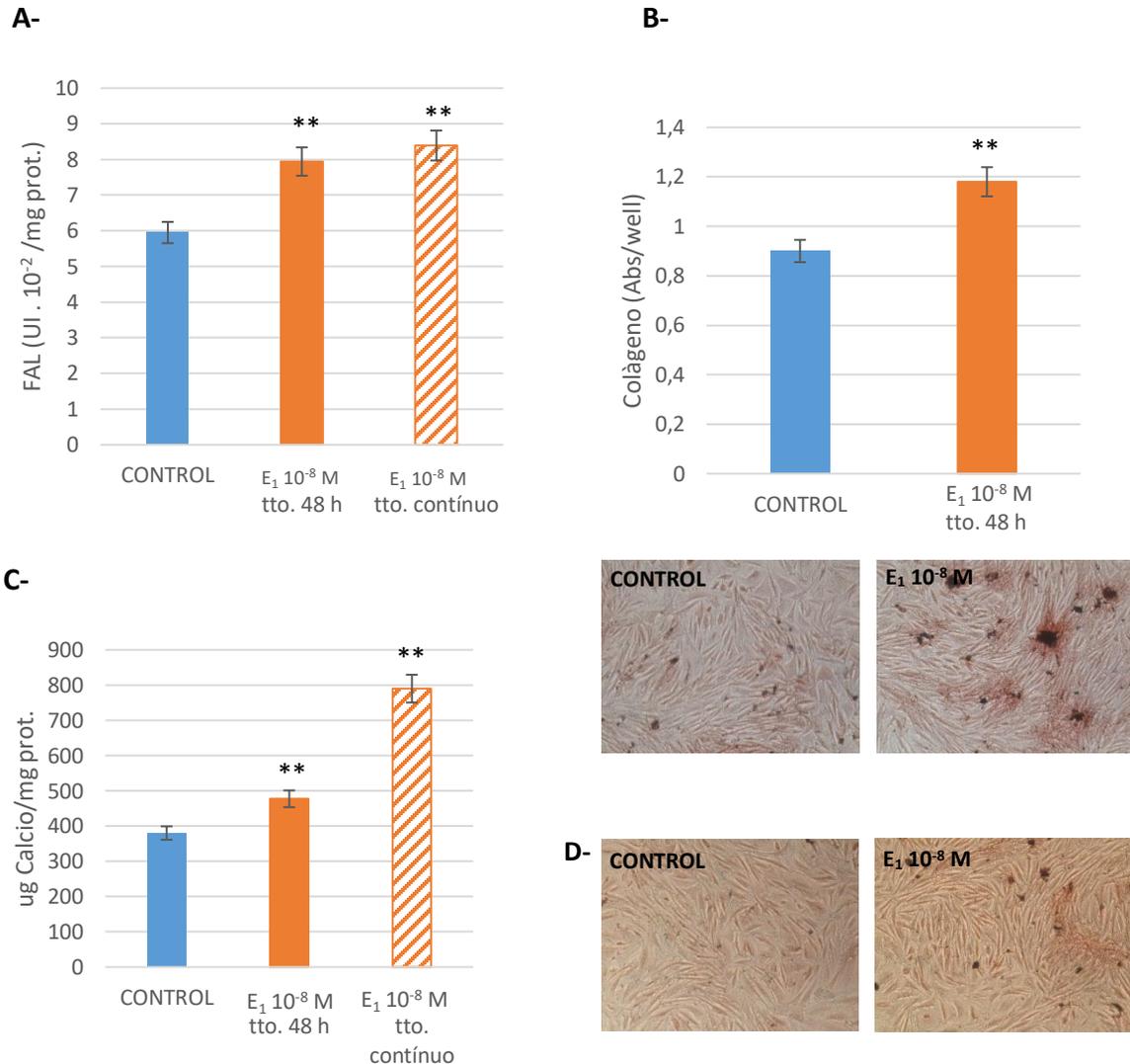
- RE citosólico/nuclear, utilizando el antagonista ICI182780;
- GPR30, utilizando el antagonista G15;
- vía de señalización NOS, utilizando el inhibidor NAME;

- vía de señalización MAPK, utilizando los inhibidores PD98059 y UO126;

y la conversión de la  $E_1$  a  $E_2$ , haciendo uso del compuesto equilin como inhibidor de la enzima 17 $\beta$ -HSD 1.

Empleamos las mismas estrategias de tratamiento hormonal presentadas en el Capítulo 1, es decir, las CMLV-OB fueron expuestas a la  $E_1$   $10^{-8}$  M en forma continua durante los 21 días de cultivo, o durante las últimas 48 horas.

La Figura 34 muestra el efecto del estrógeno sobre la actividad fosfatasa alcalina (A), el depósito de colágeno (B) y el depósito de calcio (C). En la Figura 34 A observamos que la hormona estimuló significativamente la actividad FAL de las CMLV-OB, tanto con el tratamiento hormonal de 48 horas (34% respecto al control), como con el tratamiento continuo (41% respecto al control). En las fotografías (Figura 34 B), los cultivos tratados con  $E_1$  durante 48 horas mostraron una mayor intensidad de coloración, propia del aumento en el depósito de colágeno. El gráfico de barras muestra la cuantificación del colorante; el estrógeno mostró aumentar el contenido de colágeno depositado en la matriz extracelular en un 31% respecto al control. En la Figura 34 C vemos que, para ambos tratamientos, la hormona estimuló significativamente el depósito del mineral en la matriz extracelular. Se observó un efecto considerablemente mayor cuando el tratamiento se realizó de forma continua durante los 21 días de cultivo (108% sobre el control), en comparación con un aumento del 26% en el depósito mineral al tratar los cultivos durante 48 horas con  $E_1$ .



**Figura 34: Efecto de la E<sub>1</sub> en la actividad FAL, depósito de colágeno y calcio en cultivos de CMLV-OB.**

CMLV-OB se cultivaron en DMEM-βGP durante 21 días, y se trataron con E<sub>1</sub> 10<sup>-8</sup> M durante las últimas 48 horas, o durante todo el tiempo de cultivo (tratamiento continuo). La actividad FAL se cuantificó en el lisado celular (A); el depósito de colágeno se determinó por resuspensión del colorante rojo sirio, donde las fotos (100X) muestran campos representativos de las condiciones experimentales (B); el contenido de calcio en la matriz se midió por extracción ácida (C), fotos de campos representativos de las condiciones experimentales (100X) de nódulos de calcio por tinción con rojo alizarina (D) como se describe en la Metodología. Los resultados corresponden al promedio ± desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4); \*\*p<0,01 respecto a cada control.

A continuación, realizamos un análisis comparativo de la acción de la E<sub>1</sub> sobre los marcadores óseos en CMLV-OB y OB nativos. Los valores observados en la Tabla 7 nos indican que el estrógeno estimuló significativamente la actividad FAL, el depósito de colágeno, como así también el contenido de calcio extracelular, en forma similar a lo observado en los OB. Del análisis de los datos se desprende que, si bien los valores absolutos difieren de un sistema celular a otro, las magnitudes de estímulo hormonal son equivalentes.

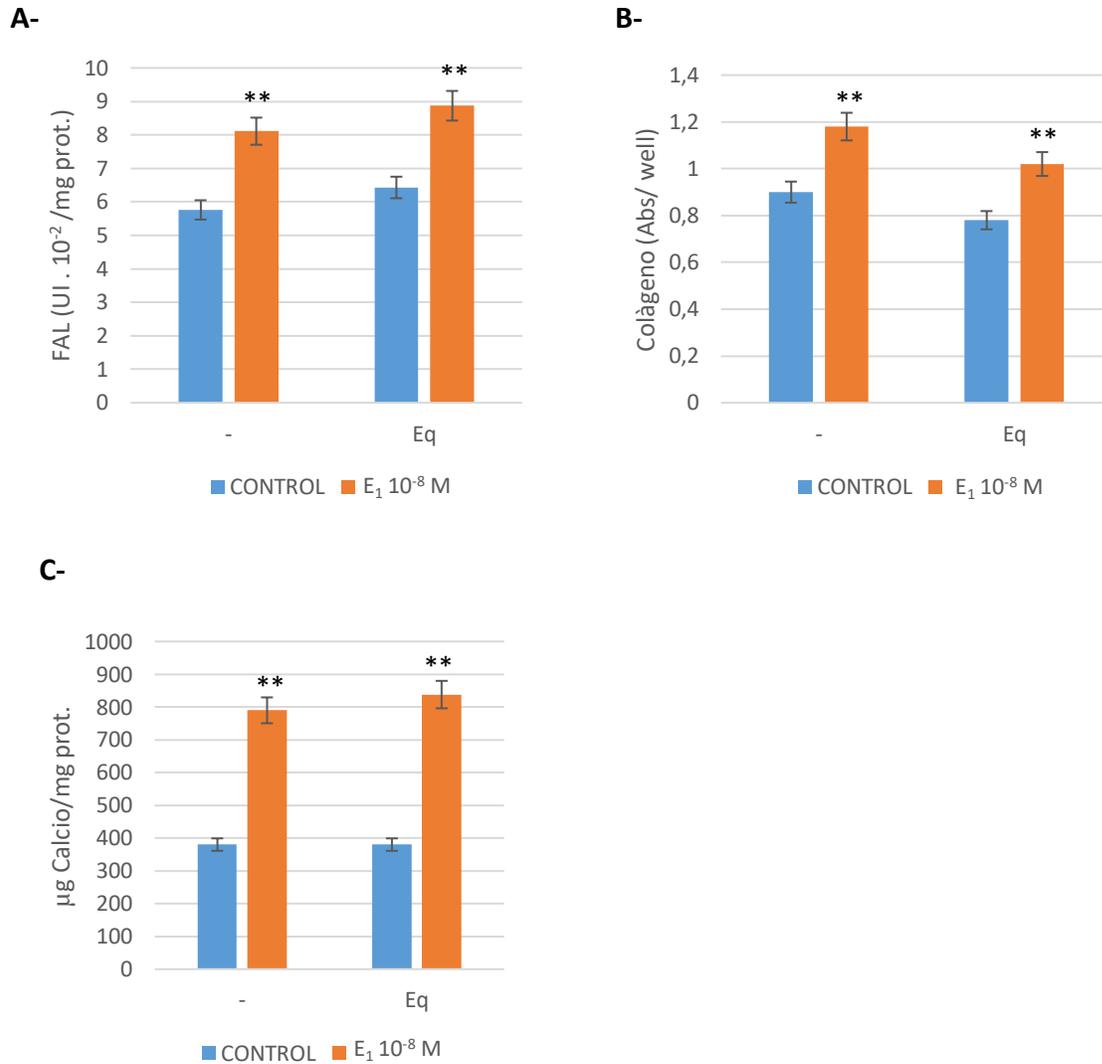
**Tabla 7: Comparación del efecto E<sub>1</sub> en cultivos de CMLV-OB y OB nativos.**

Cultivos confluentes de CMLV-OB de 21 días y OB de 15 días, fueron tratados con E<sub>1</sub> 10<sup>-8</sup> M durante 48 horas. Se cuantificó la actividad FAL en el lisado celular, el depósito de colágeno por resuspensión del colorante rojo sirio, y el contenido de calcio en la matriz por extracción ácida, como se describe en la Metodología. Los resultados corresponden al promedio ± desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4); \*\*p<0,02 \*p<0,05 respecto a cada control.

	Condición	CMLV-OB		OB	
Actividad FAL (U.I. 10 <sup>-2</sup> /mg prot)	CONTROL	5,95 ± 0,30	↑34% s/c	4.63 ± 0.25	↑29% s/c
	E <sub>1</sub> 10 <sup>-8</sup> M	7,94 ± 0,40 **		5.97 ± 0.29 **	
Colágeno (Abs/well)	CONTROL	0,9 ± 0,04	↑31% s/c	0.98 ± 0.05	↑20% s/c
	E <sub>1</sub> 10 <sup>-8</sup> M	1,18 ± 0,06 **		1.18 ± 0.06 *	
Calcio extracelular (µg / mg prot)	CONTROL	380,2 ± 18,9	↑26% s/c	519.1 ± 43.3	↑40% s/c
	E <sub>1</sub> 10 <sup>-8</sup> M	477,5 ± 23,7 **		723.8 ± 38.1 **	

Hasta aquí, nuestra evidencia muestra que la  $E_1$  favorece la transdiferenciación en términos de los parámetros estudiados. Procedimos a estudiar el mecanismo de acción hormonal sobre las CMLV-OB comenzando por determinar si los efectos son propios de la  $E_1$ .

En la Figura 35, observamos que el estímulo inducido por el estrógeno no se modificó al inhibir la enzima  $17\beta$ -HSD con el compuesto equilin; los aumentos en la actividad FAL, en el depósito de colágeno de la matriz, como así también en la mineralización, no se vieron modificados por el agregado de este inhibidor. Esto sugiere que el estímulo en la transdiferenciación de las células CMLV a CMLV-OB, es propio de la  $E_1$  y no por conversión al  $E_2$ .

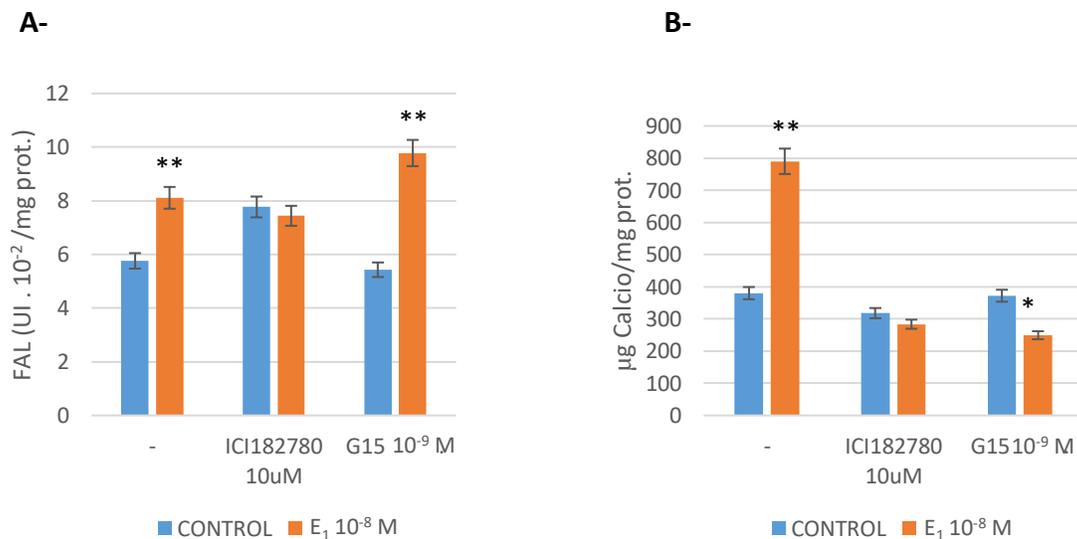


**Figura 35: Diferenciación a linaje óseo: especificidad de la acción de la E<sub>1</sub>.**

CMLV-OB de 21 días fueron cultivadas en DMEM-βGP, bajo tratamiento continuo con E<sub>1</sub>, en presencia o ausencia de equilin 10 µM, agregado una hora antes del tratamiento. La actividad FAL se cuantificó en el lisado celular (A); el depósito de colágeno se determinó por resuspensión del colorante rojo sirio (B); y el contenido de calcio en la matriz se midió por extracción ácida (C), como se describe en la Metodología. Los resultados corresponden al promedio ± desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4); \*\*p<0,01 respecto a cada control.

Evaluamos a continuación la participación del RE en la acción del estrógeno. Para ello, como mencionamos anteriormente, utilizamos los compuestos ICI182780 y G15. La Figura 36 A

muestra que la presencia del compuesto ICI182780 suprimió por completo el estímulo de la  $E_1$  sobre la actividad FAL. En cambio, en presencia del compuesto G15, no se modificó la acción hormonal. Estos datos sugieren la participación del RE citosólico/nuclear. En la Figura 36 B podemos observar que el aumento dado por la  $E_1$  sobre la mineralización extracelular, fue suprimido tanto por la presencia del antagonista ICI182780, como por la del compuesto G15. Estos resultados nos sugieren que la  $E_1$  estimula el depósito de calcio en la matriz extracelular mediante la participación de los RE citosólicos/nucleares y del GPR30.

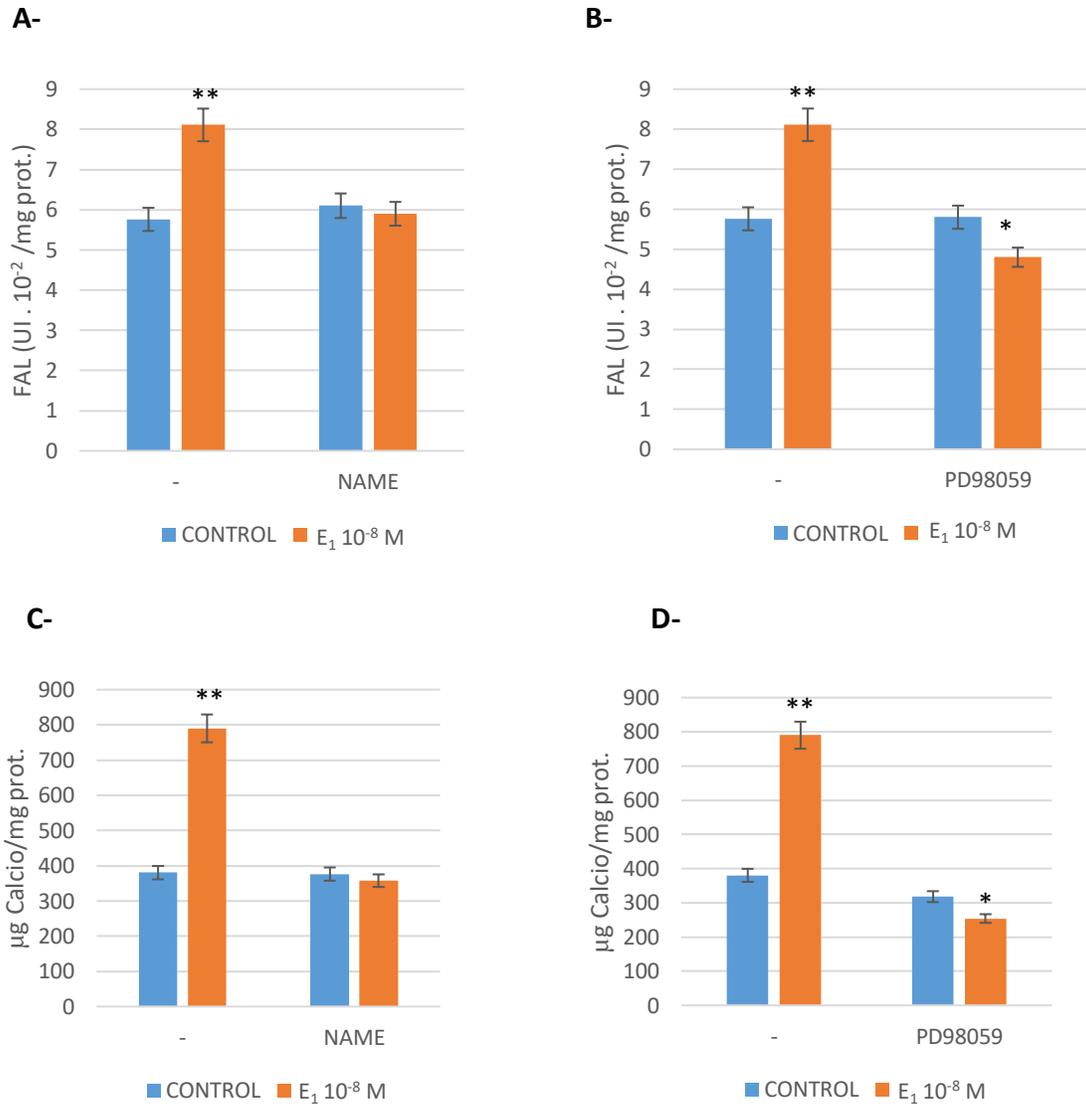


**Figura 36: Participación del RE en la actividad FAL y depósito mineral estimulados por  $E_1$ .**

CMLV-OB de 21 días fueron cultivadas en DMEM-βGP, bajo tratamiento continuo con  $E_1$ , en presencia o ausencia de ICI182780 10 µM y G15 10<sup>-9</sup> M, agregados una hora antes del tratamiento. La actividad FAL se cuantificó en el lisado celular (A); el depósito de calcio en la matriz se midió por extracción ácida (B), como se describe en la Metodología. Los resultados corresponden al promedio ± desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4); \*\*p<0,01 \*p<0,02 respecto a cada control.

Por último, evaluamos las vías de señalización NOS y MAPK. Los resultados de la Figura 37 A nos muestran que la presencia del compuesto NAME suprimió el efecto ejercido por la hormona en la actividad FAL, de la misma forma se observa en la Figura 37 C, donde el inhibidor de la NOS también suprimió la acción de la  $E_1$  en el depósito de calcio extracelular.

La presencia del compuesto PD98059 suprimió el efecto del estrógeno en la actividad FAL (Figura 37 B) y en el depósito mineral (Figura 37 D). Así mismo, se observa una disminución en los niveles basales del mismo parámetro, del 18% y 20% respectivamente. Estos resultados nos proponen que las vías mensajeras NOS y MAPK están implicadas en el mecanismo de acción que utiliza la E<sub>1</sub> para ejercer su efecto en la actividad enzimática y en el depósito de calcio extracelular.



**Figura 37: Estudio de las vías mensajeras NOS y MAPK en la actividad FAL y el depósito mineral estimulados por  $E_1$  en CMLV-OB.**

CMLV-OB de 21 días fueron cultivadas en DMEM- $\beta$ GP, bajo tratamiento continuo con  $E_1$ , en presencia o ausencia de NAME (A y C) o PD98059 (B y D) 10  $\mu$ M, agregados una hora antes del tratamiento. La actividad FAL se cuantificó en el lisado celular (A y B); el depósito de calcio en la matriz se midió por extracción ácida (C y D), como se describe en la Metodología. Los resultados corresponden al promedio  $\pm$  desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4); \*\* $p < 0,01$  \* $p < 0,02$  respecto a cada control.

**Resumen**

***Los resultados muestran que la E<sub>1</sub> promueve la transdiferenciación de las CMLV a linaje símil óseo. El efecto sobre la actividad FAL, el depósito de colágeno y la mineralización de la matriz extracelular, es equivalente a lo descrito en OB. El mecanismo de acción hormonal muestra que es un efecto propio de la E<sub>1</sub> y que comprende la participación de los receptores estrogénicos, y de las vías de señalización NOS y MAPK dependientes.***

## ***DISCUSIÓN***

## DISCUSIÓN

Como se describió en la introducción, luego de la menopausia se produce una notable reducción en la producción de estrógenos ováricos, por lo que los niveles circulantes de  $E_2$  disminuyen notablemente (**Purohit y Reed, 2002**), sin embargo, la concentración plasmática de  $E_1$  podría mantenerse (**Castracane y col., 2006**) debido a la conversión extragonadal de androstenediona (**Hemsell y col., 1974**). Aunque una gran cantidad de estudios han centrado sus investigaciones en la contribución del  $E_2$  en la salud ósea y vascular, poco se conoce sobre el papel de la  $E_1$ .

Hasta el momento se han descrito innumerables acciones beneficiosas del  $E_2$  en la formación y remodelación ósea; sin embargo, la falta de información respecto al potencial efecto de la  $E_1$  nos llevó a plantearnos cuál sería su rol a nivel óseo. Anteriormente, utilizando la línea celular murina MC3T3-E1, Park planteó la hipótesis de que dosis bajas de  $E_1$  podrían modular la proliferación y diferenciación de estas células osteoprecursoras, pero las pruebas carecieron de significación estadística (**Park, 2012**). Es por esto que estudiar el papel de la  $E_1$  sobre la osteoblastogénesis en cultivos primarios de OB y no en líneas celulares, podría resultar esencial para comprender sus acciones biológicas en el sistema óseo.

Es sabido que la osteoblastogénesis es el proceso a través del cual un progenitor mesenquimal se diferencia hacia un osteoblasto maduro, y para ello la célula mesenquimal debe migrar, proliferar, expresar factores transcripcionales que propicien la diferenciación hacia linaje óseo, y adquirir capacidad para sintetizar proteínas específicas de linaje óseo (**Caplan y Bruder, 2001**). De esta forma el OB ya maduro posee actividad FAL, y libera colágeno, osteopontina y osteocalcina hacia el espacio extracelular, para finalmente promover la mineralización de la matriz por depósito de cristales de hidroxapatita (**Jiang y col., 2002**). En este trabajo de tesis demostramos que la hormona  $E_1$  tiene la capacidad de modular los eventos propios de la osteoblastogénesis, en las diferentes etapas de este proceso.

Los efectos del  $E_2$  sobre la proliferación de OB han sido claramente descritos. Se reportó que el estrógeno induce un marcado efecto promitótico, tanto en sistemas *in vivo*, como *in*

*in vitro* en cultivos primarios o en líneas celulares. Particularmente Ernst y col., demostraron que los estrógenos metabólicamente activos tienen la capacidad de estimular directamente la proliferación de osteoblastos de cultivos primarios de OB de rata (**Ernst y col., 1988**). Los resultados presentados en esta tesis van en línea con esta observación. La E<sub>1</sub> estimula el crecimiento y la proliferación de los OB murinos.

Es conocido el rol del NO en la biología ósea, en la formación y remodelación del esqueleto. Estudios realizados con ratones knock-out de la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) han demostrado una reducción sustancial de la masa ósea y una inhibición de la función osteogénica (**Papachristou y col., 2009**). Nuestros resultados muestran que intervalos cortos de tiempo de tratamiento con E<sub>1</sub> estimulan la síntesis de NO, en OB en diferentes estadios de diferenciación. El perfil temporal indica que la producción basal de NO disminuye con el tiempo de tratamiento. Sabido es que la NOS es rápidamente inactivada por las fosfatasas citosólicas (**Förstermann y Sessa, 2012**). La disminución de la producción de NO podría estar relacionada con su rápida utilización intracelular y/o metabolización. Se ha informado que el NO juega un papel central en la regulación de la homeostasis esquelética. En las células del linaje osteoblástico, el NO se genera en respuesta a la estimulación mecánica o señales endocrinas (**McGarry y col., 2005**), y a través de la activación de GMPc dependiente de proteínas quinasas (PKG), el NO promueve la proliferación, diferenciación y supervivencia del linaje osteoblástico (**Kalyanaraman y col., 2018**). Se han identificado los tres tipos de NOS en hueso y en osteoblastos aislados (**Mancini y col., 2000**).

Como mencionamos anteriormente, la migración es un parámetro clave en la movilización de las células progenitoras a la hora de iniciar la remodelación ósea o de reparar una herida (**Garg y col., 2017**). El potencial migratorio de las células de linaje osteoblástico fue descrito por primera vez por Jones y Boyde, quienes realizaron ensayos de reparación de la herida en explantes de hueso de rata (**Jones y Boyde, 1996**). Evaluamos la acción de E<sub>1</sub> sobre la migración de OB *in vitro*. La E<sub>1</sub> fue capaz de estimular la migración de los preOB a tiempos cortos de tratamiento. Resultados similares fueron reportados por Zhang y col., quienes describieron un aumento en la migración celular dado por el 17-β-estradiol

mediado por quemoquinas (**Zhang y col., 2020**); por otro lado, Lim y col., demostraron un aumento en la movilidad de los progenitores de OB, inducido por el fitoestrógeno icariin (**Lim y col., 2018**).

El factor de transcripción temprano Runx2 es considerado el gen maestro de la diferenciación de los osteoblastos, por su interacción con muchas proteínas correguladoras, ya que activa genes que codifican para proteínas óseas como FAL y colágeno, que conducen al desarrollo del fenotipo de las células óseas (**Pratap y col., 2003**).

Hemos aportado pruebas de que la expresión del ARNm de Runx2 es un punto de acción de la E<sub>1</sub>. La acción estimuladora de la hormona fue muy marcada en los primeros días de cultivo. Los niveles de expresión de Runx2 disminuyen conforme avanza el proceso diferenciativo, lo que concuerda con los descrito en la literatura (**Gilbert y col., 2002**). Reportes de otros autores muestran que Runx2 es blanco de acción del E<sub>2</sub> (**McCarthy y col., 2003**), como así también de estrógenos de origen vegetal (**Zeng y col., 2018**).

La expresión de la proteína morfogénica ósea tipo 2 (BMP2) mostró niveles constantes de ARNm tanto en cultivos indiferenciados, como diferenciados, con o sin tratamiento hormonal. Se ha demostrado que el BMP2 tiene la capacidad de aumentar la proliferación y diferenciación de células mesenquimales y de osteoblastos *in vitro*, y mejorar la velocidad y la calidad de la formación de hueso nuevo *in vivo* (**Miron y col., 2013**).

Luego de que las células osteoprogenitoras se movilizan y proliferan, éstas experimentan cambios moleculares y morfológicos que conducen a un fenotipo de OB maduro bien diferenciado de sus progenitores (**Caplan y col., 2001; Jiang y col., 2002**). Procedimos a analizar parámetros característicos de la diferenciación osteoblástica, para lo cual seleccionamos la actividad enzimática FAL, la producción de proteínas de la matriz extracelular y el depósito de minerales. Estos parámetros fueron aumentando paulatinamente a partir de los 10 días de cultivo, siendo máximos entre los 15 y 21 días. Esto nos permitió identificar en nuestro sistema experimental una fase diferenciativa (10-15 días) y una fase de mineralización (15-21 días).

Como mencionamos en la introducción, la fosfatasa alcalina es una enzima clave, enzima que hidroliza pirofosfato para proveer fosfato inorgánico para la síntesis de hidroxapatita

a partir del calcio circulante. Este componente mineral de la matriz ósea, a través de su unión a colágeno y osteocalcina, le confiere al hueso la rigidez necesaria para la función mecánica. A su vez, la hidroxiapatita desde el punto de vista metabólico, constituye una reserva de calcio y fósforo disponible para contrarrestar las fluctuaciones de calcemia y fosfatemia debido a desequilibrios del metabolismo fosfocálcico. Vastos estudios previos demostraron ampliamente que los estrógenos aumentan la expresión de parámetros característicos de OB maduros, como por ejemplo el aumento en la actividad FAL en cultivos de células de ratón, rata y humanas **(Qu y col., 1998; Rucinski y col., 2006; Chen y col., 2012)**. Nosotros demostramos que, a partir de los 8 días de cultivo, los OB incrementan la expresión de FAL en respuesta a  $E_1$ , efecto comparable al observado bajo el tratamiento *in vitro* con  $E_2$ .

Avanzando en el estudio de la diferenciación de preOB a OB maduros, observamos un incremento en el depósito de colágeno en la matriz celular luego del tratamiento con la hormona. El colágeno tipo I constituye el 90% de la matriz orgánica y representa un componente vital para proveer la rigidez, estructura y estabilidad óptima para la función ósea. En concordancia con otros autores, empleando cultivos celulares primarios de calvaria de rata, aportamos evidencia similar a lo reportado en la línea celular MC3T3-E1, donde el  $E_2$  estimula la expresión del gen de colágeno tipo I **(Ernst y col., 1988)**, y la síntesis de proteínas **(Shang y col., 2014)**.

El progreso de nuestras investigaciones mostró que el efecto de la  $E_1$  sobre la formación de la matriz orgánica se ve acompañado por una intensa mineralización. La hormona estimuló el depósito extracelular de calcio a todos los tiempos de cultivo, siendo este efecto más importante luego de 12 días de cultivo. Este aumento se determinó no sólo por la cuantificación del contenido mineral en la matriz extracelular y en el medio de cultivo, sino también por la visualización de nódulos de calcio empleando microscopía y tinción específica. Esta acción estimuladora de la  $E_1$  fue equivalente en magnitud a la ejercida por el  $E_2$ , o por el SERM Ral, no existiendo acciones aditivas. Si bien estos datos requieren profundización, *a priori* nos sugerirían que la  $E_1$  exhibe una máxima capacidad mineralizadora estrogénica.

Habiendo estudiado la acción celular de la  $E_1$  sobre los diferentes estadios de la osteoblastogénesis, decidimos investigar el mecanismo molecular a través del cual el esteroide ejerce su acción. Para investigar la participación del RE, decidimos utilizar dos estrategias: 1) evaluar la acción de la  $E_1$  sobre la expresión del receptor, 2) estudiar los efectos hormonales en presencia de antagonistas específicos. En nuestro sistema experimental observamos que los niveles de expresión de ARNm del RE  $\alpha$  concuerdan con la literatura. La expresión del RE $\alpha$  aumentó durante la diferenciación osteoblástica, disminuyendo en la etapa de mineralización; en cambio, la expresión de RE $\beta$  fue constante durante todo el proceso madurativo.

Se ha reportado que los estrógenos poseen la capacidad de regular la expresión de los RE (**Wiren y col., 2002**). No nos fue posible determinar si la estrona regula la expresión del ARNm del RE $\alpha$ , pero su posible modulación no puede ser descartada. Los resultados no fueron consistentes, y no permitieron extraer conclusiones claras. Estos estudios deberán profundizarse con el análisis de la expresión proteica de los receptores, e incluir otros tiempos de cultivo que nos permitan establecer un orden secuencial en la expresión de marcadores tempranos de diferenciación regulados por  $E_1$ .

Se desconoce si la  $E_1$  posee un receptor específico. La evidencia en la literatura informa de que esta hormona presenta una afinidad de unión significativa al RE $\alpha$  (**Kuiper y col., 1997; Gruber y col., 2002**). Además, Sasson y Notides demostraron que, en el RE uterino de ternera, la  $E_1$  ocupa el mismo sitio de unión que el  $E_2$  (**Sasson y Notides, 1983**).

Dado que no nos fue posible determinar el rol de la  $E_1$  sobre la expresión de RE, decidimos emplear la estrategia 2, seleccionando los compuestos ICI182780 y G15. La evidencia obtenida mostró que los RE citosólicos/nucleares participan en la acción estimuladora de la hormona sobre la proliferación celular y la síntesis de NO, ya que éstos suprimieron completamente el estímulo hormonal. Cabe destacar que, en nuestro sistema experimental, la estimulación del crecimiento celular inducido por la  $E_1$  se evidenció en un tiempo de cultivo donde los OB comienzan a diferenciarse, probablemente debido a un cambio en la expresión de RE en estas células más maduras. El comienzo de una etapa de

maduración celular implica una disminución del crecimiento celular a medida que aumenta la expresión de marcadores diferenciativos **(Stein y col., 2004)**.

Por otro lado, se obtuvo evidencia que la acción estimuladora de la  $E_1$  sobre la actividad FAL y la mineralización requiere de la participación del RE nucleares/citosólicos y de membrana, ya que sólo cuando se adicionaron simultáneamente ICI182780 y G15 se observó una supresión total de la acción bioquímica de la hormona.

Es sabido que en la diferenciación osteoblástica, las vías de señalización BMP y la vía canónica Wnt son los principales transductores intracelulares de la osteoblastogénesis **(Lin y Hankenson, 2011)**. No obstante ello, múltiples actividades celulares en el OB están reguladas por las quinasas MAP, incluyendo las vías ERK, p38 y JNK. Incluso, la acción osteogénica de los fitoestrógenos genisteína o icariina están mediadas por la cascada de ER y MAPK **(Liao y col., 2014; Wu y col., 2015)**. De hecho, la fosforilación de ERK se ha visto implicada en el mecanismo de acción mostrado por el  $E_2$ , que promueve la diferenciación de preosteoblastos a osteoblastos **(Kousteni y col., 2001)**.

Se ha propuesto que la señalización obtenida para la diferenciación de OB mediada por el estradiol implica, en parte, la activación de NOS **(O'Shaughnessy y col., 2000)**. El NO es un mensajero que interviene en muchas vías de transducción, como las vías cGMP-PKG o las cascadas MAPK **(Yan y col., 2011)**. Teniendo en cuenta esto, y en base a nuestros antecedentes previos en sistema vascular que muestran que el mecanismo de acción de la  $E_1$  involucra la participación del RE, la vía NOS y la vía MAPK, estudiamos la contribución de estas vías de señalización en la acción diferenciativa ósea del estrógeno. Del análisis de los resultados obtenidos con los compuestos NAME, PD98059 y UO126, se evidencia que ambas vías de señalización intracelular (NOS y MAPK) median la acción de la  $E_1$  sobre la estimulación de la proliferación, de la actividad FAL, y de la mineralización extracelular. En concordancia con nuestros datos, Sun y col. demostraron la participación de las vías RE/NOs/MAPK/Runx2 en la diferenciación de células de línea de OB de rata (MC3T3- $E_1$ ) tratadas con  $E_2$  **(Sun y col. 2018)**. Por consiguiente, si bien nuestros resultados requieren profundización mecanística, sugerirían que la  $E_1$  podría promover la diferenciación de OB en forma equivalente al  $E_2$  a través de los RE, y con la participación de las vías NOS y MAPK.

Se sabe que la  $E_1$  se convierte en  $E_2$  a través de la actividad catalítica de la  $17\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa, una familia de proteínas compuesta por trece miembros. La conversión unidireccional de  $E_1$  a  $E_2$  es catalizada por los tipos 1, 7 y 12. En las células osteoblásticas maduras de rata, se ha informado de la presencia de la  $17\beta$ -HSD 1 (**Eyre y Col., 1998**). La  $17\beta$ -HSD 1 es bloqueada por el compuesto equilin al unirse a su subunidad catalítica (**Sawicki y col., 1999**).

Un importante hallazgo dilucidado en este trabajo de tesis es el hecho que el  $E_1$  actúa por sí misma y no a través de su conversión en el estrógeno más potente,  $E_2$ . El efecto osteoblastogénico de  $E_1$  no es atribuido al  $E_2$ , dado que la presencia de equilin no alteró la acción hormonal, tanto en la proliferación celular, actividad FAL, como así tampoco al depósito mineral en la matriz extracelular.

En general, nuestros resultados proporcionan pruebas que  $E_1$  ejerce tanto acciones no genómicas (producción de óxido nítrico) como genómicas (proliferación y diferenciación de OB).

Teniendo en cuenta que el mantenimiento de una masa ósea sana depende del equilibrio entre la formación y la resorción ósea, en la actualidad es difícil establecer un paralelismo entre nuestros resultados y la situación *in vivo*, ya que inicialmente nos centramos en entender el efecto de  $E_1$  sobre las células que dirigen la formación ósea. Se llevarán a cabo futuras investigaciones en cultivos celulares y en modelos animales para comprender mejor la importancia fisiológica de la acción ósea de  $E_1$ .

### **Resumen**

***Aportamos evidencias de una nueva acción de la estrona. Hasta donde sabemos, estos hallazgos representan el primer reporte de una acción directa de la  $E_1$  en la regulación osteoblástica.***

***En células óseas, el estrógeno promueve la osteoblastogénesis mediante la estimulación de la proliferación, la maduración y mineralización de la matriz extracelular. Los tratamientos *in vitro* con concentraciones fisiológicas de  $E_1$  aumentan la actividad FAL y el depósito de calcio y colágeno extracelular.***

*El mecanismo molecular mostrado por E<sub>1</sub> implica expresión del gen Runx2 y la participación de las vías de los RE citosólicos/nucleares y GPR30, y de las vías de transducción NOS y MAPK. Un importante hallazgo dilucidado en este estudio es el hecho que la E<sub>1</sub> actúa por sí mismo y no a través de su conversión en el estrógeno más potente, el E<sub>2</sub>.*

Como mencionamos en la introducción, la osteoporosis posmenopáusica es una enfermedad ósea metabólica caracterizada por una disminución de la masa ósea después de la menopausia, que puede conducir a fracturas espontáneas y traumáticas en mujeres aún activas. De hecho, la masa ósea es el punto final del dinámico y complejo proceso llamado remodelación, caracterizado por un equilibrio entre la resorción ósea a cargo de los osteoclastos y la formación ósea dirigida por los osteoblastos.

Muchas hormonas influyen en la diferenciación, reclutamiento y la actividad de los osteoclastos y osteoblastos, entre las que se encuentran los estrógenos, que ya conocemos, juegan un papel central en el control de ambos tipos de células. Varios estudios han demostrado que la terapia de reemplazo de estrógenos contribuye al mantenimiento de la masa esquelética y puede reducir el riesgo de fracturas en mujeres posmenopáusicas y animales ovariectomizados (**Taranta y col., 2002**). Ya mencionamos también que la protección ósea de este estrógeno al utilizarse como terapia hormonal de reemplazo, a largo plazo se ha asociado con un mayor riesgo de cáncer en los tejidos estrógeno dependientes, incluidos la glándula mamaria y útero (**Vidal y col., 1999**). En contrapartida, los SERMs demostraron poseer actividad selectiva agonista o antagonista, dependiendo del tejido blanco, reduciendo los riesgos asociados a exposiciones prolongadas a estrógenos.

Dado que no hemos dilucidado completamente la interacción entre la E<sub>1</sub> y los RE, como análisis complementario decidimos hacer un estudio comparativo de sus efectos óseos con los del SERM raloxifeno. Este fármaco es un benzotiofeno sintético que selectivamente activa respuestas biológicas en el tejido óseo, sin incrementar el riesgo de cáncer (**Nilsson y col., 2011**) en glándula mamaria o útero. Estudios preclínicos y clínicos han demostrado que el Ral previene la pérdida ósea y reduce el riesgo de fractura (**Cranney y Adachi, 2005**).

Desde el punto de vista bioquímico celular, trabajos previos reportaron que tratamientos *in vitro* con el SERM promueven **(Lu y col., 2011)** la diferenciación osteoblástica en las células madre derivadas del tejido adiposo a través de la vía del óxido nítrico. En nuestro sistema experimental, el Ral, en dosis equivalentes a las de E<sub>2</sub> y E<sub>1</sub>, estimuló la proliferación de OB en forma dependiente de NO.

Es de interés destacar que se propone que *in vivo* el SERM tendría un rol no sólo como un fármaco antirresortivo, sino también como estimulador de células osteogénicas **(Liu, 2020)**. En cultivos primarios de OB de ratón también se ha demostrado que Ral estimula la transcripción de genes relevantes para el fenotipo de osteoblastos (Cbfa1 y colágeno I) **(Qu y col., 1999)**. Noda-Seino y col. describieron que tanto el E<sub>2</sub> como el Ral inducen la proliferación de OB a través del receptor acoplado a proteína G, GPR30, y de la vía de la MAPK **(Noda-Senio y col., 2013)**. En nuestros ensayos, el SERM mostró un efecto positivo en la formación ósea comparable con los resultados observados con los tratamientos con los estrógenos E<sub>1</sub> y E<sub>2</sub>.

Obtuvimos evidencia que el Ral promueve la osteoblastogénesis a través de la estimulación de la actividad FAL, el aumento en la síntesis de colágeno y la mineralización. Posritong y col. observaron que los OB cultivados en presencia de E<sub>2</sub> o Ral mostraron un aumento robusto en la actividad FAL y mineralización **(Posritong y col., 2018)**.

Al estudiar el mecanismo de acción del SERM, encontramos que en su efecto sobre la matriz extracelular (depósito de colágeno y mineralización), el Ral actúa a través del RE y de las vías mensajeras NOS y MAPK. En cambio, la estimulación de la actividad FAL no depende de estas cascadas de señalización.

Como se mencionó en la introducción, los SERMs imparten sus efectos no sólo a través de su afinidad por los RE **(Allen y col., 2016)**, sino también por un efecto físico directo sobre la matriz ósea relacionado con la presencia de los grupos hidroxilo en la molécula. Esto puede explicar por qué el E<sub>2</sub> también mejora significativamente la dureza del material óseo, lo que sugiere que estos efectos observados no son específicos del Ral o de los SERMs como familia, sino que son más generalizables a compuestos con estructuras similares como la E<sub>1</sub> **(Burr y Phipps, 2022)**. Esto podría verse como un nuevo concepto que ciertamente abre

nuevas preguntas y perspectivas sobre el papel de la  $E_1$  y del SERM en el tratamiento de los síndromes osteopélicos relacionados con menopausia (Berman y col., 2022).

### Resumen

*Al comparar la acción del SERM en dosis semejantes a las de  $E_1$  o  $E_2$  sobre cultivos primarios de OB, se demostró que el Ral promueve la osteoblastogénesis mediante la estimulación de la proliferación de OB, la diferenciación, maduración y mineralización de la matriz extracelular. Las vías de señalización utilizadas por el SERM no fueron exactamente las mismas que las halladas para la  $E_1$ . El Ral promueve la mineralización en proporciones semejantes a  $E_1$  y  $E_2$  por una vía que implica a los RE  $\alpha$  y  $\beta$ , a la vía NOS y MAPK. A su vez, el estímulo en la actividad FAL de los cultivos de OB mostró no darse vía NOS ni MAPK, aunque sí vía el RE.*

Como mencionamos en la introducción, el proceso de calcificación vascular involucra la conversión de las CMLV en células similares a los osteoblastos, para que posteriormente comience la calcificación de la túnica afectada. En este trabajo de tesis nos concentramos en los eventos que participan en la calcificación vascular del tipo aterosclerótico, es decir, la que se localiza en la túnica íntima. Previamente, en nuestro laboratorio se aportaron evidencias de una acción dual de la  $E_1$  en el tejido vascular: por un lado la hormona exhibe una notable acción biológica beneficiosa sobre las células endoteliales, modulando los eventos de producción de vasoactivos, proliferación, apoptosis y adhesión celular; y por otro lado, una acción más bien perjudicial al estimular la proliferación y migración de CMLV, eventos que podrían promover la formación de la neoíntima y la estenosis del vaso (Rauschemberger y col., 2008 y 2011). Partiendo de esta evidencia, y habiéndonos encontrado con un efecto novedoso de la  $E_1$  sobre el tejido óseo, en este trabajo de tesis avanzamos estudiando el rol de la hormona sobre los eventos que conducen a la calcificación vascular.

En condiciones saludables el endotelio se encuentra en un estado no activado. La respuesta inicial al daño vascular es la estimulación del endotelio que conduce al reclutamiento y

activación de monocitos. A medida que progresa la lesión vascular las células que interactúan con el endotelio y el mismo endotelio activado por injuria liberan moléculas bioactivas, citoquinas (IL-1, IL-4, TNF- $\alpha$ ) y factores de crecimiento (FGF, factor de crecimiento derivados de plaquetas/PGEF, factor de crecimiento tumoral- $\beta$ /TGF- $\beta$ ), que median la respuesta inflamatoria en la pared vascular. La respuesta inflamatoria localizada estimula la invasión de la túnica íntima por CMLV que migran desde la túnica media y proliferan. El efecto ateroprotector directo de los estrógenos en las células vasculares ha atraído mucha atención. Reportes en la literatura proponen un perfil inhibitorio del crecimiento celular de CMLV posterior al tratamiento con E<sub>2</sub>, relacionado con alteraciones fenotípicas de las células o con un aumento en el recambio celular **(Song y col., 1998; Vazquez-Padron y col., 2004)**.

Durante años se ha sugerido que la terapia de reemplazo hormonal es necesaria para prevenir la osteoporosis y las enfermedades cardiovasculares, así como para mejorar el sistema vasomotor y tratamiento de la distrofia urogenital. El sulfato de estrona (E<sub>1</sub>-S) y el E<sub>3</sub> han sido considerados en este aspecto. Estudios realizados en cultivos de CMLV humanos mostraron que el E<sub>3</sub> podría tener efectos ateroprotectores al modificar la expresión de moléculas reguladoras del crecimiento (cadena PDGF-A, IL-1, IL-6 y TGF- $\beta$ ) en las células vasculares, al igual que E<sub>1</sub>-S y E<sub>2</sub>. A su vez, estos ensayos indicaron que los estrógenos, incluido el E<sub>3</sub> y el E<sub>1</sub>-S, modulan la expresión de moléculas reguladoras del crecimiento en CMLV, inhibiendo así el inicio temprano y la progresión de la aterosclerosis **(Kikuchi y col., 2000)**. Estos hallazgos de fines de la década de los 90 constituyen los únicos reportes de la literatura sobre las posibles acciones vasculares de la estrona y que no siguieron siendo investigadas. Es por ello que nuestro laboratorio se interesó en los mismos y desarrolló una línea de investigación específica sobre las acciones biológicas de este estrógeno olvidado. Sabiendo que, en pacientes con aterosclerosis, los focos ateroscleróticos son inducidos por la multiplicación de células musculares regulada por factores parácrinos y autócrinos, evaluamos en nuestro sistema experimental el efecto de la E<sub>1</sub> en la proliferación. En cultivos primarios de CMLV nativas de rata, la hormona estimuló el crecimiento celular, tanto al realizar tratamientos durante 48 horas como continuos durante los 21 días de cultivo.

Durante mucho tiempo se consideró a la calcificación vascular como un evento pasivo; sin embargo, hoy se sabe que es un proceso activo, regulado bioquímicamente, en el que intervienen distintos eventos celulares y moleculares (**Serrano y col., 2011**). Se sabe que las CMLV tienen un rol crucial al ser las partícipes del proceso de transdiferenciación, simulando el proceso de osteoblastogénesis dentro de la pared vascular (**Pal y col., 2011**). Este proceso es el resultado de la inducción de diferenciación osteogénica de subpoblaciones de células vasculares que generan una arquitectura casi indiferenciable de la estructura histológica trabecular. Pugliese y Col. describieron zonas de formación ósea con una alta tasa de actividad FAL y capacidad de calcificar la matriz extracelular en muestras de placas de ateroma presentes en carótidas de pacientes (**Pugliese y col., 2015**). En esta sección de nuestro trabajo de tesis empleamos un sistema de calcificación *in vitro* validado previamente en nuestro laboratorio. Se indujo a transdiferenciar a linaje óseo cultivos primarios de CMLV mediante incubación prolongada en medio procalcificante (CMLV-OB). Observamos en estos cultivos la expresión de niveles elevados del marcador temprano de diferenciación osteoblástica Runx2, como así también de la fosfatasa alcalina TNAP. En condiciones fisiológicas la CMLV no expresa TNAP, su aparición indica transdiferenciación osteogénica irreversible de las CMLV (**Chistiakov y col., 2015**). En concordancia con lo descrito en la literatura, en este trabajo de tesis demostramos que las CMLV-OB presentaron niveles basales de actividad FAL, y depósitos de calcio y colágeno en matriz comparables con los obtenidos en cultivos de OB de la misma edad (Tabla 6). Como mencionamos en la introducción, existen factores que inhiben la calcificación vascular, entre los que encontramos a los compuestos vasoactivos. Es ampliamente conocido que el óxido nítrico tiene rol crucial en la homeostasis vascular; la biodisponibilidad de este vasoactivo es imprescindible para el mantenimiento de las propiedades antiaterogénicas y antitrombóticas del lecho vascular (**Tousoulis y col., 2012**). A la hora de evaluar este parámetro, de la misma forma que observamos en sistema óseo (cultivos de OB), tanto los cultivos de CMLV nativas como las transdiferenciadas mostraron la capacidad de sintetizar NO.

Luego de haber demostrado las acciones óseas de la  $E_1$  estimulando la osteoblastogénesis, decidimos contrastar la hipótesis que a nivel vascular esta hormona exhibe acciones equivalentes a las óseas, resultando en la inducción de la calcificación vascular. Al igual que en los cultivos de OB, el tratamiento in vitro de CMLV-OB durante las últimas 48 horas con  $E_1$  mostró un aumento importante de células viables, efecto dependiente del RE. Cabe destacar que no nos fue posible demostrar acción proliferativa de  $E_1$  con tratamientos continuos. Estudios realizados en explantes de arterias carótidas de ratas ovariectomizadas comparando distintos tiempos de tratamiento con  $E_2$  posteriores a una injuria vascular, demostraron que los resultados obtenidos tras tratamientos con la hormona durante 3 días fueron semejantes a los de tratamientos continuos durante más de 17 días. Tatsuhiko Mori y col. sugieren que la inhibición inducida por estrógenos de la respuesta a la lesión vascular está mediada por eventos moleculares que ocurren temprano (primeras 72 horas) después de la lesión, y que el efecto vasoprotector del  $E_2$  en este entorno no depende del pretratamiento prolongado del vaso lesionado o continuación del tratamiento durante el período de formación de la neoíntima (**Mori y col., 2000**).

Teniendo en cuenta que el NO es un importante inhibidor de la calcificación vascular, evaluamos este parámetro de manera comparativa en cultivos de CMLV y CMLV-OB. Como era esperado en base a resultados previos del grupo y a bibliografía, las CMLV mostraron niveles altos de NO, y un aumento en este parámetro luego del tratamiento hormonal.

Kanno y col. propusieron que en cultivos de CMLV de rata, el NO puede desempeñar un papel beneficioso en la aterogénesis, en parte al limitar la calcificación vascular mediante la señalización de TGF- $\beta$  a través de una vía dependiente de GMPc (**Kanno y col., 2008**). Sin embargo, a pesar de considerar a priori a los cultivos de CMLV-OB como incapaces de producir el vasoactivo debido a su condición de calcificación, estas células mostraron producir niveles importantes de NO, aunque menores que los de las células nativas. El tratamiento con la hormona llegó incluso a duplicar dichos valores.

El aumento en la producción del vasoactivo NO, mostró estar mediado por la participación del RE en CMLV, distinto de lo observado en CMLV-OB, donde la ruta de síntesis del NO, no involucra al RE.

La calcificación vascular inducida por un medio procalcificante apropiado, se caracteriza por un depósito pasivo de fosfato de calcio y una transformación activa de las células del músculo liso vascular en células de tipo osteoblástico. Ésta a su vez, está acompañada de la reducción del contenido de proteína  $\alpha$ -actina y del aumento de la expresión de ARNm de FAL y Cbfa1 / Runx2 **(Ciceri y col., 2012)**. Nosotros observamos que la E<sub>1</sub> promovió la mineralización en este modelo de células transdiferenciadas a linaje óseo, aumentando la actividad FAL y el depósito de colágeno en la matriz, al igual que sucedió con OB nativos. Dado que E<sub>2</sub> y E<sub>1</sub> actúan a través del receptor de estrógenos, quizá estos efectos puedan estar relacionados con eventos moleculares provocados corriente abajo de la activación del RE. De hecho, publicaciones previas del grupo de investigación demostraron que el E<sub>2</sub> y la E<sub>1</sub> modulan la función vascular por mecanismos diferentes **(Massheimer y col., 2003)**.

Si bien la calcificación vascular es considerada un evento desfavorable en la historia natural de la aterosclerosis, la evidencia creciente sugiere que existe una relación dual entre inflamación y calcificación **(Pugliese y col., 2015)**. De hecho, el depósito inicial de calcio en respuesta a estímulos proinflamatorios da como resultado la formación de calcificación irregular (microcalcificación), que induce una mayor inflamación. Este círculo vicioso favorece la rotura de la placa, a menos que prevalezca una respuesta adaptativa, con atenuación de la inflamación y supervivencia del tejido vascular liso. Las CMLV promueven la fibrosis y también se someten a transdiferenciación osteogénica, con formación de calcificación homogénea (macrocalcificación), que estabiliza la placa al actuar como barrera contra la inflamación. La hormona E<sub>1</sub> mostró incrementar los parámetros de diferenciación celular en las CMLV transdiferenciadas, utilizando los RE y las vías de señalización NOS y MAPK, siendo éste un efecto propio de E<sub>1</sub>, y no por su conversión a E<sub>2</sub>.

Más allá que, desde una perspectiva clínica, muchos estudios sugieren que la calcificación vascular es un evento negativo en el contexto de la aterosclerosis, podríamos ver el problema de la calcificación aterosclerótica con nuevos ojos, de forma que podamos interpretar los datos mecanísticos existentes desde un punto de vista diferente, basado en los datos morfológicos y clínicos disponibles. Cada vez hay más pruebas que indican que no todos los tipos de placas de calcificación son iguales en términos de vulnerabilidad de la

placa y de resultados clínicos relacionados, y a su vez esto podría implicar diferentes destinos de ésta (**Hutcheson y col., 2014**). Como consecuencia, uno de los posibles escenarios es que la calcificación aterosclerótica sea un "costo a pagar" para evitar los resultados más desfavorables, es decir, tolerar una reducción de la distensibilidad arterial y la perfusión del tejido distal, a cambio de una reducción de la vulnerabilidad de la placa. Sin embargo, los mecanismos moleculares que regulan las relaciones mutuas entre la inflamación vascular y la osteogénesis están entrelazados en una trama compleja.

En particular, antes de buscar estrategias encaminadas a prevenir el depósito de calcio en placas ateroscleróticas, es necesario comprender mejor los mecanismos que regulan la transición desde inflamación vascular a fibrogénesis y osteogénesis.

### **Resumen**

***Este conjunto de resultados aporta evidencia de que la  $E_1$  favorecería los procesos que conducen al progreso de la lesión vascular ateromatosa y la calcificación vascular. Específicamente los hallazgos presentados muestran que la hormona induce un aumento en el número de células musculares y de la transdiferenciación osteogénica de células vasculares, que podría favorecer el progreso de la enfermedad aterosclerótica.***

***El mecanismo molecular mostrado por la  $E_1$  involucra la participación del RE y de las vías de transducción NOS y MAPK. Es importante destacar el hecho que la  $E_1$  muestra ejercer un efecto en CMLV-OB similar al observado en OB nativas, actuando por sí misma y no a través de su conversión en  $E_2$ .***

***Si bien los efectos dados por la hormona en estos sistemas experimentales parecerían ser perjudiciales para la salud vascular, estos podrían ser considerados parte de una respuesta adaptativa dirigida a la reparación de tejidos y estabilización de la placa.***

## ***CONCLUSIONES***

Las investigaciones de este trabajo de tesis revelaron acciones biológicas del estrógeno E<sub>1</sub> a nivel vascular y óseo no descritas hasta el momento, en un entorno procalcificante, permitiendo establecer similitudes en los mecanismos de acción. Los resultados reportados corresponden a ensayos *in vitro* empleando sistemas celulares aislados; es por ello que estos datos no nos permiten aseverar la relevancia de estos hallazgos. Los datos obtenidos aportan conocimiento básico, con potencial aplicabilidad clínica, a favor de diseñar estrategias terapéuticas dirigidas a la prevención de enfermedades de alta prevalencia como osteoporosis y aterosclerosis, como así también a favor de promover nuevas terapias hormonales de reemplazo. A su vez, es de gran interés pensar en la posibilidad de prevenir el inicio del depósito de calcio dentro de la pared del vaso o, en el caso de etapas más avanzadas, intervenir en la promoción de un proceso controlado de reparación de tejidos, incluso con la desventaja del aumento del depósito de calcio, con el fin de limitar los efectos adversos de calcificación aterosclerótica establecida.

Los aportes más destacados de este trabajo de tesis doctoral proveen evidencia de que la hormona E<sub>1</sub> exhibe una acción similar en los tejidos evaluados. Tanto a nivel óseo como vascular promueve los procesos celulares que conducen a un mismo fin: generación, diferenciación y mineralización osteoblástica, como así también de células musculares lisas vasculares, tendiente a la formación ósea y a la calcificación vascular, respectivamente.

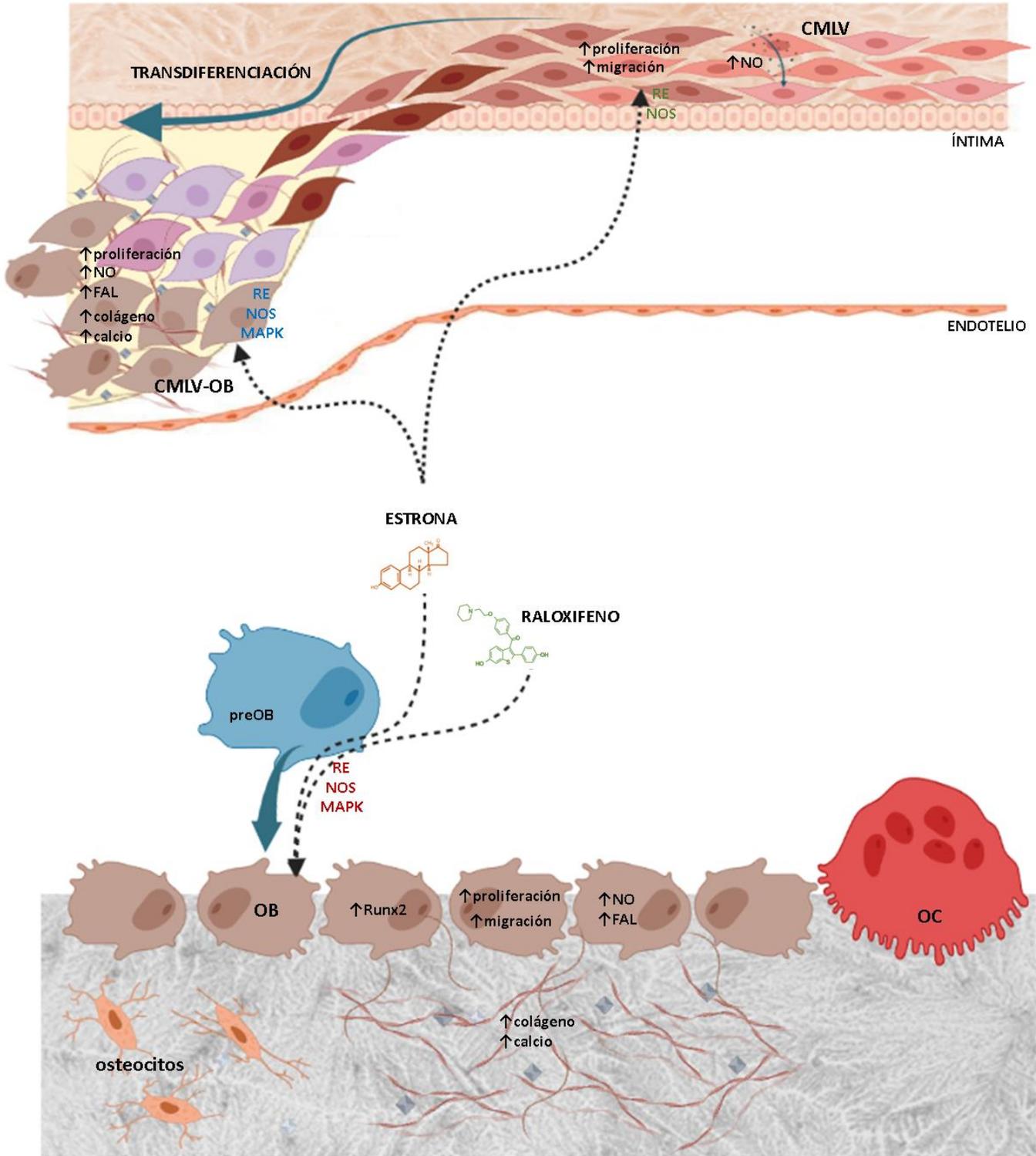
Específicamente los resultados presentados nos permiten concluir que:

- en cultivos primarios de osteoblastos, la estrona y el raloxifeno promueven la osteoblastogénesis a través de la estimulación de la expresión de Runx2, de la actividad FAL, del depósito extracelular de colágeno y de la mineralización de la matriz extracelular;
- en osteoblastos, como así también en células musculares lisas vasculares nativas y transdiferenciadas a linaje óseo, la estrona estimula la proliferación, migración celular y la síntesis de NO;

## **CONCLUSIONES**

- en el modelo de transdiferenciación celular se demostró que la estrona induce la transformación ósea de las células musculares lisas vasculares a través del aumento de la actividad FAL, el depósito de colágeno y de la mineralización extracelular;
- el mecanismo de acción de la hormona comprende la participación de los RE nucleares/citosólicos y de membrana, la vía óxido nítrico sintasa, y la vía de las MAPK;
- la estrona exhibió una actividad por sí misma, y no a través de su conversión a estradiol;
- la estrona, el estradiol y el raloxifeno mostraron poseer una capacidad semejante al promover la diferenciación osteoblástica.

**Representación esquemática de los principales aportes de este trabajo de tesis**



## ***REFERENCIAS***

- ABBASIAN, N. J. B. 2021. Vascular calcification mechanisms: updates and renewed insight into signaling pathways involved in high phosphate-mediated vascular smooth muscle cell calcification. 9, 804.
- ALLEN, M. R., AREF, M. W., NEWMAN, C. L., KADAKIA, J. R. & WALLACE, J. M. 2016. Raloxifene neutralizes bone brittleness induced by anti-remodeling treatment and increases fatigue life through non-cell mediated mechanisms.
- ALLEN, M. R., HOCK, J. M. & BURR, D. B. J. B. 2004. Periosteum: biology, regulation, and response to osteoporosis therapies. 35, 1003-1012.
- ANDERSON, H. C. J. C. R. R. 2003. Matrix vesicles and calcification. 5, 222-226.
- AREF, M., GALLANT, M. A., ORGAN, J. M., WALLACE, J. M., NEWMAN, C. L., BURR, D. B., BROWN, D. M. & ALLEN, M. R. J. B. 2013. In vivo reference point indentation reveals positive effects of raloxifene on mechanical properties following 6 months of treatment in skeletally mature beagle dogs. 56, 449-453.
- AZAMI, N., CHEN, P.-J., MEHTA, S., KALAJZIC, Z., DUTRA, E. H., NANDA, R. & YADAV, S. J. E. J. O. O. 2020. Raloxifene administration enhances retention in an orthodontic relapse model. 42, 371-377.
- AZIZ, M. & YADAV, K. J. M. C. R. 2016. Pathogenesis of atherosclerosis a review. 2, 1-6.
- BARAKAT, R., OAKLEY, O., KIM, H., JIN, J. & KO, C. J. J. B. R. 2016. Extra-gonadal sites of estrogen biosynthesis and function. 49, 488.
- BARTON, M., FILARDO, E. J., LOLAIT, S. J., THOMAS, P., MAGGIOLINI, M., PROSSNITZ, E. R. J. T. J. O. S. B. & BIOLOGY, M. 2018. Twenty years of the G protein-coupled estrogen receptor GPER: Historical and personal perspectives. 176, 4-15.
- BELLOWS, C., AUBIN, J., HEERSCHKE, J. & ANTOSZ, M. J. C. T. I. 1986. Mineralized bone nodules formed in vitro from enzymatically released rat calvaria cell populations. 38, 143-154.
- BERMAN, A. G., DAMRATH, J. G., HATCH, J., PULLIAM, A. N., POWELL, K. M., HINTON, M. & WALLACE, J. M. J. C. T. R. 2022. Effects of Raloxifene and tibial loading on bone mass and mechanics in male and female mice. 63, 3-15.
- BJORNSTROM, L. & SJOBERG, M. J. M. E. 2005. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. 19, 833-842.
- BLACK, D. M. & ROSEN, C. J. J. N. E. J. O. M. 2016. Postmenopausal osteoporosis. 374, 254-262.
- BLIZZARD, T. A., GUDE, C., CHAN, W., BIRZIN, E. T., MOJENA, M., TUDELA, C., CHEN, F., KNECHT, K., SU, Q., KRAKER, B. J. B. & LETTERS, M. C. 2007. Bridged androstenediol analogs as ER- $\beta$  selective SERMs. 17, 2944-2948.
- BONJOUR, J.-P., KOHRT, W., LEVASSEUR, R., WARREN, M., WHITING, S. & KRAENZLIN, M. J. N. R. R. 2014. Biochemical markers for assessment of calcium economy and bone metabolism: application in clinical trials from pharmaceutical agents to nutritional products. 27, 252-267.
- BONNELLYE, E., AUBIN, J. E. J. J. O. B. & RESEARCH, M. 2002. Differential expression of estrogen receptor-related receptor  $\alpha$  and estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in osteoblasts in vivo and in vitro. 17, 1392-1400.
- BURR, D. B. & PHIPPS, R. 2022. Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs). *Osteoporotic Fracture and Systemic Skeletal Disorders*. Springer.
- CAPLAN, A. I. & BRUDER, S. P. J. T. I. M. M. 2001. Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. 7, 259-264.
- CAPULLI, M., PAONE, R., RUCCI, N. J. A. O. B. & BIOPHYSICS 2014. Osteoblast and osteocyte: games without frontiers. 561, 3-12.
- CARR, B. R., MACDONALD, P. C., SIMPSON, E. R. J. F. & STERILITY 1982. The role of lipoproteins in the regulation of progesterone secretion by the human corpus luteum. 38, 303-311.

- CASTRACANE, V. D., KRAEMER, G. R., OGDEN, B. W. & KRAEMER, R. R. J. M. 2006. Interrelationships of serum estradiol, estrone, and estrone sulfate, adiposity, biochemical bone markers, and leptin in post-menopausal women. 53, 217-225.
- CEPEDA, S. B., SANDOVAL, M. J., RAUSCHEMBERGER, M. B. & MASSHEIMER, V. L. J. T. J. O. N. B. 2017. Beneficial role of the phytoestrogen genistein on vascular calcification. 50, 26-37.
- CHEN, G., DENG, C. & LI, Y.-P. J. I. J. O. B. S. 2012. TGF- $\beta$  and BMP signaling in osteoblast differentiation and bone formation. 8, 272.
- CHISTIAKOV, D. A., OREKHOV, A. N. & BOBRYSEV, Y. V. J. A. P. 2015. Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis. 214, 33-50.
- CICERI, P., VOLPI, E., BRENNIA, I., ARNABOLDI, L., NERI, L., BRANCACCIO, D. & COZZOLINO, M. J. N. D. T. 2012. Combined effects of ascorbic acid and phosphate on rat VSMC osteoblastic differentiation. 27, 122-127.
- CLARK, J. F. & PYNE-GEITHMAN, G. J. P. 2005. Vascular smooth muscle function: the physiology and pathology of vasoconstriction. 12, 35-45.
- CLASSICS LOWRY, O., ROSEBROUGH, N., FARR, A. & RANDALL, R. J. J. B. C. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. 193, 265-75.
- COELINGH BENNINK, H., HOLINKA, C. & DICZFALUSY, E. J. C. 2008. Estetrol review: profile and potential clinical applications. 11, 47-58.
- COLNOT, C. J. J. O. B. & RESEARCH, M. 2009. Skeletal cell fate decisions within periosteum and bone marrow during bone regeneration. 24, 274-282.
- CRANNEY, A. & ADACHI, J. D. J. D. S. 2005. Benefit-risk assessment of raloxifene in postmenopausal osteoporosis. 28, 721-730.
- CUTINI, P. H., CAMPELO, A. E., AGRIELLO, E., SANDOVAL, M., RAUSCHEMBERGER, M. B., MASSHEIMER, V. L. J. T. J. O. S. B. & BIOLOGY, M. 2012. The role of sex steroids on cellular events involved in vascular disease. 132, 322-330.
- DIRCKX, N., VAN HUL, M. & MAES, C. J. B. D. R. P. C. E. T. R. 2013. Osteoblast recruitment to sites of bone formation in skeletal development, homeostasis, and regeneration. 99, 170-191.
- EASTELL, R., O'NEILL, T. W., HOFBAUER, L. C., LANGDAHL, B., REID, I. R., GOLD, D. T. & CUMMINGS, S. R. J. N. R. D. P. 2016. Postmenopausal osteoporosis. 2, 1-16.
- EASTELL, R., SZULC, P. J. T. L. D. & ENDOCRINOLOGY 2017. Use of bone turnover markers in postmenopausal osteoporosis. 5, 908-923.
- ELANGO, K., JAVAID, A., KHETARPAL, B. K., RAMALINGAM, S., KOLANDAIVEL, K. P., GUNASEKARAN, K. & AHSAN, C. J. C. 2021. The effects of warfarin and direct oral anticoagulants on systemic vascular calcification: A review. 10, 773.
- ERNST, M., SCHMID, C. & FROESCH, E. J. P. O. T. N. A. O. S. 1988. Enhanced osteoblast proliferation and collagen gene expression by estradiol. 85, 2307-2310.
- EYRE, L. J., BLAND, R., BUJALSKA, I. J., SHEPPARD, M. C., STEWART, P. M., HEWISON, M. J. J. O. B. & RESEARCH, M. 1998. Characterization of aromatase and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase expression in rat osteoblastic cells. 13, 996-1004.
- FAROOQ, A. J. C. T. I. M. C. 2015. Structural and functional diversity of estrogen receptor ligands. 15, 1372-1384.
- FILARDO, E. J. & THOMAS, P. J. E. 2012. Minireview: G protein-coupled estrogen receptor-1, GPER-1: its mechanism of action and role in female reproductive cancer, renal and vascular physiology. 153, 2953-2962.
- FLORENCIO-SILVA, R., SASSO, G. R. D. S., SASSO-CERRI, E., SIMÕES, M. J. & CERRI, P. S. J. B. R. I. 2015. Biology of bone tissue: structure, function, and factors that influence bone cells. 2015.

- FÖRSTERMANN, U. & SESSA, W. C. J. E. H. J. 2012. Nitric oxide synthases: regulation and function. 33, 829-837.
- FRENKEL, B., HONG, A., BANIWAL, S. K., COETZEE, G. A., OHLSSON, C., KHALID, O. & GABET, Y. J. J. O. C. P. 2010. Regulation of adult bone turnover by sex steroids. 224, 305-310.
- FROLIK, C., BRYANT, H., BLACK, E., MAGEE, D. & CHANDRASEKHAR, S. J. B. 1996. Time-dependent changes in biochemical bone markers and serum cholesterol in ovariectomized rats: effects of raloxifene HCl, tamoxifen, estrogen, and alendronate. 18, 621-627.
- GALKINA, E. & LEY, K. J. A. R. O. I. 2009. Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis. 27.
- GALLANT, M. A., BROWN, D. M., HAMMOND, M., WALLACE, J. M., DU, J., DEYMIER-BLACK, A. C., ALMER, J. D., STOCK, S. R., ALLEN, M. R. & BURR, D. B. J. B. 2014. Bone cell-independent benefits of raloxifene on the skeleton: a novel mechanism for improving bone material properties. 61, 191-200.
- GALLEY, H. F. & WEBSTER, N. R. J. B. J. O. A. 2004. Physiology of the endothelium. 93, 105-113.
- GARG, P., MAZUR, M. M., BUCK, A. C., WANDTKE, M. E., LIU, J. & EBRAHEIM, N. A. J. O. S. 2017. Prospective review of mesenchymal stem cells differentiation into osteoblasts. 9, 13-19.
- GASSER, J. A. & KNEISSEL, M. 2017. Bone physiology and biology. *Bone toxicology*. Springer.
- GENESER, F. J. F. G. 2000. Histologia: sobre bases biomoleculares.
- GILBERT, L., HE, X., FARMER, P., RUBIN, J., DRISSI, H., VAN WIJNEN, A. J., LIAN, J. B., STEIN, G. S. & NANES, M. S. J. J. O. B. C. 2002. Expression of the osteoblast differentiation factor RUNX2 (Cbfa1/AML3/Pebp2 $\alpha$ ) is inhibited by tumor necrosis factor- $\alpha$ . 277, 2695-2701.
- GILBERT, L., HE, X., RUBIN, J., DRISSI, H., VAN WIJNEN, A., LIAN, J., STEIN, G. & NANES, M. The osteoblast differentiation factor RUNX2/Cbfa1 is suppressed by tumor necrosis factor- $\alpha$ . JOURNAL OF BONE AND MINERAL RESEARCH, 2001. AMER SOC BONE & MINERAL RES 2025 M ST, NW, STE 800, WASHINGTON, DC 20036 ..., S204-S204.
- GIZZO, S., SACCARDI, C., PATRELLI, T. S., BERRETTA, R., CAPOBIANCO, G., DI GANGI, S., VACILOTTO, A., BERTOCCO, A., NOVENTA, M., ANCONA, E. J. O. & SURVEY, G. 2013. Update on raloxifene: mechanism of action, clinical efficacy, adverse effects, and contraindications. 68, 467-481.
- GLASS, C. K. & WITZTUM, J. L. J. C. 2001. Atherosclerosis: the road ahead. 104, 503-516.
- GOSSET, A., POUILLÈS, J.-M., TRÉMOLLIÈRES, F. J. B. P., ENDOCRINOLOGY, R. C. & METABOLISM 2021. Menopausal hormone therapy for the management of osteoporosis. 35, 101551.
- GRIESS, J. J. J. O. T. A. C. S. 1879. Patents Relating to Chemistry: 213,563. and 213,564 Coloring matters. 1, 126-126.
- GRUBER, C. J., TSCHUGGUEL, W., SCHNEEBERGER, C. & HUBER, J. C. J. N. E. J. O. M. 2002. Production and actions of estrogens. 346, 340-352.
- GÜVENÇ, A., YILMAZ, C., BALTA, B., YILDIZ, Z. & VARDAR, S. A. J. T. M. S. J. 2021. Effects of Estrogen on Coronary Artery Calcification and the Relationship Between Osteoporosis and Cardiovascular Diseases in Postmenopausal Women. 8, 99-102.
- HAHN, C., SCHWARTZ, M. A. J. A., THROMBOSIS, & BIOLOGY, V. 2008. The role of cellular adaptation to mechanical forces in atherosclerosis. 28, 2101-2107.
- HARADA, S.-I. & RODAN, G. A. J. N. 2003. Control of osteoblast function and regulation of bone mass. 423, 349-355.
- HAZELL, G. G., YAO, S. T., ROPER, J. A., PROSSNITZ, E. R., O'CARROLL, A.-M. & LOLAIT, S. J. J. T. J. O. E. 2009. Localisation of GPR30, a novel G protein-coupled oestrogen receptor, suggests multiple functions in rodent brain and peripheral tissues. 202, 223.

- HEMSELL, D. L., GRODIN, J., BRENNER, P., SIITERI, P., MACDONALD, P. J. T. J. O. C. E. & METABOLISM 1974. Plasma precursors of estrogen. II. Correlation of the extent of conversion of plasma androstenedione to estrone with age. 38, 476-479.
- HOCK, J., KRISHNAN, V., ONYIA, J., BIDWELL, J., MILAS, J., STANISLAUS, D. J. J. O. B. & RESEARCH, M. 2001. Osteoblast apoptosis and bone turnover. 16, 975-984.
- HOLINKA, C. F., DICZFALUSY, E., BENNINK, H. J. C. J. T. J. O. S. B. & BIOLOGY, M. 2008. Estetrol: a unique steroid in human pregnancy. 110, 138-143.
- HSIA, J., LANGER, R. D., MANSON, J. E., KULLER, L., JOHNSON, K. C., HENDRIX, S. L., PETTINGER, M., HECKBERT, S. R., GREEP, N. & CRAWFORD, S. J. A. O. I. M. 2006. Conjugated equine estrogens and coronary heart disease: the Women's Health Initiative. 166, 357-365.
- HUTCHESON, J. D., MALDONADO, N. & AIKAWA, E. J. C. O. I. L. 2014. Small entities with large impact: microcalcifications and atherosclerotic plaque vulnerability. 25, 327.
- ICHIMARU, R., TOMINARI, T., YOSHINOCHI, S., MATSUMOTO, C., WATANABE, K., HIRATA, M., NUMABE, Y., MURPHY, G., NAGASE, H. & MIYAURA, C. J. A. O. O. B. 2018. Raloxifene reduces the risk of local alveolar bone destruction in a mouse model of periodontitis combined with systemic postmenopausal osteoporosis. 85, 98-103.
- Ji, E. & LEE, S. J. I. J. O. M. S. 2021. Antibody-based therapeutics for atherosclerosis and cardiovascular diseases. 22, 5770.
- JIAN-PING, L., XUE-GE, G., YAN-PING, S. J. C. J. O. O. & SURGERY, M. 2021. Effects of raloxifene on fracture healing and OPG/RANKL/RANK system in rats with osteoporotic jaw fracture. 19, 213.
- JIANG, G.-L., WHITE, C. R., STEVENS, H. Y., FRANGOS, J. A. J. A. J. O. P.-E. & METABOLISM 2002a. Temporal gradients in shear stimulate osteoblastic proliferation via ERK1/2 and retinoblastoma protein. 283, E383-E389.
- JIANG, Y., VAESSEN, B., LENVIK, T., BLACKSTAD, M., REYES, M. & VERFAILLIE, C. M. J. E. H. 2002b. Multipotent progenitor cells can be isolated from postnatal murine bone marrow, muscle, and brain. 30, 896-904.
- JOHNSON, J. L. J. C. R. 2014. Emerging regulators of vascular smooth muscle cell function in the development and progression of atherosclerosis. 103, 452-460.
- JONES, S., BOYDE, A. J. C. & RESEARCH, T. 1977. The migration of osteoblasts. 184, 179-193.
- KALYANARAMAN, H., SCHALL, N. & PILZ, R. B. J. N. O. 2018. Nitric oxide and cyclic GMP functions in bone. 76, 62-70.
- KANG, W.-B., DENG, Y.-T., WANG, D.-S., FENG, D., LIU, Q., WANG, X.-S., RU, J.-Y., CONG, Y., ZHAO, J.-N., ZHAO, M.-G. J. T. J. O. S. B. & BIOLOGY, M. 2015. Osteoprotective effects of estrogen membrane receptor GPR30 in ovariectomized rats. 154, 237-244.
- KANNO, Y., INTO, T., LOWENSTEIN, C. J. & MATSUSHITA, K. J. C. R. 2008. Nitric oxide regulates vascular calcification by interfering with TGF- $\beta$  signalling. 77, 221-230.
- KARSENTY, G., KRONENBERG, H. M., SETTEMBRE, C. J. A. R. O. C. & DEVELOPMENTAL 2009. Genetic control of bone formation. 25, 629-648.
- KARSENTY, G. & WAGNER, E. F. J. D. C. 2002. Reaching a genetic and molecular understanding of skeletal development. 2, 389-406.
- KHALIL, R. A. J. B. P. 2013. Estrogen, vascular estrogen receptor and hormone therapy in postmenopausal vascular disease. 86, 1627-1642.
- KHAZAEI, M., MOIEN-AFSHARI, F. & LAHER, I. J. P. 2008. Vascular endothelial function in health and diseases. 15, 49-67.
- KIKUCHI, N., URABE, M., IWASA, K., OKUBO, T., TSUCHIYA, H., HOSODA, T., TATSUMI, H., HONJO, H. J. T. J. O. S. B. & BIOLOGY, M. 2000. Atheroprotective effect of estriol and estrone sulfate on human vascular smooth muscle cells. 72, 71-78.

- KIM, B., CHO, Y. J., LIM, W. J. E. & MEDICINE, T. 2021. Osteoporosis therapies and their mechanisms of action. 22, 1-14.
- KLEIN-NULEND, J., NIJWEIDE, P. J. & BURGER, E. H. J. C. O. R. 2003. Osteocyte and bone structure. 1, 5-10.
- KLING, J. M., CLARKE, B. L. & SANDHU, N. P. J. J. O. W. S. H. 2014. Osteoporosis prevention, screening, and treatment: a review. 23, 563-572.
- KOCKX, M. M. & HERMAN, A. G. J. C. R. 2000. Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental? 45, 736-746.
- KOMORI, T. 2009. Regulation of osteoblast differentiation by Runx2. *Osteoimmunology*. Springer.
- KOUSTENI, S., BELLIDO, T., PLOTKIN, L., O'BRIEN, C., BODENNER, D., HAN, L., HAN, K., DIGREGORIO, G., KATZENELLENBOGEN, J. & KATZENELLENBOGEN, B. J. C. 2001. Nongenotropic, sex-nonspecific signaling through the estrogen or androgen receptors: dissociation from transcriptional activity. 104, 719-730.
- KUIPER, G. G., CARLSSON, B., GRANDIEN, K., ENMARK, E., HÄGGBLAD, J., NILSSON, S. & GUSTAFSSON, J.-A. K. J. E. 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$ . 138, 863-870.
- KUIPER, G. G., LEMMEN, J. G., CARLSSON, B., CORTON, J. C., SAFE, S. H., VAN DER SAAG, P. T., VAN DER BURG, B. & GUSTAFSSON, J.-A. K. J. E. 1998. Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor  $\beta$ . 139, 4252-4263.
- KUMAR, R., ZAKHAROV, M. N., KHAN, S. H., MIKI, R., JANG, H., TORALDO, G., SINGH, R., BHASIN, S. & JASUJA, R. J. J. O. A. A. 2011. The dynamic structure of the estrogen receptor. 2011.
- LE DILY, F. & BEATO, M. J. I. J. O. M. S. 2018. Signaling by steroid hormones in the 3D nuclear space. 19, 306.
- LEE, N. K., KARSENTY, G. J. T. I. E. & METABOLISM 2008. Reciprocal regulation of bone and energy metabolism. 19, 161-166.
- LEE, S. J., LEE, I.-K. & JEON, J.-H. J. I. J. O. M. S. 2020. Vascular calcification—new insights into its mechanism. 21, 2685.
- LEVICK, J. J. A. I. T. C. P. L. B. 1991. Vascular smooth muscle. 171-5.
- LIAO, M.-H., TAI, Y.-T., CHERNG, Y.-G., LIU, S.-H., CHANG, Y.-A., LIN, P.-I. & CHEN, R.-M. J. B. J. O. N. 2014. Genistein induces oestrogen receptor- $\alpha$  gene expression in osteoblasts through the activation of mitogen-activated protein kinases/NF- $\kappa$ B/activator protein-1 and promotes cell mineralisation. 111, 55-63.
- LIBBY, P., RIDKER, P. M. & MASERI, A. J. C. 2002. Inflammation and atherosclerosis. 105, 1135-1143.
- LIBBY, P. J. N. 2021. The changing landscape of atherosclerosis. 592, 524-533.
- LIM, R., LI, L., YONG, E. & CHEW, N. J. B. E. B. A.-G. S. 2018. STAT-3 regulation of CXCR4 is necessary for the prenylflavonoid Icaritin to enhance mesenchymal stem cell proliferation, migration and osteogenic differentiation. 1862, 1680-1692.
- LIN, G. L. & HANKENSON, K. D. J. J. O. C. B. 2011. Integration of BMP, Wnt, and notch signaling pathways in osteoblast differentiation. 112, 3491-3501.
- LIN, J. T., LANE, J. M. J. C. O. & RESEARCH, R. 2004. Osteoporosis: a review. 425, 126-134.
- LIU, J. H. J. M. 2020. Selective estrogen receptor modulators (SERMS): keys to understanding their function. 27, 1171-1176.
- LOPES, N. H. J. A. B. D. C. 2018. The Interface between Osteoporosis and Atherosclerosis in Postmenopausal Women. SciELO Brasil.
- LOWE, D. A. & KARARIGAS, G. J. F. I. E. 2020. new insights into estrogen/estrogen receptor effects in the cardiac and skeletal muscle. 11, 141.

- LU, H.-F., CHOU, P.-H., LIN, G.-H., CHOU, W.-H., WANG, S.-T., ADIKUSUMA, W., MUGIYANTO, E., HUNG, K.-S. & CHANG, W.-C. J. D. M. 2020. Pharmacogenomics study for raloxifene in postmenopausal female with osteoporosis. 2020.
- MA, H.-Y., CHEN, S., LU, L.-L., GONG, W., ZHANG, A.-H. J. H. & RESEARCH, M. 2021. Raloxifene in the Treatment of Osteoporosis in Postmenopausal Women with End-Stage Renal Disease: A Systematic Review and Meta-Analysis. 53, 730-737.
- MACKIE, E., AHMED, Y., TATARCZUCH, L., CHEN, K.-S., MIRAMS, M. J. T. I. J. O. B. & BIOLOGY, C. 2008. Endochondral ossification: how cartilage is converted into bone in the developing skeleton. 40, 46-62.
- MANCINI, L., MORADI-BIDHENDI, N., BECHERINI, L., MARTINETI, V., MACINTYRE, I. J. B. & COMMUNICATIONS, B. R. 2000. The biphasic effects of nitric oxide in primary rat osteoblasts are cGMP dependent. 274, 477-481.
- MANDUTEANU, I., SIMIONESCU, M. J. J. O. C. & MEDICINE, M. 2012. Inflammation in atherosclerosis: a cause or a result of vascular disorders? 16, 1978-1990.
- MARCUS, R. & MAJUMDER, S. J. O. 2001. The nature of osteoporosis. 3-17.
- MARKS JR, S. C. & POPOFF, S. N. J. A. J. O. A. 1988. Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. 183, 1-44.
- MARTÍN-SANTAMARÍA, S., RODRÍGUEZ, J. J., MASLYK, M. M., FERNÁNDEZ, B. D. P.-T. & RAMOS, A. SERMs: un largo camino desde el tamoxifeno hasta las nuevas estrategias para el diseño de fármacos más selectivos. Anales de la Real Sociedad Española de Química, 2010. Real Sociedad Española de Química, 199-206.
- MARTINKOVICH, S., SHAH, D., PLANEY, S. L. & ARNOTT, J. A. J. C. I. I. A. 2014. Selective estrogen receptor modulators: tissue specificity and clinical utility. 9, 1437.
- MASSHEIMER, V., POLINI, N., ALVAREZ, C., BENOZZI, S., RAUSCHEMBERGER, M. B. & SELLÉS, J. J. S. 2006. Signal transduction pathways involved in non-genomic action of estrone on vascular tissue. 71, 857-864.
- MASSHEIMER, V., POLINI, N., BENOZZI, S., ALVAREZ, C. & SELLÉS, J. J. R. 2003. El Estradiol y la Estrona modulan la función vascular por mecanismos diferentes. 40.
- MCCARTHY, T. L., CHANG, W.-Z., LIU, Y. & CENTRELLA, M. J. J. O. B. C. 2003. Runx2 integrates estrogen activity in osteoblasts. 278, 43121-43129.
- MCGARRY, J. G., KLEIN-NULEND, J., PRENDERGAST, P. J. J. B. & COMMUNICATIONS, B. R. 2005. The effect of cytoskeletal disruption on pulsatile fluid flow-induced nitric oxide and prostaglandin E2 release in osteocytes and osteoblasts. 330, 341-348.
- MENG, Q., LI, Y., JI, T., CHAO, Y., LI, J., FU, Y., WANG, S., CHEN, Q., CHEN, W. & HUANG, F. J. J. O. A. R. 2021. Estrogen prevent atherosclerosis by attenuating endothelial cell pyroptosis via activation of estrogen receptor  $\alpha$ -mediated autophagy. 28, 149-164.
- MIGLIORINI, F., COLAROSSO, G., BARONCINI, A., ESCHWEILER, J., TINGART, M. & MAFFULLI, N. J. E. R. O. C. P. 2021. Pharmacological management of postmenopausal osteoporosis: a level i evidence based-expert opinion. 14, 105-119.
- MILLER, V. M., NAFTOLIN, F., ASTHANA, S., BLACK, D. M., BRINTON, E. A., BUDOFF, M. J., CEDARS, M. I., DOWLING, N. M., GLEASON, C. E. & HODIS, H. N. J. M. 2019. The Kronos early estrogen prevention study (KEEPS): what have we learned? 26, 1071.
- MILLER, W. L., STRAUSS III, J. F. J. T. J. O. S. B. & BIOLOGY, M. 1999. Molecular pathology and mechanism of action of the steroidogenic acute regulatory protein, StARProceedings of Xth International Congress on Hormonal Steroids, Quebec, Canada, 17–21 June 1998. 69, 131-141.
- MILLER, W. L. J. M. & ENDOCRINOLOGY, C. 2002. Androgen biosynthesis from cholesterol to DHEA. 198, 7-14.

- MILLER, W. L. J. T. J. O. S. B. & BIOLOGY, M. 2017. Disorders in the initial steps of steroid hormone synthesis. 165, 18-37.
- MIRON, R. J., SAULACIC, N., BUSER, D., IIZUKA, T. & SCULEAN, A. J. C. O. I. 2013. Osteoblast proliferation and differentiation on a barrier membrane in combination with BMP2 and TGF $\beta$ 1. 17, 981-988.
- MORI, T., DURAND, J., CHEN, Y.-F., THOMPSON, J. A., BAKIR, S. & OPARIL, S. J. A. J. O. C. 2000. Effects of short-term estrogen treatment on the neointimal response to balloon injury of rat carotid artery. 85, 1276-1279.
- MORISSETTE, M., LE SAUX, M., D'ASTOUS, M., JOURDAIN, S., AL SWEIDI, S., MORIN, N., ESTRADA-CAMARENA, E., MENDEZ, P., GARCIA-SEGURA, L. M., DI PAOLO, T. J. T. J. O. S. B. & BIOLOGY, M. 2008. Contribution of estrogen receptors alpha and beta to the effects of estradiol in the brain. 108, 327-338.
- MUCHMORE, D. B. J. T. O. 2000. Raloxifene: a selective estrogen receptor modulator (SERM) with multiple target system effects. 5, 388-392.
- MUNJAL, A. & BORDONI, B. 2021. Histology, Vascular. *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- MURPHY, E. J. C. R. 2011. Estrogen signaling and cardiovascular disease. 109, 687-696.
- NAFTOLIN, F., FRIEDENTHAL, J., NACHTIGALL, R. & NACHTIGALL, L. J. F. 2019. Cardiovascular health and the menopausal woman: the role of estrogen and when to begin and end hormone treatment. 8.
- NAKAMURA, Y., SUZUKI, T., MIKI, Y., TAZAWA, C., SENZAKI, K., MORIYA, T., SAITO, H., ISHIBASHI, T., TAKAHASHI, S., YAMADA, S. J. M. & ENDOCRINOLOGY, C. 2004. Estrogen receptors in atherosclerotic human aorta: inhibition of human vascular smooth muscle cell proliferation by estrogens. 219, 17-26.
- NAKASHIMA, K. & DE CROMBRUGGHE, B. J. T. I. G. 2003. Transcriptional mechanisms in osteoblast differentiation and bone formation. 19, 458-466.
- NELSON, L. R. & BULUN, S. E. J. J. O. T. A. A. O. D. 2001. Estrogen production and action. 45, S116-S124.
- NEWSON, L. J. P. R. H. 2018. Menopause and cardiovascular disease. 24, 44-49.
- NILSSON, S., KOEHLER, K. F. & GUSTAFSSON, J.-Å. J. N. R. D. D. 2011. Development of subtype-selective oestrogen receptor-based therapeutics. 10, 778-792.
- NODA-SEINO, H., SAWADA, K., HAYAKAWA, J., OHYAGI-HARA, C., MABUCHI, S., TAKAHASHI, K., NISHIO, Y., SAKATA, M., KURACHI, H. & KIMURA, T. J. J. O. E. I. 2013. Estradiol and raloxifene induce the proliferation of osteoblasts through G-protein-coupled receptor GPR30. 36, 21-27.
- NOVELLA, S., DANTAS, A. P., HERMENEGILDO, C., HELLSTEN, Y. J. O. M. & LONGEVITY, C. 2019. Regulatory Mechanisms of Estrogen on Vascular Ageing. Hindawi.
- O'SHAUGHNESSY, M. C., POLAK, J. M., AFZAL, F., HUKKANEN, M. V., HUANG, P., MACINTYRE, I., BUTTERY, L. D. J. B. & COMMUNICATIONS, B. R. 2000. Nitric oxide mediates 17 $\beta$ -estradiol-stimulated human and rodent osteoblast proliferation and differentiation. 277, 604-610.
- O'LONE, R., FRITH, M. C., KARLSSON, E. K. & HANSEN, U. J. M. E. 2004. Genomic targets of nuclear estrogen receptors. 18, 1859-1875.
- ORSHAL, J. M. & KHALIL, R. A. J. H. 2004. Reduced endothelial NO-cGMP-mediated vascular relaxation and hypertension in IL-6-infused pregnant rats. 43, 434-444.
- OUYANG, P., MICHOS, E. D. & KARAS, R. H. J. J. O. T. A. C. O. C. 2006. Hormone replacement therapy and the cardiovascular system: lessons learned and unanswered questions. 47, 1741-1753.

- PAL, S. N., CLANCY, P. & GOLLEDGE, J. J. C. J. 2011. Circulating concentrations of stem-cell-mobilizing cytokines are associated with levels of osteoprogenitor cells and aortic calcification severity. 75, 1227-1234.
- PANARONI, C., TZENG, Y.-S., SAEED, H. & WU, J. Y. J. C. O. R. 2014. Mesenchymal progenitors and the osteoblast lineage in bone marrow hematopoietic niches. 12, 22-32.
- PAPACHRISTOU, D. J., PAPACHRONI, K. K., BASDRA, E. K. & PAPAVALASSILOU, A. G. J. B. 2009. Signaling networks and transcription factors regulating mechanotransduction in bone. 31, 794-804.
- PARFITT, A. M. 2001. Skeletal heterogeneity and the purposes of bone remodeling: implications for the understanding of osteoporosis. *Osteoporosis*. Elsevier.
- PARK, J.-B. J. E. & MEDICINE, T. 2012. Effects of low doses of estrone on the proliferation, differentiation and mineralization of osteoprecursor cells. 4, 681-684.
- PATEL, B., DHILLO, W. J. B. P., OBSTETRICS, R. C. & GYNAECOLOGY 2021. Menopause review: Emerging treatments for menopausal symptoms.
- PÉREZ-AMODIO, S. & ENGEL, E. J. B. C. W. C. A. 2014. Bone biology and regeneration. 315-342.
- PÉREZ, N., ORTEGA, A. I. & GUILLÉN, G. J. C. O. 2008. Efecto del raloxifeno sobre la cortical mandibular de mujeres osteoporóticas a través de radiografías panorámicas. 5, 119-126.
- PINKERTON, J. V. & SANTEN, R. J. E. R. 1999. Alternatives to the use of estrogen in postmenopausal women. 20, 308-320.
- POSRITONG, S., HONG, J. M., ELENISTE, P. P., MCINTYRE, P. W., WU, J. L., HIMES, E. R., PATEL, V., KACENA, M. A., BRUZZANITI, A. J. M. & ENDOCRINOLOGY, C. 2018. Pyk2 deficiency potentiates osteoblast differentiation and mineralizing activity in response to estrogen or raloxifene. 474, 35-47.
- PRATAP, J., GALINDO, M., ZAIDI, S. K., VRADII, D., BHAT, B. M., ROBINSON, J. A., CHOI, J.-Y., KOMORI, T., STEIN, J. L. & LIAN, J. B. J. C. R. 2003. Cell growth regulatory role of Runx2 during proliferative expansion of preosteoblasts. 63, 5357-5362.
- PROSSNITZ, E. R., BARTON, M. J. M. & ENDOCRINOLOGY, C. 2014. Estrogen biology: new insights into GPER function and clinical opportunities. 389, 71-83.
- PROSSNITZ, E. R. & BARTON, M. J. N. R. E. 2011. The G-protein-coupled estrogen receptor GPER in health and disease. 7, 715-726.
- PUGLIESE, G., IACOBINI, C., FANTAUZZI, C. B. & MENINI, S. J. A. 2015. The dark and bright side of atherosclerotic calcification. 238, 220-230.
- PUROHIT, A. & REED, M. J. J. S. 2002. Regulation of estrogen synthesis in postmenopausal women. 67, 979-983.
- QU, Q., HÄRKÖNEN, P. L. & VÄÄNÄNEN, H. K. J. J. O. C. B. 1999. Comparative effects of estrogen and antiestrogens on differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture. 73, 500-507.
- QU, Q., PERÄLÄ-HEAPE, M., KAPANEN, A., DAHLLUND, J., SALO, J., VÄÄNÄNEN, H. & HÄRKÖNEN, P. J. B. 1998. Estrogen enhances differentiation of osteoblasts in mouse bone marrow culture. 22, 201-209.
- RACHNER, T. D., KHOSLA, S. & HOFBAUER, L. C. J. T. L. 2011. Osteoporosis: now and the future. 377, 1276-1287.
- RALSTON, S. H. & UITTERLINDEN, A. G. J. E. R. 2010. Genetics of osteoporosis. 31, 629-662.
- RAUSCHEMBERGER, M. B., SANDOVAL, M. J., MASSHEIMER, V. L. J. M. & ENDOCRINOLOGY, C. 2011. Cellular and molecular actions displayed by estrone on vascular endothelium. 339, 136-143.
- RAUSCHEMBERGER, M. B., SELLÉS, J. & MASSHEIMER, V. J. L. S. 2008. The direct action of estrone on vascular tissue involves genomic and non-genomic actions. 82, 115-123.

- REID, R., ABRAMSON, B. L., BLAKE, J., DESINDES, S., DODIN, S., JOHNSTON, S., ROWE, T., SODHI, N., WILKS, P., WOLFMAN, W. J. J. O. O. & CANADA, G. 2014. Managing menopause abstract and summary statement. 36, S1-S5.
- RENNA, N. F., DE LAS HERAS, N. & MIATELLO, R. M. J. I. J. O. H. 2013. Pathophysiology of vascular remodeling in hypertension. 2013.
- REY, J. R. C., CERVINO, E. V., RENTERO, M. L., CRESPO, E. C., ÁLVARO, A. O. & CASILLAS, M. J. T. O. O. J. 2009. Raloxifene: mechanism of action, effects on bone tissue, and applicability in clinical traumatology practice. 3, 14.
- RHO, J.-Y., KUHN-SPEARING, L., ZIOUPOS, P. J. M. E. & PHYSICS 1998. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone. 20, 92-102.
- RIGGS, B. L. & HARTMANN, L. C. J. N. E. J. O. M. 2003. Selective estrogen-receptor modulators—mechanisms of action and application to clinical practice. 348, 618-629.
- ROSEN, C. J. 2009. *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*, John Wiley & Sons.
- RUCINSKI, M., ZIOLKOWSKA, A., HOCHOL, A., PUCHER, A., MACCHI, C., BELLONI, A. S., NUSSDORFER, G. G. & MALENDOWICZ, L. K. J. I. J. O. M. M. 2006. Estradiol and resveratrol stimulating effect on osteocalcin, but not osteonectin and collagen-1 $\alpha$  gene expression in primary culture of rat calvarial osteoblast-like cells. 18, 565-570.
- SAMAVAT, H. & KURZER, M. S. J. C. L. 2015. Estrogen metabolism and breast cancer. 356, 231-243.
- SANDOO, A., VELDHUIJZEN VAN ZANTEN, J. J., METSIOS, G. S., CARROLL, D. & KITAS, G. D. J. T. O. C. M. J. 2010. The endothelium and its role in regulating vascular tone. 4.
- SASSON, S. & NOTIDES, A. C. J. J. O. B. C. 1983. Estriol and estrone interaction with the estrogen receptor. II. Estriol and estrone-induced inhibition of the cooperative binding of [3H] estradiol to the estrogen receptor. 258, 8118-8122.
- SATISH, M. & TADI, P. 2022. Physiology, vascular. *StatPearls [Internet]*. StatPearls Publishing.
- SAVONITTO, S., COLOMBO, D. & PRATI, F. J. J. O. C. M. 2018. Coronary artery disease after menopause and the role of estrogen replacement therapy. 19, e107-e111.
- SAWICKI, M. W., ERMAN, M., PURANEN, T., VIHKO, P. & GHOSH, D. J. P. O. T. N. A. O. S. 1999. Structure of the ternary complex of human 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase type 1 with 3-hydroxyestra-1, 3, 5, 7-tetraen-17-one (equilin) and NADP<sup>+</sup>. 96, 840-845.
- SCHWABE, J. W. & TEICHMANN, S. A. J. S. S. S. 2004. Nuclear receptors: the evolution of diversity. 2004, pe4-pe4.
- SELLES, J., POLINI, N., ALVAREZ, C. & MASSHEIMER, V. J. S. 2005. Novel action of estrone on vascular tissue: regulation of NOS and COX activity. 70, 251-256.
- SERRANO JR, C. V., ORANGES, M., BRUNALDI, V., DE M SOEIRO, A., TORRES, T. A., NICOLAU, J. C., RAMIRES, J. A. F. J. V. H. & MANAGEMENT, R. 2011. Skeletonized coronary arteries: pathophysiological and clinical aspects of vascular calcification. 7, 143.
- SHANG, Z.-Z., LI, X., SUN, H.-Q., XIAO, G.-N., WANG, C.-W. & GONG, Q. J. I. J. O. O. S. 2014. Differentially expressed genes and signalling pathways are involved in mouse osteoblast-like MC3T3-E1 cells exposed to 17- $\beta$  estradiol. 6, 142-149.
- SHUGHRUE, P. J., SCRIMO, P. J. & MERCHENTHALER, I. J. E. 1998. Evidence of the colocalization of estrogen receptor- $\beta$  mRNA and estrogen receptor- $\alpha$  immunoreactivity in neurons of the rat forebrain. 139, 5267-5270.
- SILVA, E., KABIL, A., KORTENKAMP, A. J. T. & PHARMACOLOGY, A. 2010. Cross-talk between non-genomic and genomic signalling pathways—distinct effect profiles of environmental estrogens. 245, 160-170.
- SIMPSON, E., MARTYN-ST JAMES, M., HAMILTON, J., WONG, R., GITTOES, N., SELBY, P. & DAVIS, S. J. B. 2020. Clinical effectiveness of denosumab, raloxifene, romosozumab, and teriparatide

- for the prevention of osteoporotic fragility fractures: a systematic review and network meta-analysis. 130, 115081.
- SIMPSON, E. R. J. T. J. O. S. B. & BIOLOGY, M. 2003. Sources of estrogen and their importance. 86, 225-230.
- SINGH, A., TANDON, S. & TANDON, C. J. M. B. R. 2021. An update on vascular calcification and potential therapeutics. 48, 887-896.
- SMITH, C. L., SANTEN, R. J., KOMM, B. & MIRKIN, S. J. B. C. R. 2014. Breast-related effects of selective estrogen receptor modulators and tissue-selective estrogen complexes. 16, 1-15.
- SOMMERFELDT, D. & RUBIN, C. J. E. S. J. 2001. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. 10, S86-S95.
- SONG, J., WAN, Y., ROLFE, B. E., CAMPBELL, J. H. & CAMPBELL, G. R. J. A. 1998. Effect of estrogen on vascular smooth muscle cells is dependent upon cellular phenotype. 140, 97-104.
- STEIN, G. S., LIAN, J. B., VAN WIJNEN, A. J., STEIN, J. L., MONTECINO, M., JAVED, A., ZAIDI, S. K., YOUNG, D. W., CHOI, J.-Y. & POCKWINSE, S. M. J. O. 2004. Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. 23, 4315-4329.
- SUN, X., YANG, X., ZHAO, Y., LI, Y., GUO, L. J. M. S. M. I. M. J. O. E. & RESEARCH, C. 2018. Effects of 17 $\beta$ -estradiol on mitophagy in the murine MC3T3-E1 osteoblast cell line is mediated via G protein-coupled estrogen receptor and the ERK1/2 signaling pathway. 24, 903.
- SYED, F., KHOSLA, S. J. B. & COMMUNICATIONS, B. R. 2005. Mechanisms of sex steroid effects on bone. 328, 688-696.
- TARANTA, A., BRAMA, M., TETI, A., SCANDURRA, R., SPERA, G., AGNUSDEI, D., TERMINE, J. & MIGLIACCIO, S. J. B. 2002. The selective estrogen receptor modulator raloxifene regulates osteoclast and osteoblast activity in vitro. 30, 368-376.
- TEGOS, T. J., KALODIKI, E., SABETAI, M. M. & NICOLAIDES, A. N. J. A. 2001. The genesis of atherosclerosis and risk factors: a review. 52, 89-98.
- TITORENCU, I., PRUNA, V., JINGA, V. V., SIMIONESCU, M. J. C. & RESEARCH, T. 2014. Osteoblast ontogeny and implications for bone pathology: an overview. 355, 23-33.
- TOUSOULIS, D., KAMPOLI, A.-M., TENTOLOURIS NIKOLAOS PAPAGEORGIOU, C. & STEFANADIS, C. J. C. V. P. 2012. The role of nitric oxide on endothelial function. 10, 4-18.
- TULLBERG-REINERT, H., JUNDT, G. J. H. & BIOLOGY, C. 1999. In situ measurement of collagen synthesis by human bone cells with a Sirius Red-based colorimetric microassay: effects of transforming growth factor  $\beta$ 2 and ascorbic acid 2-phosphate. 112, 271-276.
- VÄÄNÄNEN, H. K. J. A. O. M. 1993. Mechanism of bone turnover. 25, 353-359.
- VAKHTANGADZE, T., SINGH TAK, R., SINGH, U., BAIG, M. S. & BEZSONOV, E. J. F. I. C. M. 2021. Gender differences in Atherosclerotic Vascular Disease: From lipids to clinical outcomes. 637.
- VAZQUEZ-PADRON, R. I., LASKO, D., LI, S., LOUIS, L., PESTANA, I. A., PANG, M., LIOTTA, C., FORNONI, A., AITOUICHE, A. & PHAM, S. M. J. J. O. V. S. 2004. Aging exacerbates neointimal formation, and increases proliferation and reduces susceptibility to apoptosis of vascular smooth muscle cells in mice. 40, 1199-1207.
- VIALE-BOURONCLE, S., GOSAU, M. & MORSCZECK, C. J. A. O. O. B. 2014. Collagen I induces the expression of alkaline phosphatase and osteopontin via independent activations of FAK and ERK signalling pathways. 59, 1249-1255.
- VIDAL, O., KINDBLOM, L. G., OHLSSON, C. J. J. O. B. & RESEARCH, M. 1999. Expression and localization of estrogen receptor- $\beta$  in murine and human bone. 14, 923-929.

- WATSON, C. S., JENG, Y.-J. & KOCHUKOV, M. Y. J. T. F. J. 2008a. Nongenomic actions of estradiol compared with estrone and estriol in pituitary tumor cell signaling and proliferation. 22, 3328.
- WATSON, C. S., JENG, Y. J. & KOCHUKOV, M. Y. J. T. F. J. 2008b. Nongenomic actions of estradiol compared with estrone and estriol in pituitary tumor cell signaling and proliferation. 22, 3328-3336.
- WEBB, P., NGUYEN, N.-H., CHIELLINI, G., YOSHIHARA, H. A., LIMA, S. T. C., APRILETTI, J. W., RIBEIRO, R. C., MARIMUTHU, A., WEST, B. L., GOEDE, P. J. T. J. O. S. B. & BIOLOGY, M. 2002. Design of thyroid hormone receptor antagonists from first principles. 83, 59-73.
- WIREN, K., EVANS, A. C. & ZHANG, X. J. J. O. E. 2002. Osteoblast differentiation influences androgen and estrogen receptor-alpha and-beta expression. 175, 683-694.
- WU, Y., XIA, L., ZHOU, Y., XU, Y. & JIANG, X. J. C. P. 2015. Icariin induces osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells in a MAPK-dependent manner. 48, 375-384.
- YAN, L., YINGHUI, T., BO, Y., GANG, Z., XIAN, X. & LU, Z. J. C. B. I. 2011. Effect of calcitonin gene-related peptide on nitric oxide production in osteoblasts: an experimental study. 35, 757-765.
- YIANNAKOPOULOS, C. K., KANELLOPOULOS, A. D., TROVAS, G. P., DONTAS, I. A., LYRITIS, G. P. J. A. O. O. & SURGERY, T. 2008. The biomechanical capacity of the periosteum in intact long bones. 128, 117-120.
- ZENG, X., FENG, Q., ZHAO, F., SUN, C., ZHOU, T., YANG, J. & ZHAN, X. J. P. R. 2018. Puerarin inhibits TRPM3/miR-204 to promote MC3T3-E1 cells proliferation, differentiation and mineralization. 32, 996-1003.
- ZHANG, W., LI, X., LI, H., LU, X., CHEN, J., LI, L., SUN, X., XU, C. J. B. & COMMUNICATIONS, B. R. 2020. 17 $\beta$ -estradiol promotes bone marrow mesenchymal stem cell migration mediated by chemokine upregulation. 530, 381-388.
- ZHAO, R. J. I. J. O. M. S. 2012. Immune regulation of osteoclast function in postmenopausal osteoporosis: a critical interdisciplinary perspective. 9, 825.
- ZOUANI, O. F., RAMI, L., LEI, Y. & DURRIEU, M.-C. J. B. O. 2013. Insights into the osteoblast precursor differentiation towards mature osteoblasts induced by continuous BMP-2 signaling. 2, 872-881.

## PRODUCCIÓN DERIVADA DE ESTA TESIS

### Publicaciones en revistas internacionales con referato:

“Role of estrone on the regulation of osteoblastogenesis”; María Carla Crescitelli; Belén Rauschemberger; Sabrina Cepeda; Marisa Sandoval; Virginia Massheimer.

*Molecular And Cellular Endocrinology* ; Elsevier Ireland Ltd. 2019 vol. 498, 1de Diciembre 2019, 110582 - .issn 0303-7207.

### Presentaciones a congresos cuyos resúmenes fueron publicados en revistas científicas con referato:

- “Bone actions of the forgotten estrogen, Estrone”, poster. Crescitelli MC, Rauschemberger MB, Massheimer V. Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias (SAIC, SAIB, SAI, SAA, SAB, SAB, SAFE, SAFIS, SAH, SAP), Buenos Aires, 13 al 17 noviembre 2017. *Medicina*,77:282
- “Impacto óseo de Estrona: el estrógeno olvidado”, comunicación oral. Crescitelli MC, Rauschemberger MB, Massheimer V. XII Congreso FASEN 2018 Mar del Plata, 5 al 7 septiembre del 2018. *RAEM*, 0326/4610.
- “Hueso-Estrona: una relación no tan conocida”, comunicación oral. Crescitelli MC, Rauschemberger MB, Massheimer V. 2do Congreso Argentino de Osteología AAOMM – SAO, Buenos Aires, 10 al 12 de octubre del 2018. *Actualizaciones en Osteología*, 1669/8975.
- “Acciones similares de estrona a nivel óseo y vascular: ¿Riesgo o beneficio?”, comunicación oral. Crescitelli MC, Rauschemberger MB, Massheimer V. Congreso Argentino de Osteología AAOMM, Buenos Aires, 30 de Octubre al 1 de Noviembre del 2019. *Actualizaciones en Osteología*, 1669-8975.
- “Similar effects of estrone on vascular and bone tissues: Risk or benefit?” Presentación oral. Crescitelli MC, Rauschemberger MB, Massheimer V. Reunión Conjunta de Sociedades de Biociencias, Mar del Plata, 13 al 16 de Noviembre del 2019. *Medicina*, 77:282.
- “Similar actions of estrone at bone and vascular level”; ICE 2021 Virtual: 19th International Congress of Endocrinology 24-28 febrero 2021 Crescitelli MC, Rauschemberger MB, Massheimer V. <http://www.raem.org.ar/numeros/2021-vol58/suplemento/icel-virtual-2021-abstracts-ebook.pdf>