



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Tesis de Doctor en Bioquímica

**“REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN
VASCULAR POR PROGESTERONA:
MECANISMOS CELULARES Y
MOLECULARES”**

PABLO HERNAN CUTINI

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

-2010-



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Tesis de Doctor en Bioquímica

**“REGULACIÓN DE LA FUNCIÓN
VASCULAR POR PROGESTERONA:
MECANISMOS CELULARES Y
MOLECULARES”**

PABLO HERNAN CUTINI

BAHÍA BLANCA

ARGENTINA

-2010-

Director de Tesis

Dra. Virginia Massheimer

Universidad Nacional del Sur



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR
Secretaría General de Posgrado y Educación Continua

La presente tesis ha sido aprobada el/...../..... , mercedo
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 de esta Universidad durante el periodo comprendido entre el 26 de abril de 2005 y el 25 de octubre de 2010, bajo la dirección de la Dra. Virginia Massheimer, Profesor Asociado de la Cátedra de Bioquímica Clínica II e Investigador Independiente del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET).

28 de diciembre de 2010

Bioq. Pablo Hernan Cutini

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

“Estoy satisfecho con el misterio de la eternidad de la vida y con el conocimiento de la maravillosa estructura de la existencia. Con el humilde intento de comprender aunque más no sea una porción diminuta de la Razón que se manifiesta en la naturaleza”

Albert Einstein

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional del Sur y al Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, por brindarme la oportunidad de realizar mi carrera de formación Doctoral en este prestigioso ámbito académico.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y técnicas (CONICET), por otorgarme una Beca de estudio de postgrado, sin la cual no hubiese podido llevar a cabo mis investigaciones para este trabajo de Tesis.

A la Dra. Virginia Massheimer, por su disposición para ayudarme siempre y haberme dado la oportunidad de formarme científicamente. Por su paciencia y su calidad humana. Por su espíritu crítico. Por el esfuerzo que dedicó para conseguir todo lo necesario para el desarrollo de esta Tesis.

A la Dra. Juana Sellés, por los valiosos conocimientos y valores que me dejó durante los primeros pasos de mi formación doctoral. Por su gran entusiasmo en el compromiso por la ciencia.

A mis abuelos y a mis padres, por acompañarme con ternura y amor en todo momento. A ellos les debo mi admiración y todo lo que soy.

A mi hermana Liliana, por su inmensa compañía y ánimo que me ayudaron a iniciarme en el mundo de la investigación.

A todos mis compañeros de trabajo, Belén, Adrián, Marisa y Nelly, por estar siempre presentes, tanto en las buenas como en las malas. Por las charlas amenas y las risas compartidas.

Y a todas las personas que de alguna manera me ayudaron para que esta Tesis sea posible.

Resumen

El sistema vascular es regulado por numerosos factores y hormonas, incluyendo el esteroide ovárico progesterona (Pg). La menopausia es un proceso fisiológico que se caracteriza por el cese de la actividad ovárica con la subsecuente declinación de la producción de estrógenos y Pg. Si bien existe una vasta evidencia en la literatura que reporta los efectos de los estrógenos sobre el sistema vascular, el conocimiento actual sobre la regulación del metabolismo vascular por Pg es menor. En este trabajo de Tesis se investigó la acción de Pg sobre la regulación de eventos celulares y moleculares que participan activamente en la homeostasis vascular.

Empleando tejido aórtico murino como sistema experimental, se demostró que concentraciones fisiológicas de Pg estimulan rápida y significativamente la actividad de las quinasas PKC y MAPK, como así también la producción de óxido nítrico (NO). El incremento en la producción del vasoactivo es dependiente de la participación de MAPK y del calcio intracelular. Este efecto no es mediado por PKC. Pg inhibe significativamente la proliferación de células endoteliales (CE). La preincubación de CE con el compuesto L-NAME (inhibidor de la óxido nítrico sintasa) y el compuesto chelerythrine (inhibidor de PKC) suprime el efecto antiproliferativo de la hormona. Por otro lado, la hormona ejerce un efecto proliferativo sobre células de músculo liso vascular (CMLV) en forma dependiente de la participación de MAPK, PKC y ciclooxygenasa (COX). La acción mitogénica de Pg sobre CMLV se anula cuando el tratamiento hormonal se realiza en presencia de medio de cultivo proveniente de CE tratadas previamente con la hormona. Se obtuvo evidencia de que Pg estimula la migración de CE y CMLV. En CE, Pg inhibe

la agregación plaquetaria a través de un mecanismo de acción que involucra la participación del NO derivado de endotelio. Se observó un incremento de la apoptosis de CE cuando las mismas se tratan con Pg, aunque el esteroide revierte el efecto apoptótico inducido por peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Además, la hormona previene la adhesión de monocitos sobre CE inducida por el agente proinflamatorio LPS, sin embargo, no afecta la adhesión basal de los mismos. El incremento de los niveles de ARNm de las moléculas de adhesión P-selectina, E-selectina y VCAM-1 inducidas por LPS se reducen parcialmente cuando las CE son pretratadas con Pg. Tratamientos conjuntos de 17-β-estradiol (E₂) con Pg potencian la producción de NO inducida por cada hormona. En cambio, el tratamiento en simultáneo con ambos esteroides invierte el efecto individual de cada hormona sobre proliferación de CMLV.

En conjunto, los datos reportados en este trabajo de Tesis aportan conocimientos sobre el rol de Pg en la homeostasis vascular. Se obtuvo evidencia de que progesterona regula el metabolismo vascular a través de un mecanismo de acción que involucra efectos genómicos y no genómicos, modulando la producción de óxido nítrico, la adhesión celular, la proliferación y la migración celular, la apoptosis, y la expresión de moléculas de adhesión celular.

Summary

The vascular system is regulated by several factors and hormones, including the ovarian steroid progesterone (Pg). Menopause is a physiological process characterized by the cessation of ovarian activity and subsequent decline of estrogen and progesterone production. Although there is much evidence in the literature about the effects of estrogen on vascular system, the current knowledge on the regulation of vascular metabolism by Pg is scarce. In this Thesis we investigated the effect of Pg on the regulation of cellular and molecular events that are actively involved in vascular homeostasis.

Employing murine aortic tissue as experimental system we showed that physiological concentrations of Pg rapidly and significantly stimulated PKC and MAPK activities, as well as nitric oxide (NO) production. The hormonal stimulation of vasoactive synthesis was dependent on MAPK and intracellular calcium transduction systems, but did not involve PKC participation. On cellular growth, Pg exhibited an antiproliferative effect in endothelial cells (EC) and mitogenic action on vascular smooth muscle cells (VSMC). Preincubation of EC with the compound L-NAME (nitric oxide synthase inhibitor) or with the compound chelerythrine (PKC inhibitor) suppressed the antiproliferative effect of the hormone. On the other hand, the mitogenic action on VSMC was dependent on MAPK, PKC and cyclooxygenase (COX) participation. In addition, the proliferative effect on VSMC by Pg was suppressed in the presence of culture medium obtained from EC pretreated with the hormone. We also found that Pg stimulated EC and VSMC mobilization and migration. When platelet activation was studied, Pg inhibited platelet aggregation through a mechanism of action that involves the steroid

stimulation of endothelium NO production. The hormone modulated EC apoptosis. Although an increase in EC apoptosis was detected after Pg treatment, the steroid reversed the hydrogen peroxide-induced apoptotic effect. In addition, the hormone prevented LPS-induced monocytes adhesion to EC. However, Pg did not affect basal level of monocytes adhesion. The addition of LPS to EC enhanced P-selectin, E-selectin and VCAM-1 mRNA expression. This effect was partially suppressed when the EC were pretreated with Pg prior to LPS exposure. Finally, we provided evidence that combined treatment with 17- β -estradiol and Pg potentiated the stimulatory effect of each steroid on NO production. In contrast, simultaneous treatment with both steroids reversed the individual effect of each hormone on VSMC proliferation.

Overall, the data reported in this thesis contribute to the knowledge of the role of Pg in vascular homeostasis. We obtained evidence that progesterone regulates the vascular metabolism through a mechanism of action that involves genomic and non genomic effects, modulating nitric oxide production, cell proliferation and migration, apoptosis, and leukocyte adhesion.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	5
1. BIOSÍNTESIS, METABOLISMO Y FUNCIÓN DE PROGESTERONA	6
1.1. Menopausia.....	9
2. MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS HORMONAS ESTEROIDES	10
2.1. Efectos genómicos y no genómicos.....	10
2.2. Integración de eventos genómicos y no genómicos	13
2.3. Receptor de progesterona	13
2.4. Vías de señalización intracelular	16
2.4.1. Proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs)	16
2.4.2. Sistema de fosfolipasa C (PLC)/proteína quinasa C (PKC).....	18
2.4.3. El calcio como segundo mensajero intracelular	20
3. FUNCIÓN VASCULAR.....	21
3.1. Estructura de la arteria	21
3.2. Compuestos vasoactivos	24
3.3. Moléculas de adhesión celular	28
3.4. Muerte celular: apoptosis y necrosis	31
4. DISFUNCIÓN VASCULAR	32
4.1. Proceso de formación de la placa ateromatosa	33
5. TERAPIA HORMONAL DE REEMPLAZO	37
OBJETIVOS	42
METODOLOGÍA	45

1. SISTEMAS EXPERIMENTALES	46
1.1. SISTEMA EXPERIMENTAL I: anillos de aorta de rata	46
1.1.1. Animales utilizados	46
1.1.2. Obtención de anillos de aorta de rata	46
1.1.3. Tratamientos <i>in vitro</i> de los anillos de aorta de rata	47
1.2. SISTEMA EXPERIMENTAL II: cultivos de células endoteliales y células de músculo liso vascular	48
1.2.1. Tratamientos <i>in vitro</i> de los cultivos de células endoteliales y células de músculo liso vascular	50
2. ENSAYOS REALIZADOS.....	51
2.1. Medición de actividades enzimáticas de PKC y MAPK	51
2.1.1. Obtención de homogenados a partir de aorta de rata sin tratamiento hormonal previo.....	51
2.1.2. Obtención de homogenados a partir de aorta de rata con tratamiento hormonal previo.....	53
2.1.3. Medición de la actividad enzimática de PKC	53
2.1.4. Medición de la actividad enzimática de MAPK	54
2.2. Medición de la producción de óxido nítrico.....	55
2.2.1. Medición de la producción de óxido nítrico en anillos de aorta de rata	55
2.2.2. Medición de la producción de óxido nítrico en cultivos primarios de células endoteliales	56
2.3. Medición de la proliferación celular	57
2.3.1. Ensayo de proliferación de células de músculo liso vascular utilizando medio de cultivo condicionado	58
2.4. Ensayo de migración celular.....	58

2.5. Ensayo de agregación plaquetaria	60
2.5.1. Obtención de plasma pobre en plaquetas y plasma rico en plaquetas ..	61
2.5.2. Ensayo de agregación plaquetaria.....	61
2.6. Ensayo de apoptosis celular	64
2.6.1. Ensayo de “DNA laddering”	64
2.6.2. Ensayo de apoptosis por marcación con [³ H]-timidina	64
2.7. Ensayo de RT-PCR	66
2.8. Ensayo de adhesión de monocitos sobre células endoteliales en cultivo.....	67
2.8.1. Asilamiento de células mononucleares	67
2.8.2. Adhesión de monocitos a células endoteliales en cultivo	70
2.8.3. Ensayo de viabilidad celular con Azul Tripan.....	71
2.8.4. Tinción con solución de Giemsa	71
2.9. Análisis estadístico de los datos obtenidos.....	72
RESULTADOS.....	73
1. ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN HORMONAL.....	74
1.1. Efectos rápidos, no genómicos de progesterona	74
1.2. Efectos genómicos de progesterona.....	90
1.3. Interacción entre efectos genómicos y no genómicos de progesterona	101
2. EFECTOS CELULARES DE PROGESTERONA.....	106
2.1. Efecto de progesterona sobre proliferación de células de músculo liso vascular en presencia de medio de cultivo de células endoteliales	107
2.2. Estudio del efecto de progesterona sobre la agregación plaquetaria	108
2.3. Estudio del efecto de progesterona sobre la migración celular	113

2.4. Estudio del efecto de progesterona sobre la apoptosis de células endoteliales.....	118
2.5. Estudio del efecto de progesterona sobre la adhesión de monocitos a células endoteliales.....	123
3. INTERACCIONES HORMONALES	129
DISCUSIÓN.....	133
CONCLUSIONES.....	154
ABREVIATURAS	157
REFERENCIAS	159
APÉNDICE.....	181
PUBLICACIONES ORIGINADAS EN EL PERIODO DE FORMACIÓN DOCTORAL	182

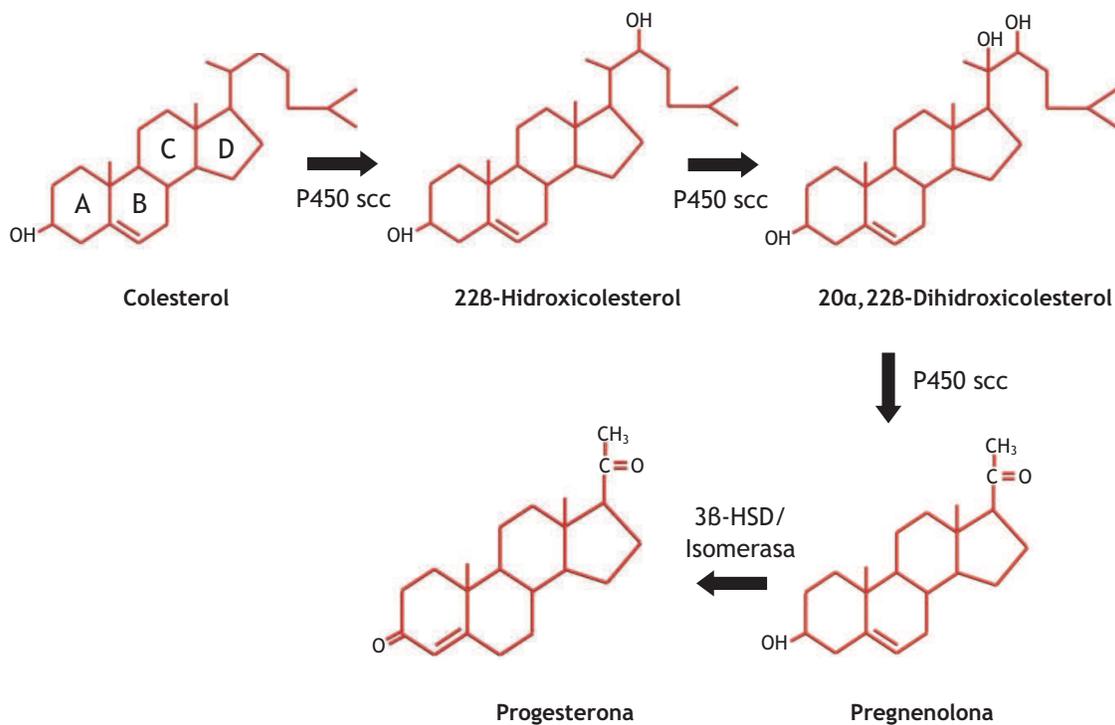
INTRODUCCIÓN

1. BIOSÍNTESIS, METABOLISMO Y FUNCIÓN DE PROGESTERONA

La progesterona (Pg) es una hormona esteroide sintetizada por las gónadas (ovarios y testículos), la corteza adrenal (zona glomerular y fasciculata) y en mujeres por la placenta durante el embarazo (Lo y Lamb, 2004; Rhen y Cidlowski, 2004; Strauss, 2004). Al igual que todas las hormonas esteroides, Pg deriva del colesterol y su estructura química básica comprende al ciclopentanoperhidrofenantreno, formado por tres anillos de ciclohexanos (A, B y C) y un anillo de ciclopentano (D) (Bloch, 1965).

El primer paso de la esteroidogénesis ocurre en la mitocondria. El transporte del colesterol hacia esta organela es el paso limitante de la síntesis de Pg. El colesterol es transportado desde la membrana externa de la mitocondria hacia la interna principalmente por una proteína transportadora específica (StAR). En la membrana interna se encuentra anclado el complejo trifuncional monooxigenasa del sistema P450_{scc} que convierte el colesterol en pregnenolona a través de dos pasos secuenciales de hidroxilación y un clivaje de cadena lateral. Luego, pregnenolona es convertida a Pg por la enzima 3-β-hidroxiesteroide dehidrogenasa/isomerasa (3βHSD), asociada al retículo endoplasmático liso (Stocco y Clark, 1996; Niswender, 2002; Uribe y col., 2003; Miller, 2007). A partir de este punto, en los tejidos esteroidogénicos Pg puede ingresar a una multitud de vías metabólicas que dan lugar a una gran variedad de hormonas esteroides. Pg es precursor del mineralocorticoide aldosterona, del glucocorticoide cortisol y del esteroide sexual androstenediona, el cual puede a su vez convertirse en testosterona, estrona y 17-β-estradiol (E₂). Una vez sintetizada, Pg es liberada a la circulación sanguínea y transportada a los tejidos diana unida con alta afinidad a la

globulina de unión a corticosteroides (CBG) y con baja afinidad a albúmina. Un pequeño porcentaje de la hormona permanece en su forma libre, la cual es biológicamente activa. La Pg es metabolizada en el hígado donde es convertida a pregnandiol, y se excreta a través de la orina conjugada con ácido glucurónico.



Biosíntesis de Pg. A partir del colesterol se sintetiza la pregnenolona por acción del complejo enzimático P450scc (dos pasos de hidroxilación y un clivaje de cadena lateral) y luego pregnenolona es convertida a Pg por actividad de la 3βHSD/isomerasa.

En mujeres, Pg es comúnmente reconocida como la “hormona del embarazo” debido al rol vital que ejerce en la preparación del endometrio para la implantación del óvulo fertilizado, gestación y desarrollo normal del feto. Interviene en la maduración del epitelio mamario, en la modulación de la pulsatilidad de las hormonas liberadoras de gonadotrofinas hipofisarias, en la

conducta sexual y el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios (Carmina y col., 2004).

Además, regula otros tejidos considerados no clásicos ejerciendo importantes efectos en un amplio rango de sistemas fisiológicos tales como el sistema cardiovascular, el sistema nervioso central y el inmunológico (Graham y Clarke, 1997; Simoncini y col., 2003; Oettel y Mukhopadhyay, 2004; Singh, 2005; Szekeres-Bartho y col., 2005; Jamnongjit y Hammes, 2006).

La síntesis ovárica de Pg se produce durante el periodo fértil en el cuerpo lúteo en respuesta al estímulo de la hormona luteinizante (LH). La síntesis se mantiene aumentada por 4 - 5 días, y en ausencia de fecundación el cuerpo lúteo sufre regresión (luteólisis) con la consecuente disminución de la síntesis de Pg. La principal acción biológica de Pg durante la fase luteínica del ciclo ovárico es estimular la actividad secretoria del endometrio, aumentar la viscosidad del moco cervical, disminuir las contracciones uterinas y participar en la preparación del útero para la implantación del óvulo fecundado. A nivel central y en forma conjunta con 17- β -estradiol, Pg inhibe la síntesis de las gonadotrofinas hipofisarias por retroalimentación negativa sobre el eje hipotálamo-hipofisis. Los niveles plasmáticos de Pg son relativamente bajos durante la fase folicular preovulatoria del ciclo menstrual (3.5 nmol/l) y aumentan luego de la ovulación alcanzando un máximo en la fase lútea media (32 a 64 nmol/l). En la menopausia, la secreción ovárica de Pg disminuye a niveles inferiores a 1 nmol/l como consecuencia del cese de los ciclos ováricos, persistiendo la síntesis suprarrenal.

En caso de fertilización, la producción de Pg luteal es sostenida por la gonadotrofina coriónica humana (hCG). Este evento es vital para el establecimiento y mantenimiento del embarazo temprano. A partir de la octava

semana de embarazo, la producción luteal de Pg declina y la placenta será la principal fuente de Pg a partir de este momento hasta finalizar el embarazo.

En hombres adultos, Pg está involucrada en la espermiogénesis, en la reacción acrosómica del espermatozoide y en la biosíntesis de andrógenos que tiene lugar en las células de Leydig. Los niveles de Pg son similares a los de las mujeres durante la fase folicular del ciclo menstrual (Oettel y Mukhopadhyay, 2004).

Progesterona juega un papel muy importante en muchas funciones corporales. Se han localizado receptores de Pg (PgR) en el cerebro (Luetjens y col., 2006), en timo (Ishibashi y col., 2003), en el sistema cardiovascular (Nakamura y col., 2005), en glándulas mamarias (Russo y col., 1999; Luetjens y col., 2006), en el tracto reproductor femenino: útero, placenta, ovarios, vagina y cérvix (Christow y col., 2002) y masculino: testículos, próstata y vesículas seminales (Williams y col., 2001; Luetjens y col., 2006). También se ha demostrado la presencia del PgR en tejido óseo (MacNamara y col., 1995), páncreas (Friess y col., 1991), tracto gastrointestinal (Franz y col., 1996), vesícula biliar y uretra (Blakeman y col., 2000, Celayir y col., 2002).

En la actualidad, se considera que los vasos sanguíneos constituyen un tejido diana para los esteroides sexuales. Se ha demostrado la existencia de receptores de Pg y estrógenos tanto en células endoteliales (CE) y células de musculo liso vascular (CMLV) (Joswig y col., 1999; Vazquez y col., 1999).

1.1. Menopausia

La menopausia (del griego *mens* que significa “mensualmente” y *pausi* que significa “cese”) es un estado fisiológico de la mujer que ocurre en promedio entre

los 42 y los 60 años. Se caracteriza por el cese de los ciclos menstruales y se correlaciona con la declinación de la función ovárica.

En la etapa postmenopáusica los niveles de 17- β -estradiol y Pg disminuyen drásticamente. El principal estrógeno en circulación es la estrona, que se genera por conversión periférica a partir de precursores suprarrenales (androstenediona y testosterona) (Morales y col., 1995; Koledova y Khalil, 2007).

Una gran variedad de síntomas y manifestaciones clínicas caracterizan a la menopausia. Los sofocos representan unos de los signos vasomotores más comunes de este periodo. A estos se suman atrofia del aparato genitourinario, sequedad en la piel, adelgazamiento de la epidermis y cambios emocionales como ansiedad, irritabilidad e insomnio. Además de estas alteraciones, hay dos situaciones clínicas que comprometen la salud de la mujer menopáusica que son la pérdida de masa ósea y los trastornos cardiovasculares que aumentan el riesgo de padecer osteoporosis y enfermedades cardiovasculares (ECV) respectivamente. Las ECV más frecuentes de este periodo son insuficiencia coronaria, hipertensión, aterosclerosis, infarto agudo de miocardio e infarto cerebral (Manson y Martin, 2001; Joffe y col., 2003; Peeyananjarassri y Baber, 2005).

2. MECANISMO DE ACCIÓN DE LAS HORMONAS ESTEROIDES

2.1. Efectos genómicos y no genómicos

Mayoritariamente, Pg y otras hormonas esteroides median sus efectos biológicos regulando la expresión de genes diana luego de la unión a receptores

citósolicos/nucleares, los cuales actúan como factores transcripcionales inducibles por ligandos (Beato, 1989; Beato y col., 1996; Beato y Klug, 2000). Este representa el mecanismo de acción clásico de las hormonas esteroides. La naturaleza lipídica de las hormonas esteroides les permite difundir pasivamente al interior de la célula, donde se unen a su receptor específico. En el citoplasma, los receptores están asociados con proteínas adaptadoras formando un complejo inactivo. La unión de la hormona al dominio de unión del ligando induce una modificación conformacional del receptor, permitiendo la dimerización del receptor y la disociación de las proteínas adaptadoras, induciendo la translocación del complejo hormona-receptor al núcleo donde se une a regiones del ADN denominadas elementos de respuesta a los hormonas, localizadas en la región promotora de los genes efectores, iniciando así su transcripción (Godowski y Picard, 1989; Beato, 1989; Pratt y Toft, 1997).

Sin embargo, no todos los efectos de las hormonas esteroides son mediados por control directo de la expresión génica. También se sabe que las hormonas esteroides pueden actuar a través de un mecanismo de acción alternativo, ejerciendo efectos significativamente rápidos, ocurriendo en cuestión de segundos y/o minutos (Losel y col., 2003; Falkenstein y col., 2000; Norman y col., 2004). Se han empleado diferentes términos para distinguir a este mecanismo de acción no convencional, siendo el más popular la denominación de efecto no genómico o no transcripcional. Estos efectos rápidos se atribuyen a la activación de vías de señalización y sistemas de segundos mensajeros intracelulares activados probablemente a nivel de membrana plasmática o bien por receptores citoplasmáticos que se asocian a complejos de señalización. Uno de los argumentos más convincentes a favor de la presencia de acciones no nucleares (no genómicas)

propone la localización de un pool de receptores para hormonas esteroides a nivel de la membrana celular (Pietras y Szego, 1977; Pietras y Szego, 1980; Blackmore y col., 1991; Watson, 1999; Filardo y col., 2000; Harrison y col., 2000; Cordoba y Beconi, 2001; Zhu y col., 2003). En contraste con el mecanismo de acción genómico, estos efectos rápidos no son compatibles con la síntesis de ARN y proteínas, por lo tanto son insensibles a inhibidores de la transcripción o de la síntesis de proteínas, y pueden ser reproducidos por el uso de hormonas esteroides acopladas a moléculas impermeables a la membrana celular. Además, algunos de estos efectos inmediatos se observan en membranas celulares aisladas o en células carentes de núcleo (Revelli y col., 1998; Losel y col., 2003).

En 1942, Hans Selye fue el primero en reportar un efecto rápido de Pg (Selye, 1942). Desde esa fecha, hasta el presente, una gran cantidad de efectos rápidos de Pg se han descrito en mamíferos y anfibios involucrando la participación de una gran diversidad de vías de señalización y sistemas de segundos mensajeros intracelulares (Bielefeldt y col., 1996; Ehring y col., 1998; Maller, 2001; Bagowski y col., 2001; Peluso y col., 2001; Thomas y col., 2002; Zhu y col., 2003; Luconi y col., 2004; Kaur y col., 2007; Schumacher y col., 2007; Fu y col., 2008; Blackmore, 2008)

Históricamente dos modelos se han estudiado exhaustivamente para analizar las acciones no genómicas de Pg: la reacción acrosómica del espermatozoide humano (Blackmore, 1993) y la inducción de la maduración oocítica en *Xenopus laevis* (Merriam, 1971; Schorderet-Slatkine y Drury, 1973), las cuales representan unas de las acciones rápidas de hormonas esteroides más caracterizadas y extensivamente estudiadas.

2.2. Integración de eventos genómicos y no genómicos

Muchas vías de señalización intracelular convergen entre sí y activan factores de transcripción nucleares, sugiriendo que la activación rápida de sistemas de señales intracelulares podría finalmente afectar el patrón de expresión génica de la célula. Esto permitió formular la hipótesis de que las hormonas esteroides podrían ejercer su acción a través de un mecanismo en dos pasos que integraría las acciones genómicas y no genómicas. Este modelo fue inicialmente descrito para aldosterona y propone que los efectos rápidos, no genómicos inducidos por las hormonas esteroides, activarían sistemas de señalización y segundos mensajeros intracelulares los cuales convergerían en la síntesis de factores transcripcionales requeridos para promover un efecto genómico (Wehling y col., 1997, Christ y Wehling, 1998).

Por lo tanto, las hormonas esteroides pueden ejercer sus acciones biológicas a través de un mecanismo de acción clásico asociado a la regulación de la transcripción génica, un mecanismo rápido, no genómico, responsable de las respuestas celulares inmediatas, o a través de la conjunción de acciones genómicas y no genómicas.

2.3. Receptor de progesterona

El PgR es una proteína perteneciente a la superfamilia de receptores nucleares los cuales funcionan como factores de transcripción dependientes de ligando (Ellmann y col., 2009). El PgR fue descubierto en 1970 como una proteína

con alta afinidad de unión a Pg cuyo gen se localiza en el brazo largo del cromosoma 11 (11q22.1) (Sherman y col., 1970). El mismo ha sido clonado, secuenciado y expresado funcionalmente (Loosfelt y col., 1986; Misrahi y col., 1987; Kastner y col., 1990; Vegeto y col., 1993; Mulac-Jericevic y col., 2000; Ismail y col., 2003; Li y O'Malley, 2003). Al igual que todos los receptores para hormonas esteroides, el PgR está estructuralmente organizado en diferentes módulos: un dominio de unión al ADN altamente conservado en la región central, un dominio de unión al ligando en el extremo C-terminal y un dominio N-terminal. Existen dos subdominios que llevan a cabo funciones de activación (AFs): en el dominio N-terminal se encuentra AF-1 y en la zona de unión al ligando se localiza AF-2. Mientras que los dominios de unión al ADN y al ligando son altamente conservados, la región N-terminal es significativamente variable y de crucial importancia para la función transcripcional de los receptores. Aquí se encuentran identificadas las zonas de unión de moléculas corepresoras o coactivadoras y proteínas adaptadoras que le confieren mayor eficacia, estabilidad y especificidad a la respuesta transcripcional. (Nilsson y col., 2001).

Se han identificado dos isoformas principales del receptor: PgR-A y PgR-B. Ambas isoformas se transcriben del mismo gen aunque son controlados por promotores diferentes (Hirata y col., 2003). El PgR-B posee 165 residuos de aminoácidos adicionales en el extremo N-terminal (Kastner y col., 1990; Williams y Sigler, 1998; Hall y McDonnell, 1999; Nakamura y col., 2005; Bain y col., 2007). En general ambas isoformas son coexpresadas en vivo en muchos tipos celulares (De Vivo y col., 2002), aunque sus niveles relativos de expresión pueden variar en función del tipo celular, de la etapa del ciclo sexual femenino y en ciertas condiciones patológicas (Winneker y col., 2008). También se ha propuesto la existencia de una

tercera variante del receptor clásico de Pg: el PgR-C, originalmente descrito como una proteína de 60 kDa truncada en el extremo N-terminal (Wei y col., 1990; Condon y col., 2006). Se ha reportado PgR-C no sería un factor de transcripción funcional, sino que actuaría inhibiendo la transactivación de PgR-B (Wei y col., 1997).

Investigaciones llevadas a cabo en los últimos años han revelado la posible existencia de otros receptores capaces de responder a Pg a los que se les atribuye las acciones no genómicas. Una de esas entidades proteicas son los denominados “receptores de Pg de membrana” (mPR) y la otra proteína es denominada “componente de membrana 1 del receptor de Pg” PGMRC1. Los receptores mPR pertenecen a una gran familia de proteínas denominada familia de receptores de progestinas y adiponectina Q (PAQRs). Estos receptores poseen una estructura de 7 dominios transmembrana acoplados a proteínas G. Se han identificado tres tipos principales de receptores mPRs (α , β , γ δ) los cuales fueron clonados de ovarios de peces y posteriormente identificados en una variedad de especies (Zhu y col., 2003). Estudios recientes han propuesto que mPR α cumple importantes funciones fisiológicas en una gran variedad de tejidos reproductivos (Patiño y Thomas, 1990; Thomas y col., 2002; Zhu y col., 2003). La proteína de membrana PGRMC1 fue aislada por primera vez en hígado de cerdo. PGMRC1 tiene una afinidad de unión moderadamente alta hacia Pg aunque también puede unir otras moléculas (Falkenstein y col., 1996; Meyer y col., 1996; Meyer y col., 1998; Cahil, 2007).

2.4. Vías de señalización intracelular

Las vías de señalización intracelular y los sistemas de segundos mensajeros intracelulares representan las principales rutas de comunicación entre la membrana plasmática y los sitios diana regulatorios presentes en varios compartimentos intracelulares. La activación secuencial de proteínas quinasas representa un mecanismo común de transducción de la señal en muchos procesos bioquímico/celulares. Hasta la fecha se han descrito una gran diversidad de vías de señalización, incluyendo entre las más estudiadas la vía de las MAPKs, PLC/PKC, PI3K/Akt, AC/AMPc/PKA, GC/GMPc/PKG y los sistemas mensajeros del calcio y el NO. Entre los sistemas de señalización intracelular, las MAPKs, la PKC, el calcio y el óxido nítrico (NO) ejercen una participación activa en la bioquímica de la pared vascular.

2.4.1. Proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs)

Las MAPKs representan una familia de proteínas quinasas que pueden ser activadas por una amplia variedad de estímulos, y median la transducción de la señal desde la superficie celular al núcleo. En combinación con otras vías mensajeras pueden alterar el estado de fosforilación de numerosas proteínas incluyendo factores de transcripción, proteínas del citoesqueleto y enzimas. Las MAPKs regulan la expresión génica, el metabolismo, la división celular, la diferenciación celular y la supervivencia celular (Minden y col., 1994; Lenormand y col., 1998; Schaeffer y Weber, 1999). La activación de la cascada de señales de

MAPKs por hormonas esteroides ha sido caracterizada en diversos tejidos (Pearson y col., 2001). Las MAPKs operan en módulos compuestos por tres proteínas quinasas que fosforilan y activan a otras MAPKs secuencialmente: las MAPKKK (MAP quinasa quinasa quinasa) activa a MAPKK (MAP quinasa quinasa) y esta última activa a una MAPK (MAP quinasa) efectora multifuncional. La activación de estas quinasas tiene lugar mediante fosforilación dual en residuos de aminoácidos conservados. Se han descrito cuatro módulos principales de cascadas MAPK en mamíferos: las quinasas reguladas por señales extracelulares 1 y 2 (ERK 1/2), el grupo de proteínas p38 MAPKs, las quinasas activadas por estrés o quinasa c-Jun N-terminal (c-JNK/SAPK) y las quinasas reguladas por señales extracelulares 5 (ERK 5) o BMK (Big Mitogen-activated protein Kinase) (Chang y Karin, 2001; Pearson y col., 2001; Davidge y col., 1999; Cowan y Storey, 2003).

Las ERK quinasas 1 y 2 representan unas de las MAPK más estudiadas y participan en la regulación de la diferenciación, el crecimiento y la migración celular. Esta cascada es activada por una amplia variedad de receptores incluyendo receptores acoplados a proteínas G (GPCRs), receptores tirosina quinasa (RTK), integrinas y canales iónicos, y son responsables de la fosforilación de múltiples sustratos dependiendo del estímulo inicial. Un esquema general de activación involucra la activación de RTK por factores crecimiento. La unión del ligando induce la autofosforilación del receptor en residuos de tirosina que promueve el reclutamiento del complejo GRB2-SOS a membrana a través de dominios SH2. La proteína SOS induce la activación de la proteína Ras a través del intercambio de GDP por GTP, Ras activa a Raf y luego Raf fosforila y activa a MKK1 y 2, las cuales fosforilan y activan a ERK 1 y 2. Un efector importante de ERK es el factor de

transcripción NF- κ B, involucrado en las respuestas inflamatorias y control del crecimiento celular (Osmond y col., 2005; Chuderland y Seger, 2005).

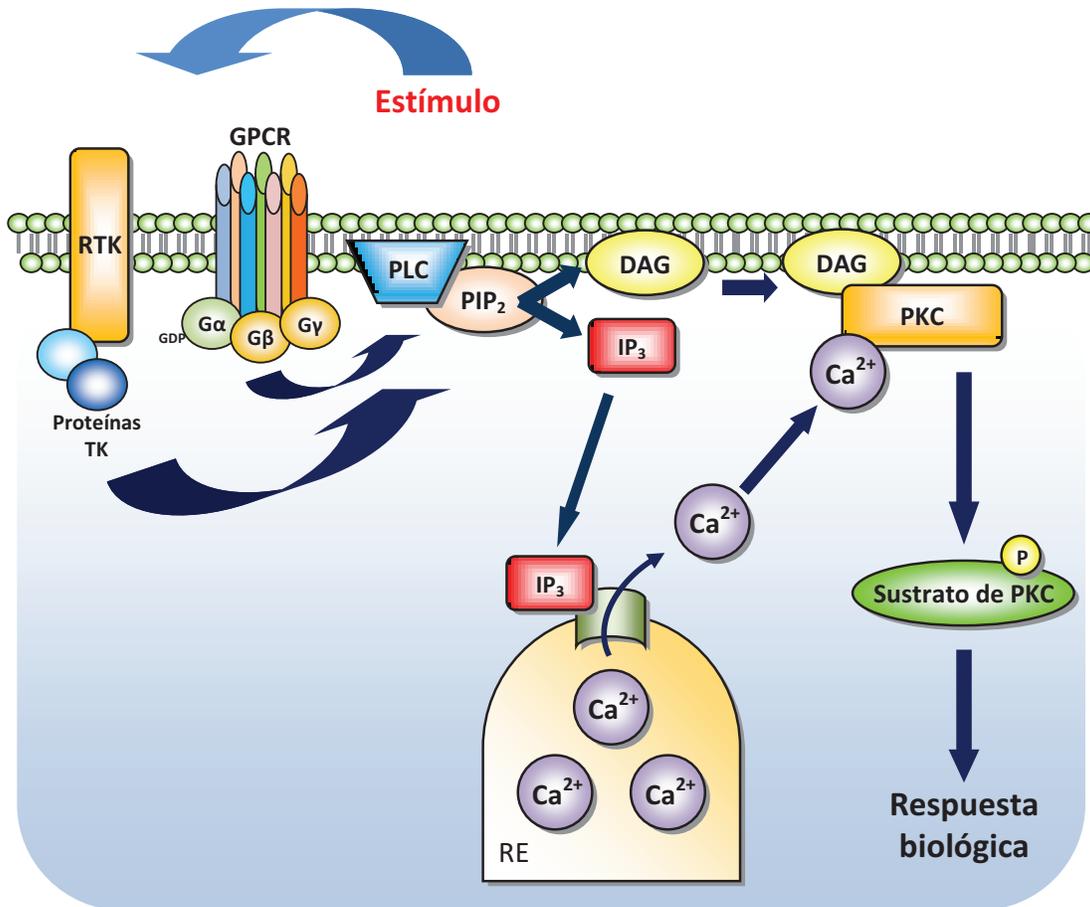
2.4.2. Sistema de fosfolipasa C (PLC)/proteína quinasa C (PKC)

La vía de señalización intracelular dependiente de PLC juega un rol clave en la bioquímica celular de muchas hormonas, factores de crecimiento, neurotransmisores y otros estímulos extracelulares. PLC es una enzima ubicada en la membrana plasmática la cual luego de su activación cataliza la hidrólisis del fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) (Hisatsune y col., 2005). Se han descrito seis clases diferentes de PLC (PLC- β (1-4), PLC- γ (1 y 2), PLC- δ (1, 3 y 4), PLC- ϵ , PLC- ζ y PLC- η (1 y 2)) las cuales difieren en sus mecanismos de regulación. PLC puede activarse a través de GPCRs o receptores con actividad tirosina quinasa (Horowitz y col., 2005). Una vez activada, la PLC hidroliza PIP₂ generando diacilglicerol (DAG) e inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃). El DAG es el activador fisiológico de PKC, mientras que el IP₃ difunde a través del citoplasma y estimula la liberación de calcio del retículo endoplásmico (Hisatsune y col., 2005).

La PKC es una proteína serina/treonina quinasa descubierta por Yasutomi Nishizuka en 1977, cuando identificó en cerebelo bovino y de rata una quinasa cuya actividad era independiente de nucleótidos cíclicos aunque dependiente de lípido y calcio (Inoue y col., 1977; Takai y col., 1977). Se han descrito en la literatura tres subfamilias de PKC en mamíferos, las cuales se diferencian en base a la diferente estructura de las isoformas y en sus distintos requerimientos de activadores. Las isoformas convencionales (β I, β II, γ) requieren de calcio y DAG para su actividad, las isoformas denominadas “novel” (ϵ , δ , η), requieren DAG, aunque no calcio, y

finalmente las isoformas atípicas (η , λ/ι) no requieren de calcio ni DAG. La estructura de la PKC consiste de un dominio catalítico cuya actividad es alostéricamente controlada por un dominio regulatorio (Newton, 2003).

La PKC se localiza en la fracción soluble de las células en su forma inactiva. La unión de DAG y calcio a PKC induce su activación alostérica. La unión del calcio aumenta su afinidad de unión al DAG, mientras que este último incrementa la afinidad de la enzima por lípidos de la membrana. Subsecuentemente, la PKC se transloca hacia la membrana celular donde se une a moléculas de anclaje y fosforila a proteínas efectoras. (Mochly-Rosen, 1995). Para contribuir a la total estabilidad de la PKC y su completa activación es necesario la fosforilación en determinados residuos de aminoácidos (serina, treonina y tirosina) del dominio C-terminal (Le Good y col., 1998; Dutil y col., 1998; Newton, 2003). La activación de PKC promueve la fosforilación de varios sustratos proteicos involucrados en la regulación de una diversidad de eventos celulares y moleculares tales como migración, proliferación y diferenciación celular, contracción, plasticidad neuronal, inmunidad, apoptosis y metabolismo. El rol crucial que cumple esta familia de proteínas tanto en la supervivencia celular como en la apoptosis sugiere que algunas isoformas específicas podrían funcionar como sensores moleculares promoviendo la supervivencia o la muerte de la célula en función de su entorno (Dempsey y col., 2000; Mueed y col., 2005; Xuan y col., 2005).



Sistema clásico de señalización de la vía PLC/PKC.

GPCR: receptor acoplado a proteína G. RTK: receptor con actividad tirosina quinasa; RE: retículo endoplásmico; DAG: diacilglicerol; IP₃: inositol-1,4,5-trifosfato; PIP₂: fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato;

2.4.3. El calcio como segundo mensajero intracelular

El calcio iónico intracelular constituye un importante segundo mensajero responsable de la activación de numerosas proteínas y enzimas dependientes de calcio (calmodulina, troponina, calbindinas, proteínas quinasas y fosfatasas). La concentración de calcio citosólico en situación de reposo es muy baja (10^{-7}M) respecto al calcio en el medio extracelular (10^{-3}M). Ante una señal bioquímica, se producen aumentos transientes del calcio citosólico, muy rápidos (segundos a

minutos) y luego los niveles retornan a su valores basales. El ingreso y salida de calcio de la célula esta estrictamente controlado. El aumento de calcio intracelular se produce por influjo del catión desde el medio extracelular a través de canales de calcio ubicados en la membrana plasmática o por liberación de calcio de los depósitos intracelulares (retículo endoplásmico, mitocondria). La disminución de la concentración de calcio citosólico se produce en forma dependiente de energía, a través de la activación de las bombas de calcio ubicadas en la membrana plasmática (que transportan calcio hacia el medio extracelular) o la bomba de calcio del retículo endoplasmico (que capta el catión hacia el interior del retículo). De esta manera, la concentración de calcio intracelular que aumentó en respuesta a una señal dada, retorna rápidamente a sus niveles basales (Berridge y col., 2003).

3. FUNCIÓN VASCULAR

3.1. Estructura de la arteria

En la estructura de un vaso sanguíneo se reconocen tres capas o tunicas dispuestas en forma concéntrica:

(A) una túnica *íntima*, que es la capa más interna, formada por CE, una lámina basal, tejido conjuntivo subendotelial y la lámina elástica interna, la cual separa esta túnica de la media. El endotelio recubre todo el árbol vascular formando una capa única de CE y se encuentra en contacto directo con los elementos de la sangre.

(B) la túnica *media*, la cual está formada por láminas concéntricas de CMLV, fibras elásticas y de colágeno y la lámina elástica externa. Esta última separa la túnica media de la adventicia. Representa la capa más gruesa en las arterias y tiene menor espesor en las venas.

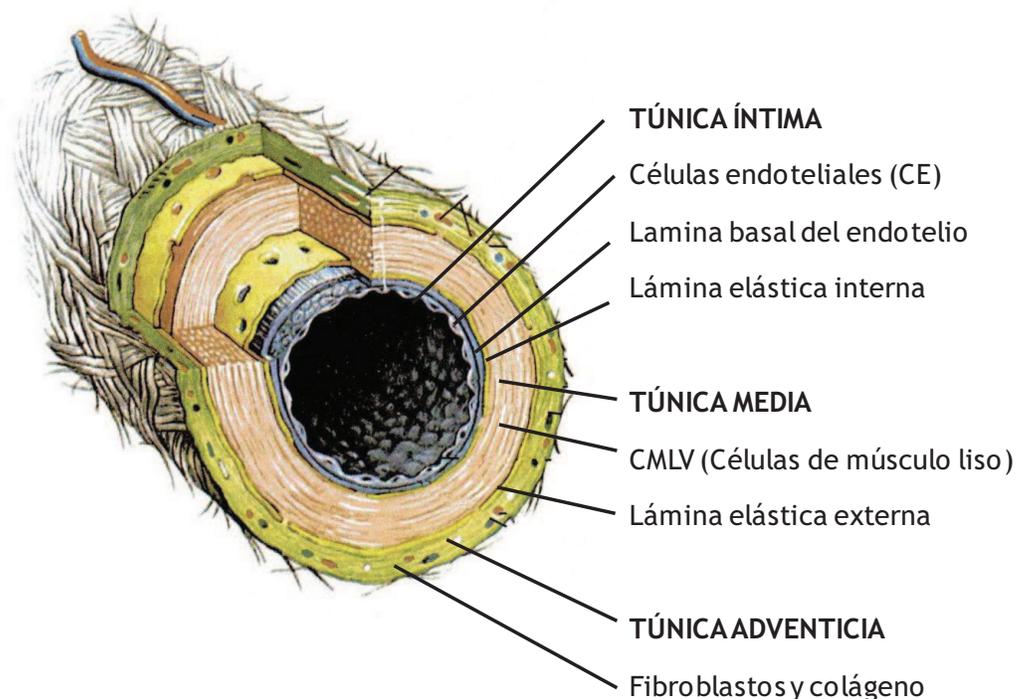
(C) la túnica *adventicia*, el recubrimiento más externo del vaso está formado por tejido conjuntivo laxo compuesto principalmente por fibroblastos y colágeno, nervios y capilares. Esta capa une el vaso al tejido que lo rodea.

El endotelio es un componente metabólico clave de la pared vascular que regula una gran variedad de eventos fisiológicos y respuestas biológicas. Algunos autores lo consideran un verdadero órgano de secreción endócrino. Las CE se caracterizan por poseer una gran capacidad sintética y en general tienen funciones especializadas que dependen de la localización del vaso sanguíneo. El endotelio presenta una gran heterogeneidad, ya sea, tanto en aspectos funcionales como morfológicos, proteínas marcadoras y respuesta a factores de crecimiento. Al igual que la mayoría de las células de los mamíferos, la capacidad de las CE para dividirse es limitada y finalmente entran en un estado de arresto del crecimiento, denominado senescencia (Foreman y Tang, 2003; Rivard y col., 1999).

Las principales propiedades y funciones fisiológicas de las CE son (Bachetti y Morbidelli, 2000):

- regulan el transporte de moléculas entre el lumen y el espacio subendotelial.
- juegan un papel vital en el control de la hemostasia a través de la síntesis de factores de la coagulación, de la fibrinólisis y de compuestos vasoactivos que regulan la agregación plaquetaria (AP) tales como NO, prostaciclina, prostaglandinas (PG) y tromboxanos (Tx).

- funcionan como un órgano inmunocompetente, presentando antígenos a linfocitos T.
- regulan el tono vascular a través de la síntesis de sustancias con propiedades vasoactivas (NO, PG, endotelina, angiotensina).
- secretan factores de crecimiento que participan en la neovascularización y en el control del crecimiento de las CMLV. Tienen la capacidad de proliferar y portar nuevas células para sustituir CE dañadas o exfoliadas y para proporcionar nuevos vasos sanguíneos (angiogénesis).
- regulan la perfusión y permeabilidad en la microcirculación.
- poseen actividad fagocítica selectiva.
- sintetizan fibronectina, laminina, colágeno, elastina y otros componentes del subendotelio.



Representación esquemática de la estructura de las grandes arterias. Se diferencian tres capas principales: la túnica íntima, la túnica media y la túnica adventicia.

La superficie de las CE está cubierta de numerosas caveolas, las cuales son pequeñas invaginaciones de membrana ricas en colesterol y glicoesfingolípidos que proveen sitios de ensamble para componentes de sistemas de señalización intracelular (Kim y col., 1999; Su y col., 2003; McDonald y col., 1997).

Cabe destacar la presencia de los cuerpos de Weibel-Palade, organelas características de las CE que producen y almacenan la molécula de adhesión P-selectina y la glucoproteína conocida como Factor de von Willebrand (FvW) que participan activamente en la hemostasia y en la inflamación. Además contienen otros compuestos tales como IL-8, endotelina 1, angiopoyetina 2, eotaxina 3, osteoprotegerina y tetraspanina.

El otro tipo celular de crucial importancia del sistema vascular son las CMLV. Son células uninucleadas que poseen propiedades de distensibilidad, fuerza, auto soporte, rigidez, elasticidad y constricción concéntrica de los vasos. Sintetizan y secretan elastina, colágeno, mucopolisacáridos y otros componentes que forman parte de la matriz extracelular. Las CMLV existen en un vaso sanguíneo normal en un estado quiescente diferenciado con bajo grado de proliferación y recambio y son las responsables de mantener el tono vascular.

3.2. Compuestos vasoactivos

El endotelio es el principal regulador de la fisiología vascular a través del control de la producción de compuestos vasoactivos tales como NO, prostaciclina (PGI_2) y endotelina los cuales contribuyen a mantener el tono vascular y las propiedades no trombogénicas de la superficie endotelial (Inagami y col., 1995). Acetilcolina es un agonista natural del endotelio, que induce vasorelajación como

consecuencia de la estimulación de la óxido nítrico sintasa (NOS) y subsecuente producción de NO (Knowles y Moncada, 1994).

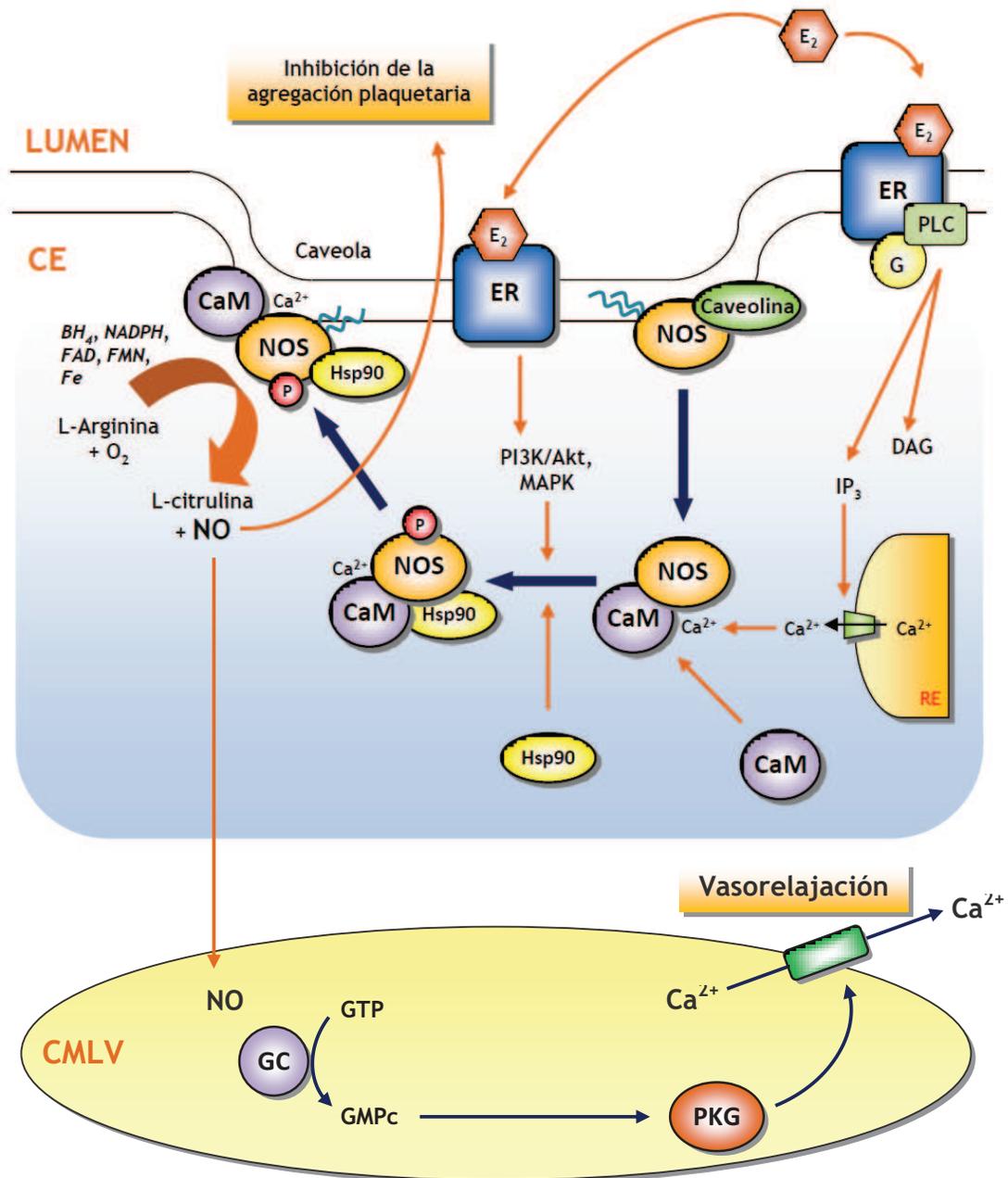
El NO es un radical libre que se sintetiza por acción catalítica de la NOS mediante la conversión del aminoácido L-arginina en L-citrulina (Palmer y col., 1988). La NOS cataliza la oxidación del grupo guanidino de L-arginina en presencia de oxígeno molecular y varios cofactores (NADPH, FMN, FAD y THB4), resultando en la producción estequiométrica de NO y L-citrulina (Palmer y col., 1988; Alderton y col., 2001; Fleming y Busse, 2003). El sustrato de la NOS, L-arginina es transportado a través de la membrana celular, vía un sistema de transporte específico para aminoácidos catiónicos (familia de transportadores CAT) (Caivano, 1998; Mori y Gotoh, 2000).

Se han identificado dos isoformas de NOS, la constitutiva (NOS_c) y la inducible (NOS_i) (Knowles y Moncada, 1994). La NOS_c se expresa en CE (NOS_e) y neuronales (NOS_n), requiere de calcio y calmodulina (CaM) para su activación, es susceptible de fosforilación y sintetiza pequeñas cantidades de NO en respuesta a estímulos específicos (Nathan, 1992; Liu y col., 1997; Michel y Feron, 1997), mientras que la NOS_i, se expresa en diversos tipos celulares incluyendo las CMLV y genera grandes cantidades de NO bajo la acción de citoquinas o endotoxinas (Kanno y col., 1994). Su activación es independiente de calcio y se propone que sería regulada por procesos de fosforilación y desfosforilación (Kone, 2000).

La NOS_e es susceptible de regulación por estrógenos especialmente el 17- β -estradiol. El mecanismo de activación de la NOS_e por 17- β -estradiol ha sido exhaustivamente estudiado. Se propone que: en condiciones basales la NOS_e colocaliza con proteínas del citoesqueleto en la "caveolas" donde se encuentra asociada con ácidos mirístico y palmítico y a la proteína caveolina-1 formando un

complejo inactivo. La unión de 17- β -estradiol al receptor de estrógenos acoplado a proteínas G e induce la activación de PLC con generación de IP₃ y DAG. El IP₃ promueve la salida de Ca²⁺ de los depósitos intracelulares. El calcio se une a CaM. El complejo Ca²⁺/CaM desplaza competitivamente a la proteína caveolina-1 unida a la NOSe, promoviendo la asociación de la NOSe con proteínas de shock térmico (Hsp90) en el citoplasma. 17- β -estradiol también induce la activación de la vías de señalización de PI3K/Akt y MAPK (entre otras) las cuales fosforilan al complejo enzimático NOSe/Hsp90. El complejo fosforilado se transloca a la membrana plasmática donde sufre miristoilación y palmitoilación y actúa sobre el sustrato L-arginina para producir L-citrulina y NO (Kone, 2000; Serock y col., 2008).

Además, se han reportado reacciones reversibles de s-nitrosilación y reacciones de defosforilación por parte de las proteínas fosfatasa. La defosforilación de la NOS podría atenuar la actividad de la enzima, llevándola a una actividad basal luego de su activación por fosforilación (McCabe y col., 2000; Fleming y col., 2001, Michell y col., 2001; Dudzinski y col., 2007; Mount y col., 2007).



Activación de la NOSe mediada por E₂.

GC: guanilato ciclasa, NO: óxido nítrico, E₂: 17-β-estradiol, ER: receptor de estrógenos, G: proteína G, RE: retículo endoplásmico, CaM: calmodulina. Cofactores de la NOSe: BH₄, FAD, NADPH, FMN, Fe. Adaptado de Serock y col., 2008.

El NO producido por las CE se libera a la luz arterial donde inhibe la agregación plaquetaria y la adhesión de leucocitos al endotelio, o bien difunde hacia la túnica media donde, en CMLV estimula el sistema GC/GMPc/PKG e induce vasorelajación.

El NO representa un verdadero segundo mensajero intracelular del sistema vascular. Es un regulador clave de la homeostasis vascular y juega un rol fundamental previniendo la disfunción vascular. Esto se debe a que el NO posee una potente acción vasodilatadora, inhibe la adhesión de monocitos, inhibe la migración de CMLV, inhibe la agregación plaquetaria, previene la oxidación de lipoproteínas de baja densidad (LDL), promueve la síntesis de prostaciclina e inhibe la síntesis de integrinas en leucocitos. Por lo tanto, la integridad funcional del endotelio depende fundamentalmente de su capacidad de generar NO (Ignaro y col., 1989; Tsao y col., 1995).

Las PG y los Tx son mediadores químicos que intervienen activamente en procesos inflamatorios y en el mantenimiento del balance entre la vasoconstricción y la vasorelajación. Se sintetizan a partir del ácido araquidónico por la acción catalítica de la ciclooxigenasa (COX) constitutiva (COX-1) o inducible (COX-2). Dichas enzimas se expresan en numerosos tipos celulares, entre ellos las CE y las CMLV. Los eicosanoides PGD_2 , PGE_2 , PGI_2 son potentes vasodilatadores y antitrombóticos que disminuyen la tensión arterial y la resistencia periférica. El principal eicosanoide producido por el endotelio vascular es PGI_2 . El tromboxano A_2 (TxA_2) es un potente vasoconstrictor y estimulante de la agregación plaquetaria (Gryglewski y col., 1988; Yanagisawa y col., 1988).

3.3. Moléculas de adhesión celular

Las moléculas de adhesión celular (CAMs) son glicoproteínas de la superficie celular que regulan la adhesión célula-célula y entre células y componentes de la matriz extracelular. En el sistema vascular desempeñan un rol fundamental

regulando la respuesta inflamatoria a nivel de la superficie endotelial. En condiciones de inflamación o de injuria vascular, se estimula la adhesión de leucocitos sobre la superficie endotelial a través de interacciones entre las CAMs endoteliales y las leucocitarias.

A nivel vascular, se han identificado diversas familias de moléculas de adhesión que participan en el tráfico de leucocitos. Estas moléculas pueden dividirse en tres grupos generales: las selectinas, las integrinas y algunos miembros de la superfamilia de las inmunoglobulinas.

Las selectinas pertenecen a una familia de glicoproteínas transmembrana dependientes de calcio con dominios extracelulares tipo lectina. Las selectinas participan en los primeros estadios del reclutamiento de leucocitos sobre la superficie del endotelio, creando interacciones débiles entre ambos tipos celulares. También participan amplificando el proceso de reclutamiento para favorecer las interacciones entre plaquetas y leucocitos (Chen y Geng, 2006). Se han identificado tres selectinas en mamíferos. Se nombran de acuerdo a su principal sitio de expresión: L-selectina en leucocitos, E-selectina en CE y P-selectina en plaquetas.

E-selectina es específicamente sintetizada por CE. Generalmente ausente en CE quiescentes, se induce de forma transcripcional por citoquinas y agentes inflamatorios tales como TNF α , IL-1, NF- κ B y lipopolisacáridos bacterianos (LPS), para favorecer la adhesión de monocitos, neutrófilos y otros leucocitos (Collins y col., 1995). El factor de transcripción NF- κ B es crucial en la activación de E-selectina (Kneuer y col., 2006). Una vez expresada en superficie, la E-selectina es internalizada y dirigida hacia los lisosomas para su posterior degradación.

P-selectina se expresa constitutivamente en CE y en plaquetas. Se encuentra almacenada en los gránulos alfa de las plaquetas y en los cuerpos de Weibel-Palade de CE y se expresa en superficie luego de la activación celular por IL-4, IL-13 y LPS (Yao y col., 1996; Woltmann y col., 2000; Pan y col., 1998). Favorece la interacción del endotelio con monocitos, neutrófilos, plaquetas y células tumorales (McEver y col., 1989; Furie y col., 2001; Geng, 2003; McEver, 2002). Una vez expresada sobre la superficie celular, P-selectina es rápidamente internalizada por endocitosis (Hattori y col., 1989).

Las integrinas son glicoproteínas transmembrana heterodiméricas donde cada unidad consta de subunidades α y β ($\beta 1$, $\beta 2$ o $\beta 3$). La expresión de integrinas $\beta 2$, se limita a los leucocitos de la sangre. Usualmente las integrinas poseen múltiples ligandos, algunas proteínas de la matriz extracelular como las lamininas, colágeno y fibronectina interactúan con las integrinas (Luo y col., 2007).

Las CAMs pertenecientes a la superfamilia de las inmunoglobulinas, proteínas estructuralmente semejantes a las inmunoglobulinas, actúan como ligandos del endotelio para integrinas expresadas sobre leucocitos y plaquetas. Entre ellas es importante el papel que desempeña la molécula de adhesión VCAM-1.

VCAM-1 es una glicoproteína transmembrana que se induce transcripcionalmente en CE y otros tipos celulares (macrófagos, mioblastos y células dendríticas) en respuesta a estímulos proinflamatorios ($\text{TNF}\alpha$, IL-1 y LPS). Favorece la adhesión firme entre el endotelio activado, los leucocitos y determinados componentes de la matriz extracelular (Blankenberg y col., 2003; Preiss y col., 2007; Matheny y col., 2000).

3.4. Muerte celular: apoptosis y necrosis

Los dos tipos de muerte celular más estudiados son la apoptosis y la necrosis. La apoptosis o también denominada muerte celular programada representa un proceso fisiológico de vital importancia para el desarrollo normal de los organismos vivos y el recambio normal de los tejidos durante la etapa adulta. En cambio, la necrosis es un evento de carácter patológico que se origina por una disfunción celular aguda en respuesta a condiciones de estrés severas o una injuria tisular importante.

La apoptosis o muerte celular programada es un proceso fisiológico dependiente de energía que se caracteriza por un desmantelamiento ordenado de la célula a través de caminos bioquímicos bien definidos que ocurre en respuesta a determinados estímulos (Granville y col., 1998). Representa un mecanismo de regulación para el control de las poblaciones celulares y remoción de células potencialmente perjudiciales (Raff, 1992). En el programa apoptótico se desencadenan una serie de eventos que llevan a la muerte de la célula: condensación y fragmentación de la cromatina nuclear, reducción del volumen citoplasmático (sin alteración de las organelas), formación de cuerpos apoptóticos que incluye material nuclear y citoplasmático y finalmente el reconocimiento y fagocitosis de los cuerpos apoptóticos por macrófagos circundantes lo cual ocurre sin originar una respuesta inflamatoria.

Se han descrito 2 vías que activan el programa apoptótico, la vía intrínseca (se activa a partir de señales que derivan del interior de la célula, por ejemplo estrés oxidativo) y la extrínseca (por activación de receptores de muerte en la membrana plasmática) (Ashkenazi, 2002; Kaufmann y Earnshaw, 2000). En ambas vías las

verdaderas ejecutoras de la apoptosis son las caspasas, una serie de cisteína-aspartato proteasas las cuales actúan sobre una gran cantidad de sustratos celulares, entre ellos las endonucleasas que son las responsables directas de la fragmentación del ADN que tiene lugar en el programa apoptótico.

La regulación de la apoptosis es frecuentemente alterada en estados de enfermedad. En situaciones de daño vascular, la alteración del balance supervivencia/apoptosis de las CE provoca denudación del endotelio comprometiendo la regulación de la proliferación, la migración y la apoptosis de las CMLV (Bochatan-Piallat y col., 1995).

A diferencia de la apoptosis, la necrosis es una forma de muerte celular independiente de energía que no se puede regular bioquímicamente. Se caracteriza por una rápida depleción de ATP, pérdida de la integridad de la membrana plasmática, incremento del volumen de la célula, formación de pequeños agregados de cromatina nuclear, estallido de las organelas citoplasmáticas y desintegración celular, lo cual origina una respuesta inflamatoria. Los restos celulares son finalmente degradados por las células fagocíticas que acuden al sitio de la injuria (Golstein y Kroemer, 2007).

4. DISFUNCIÓN VASCULAR

Una de las principales consecuencias de la disfunción vascular es la aterosclerosis. La aterosclerosis y las ECV asociadas son las principales causas de mortalidad en países desarrollados.

La aterosclerosis constituye un proceso inflamatorio crónico que se caracteriza por la formación de placas ateromatosas (ateromas), engrosamiento de la pared

arterial y estrechamiento de la luz vascular. Es el resultado de un proceso complejo y multifactorial que se produce a nivel de la intima arterial como consecuencia de una disfunción endotelial. Las placas contienen un núcleo rico en lípidos separado del lumen vascular por una capa fibrosa compuesta de CMLV y fibras de colágeno intersticiales (Davies, 1996; Ross, 1999; Lusis, 2000; Libby y col., 2002).

Se han propuesto numerosos factores de riesgo de aterosclerosis: dislipidemia y elevada concentración en plasma de colesterol LDL, homocisteinemia, estrés oxidativo y presencia de especies reactivas del oxígeno, tabaquismo, hipertensión, diabetes mellitus, alteraciones genéticas, infecciones por microorganismos tales como herpesvirus o *Chlamydia pneumoniae* y combinación de estos u otros factores.

Esta enfermedad afecta principalmente a regiones discretas de arterias musculares y elásticas de mediano y gran calibre. La localización de las placas ateromatosas se correlaciona positivamente con regiones que se caracterizan por tener un patrón de flujo sanguíneo complejo, principalmente en las bifurcaciones y curvaturas arteriales (Gimbrone y col., 2000; Matharu y col., 2006).

4.1. Proceso de formación de la placa ateromatosa

La enfermedad vascular se inicia con una injuria endotelial que conduce a una disfunción y posterior estimulación endotelial. Existen dos hipótesis acerca del origen de dicha injuria, la “hipótesis lipídica” que le atribuye a la hiperlipidemia un rol determinante en el inicio de la enfermedad, y la “hipótesis inflamatoria” que considera a la aterosclerosis como un proceso inflamatorio crónico en el cual

el estrés oxidativo representa un estímulo temprano para la formación de la placa (Ross, 1999). La fase temprana de generación de la lesión ateromatosa se caracteriza por una reducción de la síntesis de moléculas vasoactivas (NO y prostaciclina) y aumento de la expresión de 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 (Li y col., 1994; Ross, 1999). Las plaquetas juegan un papel importante en el inicio y desarrollo de la aterosclerosis. La respuesta inicial al daño vascular es la adhesión de plaquetas al endotelio activado por la injuria. Se forman puentes entre las integrinas plaquetarias y las proteínas endoteliales como P-selectina, fibronectina, colágeno, FvW. El progreso de la lesión conduce a una mayor adhesión y agregación plaquetaria. A su vez las plaquetas activadas liberan citoquinas que promueven el reclutamiento de monocitos y su activación a macrófagos (Steinhubl y Moliterno, 2005; Giovanni y Patrono, 2007). El reclutamiento de leucocitos sobre la pared vascular comprende múltiples etapas (Galkina y Ley, 2007): inicialmente ocurre una interacción primaria débil y “rodamiento” de los leucocitos sobre el endotelio activado, donde intervienen entre otras las CAMs P- y E-selectina (Hidalgo y col., 2007; Zarbock y col., 2007), luego tiene lugar una adhesión celular más firme, y finalmente se produce la migración de los leucocitos hacia el espacio subendotelial de la túnica íntima (Springer, 1994; Ley y col., 2007) (Esquema 1A).

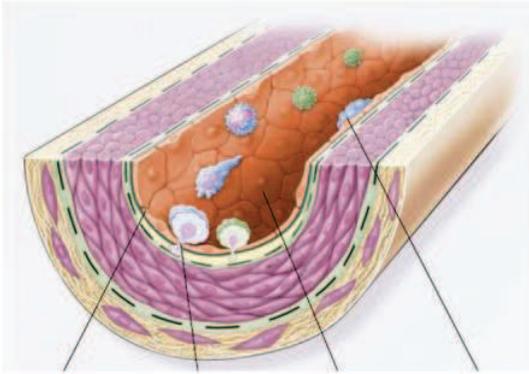
El contenido de lípidos presentes en plasma juega un rol importante en la patogénesis de la aterosclerosis, en especial las LDL (Brown y col., 2006). El endotelio disfuncional incrementa la captación de colesterol LDL, las cuales pueden ser modificadas por oxidación, glicosilación, asociación con proteoglicanos, etc., y representan una de las mayores causas de injurias al endotelio (Khoo y col.,

1992; Navab y col., 1996; Steinberg, 1997). Los leucocitos que así migraron se activan y 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 necrótico del ateroma. Las citoquinas liberadas por los macrófagos inducen la migración de CMLV desde la túnica media hacia la íntima donde se estimula su proliferación. La liberación de citoquinas proinflamatorias 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 y proliferación de CMLV hacia la túnica íntima (Ross, 1999) (Esquema 1B).

Cuando la lesión progresa, se desarrolla una capa fibrosa formada por CMLV y matriz que recubre el núcleo necrótico de la placa constituido por leucocitos, lípidos, matriz y detritus celular. Esta capa fibrosa separa el lumen de la lesión, la cual se expande debido al continuo ingreso y acumulación de macrófagos. El núcleo necrótico resulta de la actividad proteolítica de los macrófagos, acumulación de lípidos y necrosis/apoptosis de las células presentes (Ross, 1999) (Esquema 1C).

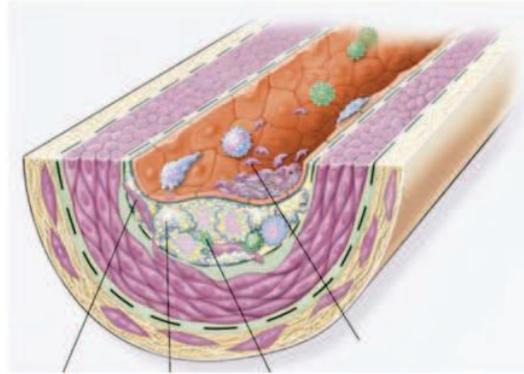
El continuo influjo de macrófagos y su activación genera una inestabilidad de la placa. Los macrófagos activados liberan enzimas hidrolíticas que degradan la matriz originando hemorragias de la microvasculatura desarrollada en la lesión. Esto desencadena la formación de trombos que puede resultar en la oclusión del vaso (Ross, 1999) (Esquema 1D).

A. Disfunción endotelial



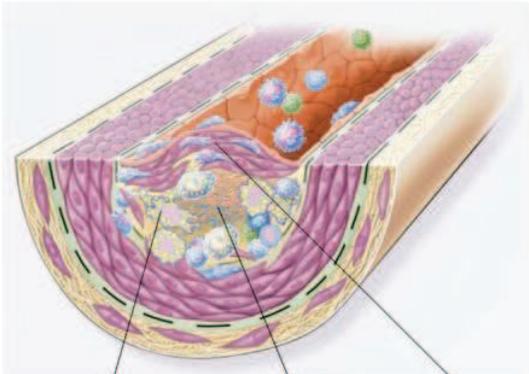
Permeabilidad endotelial Migración de leucocitos Adhesión endotelial Adhesión de leucocitos

B. Acumulación de lípidos en la íntima



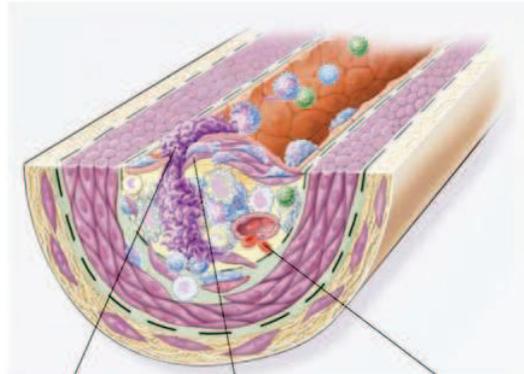
Migración de CMLV Células espumosas Células T Adhesión/agregación plaquetaria

C. Formación de una lesión avanzada



Acumulación de macrófagos Formación del núcleo necrótico Formación de la capa fibrosa

D. Placa fibrosa inestable



Ruptura de la placa Placa fibrosa más fina Hemorragia de los microvasos

Esquema 1. Proceso de formación de la placa ateromatosa. Adaptado de Ross, 1999.

Injurias químicas o mecánicas causan desdiferenciación de las CMLV, disminución de las propiedades contráctiles e inducción de un fenotipo proliferativo y frecuentemente móvil. (Ross, 1993; Pauly y col., 1994). Se ha propuesto que en la placa ateromatosa el tejido vascular es más susceptible a la apoptosis. La muerte celular en aterosclerosis fue sugerida por primera vez en 1858 por R. Virchow, padre de la patología celular. Él sugería que las placas estaban formadas por células que se replicaban y luego morían. La inducción de apoptosis depende del

estadio de la placa, su localización y el tipo celular involucrado (Isner y col., 1995; Hegyi y col., 1996).

Por consiguiente, los procesos de apoptosis, adhesión celular, diferenciación, proliferación y migración celular, juegan un rol clave en la enfermedad vascular.

5. TERAPIA HORMONAL DE REEMPLAZO

Durante su periodo fértil, las mujeres presentan un bajo riesgo de padecer ECV. De acuerdo a estudios epidemiológicos, la incidencia de ECV en mujeres premenopáusicas es menor respecto a los hombres de la misma edad o en mujeres postmenopáusicas. Dicho riesgo aumenta significativamente luego de la menopausia. Las ECV, en especial las cardíacas isquémicas como consecuencia de aterosclerosis coronaria, representan una de las principales causas de muerte entre las mujeres postmenopáusicas (Orshal y Khalil, 2004; Mendelsohn y Karas, 2005). La mayor incidencia de ECV se ha atribuido a la disminución de estrógenos en circulación, como consecuencia del cese de la actividad ovárica (Schwenke, 1998). La evidencia presentada en la literatura sostiene que los estrógenos ejercen un efecto cardioprotector sobre la fisiología vascular debido a su acción sobre el metabolismo lipoproteico, sobre los sistemas fibrinolítico y de la coagulación, sobre la producción de sustancias vasoactivas que regulan el tono vascular, sobre el crecimiento, la migración y la apoptosis de células vasculares, y a sus propiedades antioxidantes. El efecto vascular del 17- β -estradiol ha sido extensivamente caracterizado. A través de su acción directa sobre las células vasculares, el 17- β -estradiol regula el tono vascular y contribuye a mantener las propiedades antiaterogénicas y antitrombóticas del lecho vascular. Numerosos

estudios *in vitro* han aportado evidencias de que el 17- β -estradiol: (a) estimula la producción de NO en CE y aumenta los niveles de GMPc promoviendo a relajación de CMLV, (b) disminuye la síntesis de proteínas vasoconstrictoras, (c) modula la producción de PG, (d) inhibe la proliferación de CMLV, (e) modula la interacción célula-célula inhibiendo la expresión de moléculas de adhesión proaterogénicas, y (f) inhibe la apoptosis de CE y promueve la reendotelización. Estos efectos los ejerce a través de acciones rápidas que comprenden la activación de los sistemas de segundos mensajeros intracelulares PKG, PI3K/AkT y MAPK y consecuente activación de las enzimas NOS y COX y efectos genómicos de regulación de la expresión de proteínas vasculares como endotelina-1, COX-1, E-selectina, VCAM-1, NOSe (Mendelshon y Karas, 1999; Serock y col., 2008). Se ha informado que la estrona, estrógeno producido por el ovario con actividad biológica relevante, también regula la función vascular. Datos reportados por nuestro laboratorio demostraron que en tejido aórtico murino estrona regula la función vascular en forma directa y específica (Selles y col., 2005) a través de un mecanismo de acción que comprende efectos genómicos y no genómicos que involucran la participación de sistemas de señalización intracelular y del receptor de 17- β -estradiol (Massheimer y col., 2006; Rauschemberger y col., 2008).

El cese de la función ovárica no solo afecta a los niveles circulantes de 17- β -estradiol, sino también a los de Pg, segunda hormona con actividad biológica relevante que produce el ovario. La terapia hormonal de reemplazo (THR) en base a estrógenos, o combinada (estrógenos más progestágenos) surge como alternativa para aliviar los signos y síntomas asociados a la menopausia. Se propone que la THR contribuiría a reducir los síntomas vasomotores, revitalizar los epitelios estratificados, reducir la pérdida de masa ósea, prevenir la osteoporosis, mejorar

el perfil lipídico y reducir el riesgo de ECV. No obstante, hasta el presente, los resultados obtenidos de ensayos clínicos aleatorizados son contradictorios, y su utilidad clínica para reducir el riesgo cardiovascular es motivo de debate aún (Rossouw y col., 2002; Dubey y col., 2004; Ouyang y col., 2006). Algunos ensayos clínicos demostraron beneficios fundamentados en una reducción de los niveles plasmáticos de colesterol total, LDL colesterol y lipoproteína A, aumento de HDL colesterol, inhibición de la oxidación de las LDL, de fibrinógeno y del inhibidor del activador del plasminogeno-1 (PAI-1). Por el contrario otros ensayos reportaron efectos no deseables como incremento de los niveles plasmáticos de triglicéridos y de la proteína C reactiva (Stamfer y col., 1991; Walsh y col., 1991; Barton y col., 1998).

Históricamente, las progestinas fueron incluidas en los protocolos de THR para contrarrestar la displasia endometrial causada por 17- β -estradiol (The Writing Group for the PEPI Trial, 1996). Se ha reportado que la administración de progestinas sintéticas al protocolo de administración de estrógenos, como por ejemplo acetato de medroxiprogesterona (MPA), mejoraría la eficacia de la THR (Manson y col., 2003). Otros estudios, no obstante, han mostrado que la coadministración de una progestina bloquea el efecto ateroprotector del estrógeno sobre el perfil lipídico (Sitruk-Ware, 2000).

El estudio de prevención cardiovascular secundaria denominado HERS (the Heart and estrogen/progestin replacement study) demostró que la THR no fue capaz de reducir la incidencia de eventos coronarios, y a su vez incrementó el riesgo de eventos tromboembólicos en mujeres postmenopáusicas con enfermedad coronaria establecida, tratadas (vía oral) con estrógenos equinos conjugados (CEE) y la progestina sintética MPA durante un periodo de tiempo de cuatro años (Grady y

col., 2002; Hulley y col., 1998). En cambio, datos provenientes de otro estudio realizado en mujeres postmenopáusicas sanas demostró que la administración oral de 17- β -estradiol y progestágenos, corrigió los niveles circulantes de factores de la coagulación y mejoró la función vascular (Van Baal y col., 1999).

El estudio clínico denominado The women's health initiative (WHI) evaluó prevención cardiovascular primaria en mujeres postmenopáusicas de entre 50 y 79 años de edad que no presentaban historial de enfermedad arterio-coronaria. Los autores de este trabajo demostraron que la adición de MPA a CEE resultó en un sustancial incremento del riesgo de infarto de miocardio. La administración de esta terapia combinada se suspendió prematuramente debido a este aparente incremento en la incidencia de eventos cardiovasculares y otros efectos adversos (Rossouw y col., 2002).

Un interrogante interesante que se plantea es porqué los efectos beneficiosos de los estrógenos a nivel vascular observados en el gran cúmulo de información proveniente de los estudios experimentales *in vitro* no se manifiestan cuando se emplean protocolos de sustitución hormonal *in vivo*. Esto dio origen a la corriente de pensamiento que plantea la hipótesis de que se debería estudiar no solo al 17- β -estradiol sino además a los otros sustitutos que se administran en la THR, como por ejemplo Pg, otras progestinas sintéticas y a los metabolitos derivados de ellos. El conocimiento actual sobre la acción bioquímica de Pg y otras progestinas a nivel de la fisiología vascular es bastante escaso en contraste con la gran cantidad de evidencia reportada sobre los efectos de los estrógenos en el sistema cardiovascular (Mendelsohn y Karas, 1999; Orshal y Khalil, 2004). Se han descrito potenciales efectos vasculares de Pg, proponiendo a esta hormona como un esteroide sexual activo a nivel cardiovascular. En arterias coronarias de conejo y

en aorta de rata, se reportó que Pg induce vasorelajación en forma independiente de endotelio, a través de un mecanismo de inhibición del influjo de calcio (Jiang y col., 1992; Glusa y col., 1997). Pg regula el crecimiento de células vasculares (Simoncini y col., 2003) e inhibe la expresión de moléculas de adhesión intercelular inducida por TNF α y LPS (Otsuki y col., 2001; Simoncini y col., 2004). Sin embargo, muchos de estos estudios han sido realizados empleando progestágenos sintéticos (MPA) y no Pg nativa. Se ha propuesto la existencia de importantes diferencias en los mecanismos moleculares de acción y en los potenciales efectos riesgo/beneficio de Pg y MPA (L'hermite y col., 2008). La evidencia aportada hasta el presente es insuficiente, y desentrañar su mecanismo sigue siendo un desafío para comprender el verdadero rol de la Pg natural y su potencial utilidad clínica. Así mismo, se desconoce si desde el punto de vista de la regulación del metabolismo vascular Pg y 17- β -estradiol son equivalentes o si Pg antagonizaría las acciones del 17- β -estradiol, como lo hace en otros tejidos efectores.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Teniendo en cuenta la controversia existente entre el riesgo/beneficio de la aplicación de la THR para la prevención de ECV en mujeres postmenopáusicas, y considerando la escasa información disponible acerca del mecanismo a través del cual, Pg media sus efectos en el sistema vascular, se propuso como objetivo general de este trabajo de Tesis, investigar las acciones celulares y moleculares a través de las cuales Pg regula la función vascular.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Empleando como sistema experimental anillos de aorta aislados de ratas Wistar hembras fértiles o CE y CMLV en cultivo, se plantearon los siguientes objetivos específicos:

Desde un punto de vista molecular, investigar el mecanismo de acción de Pg, estudiando:

- los efectos no genómicos sobre sistemas de señalización intracelular y la síntesis de NO
- las acciones genómicas sobre la regulación del crecimiento celular
- la posible existencia de una interacción entre las acciones genómicas y no genómicas
- el efecto del tratamiento conjunto de 17- β -estradiol y Pg sobre la producción de NO y la proliferación celular

Desde un punto de vista celular, investigar la acción de Pg sobre algunos de los procesos celulares involucrados en la disfunción vascular, tales como:

- proliferación celular, migración celular y apoptosis
- adhesión de monocitos
- agregación plaquetaria

METODOLOGÍA

1. SISTEMAS EXPERIMENTALES

1.1. SISTEMA EXPERIMENTAL I: anillos de aorta de rata

1.1.1. Animales utilizados

Se utilizaron ratas Wistar hembras sexualmente maduras, de cuatro a seis meses de edad, las cuales ya habían tenido al menos tres estros consecutivos. Los animales fueron alimentados con una dieta estándar para roedores, con provisión de agua *ad libitum* y mantenidos en ciclos de doce horas de luz y doce horas de oscuridad. La actividad de los estros se evaluó mediante citología exfoliativa y aquellos animales elegidos para los ensayos experimentales presentaban estros de la misma duración. Todos los trabajos con animales se llevaron a cabo en el Bioterio del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur, los cuales fueron avalados por la comisión asesora del Bioterio.

1.1.2. Obtención de anillos de aorta de rata

Los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, la aorta torácica fue removida inmediatamente y colocada en solución fisiológica refrigerada a 4 °C (Andersen y col., 1999). Se procedió a limpiar la aorta del tejido conectivo y adiposo adyacente y se cortó en pequeños anillos, de 15 a 20 mm aproximadamente. Se tomó especial cuidado se tomó para evitar el daño de la superficie endotelial.

1.1.3. Tratamientos *in vitro* de los anillos de aorta de rata

Los anillos de aorta de rata (AAR) se utilizaron dentro de las dos horas posteriores a su aislamiento, periodo en el cual mantiene su viabilidad, la cual fue comprobada por su capacidad de responder al agonista natural del tejido vascular “acetilcolina”. Los AAR fueron colocados en 1.5 ml del medio de incubación (Medio D), cuya composición se detalla al pie de este párrafo. Se preincubaron durante 10 minutos en baño termostático (Vicking, modelo Dubnoff) a 37 °C, con agitación continua (Andersen y col., 1999). Seguidamente, se inició el tratamiento con el agregado de la hormona por los intervalos de tiempo correspondientes a cada ensayo experimental. Paralelamente se procesó siempre un grupo control, el que recibió solamente el vehículo en el cual se solubilizó la hormona (isopropanol), en concentración menor a 0.1%. En los ensayos en los cuales se emplearon inhibidores y antagonistas, estos se agregaron al medio de incubación 30 minutos antes de comenzar el tratamiento con Pg. Las soluciones hormonales empleadas en todos los ensayos fueron siempre preparadas en el día del experimento minutos antes de comenzar el tratamiento.

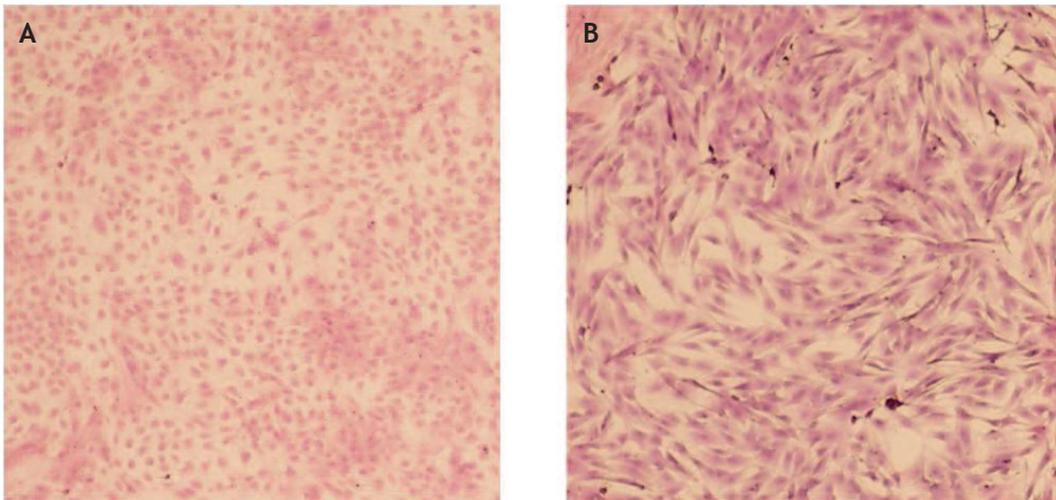
Composición del Medio D:

	Concentración final (mM)
NaCl	145
KCl	5
MgSO ₄	1.2
CaCl ₂	1
Glucosa	10
Buffer Hepes, pH 7.35	10

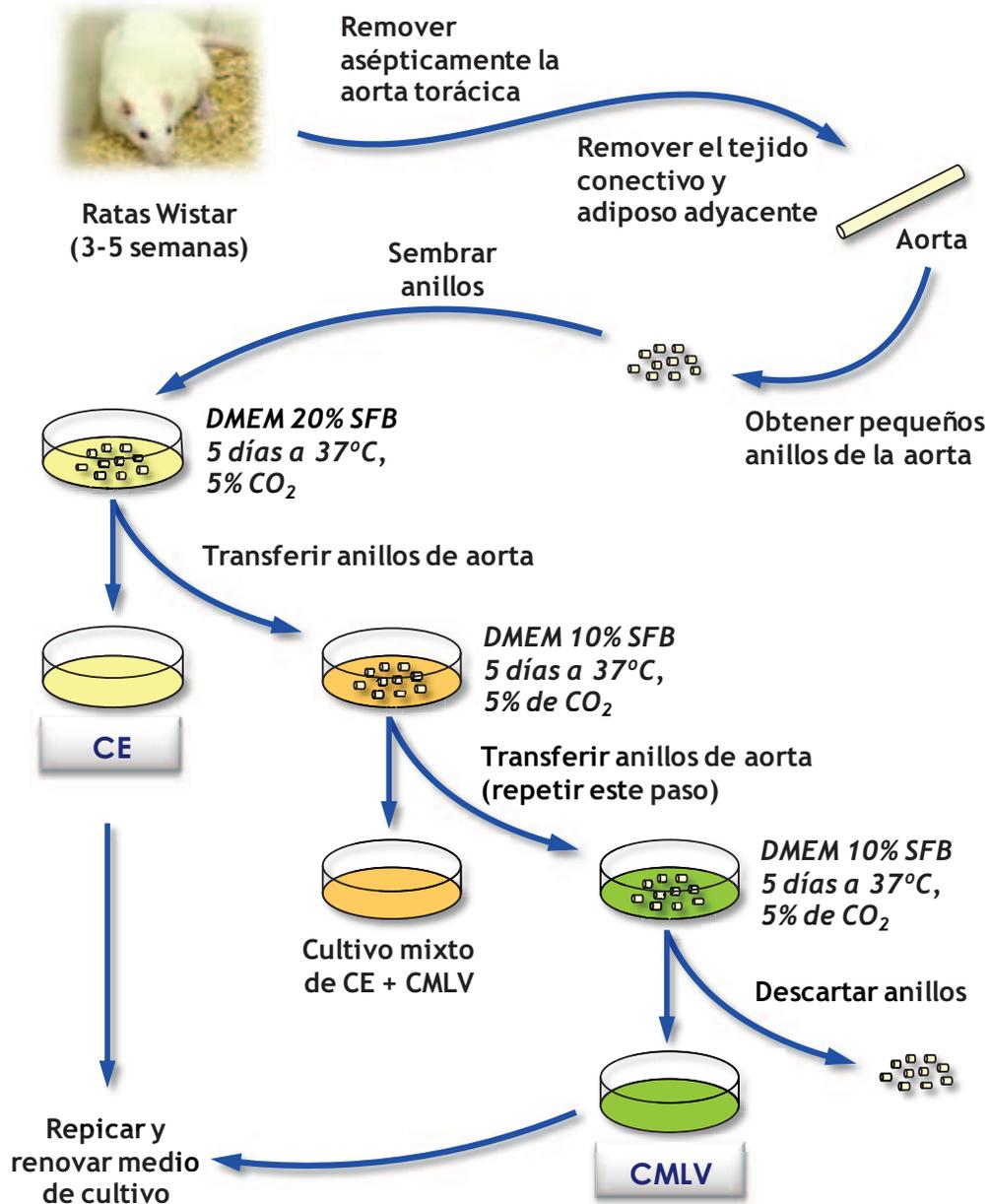
1.2. SISTEMA EXPERIMENTAL II: cultivos de células endoteliales y células de músculo liso vascular

Las CE y CMLV se obtuvieron por cultivo primario utilizando la técnica de explantes, a partir de anillos de aorta de ratas Wistar hembras (de tres a cinco semanas de edad) (Yeh y col., 2002; McGuire y Orkin, 1987). En las instalaciones del Bioterio se aisló la aorta torácica en condiciones de asepsia, para lo cual el quirófano y el instrumental empleado se esterilizaron por irradiación con luz UV. El resto del procedimiento y todos los ensayos experimentales en los que se usaron CE y CMLV, se realizaron en un gabinete de seguridad biológica (Telstar Bio-II-A) disponible en el Laboratorio de Cultivo Celular. Luego de eliminar cuidadosamente el tejido conectivo y adiposo adyacente, la aorta se cortó en pequeños anillos de 2 mm de longitud (Esquema 2). Los anillos así obtenidos se cultivaron en placas de 10 cm de diámetro (NUNC) conteniendo 10 ml de medio de cultivo DMEM (libre de rojo de fenol y suplementado con 3.7 mg/L de bicarbonato de sodio (NaHCO_3), 2 mM de L-glutamina y antimicrobianos: 100 U/ml de penicilina (60 $\mu\text{g/ml}$), 10 $\mu\text{g/ml}$ de streptomina y 2.5 $\mu\text{g/ml}$ de amfotericina B), con el agregado de 20% de suero fetal bovino (SFB). Se empleó un incubador metabólico (Revco Habitat, Asheville, USA) con control automático de temperatura y CO_2 (37 °C, 5% de CO_2). Durante los primeros cinco días de cultivo, se liberan las CE. Finalizado este periodo, los anillos fueron transferidos a una nueva placa con medio DMEM fresco suplementado con 10% de SFB y antimicrobianos y se incuban durante cinco días. En esta nueva placa se obtuvo un cultivo mixto de CE y CMLV. Los anillos se retiran y se transfieren nuevamente a otra placa y se incuban durante otros cinco días. Se repite este paso una vez más y de esta manera se obtiene un cultivo puro de CMLV

a los 20 días de iniciado el procedimiento. A los cultivos de CE y CMLV se les efectuó un recambio del medio DMEM con una frecuencia de 3 días. La pureza de los cultivos de ambos tipos celulares se estableció de la siguiente manera: (a) por la morfología característica que adoptan las células en cultivo al observarlas en un microscopio invertido de contraste de fase (Nikon Eclipse TS100). En el caso de las CE se observó la morfología característica de “cobblestone” en cultivos confluentes, mientras que en el caso de las CMLV se observó la apariencia de “valles y colinas”, (b) a través de inmunohistoquímica: se estudió la presencia de FvW en CE y su ausencia en CMLV y de la presencia de alfa actina en CMLV y su ausencia en CE (sistema Dako Cytomation En Vision), y (C) por la capacidad de las CE de sintetizar NO (Bachetti y Morbidelli, 2000). Todos los ensayos experimentales se realizaron empleando cultivos de CE o CMLV de pasajes 2 a 7.



A. Cultivo primario de CE.
B. Cultivo primario de CMLV
(Tinción:hematoxilina-eosina)



Esquema 2. Obtención de cultivos primarios de CE y CMLV a partir de aorta de rata por la técnica de explante.

1.2.1. Tratamientos *in vitro* de los cultivos de células endoteliales y células de músculo liso vascular

Los cultivos de CE y CMLV se mantuvieron en DMEM suplementado con 10% de SFB hasta llegar a la confluencia necesaria para realizar los ensayos experimentales. En los casos que se requería sincronizar las células, las mismas se privaron de suero durante 24 horas y luego se reemplazó el medio de cultivo por DMEM fresco conteniendo 1% de SFB, medio en el cual se realizaron los tratamientos hormonales correspondientes. Se inició el tratamiento con el agregado de la hormona por los intervalos de tiempo correspondientes a cada ensayo experimental. Paralelamente se procesó siempre un grupo control, el que recibió solamente el vehículo (isopropanol), en una concentración inferior a 0.1%. En los ensayos en los cuales se emplearon inhibidores y antagonistas, estos se agregaron al medio una hora antes de comenzar el tratamiento hormonal. Las soluciones hormonales empleadas en todos los ensayos fueron siempre preparadas en el día del experimento, minutos antes de comenzar el tratamiento.

2. ENSAYOS REALIZADOS

2.1. Medición de actividades enzimáticas de PKC y MAPK

Las actividades enzimáticas de PKC y MAPK se cuantificaron empleando homogenados obtenidos a partir de aorta de rata (HAR) y ensayos de fosforilación.

2.1.1. Obtención de homogenados a partir de aorta de rata sin tratamiento hormonal previo

Se aisló la aorta torácica de la rata según lo descrito en la sección 1.1.2. Para ello se seccionó en anillos de 5 mm de longitud y se homogeneizó mecánicamente (OMNI International GLH) en 1.5 ml del buffer de homogeneización a 0 °C (baño de hielo) durante tres periodos consecutivos de 20 segundos cada uno y con intervalos de descanso de 40 segundos. Se tomaron alícuotas de 20 µl para cuantificar el contenido proteico empleando el método de Lowry (Lowry y col., 1951). Los HAR se alicuotaron en volúmenes apropiados y se mantuvieron a -80 °C hasta su posterior utilización en los ensayos enzimáticos de PKC y MAPK (Rauschemberger y col., 2008). Las muestras fueron descongeladas una sola vez.

Composición del buffer de homogeneización para medir actividad de PKC:

	Concentración final
Buffer Tris-HCl, pH 7.4	20 mM
Sacarosa	0.33 M
EGTA	1 mM
Fluoruro de sodio (NaF)	20 mM
Ditiotreitol (DTT)	1 mM
Aprotinina	20 µg/ml

Composición del buffer de homogeneización para medir actividad de MAPK:

	Concentración final
Buffer Tris-HCl, pH 7.4	20 mM
EGTA	1 mM
Sacarosa	0.27 M
NaF	50 mM
EDTA	1 mM
DTT	1 mM
Pepstatina	2 µg/ml
Aprotinina	2 µg/ml
Ortovanadato de sodio	1 mM

2.1.2. Obtención de homogenados a partir de aorta de rata con tratamiento hormonal previo

En forma alternativa, los homogenados fueron obtenidos a partir de AAR previo tratamiento con Pg. Para llevar a cabo este experimento, los AAR se incubaron con Pg durante el tiempo correspondiente del ensayo experimental. El tratamiento se detuvo por congelación del tejido aórtico en nitrógeno líquido. Los HAR fueron obtenidos como se describió anteriormente y se mantuvieron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta su ulterior uso.

2.1.3. Medición de la actividad enzimática de PKC

La actividad de la PKC fue determinada en HAR utilizando un ensayo de fosforilación de sustrato específico y posterior separación mediante cromatografía de intercambio iónico (Massheimer y de Boland, 1992). Para la realización del ensayo se empleó un volumen final de reacción de $100\text{ }\mu\text{l}$. El buffer de reacción contenía: $50\text{ }\mu\text{g}$ de proteínas del HAR obtenidos según se describió en la sección 2.1.1. y 2.1.2., 20 mM de Tris-HCl (pH 7.4), 10 mM de MgCl_2 , 1 mM de EGTA, 20 mM de NaF, 1 mM de DTT, $20\text{ }\mu\text{g/ml}$ de aprotinina y $5\text{ }\mu\text{g}$ de histona tipo III-S (sustrato exógeno de PKC) con o sin el agregado de: 1 mM de CaCl_2 , $10\text{ }\mu\text{g}$ de fosfatidilserina (PS) y $0.75\text{ }\mu\text{g}$ de DAG. Se realizó una preincubación de cinco minutos a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cuando se usaron los HAR según se describió en 2.1.1., se inició el tratamiento mediante el agregado de diferentes concentraciones de Pg o del vehículo (isopropanol) por breves intervalos de tiempo (3 - 15 minutos) a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Cuando se usaron HAR según se describió en 2.1.2., se obvió el tratamiento hormonal. Una vez finalizado el tiempo del tratamiento hormonal, se inició inmediatamente el ensayo de fosforilación por agregado de 10 μl de ATP/[$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP (100 μM /0.2 μCi) durante cinco minutos a 30 $^{\circ}\text{C}$. La reacción se detuvo transfiriendo dos alícuotas (25 μl cada una) de la mezcla de reacción a discos de fosfocelulosa (Whatmann P-81). Los discos conteniendo el sustrato fosforilado fueron luego lavados tres veces con 5 ml de una solución de 30% de ácido acético y 1% de ácido fosfórico y una vez más con etanol 96%. Se secaron a temperatura ambiente. Se colocaron en viales conteniendo un cocktail de centelleo líquido (Opti phase “hisafe” 3) y se contó la radioactividad en un contador Wallac 1414 (PerkinElmer Winspectral, Wellesley, USA). La actividad enzimática fue calculada como la diferencia entre la fosforilación observada en presencia y ausencia de Calcio, PS y DAG y se expresó en pmoles de P/minuto/mg de proteína.

2.1.4. Medición de la actividad enzimática de MAPK

La actividad de la MAPK fue determinada utilizando un ensayo de fosforilación y posterior separación mediante cromatografía de intercambio iónico (Buitrago y col., 2003). Los HAR fueron sometidos a inmunoprecipitación con anticuerpos anti MAPK (anti p42, anti p44). Se lavó dos veces con buffer de reacción. El ensayo de fosforilación se realizó en un volumen final de reacción de 100 μl . El buffer de reacción contenía: 100 μg de proteínas del HAR, obtenidos según se describió en la sección 2.1. y 2.2., 25 mM de Tris-HCl (pH 7.0), 5 mM de MgCl_2 , 100 μM de EGTA, 100 μM de ortovanadato de sodio, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de pepstatina, 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de aprotinina, 1 mM de DTT, 1 μM de ácido okadaico y 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de

proteína básica de mielina como un sustrato exógeno para la MAPK. Se realizó una preincubación de cinco minutos a 30 °C y se inició el ensayo de fosforilación por agregado de 10 µl de ATP/[γ ³²P]-ATP (100 µM/0.2 µCi) durante 15 minutos a 30 °C. La reacción se detuvo transfiriendo dos alícuotas (25 µl cada una) de la mezcla de reacción a discos de fosfocelulosa (Whatmann P-81). Los discos conteniendo el sustrato fosforilado fueron luego lavados tres veces con 5 ml de una solución de 0.5% de ácido fosfórico y una vez más con etanol 96%. Se secaron a temperatura ambiente. Se colocaron en viales conteniendo un cocktail de centelleo líquido (Opti phase “hisafe” 3) y se contó la radioactividad en un contador Wallac 1414 (PerkinElmer Winspectral, Wellesley, USA). La actividad enzimática se expresó en pmoles de P/minuto/mg de proteína.

2.2. Medición de la producción de óxido nítrico

Se procedió a determinar en forma indirecta la producción de NO a través de la medición de los niveles de nitritos, los cuales representan un producto de degradación estable y no volátil del NO. Para llevar a cabo dicha determinación se empleó el método espectrofotométrico de Griess (Griess, 1879; Kleinbongard y col., 2002).

2.2.1. Medición de la producción de óxido nítrico en anillos de aorta de rata

Los AAR recibieron el tratamiento correspondiente por breves intervalos de tiempo (5 - 20 minutos) según lo descrito en la sección 1.1.3. El tratamiento se

detiene tomando una alícuota de 500 µl del medio de incubación, que se hizo reaccionar con el reactivo de Griess. La reacción consistió en el agregado sucesivo de 35 µl del reactivo A de Griess (sulfanilamida 1%) y 35 µl del reactivo B de Griess (0.1% dihidrocloruro de naftilendiamina en 2.5% de ácido fosfórico) por diez minutos a temperatura ambiente. El color desarrollado fue estable por 30 minutos a temperatura ambiente. Se midió la absorbancia a 548 nm de longitud de onda, en un espectrofotómetro Hitachi U-1000. La concentración de nitritos en las muestras se determinó empleando una curva estándar de nitritos realizada en la misma matriz (Medio D). Paralelamente, los AAR fueron disueltos en NaOH 1 N y se determinó el contenido proteico empleando el método de Lowry. Los resultados se expresaron como nmoles de nitritos/mg de proteínas.

2.2.2. Medición de la producción de óxido nítrico en cultivos primarios de células endoteliales

Las CE fueron sembradas en placas de 24 pocillos con una densidad de 4×10^4 células/pocillo en 1 ml de medio de cultivo (DMEM) suplementado con 10% de SFB. Se permitió desarrollar el crecimiento celular hasta alcanzar una confluencia del 90%. Luego del tratamiento hormonal durante el periodo de tiempo correspondiente, se tomaron alícuotas de 500 µl del medio sobrenadante, las cuales se hicieron reaccionar con los reactivos A y B de Griess como se describió en 2.2.1. Se midió la absorbancia a 548 nm de longitud de onda en un espectrofotómetro Hitachi U-1000 y la concentración de nitritos en las muestras se determinó empleando una curva estándar de nitritos. Las células fueron disueltas en 340 µl de NaOH 1 N y luego se determinó el contenido de proteínas por el

método de Lowry. Los resultados se expresaron como nmoles de nitritos/mg de proteínas.

2.3. Medición de la proliferación celular

Para evaluar proliferación celular se utilizó el ensayo de incorporación de timidina radiomarcada ($[^3\text{H}]$ -timidina). Los cultivos de CE y CMLV se sembraron en placas de 24 pocillos (NUNC) a una densidad de 5×10^4 células/pocillo en 1 ml de DMEM suplementado con 10% de SFB. Cuando los cultivos alcanzaron una confluencia del 60 - 70%, las células fueron sincronizadas por privación de suero durante 24 horas. Se realizó un recambio de medio por DMEM fresco conteniendo 1% de SFB, y se procedió a realizar el tratamiento con Pg o el vehículo durante el periodo de tiempo correspondiente a cada ensayo experimental. Cuando se requirió el agregado de inhibidores o antagonistas, los mismos se agregaron una hora antes de comenzar el tratamiento hormonal. La $[^3\text{H}]$ -timidina fue agregada en forma de pulso (1 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$) durante las dos últimas horas del tratamiento. Las células se lavaron dos veces con PBS para remover la $[^3\text{H}]$ -timidina no incorporada, y se adicionó ácido tricloroacético 10% (p/v) y se incubó durante 30 minutos en frío (2 °C). Se descartó el ácido tricloroacético y se lavó con PBS. El material ácido insoluble resultante fue disuelto con NaOH 1 N. Se tomaron alícuotas para la determinación proteínas (por el método de Lowry) y para contar la radioactividad incorporada por centelleo líquido, empleando un contador Wallac 1414 (PerkinElmer Winspectral, Wellesley, USA). Los resultados se expresaron como cuentas por minuto (cpm)/mg proteína (Kyaw y col., 2002).

2.3.1. Ensayo de proliferación de células de músculo liso vascular utilizando medio de cultivo condicionado

Medio de cultivo condicionado: corresponde al medio de cultivo proveniente de CE tratadas durante 24 horas con Pg o el vehículo.

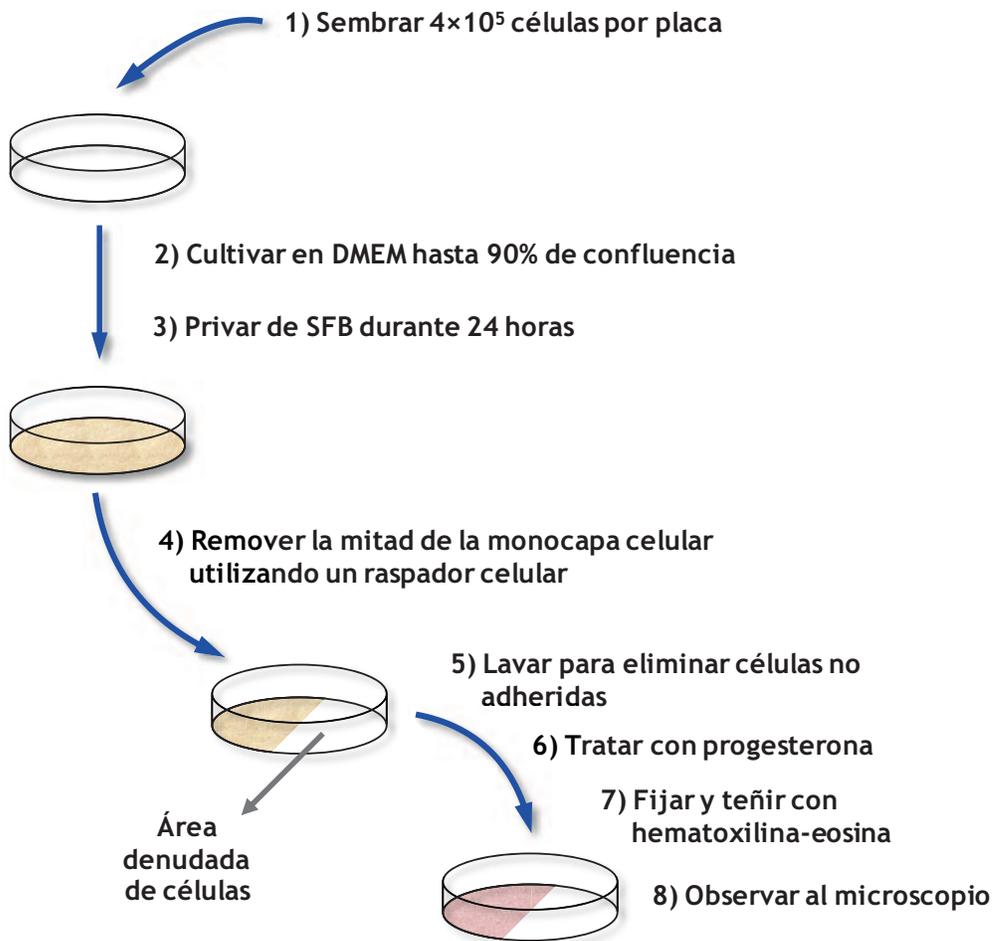
Obtención del medio de cultivo condicionado: Finalizado el tratamiento, se colectó el medio de cultivo de las CE, se centrifugó a 550 × g (Rolco CM36R) durante diez minutos, se fraccionó y se congeló a -80 °C hasta su ulterior uso.

Ensayo de proliferación: Las CMLV fueron sincronizadas por privación de suero durante 24 horas. Se descartó dicho medio y se reemplaza por medio condicionado. Las CMLV se trataron con Pg o el vehículo en presencia del medio condicionado. Se adicionó la [³H]-timidina en forma de pulso (1 µCi/ml) durante las dos últimas horas de tratamiento hormonal. La proliferación celular fue medida como se describió en la sección 2.3. (Soares y col., 2007).

2.4. Ensayo de migración celular

Se determinó por recuento del número de células y su movilización hacia un sector de la placa de cultivo denudada de células (Bürk, 1973; Pedram y col., 2002). Para ello, CE o CMLV se sembraron en placas NUNC de 60 mm de diámetro a una densidad de 4×10^5 células/placa en 5 ml de DMEM conteniendo 10% SFB y se dejó crecer hasta una confluencia del 90%. Las monocapas fueron privadas de suero durante 24 horas. Posteriormente, utilizando un raspador celular, se removió la totalidad de las células presentes en la superficie de media placa como se

observa en el Esquema 3. Seguidamente, se realizaron dos lavados con PBS para eliminar las células que fueron removidas. Se agregó medio DMEM fresco suplementado con 1% de SFB. Se realizó el tratamiento hormonal correspondiente. Las células fueron fijadas con glutaraldehído 0.1% durante 15 minutos y teñidas con hematoxilina-eosina (el tiempo de tinción fue: diez minutos con hematoxilina y 30 segundos con eosina). La migración celular fue cuantificada por recuento del número de células que cruzaron al área desnuda. Se contaron al menos 7 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 OLYMPUS C7070WZ acoplada a un microscopio óptico OLYMPUS BX51. Los resultados se expresaron como el promedio (\pm D.E.) del número de células migrantes por campo, y corresponden a tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado.



Esquema 3. Ensayo de migración celular

2.5. Ensayo de agregación plaquetaria

En este tipo de ensayo se evaluó el efecto del endotelio vascular expuesto a tratamiento hormonal sobre la capacidad de agregación de plaquetas provenientes de un plasma rico en plaquetas (PRP). Para ello las CE se incubaron con un plasma rico en plaquetas a 37°C , se realizó el tratamiento hormonal e inmediatamente después se transfirió una alícuota del PRP a un agregómetro Chrono-Log 430 para

la determinación de la AP empleando el método turbidimétrico de Born (Born, 1962).

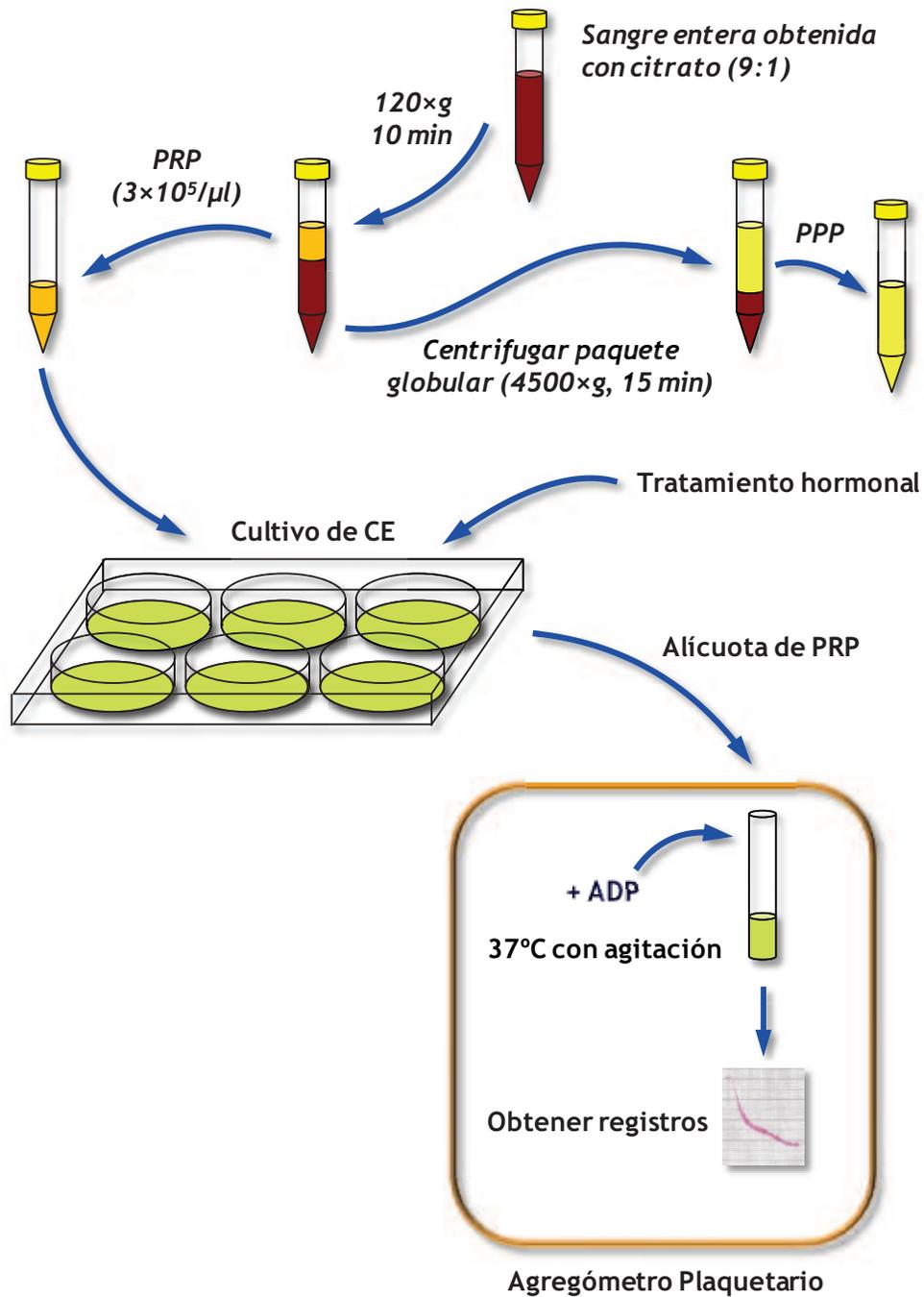
2.5.1. Obtención de plasma pobre en plaquetas y plasma rico en plaquetas

Sangre venosa obtenida con citrato de sodio como anticoagulante (9:1, sangre:citrato) se centrifugó a $120 \times g$ (Rolco CM36R) durante diez minutos. Se colectó el sobrenadante, el cual contiene el PRP, se tomó una alícuota de 50 μ l del PRP y se diluyó con 950 μ l de oxalato de amonio para realizar el recuento de plaquetas en una cámara de Neubauer. Se ajustó la concentración de plaquetas a 3×10^8 plaquetas/ml. Paralelamente, el paquete globular remanente de la centrifugación anterior se volvió a centrifugar a $4500 \times g$ (Rolco CM36R) por 15 minutos, se colectó el sobrenadante (plasma pobre en plaquetas o PPP) y se lo centrifugó nuevamente a $4500 \times g$ (Rolco CM36R) por 15 minutos. Se colecta el PPP que se utilizó como blanco en la medición de la agregación plaquetaria. El PPP y PRP se emplearon dentro de las dos horas de obtenidos (Esquema 4).

2.5.2. Ensayo de agregación plaquetaria

Se emplearon cultivos de CE los cuales presentaban una confluencia del 90%. Previo al ensayo experimental, el medio de cultivo se reemplaza por 400 μ l de PRP. Se inició el tratamiento por agregado de la hormona o el vehículo (isopropanol) durante tiempos breves. Para evitar la degradación del NO, todos los tratamientos se realizaron en presencia de 60 U/ml de superóxido dismutasa (SOD)

(Gryglewski y col., 1986). Luego de finalizado el tratamiento, se colectaron 285 μ l del PRP de cada condición experimental y se colocaron en la cubeta del agregómetro. Se inició la agregación plaquetaria con el agregado de adenosina difosfato (ADP) 2×10^{-5} M y se monitoreó la agregación plaquetaria por cinco minutos obteniéndose los registros correspondientes (Esquema 4). La señal generada en un PPP se utilizó como control de transparencia (100% de transmisión) (Kikuta y col., 1998). Paralelamente, las células se disolvieron en NaOH 1 N y se tomaron alícuotas para la determinación de proteínas (método de Lowry). Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria por mg de proteínas respecto al control. La agregación plaquetaria inducida por las muestras control se consideró como 100% de agregación.



Esquema 4. Ensayo de agregación plaquetaria. PPP: plasma pobre en plaquetas. PRP: plasma rico en plaquetas

2.6. Ensayo de apoptosis celular

La apoptosis o muerte celular programada se estudió midiendo la fragmentación de ADN.

2.6.1. Ensayo de “DNA laddering”

Se utilizó un ensayo de fragmentación de ADN con posterior visualización en geles de agarosa. Se utilizaron CE (90% de confluencia) cultivadas en placas de 60 mm de diámetro (NUNC). Las células se incubaron en 5 ml de DMEM suplementado con 1% de SFB en ausencia y presencia de distintas concentraciones del inductor de apoptosis peróxido de hidrógeno (H_2O_2). Finalizado el tratamiento, se extrajo el ADN empleando una mezcla de solventes (fenol:cloroformo:alcohol isoamílico; 25:24:21). Se separó por electroforesis en gel de agarosa al 1% (p/v) conteniendo 1 mg/ml de bromuro de etidio. Las bandas de ADN se visualizaron utilizando un transiluminador de luz UV (UVP M-15E, Upland, USA) (Ohtsuka y col., 2006). Los geles obtenidos fueron fotografiados utilizando una cámara digital (Canon PowerShot A540).

2.6.2. Ensayo de apoptosis por marcación con [3H]-timidina

Esta técnica permite cuantificar el grado de fragmentación del ADN (Hurst-Kennedy y col., 2009; Artwohl y col., 2009). Se utilizaron CE (90% de confluencia) cultivadas en 5 ml de DMEM placas de 60 mm de diámetro (NUNC). Las células se

marcaron con [³H]-timidina (1 µCi/ml) durante dos horas. Se realizaron tres lavados con PBS para eliminar el exceso de [³H]-timidina no incorporada por las células. Inmediatamente después, las células se trataron con Pg o el vehículo (isopropanol <0.1%) en DMEM suplementado con 1% de SFB. Cuando se empleó el inductor de apoptosis (H₂O₂), este se agregó durante las dos últimas horas del tratamiento hormonal. Finalizado el tratamiento, se descartó el medio de cultivo, las células se lisaron a 37 °C durante toda la noche en un buffer de lisis (se detalla su composición al final de este párrafo) y luego se centrifugó a 13000 × g (Sigma 2K15) durante 15 minutos a 4 °C. Esta centrifugación permite separar el ADN fragmentado (sobrenadante) del ADN entero (pellet). Se cuantificó la radioactividad presente en cada fracción y se expresaron los resultados como porcentaje de ADN fragmentado respecto al ADN total.

Composición del buffer de lisis:

	Concentración final
Buffer Tris-HCl, pH 8.0	10 mM
NaCl	400 mM
EDTA	10 mM
Dodecil sulfato de sodio (SDS)	1% (v/v)
Proteinasa K	1 mg/ml

2.7. Ensayo de RT-PCR

Se empleó la técnica de RT-PCR para evaluar los niveles de expresión del ARN mensajero de las moléculas de adhesión endoteliales. Se usó LPS como inductor de expresión de las CAMs. Las CE se sembraron en placas de 24 pocillos (NUNC) con una densidad de 5×10^4 células/pocillo en 1 ml de DMEM suplementado con 10% de SFB y se cultivaron hasta una confluencia del 90%. Se privaron de suero durante 24 horas. Los tratamientos hormonales (Pg y/o LPS) se realizan en DMEM fresco conteniendo 1% de SFB. Las moléculas de adhesión celular estudiadas fueron: E-selectina, P-selectina y VCAM-1. Para realizar la extracción de ARN y la obtención del ADN complementario se utilizó un kit comercial (Superscript III CellsDirect cDNA synthesis system) y se procedió de acuerdo a las instrucciones descriptas en el mismo. El ADNc fue amplificado por PCR usando un termociclador programado (Biometra Uno-Thermoblock, Göttingen, Germany). La secuencia de los cebadores utilizados y los ciclos de PCR se ajustaron a lo descrito en la literatura (Peng y col., 2006; Callera y col., 2004). Los ciclos de PCR llevados a cabo fueron los siguientes: E-selectina (95 °C, 3 minutos, 94 °C, 30 segundos, 53 °C, 45 segundos, 72 °C, 60 segundos, 72 °C, 7 minutos, 32 ciclos); P-selectina (94 °C, 3 minutos, 94 °C, 30 segundos, 62 °C, 45 segundos, 72 °C, 45 segundos, 72 °C, 7 minutos, 38 ciclos); VCAM-1 (95 °C, 3 minutos, 95 °C, 60 segundos, 55 °C, 60 segundos, 72 °C, 60 segundos, 72 °C, 7 minutos, 32 ciclos). La secuencia de los cebadores utilizados fue la siguiente: E-selectina, forward: 5' CAA CGT GCA CGT TTG ACT GT 3', reverse: 5' AGG TCA AGG CTT GAA CAC TG 3'; P-selectina, forward: 5' TAA TCC CCC GCA GTG TAA AG 3', reverse: 5' AGG TTG GCA ATG GTT CAC TC 3'; VCAM-1, forward: 5' TAA GTT ACA CAG CAG TCA AAT GGA 3'. La

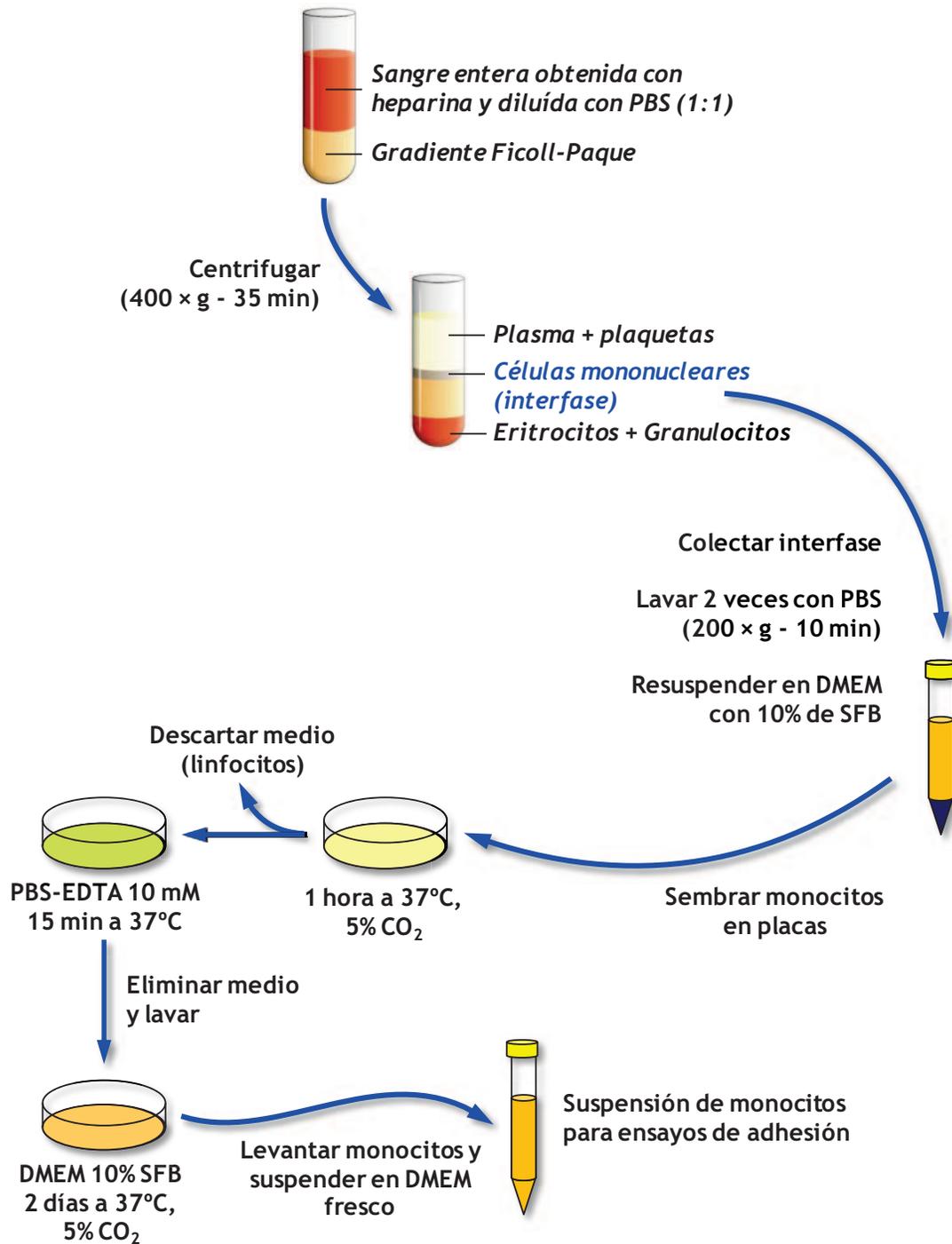
expresión del gen de la enzima gliceraldehído-3-fosfato dehidrogenasa se usó como control de expresión y fue corroborada para cada set de RT-PCR experimentales (cebador directo: 5' TCC CTC AAG ATT GTC AGC AA 3', cebador inverso: 5' AGA TCC ACA ACG GAT ACA TT 3'; los pasos del proceso de amplificación fueron los siguientes: 95 °C, 3 minutos, 94 °C, 30 segundos, 53 °C, 30 segundos, 72 °C, 45 segundos, 72 °C, 7 minutos, 35 ciclos). Los productos de amplificación se resolvieron por electroforesis en geles de agarosa al 1% (p/v) conteniendo 1 mg/ml de bromuro de etidio (Ohtsuka y col., 2006). Los geles se fotografiaron sobre un transiluminador de luz UV (M-15E, Upland, USA) utilizando una cámara digital (Canon PowerShot A540).

2.8. Ensayo de adhesión de monocitos sobre células endoteliales en cultivo

2.8.1. Asilamiento de células mononucleares

Las células mononucleares sanguíneas fueron asiladas empleando un gradiente de densidad (Boyum y col., 1968). Sangre entera obtenida aseptícamente con heparina como anticoagulante fue diluida con igual volumen de una solución salina balanceada (PBS), y se sembraron cuidadosamente sobre un gradiente de Ficoll-Paque Plus (Pharmacia) (Composición: 5.7 g de Ficoll 400/100 ml, 9 g de diatrizoato de sodio/100 ml, 0.0231 g de EDTA/100 ml, densidad: 1.077 ± 0.001 mg/ml) en una proporción de 4:3 (sangre:Ficoll-Paque) (Esquema 5). Se centrifugó a $400 \times g$ (Rolco CM36R) durante 35 minutos a temperatura ambiente. Se colectó cuidadosamente la interfase que contiene las células mononucleares (monocitos y

linfocitos). Se evaluó la viabilidad celular mediante tinción vital con Azul Tripan. La suspensión celular se lavó dos veces con PBS (200 × g durante diez minutos a temperatura ambiente). Se retomó el paquete celular en 3 ml de medio DMEM suplementado con 10% de SFB y se sembraron en placas (NUNC) de 35 mm de diámetro a una densidad de 6×10^7 células/placa y se incuban durante una hora a 37 °C y 5% de CO₂ para permitir la adhesión de los monocitos a la placa y eliminar las células no adheridas (linfocitos). Los monocitos se incubaron a 37 °C durante 15 minutos en PBS-EDTA 10 mM, se lavaron y se cultivaron en DMEM suplementado con 10% de SFB durante dos días. Las células adheridas se levantaron y fueron suspendidas en medio de cultivo fresco. Se realizó un recuento del número absoluto de monocitos en cámara de Neubauer y se confirmó nuevamente la viabilidad celular mediante el ensayo de coloración vital con Azul Tripan.



Esquema 5. Aislamiento de células mononucleares a partir de sangre entera

2.8.2. Adhesión de monocitos a células endoteliales en cultivo

Se utilizaron cultivos de CE con una confluencia del 90%. Las mismas se privaron de SFB durante 24 horas, se reemplazó por DMEM fresco con 1% de SFB y se trataron con Pg, LPS o Pg más LPS durante el periodo de tiempo correspondiente a cada ensayo experimental. Finalizado el tratamiento, 1×10^6 monocitos/ml fueron sembrados sobre monocapas de CE e incubados durante dos horas a 37 °C en un incubador metabólico (Pawlowski y col., 1985). A continuación se colectó el medio y se tomaron alícuotas para realizar el recuento de los monocitos no adheridos utilizando una cámara de Neubauer. El número total de monocitos adheridos a las CE fue calculado por la diferencia entre el total de monocitos sembrados y la cantidad de monocitos no adheridos. Paralelamente, las CE se fijaron con metanol y se tiñeron con solución de Giemsa. Se tomaron fotografías de campos representativos de todas las condiciones experimentales ensayadas, utilizando una cámara digital (OLYMPUS C7070WZ) acoplada a un microscopio óptico (OLYMPUS BX51). Se contó el número de monocitos adheridos en siete campos microscópicos de cada condición experimental y se calculó el promedio del número de monocitos adheridos por campo, lo cual se corroboró mediante el recuento en cámara de Neubauer previamente mencionado. Los resultados se expresaron como número de monocitos adheridos por campo.

2.8.3. Ensayo de viabilidad celular con Azul Tripan

Para estudiar viabilidad celular se utilizó la técnica de exclusión de Azul Tripan. El método de exclusión del colorante Azul Tripan se fundamenta en que solamente aquellas células muertas (no viables) van a incorporar el colorante (Paul, 1975). Se colectó 100 µl de la suspensión de células y se mezcló con 100 µl de una solución 0.4% (p/v) del colorante. Se realizó el recuento de aquellas células que habían incorporado el colorante (no viables) en cámara de Neubauer. Finalmente se determinó la cantidad de células viables presentes en la suspensión llevando a cabo el siguiente cálculo:

Número de células viables/ml = promedio de células contadas por cuadrante $\times 10^4$
 \times factor de dilución.

2.8.4. Tinción con solución de Giemsa

Se descartó el medio de cultivo de las células y se fijaron con metanol durante seis minutos. Luego de descartar el alcohol se dejó secar al aire completamente. Se agregó la solución de Giemsa (diluida 1:20 con agua destilada-desionizada) durante 18 minutos en agitación suave. Se eliminó el colorante y se procedió a lavar con agua hasta que se observó la ausencia de colorante en la misma. Se secó a temperatura ambiente.

2.9. Análisis estadístico de los datos obtenidos

Cada condición experimental ha sido reproducida en tres experimentos independientes llevados a cabo con diferentes lotes de animales y distintos cultivos celulares. En cada uno de ellos, las condiciones experimentales fueron realizadas por cuadruplicado. Los datos cuantitativos representan el promedio con su correspondiente desviación estándar (D.E.). Se empleó el Test de ANOVA para comparaciones múltiples y el Test t de Student (Snedecor y Cochran, 1967) para las comparaciones entre 2 medias, considerando como significativos valores de probabilidad menores a 0.05 ($p < 0.05$).

RESULTADOS

1. ESTUDIO DEL MECANISMO DE ACCIÓN HORMONAL

1.1. Efectos rápidos, no genómicos de progesterona

Previamente, en nuestro laboratorio, se demostró que Pg estimula la síntesis de NO y PGI₂ (Tabla 1) (Selles y col., 2001). Este efecto se produce a tiempos cortos de tratamiento hormonal (menor a 30 minutos) y es de naturaleza no genómica ya que la presencia de inhibidores de la transcripción génica (actinomicina D) (Perry y Kelly., 1970) o de la síntesis de proteínas (cicloheximida) (Ennis y Lubin, 1964) no suprimió la acción de la hormona (Selles y col., 2002).

	<i>NO (% sobre el control)</i>	<i>PGI₂ (% sobre el control)</i>
Pg 1 nM	40*	42*
Pg 10 nM	83**	110**
Pg 100 nM	89**	182**

Tabla 1. Estudio del efecto de Pg sobre la producción de NO y PGI₂ en AAR.
Se midió la producción de NO empleando [³H]-arginina como precursor y cromatografía de intercambio iónico (Selles y col., 2002). La producción de PGI₂ se midió empleando [³H]-ácido araquidónico como precursor y cromatografía en capa fina (Selles y col., 2002).

Se demostró además, que la acción de Pg sobre la producción de NO es específica de sexo y es dependiente de una función ovárica conservada. Ratas macho y ratas ovariectomizadas no exhibieron respuesta frente al tratamiento hormonal, pero sí responden a acetilcolina, un agonista natural del tejido vascular (Selles y col., 2002). El efecto sobre la producción de NO no se modificó al realizar el tratamiento en presencia del antagonista del receptor citosólico/nuclear de Pg, el compuesto RU486 (Mendiberri y col., 2006).

Los efectos de Pg sobre la producción de NO descritos anteriormente, se estudiaron empleando la técnica de conversión de [³H]-arginina en [³H]-citrulina + NO, con posterior separación de la [³H]-citrulina generada por cromatografía de intercambio iónico (Selles y col., 2001). Al iniciarme como tesista, mi primera actividad fue evaluar el método de Griess como herramienta para medir la producción de NO en tejido vascular (Griess, 1879; Kleinbongard y col., 2002). Para ello se empleó como control positivo de síntesis de NO el compuesto acetilcolina, agonista fisiológico del sistema vascular. Es sabido que la acetilcolina estimula la síntesis de NO por activación directa de la NOS (Furchgott y Zawadzki, 1980; Amezcua y col., 1988; Knowles y Moncada, 1994). Los AAR se incubaron con acetilcolina (10 y 50 μM) por 15 minutos y se midió la producción de NO por Griess. En concordancia con lo descrito en la literatura (Yang y col., 2001; Rand y Garland, 1992; Jovanovic y col., 1994), el tratamiento con acetilcolina estimuló significativamente la producción de NO (101% y 83% sobre el control, 10 y 50 μM respectivamente, $p < 0.001$) (Figura 1). Esto permitió demostrar que el sistema experimental propuesto (AAR) responde a su agonista natural y evidenció también la capacidad de la técnica de Griess de detectar cambios en NO.

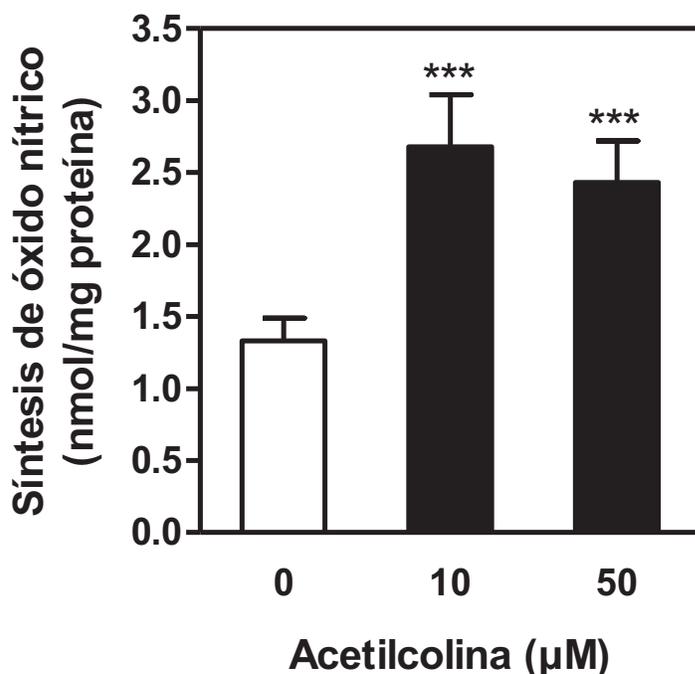


Figura 1. Estudio del efecto de acetilcolina sobre la producción de NO en AAR. Los AAR se trataron con acetilcolina (10 µM) o su vehículo (H₂O) durante 15 minutos. La producción de NO liberado al medio de incubación fue medida utilizando la técnica de Griess de acuerdo a como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados representan el promedio ± D.E. de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. ***p<0.001 respecto al valor de la condición control.

A continuación, se realizaron estudios dosis respuesta del efecto de Pg sobre la producción de NO. Los AAR fueron expuestos a diferentes concentraciones de la hormona (0.1 - 100 nM) durante cinco minutos. Se observó que Pg incrementó significativamente la generación de NO en el rango de concentraciones comprendido entre 1 y 100 nM (Figura 2).

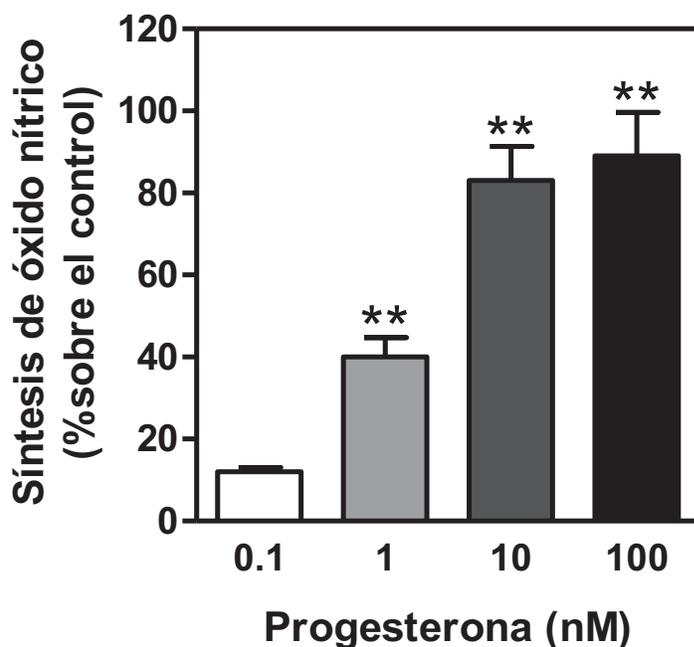


Figura 2. Estudio del efecto de Pg sobre la producción de NO en AAR.

Los AAR se trataron con distintas concentraciones de Pg (0.1, 1, 10 y 100 nM) o su vehículo (isopropanol <0.1%) durante 5 minutos. La producción de NO liberado al medio de incubación fue medida utilizando la técnica de Griess de acuerdo a como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados representan el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. ** $p < 0.02$ respecto al valor de la condición control.

Los resultados obtenidos al emplear la técnica de Griess fueron semejantes a los descritos previamente en nuestro laboratorio empleando el mismo sistema experimental y la técnica de conversión de [3 H]-arginina en [3 H]-citrulina (Selles y col., 2002). De esta manera consideramos como validada la técnica de Griess y siendo este ensayo más económico, adoptamos esta técnica para el desarrollo de los futuros experimentos.

Es sabido que la NOS es una enzima regulable por calcio (Ca^{2+}) y fosforilación (Serock y col., 2008). Resultados previos reportados por nuestro laboratorio sugerían la participación del sistema mensajero del calcio en la activación de la NOS por Pg. En presencia del compuesto verapamil (bloqueador de

canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje), se suprime el estímulo sobre la síntesis de NO inducido por Pg (Mendiberri y col., 2006). Sabiendo que el calcio ingresa al interior de la célula a través de diferentes tipos de canales y continuando con estos estudios, se evaluó la acción de la hormona sobre la actividad de NOS cuando los AAR se incuban en un medio libre de Ca^{2+} (para evitar el influjo del catión desde el medio extracelular). Como se observa en la Figura 3, cuando se realizó el tratamiento en un medio libre de Ca^{2+} , el efecto hormonal se anuló totalmente, demostrando que el efecto estimulador de la producción de NO inducido por Pg depende del Ca^{2+} extracelular. Para evaluar la contribución del calcio intracelular se diseñó la siguiente estrategia: se provocó la salida de calcio de los depósitos intracelulares empleando el compuesto thapsigargin (TG). Además, para impedir el relleno de dichos depósitos se adicionó en forma simultánea un inhibidor de la bomba de calcio del retículo endoplásmico (capta calcio hacia el interior del retículo), el compuesto ácido ciclopiazónico (ACP) (Thastrup y col., 1990; Seidler y col., 1989). Los AAR se incuban en un medio libre de Ca^{2+} , se agrega TG y ACP por dos minutos e inmediatamente después se adiciona la hormona durante 5 minutos adicionales. En la Figura 3, se muestra que, provocando un aumento en los niveles de Ca^{2+} intracelular, aún en ausencia del catión en el medio de incubación, se observó un estímulo estadísticamente significativo en la síntesis del vasoactivo. Este estímulo es significativamente menor con respecto a aquel que se obtuvo cuando lo AAR se incubaron en presencia de Ca^{2+} . De esta manera, estos resultados muestran que el Ca^{2+} del medio intracelular también contribuye en la estimulación de NOS inducida por Pg.

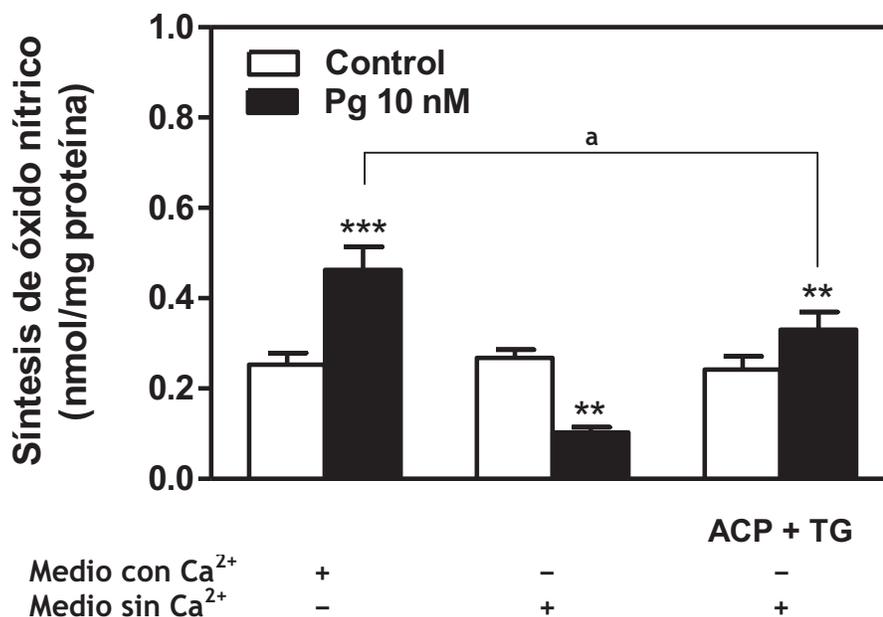


Figura 3. Participación del calcio en la síntesis rápida de NO inducida por tratamiento con Pg en AAR.

Los AAR se incubaron en ausencia y presencia de ACP (10 μ M) juntamente con TG (1 μ M) durante 2 minutos en un medio libre de Ca²⁺ (con el agregado de EGTA 1 mM). También se incubaron AAR en un medio con Ca²⁺ (1 mM CaCl₂). Inmediatamente después se trataron con Pg (10 nM) o su vehículo (isopropanol <0.1%) durante 5 minutos adicionales. La producción de NO liberado fue medida utilizando la técnica de Griess de acuerdo a como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados representan el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes (n=4). **p<0.02, ***p<0.001 respecto al valor de sus correspondientes controles, ^ap<0.02 Pg con Ca²⁺ vs Pg+ACP+TG sin Ca²⁺.

En su conjunto estos resultados sugieren que la acción estimuladora de Pg sobre la síntesis de NO depende del aporte de calcio del medio extracelular y de los reservorios intracelulares.

Teniendo en consideración reportes de la literatura que muestran que la activación de la NOS por diferentes agonistas, entre ellos el 17- β -estradiol, comprende la participación de los sistemas de señalización intracelular de PKC, MAPK y PI3K/Akt (Serock y col., 2008), nos propusimos evaluar si el mecanismo de acción de Pg a nivel vascular involucraría la activación de sistemas de transducción de señales. Está descrito que la vía de la PLC/PKC participa en las acciones no

genómicas de Pg en diferentes sistemas celulares (Cordoba y Beconi, 2001). Datos reportados previamente por nuestro laboratorio mostraron que Pg estimula la síntesis de DAG (Mendiberri y col., 2006). Teniendo en cuenta esto, se decidió estudiar si Pg regula la actividad enzimática de PKC. Para ello se utilizó un ensayo de fosforilación de sustrato específico, empleando HAR. Como sustrato de PKC se seleccionó histona tipo III-S. Para determinar la concentración adecuada de proteínas provenientes de los HAR, se realizaron ensayos de fosforilación empleando el éster de forbol TPA como activador directo de PKC (Castagna y col., 1982) y diferentes concentraciones de proteínas: 25, 50 y 100 µg/ensayo. En presencia de 50 y 100 µg de proteínas, el tratamiento con TPA (100 nM) produjo el mayor estímulo de actividad PKC (Tabla 2). Con 25 µg de proteínas, los efectos de TPA no fueron estadísticamente significativos (Tabla 2). En base a estos resultados se seleccionó 50 µg como la concentración óptima de proteína a utilizar en los ensayos siguientes.

Tratamiento	Actividad de PKC (pmoles P/mg proteína/min)	
	Control	TPA 100 nM
25 µg/ensayo	1.57 ± 0.18	1.76 ± 0.14
50 µg/ensayo	1.66 ± 0.23	2.64 ± 0.29***
100 µg/ensayo	1.70 ± 0.20	2.26 ± 0.26**

Tabla 2: Caracterización del ensayo para medir actividad de PKC.

Los HAR conteniendo 25, 50 ó 100 µg de proteínas, se trataron con TPA (100 nM) o su vehículo (etanol <0.1%) por 5 minutos. Seguidamente se adicionaron 10 µl de ATP/[γ ³²P]-ATP (100 µM, 0.2 µCi/ensayo) por 5 minutos adicionales. Se midió la actividad de PKC como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados representan el promedio ± D.E. de tres experimentos independientes (n=4). **p<0.02; ***p<0.001 respecto al valor de sus correspondientes controles.

A continuación se midió la actividad PKC estimulada por TPA en presencia o ausencia de un inhibidor de PKC. Se observó que el tratamiento de los HAR con 100

nM de TPA durante 5 minutos produjo un aumento de la actividad de PKC de 109% sobre el control, $p < 0.001$ (Figura 4). En presencia de un inhibidor de PKC, el compuesto chelerythrine ($1 \mu\text{M}$) (Herbert y col., 1990), el efecto de TPA se suprimió totalmente (Figura 4). Este resultado corrobora que el ensayo de fosforilación es específico para PKC ya que responde positivamente a TPA y además evidenció la especificidad del compuesto chelerythrine como inhibidor selectivo de PKC.

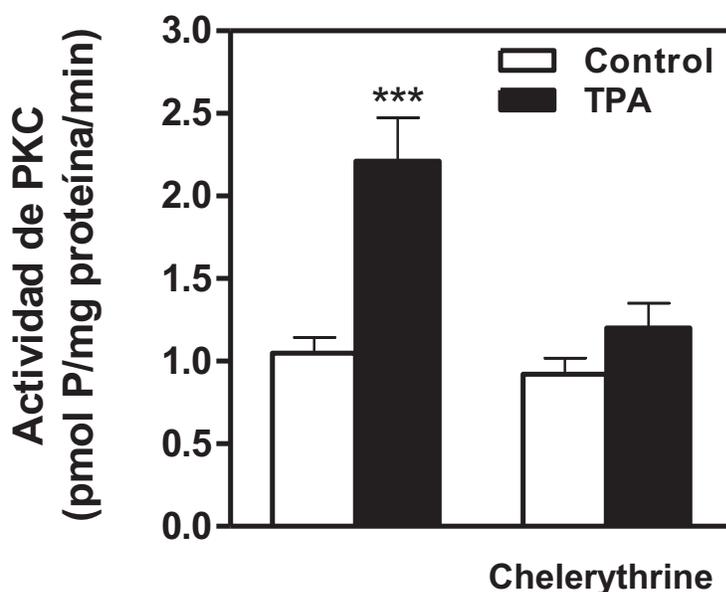


Figura 4: Caracterización del ensayo para medir actividad de PKC.

Los HAR se preincubaron en ausencia y presencia de chelerythrine ($1 \mu\text{M}$) por 3 minutos e inmediatamente después se trataron con TPA (100 nM) o su vehículo (etanol $< 0.1\%$) por 5 minutos. Seguidamente se adicionaron $10 \mu\text{l}$ de ATP/ $[\gamma^{32}\text{P}]\text{-ATP}$ ($100 \mu\text{M}$, $0.2 \mu\text{Ci/ensayo}$) por 5 minutos adicionales. Se midió la actividad de PKC como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados representan el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes ($n=4$). *** $p < 0.001$ vs su respectivo control.

Habiendo caracterizado el ensayo de fosforilación para PKC se procedió a estudiar el efecto de Pg sobre la activación de dicha enzima. Para ello se diseñaron dos estrategias experimentales: (1) emplear HAR aislados a partir de AAR con tratamiento hormonal previo y (2) usar HAR aislados de AAR sin tratamiento

hormonal. Como se describe en la Sección de metodología la opción (1) requiere de dos pasos de congelación en nitrógeno líquido mientras que la opción (2) solo requiere uno. Para medir el efecto de Pg (10 nM), en el primer caso los AAR fueron tratados 10 minutos con la hormona y luego se procedió a aislar el homogenado y realizar el ensayo de fosforilación. En el segundo caso, alícuotas de HAR fueron tratadas por 10 minutos con la hormona e inmediatamente después, se realizó el ensayo de fosforilación. Como se observa en la Tabla 3 el tratamiento con Pg estimuló significativamente la actividad de la enzima. Dado que los resultados obtenidos con ambos sistemas son semejantes, se seleccionó el segundo modelo como sistema experimental para los siguientes ensayos, ya que solo requiere congelar la muestra una sola vez.

<i>Actividad de PKC (pmoles P/mg proteína/min)</i>		
	HAR con tratamiento previo	HAR sin tratamiento previo
Control	2.51 ± 0.26	1.72 ± 0.23
Pg 10 nM	7.32 ± 0.80**	6.71 ± 0.84***

Tabla 3: Efecto de Pg sobre la actividad de PKC en HAR con y sin tratamiento hormonal previo.

HAR con tratamiento previo: los HAR fueron tratados durante 10 minutos con la hormona. Inmediatamente después, los AAR se homogenizaron mecánicamente para obtener los HAA de acuerdo a como se describe en la Sección de Metodología.

HAR sin tratamiento previo: los AAR se homogenizaron mecánicamente para obtener los HAA de acuerdo a como se describe en la Sección de Metodología. Los HAA se trataron con Pg 10 nM por 10 minutos.

Seguidamente se llevaron a cabo los ensayos de fosforilación de acuerdo a como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados representan el promedio ± D.E. de tres experimentos independientes (n=4). **p<0.02, ***p<0.001 con respecto al valor de los controles correspondientes.

A continuación se estudió el efecto de Pg sobre la actividad de PKC en función de la concentración hormonal empleada. Alícuotas conteniendo 50 µg de proteínas del homogenado total, se trataron con concentraciones fisiológicas de Pg

(1, 10 y 100 nM) durante 10 minutos e inmediatamente después se realizó el ensayo de fosforilación usando ATP/[$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP como precursor. Como se observa en la Figura 5, a concentraciones bajas (1 nM), se obtuvo un incremento significativo de la actividad quinasa de 158% por encima del control ($p < 0.001$) siendo mayor el estímulo a 10 y 100 nM (293% y 440% sobre el control, respectivamente; $p < 0.001$). Se demostró que este efecto fue dosis dependiente, ya que se detectaron diferencias significativas entre los diferentes estímulos inducidos por cada una de las concentraciones de Pg ensayadas: $p < 0.02$ (1 nM vs 10 nM Pg), $p < 0.05$ (10 nM vs 100 nM Pg) y $p < 0.01$ (1 nM vs 100 nM Pg).

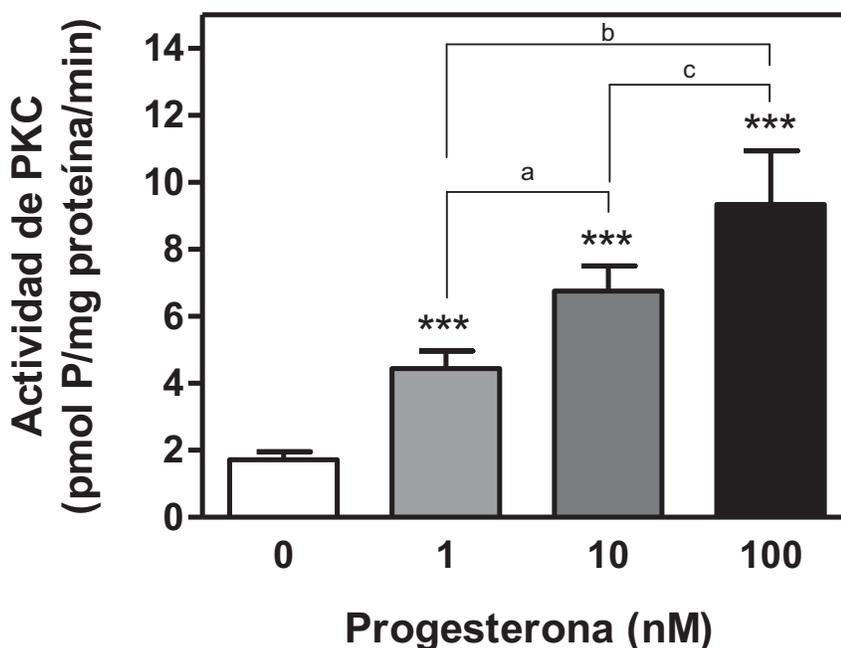


Figura 5: Estudio dosis respuesta de actividad PKC.

Los HAR se trataron con diferentes concentraciones de Pg (1, 10 y 100 nM) por 10 minutos. Seguidamente se adicionaron 10 μl de ATP/[$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP (100 μM , 0.2 μCi /ensayo) por 5 minutos. Se midió la actividad de PKC como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados representan el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. *** $p < 0.001$ respecto al valor de la condición control. ^a $p < 0.02$, ^b $p < 0.01$, ^c $p < 0.05$

Posteriormente se estudió el perfil temporal de la acción estimuladora de Pg sobre la actividad de PKC. Teniendo en cuenta los resultados obtenidos del estudio dosis respuesta, elegimos 10 nM de Pg como la concentración a utilizar en los siguientes ensayos. Los tiempos ensayados fueron 3, 5, 10 y 15 minutos, obteniéndose un estímulo máximo a los 5 minutos de tratamiento (570% respecto al control, $p < 0.001$). A los 3 y 10 minutos se observó un aumento de la actividad PKC de menor magnitud (165% y 290% respecto al control, respectivamente; $p < 0.001$), mientras que a los 15 minutos no se detectaron diferencias significativas con respecto a la condición control (Figura 6). Este perfil temporal de activación de PKC es semejante al perfil temporal de la acción estimuladora de Pg sobre la producción de DAG reportado previamente en nuestro laboratorio (Mendiberri y col., 2006).

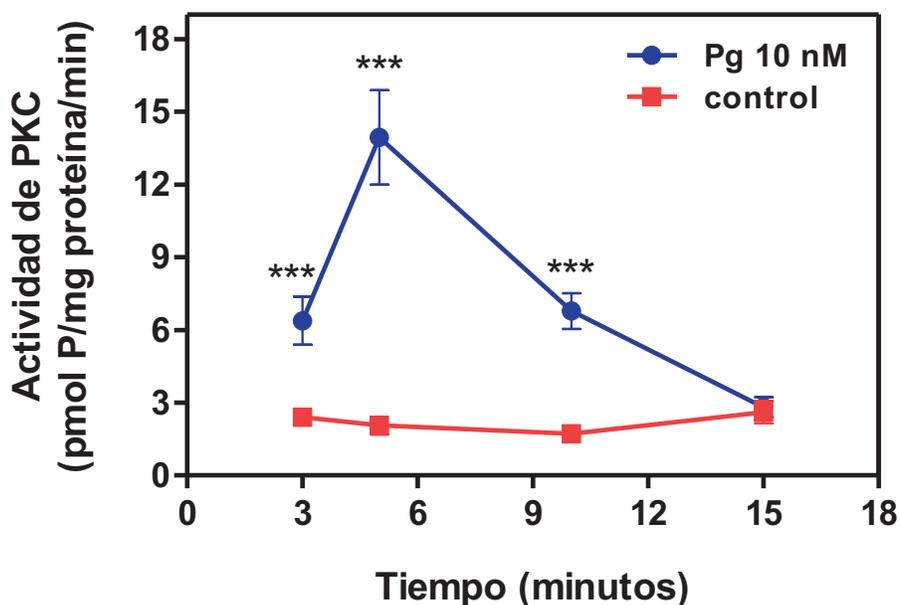


Figura 6: Estudio del perfil temporal de actividad PKC.

Los HAR se trataron con Pg (10 nM) a diferentes tiempos (3, 5, 10 y 15 minutos). Seguidamente se adicionaron 10 μ l de ATP/[γ^{32} P]-ATP (100 μ M, 0.2 μ Ci/ensayo) por 5 minutos. Se midió la actividad de PKC como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados representan el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. *** $p < 0.001$ respecto al valor de sus correspondientes controles.

Para investigar la acción de Pg sobre la actividad de MAPK se emplearon ensayos de fosforilación con ATP/[$\gamma^{32}\text{P}$]-ATP usando proteína básica de mielina como sustrato de la enzima. Se estudió la acción hormonal sobre la actividad MAPK empleando diferentes concentraciones de Pg (1, 10 y 100 nM). Se observó que 10 minutos de tratamiento con Pg 1 nM, produjo un incremento significativo de la actividad MAPK (35% respecto al control, $p < 0.001$), siendo mayor el estímulo a 10 y 100 nM (57% y 66% sobre el control, respectivamente, $p < 0.001$) (Figura 7). A diferencia de lo observado para PKC, el efecto de Pg no fue dependiente de la dosis ya que no se detectaron diferencias significativas entre las distintas magnitudes del estímulo.

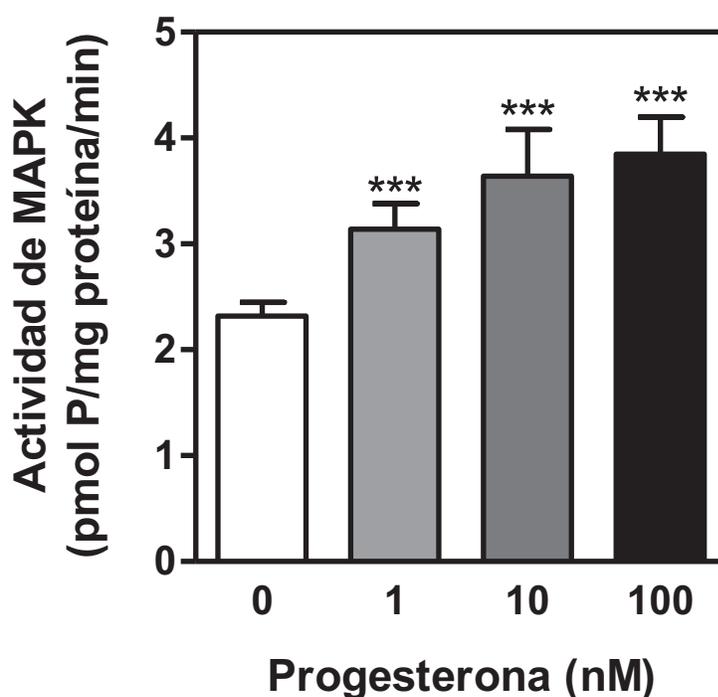


Figura 7: Efecto de Pg sobre la actividad de MAPK: estudio dosis respuesta. Los HAR se expusieron a las dosis indicadas de Pg (1, 10 y 100 nM) durante 10 minutos. Se midió la actividad MAPK como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados representan el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. *** $p < 0.001$ respecto al valor del control.

Se evaluó el perfil temporal de la acción estimuladora de Pg. Los HAR se trataron con Pg 10 nM durante 1, 10 y 15 minutos. Los resultados demostraron que ya al minuto de tratamiento se obtuvo un aumento significativo de la actividad MAPK (45% respecto al control, $p < 0.05$), siendo máximo el estímulo a los 10 minutos de tratamiento con la hormona (93% sobre el control, $p < 0.02$). Luego de 15 minutos de tratamiento hormonal no se observaron diferencias significativas respecto al control (Figura 8).

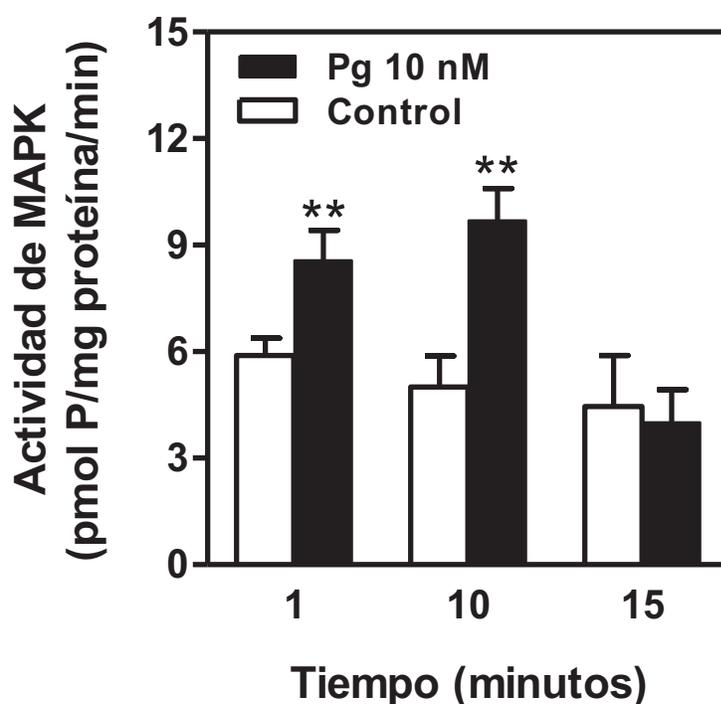


Figura 8: Estudio del perfil temporal de actividad MAPK en respuesta al tratamiento con Pg.

Los HAR fueron tratados con Pg (10 nM) durante diferentes periodos de tiempo (1, 10 y 15 minutos). Se midió la actividad MAPK como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados representan el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. ** $p < 0.02$ respecto al valor de sus correspondientes controles.

Habiendo demostrado que Pg activa los sistemas de PKC y MAPK, se procedió a investigar si estos sistemas mensajeros median la acción estimuladora de la hormona sobre la producción de NO. Para ello se emplearon inhibidores específicos

de estas vías mensajeras. Para evaluar la contribución de la vía MAPK, se seleccionó el compuesto PD98059, un inhibidor de MEK (MAPKK) (Dudley y col., 1995; Alessi y col., 1995). Las concentraciones del inhibidor empleadas fueron seleccionadas de lo reportado en la literatura. Los AAR se preincubaron con diferentes concentraciones de PD98059 durante 30 minutos e inmediatamente después fueron expuestos a 10 nM Pg por 5 minutos. La Figura 9 muestra que el incremento en la generación de NO inducido por la hormona, fue totalmente suprimido en presencia del inhibidor de MAPK, a todas las concentraciones del inhibidor ensayadas.

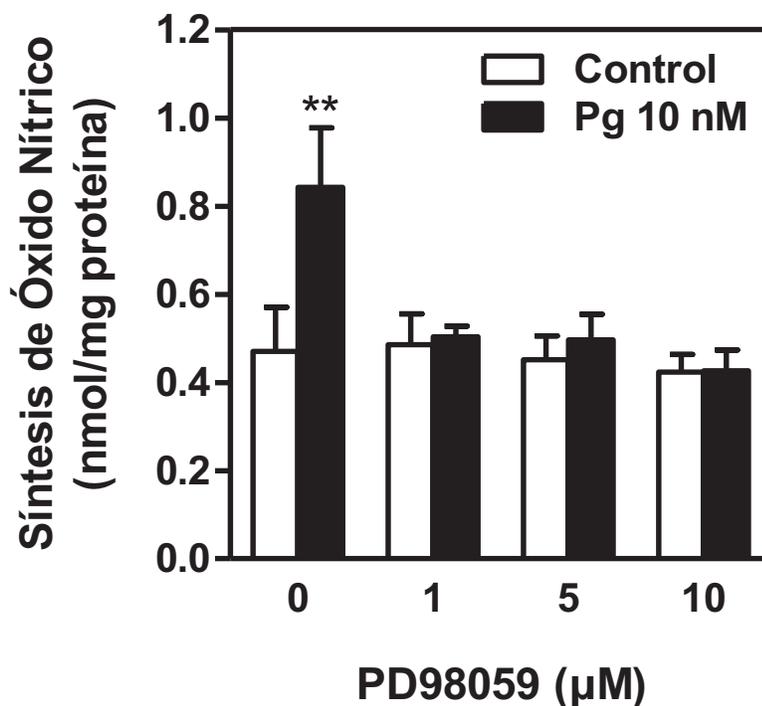


Figura 9. Participación de la vía MAPK en la síntesis de NO inducida por Pg. Los AAR se preincubaron durante 30 minutos con el inhibidor de MAPK (PD98059; 5 µM). Inmediatamente después se trataron con Pg (10 nM) o su vehículo (isopropanol <0.1%) durante 5 minutos. La producción de NO liberado fue medida utilizando la técnica de Griess de acuerdo a como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados representan el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. ** $p < 0.02$ respecto al valor de su correspondiente control.

La hipótesis de que la vía PKC participe en la acción estimuladora de Pg sobre la producción de NO se evaluó empleando el compuesto chelerythrine. Se seleccionó una concentración de 1 μM del inhibidor de PKC ya que previamente habíamos demostrado que dicha concentración fue efectiva en bloquear la estimulación de la actividad de la enzima inducida por TPA (Figura 4). En la Figura 10 se observa que 30 minutos de pretratamiento con chelerythrine no alteró el estímulo hormonal sobre la generación de NO. Se repitió el ensayo con una concentración mayor del inhibidor chelerythrine: 10 μM . El estímulo en la síntesis de NO inducido por Pg tampoco se modificó (95% vs 85% sobre el control; Pg vs Pg con inhibidor).

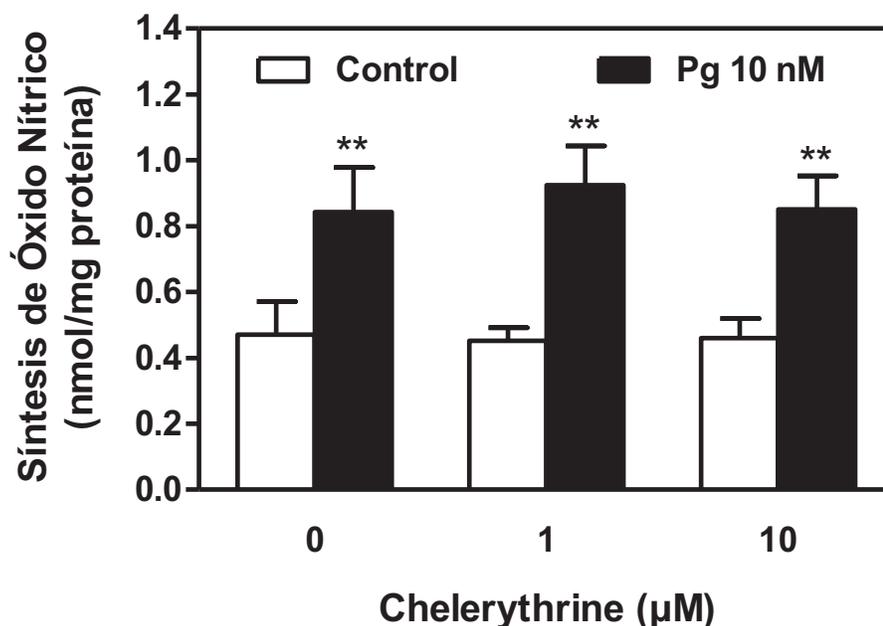


Figura 10. Efecto de chelerythrine sobre la estimulación de la síntesis de NO inducida por Pg.

Los AAR se preincubaron durante 30 minutos con chelerythrine a las concentraciones indicadas. Inmediatamente después se trataron con Pg (10 nM) o su vehículo (isopropanol <0.1%) durante 5 minutos. La producción de NO liberado fue medida utilizando la técnica de Griess de acuerdo a como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados representan el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. ** $p < 0.02$ respecto al valor de sus correspondientes controles.

Estos resultados nos sugieren que si bien Pg activa la vía de señalización intracelular de PLC/PKC, esta vía no media la acción rápida, no genómica de la hormona sobre la producción de NO.

Teniendo en cuenta que los anillos de aorta poseen dos tipos celulares principales (CE y CMLV), se propuso investigar si los efectos de Pg sobre la producción de NO observados en anillos aórticos, se podría deber a una acción directa de la hormona sobre las CE. Para ello se emplearon cultivos primarios de CE. Primeramente se estudió la especificidad del sistema celular empleando acetilcolina como control positivo de la síntesis de NO. En la Tabla 4, se observa que 20 minutos de tratamiento de las CE con acetilcolina 100 μM , indujeron un estímulo significativo de la producción de NO (168% sobre el control, $p < 0.02$).

<i>Síntesis de NO en CE (nmoles/mg proteína)</i>	
Control	2.11 \pm 0.22
Acetilcolina 100 μM	5.66 \pm 0.65**

Tabla 4. Efecto de acetilcolina sobre la producción de NO en CE.
Las CE en estado confluyente fueron tratadas con acetilcolina (100 μM) o su vehículo (H_2O) durante 20 minutos. La producción de NO liberado fue medida por la reacción de Griess de acuerdo a como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados representan el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado ** $p < 0.02$ respecto al valor del control.

Habiendo comprobado que las células responden a su agonista natural, se investigó el efecto de Pg sobre la producción de NO en cultivos de CE. Semejante a lo descrito en AAR, tratamientos breves (20 minutos) con concentraciones fisiológicas de Pg (1, 10 y 100 nM) indujeron una significativa estimulación de la síntesis de NO: 42%, 29% y 103% sobre el control, respectivamente (Figura 11). Estos resultados evidencian una acción directa de Pg a nivel endotelial estimulando la síntesis del vasoactivo NO.

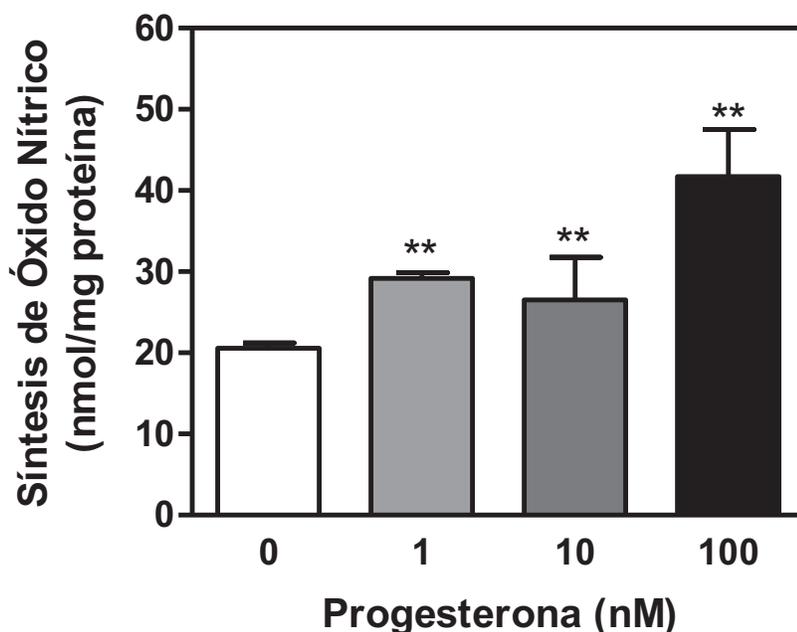


Figura 11. Estudio dosis respuesta del efecto de Pg sobre la producción de NO en CE. Las CE en estado confluyente fueron tratadas con distintas concentraciones de Pg (1 nM - 100 nM) o su vehículo (isopropanol <0.1%) durante 20 minutos. La producción de NO liberado fue medida por la reacción de Griess de acuerdo a como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados representan el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. ** $p < 0.02$ respecto al valor del control.

1.2. Efectos genómicos de progesterona

Como se mencionó anteriormente, los anillos de aorta representan un sistema celular que contiene CE y CMLV. Con la finalidad de estudiar el efecto de la hormona en forma individual sobre las CE o CMLV se implementaron cultivos celulares de CE y CMLV obtenidas a partir de explantes de aorta de rata. Se utilizó la técnica de cultivo primario propuesta originalmente por Mc Guire y Orkin (McGuire y Orkin, 1987), modificado por Yeh y colaboradores (Yeh y col., 2002), que permite el cultivo selectivo de CE, CMLV y además el cocultivo de ambos tipos

celulares. El procedimiento empleado para el aislamiento de las mismas se encuentra descrito en la sección de Metodología.

Para estudiar las acciones genómicas de Pg se seleccionó como parámetro la proliferación celular y se investigó la regulación hormonal de la proliferación tanto en CE como en CMLV. Se empleó la técnica de incorporación de [³H]-timidina como indicador de proliferación celular (Kyaw y col., 2002). Primeramente, se evaluó la cinética de incorporación de [³H]-timidina en CMLV durante un periodo de tiempo comprendido entre 4 y 96 horas en presencia de 1% de SFB. Los cultivos de CMLV fueron sincronizados por privación de suero durante 24 horas y se midió la incorporación de [³H]-timidina como se describe en la sección de Metodología. Se observó que la mayor incorporación del compuesto radiomarcado se produjo entre las 8 y las 36 horas (Figura 12). A partir de las 36 horas, se redujo marcadamente la síntesis de ADN por parte de las CMLV, cinética que se mantuvo hasta las 96 horas (Figura 12). Si bien la técnica de incorporación de [³H]-timidina es ampliamente utilizada en la literatura como índice de proliferación celular, para validarla en nuestro sistema experimental, se repitió el ensayo cuantificando la proliferación por recuento celular en cámara de Neubauer. En la Tabla 5 se puede observar que los resultados obtenidos con ambas técnicas fueron semejantes.

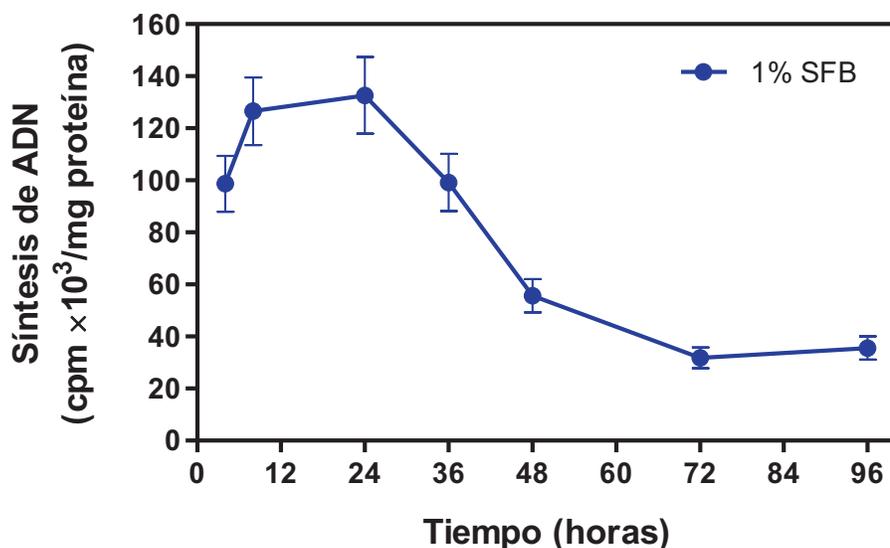


Figura 12. Estudio de la cinética de incorporación de [³H]-timidina en cultivos de CMLV. CMLV semiconfluentes fueron cultivadas en ausencia de suero por 24 horas y se reemplazó el medio por DMEM fresco suplementado con 1% de SFB y se mantuvieron durante 4, 8, 24, 36, 48, 72 ó 96 horas adicionales. La [³H]-timidina (1 μ Ci/ml) se adicionó en forma de pulso dos horas antes de finalizar el periodo de tiempo estudiado. La incorporación de [³H]-timidina se determinó como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados representan el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes procesados por cuadruplicado.

Proliferación celular		
	Incorporación de [³H]-timidina (cpm × 10³/mg proteína)	Número de células × 10³/ml
12 hs	106.6 \pm 13.8	186 \pm 23.4
24 hs	132.6 \pm 14.7	240 \pm 21.6
48 hs	55.7 \pm 6.4	85 \pm 7.3
72 hs	31.8 \pm 4.1	91 \pm 7.8
96 hs	35.5 \pm 4.5	108 \pm 9.7

Tabla 5. Cinética de crecimiento celular en cultivos de CMLV. CMLV semiconfluentes fueron cultivadas en ausencia de suero por 24 horas. Se cambió el medio por medio DMEM fresco conteniendo 1% de SFB y se mantuvieron por 12, 24, 48, 72 ó 96 horas adicionales. Cuando se estudió la proliferación celular por medio de la técnica de incorporación de timidina radiomarcada las CMLV recibieron un pulso de [³H]-timidina (1 μ Ci/ml) dos horas antes de finalizar el periodo de tiempo correspondiente. Cuando se realizó el recuento de las CMLV, las células se resuspendieron con PBS y se procedió a realizar el recuento en cámara de Neubauer. Los resultados representan el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes llevados a cabo por cuadruplicado.

A continuación se investigó el efecto de Pg sobre la proliferación de CMLV. Se emplearon diferentes concentraciones de la hormona. Las CMLV sincronizadas fueron tratadas con Pg (1-100 nM) por 24 horas. En la Figura 13 se puede observar que el esteroide estimuló significativamente la síntesis de ADN en el rango de concentración de 10-100 nM (53%, 25% y 30% sobre el control respectivamente). No se observaron diferencias significativas respecto al control con 1 nM de Pg).

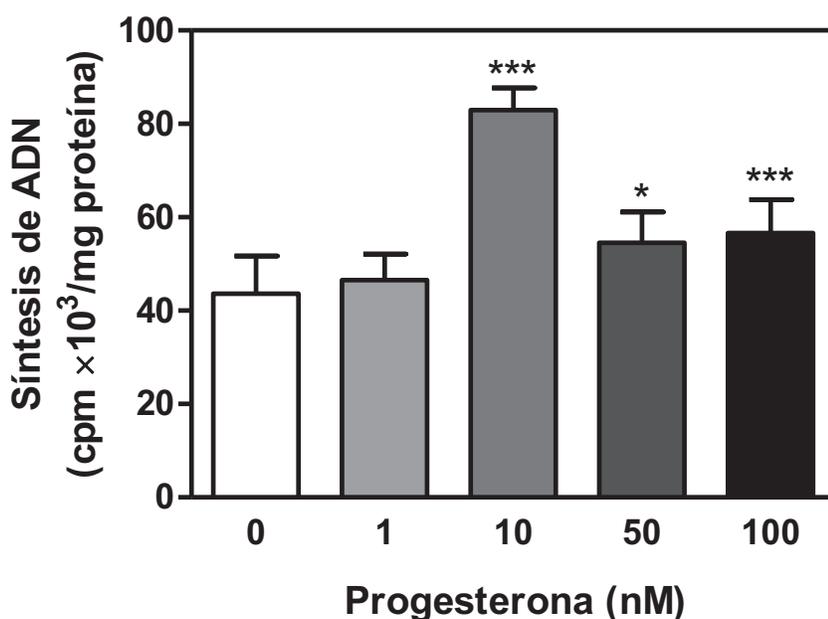


Figura 13. Estudio dosis respuesta del efecto de Pg sobre la proliferación de CMLV. Las CMLV semiconfluentes fueron cultivadas en ausencia de suero por 24 horas y luego tratadas con diferentes concentraciones de la hormona (1 nM - 100 nM) durante 24 horas adicionales. Las CMLV recibieron un pulso de [³H]-timidina (1 μCi/ml) dos horas antes de finalizar el tiempo de tratamiento hormonal. Los ensayos de incorporación de [³H]-timidina se llevaron a cabo de acuerdo a como se describe en la sección de Metodología. Los resultados representan el promedio ± D.E. de tres experimentos independientes llevados a cabo por cuadruplicado. *p<0.05, ***p<0.001 respecto al valor del control.

Se seleccionó la concentración 10 nM para estudiar la acción de la hormona sobre la proliferación de CMLV en función del tiempo de tratamiento (24 - 96 h). Como se puede observar en la Figura 14, Pg estimuló significativamente la proliferación entre 24 y 36 horas, mientras que a partir de las 48 horas de

tratamiento, la incorporación de [3 H]-timidina fue semejante a la condición control.

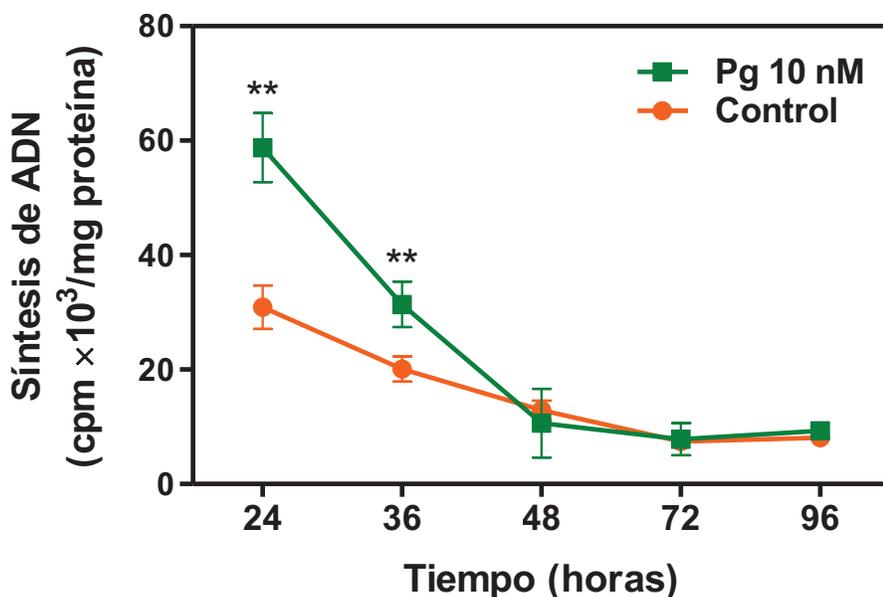


Figura 14. Estudio tiempo respuesta del efecto de Pg sobre la proliferación de CMLV. Las CMLV en estado semiconfluyente fueron incubadas en medio DMEM libre de suero durante 24 horas y luego tratadas con la Pg (10 nM) durante 24, 36, 48, 72 y 96 horas. Las CMLV recibieron un pulso de [3 H]-timidina (1 μ Ci/ml) dos horas antes de finalizar el periodo de tratamiento. Los ensayos de incorporación de [3 H]-timidina se realizaron como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados aquí mostrados representan el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes llevados a cabo por cuadruplicado. ** $p < 0.02$ respecto al valor de sus correspondientes controles.

Se evaluó si el efecto mitogénico de la hormona sobre las CMLV involucraría la participación del PgR. Para ello se utilizó el antagonista del PgR, el compuesto RU486 (Baulieu, 1989; El-Ashry y col., 1989), el cual fue agregado al medio de incubación una hora antes del tratamiento con Pg (10 nM). En la Figura 15, se observa que la presencia del antagonista del PgR, RU486 (10 nM), suprimió totalmente el efecto proliferativo de Pg sobre las CMLV luego de 24 horas de tratamiento.

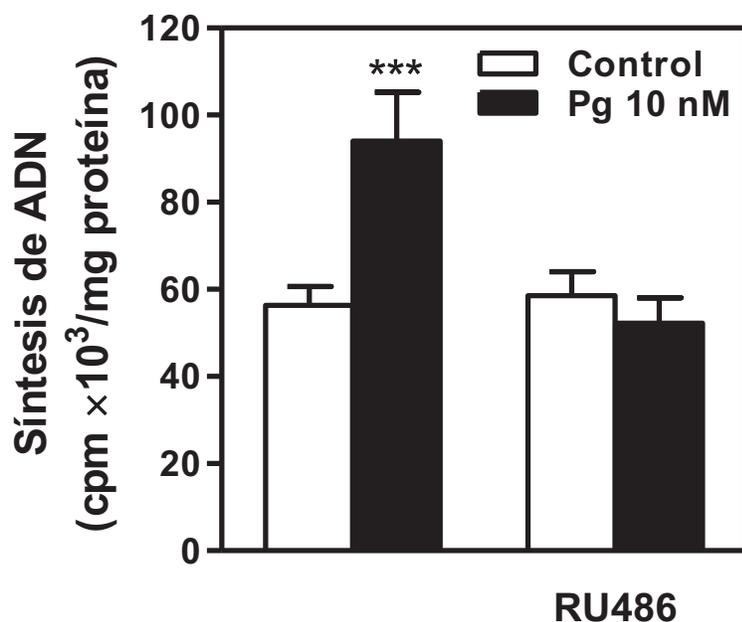


Figura 15. Efecto del antagonista del receptor de progesterona RU486 en el efecto proliferativo de Pg en CMLV.

Las CMLV en estado de semiconfluencia fueron incubadas en medio DMEM libre de suero durante 24 horas. Las células se preincubaron durante una hora con el antagonista del receptor de progesterona RU486 (10 μ M) e inmediatamente después se trataron con Pg 10 nM o su vehículo (isopropanol <0.1%) por 24 horas. Dos horas antes de finalizar el tratamiento hormonal, las CMLV recibieron un pulso de [³H]-timidina (1 μ Ci/ml). Se procedió como se describe en Metodología. Los resultados presentados representan el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. *** p <0.001 respecto al valor del control correspondiente.

A continuación, se estudió el efecto de Pg sobre la regulación de la proliferación del otro componente celular de la pared vascular, las CE. Inicialmente y de la misma manera como se procedió con los cultivos de CE, se realizó un estudio de la cinética de incorporación de [³H]-timidina durante un periodo de tiempo comprendido entre 4 y 48 horas en presencia de 1% de SFB. Como se observa en la Figura 16, entre 8 y 20 horas las células exhiben un perfil ascendente de proliferación alcanzando un máximo entre 20 y 36 horas y descendiendo a las 48 horas.

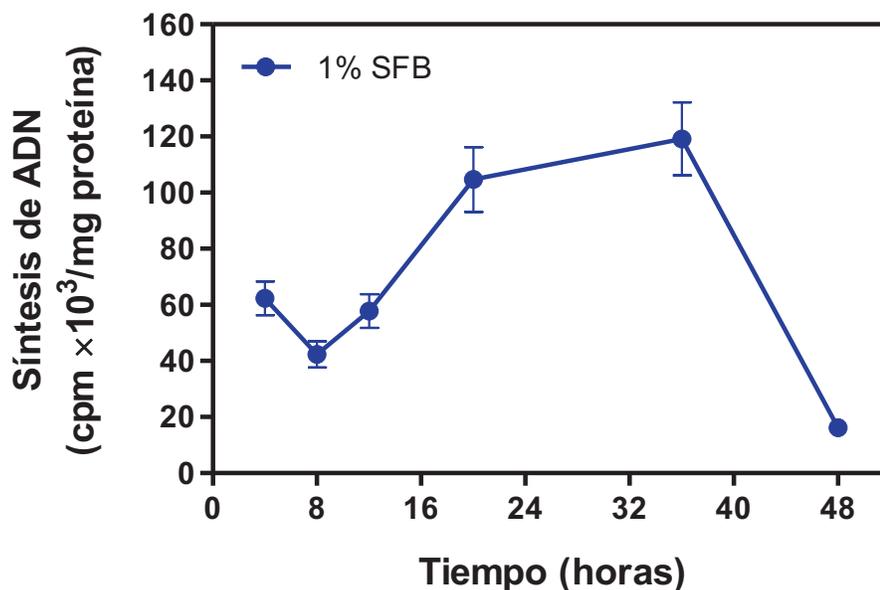


Figura 16. Estudio de la cinética de incorporación de [³H]-timidina en cultivos de CE. CE en estado de semiconfluencia fueron cultivadas en ausencia de suero por 24 horas y luego se dejaron proliferar durante 4, 8, 12, 20, 36 ó 48 horas adicionales. Las CMLV recibieron un pulso de [³H]-timidina (1 μ Ci/ml) dos horas antes de finalizar el tiempo de tratamiento hormonal. Los ensayos de incorporación de [³H]-timidina se llevaron a cabo de acuerdo a como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados representan el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes llevados a cabo por cuadruplicado.

Se estudió el efecto de Pg sobre el crecimiento de CE. Para ello, las CE se tratan con Pg 10 nM durante 24 a 72 horas en presencia de 1% de SFB y se midió la incorporación de [³H]-timidina. Se observó que 24 horas de tratamiento con Pg 10 nM produjo una inhibición estadísticamente significativa de la proliferación de las CE ($p < 0.001$), mientras que no se observaron diferencias respecto al grupo control luego de 48 ó 72 horas de tratamiento hormonal (Figura 17).

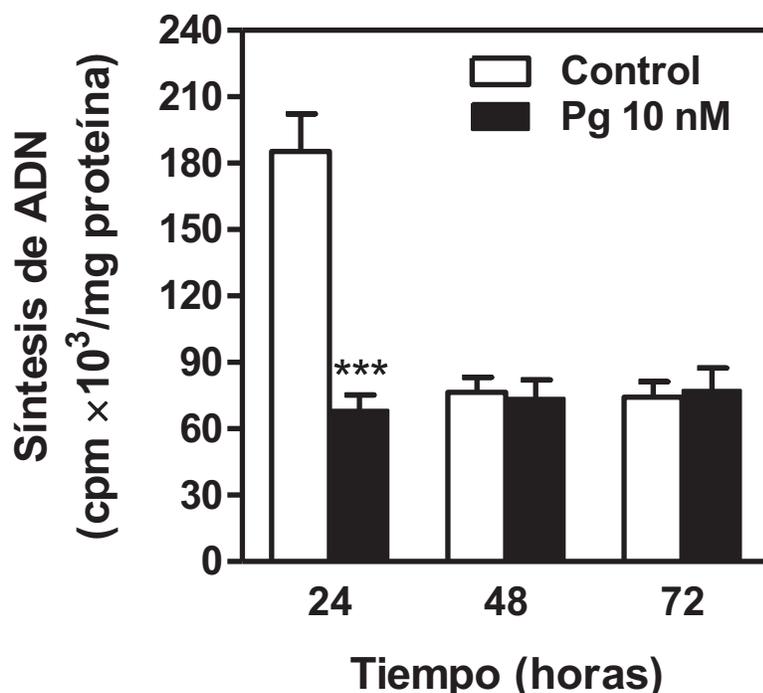


Figura 17. Estudio tiempo respuesta del efecto de Pg sobre la proliferación de CE. Cultivos de CE en estado semiconfluyente fueron incubados en medio DMEM libre de suero durante 24 horas y luego tratados con la Pg (10 nM) durante 24, 48 y 72 horas en presencia de 1% de SFB. Las CE recibieron un pulso de [3 H]-timidina (1 μ Ci/ml) dos horas antes de finalizar el periodo de tratamiento. Los ensayos de incorporación de [3 H]-timidina se realizaron como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados representan el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes llevados a cabo por cuadruplicado. *** $p < 0.001$ respecto al valor del control correspondiente.

Se analizó el efecto de Pg sobre la proliferación celular en un amplio rango de concentraciones. Se observó que 24 horas de tratamiento hormonal indujeron una inhibición estadísticamente significativa del crecimiento celular a todas las concentraciones ensayadas (1, 10, 50 y 100 nM) (Figura 18). En tratamientos más prolongados (48 - 72 horas) no se encontraron diferencias significativas respecto al control en ninguna de las concentraciones estudiadas.

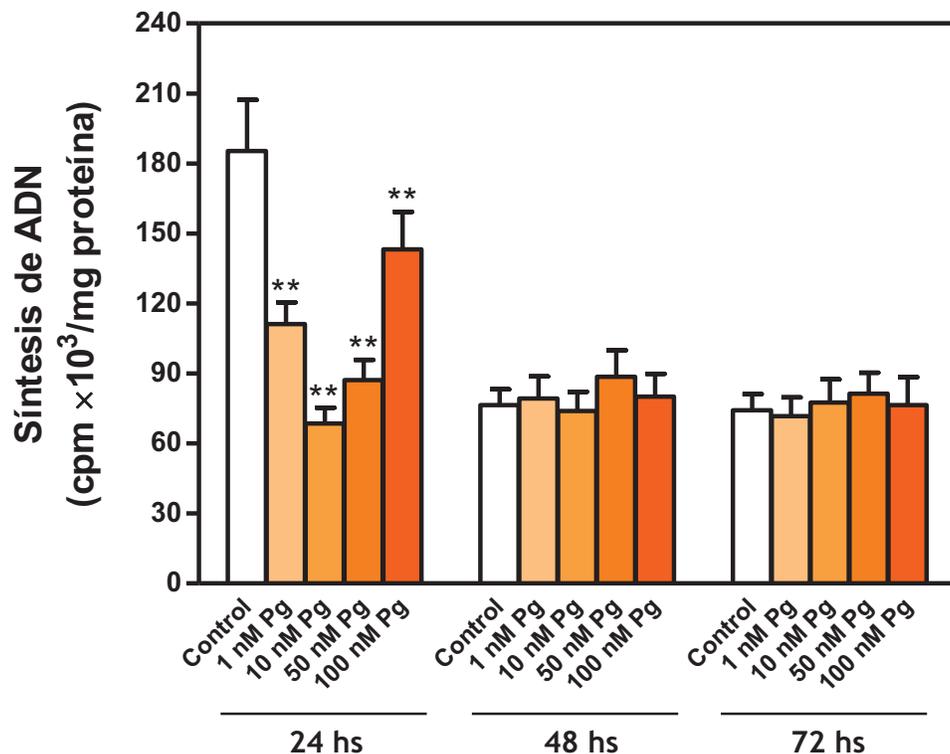


Figura 18. Estudio dosis respuesta del efecto de Pg sobre la proliferación de CE. Cultivos de CE en estado semiconfluyente fueron sincronizados por privación de suero durante 24 horas y luego fueron tratadas con diferentes concentraciones de la hormona (1 nM - 100 nM) por 24, 48 y 72 horas en presencia de 1% de SFB. Las CE recibieron un pulso de [³H]-timidina (1 μCi/ml) dos horas antes de finalizar el periodo de tratamiento. Los ensayos de incorporación de [³H]-timidina se realizaron como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados aquí mostrados representan el promedio ± D.E. de tres experimentos independientes llevados a cabo por cuadruplicado. **p<0.02 respecto al valor del control correspondiente.

Para confirmar que este efecto es de tipo genómico, el tratamiento hormonal fue realizado en presencia y ausencia de inhibidores de la transcripción génica (actinomicina D, 1 y 10 μg/ml) y de la síntesis de proteínas (cicloheximida, 10, 50 y 100 μM). Como se observa en la Figura 19, la supresión de la transcripción y la traducción génica, suprimió el efecto antiproliferativo de Pg a todas las concentraciones ensayadas de los inhibidores. Este resultado evidencia una acción de tipo genómica por parte de la hormona.

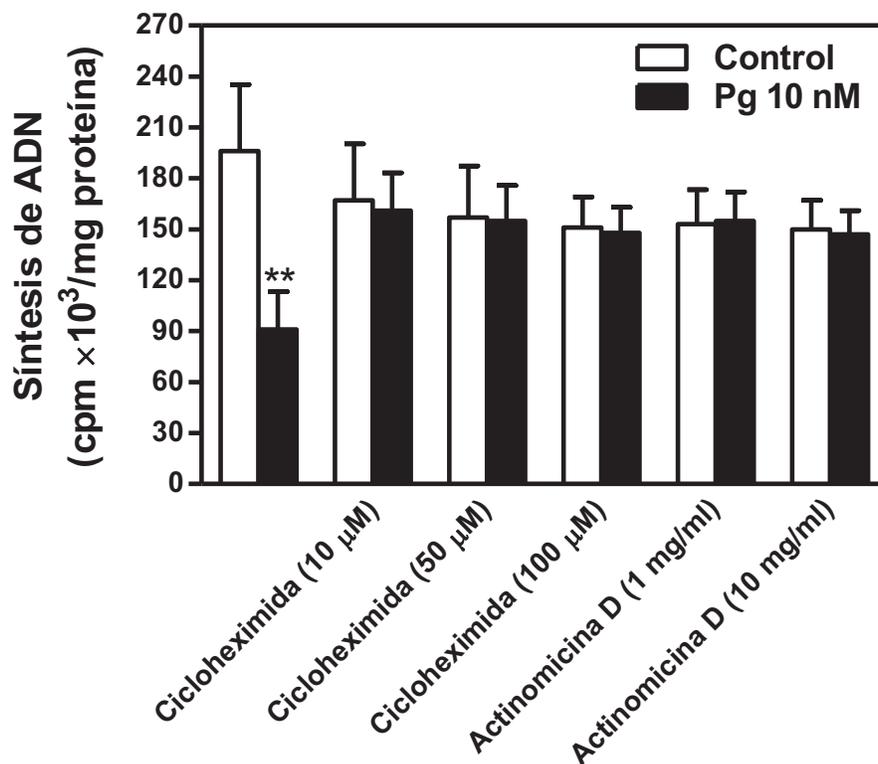


Figura 19. Rol de cicloheximida y actinomicina D sobre el efecto antiproliferativo de Pg en CE.

Las CE en estado de semiconfluencia fueron incubadas en medio libre de suero durante 24 horas y luego tratadas con Pg (10 nM) o su vehículo (isopropanol <0.1%) durante 24 horas. Dos horas antes de finalizar el periodo de tratamiento, las CE recibieron un pulso de [³H]-timidina (1 μCi/ml). Los ensayos de incorporación de [³H]-timidina se realizaron como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados representan el promedio ± D.E. de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. **p<0.02 respecto al valor del control correspondiente.

Se evaluó si el efecto antiproliferativo de la hormona sobre las CE involucraría la participación del PgR. Para ello se utilizó el compuesto RU486. Se ensayaron diferentes concentraciones del antagonista (10 nM, 1 y 10 μM), el cual fue agregado al medio de incubación una hora antes del tratamiento con Pg (10 nM). Se observó que la acción antimitogénica de la hormona se suprimió completamente por la presencia del antagonista del PgR. Este efecto se observó para todas las concentraciones ensayadas del antagonista (Figura 20). El RU486

también suprimió la acción de Pg cuando se empleó una concentración mayor de la hormona (100 nM) (Tabla 6).

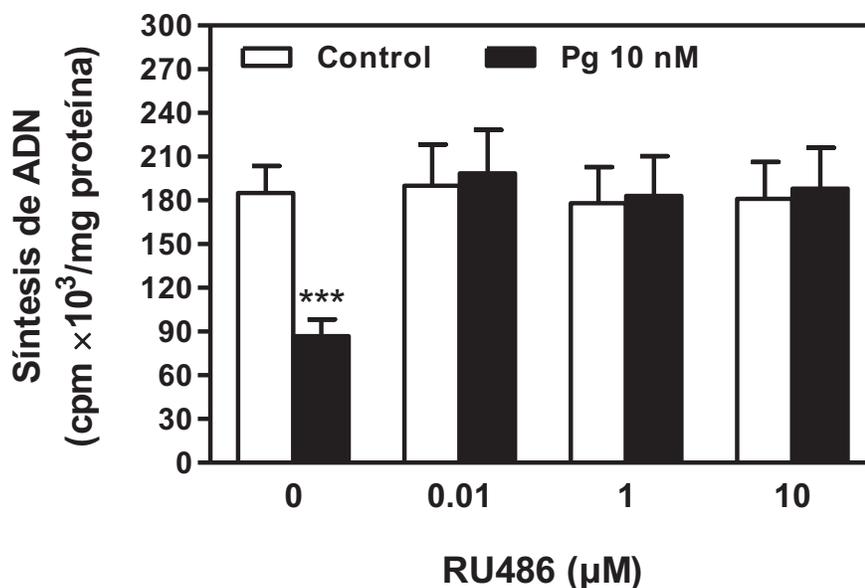


Figura 20. Efecto del antagonista del receptor de progesterona RU486 sobre el efecto antimitogénico de Pg en CE.

Las CE en estado de semiconfluencia fueron incubadas en medio libre de suero durante 24 horas. Las células se preincubaron durante una hora con el antagonista del receptor de progesterona RU486 a las concentraciones indicadas e inmediatamente después se trataron con Pg 10 nM o su vehículo (isopropanol <0.1%) por 24 horas. Dos horas antes de finalizar el tratamiento hormonal, las CE recibieron un pulso de [³H]-timidina (1 μCi/ml). Los ensayos de incorporación de [³H]-timidina se realizaron como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados presentados representan el promedio ± D.E. de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. ***p<0.001 respecto al valor del control correspondiente.

Tratamiento	<i>Síntesis de ADN en CE (cpm × 10³/mg proteína)</i>	
	Sin RU486 10 nM	Con RU486 10 nM
Control	185.4 ± 21.8	178.4 ± 30.2
Progesterona 100 nM	143.2 ± 16.1**	174.7 ± 27.4

Tabla 6. Efecto del antagonista del receptor de progesterona RU486 sobre el efecto antimitogénico de Pg en CE.

Las CE en estado de semiconfluencia fueron incubadas en medio libre de suero durante 24 horas. Las células se preincubaron durante una hora con el antagonista del receptor de progesterona RU486 (10 nM) e inmediatamente después se trataron con Pg 100 nM o su vehículo (isopropanol <0.1%) por 24 horas. Dos horas antes de finalizar el tratamiento hormonal, las CE recibieron un pulso de [³H]-timidina (1 µCi/ml). Los ensayos de incorporación de [³H]-timidina se realizaron como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados presentados representan el promedio ± D.E. de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. **p<0.02 respecto al valor del control correspondiente.

1.3. Interacción entre efectos genómicos y no genómicos de progesterona

Se investigó la posible existencia de una interrelación entre los efectos de Pg sobre los sistemas de señalización intracelular y su acción a largo plazo en la regulación de la proliferación celular. Dado que está reportado en la literatura la existencia de interacción entre la activación de la NOS y proliferación en diferentes tejidos y tipos celulares (Yang y col., 2008; Wang y col., 2009; Hammoud y col., 2007; Park y col., 2003), se evaluó si la acción antimitogénica de Pg sobre CE en cultivo involucra la participación del mensajero celular NO. Para evaluar ello, las células se preincubaron con un inhibidor de la NOS, el compuesto L-NAME (Rees y col., 1989; Rees y col., 1990). En la Figura 21 se observa que 24 horas de tratamiento con Pg (10 nM) inhibió significativamente la proliferación celular (60% de inhibición con respecto al control, p<0.001). La presencia del inhibidor L-NAME (10 µM), suprimió completamente la acción hormonal.

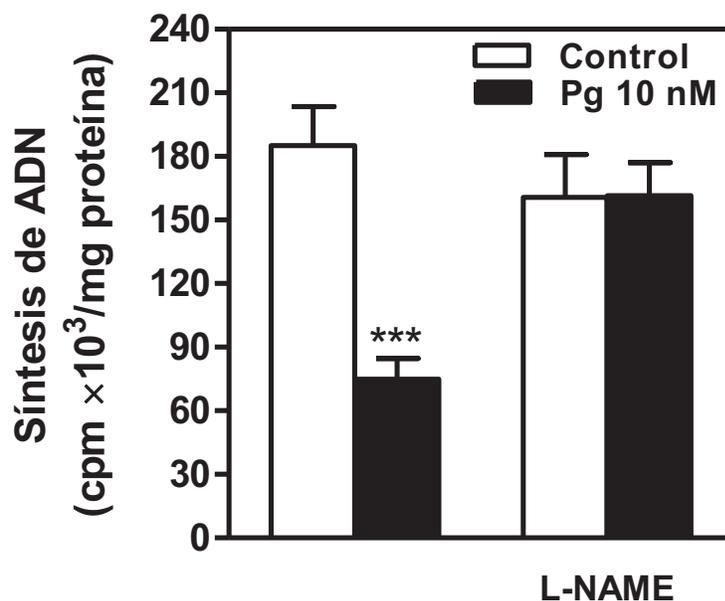


Figura 21. Participación de la NOS en el efecto antiproliferativo de Pg sobre CE. Las CE en estado de semiconfluencia fueron incubadas en medio libre de suero durante 24 horas. Las células se preincubaron durante una hora con el inhibidor de la NOS (L-NAME 10 μ M) e inmediatamente después se trataron con Pg 10 nM o su vehículo (isopropanol <0.1%) por 24 horas. Dos horas antes de finalizar el tratamiento hormonal, las CE recibieron un pulso de [³H]-timidina (1 μ Ci/ml). Los ensayos de incorporación de [³H]-timidina se realizaron como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados presentados representan el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. *** p <0.001 respecto al valor del control correspondiente.

En base a los resultados previos que mostraron que Pg activa la vía de PLC/PKC, se evaluó la participación de PKC en la acción antiproliferativa de Pg en CE. Para ello, se midió la proliferación de CE en presencia del inhibidor de PKC chelerythrine. En la Figura 22 se observa que el efecto hormonal se anuló cuando las CE se preincubaron con chelerythrine (1 μ M).

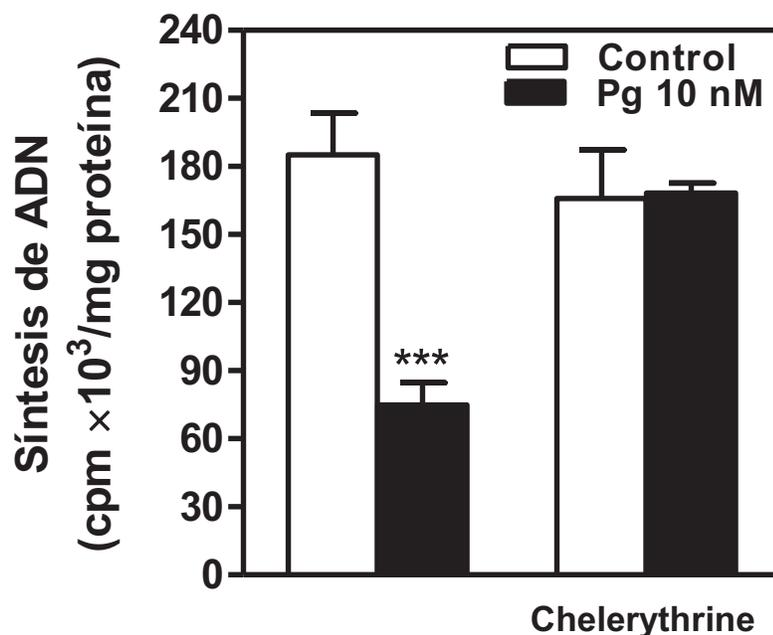


Figura 22. Participación de la vía mensajera de PKC en el efecto antiproliferativo de Pg sobre CE.

Las CE en estado de semiconfluencia fueron incubadas en medio libre de suero durante 24 horas. Las células se preincubaron durante una hora con el inhibidor de PKC (chelerythrine 1 μ M) e inmediatamente después se trataron con Pg (10 nM) o su vehículo (isopropanol <0.1%) por 24 horas. Dos horas antes de finalizar el tratamiento hormonal, las CE recibieron un pulso de [³H]-timidina (1 μ Ci/ml). Los ensayos de incorporación de [³H]-timidina se realizaron como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados presentados representan el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. *** p <0.001 respecto al valor del control correspondiente.

Para confirmar que la vía PKC participa en la inhibición del crecimiento celular, se analizó el efecto de TPA, activador de PKC, sobre la proliferación de CE. El ensayo se realizó en ausencia y presencia del inhibidor de PKC chelerythrine. Los resultados obtenidos se resumen en la Figura 23, en la cual se observa que, de manera semejante a lo observado con Pg, el tratamiento con TPA (100 nM) inhibe la proliferación celular. Al bloquear la actividad de la PKC con chelerythrine (1 μ M), se suprimió completamente el efecto inhibitorio de la proliferación celular inducido por tratamiento con TPA. Este resultado reforzaría el hecho que el efecto antimitogénico de Pg sobre CE involucre la participación de la vía mensajera de PKC.

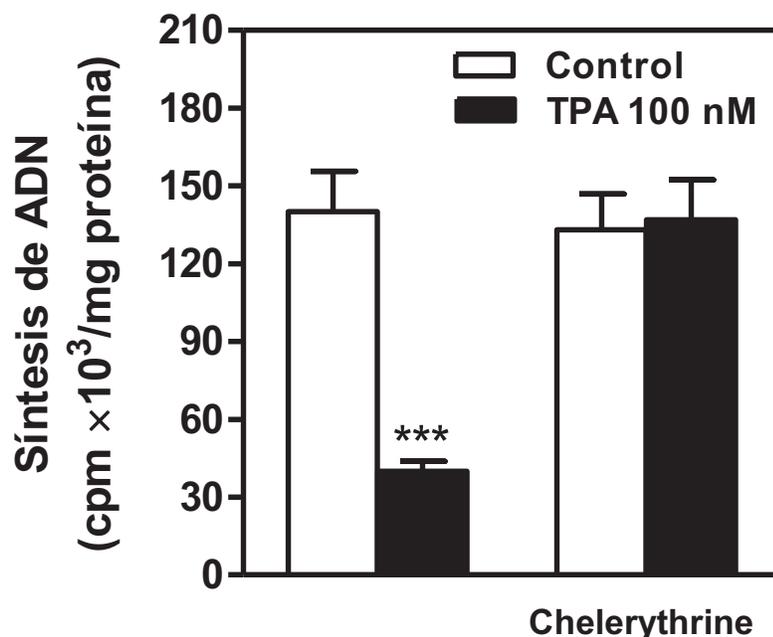


Figura 23. Efecto de TPA sobre la proliferación de CE.

Las CE en estado de semiconfluencia fueron sincronizadas por incubación durante 24 horas en ausencia de suero. Las células se preincubaron durante una hora con el inhibidor de PKC (chelerythrine 1 μ M). Inmediatamente después se trataron con TPA (100 nM) o su vehículo (etanol <0.1%) por 24 horas. Dos horas antes de finalizar el tratamiento hormonal, las CE recibieron un pulso de [³H]-timidina (1 μ Ci/ml). Los ensayos de incorporación de [³H]-timidina se realizaron como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados representan el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. *** p <0.001 respecto al valor del control correspondiente.

Los resultados descriptos anteriormente sugieren que el efecto genómico de Pg sobre la proliferación de CE involucraría de la participación de las vías mensajeras de PKC y NOS. El siguiente paso fue estudiar la participación de las vías de señalización de PKC y MAPK sobre la acción mitogénica de Pg en CMLV. Se determinó que el efecto proliferativo de Pg 10 nM fue totalmente suprimido cuando el tratamiento hormonal se realizó en presencia del inhibidor de PKC chelerythrine (1 μ M) o el inhibidor de MAPK PD98059 (1 μ M) (Figura 24). Estos resultados sugieren que el efecto genómico de Pg sobre proliferación de CMLV involucraría la participación de ambas vías mensajeras.

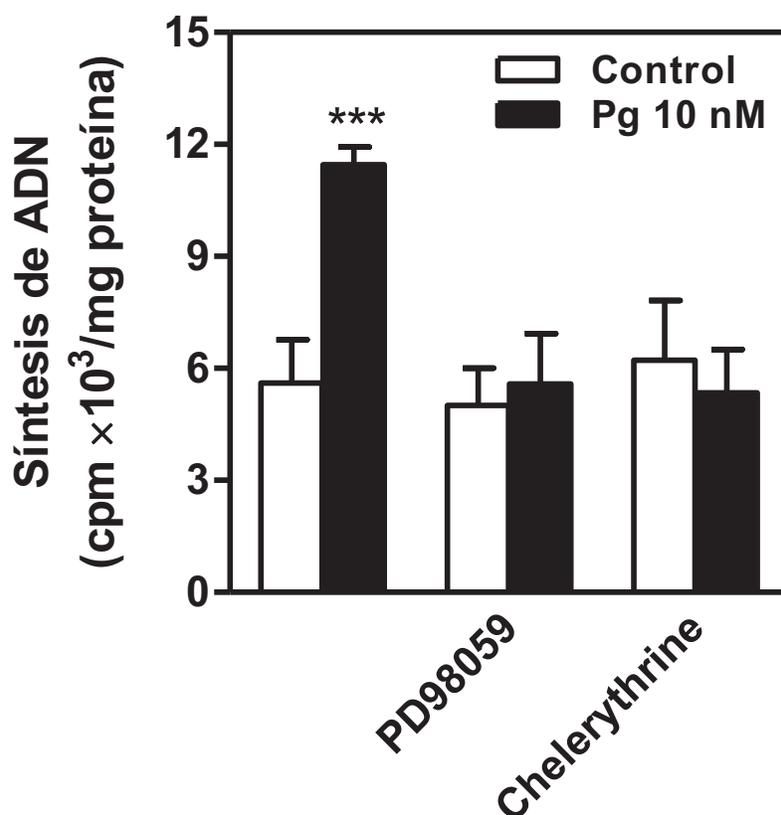


Figura 24. Participación de MAPK y PKC sobre el efecto proliferativo de Pg en CMLV. Las CMLV con una confluencia del 60 - 70% fueron incubadas en medio libre de suero durante 24 horas. Las células se preincubaron durante una hora con los inhibidores de MAPK (PD98059 5 μ M) o de PKC (chelerythrine 1 μ M). Inmediatamente después, las células se trataron con Pg 10 nM o su vehículo (isopropanol <0.1%) por 24 horas. Dos horas antes de finalizar el tratamiento hormonal, las CMLV recibieron un pulso de [³H]-timidina (1 μ Ci/ml). Los ensayos de incorporación de [³H]-timidina se realizaron como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados presentados representan el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. *** p <0.001 respecto al valor del control correspondiente.

Sabiendo que los eicosanoides están implicados en la regulación del fenotipo y crecimiento de las CMLV (Pomerantz y Hajjar, 1989), y teniendo en consideración los reportes previos de nuestro laboratorio que muestran que Pg estimula de forma no genómica la actividad de la COX, se investigó si la acción mitogénica de Pg en CMLV está relacionada con la activación de la COX. Los estudios de incorporación de [³H]-timidina revelaron que en presencia de un inhibidor de la COX, el compuesto indometacina (10 μ M) (de Leval y col., 1999), se suprime el efecto

proliferativo sobre CMLV inducido por tratamiento con 10 nM Pg durante 24 horas (Figura 25).

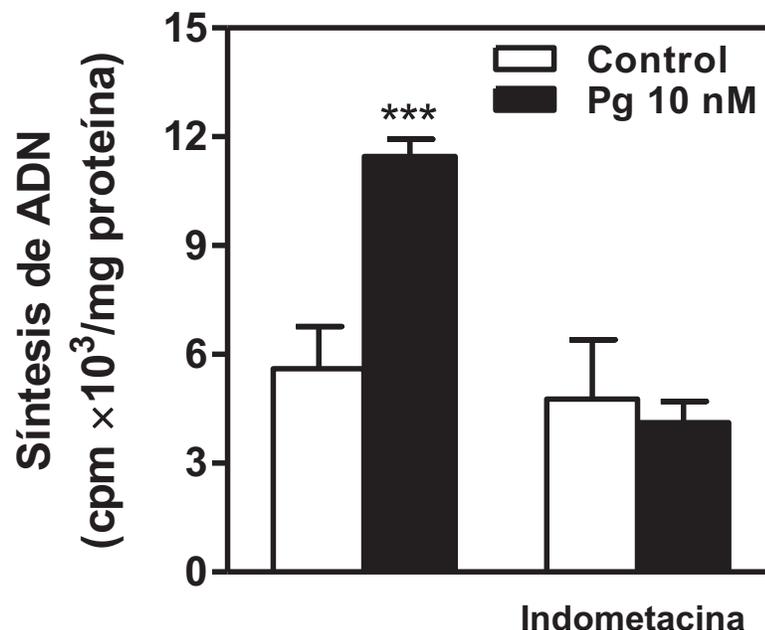


Figura 25. Participación de la COX sobre el efecto proliferativo de Pg en CMLV. Las CMLV con una confluencia del 60 - 70% fueron incubadas en medio libre de suero durante 24 horas. Las células se preincubaron durante una hora con el inhibidor de la COX (indometacina 10 μ M). Inmediatamente después, las células se trataron con Pg 10 nM o su vehículo (isopropanol <0.1%) por 24 horas. Dos horas antes de finalizar el tratamiento hormonal, las CMLV recibieron un pulso de [³H]-timidina (1 μ Ci/ml). Los ensayos de incorporación de [³H]-timidina se realizaron como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados presentados representan el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. ***p<0.001 respecto al valor del control correspondiente.

2. EFECTOS CELULARES DE PROGESTERONA

Como se mencionó en la introducción, la regulación de determinados eventos celulares, tales como migración, proliferación y diferenciación celular, apoptosis, adhesión celular y agregación plaquetaria, juegan un rol clave en la fisiología del sistema vascular. Teniendo esto en cuenta, procedimos a estudiar los

efectos celulares de Pg. Los ensayos se realizaron en condiciones basales o bien frente a agentes que inducen injuria vascular.

2.1. Efecto de progesterona sobre proliferación de células de músculo liso vascular en presencia de medio de cultivo de células endoteliales

Está descrito que el endotelio vascular, a través de diferentes mediadores, condiciona el crecimiento de las CMLV (Cucina y col., 2003; Ferrara y Davis-Smyth, 1997). Teniendo en cuenta este hecho, nos preguntamos si la acción mitogénica de Pg podría modificarse en presencia de CE. Para ello se realizó un ensayo en el cual se investigó el efecto que ejerce la presencia del medio de cultivo proveniente de CE tratadas con Pg o su vehículo, sobre la respuesta mitogénica de Pg en CMLV. Para ello, las CMLV y las CE fueron sincronizadas por privación de suero durante 24 horas. Las CE se trataron durante 24 horas con la hormona o su vehículo y el medio de cultivo proveniente de estos tratamientos (medio condicionado) fue luego utilizado para realizar los ensayos de proliferación en CMLV. Todos los tratamientos hormonales fueron llevados a cabo en presencia de 1% de SFB. Los resultados de la Figura 26 aportan evidencia de que si bien en CMLV aisladas Pg promueve la proliferación, este efecto se modifica en un microambiente endotelial. En ausencia de medio condicionado de CE, el tratamiento con Pg 10 nM estimula la proliferación de las CMLV (Figura 26, barras de la izquierda). La presencia de medio condicionado control (CE tratadas solo con el vehículo), no modificó la acción mitogénica de Pg sobre CMLV (Figura 26, barras centrales). En presencia de medio de cultivo proveniente de CE que fueron tratadas con Pg 10

nM, el efecto mitogénico de la hormona se suprimió completamente (Figura 26, barras de la derecha).

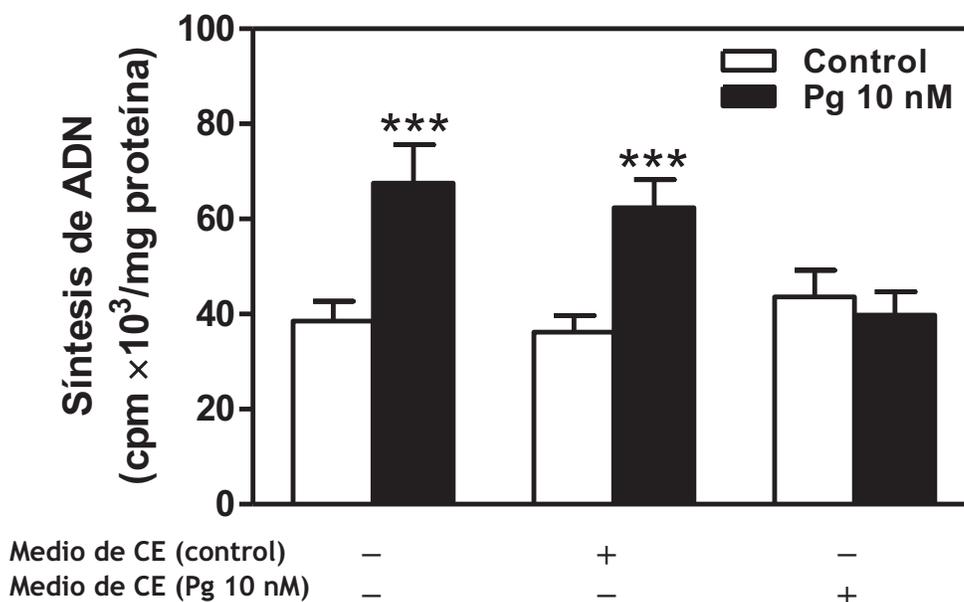


Figura 26. Efecto de Pg sobre la proliferación de CMLV en presencia de medio DMEM condicionado proveniente de un cultivo de CE.

Las CMLV con una confluencia del 60 - 70% fueron incubadas en medio DMEM libre de suero durante 24 horas. Las células se trataron con Pg 10 nM o su vehículo (isopropanol <0.1%) por 24 horas en presencia o ausencia de medio DMEM proveniente de un cultivo de CE las cuales fueron expuestas por 24 horas a un tratamiento con Pg 10 nM o su vehículo (isopropanol <0.1%). Dos horas antes de finalizar el tratamiento hormonal, las CMLV recibieron un pulso de [³H]-timidina (1 μCi/ml). Los ensayos de incorporación de [³H]-timidina se realizaron como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados representan el promedio ± D.E. de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. ***p<0.001 respecto al valor de sus controles correspondientes.

2.2. Estudio del efecto de progesterona sobre la agregación plaquetaria

Previamente se demostró en nuestro laboratorio que Pg ejerce una acción antiagregante plaquetaria cuando AAR se incubaron en un plasma rico en plaquetas y se trataron con Pg durante 1 a 5 minutos (Selles y col., 2001; Selles y col., 2002; Polini y col., 2004). La acción antiagregante de la hormona estaba asociada a su

capacidad de estimular la síntesis de NO por parte de los AAR. Con la finalidad de determinar si la acción antiagregante de Pg se debería a una acción directa del esteroide sobre las CE, se utilizaron células en cultivo aisladas a partir de AAR. Las células se incubaron en PRP, se trataron durante 5 minutos con Pg e inmediatamente después de finalizado el tratamiento hormonal, una alícuota del plasma rico en plaquetas se transfirió al agregómetro y se midió la agregación plaquetaria inducida por ADP. En la Figura 27A se observan los registros de agregación plaquetaria correspondientes. En condiciones basales (solo plasma rico en plaquetas) se obtiene la máxima agregación plaquetaria. Cuando las CE se incuban con el plasma rico en plaquetas (condición control), se produce una disminución de la agregación plaquetaria (68% de agregación plaquetaria en la condición control vs 100% de agregación plaquetaria en la condición basal). El tratamiento de las CE durante 5 minutos con diferentes concentraciones de la hormona (1 - 100 nM) incrementa aún más la inhibición de la agregación plaquetaria respecto de la condición control. En la Figura 27B se muestra la cuantificación de la agregación plaquetaria.

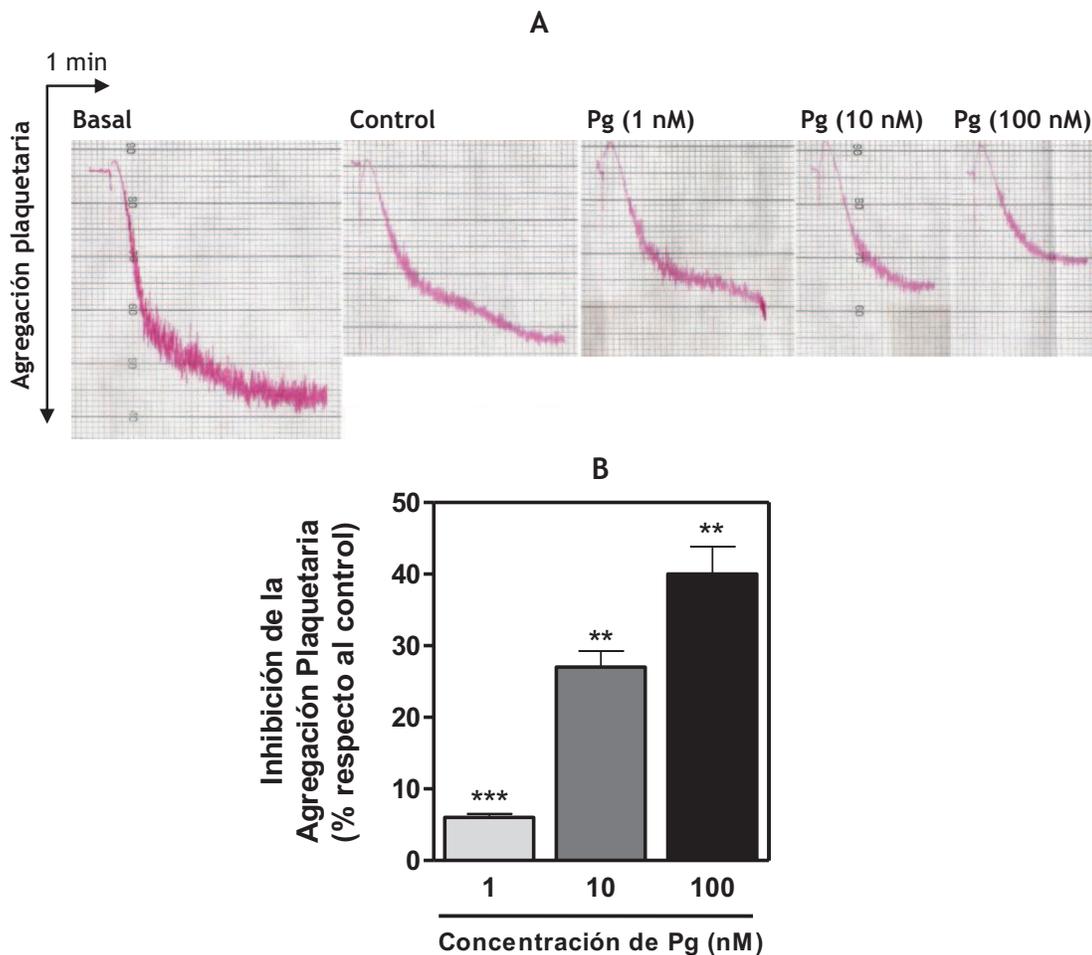


Figura 27. Estudio del efecto de Pg sobre la agregación plaquetaria.

(A) Registros representativos de la inhibición de la agregación plaquetaria inducida por tratamiento de las CE con Pg. Las CE con una confluencia del 90% se trataron con diferentes concentraciones de Pg (1, 10 y 100 nM) en 400 μ l de PRP durante 5 minutos. Se midió la agregación plaquetaria inducida con ADP (2×10^{-5} M) de una alícuota del PRP de cada una de las condiciones, de acuerdo a como se describe en la Sección de Metodología.

(B) Los resultados se expresan en porcentaje de inhibición de la agregación de las plaquetas con respecto a la condición control (vehículo) y representan el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. ** $p < 0.02$, *** $p < 0.001$ respecto al valor del control.

Resultados similares se obtuvieron cuando las CE se expusieron a un plasma rico en plaquetas y se trataron con las mismas concentraciones hormonales (1 - 100 nM) durante 2 minutos (Figura 28A y 28B).

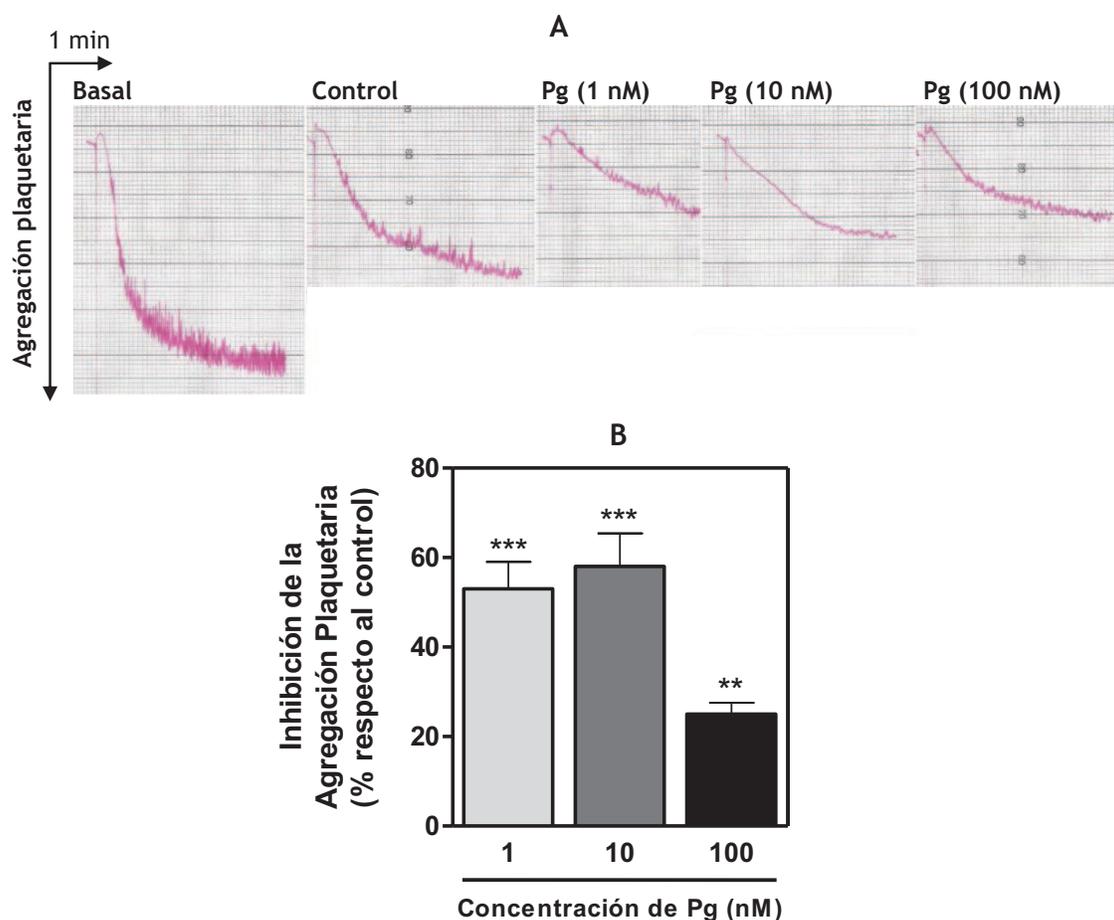


Figura 28. Estudio del efecto de Pg sobre la agregación plaquetaria.

(A) Registros representativos de la inhibición de la agregación plaquetaria inducida por tratamiento de las CE con Pg. Las CE con una confluencia del 90% se trataron con diferentes concentraciones de Pg (1, 10 y 100 nM) en 400 μ l de PRP durante 2 minutos. Se midió la agregación plaquetaria inducida con ADP (2×10^{-5} M) de acuerdo a como se describe en la Sección de Metodología.

(B) Los resultados se expresan en porcentaje de inhibición de la agregación de las plaquetas con respecto a la condición control (vehículo) y representan el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. ** $p < 0.02$, *** $p < 0.001$ respecto al valor del control.

Para determinar si la inhibición de la agregación plaquetaria inducida por Pg se debiera a una acción de la hormona sobre la síntesis de NO en CE, se repitieron los ensayos de agregación plaquetaria empleando CE pretratadas con el compuesto L-NAME. Como se observa en la Figura 29, en ausencia del inhibidor, cinco minutos de tratamiento con Pg (10 nM) inhibieron significativamente la agregación plaquetaria respecto a la condición control (33% de inhibición de la agregación

plaquetaria respecto al control, $p < 0.02$). Cuando las CE fueron incubadas con L-NAME, el efecto antiagregante de la hormona se reduce aproximadamente en un 50% (33 vs 17% de inhibición de la agregación plaquetaria en ausencia de L-NAME vs en presencia de L-NAME, $p < 0.05$) (Figura 29).

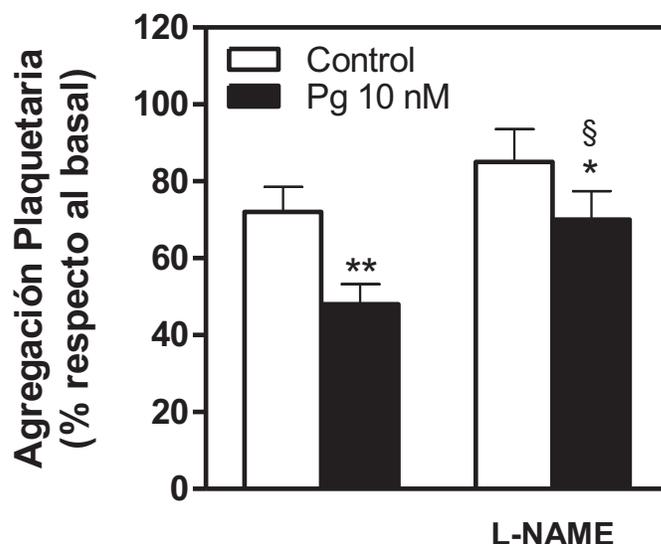


Figura 29. Participación de NO sobre la inhibición de la agregación plaquetaria inducida por Pg utilizando CE como sistema experimental.

Las CE (90% de confluencia) se preincubaron en ausencia o presencia de L-NAME (10 μ M) durante 10 minutos. Posteriormente, las CE se incubaron en PRP y se trataron con Pg (10 nM) o su vehículo (isopropanol) durante 5 minutos. Se midió la agregación plaquetaria inducida con ADP (2×10^{-5} M) de acuerdo a como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados se expresan en porcentaje de agregación plaquetaria con respecto a la condición basal) y representan el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. * $p < 0.05$, ** $p < 0.02$ vs sus respectivos controles. § $p < 0.05$ Pg con L-NAME vs Pg sin L-NAME.

Para descartar que el efecto antiagregante observado pudiera deberse a una acción directa de la hormona sobre las plaquetas, se midió la AP de un plasma rico en plaquetas en ausencia de CE, al cual se le agregó la hormona (todas las concentraciones empleadas en los tratamientos), isopropanol (vehículo de la hormona) y el inhibidor de la NOS, el compuesto L-NAME. Como puede observarse en la Tabla 7, ninguno de los compuestos empleados en los ensayos anteriores afectaron la agregación plaquetaria, descartándose un posible efecto directo sobre

las plaquetas. Se empleó también el compuesto nitroprusiato de sodio, un dador de NO ampliamente utilizado para estudiar procesos bioquímicos dependientes de NO (Inoue y col., 2003; Kawasaki y col., 2007). El nitroprusiato de sodio indujo una significativa inhibición de la agregación plaquetaria, lo que pone en evidencia la capacidad de las plaquetas de responder al NO (Tabla 7).

<i>Compuesto</i>	<i>Agregación plaquetaria (%)</i>
Basal	100
Isopropanol	98
Progesterona 1 nM	97
Progesterona 10 nM	96
Progesterona 100 nM	98
L-NAME 10 μ M	99
Nitroprusiato de sodio 1 μ M	45

Tabla 7. Efecto de Pg, isopropanol (vehículo), L-NAME y nitroprusiato de sodio sobre la agregación plaquetaria.

Los compuestos se adicionaron al PRP en las concentraciones indicadas por un periodo de tiempo de 5 minutos. Se midió la agregación plaquetaria inducida con ADP (2×10^{-5} M) de acuerdo a como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados se expresan en porcentaje de agregación plaquetaria con respecto a la condición basal y representan el promedio \pm D.E. de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado.

2.3. Estudio del efecto de progesterona sobre la migración celular

Para estudiar el efecto de Pg sobre la migración de CE y CMLV, se empleó un ensayo que permita determinar si las células se movilizan o no en respuesta a un estímulo dado. Las células en cultivo se sincronizaron por privación de suero durante 24 horas y luego se procedió a remover la mitad de la monocapa celular. La hemicapa restante se trató con la hormona en presencia de 1% de SFB y luego se

cuantificaron las células presentes en el área de la placa donde se realizó la remoción celular.

Inicialmente se evaluó el efecto de Pg sobre la migración de CE. En la Figura 30A se observan fotografías con distinto grado de magnificación correspondientes a campos representativos de las diferentes condiciones experimentales.

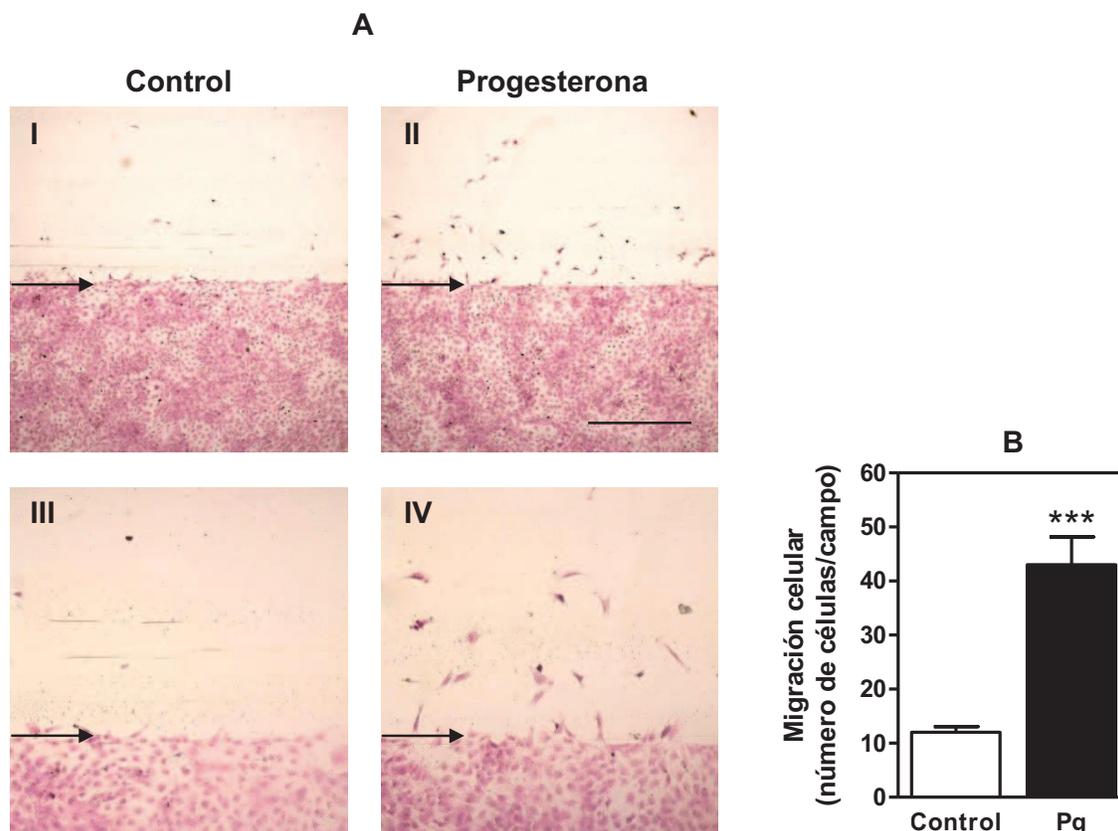


Figura 30. Rol de Pg sobre la migración de CE.

Las CE fueron incubadas en medio libre de suero durante 24 horas. Se realizó un corte transversal en la monocapa celular para delimitar el área denudada de células. La monocapa celular remanente se trató con Pg (10 nM) o su vehículo (isopropanol <0.1%) durante 48 horas y se procesó como se describe en la Sección de Metodología.

(A I, II, III y IV) Se muestran imágenes de campos representativos luego de la tinción con hematoxilina-eosina. Las flechas indican el sitio donde se realizó el corte. Magnificación: 40X (I y II) y 100X (III y IV) correspondientes al mismo campo. Escala: 340 μ m.

(B) Cuantificación de los resultados en número de células por campo. Los resultados representan el promedio (\pm D.E.) de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. *** p <0.001 respecto al valor del control.

Como se observa en la Figura 30, el tratamiento durante 48 horas con Pg (10 nM) indujo una mayor movilización de células hacia el área denudada respecto a la

condición control. En las fotografías 30A-III y IV se puede observar con más detalle las células migrantes en la región denudada de células.

Se estudió también el efecto de otras concentraciones de Pg (1 y 100 nM) sobre la migración de CE. Los resultados se presentan en la Tabla 8. El tratamiento con Pg 1 nM produjo un estímulo de la migración de 77% con respecto al control ($p < 0.05$), en tanto que, cuando las CE se trataron con Pg 100 nM el estímulo fue de 192% sobre el control ($p < 0.02$).

<i>Tratamiento</i>	<i>Migración de CE (número de células/campo)</i>
Control	12.0 ± 1.1
Progesterona 1 nM	21.3 ± 3.1*
Progesterona 10 nM	43.2 ± 5.2***
Progesterona 100 nM	35.0 ± 4.6**

Tabla 8. Efecto de Pg sobre la migración de CE.

Las CE fueron incubadas en un medio libre de suero durante 24 horas. Se realizó un corte transversal en la monocapa celular. La monocapa celular remanente se trató con Pg a las concentraciones indicadas (1 - 100 nM) o su vehículo (isopropanol <0.1%) durante 48 horas y se procesó como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados representan el promedio (\pm D.E.) del número de células migrantes/campo representativo de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. * $p < 0.05$; ** $p < 0.02$; *** $p < 0.001$ respecto al valor del control.

Se analizó el efecto de Pg sobre la migración de CMLV. En la Figura 31 se observan las fotografías correspondientes a campos representativos de la condiciones control (CMLV tratadas solo con vehículo) y tratamiento de 48 horas con Pg (10 nM). Como puede observarse en la Figura 31 (I y II), cuando las CMLV se trataron con la hormona, un mayor número de CMLV migraron hacia la zona denudada en relación a la condición control ($p < 0.001$).

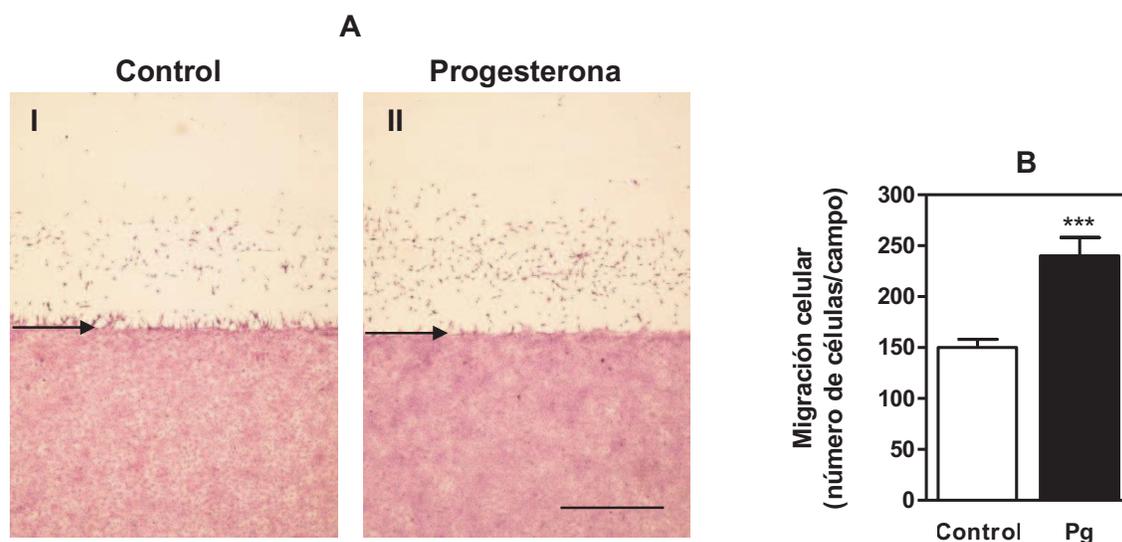


Figura 31. Efecto de Pg sobre la migración de CMLV.

Las CMLV fueron incubadas en medio DMEM libre de suero durante 24 horas. Se realizó un corte transversal en la monocapa celular. La monocapa celular remanente se trató con Pg (10 nM) o su vehículo (isopropanol <0.1%) durante 48 horas y se procesó como se describe en la Sección de Metodología.

(A I y II) Imágenes de campos representativos de cada condición experimental luego de la tinción con hematoxilina-eosina. Las flechas indican la zona del corte realizado. Magnificación: 40X. Escala: 340 μ m.

(B) Cuantificación de los resultados en número de células por campo. Los resultados representan el promedio (\pm D.E.) de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. *** p <0.001 respecto al valor del control.

Se ampliaron los estudios de migración de CMLV empleando una concentración menor de Pg. Semejante al resultado observado para Pg 10 nM, cuando las células se trataron durante 48 horas con Pg 1 nM, también se incrementó de manera significativa la migración celular (46% con respecto al control; p <0.02), (Tabla 9).

<i>Tratamiento</i>	<i>Migración de CMLV (número de células/campo)</i>
Control	150.5 ± 8.1
Progesterona 1 nM	220.3 ± 19.6**
Progesterona 10 nM	240 ± 18.2***

Tabla 9. Efecto de Pg sobre la migración de CMLV.

Las CMLV fueron incubadas en un medio libre de suero durante 24 horas. Se realizó un corte transversal en la monocapa celular para delimitar el área denudada de células. La monocapa celular remanente se trató con Pg a las concentraciones indicadas (1 y 10 nM) o su vehículo (isopropanol <0.1%) durante 48 horas y se procesó como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados representan el promedio (\pm D.E.) del número de células migrantes/campo representativo de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. ** $p < 0.02$; *** $p < 0.001$ respecto al valor del control.

Considerando los resultados presentados en la Figura 26 donde se observa que el efecto mitogénico de Pg en CMLV es condicionado por la presencia de medio de cultivo proveniente de CE, se analizó si esta regulación también afecta a la acción de la hormona sobre la movilidad celular. Se empleó un diseño experimental semejante. Las CE fueron tratadas con Pg (10 nM) o su vehículo (isopropanol, <0.1%) durante 24 horas. El medio de cultivo proveniente de estos tratamientos fue posteriormente usado para realizar los ensayos de migración en CMLV. Todos los tratamientos con la hormona fueron realizados en presencia de 1% de SFB.

Como puede observarse en la Tabla 10, en ausencia de medio condicionado, 48 horas de tratamiento con Pg (10 nM) estimula la migración de CMLV. Cuando las CMLV se incuban con medio de cultivo proveniente de CE controles (tratadas solo con vehículo) o de CE tratadas con Pg, la inducción de la migración se mantiene con magnitudes de estímulo semejantes.

Tratamiento	Migración de CMLV (número de células/campo)	
	Control	Pg 10 nM
	150.5 ± 8.1	240 ± 18.2***
Medio de CE (control)	161.4 ± 10.8	252.7 ± 28.5***
Medio de CE (Pg 10 nM)	143.7 ± 8.2	237.5 ± 24.4***

Tabla 10. Efecto de Pg sobre la migración de CMLV en presencia de medio DMEM condicionado proveniente de un cultivo de CE.

Las CMLV fueron incubadas en medio DMEM libre de suero durante 24 horas. Se realizó un corte transversal en la monocapa celular para delimitar el área denudada de células. La monocapa celular remanente se trató con Pg (10 nM) o su vehículo (isopropanol <0.1%) durante 48 horas en presencia o ausencia de medio DMEM proveniente de un cultivo de CE las cuales fueron expuestas por 24 horas a un tratamiento con Pg 10 nM o su vehículo (isopropanol <0.1%) y se procesó como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados representan el promedio (\pm D.E.) del número de células migrantes/campo representativo de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. *** $p < 0.001$ respecto al valor de sus correspondientes controles.

2.4. Estudio del efecto de progesterona sobre la apoptosis de células endoteliales

Para estudiar el efecto de Pg sobre la muerte celular programada se seleccionó la fragmentación de ADN como parámetro a medir, ya que representa uno de los eventos bioquímicos finales del proceso apoptótico. Se escogió H₂O₂ como inductor de apoptosis (control positivo) según lo descrito en la literatura (Cao y col., 2008).

Se empleó la técnica de “DNA laddering” la cual permite visualizar la degradación del ADN en fragmentos de bajo peso molecular. Primeramente se caracterizó el efecto del H₂O₂ sobre CE en cultivo ensayando distintas concentraciones (100 μ M, 200 μ M y 1 mM) y tiempos de tratamiento (una y dos horas) con H₂O₂ (Figura 32). Finalizado el tratamiento, se realizó una extracción de ADN y se resolvió por electroforesis en gel de agarosa al 1%, visualizando con bromuro de etidio.

La Figura 32 muestra una fotografía de un experimento representativo. Dos horas de tratamiento con 1 mM de H₂O₂ indujeron la mayor fragmentación del ADN de CE respecto al control. Por consiguiente, se seleccionó esta concentración y tiempo de exposición al H₂O₂ como las condiciones a emplear en los ensayos siguientes.

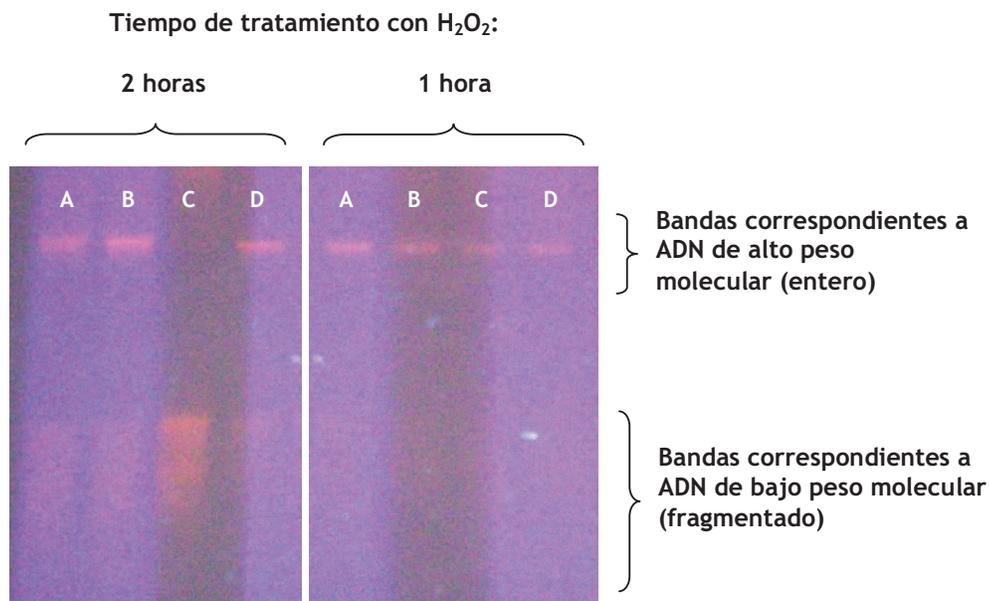


Figura 32. Caracterización del efecto de H₂O₂ sobre la apoptosis de CE.

Las CE (90% de confluencia) se trataron durante una ó dos horas con diferentes concentraciones de H₂O₂ (100 μ M, 200 μ M y 1 mM). Inmediatamente después se lisan las células y se extrae el ADN, el cual se separa por electroforesis en geles de agarosa y se visualiza por tinción con bromuro de etidio. Se muestran fotografías de los geles de un experimento representativo. A: 100 μ M H₂O₂; B: 200 μ M H₂O₂; C: 1 mM H₂O₂; D: Control.

A continuación seleccionamos una técnica que permite cuantificar el grado de fragmentación de ADN. La misma emplea marcación con [³H]-timidina y separación mediante centrifugación del ADN entero y fragmentado (Hurst-Kennedy y col., 2009). Según lo descrito el pellet obtenido luego de la centrifugación contiene ADN entero mientras que el sobrenadante el ADN fragmentado. Ambas fracciones están radiomarcadas. Para corroborar esta técnica, las CE se expusieron al H₂O₂ (1 mM) durante dos horas, se centrifugó, se extrajo el ADN de cada una de las fracciones (pellet y sobrenadante) y se las sembró en geles de agarosa. En la

calle 1 del gel se sembró el material obtenido del pellet, mientras que en la calle 2 se sembró el material obtenido del sobrenadante.

En la Figura 33 se muestra una foto del gel luego de la electroforesis. En la calle 1 se observa una banda única de gran intensidad en la región correspondiente a ADN de alto peso molecular, mientras que en la calle 2 se detecta un patrón de bandas dispuestas en “escalera” en la región correspondiente a ADN de bajo peso molecular. Esto confirma que la técnica de centrifugación permite separar ADN entero (pellet) del ADN fragmentado (sobrenadante), ya que ambas fracciones se localizaron en el gel en las zonas esperadas. Habiendo comprobado esto, se utilizó la técnica de centrifugación para investigar el efecto de Pg sobre apoptosis en CE.

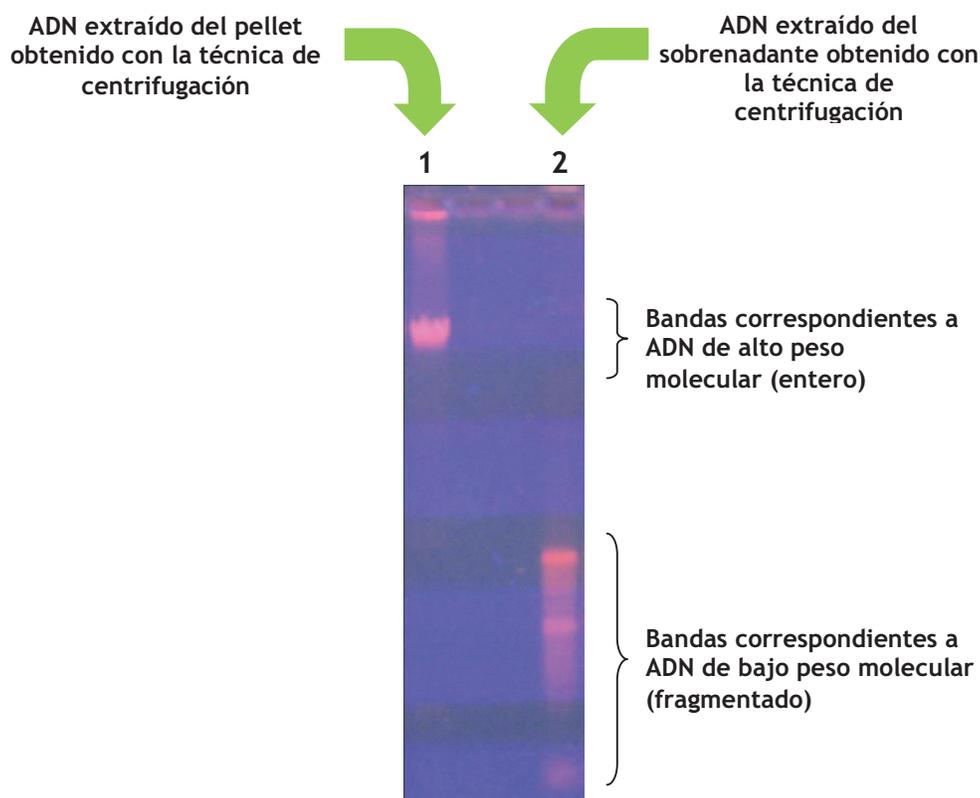


Figura 33. Validación de la Técnica de centrifugación para estudiar apoptosis.

Las CE (confluencia del 90%) se trataron durante dos horas con el inductor de apoptosis (H_2O_2 1 mM). Inmediatamente después, las CE se levantaron y se realizó una centrifugación a $13,000 \times g$ durante 15 minutos. Se extrajo el ADN en cada una de las fracciones empleando solventes y luego se realizó una electroforesis en gel de agarosa al 1% visualizando con bromuro de etidio de acuerdo a como se describe en la Sección de Metodología.

Para estudiar el efecto de Pg sobre la apoptosis de CE, las células se marcaron con [³H]-timidina (1μci/ml) durante dos horas. Se lavaron para eliminar la marca no incorporada y se trataron con la Pg 10 nM durante cuatro horas. Dos horas antes de finalizar el tratamiento hormonal, se adicionó el inductor de apoptosis (H₂O₂ 1mM). Como se observa en la Figura 34, en condiciones basales, el porcentaje de fragmentación de ADN es muy bajo (7%). Cuando las CE se trataron con la hormona se produjo un incremento significativo en la apoptosis de CE (42% de fragmentación respecto al ADN total, p<0.001). El tratamiento de las CE con H₂O₂ indujo una casi total fragmentación del ADN (aproximadamente un 90%), efecto significativamente mayor que aquel ejercido por la hormona (Figura 34). Cuando las CE fueron pretratadas con la hormona previo al agregado del agente oxidante, el tratamiento con Pg reduce marcadamente el estímulo apoptótico inducido por el H₂O₂ (p<0.02) (Figura 34).

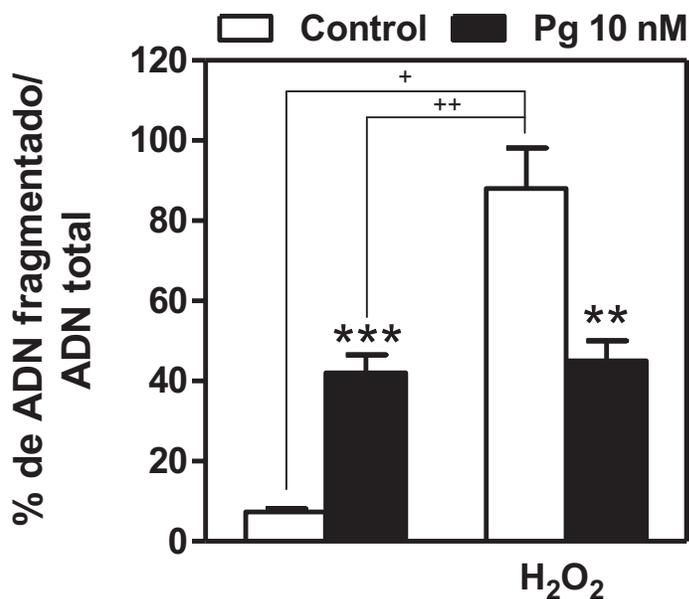


Figura 34. Efecto de Pg sobre muerte celular programada CE.

Las CE en cultivo (90% de confluencia) se marcaron con [³H]-timidina (1 μCi/ml) durante dos horas. Inmediatamente después, las células se lavaron para eliminar la [³H]-timidina no incorporada. Se realizó el tratamiento con Pg (10 nM) durante cuatro horas adicionales. El inductor de apoptosis (H₂O₂ 1 mM) se agregó dos horas antes de finalizar el tratamiento hormonal. Se realizó la separación de las fracciones correspondientes a ADN entero y fragmentado por centrifugación a 13,000 × g durante 15 minutos y se determinó la cantidad de [³H]-timidina incorporada en ambas fracciones de acuerdo a como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados representan el promedio ± D.E. de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. ***p<0.001, **p<0.02 vs sus respectivos controles sin y con H₂O₂; +p<0.001 control vs control con H₂O₂, ++p<0.001 Pg vs control con H₂O₂.

Se evaluaron otros tiempos de tratamiento con Pg. Como se observa en la Tabla 11, las CE incubadas durante 24 horas con Pg (10 nM) exhiben un perfil apoptótico mayor que las células controles. A las 48 horas de tratamiento no se detectaron cambios significativos en comparación con el control, aunque si se observaron valores basales de fragmentación ligeramente mayores que a 24 horas.

Tratamiento	% de ADN fragmentado/ADN total	
	24 horas	48 horas
Control	27.6 ± 3.2	38.6 ± 4.9
Progesterona 10 nM	41.6 ± 4.9**	42.3 ± 5.3

Tabla 11. Efecto de Pg sobre apoptosis de CE.

Las CE en cultivo se marcaron con [³H]-timidina (1 µCi/ml) durante dos horas. Inmediatamente después, las células se lavaron para eliminar la [³H]-timidina no incorporada. Se realizó el tratamiento con Pg (10 nM) durante 24 o 48 horas adicionales. Se realizó la separación de las fracciones correspondientes a ADN entero y fragmentado por centrifugación a 13,000 × g durante 15 minutos y se determinó la cantidad de [³H]-timidina incorporada en ambas fracciones de acuerdo a como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados representan el promedio ± D.E. de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. **p<0.02 respecto al valor del control correspondiente.

2.5. Estudio del efecto de progesterona sobre la adhesión de monocitos a células endoteliales

La adhesión de leucocitos al endotelio vascular constituye un evento clave que se desencadena en respuesta a una injuria vascular o un estímulo inflamatorio. Para estudiar el rol de Pg en este proceso celular se evaluó el efecto de la hormona sobre la adhesión de monocitos inducida por un agente inflamatorio. Se utilizó LPS como inductor de adhesión celular (Rummel y col., 2010; Holm y col., 2010; Reddy y col., 2009).

Primeramente, se estudió el efecto del tratamiento con LPS sobre la adhesión de monocitos a CE en cultivo. La concentración y los tiempos de tratamiento con LPS se seleccionaron a partir de lo descrito en la literatura (Jersmann y col., 2001). Las CE se trataron con LPS (1 µg/ml) durante 14 ó 21 horas. Al finalizar el tratamiento, una suspensión de 1×10⁶ monocitos/ml monocitos se agregó sobre la monocapa de CE durante dos horas. Finalizado este periodo, las células se fijaron y

se tiñeron con solución de Giemsa y se realizó el recuento de aquellos monocitos adheridos sobre las CE en siete campos representativos de cada una de las condiciones experimentales. El recuento de monocitos calculado por diferencia entre el total de monocitos sembrados y aquellos que no se adhirieron se realizó para corroborar el resultado obtenido mediante tinción y recuento de campos representativos. Para ello, finalizado el periodo de dos horas de adhesión de los monocitos a las CE, se colectó el sobrenadante y se contó el número de monocitos no adheridos en cámara de Neubauer.

Los resultados de la Tabla 12 muestran que el número de monocitos adheridos a las CE luego de 14 ó 21 horas de tratamiento con LPS (1 µg/ml) es significativamente mayor que en el grupo control. Dado que el efecto inductor de adhesión es mayor a 21 horas, se seleccionó este tiempo de tratamiento para los siguientes ensayos.

<i>Adhesión de monocitos a CE (número de células/campo)</i>		
Tratamiento	14 horas	21 horas
Control	7.2 ± 2.2	10.6 ± 2.5
LPS 1 µg/ml	15.6 ± 3.8*	44.3 ± 5.3***

Tabla 12. Efecto de LPS sobre la adhesión de monocitos a CE en cultivo. Las CE fueron tratadas con LPS (1 µg/ml) durante 14 ó 21 horas en presencia de 1% de SFB. Finalizado el tratamiento, se removió el medio y se agregó una suspensión de 1×10⁶ monocitos/ml (DMEM suplementado con 1% de SFB) durante dos horas adicionales. Las CE se fijaron y se tiñeron con solución de Giemsa de acuerdo a como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados representan el promedio ± D.E. del número de monocitos adheridos por campo representativo (200×) a partir de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. *p<0.05; ***p<0.001 respecto al valor del control correspondiente.

En la Figura 35 se presentan fotografías de campos representativos de la condiciones control y LPS (1 µg/ml, 21 horas de tratamiento). En la Figura 35b se

aprecia que un mayor número de monocitos (de color azul intenso) se adhirieron sobre las CE en comparación con las CE control (Figura 35a).

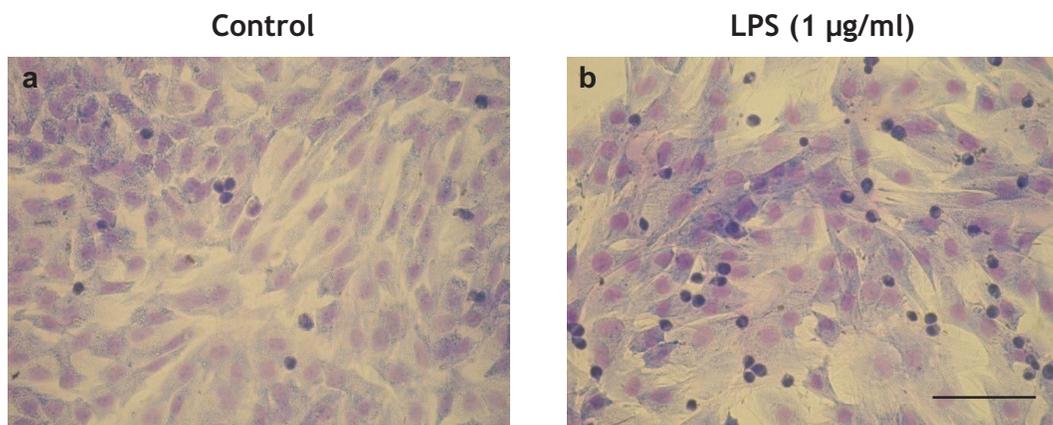


Figura 35. Efecto de LPS sobre la adhesión de monocitos a CE en cultivo.
 Las CE fueron tratadas con el agente proinflamatorio LPS (1 µg/ml) por 21 horas en presencia de 1% de SFB. Finalizado el tratamiento, se removió el medio y se agregó una suspensión de 1×10^6 monocitos/ml durante dos horas adicionales. Las CE se fijaron y se tiñeron con solución de Giemsa de acuerdo a como se describe en la Sección de Metodología. Se muestran las fotografías de campos representativos correspondientes a cada una de las condiciones experimentales. Magnificación: 200X. Escala: 70 µm.

Habiendo demostrado que en nuestro sistema experimental, el LPS induce adhesión de monocitos en CE, se procedió a investigar el rol de Pg sobre la adhesión de monocitos a CE en condiciones basales y/o estimuladas por LPS.

Las CE fueron tratadas durante 24 ó 48 horas con Pg (10 nM) y finalizado el tratamiento se adicionó una suspensión de monocitos. Los resultados presentados en la Tabla 13 muestran que el tratamiento con la hormona no modificó la adhesión basal (condición control) en ninguno de los tiempos ensayados.

Tratamiento	<i>Adhesión de monocitos (número de células/campo)</i>	
	24 horas	48 horas
Control	26.3 ± 2.9	29.9 ± 2.5
Pg 10 nM	28.2 ± 3.2	27.3 ± 2.6

Tabla 13. Efecto de Pg (10 nM) sobre la adhesión de monocitos a CE en cultivo. Las CE fueron tratadas con Pg (10 nM) durante 24 ó 48 horas en presencia de 1% de SFB. Finalizado el tratamiento, se removió el medio y se agregó una suspensión de 1×10^6 monocitos/ml (DMEM suplementado con 1% de SFB) durante dos horas adicionales. Las CE se fijaron y se tiñeron con solución de Giemsa de acuerdo a como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados representan el promedio \pm D.E. del número de monocitos adheridos por campo representativo (200 \times) a partir de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado.

Para evaluar si Pg afecta la adhesión de monocitos inducida por LPS, se realizaron ensayos de tratamientos conjuntos con Pg y LPS, en los cuales las CE fueron expuestas a la hormona de forma previa al agregado de LPS. Se ensayaron 24 y 48 horas de tratamiento con Pg (10 nM). El LPS (1 μ g/ml) se agregó durante las 21 horas finales de cada uno de los tratamientos. En la Figura 36 se puede observar que 21 horas de tratamiento con LPS (barra rayada) aumentó significativamente el número de monocitos adheridos a las CE. Cuando las células se expusieron 24 ó 48 horas a la hormona en ausencia de LPS (barras grises), no se detectaron diferencias significativas con respecto al control. Sin embargo, cuando la hormona fue agregada 3 ó 27 horas antes que el agente proinflamatorio (barras negras), el estímulo inducido por el LPS sobre la adhesión de monocitos en CE se suprimió totalmente.

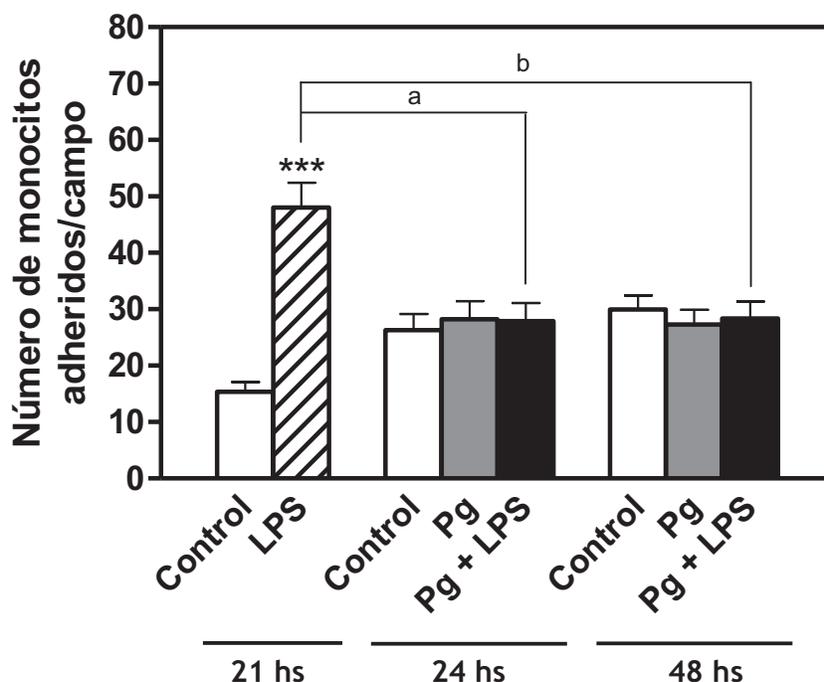


Figura 36. Efecto de Pg sobre la adhesión de monocitos a CE en cultivo. Las CE fueron tratadas con Pg (10 nM) durante 24 ó 48 horas en presencia de 1% de SFB. El LPS (1 µg/ml) se agrega durante las últimas por 21 horas de cada tratamiento hormonal. Finalizado el tratamiento, se removió el medio y se agregó una suspensión de 1×10^6 monocitos/ml (DMEM suplementado con 1% de SFB) durante dos horas adicionales. Las CE se fijaron y se tiñeron con solución de Giemsa de acuerdo a como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados representan el promedio \pm D.E. del número de monocitos adheridos por campo representativo (200 \times) a partir de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. *** $p < 0.001$ vs su respectivo control; ^a $p < 0.001$ LPS vs Pg con LPS 24 horas, ^b $p < 0.001$ LPS vs Pg con LPS 48 horas.

La adhesión de monocitos al endotelio vascular depende de la expresión de moléculas de adhesión celular (Butcher, 1991; Springer, 1994). Empleando la técnica de RT-PCR se estudió el efecto de Pg sobre la expresión de ARN mensajero (ARNm) de las moléculas de adhesión: P-selectina, E-selectina y VCAM-1. En primer lugar, se evaluaron los cambios en los niveles de ARNm de dichas moléculas en respuesta al tratamiento de las CE con el agente proinflamatorio LPS. En la Figura 37 se muestra una fotografía de los productos de amplificación correspondientes a cada una de las moléculas de adhesión estudiadas, luego de la separación por electroforesis en gel de agarosa. Los resultados obtenidos revelan que, en

condiciones basales (control), el nivel de expresión de ARNm de las tres moléculas de adhesión es bajo. Cuando las CE fueron expuestas a un tratamiento de 21 horas con LPS, el nivel de expresión de ARNm de las tres moléculas estudiadas se incrementó marcadamente. Como control de expresión se usó GAPDH.

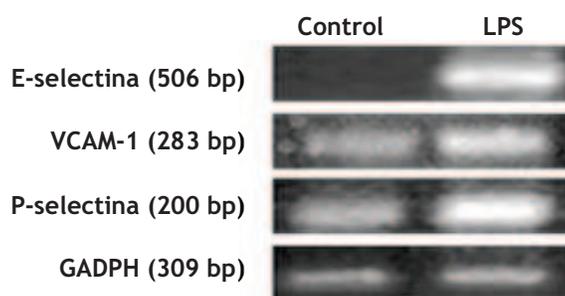


Figura 37. Efecto de LPS sobre la expresión de ARNm de las moléculas de adhesión P- y E-selectina y VCAM-1 en cultivos de CE.

Las CE (90% de confluencia) fueron tratadas con LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) durante 21 horas en presencia de 1% de SFB. Se aisló el ARNm, y los niveles de expresión de P-selectina, E-selectina y VCAM-1 se determinaron por RT-PCR como se describe en metodología. Las fotografías muestran los productos de amplificación obtenidos.

Teniendo en consideración los resultados anteriores, los cuales mostraron que Pg suprime la adhesión de monocitos inducida por LPS, se evaluó si la hormona regula la expresión del ARNm de las moléculas de adhesión seleccionadas. Las CE se trataron 24 horas con Pg (10 nM) en presencia o ausencia de LPS (1 $\mu\text{g/ml}$) agregado durante las últimas 21 horas de tratamiento. Se observó que el tratamiento con Pg no modificó los niveles de expresión de ARNm de las moléculas estudiadas respecto al control (Figura 38). El tratamiento con LPS aumentó notablemente dicha expresión. Cuando las CE son previamente tratadas con la hormona, previo al agregado del LPS, el estímulo inducido con LPS sobre el ARNm de las 3 moléculas se redujo marcadamente (Figura 38).

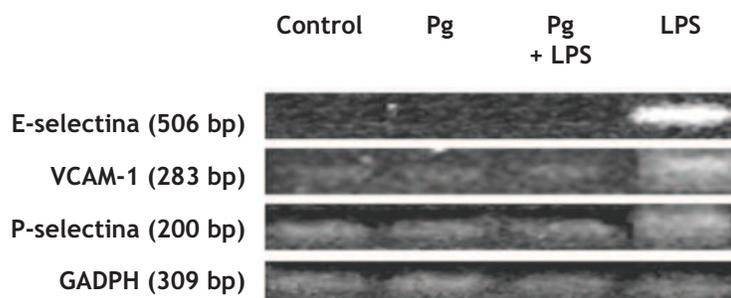


Figura 38. Efecto de Pg sobre la expresión de ARNm de las moléculas de adhesión P- y E-selectina y VCAM-1 en respuesta a un estímulo proinflamatorio en cultivos de CE. Las CE (90% de confluencia) fueron tratadas con Pg (10 nM) por 24 horas en DMEM con 1% de SFB, en ausencia o presencia de LPS (1 µg/ml). El LPS se agregó durante las últimas 21 horas de tratamiento hormonal. Se aisló el ARNm, y los niveles de expresión de P-selectina, E-selectina y VCAM-1 se determinaron por RT-PCR como se describe en metodología. Las fotografías muestran los productos de amplificación obtenidos.

3. INTERACCIONES HORMONALES

Teniendo en cuenta que 17-β-estradiol y Pg están presentes en la circulación en forma simultánea; que cuando declina la actividad ovárica se alteran los niveles circulantes de ambas hormonas o que cuando se utilizan terapéuticas de sustitución hormonal se usan combinaciones de 17-β-estradiol y Pg, se analizó el efecto de tratamientos conjuntos con ambas hormonas. Para ello se evaluó el efecto de la adición simultánea de 17-β-estradiol y Pg, sobre algunos de los efectos genómicos y no genómicos de Pg descritos en las secciones anteriores. Como parámetro genómico se seleccionó el efecto mitogénico sobre CMLV y como acción rápida la estimulación de la síntesis de NO en CE. Según lo descrito en la literatura, estos eventos también son regulados por 17-β-estradiol (Watanabe y col., 2003; Espinosa y col., 1996; Wang y col., 2000). Empleando cultivos sincronizados de CMLV se estudió el efecto de tratamientos conjuntos con ambas

hormonas sobre la proliferación celular utilizando la técnica de [³H]-timidina. Los resultados se presentan en la Figura 39. En forma semejante a lo reportado por otros autores (Yang y col., 2002), se comprobó que el 17-β-estradiol (10 nM) inhibe la proliferación de CMLV (57% de inhibición respecto al control, $p < 0.02$). El tratamiento con Pg (10 nM) incrementó significativamente la síntesis de ADN (53% sobre el valor del control, $p < 0.02$), sin embargo, dicha acción estimuladora se suprime en presencia de 17-β-estradiol (Figura 39). La adición conjunta de ambos esteroides no solo anula la acción mitogénica de Pg sino que también reduce marcadamente la proliferación respecto a los valores basales (45% de inhibición respecto al control, $p < 0.02$). No obstante, el efecto inhibitorio de la proliferación inducido por el tratamiento conjunto es ligeramente menor que la inhibición observada por tratamiento con 17-β-estradiol solamente (45% vs 57% de inhibición de síntesis de ADN respecto al control; E_2 (10 nM) + Pg (10 nM) vs E_2 (10 nM) respectivamente, $p < 0.02$) (Figura 39).

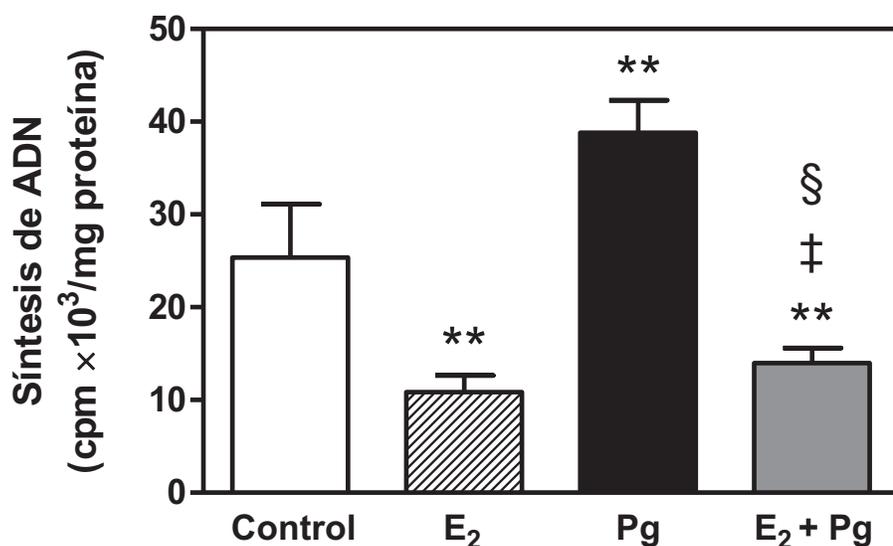


Figura 39. Efecto del tratamiento combinado de Pg con E₂ sobre la proliferación de CMLV.

Las CMLV en estado de semiconfluencia fueron incubadas en medio libre de suero durante 24 horas y posteriormente se trataron con Pg (10 nM), E₂ (10 nM) o el vehículo (isopropanol <0.1%) por 24 horas adicionales. Dos horas antes de finalizar el tratamiento hormonal, las CMLV recibieron un pulso de [³H]-timidina (1 µCi/ml). Los ensayos de incorporación de [³H]-timidina se realizaron como se describió en la sección de Metodología. Los resultados presentados representan el promedio ± D.E. de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado. **p<0.02 con respecto al valor del control; §p<0.001 E₂+Pg vs Pg; †p<0.02 E₂+Pg vs Pg.

Al evaluar el efecto del tratamiento combinado con Pg y 17-β-estradiol sobre la producción de NO por CE, se observó que ambos esteroides inducen un rápido y significativo incremento de la producción de NO en un amplio rango de concentraciones ensayadas (0.1 - 100 nM) (Tabla 14). Cuando se llevó a cabo el tratamiento combinado con ambas hormonas, el estímulo en la síntesis de NO se potenció significativamente respecto a la acción individual de cada hormona (Tabla 14). La combinación de E₂ (10 nM) con Pg (10 nM) indujo un estímulo de un 40% (p<0.001) superior al inducido por tratamiento con E₂ (10 nM) o bien de un 116% (p<0.001) superior al de Pg 10 nM (Tabla 14). El mismo efecto potenciador sobre la producción de NO se obtuvo cuando se realizó el tratamiento combinado con concentraciones mayores de E₂ (100 nM) y Pg (100 nM).

<i>Producción de NO</i>		
	nmoles NO/mg proteína	% de estímulo sobre el control
Control	140.2 ± 17	
10 ⁻¹⁰ M Pg	156.8 ± 15	12
10 ⁻⁹ M Pg	196.3 ± 15*	40
10 ⁻⁸ M Pg	256.6 ± 23**	83
10 ⁻⁷ M Pg	266.4 ± 45***	90
10 ⁻¹⁰ M E ₂	277.5 ± 27**	98
10 ⁻⁹ M E ₂	309.8 ± 33*	121
10 ⁻⁸ M E ₂	399.6 ± 12**	185
10 ⁻⁷ M E ₂	392.6 ± 13**	180
10 ⁻⁸ M Pg + 10 ⁻⁸ M E ₂	555.3 ± 48***, a, b	296
10 ⁻⁷ M Pg + 10 ⁻⁷ M E ₂	518.6 ± 93***, c, d	270

Tabla 14. Efecto del tratamiento combinado con Pg y E₂ sobre la producción de NO en CE.

Cultivos de CE (90% de confluencia) fueron tratadas con Pg, E₂ o ambas hormonas adicionadas simultáneamente a las concentraciones indicadas durante 5 minutos en medio DMEM fresco en presencia de 1% de SFB. La producción de NO liberado fue medida por la reacción de Griess de acuerdo a como se describe en la Sección de Metodología. Los resultados de tres experimentos independientes realizados por cuadruplicado, representan el promedio ± D.E. *p<0.05; **p<0.02; ***p<0.001 respecto al valor del control; ^ap<0.001 vs Pg (10⁻⁸ M); ^bp<0.001 vs E₂ (10⁻⁸ M); ^cp<0.001 vs Pg (10⁻⁷ M); ^dp<0.001 vs E₂ (10⁻⁷ M).

DISCUSIÓN

En este trabajo de Tesis nos propusimos investigar las acciones celulares y moleculares a través de las cuales Pg regula la función vascular con la finalidad de que el conocimiento aportado contribuya a elucidar el rol del esteroide en la homeostasis y en la disfunción vascular.

Trabajos previos de nuestro laboratorio habían reportado que en tejido aórtico de rata, Pg ejerce una acción rápida, no genómica, estimulando la síntesis de los vasoactivos NO y prostaciclina (Selles y col., 2002). Las concentraciones de Pg empleadas en este trabajo de Tesis se seleccionaron a partir de estos trabajos previos (Selles y col., 2001; Selles y col., 2002). Dichas concentraciones son equivalentes a los niveles séricos de Pg encontrados en mujeres de edad fértil (White y col., 1995) como así también a los niveles de Pg medidos en plasma de ratas durante su ciclo de ovulación de cuatro días (Scharfman y col., 2003). También se había demostrado que Pg estimula la síntesis de DAG y además se vinculó a proteínas tirosina quinasas en el mecanismo de acción a través del cual la hormona regula la actividad de la NOS. Continuando con esta línea de investigación, en este trabajo de Tesis se procedió a estudiar la participación de las vías de señalización intracelular de MAPK y PKC en el mecanismo de acción no genómico de Pg en nuestro sistema experimental.

Empleando ensayos de fosforilación de sustrato específico demostramos que Pg estimula en forma directa las vías de PKC y MAPK. La acción estimuladora se manifestó a concentraciones fisiológicas (1 - 100 nM) y a tiempos muy breves de tratamiento compatibles con acciones no genómicas. Uno y tres minutos de exposición a la hormona fueron suficientes para detectar aumentos significativos en las actividades de MAPK y PKC respectivamente. La acción estimuladora de la

hormona se evidenció tanto cuando el tratamiento hormonal se realiza sobre el tejido intacto (AAR) o en forma directa sobre el homogenado aórtico. Adoptamos el segundo sistema (HAR) ya que de esa forma se evitan congelaciones sucesivas del tejido. El perfil temporal de activación de PKC fue equivalente al reportado previamente para la estimulación de la síntesis de DAG (Mendiberri y col., 2006).

Se han reportado diversos efectos rápidos de Pg en numerosos tejidos y sistemas celulares. Los efectos rápidos de Pg han sido muy bien caracterizados en espermatozoides humanos, donde la hormona induce la reacción acrosómica mediante activación de las quinasas PKA y PKC y canales de calcio regulados por voltaje (Cordoba y Beconi, 2001; Harrison y col., 2000). La activación de la PKC por Pg también ha sido reportada en células de cuerpo lúteo bovinas (Liszewska y col., 2005). En *Xenopus laevis*, Pg induce la maduración oocítica a través de la activación de las vías mensajeras de MAPK (p42) y PI3K/AkT (Bagowski y col., 2001; Ferrell y col., 1999). También se sabe que Pg induce vasorelajación en arterias coronarias de conejo y en aorta de rata, efectos que se atribuyen a la inhibición de la entrada de calcio o bloqueo de canales de calcio operados por receptor o dependientes de voltaje (Jiang y col., 1992; Glusa y col., 1997).

El NO producido por el endotelio vascular representa un segundo mensajero intracelular de vital importancia para el mantenimiento de la homeostasis de los vasos sanguíneos. El NO ejerce acción vasodilatadora, antiinflamatoria, antiaterogénica, antitrombótica y antiapoptótica. La NOSe es la enzima encargada de generar NO en respuesta a una diversidad de estímulos fisiológicos. El mecanismo de activación de la NOSe por 17- β -estradiol ha sido exhaustivamente estudiado. El mecanismo propuesto incluye la unión del 17- β -estradiol a su receptor de membrana, activación de PLC, aumento del calcio intracelular y

activación de CaM. La CaM activada se une a la NOS, la cual se disocia de la proteína caveolina y se transloca al citoplasma donde se activa en forma completa por la unión de proteínas adaptadoras (Hsp 90) y por fosforilación dependiente de MAPK y PI3K/Akt (Serock y col., 2008; (Haynes y col., 2000).

Teniendo en cuenta lo descrito en la literatura se investigó si las vías MAPK y PKC contribuyen a la rápida estimulación de la NOS inducida por Pg en tejido vascular. Demostramos que la vía de señalización de MAPK contribuiría al estímulo sobre la producción de NO inducida por Pg (10 nM), ya que la preincubación de los AAR con el compuesto PD98059, inhibidor de la quinasa MEK, suprimió el efecto hormonal. La participación de la vía MAPK fue demostrada empleando diferentes concentraciones del inhibidor.

En forma análoga, evaluamos si la vía de PKC está involucrada en la rápida activación de la NOS por Pg. La preincubación de los AAR con un inhibidor de PKC, el compuesto chelerythrine, no alteró el rápido estímulo ejercido por la hormona sobre la producción de NO. Esto nos podría sugerir que el mecanismo de acción de Pg a través del cual regula la activación no genómica de la NOS sería independiente de la participación de la PKC. Este resultado lo comprobamos empleando dos concentraciones diferentes del inhibidor. Para asegurarnos de la efectividad del compuesto chelerythrine como inhibidor de la PKC, medimos la actividad de la quinasa con el éster de fórbol TPA (un activador directo de la PKC) en presencia del inhibidor. Los resultados obtenidos demostraron que el estímulo inducido por TPA sobre la actividad de la PKC se suprimió cuando el tejido se preincubó con el inhibidor, confirmando la acción antagonista de chelerythrine.

Sabiendo que la NOS es una enzima regulable por calcio estudiamos la participación de este catión en la regulación de la NOS por Pg. Al impedir el influjo

de calcio desde el medio extracelular incubando el tejido en un medio libre de calcio o provocando una depleción de los depósitos intracelulares de calcio con la adición simultánea de TG (libera calcio del retículo endoplásmico) y ACP (bloquea el rellenado de los depósitos) se demostró que ambos flujos de calcio contribuyen al mecanismo por el cual Pg estimula la producción de NO. No obstante, para determinar con mayor precisión el efecto de la hormona sobre los diferentes flujos de calcio se deberán emplear técnicas que permitan medir los cambios en la concentración de calcio citosólico.

Anter y col. demostraron que la vía de la p38 MAPK media la activación de la NOS en CE de aorta de cerdo expuestas a polifenoles presentes en el té negro. Dicho efecto también involucraba la participación del calcio extracelular y la fosforilación de la NOS en el residuo de serina 1177 y treonina 495 (Anter y col., 2004). Por otra parte, Kao y col. reportaron que el tratamiento de macrófagos (RAW 264.7) con ácido lipoteicoico indujo la expresión de la NOS inducible y aumentó la producción de NO en forma dependiente de la participación de la vía de p38 MAPK (Kao y col., 2005). También se ha demostrado que IL-17 regula la expresión del ARNm de la NOS inducible y constitutiva en células de médula ósea murina en forma dependiente de la vía p38 MAPK (Krstic y col., 2009).

En apoyo de los datos demostrados en este trabajo de Tesis, Simoncini y col. demostraron que la inhibición de las quinasas MEK1/2, suprime el estímulo inducido sobre la síntesis de NO en células endoteliales de vena umbilical humana (HUVECs) luego de 30 minutos de tratamiento con Pg (Simoncini y col., 2004).

Los resultados hasta aquí presentados se llevaron a cabo utilizando AAR. Como dicho sistema experimental representa un sistema celular mixto, se implementaron cultivos primarios para aislar CE y CMLV a partir de explantes de AAR. De esta

manera pudimos estudiar las acciones directas de Pg a nivel de cada tipo celular. Obtuvimos evidencia de que Pg estimula rápidamente la producción de NO en CE en forma concordante con los datos obtenidos previamente en nuestro laboratorio utilizando AAR como sistema experimental (Selles y col., 2001; Selles y col., 2002). Esto confirma que Pg actúa en forma directa sobre el endotelio vascular estimulando la síntesis de NO.

En resumen los resultados discutidos hasta aquí aportan evidencia de que el mecanismo de acción no genómico de Pg en tejido vascular comprende la activación de las vías mensajeras de MAPK y PKC, y la estimulación de la síntesis de NO en forma dependiente de calcio y MAPK.

Para estudiar las acciones genómicas de Pg a nivel vascular seleccionamos como parámetro la proliferación celular. Se demostró que Pg (10 - 100nM) estimuló la proliferación de CMLV. La acción mitogénica de Pg sobre estas células se observó luego de 24 y 36 horas de tratamiento. Periodos más largos de tratamiento hormonal (48 - 96 horas) no resultaron en cambios significativos sobre la proliferación basal de CMLV. Morey y col. demostraron que Pg inhibe la proliferación de CMLV humanas inducida por endotelina-1 (ET-1) o por la presencia de 3% de SFB, aunque por sí sola, la hormona induce un estímulo significativo del crecimiento celular. El efecto mitogénico de ET-1 y suero fue dependiente de la participación de MAPK (Morey y col., 1997). Por otro lado Karas y col. demostraron que Pg también ejerce un efecto inhibitorio sobre la síntesis de ADN en CMLV aisladas de arteria carótida de ratón (Karas y col., 2001). En cambio, la progestina sintética MPA no altera la expresión de genes involucrados en la regulación el

crecimiento celular (IL-1, IL-6 y PDGF) en CMLV (Okubo y col., 2000). Comparando con nuestros resultados, esto evidencia que la regulación del crecimiento de CMLV es diferente según sea Pg natural o progestinas sintéticas.

Existe evidencia de que Pg y MPA no son equivalentes en términos de señalización molecular en CE humanas y en tejido vascular de ratas ovariectomizadas. Se ha reportado que Pg y MPA activan diferentes eventos de señalización en sistemas *in vitro*. A nivel endotelial, MPA y otras progestinas sintéticas, ejercen *per se* diferentes efectos inflamatorios y antiinflamatorios *in vitro* en comparación con Pg (Simoncini y col., 2004). Aunque se ha asumido que algunas progestinas sintéticas utilizadas en protocolos de sustitución hormonal ejercen efectos clínicos análogos a la Pg natural, cada ligando del PgR podría tener efectos celulares/moleculares específicos. La diferente farmacocinética de las progestinas naturales o sintéticas y sus distintas afinidades por el PgR puede conducir al reclutamiento de vías de señalización intracelular parcialmente divergentes en células vasculares humanas debido a una modulación diferencial del receptor. A nivel vascular y en términos moleculares de señalización intracelular, la Pg natural y las sintéticas no se comportan de la misma manera. Esto debería ser tenido en cuenta en los protocolos de sustitución hormonal que emplean Pg sintéticas. Si la finalidad de la terapia es recuperar los efectos deseables de las hormonas nativas, los cuales declinaron por la inactividad ovárica propia del periodo postmenopáusico, el uso de los derivados sintéticos podría generar efectos diferentes a los de la Pg endógena.

En CE demostramos que Pg inhibió la proliferación luego de 24 horas de tratamiento, mientras que dicho efecto no fue observado cuando se realizaron tratamientos más prolongados (hasta 72 horas). La naturaleza genómica de este

evento fue demostrada al suprimir el efecto de la hormona en presencia de inhibidores de la transcripción y de la síntesis de proteínas. En apoyo de estos resultados, Vazquez y col. demostraron que Pg inhibe la proliferación de CE humanas estimuladas por el factor de crecimiento el endotelio vascular (VEGF) por reducción de la actividad quinasa dependiente de ciclinas, alteración de la expresión de las ciclinas A y E, y arresto del ciclo celular en la fase G1 (Vazquez y col., 1999). Hsu y col. demostraron que niveles fisiológicos de Pg (5 - 500 nM) inhiben la proliferación de HUVECs de manera dosis y tiempo dependiente y a través de un mecanismo que involucra la participación del gen supresor de tumores p53 (Hsu y col., 2008).

Para evaluar la posible participación del PgR en la regulación de la proliferación celular seleccionamos al compuesto RU486 como antagonista del PgR. Empleando diferentes concentraciones del inhibidor demostramos que la acción antiproliferativa de Pg en CE y la acción mitogénica en CMLV se suprime en presencia del RU486. La participación de PgR en la regulación del crecimiento de células vasculares, empleando al RU486 como antagonista fue reportada por otros autores (Lee y col., 1997; Vazquez y col., 1999). Se sabe que el compuesto RU486 es un fuerte antagonista del PgR. Sin embargo una de sus limitaciones es su inespecificidad ya que también se une al receptor de glucocorticoides. El RU486 actúa como antagonista del receptor en la mayoría de las circunstancias, sin embargo, en presencia de AMPc puede comportarse como agonista. La potencia antagonista del PgR se mide en función de su capacidad abortiva. Según datos reportados en la literatura, si bien el RU486 presenta afinidades similares con el receptor de glucocorticoides posee un efecto abortivo significativo, es decir que su capacidad de antagonizar los efectos de Pg es potente (Elger y col., 2000). La

eventual participación del PgR que sugerimos en función de los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis deberá ser complementado con otros abordajes experimentales (por ejemplo realizar silenciamiento del PgR) o incluir otros antagonistas del PgR más selectivos como el compuesto ZK 135 695 el cual previene la unión del PgR al ADN (Chwalisz y col., 2000; Elger y col., 2000).

Los resultados hasta aquí presentados describen las acciones rápidas y las acciones genómicas de Pg en tejido vascular. Las acciones rápidas o no genómicas comprenden la participación de la NOS y los sistemas de señalización celular de PLC/PKC y MAPK. Las acciones genómicas de Pg involucran la regulación de la proliferación celular. Para evaluar si existen interacciones entre los efectos de Pg sobre sistemas de señalización intracelular y las acciones genómicas, estudiamos la participación de estas vías mensajeras (PKC y MAPK) en los efectos mitogénicos y antimitogénicos de Pg en CMLV y CE respectivamente.

La cascada de señalización intracelular de las MAPK es de gran importancia para la biología de la célula. Estas proteínas quinasas participan activamente en procesos celulares relacionados con mitogénesis. En CMLV, la cascada de señales de MAPK controla diversas funciones celulares, entre ellas, la proliferación y la migración celular. En este trabajo, demostramos que el efecto mitogénico de Pg en CMLV es dependiente de la activación de MAPK, ya que en presencia del inhibidor de MEK, el compuesto PD98059, el efecto hormonal se anuló totalmente. Se demostró también que en esta acción proliferativa de Pg participa la vía de PKC. La preincubación de las células con el compuesto chelerythrine suprimió el estímulo sobre la proliferación de CMLV inducido luego de 24 horas de tratamiento con la Pg. En la cascada de las MAPKs, MEK (MAPKK) es activada por la proteína Raf, la cual es susceptible de activación por fosforilación dependiente de PKC. Si bien no

hemos establecido una secuencia temporal de los eventos activados por Pg se podría plantear la hipótesis de que el efecto mitogénico de la hormona sobre CMLV requeriría de la activación secuencial de las enzimas PKC y MAPK. Se ha descrito en la literatura que angiotensina II estimula la proliferación de CMLV a través de un mecanismo de acción que comprende la activación de la proteína Raf por PKC y subsecuente estimulación de ERK 1 y 2 (Turner y col., 2001).

Dado que previamente en nuestro laboratorio se había reportado que Pg (20 nM) induce rápidamente (1 - 10 minutos) la síntesis de prostaciclina por estimulación de la COX (Mendiberri y col., 2006) y considerando lo descrito por Pomerantz y Hajjar que los eicosanoides están implicados en la regulación de la proliferación y del fenotipo de las CMLV arteriales (Pomerantz y Hajjar, 1989), o lo propuesto por Tzeng y col. de que la COX-2 y la quinasa ERK (MAPK) participan en la estimulación del crecimiento de CMLV de aorta de rata (Tzeng y col., 2007), evaluamos si la COX contribuye a la regulación de la proliferación de CMLV por Pg. Empleando indometacina como inhibidor de la COX obtuvimos evidencia de que la vía de los eicosanoides estaría involucrada en el efecto proliferativo de Pg sobre CMLV.

En CE demostramos que la acción de la hormona es antimitogénica. Cuando las células se preincubaron con el inhibidor de la NOS, el compuesto L-NAME, el efecto fue suprimido. Datos reportados en la literatura muestran que a nivel vascular, el NO inhibe el crecimiento celular a través del arresto del ciclo celular en la fase G1 (Sarkar y col., 1997). Se han propuesto diferentes mecanismos a través de los cuales, el NO regularía la proliferación celular: (a) activación del sistema de GMPc/PKG y activación subsecuente de la vía MAPK, (b) estimulación de la COX-2 a través de la vía de señalización de PI3K/Akt, y (c) estimulación de la expresión de las ciclinas que controlan el ciclo celular (Villalobo, 2007). La acción

antimitogénica de Pg en CE también sería mediada por la quinasa PKC, debido que el pretratamiento de las CE con cherythrine, anuló la acción hormonal. Una relación entre la activación de la PKC y la inhibición del crecimiento de CE también fue reportada en la literatura. Cui y col. demostraron que las vías mensajeras de PKC y ERK (MAPK) participan en la inhibición de la proliferación de HUVECs inducida por altas concentraciones de melatonina (Cui y col., 2008). Por otra parte, Rojas y col. reportaron una inhibición de la proliferación de HUVECs mediado por PKC, MAPK y NO en respuesta a elevadas concentraciones de glucosa (Rojas y col., 2003). En vista de los resultados presentados, se podría sugerir que la acción de Pg sobre el crecimiento celular es selectiva y diferencial sobre cada tipo celular.

En resumen en lo relativo a los aspectos moleculares del mecanismo de acción de Pg los resultados presentados en esta Tesis aportan evidencia de que las acciones vasculares de Pg responden a un mecanismo acción de 2 pasos que integraría la activación de sistemas de señalización intracelular (PKC, MAPK y NOS) los cuales mediarían los efectos genómicos del esteroide sobre el control del crecimiento celular.

Una importante relación funcional coexiste entre CE y CMLV como consecuencia del intercambio de una gran diversidad de metabolitos y mediadores vasoactivos tales como NO, PG, endotelinas y angiotensina. Las CMLV son fuertemente influenciadas por el endotelio vascular (Cucina y col., 2003). Factores de crecimiento liberados por las CE regularían la migración y la proliferación de las CMLV (Ferrara y Davis-Smyth, 1997). La injuria endotelial altera la producción de

factores solubles lo que perjudicaría la interacción entre CE y CMLV, favoreciendo de esta manera la progresión de una lesión vascular.

Wang y col. observaron que utilizando un sistema de cocultivo las CE promueven un incremento significativo en la propagación y adhesión de CMLV a través de un mecanismo que involucra la participación de integrina- $\beta 1$ (Wang y col., 2007). Por otro lado cuando CMLV se cocultivan con CE, la migración de las musculares es regulada por las CE dependiendo de las condiciones de cultivo de las CE (basal o expuestas patrones de flujo determinados) (Wang y col., 2006).

Demostramos que el efecto regulador de Pg sobre proliferación de CMLV estaría modulado por las CE. El incremento significativo de la proliferación de CMLV inducido por tratamiento de 24 horas con Pg fue suprimido completamente cuando las CMLV se incubaron con medio de cultivo proveniente de CE las cuales habían recibido tratamiento hormonal (24 horas con Pg 10 nM). Sin embargo, si el medio condicionado proviene de aquellas CE que no habían recibido tratamiento con Pg el efecto mitogénico del esteroide sobre las CMLV se mantiene. Es importante destacar que la proliferación basal de las CMLV no se vio afectada por el agregado de medio condicionado de CE controles o tratadas con Pg. El análisis de estos resultados nos sugiere que el tratamiento de las CE con Pg estimularía la liberación al medio de incubación de factores que condicionarían (inhibiendo) la acción proliferativa de la hormona sobre las CMLV. Si bien esto evidenciaría una interrelación entre ambos sistemas celulares en presencia de la Pg, experimentación adicional se requiere para establecer la identidad de dichos factores y el punto de regulación.

Sin embargo, esta influencia de CE sobre las CMLV no se detectó cuando estudiamos migración celular. Empleando la misma estrategia experimental, y bajo

las condiciones ensayadas, la presencia de medio proveniente de CE tratadas durante 24 horas con Pg o con vehículo no afectó la acción estimuladora de Pg sobre la migración de las CMLV.

La migración celular *in vivo* representa un complejo mecanismo celular que desempeña un rol crucial tanto para la homeostasis vascular como así también en condiciones de enfermedad. Al examinar la acción de Pg sobre la migración de CE hallamos que la hormona estimula la motilidad celular. Teniendo en cuenta que la migración de CE está implicada en la reparación vascular, reendoteización y en el proceso de neovascularización para la formación de nuevos vasos sanguíneos a partir de CE preexistentes (angiogénesis) (Simons, 2005; Rosenzweig, 2003), esto podría representar una acción beneficiosa de la hormona. Sin embargo, también demostramos un efecto antiproliferativo de Pg en CE, lo cual se podría considerar como un efecto negativo para la integridad del endotelio y su capacidad de regeneración.

Pg puede estimular la proliferación celular o bien inhibir el crecimiento y promover la diferenciación celular en función del tipo celular involucrado, del ambiente hormonal y de las condiciones de crecimiento (Mangelsdorf y col., 1995). Es interesante destacar que en este trabajo de Tesis, los ensayos de migración celular se realizaron en condiciones estáticas, sin la influencia del medio ambiente circundante.

Por otro lado, mostramos que Pg estimuló significativamente la migración de CMLV en cultivo. Analizando el efecto individual de Pg sobre la CMLV, los resultados presentados muestran que el esteroide no solo ejerce una acción proliferativa sino que además, promueve la migración celular. La proliferación y la migración celular *in vivo* son mecanismos complejos que dependen del balance entre la acción local

de factores y las interacciones celulares. Teniendo en cuenta esto y los resultados obtenidos nos preguntamos: la acción mitogénica de Pg en CMLV, ¿representa un potencial efecto no deseado? Si bien los ensayos presentados se realizan en condiciones definidas y en ausencia de la influencia de su entorno, la presencia de CE o el tratamiento en combinación con 17- β -estradiol contrarresta la acción proliferativa de Pg: ¿representa esto un efecto positivo para la salud vascular? Para responder a estos interrogantes se deberán diseñar estrategias experimentales que permitan evaluar en forma simultánea la influencia de diversos factores.

En condiciones saludables, el endotelio está en estado no activado. Sus propiedades antitrombóticas previenen la adhesión de monocitos y plaquetas a través de la liberación de mediadores químicos como el NO y las prostaciclina. La respuesta inicial al daño vascular es la activación, la adhesión y la agregación de las plaquetas al endotelio activado por la injuria. A su vez, las plaquetas activadas liberan mediadores químicos (citoquinas) que promueven el reclutamiento de monocitos y su activación a macrófagos (Steinhuyl y Moliterno, 2005). Por lo tanto, la función plaquetaria debe estar rigurosamente controlada para mantener la homeostasis vascular.

Antecedentes previos reportados por nuestro laboratorio habían descrito una regulación hormonal (17- β -estradiol y Pg) de la agregación plaquetaria dependiente de endotelio (Selles y col., 2001; Massheimer y col., 2002; Selles y col., 2002). Nos referimos a agregación plaquetaria dependiente de endotelio porque lo que medimos es la agregación de las plaquetas cuando estas eran coincubadas con el tejido aórtico tratado con los esteroides ováricos. En particular, con respecto a Pg se había demostrado una potente acción antiagregante plaquetaria cuando el plasma rico en plaquetas se incubaba con AAR

tratados por breves intervalos de tiempo (1 - 10 min) de tratamiento con concentraciones fisiológicas de Pg (Selles y col., 2001; Selles y col., 2002). Habiendo implementado y desarrollado cultivos de CE, nos propusimos evaluar si dicha acción antiagregante plaquetaria se debía a una acción directa de la hormona sobre las CE. Empleando CE en cultivo incubadas con un PRP y tratadas durante breves periodos de tiempo con Pg, confirmamos esta hipótesis y que la acción antiagregante de la hormona depende en parte de la estimulación de la síntesis de NO, ya que la presencia de un inhibidor de la NOS, el compuesto L-NAME, suprimió parcialmente la acción de Pg. Teniendo en cuenta nuestros antecedentes previos (Selles y col., 2002) en los cuales se demostró que Pg estimula la síntesis de prostaciclina, esta reducción parcial podría deberse a que la regulación hormonal de la agregación plaquetaria dependiente de endotelio fuese mediada también por la participación de los eicosanoides. Está reportado que el NO liberado del endotelio actúa como un potente inhibidor de la AP a través de la activación del sistema GC y liberación de GMPc (Mellion y col., 1981; Radomski y col., 1987). Por su parte, la prostaciclina actúa sobre las plaquetas inhibiendo la agregación de las mismas a través de la vía del AMPc (Murata y col., 1997).

La apoptosis representa un proceso fisiológico de fundamental importancia para la biología de la célula. Uno de los eventos finales en este programa de suicidio celular es la degradación del ADN en pequeños fragmentos de muy bajo peso molecular. La determinación de estos fragmentos mediante técnicas adecuadas nos permite evaluar el estado apoptótico general de las células estudiadas.

El recambio del tejido endotelial es acelerado por numerosos factores. Las CE se adaptan continuamente para responder a los cambios que ocurren en el plasma

sanguíneo, en el fluido intersticial, y en las células adyacentes. La respuesta de las CE frente al microambiente modificado es gradual y dependiente de la intensidad de los factores agresivos. Factores de riesgo tales como estrés oxidativo, LDL oxidadas y angiotensina II estimulan la apoptosis de CE (Kockx y Herman, 2000; Dimmeler y col., 1997). Las CE son removidas y reemplazadas por endotelio regenerado a partir de CE adyacentes o bien a partir de CE progenitoras circulantes (Vanhoutte y col., 2009).

En este trabajo de Tesis demostramos que Pg promueve la apoptosis de las CE, y que cuando las CE son expuestas a un agente oxidante (H_2O_2), el tratamiento con Pg revierte el efecto apoptótico inducido por el H_2O_2 . El efecto proapoptótico de Pg depende del tiempo de tratamiento hormonal. Observamos que a 24 horas, Pg estimuló la fragmentación de ADN. Si esto se analiza en conjunto con los resultados de proliferación, a 24 horas demostramos que Pg inhibe el crecimiento de las CE. Quizá estos dos eventos estén relacionados. Aunque la cinética de incorporación de [3H]-timidina mostraba que las CE se encuentran en una fase proliferativa a las 24 horas, el efecto antimitogénico de la hormona podría deberse a una estimulación hormonal de la apoptosis.

Choksuchat y col. demostraron que 24 horas de tratamiento con Pg (500 ng/ml) y MPA (5 - 500 ng/ml) promovieron la apoptosis de células endoteliales de endometrio humano utilizando la técnica de TUNEL. Sin embargo, no encontraron el mismo estímulo apoptótico cuando las células eran tratadas durante 12 horas (Choksuchat y col., 2009).

La extensión de los experimentos de fragmentación de ADN a tiempos más prolongados resultaba en una apoptosis espontánea de las células. Esto representó una limitación al momento de querer ampliar las condiciones y tiempos de

tratamiento a estudiar. Qiao y Farrell reportaron que la densidad celular y el tipo de sustrato adherente utilizado influyen sobre la apoptosis espontánea de las células obtenidas por cultivo primario (Qiao y Farrell, 1999). En vista de lo explicado, experimentos adicionales empleando otras estrategias se requieren para una correcta interpretación de los resultados obtenidos.

Habiendo observado que la Pg regula la apoptosis de CE inducida por un estímulo oxidante y considerando que la adhesión de monocitos al endotelio vascular constituye uno de los eventos que pueden contribuir a alterar el balance supervivencia/muerte de CE, consideramos de interés estudiar si Pg modula la adhesión leucocitaria inducida por un estímulo inflamatorio. Para ello se empleó el agente proinflamatorio LPS. Comprobamos que en nuestro sistema experimental el LPS estimuló la adhesión de monocitos a CE en cultivo. Cuando las CE fueron tratadas durante 24 o 48 horas con Pg (10 nM) no se detectaron diferencias significativas en el número de monocitos adheridos respecto a la condición control. Sin embargo, cuando las CE son previamente tratadas con la hormona, la acción del LPS se suprimió completamente. La activación de las CE por citoquinas proinflamatorias o endotoxinas bacterianas (LPS) promueve el reclutamiento de leucocitos sobre la superficie de las mismas a través de la expresión de CAMs en su membrana plasmática. El LPS y las citoquinas inflamatorias inducen un incremento en la producción de especies reactivas del oxígeno, generando estrés oxidativo y promoviendo la transcripción de genes que codifican para CAMs a través de la vía de señalización intracelular que involucra la participación del factor de transcripción NF- κ B (Collins y col., 1995). P- y E- selectina participan en la adhesión y rodamiento inicial de los monocitos sobre el endotelio estimulado,

mientras que VCAM-1 está involucrada en la adhesión firme y migración de los monocitos hacia la íntima arterial (Rao y col., 2007).

Teniendo en cuenta esto decidimos estudiar la regulación por Pg de la expresión de las CAMs: VCAM-1, P-selectina y E-selectina. Demostramos que el tratamiento con Pg no modificó los niveles de expresión del ARNm de las CAMs estudiadas. El LPS estimuló marcadamente su expresión, pero cuando las CE fueron tratadas con Pg previo al agregado del proinflamatorio, el efecto inductor del LPS se reduce. En concordancia con estas observaciones, Otsuki y col. demostraron que en HUVECs, Pg previene la expresión de la proteína y del ARNm de VCAM-1 inducida por TNF α . Por el contrario, el progestágeno sintético MPA no revirtió la acción de la citoquina (Otsuki y col., 2001). Por otra parte, Simoncini y col. reportaron que Pg y la progestina sintética MPA inhiben la expresión de la molécula de VCAM-1 e ICAM-1 inducida por LPS en HUVECs (Simoncini y col., 2004).

En función de los resultados obtenidos, interpretamos que Pg inhibiría la adhesión de monocitos al endotelio vascular inducida por LPS a través de la regulación de la expresión de determinadas proteínas de adhesión celular. Como solo se estudió la expresión del ARNm esto deberá confirmarse evaluando la acción de la hormona sobre los niveles proteicos de las CAMs.

El efecto observado de Pg, se podría interpretar como un potencial efecto beneficioso o protector de la hormona que contribuiría a prevenir la adhesión de leucocitos frente a una injuria endotelial. Es interesante destacar que el NO también puede regular la expresión de CAMs. Armstead y col. demostraron que el NO inhibe la expresión en superficie de P-selectina almacenada en las CE como así también la síntesis *de novo* de P-selectina (Armstead y col., 1997).

Teniendo presente que 17- β -estradiol es un importante modulador de la función vascular, se estudió la acción conjunta de 17- β -estradiol y Pg.

Previamente, en nuestro laboratorio, empleando modelos animales de sustitución hormonal *in vivo* con estrógenos y Pg, se demostró la existencia de interacciones entre los mecanismos rápidos de acción de 17- β -estradiol, estrona y Pg a nivel vascular (Polini y col., 2009; Rauschemberger y col., 2007). Los resultados obtenidos en este trabajo de Tesis, revelaron que si bien la acción mitogénica de la Pg en CMLV se redujo en presencia de 17- β -estradiol, si este resultado se analiza en función del efecto inducido por 17- β -estradiol, la acción antimitogénica del estrógeno es ligeramente menor en presencia de Pg. También demostramos que el tratamiento conjunto con E₂ y Pg potenció el estímulo sobre la producción de NO inducido por cada una de las hormonas por separado. Aunque estos resultados en su conjunto evidencian una interacción entre las acciones bioquímico/ celulares de 17- β -estradiol y Pg, al presente desconocemos la relevancia fisiológica de los mismos. Aguirre y Baudry demostraron que la Pg (10 nM) revierte los efectos neuroprotectores del 17- β -estradiol (10 nM) reduciendo los niveles del factor neurotrófico derivado de cerebro en cortes de hipocampo de rata en cultivo (Aguirre y Baudry, 2009). En un trabajo publicado por Suzuki y col. se demostró que si bien el tratamiento de células de músculo liso de aorta humana con concentraciones fisiológicas de 17- β -estradiol inhibe la proliferación y la migración celular inducida por factores de crecimiento (VEGF, FGF, PDGF), el tratamiento con concentraciones similares de Pg no ejerce ningún efecto sobre estos eventos celulares. Cuando realizan el tratamiento combinado de Pg más 17- β -estradiol, los autores hallaron que la acción ejercida por 17- β -estradiol no se modifica (Suzuki y col., 1996). Por otro lado, Trotter y col. reportaron que solo el tratamiento

combinado de 17- β -estradiol más Pg indujo un estímulo significativo en los niveles de ARNm y la proteína del factor de crecimiento de endotelio vascular (VEGF) en células alveolares tipo II y fibroblastos pulmonares de embrión de ratón (Trotter y col., 2009). Adams y col. examinaron los efectos cardioprotectores de CEE/Pg vs CEE/MPA en primates alimentados con dietas aterogénicas: la combinación de CEE con Pg redujo en un 50% el tamaño de las lesiones ateroscleróticas en arterias coronarias, lo cual no se observó cuando se administraba MPA (Adams y col., 1990).

En resumen, el estudio de los efectos celulares de Pg a nivel vascular demostró que la hormona regula la proliferación, la migración y la apoptosis de las células vasculares, con una acción selectiva y diferencial según el tipo celular. La hormona previene la adhesión de monocitos inducida por un agente injurante e inhibe la agregación plaquetaria a través de la estimulación de la síntesis de NO. Los resultados reportados en este trabajo de Tesis fueron obtenidos en sistemas *in vitro* trabajando con células aisladas. Si bien en algunos ensayos se intentó simular una aproximación más cercana a lo que ocurre *in vivo* (adhesión leucocitaria, agregación plaquetaria en presencia de CE, cultivos celulares en medios condicionados, tratamientos hormonales conjuntos), al presente no estamos en condiciones de evaluar la contribución general de Pg a la homeostasis vascular y la relevancia fisiológica de los resultados obtenidos.

Un conocimiento completo de las acciones vasculares de Pg permitirá comprender mejor las alteraciones que se producen cuando los niveles circulantes del esteroide disminuyen. De esta manera comprenderemos en qué medida los cambios observados condicionan al organismo en general y a la homeostasis

vascular en particular, y además sabremos con mayor certeza que efectos se van a restituir cuando se administran terapias de reemplazo hormonal y su posible impacto sobre la salud cardiovascular.

CONCLUSIONES

En resumen, los aspectos más relevantes de la de este trabajo de Tesis, son que, desde un punto de vista mecanístico, Pg actuaría a través de un mecanismo de acción en dos pasos, que comprende la integración de las acciones rápidas, no genómicas, con los efectos genómicos o a largo plazo. En un contexto celular se demostró que, a través de su acción directa sobre CE y CMLV Pg modula los procesos celulares que participan activamente en el mantenimiento de la homeostasis vascular y que sufren alteraciones en la enfermedad.

Específicamente, los resultados obtenidos permiten concluir que:

- el mecanismo de acción rápido de Pg en tejido aórtico de rata involucra la activación de la NOS y las quinasa PKC y MAPK.
- en nuestro sistema experimental, Pg regularía la producción de NO en forma no genómica, a través de un mecanismo que involucra la participación de MAPK y del calcio extracelular e intracelular, aunque sería independiente de la activación de PKC.
- la hormona inhibe la proliferación de CE, efecto en el que participarían el PgR, la NOS y la quinasa PKC.
- Pg promueve la proliferación de CMLV, a través de un mecanismo de acción que involucraría la participación del PgR, la activación de la COX y las quinasas MAPK y PKC.

- el efecto mitogénico de la hormona sobre CMLV se suprime en presencia de medio de un cultivo proveniente de CE tratadas con la hormona.
- Pg inhibe rápidamente la agregación plaquetaria en forma dependiente del NO derivado del endotelio.
- la hormona estimula la migración de CE y CMLV.
- sin bien la hormona induce apoptosis de CE *per se*, suprime el efecto apoptótico del H₂O₂.
- la Pg no afecta la adhesión basal de monocitos a CE, pero previene la adhesión de monocitos inducida por LPS.
- la hormona suprime en forma parcial la expresión de VCAM-1, E-selectina y P-selectina promovida por LPS. *Per se*, Pg no afecta la expresión de las CAMs estudiadas.
- el tratamiento conjunto con 17-β-estradiol potencia la acción estimuladora de ambos esteroides sobre la síntesis de NO. En cambio, sobre CMLV, la adición simultánea de ambas hormonas reduce la acción individual de cada una de ellas.

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS INGLESAS UTILIZADAS EN ESTE TRABAJO DE TESIS

AC	Adenylate cyclase
AF	Activation function
AMPc	Cyclic 3', 5'-adenosine monophosphate
CaM	Calmodulin
CAMs	Cellular adhesion molecules
CBG	Corticosteroid binding globulin
COX	Cyclooxygenase
DAG	Diacylglycerol
DMEM	Dulbecco's modified Eagle's medium
ERK 1/2	Extracellular signal-regulated kinase 1/2
ERK 5	Extracellular signal-regulated kinase 5
FGF	Fibroblast growth factor
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GC	Guanylate ciclase
GDP	Guanosine-5'-diphosphate
GMPc	Cyclic 3', 5'-guanosine monophosphate
GPCRs	G protein-coupled receptors
GTP	Guanosine-5'-triphosphate
HUVECs	Human umbilical vein endothelial cells
ICAM-1	Intercellular adhesion molecule-1
IL	Interleukin
JNK	c-Jun NH ₂ -terminal protein
LDL	Low-density lipoprotein
LH	Luteinizing hormone
L-NAME	L-nitro-arginine methyl ester
MAPK	Mitogen activated protein kinase
MEK	Mitogen activated protein kinase kinase
MPA	Medroxyprogesterone acetate
NF-kB	Nuclear factor-kappa B
NO	Nitric oxide
NOS	Nitric oxide synthase
PDGF	Platelet-derived growth factor
PgR	Progesterone receptor
PI3K	Phosphatidylinositol-3-kinase
PKA	Protein kinase A
PKC	Protein kinase C
PKG	Protein kinase G
PLC	Phospholipase C
TNF α	Tumor necrosis factor α
TPA	12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate
VCAM-1	Vascular cell adhesion molecule-1
VEGF	Vascular endothelial growth factor
RT-PCR	Reverse Transcription - Polymerase Chain Reaction

REFERENCIAS

- Adams MR, Kaplan JR, Manuck SB, Koritnik DR, Parks JS, Wolfe MS, Clarkson TB. Inhibition of coronary artery atherosclerosis by 17-beta estradiol in ovariectomized monkeys. Lack of an effect of added progesterone. *Arteriosclerosis* (1990) 10: 1051-1057.
- Aguirre CC, Baudry M. Progesterone reverses 17beta-estradiol-mediated neuroprotection and BDNF induction in cultured hippocampal slices. *Eur J Neurosci* (2009) 29: 447-454.
- Alderton WK, Cooper CE, Knowles RG. Nitric oxide synthases: structure, function and inhibition. *Biochem J* (2001) 357: 593-615.
- Alessi DR, Cuenda A, Cohen P, Dudley DT, and Saltiel AR. PD 098059 is a specific inhibitor of the activation of mitogen-activated protein kinase kinase *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* (1995) 270: 27489-27494.
- Amezcuca JL, Dusting GJ, Palmer RM, Moncada S. Acetylcholine induces vasodilatation in the rabbit isolated heart through the release of nitric oxide, the endogenous nitrovasodilator. *Br J Pharmacol* (1988) 95: 830-834.
- Andersen HL, Weis JU, Fjalland B, Korsgaard N. Effect of acute and long-term treatment with 17-beta-estradiol on the vasomotor responses in the rat aorta. *Br J Pharmacol* (1999) 126: 159-168.
- Anter E, Thomas SR, Schulz E, Shapira OM, Vita JA, Keaney JF Jr. Activation of endothelial nitric-oxide synthase by the p38 MAPK in response to black tea polyphenols. *J Biol Chem* (2004) 279: 46637-46643.
- Armstead VE, Minchenko AG, Schuhl RA, Hayward R, Nossuli TO, Lefer AM. Regulation of P-selectin expression in human endothelial cells by nitric oxide. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* (1997) 273: H740-H746.
- Artwohl M, Lindenmair A, Roden M, Waldhäusl WK, Freudenthaler A, Klosner G, Ilhan A, Luger A, Baumgartner-Parzer SM. Fatty acids induce apoptosis in human smooth muscle cells depending on chain length, saturation, and duration of exposure. *Atherosclerosis* (2009) 202: 351-362.
- Ashkenazi A. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat Rev Cancer* (2002) 2: 420-430.
- Bachetti T, Morbidelli L. Endothelial cells in culture: a model for studying vascular functions. *Pharmacol Res* (2000) 42: 9-19.
- Bagowski CP, Myers JW, Ferrell JE Jr. The classical progesterone receptor associates with p42 MAPK and is involved in phosphatidylinositol 3-kinase signaling in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem* (2001) 276: 37708-37714.
- Bain DL, Heneghan AF, Connaghan-Jones KD, Miura MT. Nuclear receptor structure: implications for function. *Annu Rev Physiol* (2007) 69: 201-220.
- Barton M, Cremer J, Mügge A. 17-Beta-estradiol acutely improves endothelium dependent relaxation to bradikinin in isolated human coronary arteries. *Eur J Pharmacol* (1998) 362: 73-76.
- Baulieu EE. Contraception and other clinical applications of RU486, an antiprogestin at the receptor. *Science* (1989) 245: 1351-1357.

- Beato M, Chávez S, Truss M. Transcriptional regulation by steroid hormones. *Steroids* (1996) 61: 240-251.
- Beato M, Klug J. Steroid hormone receptors: An update. *Hum Reprod Update* (2000) 6: 225-236.
- Beato M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell* (1989) 56: 335-344.
- Berridge MJ, Bootman MD, Roderick HL. Calcium signalling: dynamics, homeostasis and remodelling. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2003) 4(7): 517-529.
- Bielefeldt K, Waite L, Abboud FM, Conklin JL. Nongenomic effects of progesterone on human intestinal smooth muscle cells. *Am J Physiol* (1996) 271: G370-G376.
- Blackmore PF, Neulen J, Lattanzio F, Beebe SJ. Cell surface-binding sites for progesterone mediate calcium uptake in human sperm. *J Biol Chem* (1991) 266: 18655-18659.
- Blackmore PF. Progesterone metabolites rapidly stimulate calcium influx in human platelets by a src-dependent pathway. *Steroids* (2008) 73: 738-750.
- Blackmore PF. Rapid non-genomic actions of progesterone stimulate Ca^{2+} influx and the acrosome reaction in human sperm. *Cell Signal* (1993) 5: 531-538.
- Blakeman PJ, Hilton P, Bulmer JN. Oestrogen and progesterone receptor expression in the female lower urinary tract, with reference to oestrogen status. *BJU International* (2000) 86: 32-38.
- Blankenberg S, Barbaux S, Tiret L. Adhesion molecules and atherosclerosis. *Atherosclerosis* (2003) 170: 191-203.
- Bloch K. The biological synthesis of cholesterol. *Science* (1965) 150: 19-28.
- Bochatan-Piallat ML, Gabbiani F, Redard M, Desmoulière A, Gabbiani G. Apoptosis participates in cellularity regulation during rat aortic intimal thickening. *Am J Pathol* (1995) 146: 1059-1064.
- Born GVR. Quantitative investigations into the aggregation of blood platelets. *J Physiol* (1962) 162: 67-68.
- Boyum A. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Clin Lab Invest Suppl* (1968) 97: 77-89.
- Brown MS, Goldstein JL. Biomedicine. Lowering LDL: not only how low, but how long? *Science* (2006) 311: 1721-1723.
- Buitrago CG, Pardo VG, de Boland AR, Boland R. Activation of RAF-1 through Ras and protein kinase Calpha mediates $1\alpha, 25(OH)_2$ -vitamin D3 regulation of the mitogen-activated protein kinase pathway in muscle cells. *J Biol Chem* (2003) 278: 2199-2205.
- Bürk RR. A factor from a transformed cell line that affects cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1973) 70: 369-372.
- Butcher EC. Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* (1991) 67: 1033-1036.

- Cahil MA. Progesterone receptor membrane component 1: an integrative review. *J Steroid Biochem Mol Biol* (2007) 150: 16-36.
- Caivano M. Role of MAP kinase cascades in inducing arginine transporters and nitric oxide synthetase in RAW264 macrophages. *FEBS Lett* (1998) 429(3): 249-53.
- Callera GE, Montezano AC, Touyz RM, Zorn TM, Carvalho MH, Fortes ZB, Nigro D, Schiffrin EL, Tostes RC. ETA receptor mediates altered leukocyte endothelial cell interaction and adhesion molecules expression in DOCA-salt rats. *Hypertension* (2004) 43: 872-879.
- Cao C, Lu S, Kivlin R, Wallin B, Card E, Bagdasarian A, Tamakloe T, Chu WM, Guan KL, Wan Y. AMP-activated protein kinase contributes to UV- and H₂O₂-induced apoptosis in human skin keratinocytes. *J Biol Chem* (2008) 283: 28897-28908.
- Carmina E, Lobo RA. Evaluation of hormonal status. In Strauss JF, Barbieri RL (Eds.), Yen and Jaffe's reproductive endocrinology: Physiology, pathophysiology, and clinical management (5th ed., pp. 939-964). Philadelphia: Elsevier, 2004.
- Castagna M, Takai Y, Kaibuchi K, Sano K, Kikkawa U, Nishizuka Y. Direct activation of calcium-activated, phospholipid-dependent protein kinase by tumor-promoting phorbol esters. *J Biol Chem* (1982) 257: 7847-7851.
- Celayir S, Ilce Z, Dervisoglu S. The sex hormone receptors in the bladder in childhood—I: Preliminary report in male subjects. *Eur J Pediatr Surg* (2002) 12: 312-317.
- Chang L, Karin M. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* (2001) 410: 37-40.
- Chen M, Geng J. P-selectin mediates adhesion of leukocytes, platelets, and cancer cells in inflammation, thrombosis, and cancer growth and metastasis. *Arch Immunol Ther Exp* (2006) 54: 75-84.
- Choksuchat C, Zhao S, Deutch TD, Kimble TD, Archer DF. Effects of progesterone, levonorgestrel and medroxyprogesterone acetate on apoptosis in human endometrial endothelial cells. *Contraception* (2009) 79: 139-145.
- Christ M, Wehling M. Cardiovascular steroid actions: Swift swallows or sluggish snails? *Cardiovasc Res* (1998) 40: 34-44.
- Christow A, Sun X, Gemzell-Danielsson K. Effect of mifepristone and levonorgestrel on expression of steroid receptors in the human fallopian tube. *Molecular Human Reproduction* (2002) 8: 333-340.
- Chuderland D, Seger R. Protein-protein interactions in the regulation of the extracellular signal-regulated kinase. *Mol Biotechnol* (2005) 29: 57-74.
- Chwalisz K, Brenner RM, Fuhrmann UU, Hess-Stumpp H, Elger W. Antiproliferative effects of progesterone antagonists and progesterone receptor modulators on the endometrium. *Steroids* (2000) 65: 741-751.
- Collins T, Read MA, Neish AS, Whitley MZ, Thanos D, Maniatis T. Transcriptional regulation of endothelial cell adhesion molecules: NF- κ B and cytokine-inducible enhancers. *FASEB J* (1995) 9: 899-909.
- Condon JC, Hardy DB, Kovaric K, Mendelson CR. Up-regulation of the progesterone receptor (PR)-C isoform in laboring myometrium by activation of nuclear factor- κ B may

contribute to the onset of labor through inhibition of PR function. *Mol Endocrinol* (2006) 20: 764-775.

Cordoba M, Beconi MT. Progesterone effect mediated by the voltage dependent calcium channel and protein kinase C on non-capacitated cryopreserved bovine spermatozoa. *Andrologia* (2001) 33: 105-112.

Cowan KJ, Storey KB. Mitogen-activated protein kinases: new signaling pathways functioning in cellular responses to environmental stress. *J Exp Biol* (2003) 206: 1107-1115.

Cucina A, Borelli V, Randone B, Coluccia P, Sapienza P, Cavallaro A. Vascular endothelial growth factor increases the migration and proliferation of smooth muscle cells through the mediation of growth factors released by endothelial cells. *J Surg Res* (2003) 109: 16-23.

Cui P, Yu M, Luo Z, Dai M, Han J, Xiu R, Yang Z. Intracellular signaling pathways involved in cell growth inhibition of human umbilical vein endothelial cells by melatonin. *J Pineal Res* (2008) 44: 107-114.

Davidge ST, Pitt BR, McLaughlin MK, Roberts JM, Johnson BA. Biphasic stimulation of prostacyclin by endogenous nitric oxide (NO) in endothelial cells transfected with inducible NO synthase. *Gen Pharmacol* (1999) 33: 383-387.

Davies MJ. Stability and instability: two faces of coronary atherosclerosis. The Paul Dudley White Lecture 1995. *Circulation* (1996) 94: 2013-2020.

De Leval X, Dogné JM, Neven P, Labasse A, Delarge J, Reginster JY, Henrotin Y. Effects of nimesulide and indometacin on COX-1 and COX-2: a comparative study. *J Pharm Belg* (1999) 54: 89-90.

De Vivo I, Huggins GS, Hankinson SE, Lescault PJ, Boezen M, Colditz GA, Hunter DJ. A functional polymorphism in the promoter of the progesterone receptor gene associated with endometrial cancer risk. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2002) 99: 12263-12268.

Dempsey EC, Newton AC, Mochly-Rosen D, Fields AP, Reyland ME, Insel PA, Messing RO. Protein kinase C isozymes and the regulation of diverse cell responses. *Am J Physiol* (2000) 279: L429-L438.

Dimmeler S, Haendeler J, Galle J, Zeiher AM. Oxidized low-density lipoprotein induces apoptosis of human endothelial cells by activation of CPP32-like proteases. A mechanistic clue to the 'response to injury' hypothesis. *Circulation* (1997) 95: 1760-1763.

Dubey RK, Imthurn B, Zacharia LC, Jackson EK. Hormone replacement therapy and cardiovascular disease: what went wrong and where do we go from here? *Hypertension* (2004) 44: 789-795.

Dudley DT, Pang L, Decker SJ, Bridges AJ, Saltiel AR. A synthetic inhibitor of the mitogen-activated protein kinase cascade. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1995) 92: 7686-7689.

Dudzinski DM, Michel T. Life history of eNOS: partners and pathways. *Cardiovasc Res* (2007) 75: 247-260.

Dutil EM, Toker A, Newton A. Regulation of conventional protein kinase C isozymes by phosphoinositide-dependent kinase 1 (PDK-1). *Curr Biol* (1998) 8: 1366-1375.

- Ehring GR, Kerschbaum HH, Eder C, Neben AL, Fanger CM, Khoury RM, Negulescu PA, Cahalan MD. A nongenomic mechanism for progesterone-mediated immunosuppression: inhibition of K_p channels, Ca²⁺ signaling, and gene expression in T lymphocytes. *J Exp Med* (1998) 188: 1593-1602.
- El-Ashry D, Oñate SA, Nordeen SK, Edwards DP. Human progesterone receptor complexed with the antagonist RU 486 binds to hormone response elements in a structurally altered form. *Mol Endocrinol* (1989) 3: 1545-1558.
- Elger W, Bartley J, Schneider B, Kaufmann G, Schubert G, Chwalisz K. Endocrine pharmacological characterization of progesterone antagonists and progesterone receptor modulators with respect to PR-agonistic and antagonistic activity. *Steroids* (2000)65: 713-723.
- Ellmann S, Sticht H, Thiel F, Beckmann MW, Strick R, Strissel PL. Estrogen and progesterone receptors: from molecular structures to clinical targets. *Cell Mol Life Sci* (2009) 66: 2405-2426.
- Ennis HL, Lubin M. Cycloheximide: aspects of inhibition of protein synthesis in mammalian cells. *Science* (1964) 146: 1474-1476.
- Espinosa E, Oemar BS, Lüscher TF. 17 beta-Estradiol and smooth muscle cell proliferation in aortic cells of male and female rats. *Biochem Biophys Res Commun* (1996) 221: 8-14.
- Falkenstein E, Meyer C, Eisen C, Sciba PC, Wehling M. Fulllength cDNA sequence of progesterone membrane-binding protein from porcine vascular smooth muscle cells. *Biochem Biophys Res Commun* (1996) 229: 86-89.
- Falkenstein E, Tillmann HC, Christ M, Feuring M, Wehling M. Multiple actions of steroid hormones - a focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev* (2000) 52: 513-556.
- Ferrara N, Davis-Smyth T. The biology of vascular endothelial growth factor. *Endocr Rev* (1997) 18: 4-25.
- Ferrell JE Jr. Xenopus oocyte maturation: new lessons from a good egg. *BioEssays* (1999) 21: 833-842.
- Filardo EJ, Quinn JA, Bland KI, Frackelton AR Jr. Estrogeninduced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via trans-activation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. *Mol Endocrinol* (2000) 14: 1649-1660.
- Fleming I, Busse R. Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol* (2003) 284: R1-R12.
- Fleming I, Fisslthaler B, Dimmeler S, Kemp BE, Busse R. Phosphorylation of Thr(495) regulates Ca²⁺/calmodulin-dependent endothelial nitric oxide synthase activity. *Circ Res* (2001) 88: E68-E75.
- Foreman KE, Tang J. Molecular mechanisms of replicative senescence in endothelial cells. *Exp Gerontol* (2003) 38: 1251-1257.
- Franz HB, Wendler D, Oettling G. Immunohistochemical assessment of steroid hormone receptors in tissues of the anal canal: Implications for anal incontinence? *Acta Obstet Gynecol Scand* (1996) 75: 892-895.

- Friess H, Buchler M, Kiesel L, Kruger M, Beger HG. LH-RH receptors in the human pancreas: Basis for antihormonal treatment in ductal carcinoma of the pancreas. *Int J Pancreatol* (1991) 10: 151-159.
- Fu XD, Flamini M, Sanchez AM, Goglia L, Giretti MS, Genazzani AR, Simoncini T. Progesterone regulates endothelial actin cytoskeleton and cell movement via the actin-binding protein moesin. *Mol Hum Reprod* (2008) 14: 225-234.
- Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* (1980) 288: 373-376.
- Furie B, Furie BC, Flaumenhaft R. A journey with platelet P-selectin: the molecular basis of granule secretion, signalling and cell adhesion. *Thromb Haemost* (2001) 86: 214-221.
- Galkina E, Ley K. Vascular Adhesion Molecules in Atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2007) 27: 2292-2301.
- Geng JG. Interaction of vascular endothelial cells with leukocytes, platelets and cancer cells in inflammation, thrombosis and cancer growth and metastasis. *Acta Pharmacol Sin* (2003) 24: 1297-1300.
- Gimbrone MA, Topper JN, Nagel T, Anderson KR, Garcia-Cardena G. Endothelial dysfunction, hemodynamic forces, and atherogenesis. *Ann N Y Acad Sci* (2000) 902: 230-239.
- Giovanni D, Patrono C. Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med* (2007) 357: 2482-2494.
- Glusa E, Graser T, Wagner S, Oettel M. Mechanisms of relaxation of rat aorta in response to progesterone and synthetic progestins. *Maturitas* (1997) 28: 181-191.
- Godowski PJ, Picard D. Steroid receptors. How to be both a receptor and a transcription factor. *Biochem Pharmacol* (1989) 38: 3135-3143.
- Golstein P, Kroemer G. Cell death by necrosis: towards a molecular definition. *Trends Biochem Sci* (2007) 32: 37-43.
- Grady D, Herrington D, Bittner V, Blumenthal R, Davidson M, Hlatky M, Hsia J, Hulley S, Herd A, Khan S, Newby LK, Waters D, Vittinghoff E, Wenger N; HERS Research Group. Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy. Heart and estrogen/progestin replacement study follow up (HERSII). *JAMA* (2002) 288: 49-57.
- Graham JD, Clarke CL. Physiological action of progesterone in target tissues. *Endocr Rev* (1997) 18: 502-519.
- Granville DJ, Carthy CM, Hunt DW, McManus BM. Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. *Lab Invest* (1998) 78: 893-913.
- Griess P. Bemerkungen zu der abhandlung der H.H. Weselsky und Benedikt "Ueber einige azoverbindungen". *Chem Ber* (1879) 12: 426-434.
- Gryglewski RJ, Botting RM, Vane JR. Mediators produced by the endothelial cell. *Hypertension* (1988) 12: 530-548.

- Gryglewski RJ, Palmer RM, Moncada S. Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium derived vascular relaxing factor. *Nature* (1986) 320: 454-456.
- Hall JM, McDonnell DP. The estrogen receptor betaisoform (ERbeta) of the human estrogen receptor modulates ERalpha transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology* (1999) 140: 5566-5578.
- Hammes SR. The further redefining of steroid-mediated signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) 100: 2168-2170.
- Hammoud L, Xiang F, Lu X, Brunner F, Leco K, Feng Q. Endothelial nitric oxide synthase promotes neonatal cardiomyocyte proliferation by inhibiting tissue inhibitor of metalloproteinase-3 expression. *Cardiovasc Res* (2007) 75: 359-368.
- Harrison DA, Carr DW, Meizel S. Involvement of protein kinase A and A kinase anchoring protein in the progesterone initiated human sperm acrosome reaction. *Biol Reprod* (2000) 62: 811-820.
- Hattori R, Hamilton KK, Fugate RD, McEver RP, Sims PJ. Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140. *J Biol Chem* (1989) 264: 7768-7771.
- Haynes MP, Sinha D, Russell KS, Collinge M, Fulton D, Morales-Ruiz M, Sessa WC, Bender JR. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Res* (2000) 87: 677-682.
- Hegy L, Skepper JN, Cary NR, Mitchinson MJ. Foam cell apoptosis and the development of the lipid core of human atherosclerosis. *J Pathol* (1996) 180: 423-442.
- Herbert JM, Augereau JM, Gleye J, Maffrand JP. Chelerythrine is a potent and specific inhibitor of protein kinase C. *Biochem Biophys Res Commun* (1990) 172: 993-999.
- Hidalgo A, Peired AJ, Wild MK, Vestweber D, Frenette PS. Complete identification of E-selectin ligands on neutrophils reveals distinct functions of PSGL-1, ESL-1, and CD44. *Immunity* (2007) 26: 477-489.
- Hirata S, Shoda T, Kato J, Hoshi K. Isoform/variant mRNAs for sex steroid hormone receptors in humans. *Trends Endocrinol Metab* (2003) 14: 124-129.
- Hisatsune C, Nakamura K, Kuroda Y, Nakamura T, Mikoshiba K. Amplification of Ca²⁺ signaling by diacylglycerol-mediated inositol 1,4,5-trisphosphate production. *J Biol Chem* (2005) 280: 11723-11730.
- Holm A, Andersson KE, Nordström I, Hellstrand P, Nilsson BO. Down-regulation of endothelial cell estrogen receptor expression by the inflammation promoter LPS. *Mol Cell Endocrinol* (2010) 319: 8-13.
- Horowitz LF, Hirdes W, Suh BC, Hilgemann DW, Mackie K, Hille B. Phospholipase C in living cells: activation, inhibition, Ca²⁺ requirement, and regulation of M current. *J Gen Physiol* (2005) 126: 243-262.
- Hsu SP, Ho PY, Juan SH, Liang YC, Lee WS. Progesterone inhibits human endothelial cell proliferation through a p53-dependent pathway. *Cell Mol Life Sci* (2008) 65: 3839-3850.

- Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *JAMA* (1998) 280: 605-613.
- Hurst-Kennedy J, Boyan BD, Schwartz Z. Lysophosphatidic acid signaling promotes proliferation, differentiation, and cell survival in rat growth plate chondrocytes. *Biochim Biophys Acta* (2009) 1793: 836-846.
- Inagami T, Naruse M, Hoover R. Endothelium as an endocrine organ. *Annu Rev Physiol* (1995) 57: 171-189
- Inoue M, Kishimoto A, Takai Y, Nishizuka Y. Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. II. Proenzyme and its activation by calcium-dependent protease from rat brain. *J Biol Chem* (1977) 252: 7610-7616.
- Inoue O, Yanamoto K, Fujiwara Y, Hosoi R, Kobayashi K, Tsukada H. Sensitivities of benzodiazepine receptor binding and muscarinic acetylcholine receptor binding for the detection of neural cell death caused by sodium nitroprusside microinjection in rat brain. *Synapse* (2003) 49: 134-141.
- Ishibashi H, Suzuki T, Suzuki S, Moriya T, Kaneko C, Takizawa T, Sunamori M, Handa M, Kondo T, Sasano H. Sex steroid hormone receptors in human thymoma. *J Clin Endocrinol Metab* (2003) 88: 2309-2317.
- Ismail PM, Amato P, Soyal SM, DeMayo FJ, Conneely OM, O'Malley BW, Lydon JP. Progesterone involvement in breast development and tumorigenesis - as revealed by progesterone receptor "knockout" and "knockin" mouse models. *Steroids* (2003) 68: 779-787.
- Isner JM, Kearney M, Bortman S, Passeri J. Apoptosis in human atherosclerosis and restenosis. *Circulation* (1995) 91: 2703-2711.
- Jamnongjit M, Hammes SR. Ovarian steroids: the good, the bad, and the signals that raise them. *Cell Cycle* (2006) 5: 1178-1183.
- Jersmann HP, Hii CS, Ferrante JV, Ferrante A. Bacterial lipopolysaccharide and tumor necrosis factor alpha synergistically increase expression of human endothelial adhesion molecules through activation of NF-kB and p38 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *Infect Immun* (2001) 69: 1273-1279.
- Jiang CW, Sarrel PM, Lindsay DC, Poole-Wilson PA, Collins P. Progesterone induces endothelium independent relaxation of rabbit coronary artery *in vitro*. *Eur J Pharmacol* (1992) 211: 163-167.
- Joffe H, Soares CN, Cohen LS. Assessment and treatment of hot flushes and menopausal mood disturbance. *Psychiatr Clin North Am* (2003) 26: 563-580.
- Joswig M, Hach-Wunderle V, Ziegler R, Nawroth PP. Postmenopausal hormone replacement therapy and the vascular wall: mechanism of 17-beta estradiol effects on vascular biology. *Exp Clin Endocrinol Diabetes* (1999) 107: 477-487.
- Jovanovic A, Grbovic L, Tulic I. Predominant role for nitric oxide in the relaxation induced by acetylcholine in human uterine artery. *Hum Reprod* (1994) 9: 387-393.

- Kanno K, Hirata Y, Imai T, Iwashina M, Marumo F. Regulation of inducible nitric oxide synthase gene by interleukin-1 beta in rat vascular endothelial cells. *Am J Physiol* (1994) 267: H2318-H2324.
- Kao SJ, Lei HC, Kuo CT, Chang MS, Chen BC, Chang YC, Chiu WT, Lin CH. Lipoteichoic acid induces nuclear factor-kappaB activation and nitric oxide synthase expression via phosphatidylinositol 3-kinase, Akt, and p38 MAPK in RAW 264.7 macrophages. *Immunology* (2005) 115: 366-374.
- Karas RH, van Eickels M, Lydon JP, Roddy S, Kwoun M, Aronovitz M, Baur WE, Conneely O, O'Malley BW, Mendelsohn ME. A complex role for the progesterone receptor in the response to vascular injury. *J Clin Invest* (2001) 108: 611-618.
- Kastner P, Krust A, Turcotte B, Stropp U, Tora L, Gronemeyer H, Chambon P. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J* (1990) 9: 1603-1614.
- Kaufmann SH, Earnshaw WC. Induction of apoptosis by cancer chemotherapy. *Exp Cell Res* (2000) 256: 42-49.
- Kaur P, Jodhka PK, Underwood WA, Bowles CA, de Fiebre NC, de Fiebre CM, Singh M. Progesterone increases brain-derived neurotrophic factor expression and protects against glutamate toxicity in a mitogen-activated protein kinase- and phosphoinositide-3 kinase-dependent manner in cerebral cortical explants. *J Neurosci Res* (2007) 85: 2441-2449.
- Kawasaki T, Kitao T, Nakagawa K, Fujisaki H, Takegawa Y, Koda K, Ago Y, Baba A, Matsuda T. Nitric oxide-induced apoptosis in cultured rat astrocytes: protection by edaravone, a radical scavenger. *Glia* (2007) 55: 1325-1333.
- Khoo JC, Miller E, Pio F, Steinberg D, Witztum JL. Monoclonal antibodies against LDL further enhance macrophage uptake of LDL aggregates. *Arterioscler Thromb* (1992) 12: 1258-1266.
- Kikuta K, Sawamura T, Miwa S, Hashimoto N, Masaki T. High affinity arginine transport of bovine aortic endothelial cells is impaired by lysophosphatidylcholine. *Circ Res* (1998) 83: 1088-1096.
- Kim HP, Lee JY, Jeong JK, Bae SW, Lee HK, Jo I. Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor α localized in caveolae. *Biochem Biophys Res Commun* (1999) 263: 257-262.
- Kleinbongard P, Rassaf T, Dejam A, Kerber S, Kelm M. Griess method for nitrite measurement of aqueous and protein containing sample. *Methods Enzymol* (2002) 359: 158-168.
- Kneuer C, Ehrhardt C, Radomski MW, Bakowsky U. Selectins - potential pharmacological targets?. *Drug Discovery Today* (2006) 11: 21-22.
- Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J* (1994) 298: 249-258.
- Kockx MM, Herman AG. Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental? *Cardiovasc Res* (2000) 45: 736-746.

- Koledova VV, Khalil RA. Sex hormone replacement therapy and modulation of vascular function in cardiovascular disease. *Expert Rev Cardiovasc Ther* (2007) 5(4): 777-789.
- Kone R. Protein-protein interactions controlling nitric oxide synthases. *Acta Physiol Scand* (2000) 168: 27-31.
- Krstic A, Ilic V, Mojsilovic S, Jovcic G, Milenkovic P, Bugarski D. p38 MAPK signaling mediates IL-17-induced nitric oxide synthase expression in bone marrow cells. *Growth Factors* (2009) 27: 79-90.
- Kyaw M, Yoshizumi M, Tsuchiya K, Kirima K, Suzaki Y, Abe S, Hasegawa T, Tamaki T. Antioxidants inhibit endothelin-1 (1-31)-induced proliferation of vascular smooth muscle cells via the inhibition of mitogen-activated protein (MAP) kinase and activator protein-1 (AP-1). *Biochem Pharmacol* (2002) 64: 1521-1531.
- Le Good JA, Ziegler WH, Parekh DB, Alessi DR, Cohen P, Parker PJ. Protein kinase C isoforms controlled by phosphoinositide 3-Kinase through the protein kinase PDK1. *Science* (1998) 281: 2042-2045.
- Lee WS, Harder JA, Yoshizumi M, Lee ME, Haber E. Progesterone inhibits arterial smooth muscle cell proliferation. *Nat Med* (1997) 3: 1005-1008.
- Lenormand P, Brondello JM, Brunet A, Pouyssegur J. Growth factor-induced p42/p44 MAPK nuclear translocation and retention requires both MAPK activation and neosynthesis of nuclear anchoring proteins. *J Cell Biol* (1998) 142: 625-633.
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky M, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* (2007) 7(9): 678-689.
- L'hermite M, Simoncini T, Fuller S, Genazzani AR. Could transdermal estradiol plus progesterone be a safer postmenopausal HRT? A review. *Maturitas* (2008) 60(3-4): 185-201.
- Li G, Mills I, Sumpio BE. Cyclic strain stimulates endothelial cell proliferation: characterization of strain requirements. *Endothelium* (1994) 22: 177-181.
- Li X, O'Malley BW. Unfolding the action of progesterone receptors. *J Biol Chem* (2003) 278: 39261-39264.
- Libby P, Ridker PM, Maseri A. Inflammation and atherosclerosis. *Circulation* (2002) 105: 1135-1143.
- Liszewska E, Rekawiecki R, Kotwika J. Effect of progesterone on the expression of bax and bcl-2 and on caspase activity in bovine luteal cells. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* (2005) 78: 67-81.
- Lo KC, Lamb DJ. The testis and male accessory organs. In Strauss JF, Barbieri RL (Eds.), Yen and Jaffe's reproductive endocrinology: Physiology, pathophysiology, and clinical management (5th ed., pp. 367-387). Philadelphia: Elsevier, 2004.
- Loosfelt H, Atger M, Misrahi M, Guiochon-Mantel A, Meriel C, Logeat F, Benarous R and Milgrom E. Cloning and sequence analysis of rabbit progesterone receptor complementary DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1986) 83: 9045-9049.

- Losel RM, Falkenstein E, Feuring M, Schultz A, Tillmann HC, Rossol-Haseroth K, Wehling M. Nongenomic steroid action: controversies, questions, and answers. *Physiol Rev* (2003) 83: 965-1016.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* (1951) 193: 265-275.
- Luconi M, Francavilla F, Porazzi I, Macerola B, Forti G, Baldi E. Human spermatozoa as a model for studying membrane receptors mediating rapid nongenomic effects of progesterone and estrogens. *Steroids* (2004) 69: 553-559.
- Luetjens CM, Didolkar A, Kliesch S, Paulus W, Jeibmann A, Böcker W, Nieschlag E, Simoni M. Tissue expression of the nuclear progesterone receptor in male non-human primates and men. *J Endocrinol* (2006) 189: 529-539.
- Luo BH, Carman CV, Springer TA. Structural basis of integrin regulation and signaling. *Annu Rev Immunol* (2007) 25: 619-647.
- Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* (2000) 407: 233-241.
- MacNamara P, O'Shaughnessy C, Manduca P, Loughrey HC. Progesterone receptors are expressed in human osteoblast-like cell lines and in primary human osteoblast cultures. *Calcified Tissue International* (1995) 57: 436-441.
- Maller JL. The elusive progesterone receptor in *Xenopus* oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001) 98: 8-10.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell* (1995) 83: 835-839.
- Manson JE, Hsia J, Johnson KC, Rossouw JE, Assaf AR, Lasser NL, Trevisan M, Black HR, Heckbert SR, Detrano R, Strickland OL, Wong ND, Crouse JR, Stein E, Cushman M; Women's Health Initiative Investigators. Estrogen plus progestin and the risk of coronary heart disease. *N Engl J Med* (2003) 349: 523- 534.
- Manson JE, Martin KA. Postmenopausal hormone-replacement therapy. *N Engl J Med* (2001) 345: 34-40.
- Massheimer V, de Boland AR. Modulation of 1,25-dihydroxyvitamin D₃-dependent Ca²⁺ uptake in skeletal muscle by protein kinase C. *Biochem J* (1992) 281: 349-52.
- Massheimer V, Polini N, Alvarez C, Benozzi S, Rauschemberger MB, Sellés J. Signal transduction pathways involved in non-genomic action of estrone on vascular tissue. *Steroids* (2006) 71: 857-864.
- Massheimer V, Polini N, Alvarez C, Benozzi S, Selles J. 17Beta-estradiol rapid stimulation of rat aorta NOS activity is prevented by oestrogen deficiency. *Maturitas* (2002) 43(1): 55-64.
- Matharu NM, Rainger GE, Vohra R, Nash GB. Effects of disturbed flow on endothelial cell function: pathogenic implications of modified leukocyte recruitment. *Biorheology* (2006) 43: 31-44.

- Matheny HE, Deem TL, Cook-Mills JM. Lymphocyte migration through monolayers of endothelial cell lines involves VCAM-1 signaling via endothelial cell NADPH oxidase. *J Immunol* (2000) 164: 6550-6559.
- McCabe TJ, Fulton D, Roman LJ, Sessa WC. Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "calcium-independent" eNOS activation by phosphorylation. *J Biol Chem* (2000) 275: 6123-6128.
- McDonald KK, Zharikov S, Block ER, Kilberg MS. A caveolar complex between the cationic amino acid transporter 1 and endothelial nitric oxide synthase may explain the "arginine paradox". *J Biol Chem* (1997) 272: 31213-31216.
- McEver RP, Beckstead JH, Moore KL, Marshall-Carlson L, Bainton DF. GMP-140, a platelet alpha-granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel-Palade bodies. *J Clin Invest* (1989) 84: 92-99.
- McEver RP. P-selectin and PSGL-1: exploiting connections between inflammation and venous thrombosis. *Thromb Haemost* (2002) 87: 364-365.
- McGuire PG, Orkin RW. Isolation of rat aortic endothelial cells by primary explant techniques and their phenotypic modulation by defined substrata. *Lab Invest* (1987) 57: 94-105.
- Mellion BT, Ignarro IJ, Ohlstein EH, Pontecorvo E, Hyman A, Kadowitz P. Evidence for the inhibitory role of guanosine 3'-5'-monophosphate in ADP induce human platelet aggregation in the presence of nitric oxide and related vasodilators. *Blood* (1981) 57: 946-955.
- Mendelsohn ME, Karas RH. Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science* (2005) 308: 1583-1587.
- Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* (1999) 340: 1801-1811.
- Mendiberry J, Rauschemberger MB, Selles J, Massheimer V. Involvement of phosphoinositide-3-kinase and phospholipase C transduction systems in the non-genomic action of progesterone in vascular tissue. *Int J Biochem Cell Biol* (2006) 38: 288-296.
- Merriam RW. Progesterone-induced maturational events in oocytes of *Xenopus laevis*. I. Continuous necessity for diffusible calcium and magnesium. *Exp Cell Res* (1971) 68: 75-80.
- Meyer C, Schmid R, Scriba PC, Wehling M. Purification and partial sequencing of high-affinity progesterone-binding site(s) from porcine liver membranes. *Eur J Biochem* (1996) 239: 726-731.
- Meyer C, Schmieding K, Falkenstein E, Wehling M. Are highaffinity progesterone binding site(s) from porcine liver microsomes members of the r receptor family? *Eur J Pharmacol* (1998) 347: 293-299.
- Michel T, Feron O. Nitric oxide synthases: which, where, how, and why? *J Clin Invest* (1997) 100(9): 2146-2152.
- Michell BJ, Chen Z, Tiganis T, Stapleton D, Katsis F, Power DA, Sim AT, Kemp BE. Coordinated control of endothelial nitric-oxide synthase phosphorylation by protein kinase C and the cAMP-dependent protein kinase. *J Biol Chem* (2001) 276: 17625-17628.

- Miller WL. StAR search-what we know about how the steroidogenic acute regulatory protein mediates mitochondrial cholesterol import. *Mol Endocrinol* (2007) 21: 589-601.
- Minden A, Lin A, Smeal T, Dérijard B, Cobb M, Davis R, Karin M. c-Jun N-terminal phosphorylation correlates with activation of the JNK subgroup but not the ERK subgroup of mitogen-activated protein kinases. *Mol Cell Biol* (1994) 14: 6683-6688.
- Misrahi M, Atger M, d'Auriol L, Loosfelt H, Meriel C, Fridlansky F, Guiochon- Mantel A, Galibert F and Milgrom E. Complete amino acid sequence of the human progesterone receptor deduced from cloned cDNA. *Biochem Biophys Res Commun* (1987) 143: 740-748.
- Mochly-Rosen D. Localization of protein kinases by anchoring proteins: a theme in signal transduction. *Science* (1995) 268: 247-251.
- Morales DE, McGowan KA, Grant DS, Maheshwari S, Bhartiya D, Cid MC, Kleinman HK, Schnaper HW. Estrogen promotes angiogenic activity in human umbilical vein endothelial cells *in vitro* and in a murine model. *Circulation* (1995) 91: 755-763.
- Morey AK, Pedram A, Razandi M, Prins BA, Hu RM, Biesiada E, Levin ER. Estrogen and progesterone inhibit vascular smooth muscle proliferation. *Endocrinology* (1997) 138: 3330-3339.
- Mori M, Gotoh T. Regulation of nitric oxide production by arginine metabolic enzymes. *Biochem Biophys Res Commun* (2000) 275: 715-719.
- Mount PF, Kemp BE, Power DA. Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. *J Mol Cell Cardiol* (2007) 42: 271-279.
- Mueed I, Zhang L, MacLeod KM. Role of the PKC/CPI-17 pathway in enhanced contractile responses of mesenteric arteries from diabetic rats to alpha adrenoceptor stimulation. *Br J Pharmacol* (2005) 146: 972-982.
- Mulac-Jericevic B, Mullinax RA, DeMayo FJ, Lydon JP, Conneely OM. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science* (2000) 289: 1751-1754.
- Murata T, Ushikubi F, Matsuoka T, Hirata M, Yamasaki A, Sugimoto Y, et al. Altered pain perception: an inflammatory response in mice lacking prostacyclin receptor. *Nature* (1997) 388: 678-682.
- Nakamura Y, Suzuki T, Inoue T, Tazawa C, Ono K, Moriya T, Saito H, Ishibashi T, Takahashi S, Yamada S, Sasano H. Progesterone receptor subtypes in vascular smooth muscle cells of human aorta. *Endocr J* (2005) 52: 245-252.
- Nathan C. Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* (1992) 6: 3051-3064.
- Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, Territo MC, Lusis AJ, Shih DM, Van Lenten BJ, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Fogelman AM. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak: a review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (1996) 16: 831-842.
- Newton AC. Regulation of the ABC kinases by phosphorylation: protein kinase C as a paradigm. *Biochem J* (2003) 370: 361-371.

- Nilsson S, Makela S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* (2001) 81: 1535-1565.
- Niswender GD. Molecular control of luteal secretion of progesterone. *Reproduction* (2002) 123: 333-339.
- Norman AW, Mizwicki MT, Norman DP. Steroid-hormone rapid actions, membrane receptors and a conformational ensemble model. *Nat Rev Drug Discov* (2004) 3: 27-41.
- Oettel M, Mukhopadhyay AK. Progesterone: the forgotten hormone in men? *Aging Male* (2004) 7: 236-257.
- Ohtsuka M, Miyashita Y, Shirai K. Lipids deposited in human atheromatous lesions induce apoptosis of human vascular smooth muscle cells. *J Atheroscler Thromb* (2006) 13: 256-262.
- Okubo T, Urabe M, Tsuchiya H, Iwasa K, Yokota K, Kikuchi N, Yamamoto T, Honjo H. Effect of estrogen and progesterone on gene expression of growth regulatory molecules and proto-oncogene in vascular smooth muscle cells. *Endocr J* (2000) 47: 205-214.
- Orshal JM, Khalil RA. Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* (2004) 286: R233-R249.
- Osmond RI, Sheehan A, Borowicz R, Barnett E, Harvey G, Turner C, Brown A, Crouch MF, Dyer AR. GPCR screening via ERK 1/2: a novel platform for screening G protein-coupled receptors. *J Biomol Screen* (2005) 10: 730-737.
- Otsuki M, Saito S, Sumitani S, Kouhara T, Kasayama S. Progesterone, but not medroxyprogesterone, inhibits vascular cell adhesion molecule-1 expression in human vascular endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* (2001) 21: 243-248.
- Ouyang P, Michos ED, Karas RH. Hormone replacement therapy and the cardiovascular system. *J Am Coll Cardiol* (2006) 47: 1741-1753.
- Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* (1988) 333: 664-666.
- Pan J, Xia L, McEver RP. Comparison of promoters for the murine and human P-selectin genes suggests species-specific and conserved mechanisms for transcriptional regulation in endothelial cells. *J Biol Chem* (1998) 273: 10058-10067.
- Park C, Sohn Y, Shin KS, Kim J, Ahn H, Huh Y. The chronic inhibition of nitric oxide synthase enhances cell proliferation in the adult rat hippocampus. *Neurosci Lett* (2003) 339: 9-12.
- Patiño R, Thomas P. Characterization of a membrane receptor activity for 17 α ,20 β ,21-trihydroxy-4-pregnen-3-one in ovaries of spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*). *Gen Comp Endocrinol* (1990) 78: 204-217.
- Paul J. Cell and Tissue Culture. 5th Edition. Churchill Livingstone. New York, 1975.
- Pauly RR, Passaniti A, Bilato C, Monticone R, Cheng L, Papadopoulos N, Gluzband YA, Smith L, Weinstein C, Lakatta EG, Crow MT. Migration of cultured vascular smooth cells

through a basement membrane barrier requires type IV collagenase activity and is inhibited by cellular differentiation. *Circ Res* (1994) 75: 41-54.

Pawlowski NA, Abraham EL, Pontier S, Scott WA, Cohn ZA. Human monocyte-endothelial cell interaction *in vitro*. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1985) 82: 8208-8212.

Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu BE, Karandikar M, Berman K, Cobb MH. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocr Rev* (2001) 22: 153-183.

Pedram A, Razandi M, Aitkenhead M, Hughes CC, Levin ER. Integration of the non-genomic and genomic actions of estrogen. Membrane-initiated signaling by steroid to transcription and cell biology. *J Biol Chem* (2002) 277: 50768-50775.

Peeyananjarassri K, Baber R. Effects of low-dose hormone therapy on menopausal symptoms, bone mineral density, endometrium, and the cardiovascular system: a review of randomized clinical trials. *Climacteric* (2005) 8: 13-23.

Peluso JJ, Fernandez G, Pappalardo A, White BA. Characterization of a putative membrane receptor for progesterone in rat granulosa cells. *Biol Reprod* (2001) 65: 94-101.

Perry RP, Kelly DE. Inhibition of RNA synthesis by actinomycin D: characteristic dose-response of different RNA species. *J Cell Physiol* (1970) 76: 127-139.

Pietras RJ, Szego CM. Partial purification and characterization of oestrogen receptors in subfractions of hepatocyte plasma membranes. *Biochem J* (1980) 191: 743-760.

Pietras RJ, Szego CM. Specific binding sites for oestrogen at the outer surfaces of isolated endometrial cells. *Nature* (1977) 265: 69-72.

Polini N, Benozzi S, Alvarez C, Cutini P, Rauschemberger MB, Massheimer V. Efecto conjunto de estradiol, estrona y progesterona a nivel vascular. *Bioquímica y Patología Clínica* (2009) 73(1): pág 71.

Polini N, Massheimer V, Sellés J. Efecto de la progesterona sobre la agregación plaquetaria y la producción de eicosanoides por aorta de rata. *Acta Bioquím Clín Latinoam* (2004) 38(3): 281-287.

Pomerantz KB, Hajjar DP. Eicosanoids in regulation of arterial smooth muscle cell phenotype, proliferative capacity, and cholesterol metabolism. *Arteriosclerosis* (1989) 9: 413-429.

Pratt WB, Toft DO. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocr Rev* (1997) 18: 306-360.

Preiss DJ, Sattar N. Vascular cell adhesion molecule-1: a viable therapeutic target for atherosclerosis? *Int J Clin Pract* (2007) 61(4): 697-701.

Qiao L, Farrell GC. The effects of cell density, attachment substratum and dexamethasone on spontaneous apoptosis of rat hepatocytes in primary culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim* (1999) 35: 417-424.

Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. The anti-aggregation properties of vascular endothelium: interactions between prostacyclin and nitric oxide. *Br J Pharmacol* (1987) 92: 639-646.

- Raff MC. Social controls on cell survival and cell death. *Nature* (1992) 356: 397-400.
- Rand VE, Garland CJ. Endothelium-dependent relaxation to acetylcholine in the rabbit basilar artery: importance of membrane hyperpolarization. *Br J Pharmacol* (1992) 106: 143-150.
- Rao RM, Yang L, Garcia-Cardena G, Luscinskas FW. Endothelialdependent mechanisms of leukocyte recruitment to the vascular wall. *Circ Res* (2007) 101: 234-247.
- Rauschemberger MB, Benozzi S, Polini N, Massheimer V. La estrona interfiere con la acción estimuladora de estradiol y progesterona sobre la producción de óxido nítrico en aorta de rata. *Medicina* (2007) 67: pág 222.
- Rauschemberger MB, Sellés J, Massheimer V. The direct action of estrone on vascular tissue involves genomic and non-genomic actions. *Life Sci* (2008) 82: 115-123.
- Reddy DB, Reddanna P. Chebulagic acid (CA) attenuates LPS-induced inflammation by suppressing NF-kappaB and MAPK activation in RAW 264.7 macrophages. *Biochem Biophys Res Commun* (2009) 381: 112-117.
- Rees DD, Palmer RM, Hodson FH, Moncada S. A specific inhibitor of NO formation from L-arginine attenuates endothelial dependent relaxation. *Br J Pharmacol* (1989) 96: 418-424.
- Rees DD, Palmer RM, Schulz R, Hodson HF, Moncada S. Characterisation of three inhibitors of endothelial NO synthase *in vitro* and *in vivo*. *Br J Pharmacol* (1990) 101: 746-752.
- Revelli A, Massobrio M, Tesarik J. Nongenomic actions of steroid hormones in reproductive tissues. *Endocr Rev* (1998) 19: 3-17.
- Rhen T, Cidlowski JA. Steroid hormone action. In Strauss JF, Barbieri RL (Eds.). Yen and Jaffe's reproductive endocrinology: Physiology, pathophysiology, and clinical management. 5th Edition, pp. 155-174. Philadelphia: Elsevier, 2004.
- Rivard A, Fabre JE, Silver M, Chen D, Murohara T, Kearney M, Magner M, Asahara T, Isner JM. Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation* (1999) 99: 111-120.
- Rojas S, Rojas R, Lamperti L, Casanello P, Sobrevia L. Hyperglycaemia inhibits thymidine incorporation and cell growth via protein kinase C, mitogen activated protein kinases and nitric oxide in human umbilical vein endothelium. *Exp Physiol* (2003) 88: 209-219.
- Rosenzweig A. Endothelial progenitor cells. *N Engl J Med* (2003) 348: 581-582.
- Ross R. Atherosclerosis, an inflammatory disease. *N Engl J Med* (1999) 340: 115-126.
- Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* (1993) 362: 801-809.
- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J; The Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* (2002) 288(3): 321-333.
- Rummel C, Inoue W, Poole S, Luheshi GN. Leptin regulates leukocyte recruitment into the brain following systemic LPS-induced inflammation. *Mol Psychiatry* (2010) 15: 523-534.

- Russo J, Ao X, Grill C, Russo IH. Pattern of distribution of cells positive for estrogen receptor alpha and progesterone receptor in relation to proliferating cells in the mammary gland. *Breast Cancer Res Treat* (1999) 53: 217-227.
- Sarkar R, Gordon D, Stanley JC, Webb RC. Cell cycle effects of nitric oxide on vascular smooth muscle cells. *Am J Physiol* (1997) 272: H1810-H1818.
- Schaeffer HJ, Weber MJ. Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. *Mol Cell Biol* (1999) 19: 2435-2444.
- Scharfman HE, Mercurio TC, Goodman JH, Wilson MA, MacLusky NJ. Hippocampal excitability increases during the estrous cycle in the rat: a potential role for brain-derived neurotrophic factor. *J Neurosci* (2003) 23: 11641-11652.
- Schorderet-Slatkine S, Drury KC. Progesterone induced maturation in oocytes of *Xenopus laevis*. Appearance of a 'maturation promoting factor' in enucleated oocytes. *Cell Differ* (1973) 2: 247-254.
- Schumacher M, Guennoun R, Ghoumari A, Massaad C, Robert F, El-Etr M, Akwa Y, Rajkowski K, Baulieu EE. Novel perspectives for progesterone in hormone replacement therapy, with special reference to the nervous system. *Endocr Rev* (2007) 28: 387-439.
- Schwenke DC. Aging, menopause and free radicals. *Semin Reprod Endocrinol* (1998) 16: 281-308.
- Seidler NW, Jona I, Vegh M, Martonosi A. Cyclopiazonic acid is a specific inhibitor of the Ca^{2+} -ATPase of sarcoplasmic reticulum. *J Biol Chem* (1989) 264: 17816-17823.
- Selles J, Polini N, Alvarez C, Massheimer V. Nongenomic action of progesterone in rat aorta: Role of nitric oxide and prostaglandins. *Cell Signal* (2002) 14: 431-436.
- Selles J, Polini N, Alvarez C, Massheimer V. Novel action of estrone on vascular tissue: regulation of NOS and COX activity. *Steroids* (2005) 70(4): 251-256.
- Selles J, Polini N, Alvarez C, Massheimer V. Progesterone and 17 beta-estradiol acutely stimulate nitric oxide synthase activity in rat aorta and inhibit platelet aggregation. *Life Sci* (2001) 69: 815-827.
- Selye H. Correlation between the chemical structure and the pharmacological actions of the steroids. *Endocrinology* (1942) 30: 437-453.
- Serock MR, Wells AK, Khalil RA. Modulators of vascular sex hormone receptors and their effects in estrogen-deficiency states associated with menopause. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov* (2008) 3: 165-186.
- Sherman MR, Corvol PL, O'Malley BW. Progesteronebinding components of chick oviduct I. Preliminary characterization of cytoplasmic components. *J Biol Chem* (1970) 245: 6085-6096.
- Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Caruso A, Varone G, Genazzani AR. *In vitro* effects of progesterone and progestins on vascular cells. *Steroids* (2003) 68: 831-836.
- Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Caruso A, Willis MY, Garibaldi S, Baldacci C, Genazzani AR. Differential signal transduction of progesterone and medroxyprogesterone acetate in human endothelial cells. *Endocrinology* (2004) 145: 5745-5756.

- Simons M. Angiogenesis: where do we stand now? *Circulation* (2005) 111: 1556-1566.
- Singh M. Mechanisms of progesterone-induced neuroprotection. *Ann N Y Acad Sci* (2005) 1052: 145-51.
- Sitruk-Ware R. Progestins and cardiovascular risk markers. *Steroids* (2000) 65: 651-658.
- Snedecor GW, Cochran WG. *Statistical Methods*. 6th Edition. The Iowa State University Press. Iowa, 1967.
- Soares R, Guerreiro S, Botelho M. Elucidating progesterone effects in breast cancer: cross talk with PDGF signaling pathway in smooth muscle cell. *J Cell Biochem* (2007) 100: 174-83.
- Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell* (1994) 76: 301-314.
- Stamfer MJ, Colditz G, Willet W, Manson J, Rosner B, Speizer F, Hennekens C. Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow the nurses' health study. *N Engl J Med* (1991) 325: 756-762.
- Steinberg D. Low density lipoprotein oxidation and its pathobiological significance. *J Biol Chem* (1997) 272: 20963-20966.
- Steinhubl SR, Moliterno DJ. The Role of the Platelet in the Pathogenesis of Atherothrombosis. *Am J Cardiovasc Drugs* (2005) 5(6): 1-10.
- Stocco DM, Clark BJ. Regulation of the acute production of steroids in steroidogenic cells. *Endocr Rev* (1996) 17: 221-244.
- Strauss JF. The synthesis and metabolism of steroid hormones. In Strauss JF, Barbieri RL (Eds.). *Yen and Jaffe's reproductive endocrinology: Physiology, pathophysiology, and clinical management*. 5th Edition, pp. 125-154. Philadelphia: Elsevier, 2004.
- Su Y, Edwards-Bennett S, Bubb MR, Block ER. Regulation of endothelial nitric oxide synthase by the actin cytoskeleton. *Am J Physiol Cell Physiol* (2003) 284: C1542-C1549.
- Suzuki A, Mizuno K, Ino Y, Okada M, Kikkawa F, Mizutani S, Tomoda Y. Effects of 17 beta-estradiol and progesterone on growth-factor-induced proliferation and migration in human female aortic smooth muscle cells *in vitro*. *Cardiovasc Res* (1996) 32: 516-523.
- Szekeres-Bartho J, Polgar B, Kozma N, Miko E, Par G, Szereday L, Barakonyi A, Palkovics T, Papp O, Varga P. Progesterone-dependent immunomodulation. *Chem Immunol Allergy* (2005) 89: 118-125.
- Takai Y, Kishimoto A, Inoue M, Nishizuka Y. Studies on a cyclic nucleotide-independent protein kinase and its proenzyme in mammalian tissues. I. Purification and characterization of an active enzyme from bovine cerebellum. *J Biol Chem* (1977) 252: 7603-7609.
- Thastrup O, Cullen PJ, Drobak BK, Hanley MR, Dawson AP. Thapsigargin, a tumor promoter, discharges intracellular Ca stores by specific inhibition of the endoplasmic reticulum Ca-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1990) 87: 2466-2470.

- The Writing Group for the PEPI Trial. Effects of hormone replacement therapy on endometrial histology in postmenopausal women. The postmenopausal estrogen/progestin interventions (PEPI) trial. *JAMA* (1996) 275: 370-375.
- Thomas P, Zhu Y, Pace M. Progesterone membrane receptors involved in the meiotic maturation of teleost oocytes: a review with some new findings. *Steroids* (2002) 67: 511-517.
- Trotter A, Kipp M, Schrader RM, Beyer C. Combined application of 17beta-estradiol and progesterone enhance vascular endothelial growth factor and surfactant protein expression in cultured embryonic lung cells of mice. *Int J Pediatr* (2009) 2009: ID 170491.
- Tsao PS, Lewis NP, Alpert S, Cooke JP. Exposure to shear stress alters endothelial adhesiveness. Role of nitric oxide. *Circulation* (1995) 92: 3513-3519.
- Turner NA, Ball SG, Balmforth AJ. The mechanism of angiotensin II-induced extracellular signal-regulated kinase-1/2 activation is independent of angiotensin AT(1A) receptor internalization. *Cell Signal* (2001) 13: 269-277.
- Tzeng HP, Yang RS, Ueng TH, Liu SH. Upregulation of cyclooxygenase-2 by motorcycle exhaust particulate-induced reactive oxygen species enhances rat vascular smooth muscle proliferation. *Chem Res Toxicol* (2007) 20: 1170-1176.
- Uribe A, Strauss JF, Martínez F. Contact sites from human placental mitochondria: Characterization and role in progesterone synthesis. *Arch Biochem Biophys* (2003) 413: 172-181.
- Van Baal W, Kenemans P, Coen D, Stehouwer A. Long term effects of combined hormone replacement therapy on markers of endothelial function and inflammatory activity in healthy postmenopausal women. *Fertil Steril* (1999) 71: 663-670.
- Vanhoutte PM, Shimokawa H, Tang EH, Feletou M. Endothelial dysfunction and vascular disease. *Acta Physiol* (2009) 196: 193-222.
- Vazquez F, Rodriguez-Manzanera JC, Lydon JP, Edwards DP, O'Malley BW, Iruela-Arispe ML. Progesterone regulates proliferation of endothelial cells. *J Biol Chem* (1999) 274: 2185-2192.
- Vegeto E, Shahbaz MM, Wen DX, Goldman ME, O'Malley BW, McDonnell DP. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol* (1993) 7: 1244-1255.
- Villalobo A. Enhanced cell proliferation induced by nitric oxide. *Dyn Cell Biol* (2007) 1: 60-64.
- Walsh B, Schiff I, Rosner B, Greenberg L, Ravnkar V, Sacks F. Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentration of plasma lipoproteins. *N Engl J Med* (1991) 325: 1196-1204.
- Wang HQ, Bai L, Shen BR, Yan ZQ, Jiang ZL. Coculture with endothelial cells enhances vascular smooth muscle cell adhesion and spreading via activation of beta1-integrin and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt. *Eur J Cell Biol* (2007) 86: 51-62.

- Wang HQ, Huang LX, Qu MJ, Yan ZQ, Liu B, Shen BR, Jiang ZL. Shear stress protects against endothelial regulation of vascular smooth muscle cell migration in a coculture system. *Endothelium* (2006) 13: 171-180.
- Wang TH, Yang D, Liu PQ, Gong SZ, Lu W, Pan JY. 17beta -estradiol induced nitric oxide release in vascular endothelial cells. *Sheng Li Xue Bao* (2000) 52: 479-482.
- Wang YY, Chen WL, Zhang WX, Bai ZB, Huang ZQ, Li JS. Ezrin and inducible nitric oxide synthase in malignant proliferation of salivary gland pleomorphic adenoma. *Ai Zheng* (2009) 28: 1072-1076.
- Watanabe T, Akishita M, Nakaoka T, Kozaki K, Miyahara Y, He H, Ohike Y, Ogita T, Inoue S, Muramatsu M, Yamashita N, Ouchi Y. Estrogen receptor beta mediates the inhibitory effect of estradiol on vascular smooth muscle cell proliferation. *Cardiovasc Res* (2003) 59: 734-744.
- Watson CS. Signaling themes shared between peptide and steroid hormones at the plasma membrane. *Sci STKE* (1999) 1999(12):PE1.
- Wehling M. Specific, nongenomic actions of steroid hormones. *Annu Rev Physiol* (1997) 59: 365-393.
- Wei LL, Gonzalez-Aller C, Wood WM, Miller LA, Horwitz KB. 50-Heterogeneity in human progesterone receptor transcripts predicts a new amino-terminal truncated "C"-receptor and unique A-receptor messages. *Mol Endocrinol* (1990) 4: 1833-1840.
- Wei LL, Norris BM, Baker CJ. An N-terminally truncated third progesterone receptor protein, PR(C), forms heterodimers with PR(B) but interferes in PR(B)- DNA binding. *J Steroid Biochem Mol Biol* (1997) 62(4): 287-97.
- White MM, Zamudio S, Stevens T, Tyler R, Lindenfeld J, Leslie K, Moore LG. Estrogen, progesterone, and vascular reactivity: potential cellular mechanisms. *Endocr Rev* (1995) 16: 739-751.
- Williams K, Fisher JS, Turner KJ, McKinnell C, Saunders PT, Sharpe RM. Relationship between expression of sex steroid receptors and structure of the seminal vesicles after neonatal treatment of rats with potent or weak estrogens. *Environ Health Perspect* (2001) 109: 1227-1235.
- Williams SP, Sigler PB. Atomic structure of progesterone complexed with its receptor. *Nature* (1998) 393: 392-396.
- Winneker RC, Fensome A, Zhang P, Yudt MR, McComas CC, Unwalla RJ. A new generation of progesterone receptor modulators. *Steroids* (2008) 73: 689-701.
- Woltmann G, McNulty CA, Dewson G, Symon FA, Wardlaw AJ. Interleukin-13 induces PSGL-1/P-selectin-dependent adhesion of eosinophils, but not neutrophils, to human umbilical vein endothelial cells under flow. *Blood* (2000) 95: 3146-3152.
- Xuan YT, Guo Y, Zhu Y, Wang OL, Rokosh G, Messing RO, Bolli R. Role of the protein kinase C-epsilon-Raf-1-MEK-1/2-p44/42 MAPK signaling cascade in the activation of signal transducers and activators of transcription 1 and 3 and induction of cyclooxygenase-2 after ischemic preconditioning. *Circulation* (2005) 112: 1971-1978.

- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Tomobe Y, Kobayashi M, Mitsui Y, Yazaki Y, Goto K, Masaki T. A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* (1988) 332: 411-415.
- Yang D, Tan Z, Pan JY, Wang TH. 17beta-Estradiol inhibits vascular smooth muscle cell proliferation and c-fos expression: role of nitric oxide. *Sheng Li Xue Bao* (2002) 54: 17-22.
- Yang L, Yang XC, Yang JK, Guo YH, Yi FF, Fan Q, Liu XL. Cyclosporin A suppresses proliferation of endothelial progenitor cells: involvement of nitric oxide synthase inhibition. *Intern Med* (2008) 47: 1457-1464.
- Yang W, Benjamin IS, Alexander B. Nitric oxide modulates acetylcholine-induced vasodilatation in the hepatic arterial vasculature of the dual-perfused rat liver. *Acta Physiol Scand* (2001) 171: 413-418.
- Yao L, Pan J, Setiadi H, Patel KD, McEver RP. Interleukin 4 or oncostatin M induces a prolonged increase in P-selectin mRNA and protein in human endothelial cells. *J Exp Med* (1996) 184: 81-92.
- Yeh YC, Hwang GY, Liu IP, Yang VC. Identification and expression of scavenger receptor SR-BI in endothelial cells and smooth muscle cells of rat aorta *in vitro* and *in vivo*. *Atherosclerosis* (2002) 161: 95-103.
- Zarbock A, Lowell CA, Ley K. Spleen Tyrosine Kinase Syk Is Necessary for E-Selectin-Induced alpha(L)beta(2) Integrin-Mediated Rolling on Intercellular Adhesion Molecule-1. *Immunity* (2007) 26: 773-783.
- Zhu Y, Rice CD, Pang Y, Pace M, Thomas P. Cloning, expression, and characterization of a membrane progesterin receptor and evidence it is an intermediary in meiotic maturation of fish oocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2003) 100: 2231-2236.

APÉNDICE

Los ensayos de inmunocitoquímica empleados para la caracterización de los cultivos celulares fueron realizados con la colaboración de la Bqca. Graciela Gigola quién brindó cordialmente los materiales, la experiencia y los consejos necesarios para ello.

PUBLICACIONES ORIGINADAS EN EL PERIODO DE FORMACIÓN DOCTORAL

- **Cutini Pablo**, Sellés Juana, Massheimer Virginia. “CROSS-TALK BETWEEN RAPID AND LONG TERM EFFECTS OF PROGESTERONE ON VASCULAR TISSUE”. *J Steroid Biochem Mol Biol* (2009) 115: 36-43 (ISSN: 0960-0760)
- **Cutini Pablo**, Massheimer Virginia. “ROLE OF PROGESTERONE ON THE REGULATION OF VASCULAR MUSCLE CELLS PROLIFERATION, MIGRATION AND APOPTOSIS”. *Steroids* (2010) 75: 355-361 (ISSN: 0039-128X)
- Sandoval Marisa, **Cutini Pablo**, Rauschemberger María Belén, Massheimer Virginia. “THE SOYBEAN ISOFLAVONE GENISTEIN MODULATES ENDOTHELIAL CELL BEHAVIOUR”. *Br J Nutr* (2010) 104: 171-179 (ISSN: 0007-1145)