



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

Tesis de Doctor en Biología

“Rol del Fitoestrógeno Genisteína en los sistemas vascular y óseo”

Sabrina Belén Cepeda

Bahía Blanca

Argentina

-2019-

Directora de tesis

Dra Virginia L. Massheimer

Co-directora de tesis

Dra. Marisa J. Sandoval

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 Biología, de la Universidad Nacional del Sur y no ha sido presentada previamente para la obtención de otro título en esta Universidad u otra. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en el ámbito del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia durante el período comprendido entre el 1 de marzo de 2014 al 12 de noviembre de 2018, bajo la dirección de la Dra. Virginia Massheimer, Profesora Asociada de la Cátedra de Bioquímica Clínica II e Investigadora Principal del Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (CONICET) y la codirección de la Dra. Marisa Sandoval, Profesora Adjunta de la Cátedra de Hematología Clínica.

Lic. en Cs. Biológicas Sabrina Belén Cepeda

Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL SUR

El mundo necesita más gente que ame lo que hace.

Agradecimientos

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

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

A la Dra. Virginia Massheimer, por su dirección, disposición permanente para formarme científicamente, por su paciencia y perseverancia. Por su gran calidad científica. A la Dra. Marisa Sandoval por su calidad humana, por contagiarme cada día su amor a la ciencia. Gracias por ser una paciente maestra. Gracias por hacer que el proyecto de tesis, presentado hace cinco años, sea hoy realidad.

A mis padres Jorge y Graciela, y a mis hermanas Carolina y Sofia por apoyarme siempre.

A mis compañeros de laboratorio, Adrian, Pablo, Belén, Ivone y Carla con quien hemos compartido incontables charlas, viajes y experimentos.

... y a todos aquellos que de alguna forma hicieron posible la concreción de esta tesis...

Gracias!

RESUMEN

Las calcificaciones vasculares y la osteoporosis son patologías prevalentes en mujeres postmenopáusicas. Ambos trastornos se caracterizan por una distorsión de la arquitectura natural del tejido, donde la inflamación y el estrés oxidativo son condiciones que subyacen. La existencia de posibles mecanismos fisiopatológicos compartidos presupone la posibilidad de nuevas estrategias terapéuticas comunes. Los resultados controvertidos sobre el riesgo/beneficio de la terapia de sustitución hormonal para prevenir patologías asociadas a la menopausia, ha incentivado la búsqueda de nuevas opciones de tratamiento. Los fitoestrógenos se posicionaron como una opción.

En este trabajo de tesis se investigó el rol del fitoestrógeno Genisteína en los procesos celulares involucrados en la transformación ósea del lecho vascular, en la remodelación ósea y en la interacción óseo-vascular.

A nivel vascular demostramos que la Genisteína regula los procesos celulares involucrados en la calcificación vascular. Empleando cultivos primarios determinamos que, en células endoteliales Genisteína estimula la síntesis de óxido nítrico, ejerce un balance positivo sobre el crecimiento celular favoreciendo su supervivencia frente al estrés oxidativo. Así mismo, en condiciones de inflamación, la Genisteína previene la expresión de moléculas de adhesión celular endoteliales y de integrinas monocíticas involucradas en la adhesión de los mononucleares al endotelio vascular. En células musculares lisas vasculares (CMLV) el tratamiento con el fitoestrógeno previene la transformación celular a linaje similar osteoblástico. En un modelo experimental de transdiferenciación ósea de CMLV, demostramos que la isoflavona reduce la actividad fosfatasa alcalina y la formación de nódulos de calcio en la matriz extracelular de CMLV. Los resultados se corroboraron por ensayos *ex vivo*, demostrando una marcada disminución en la formación de áreas de calcificación en el tejido aórtico intacto.

A diferencia de la acción anti-ósea evidenciada en el sistema vascular, a nivel óseo la Genisteína estimula la osteoblastogénesis y la osteoclastogénesis. La diferenciación de preosteoblastos a osteoblastos maduros se demostró por la estimulación de marcadores tempranos de diferenciación (Runx-2 y REX), por el aumento de la actividad fosfatasa alcalina y del depósito de colágeno y, por la estimulación de la mineralización de la matriz extracelular. En cocultivos de osteoblastos-monocitos, y a

través de análisis de cambios morfológicos y expresión de la enzima fosfatasa ácida tartrato resistente, se demostró que Genisteína favorece la maduración monocítica a osteoclastos diferenciados. Desde un punto de vista molecular, el mecanismo de acción del fitoestrógeno incluye la participación del receptor de estrógenos y la vía óxido nítrico sintasa.

En su conjunto, los resultados de este trabajo de tesis evidencian una acción selectiva y diferencial de la Genisteína según el tipo celular sobre el cual actúa. Adicionalmente se demostró la existencia de una interacción bidireccional ósea-vascular favoreciendo el crecimiento celular y la angiogénesis.

Si bien los datos aportados corresponden a ensayos *in vitro* en sistemas aislados, sugieren una potencial acción dual de la Genisteína a favor del mantenimiento de la arquitectura natural de ambos tejidos. De confirmarse estas acciones en modelos *in vivo* se aportaría fundamento para fomentar el consumo de fitoestrógenos como alternativa para promover la salud ósea y cardiovascular.

ABSTRACT

Although soy phytoestrogen are proposed to prevent or improve postmenopausal vascular and bone diseases, the currently available data are controversial and unclear. In this thesis we investigated the molecular and biochemical action of the isoflavone Genistein on the cellular events involved in vascular calcification and in bone remodeling. We also focused our attention on the interactions between bone and vascular cells.

At vascular level, the data obtained supported the hypothesis that Genistein prevents *in vitro* vascular calcification. To that end, rat aortic vascular cell cultures and murine monocytes *in vitro*, exposed to Genistein were employed. Genistein down-regulated the expression of endothelial cell adhesion molecules and monocytes integrins, involved in stable leukocyte attachment induced by a pro-inflammatory environment. In endothelial cells, promotes nitric oxide synthesis and under oxidative stress favors cell growth and survival. On vascular muscle cells, the isoflavone markedly reduced cell proliferation and migration. In order to study vascular calcification, muscle cells transdifferentiation into osteoblasts like cells was evaluated. The expression of alkaline phosphatase and the presence of calcified nodules in the extracellular matrix were selected as features of vascular muscle cells transdifferentiation. Both osteoblastic markers were significantly reduced after Genistein treatment. These data were corroborated in *ex vivo* assays using aortic tissue, where the presence of calcified areas was significantly reduced by Genistein treatment.

In contrast to this anti-osteogenic action, on bone cells Genistein promoted osteoblastogenesis and osteoclastogenesis. The isoflavone promoted calvaria pre-osteoblast differentiation with an earlier up-regulation of the estrogen receptor alpha gene expression and the enhancement of mRNA levels of the Runt-related transcription factor 1 mRNA expression. The differentiative effect was accompanied through, an increase of alkaline phosphatase activity, extracellular collagen deposition and increased matrix mineralization. Using co-cultures of osteoblasts and monocytes, and tartrate resistant acid phosphatase staining, we found that Genistein induced osteoclast differentiation from mononuclear blood cells. The mechanisms displayed by Genistein involved the participation of estrogen receptor and nitric oxide pathway.

We also obtained evidence that Genistein acted through a bidirectional cross link between bone and vascular cells, that modulates cells growth and enhanced angiogenesis.

Although our data arise from *in vitro* assays employing isolated cells and required confirmation using *in vivo* animal models, provide knowledge that support the hypothesis that phytoestrogens could be useful for cardiovascular and bone health.

INTRODUCCIÓN.....	1
1. FITOESTRÓGENOS.....	1
1.1. CLASIFICACIÓN.....	1
1.2. METABOLISMO DE LOS FITOESTRÓGENOS.....	4
1.3. MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS FITOESTRÓGENOS.....	5
2. SISTEMA VASCULAR.....	7
2.1. ESTRUCTURA DE LOS VASOS SANGUINEOS.....	7
2.2. ENDOTELIO.....	8
2.3. CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES.....	8
2.4. ATEROSCLEROSIS.....	8
2.5. CALCIFICACIÓN VASCULAR ATEROSCLERÓTICA.....	10
2.6. ESTRÓGENOS Y ENFERMEDAD VASCULAR.....	12
3. SISTEMA ÓSEO.....	14
3.1. OSTEOLASTO.....	15
3.2. OSTEOCITO.....	18
3.3. OSTEOLASTO.....	18
3.4. MATRIZ ÓSEA.....	20
3.5. REMODELADO ÓSEO.....	20
3.5.i. Fases del remodelado.....	21
3.6. OSTEOPOROSIS.....	23
4. INTERACCIÓN ÓSEO-VASCULAR.....	25
5. MENOPAUSIA.....	25
5.1. ATEROSCLEROSIS Y OSTEOPOROSIS.....	25
5.2. TERAPIA HORMONAL DE REEMPLAZO.....	26
5.3. EL NUTRACÉUTICO GENISTEÍNA.....	27
5.4. ACCIÓN CARDIOVASCULAR Y ÓSEA DE GENISTEÍNA.....	29

OBJETIVOS.....	31
METODOLOGÍA.....	33
ANIMALES.....	33
SISTEMAS EXPERIMENTALES.....	33
A. SISTEMA EXPERIMENTAL I: anillos de aorta.....	33
A.1. Obtención de anillos de aorta.....	33
A.2. Tratamiento <i>in vitro</i>	34
B. SISTEMA EXPERIMENTAL II: cultivos celulares.....	34
B.1. Cultivos primarios de CE y de CMLV.....	35
B.2. Cultivo de preOB.....	38
B.3. Cultivo de Mo.....	40
B.4. Cocultivo de Mo-OB.....	42
B.5. Inducción a transdiferenciación de CMLV.....	42
B.6. Tratamientos <i>in vitro</i> de los cultivos celulares.....	42
B.7. Viabilidad celular: tinción con Azul de Tripán.....	43
B.8. Ensayos con medios condicionados.....	43
B.8.i. Obtención de medio condicionado de CE.....	43
B.8.ii. Obtención de medio condicionado de OB.....	43
C. SISTEMA EXPERIMENTAL III: ensayos <i>ex vivo</i>.....	44
C.1. Aislamiento de aortas.....	44
C.2. Tratamiento.....	44
ENSAYOS REALIZADOS Y METODOLOGÍA EMPLEADA.....	44
1. Medición de la producción de óxido nítrico.....	44
1.1. En anillos de aorta.....	45
1.2. En cultivos de CE.....	45
2. Proliferación celular.....	46

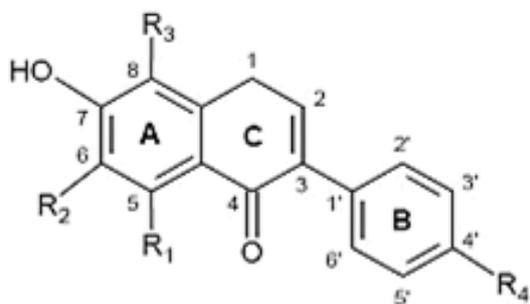
2.1. Ensayo de MTT.....	46
2.2. Inmunocitoquímica diferencial: DAPI/Texas-Red.....	46
3. Producción de VEGF.....	47
4. Migración celular.....	47
4.1. Tinción con Giemsa.....	49
5. Fragmentación de ADN.....	49
6. RT-PCR.....	49
7. Citometría de flujo.....	51
8. Actividad de la enzima fosfatasa alcalina.....	51
9. Estudio de la matriz extracelular.....	52
9.1. Niveles de colágeno: tinción con Rojo Sirio.....	52
9.2. Mineralización.....	52
9.2.i. Cuantificación espectrofotométrica del contenido de calcio.....	52
9.2.ii. Tinción con Rojo de Alizarina.....	53
10. Tinción de nitrato de plata.....	53
11. Tinción TRAP.....	54
12. Angiogénesis: formación de capilares 3D a partir de AA.....	54
12.1. Obtención de colágeno.....	55
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	56
RESULTADOS.....	57
CAPÍTULO 1: SISTEMA VASCULAR.....	57
1.1. Efecto de Gen sobre la producción de NO en AA.....	57
1.2. Estudio de la acción de Gen en CE.....	58
1.3. Efecto de Gen sobre CMLV.....	73
1.4. Inducción de la transdiferenciación de CMLV.....	78
1.5. Efecto de Gen sobre la transdiferenciación de CMLV a CMLV-OB	82

1.6. Modelo <i>ex vivo</i> de calcificación vascular: efecto de Gen.....	86
CAPÍTULO 2: SISTEMA ÓSEO.....	89
2.1. Efecto de Gen sobre osteoblastogénesis.....	89
2.1.i. Caracterización del sistema experimental.....	89
2.1.ii. Estudio del efecto de Gen sobre la osteoblastogénesis.....	94
2.2. Efecto de Gen sobre la osteoclastogénesis.....	103
2.2.i. Caracterización de la diferenciación de Mo a OC.....	103
2.3. Mecanismo de acción de Gen en células óseas.....	107
CAPÍTULO 3: INTERACCIÓN ÓSEO-VASCULAR.....	112
3.1. Interacción células endoteliales-óseas.....	112
3.2. Interacción células óseas-endoteliales.....	116
DISCUSIÓN.....	122
CONCLUSIONES.....	136
ABREVIATURAS.....	138
REFERENCIAS.....	140
PUBLICACIONES DERIVADAS DE ESTA TESIS.....	160

1. FITOESTRÓGENOS

1.1. CLASIFICACIÓN

Los fitoestrógenos (FE) son metabolitos de origen vegetal biológicamente activos con muy diversas funciones en las plantas **(Nikolić y col. 2017)**, como antifúngicos, bactericidas, quelantes de metales, protectores de radiación ultravioleta y moduladores de las auxinas reguladoras del crecimiento y la diferenciación. Su nombre deriva de la capacidad de ejercer actividad símil estrógena en animales y humanos **(Si y col. 2007)**. Desde el punto de vista químico, los FE son compuestos polifenólicos no esteroides que poseen una estructura en común: un esqueleto de difenilpirano compuesto por dos anillos fenólicos (A y B) ligados a través de un anillo de pirano (C). Sobre esta estructura se pueden dar diferentes sustituciones (R1-R₄) lo que da origen a diversos compuestos (Figura 1)**(Ko 2014)**. Los principales FE presentes en el reino vegetal son los pertenecientes a los grupos de las isoflavonas, cumestanos y lignanos (Figura 2), siendo las isoflavonas los FE más abundantes, más potentes y más estudiados **(Harborne 1988; Ososki y col. 2003)**. Desde el punto de vista de su acción biológica las principales isoflavonas son Genisteína (Gen) y Daidzeína (Daid). Si bien se presentan en numerosos vegetales, como en las solanáceas, gramíneas y rosáceas, son más abundantes en las leguminosas, especialmente en la soja **(Fukutake y col. 1996)**.



Compuestos	R1	R2	R3	R4	Sustitución
Daidzeína	H	H	H	OH	7,4'-(OH) ₂
Genisteína	OH	H	H	OH	5,7,4'-(OH) ₃
Gliciteína	H	OCH ₃	H	OH	7,4'-(OH) ₂ , 6-OCH ₃
Formonectina	H	H	H	OCH ₃	7-OH,4'-OCH ₃
Bioactina A	OH	H	H	OCH ₃	5,7-(OH) ₂ , 4'-OCH ₃

Figura 1. Estructura química de las isoflavonas

Modificada de Ko KP. Y col., 2014 (Ko 2014)

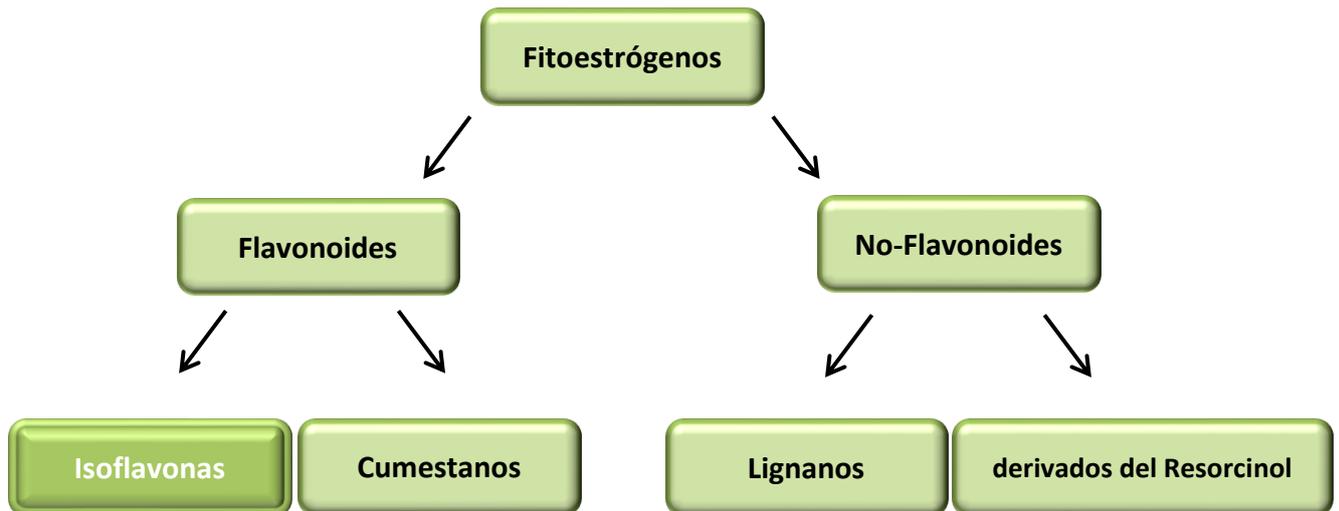


Figura 2. Clasificación de los fitoestrógenos

Modificado de Nikolic I. y col., 2017 (Nikolić y col. 2017)

Desde el punto de vista estereoquímico las isoflavonas presentan gran analogía estructural con el estrógeno humano 17β -estradiol (E_2), lo que les permite unirse al receptor de estrógenos (RE) e inducir acciones agonistas o antagonistas estrogénicas (Setchell 2001). Esa similitud radica en la presencia de un anillo fenólico A y en la distancia entre los grupos OH de los anillos A y B de las isoflavonas Gen y Daid, la que es equivalente a la distancia entre OH_1 y OH_{17} de la molécula de 17β -estradiol (Figura 3). Se ha descrito que se unen a los diferentes RE con menor afinidad que el 17β -estradiol (Ganai y col. 2015). De las isoflavonas Gen y Daid, como de sus precursores biochanina A y formononetina respectivamente, Gen es la de mayor afinidad por el RE (Dixon y col. 2002). La interacción de Gen con el RE es entre 10-100 veces más potente que la de Daid (Nikolić y col. 2017; Polkowski y col. 2000).

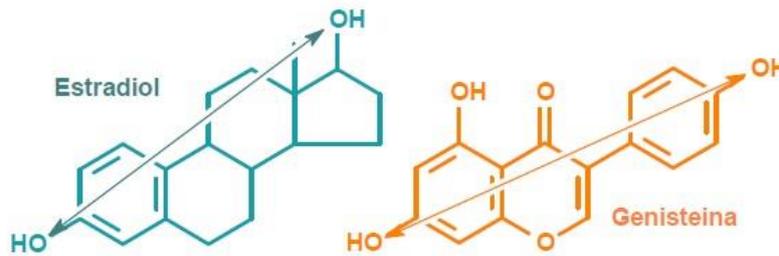


Figura 3. Estructura química de Gen y 17β-estradiol (Escribano Tórtola 2010)

1.2. METABOLISMO DE LOS FITOESTRÓGENOS

Las isoflavonas se ingieren principalmente en forma de glúcidos (Genistina y Daidzina). En el tracto intestinal se hidrolizan por la acción de la enzima UDP glucuronosiltransferasa (UGT) secretada por bacterias intestinales, dando lugar a las formas activas o agliconas (Gen y Daid). Gen y Daid también se pueden producir a partir de la desmetilación de sus precursores de origen vegetal, biocanina A y formononetina, respectivamente. Las agliconas son rápidamente absorbidas, conjugadas en el hígado con ácido glucurónico ó en sulfato. El destino de las agliconas puede variar. Parte de las agliconas conjugadas se excretan en la bilis, las agliconas no conjugadas se excretan en las heces, mientras que otras se reabsorben en el hígado a través de la circulación enterohepática. Algunas isoflavonas, como la Daid se metabolizan principalmente a equol, un metabolito muy activo que se excreta por la orina (Figura 4). La excreción de las isoflavonas se produce fundamentalmente por orina (formas conjugadas) y por heces (formas no conjugadas) (Duncan y col. 2003; Gencel y col. 2012).

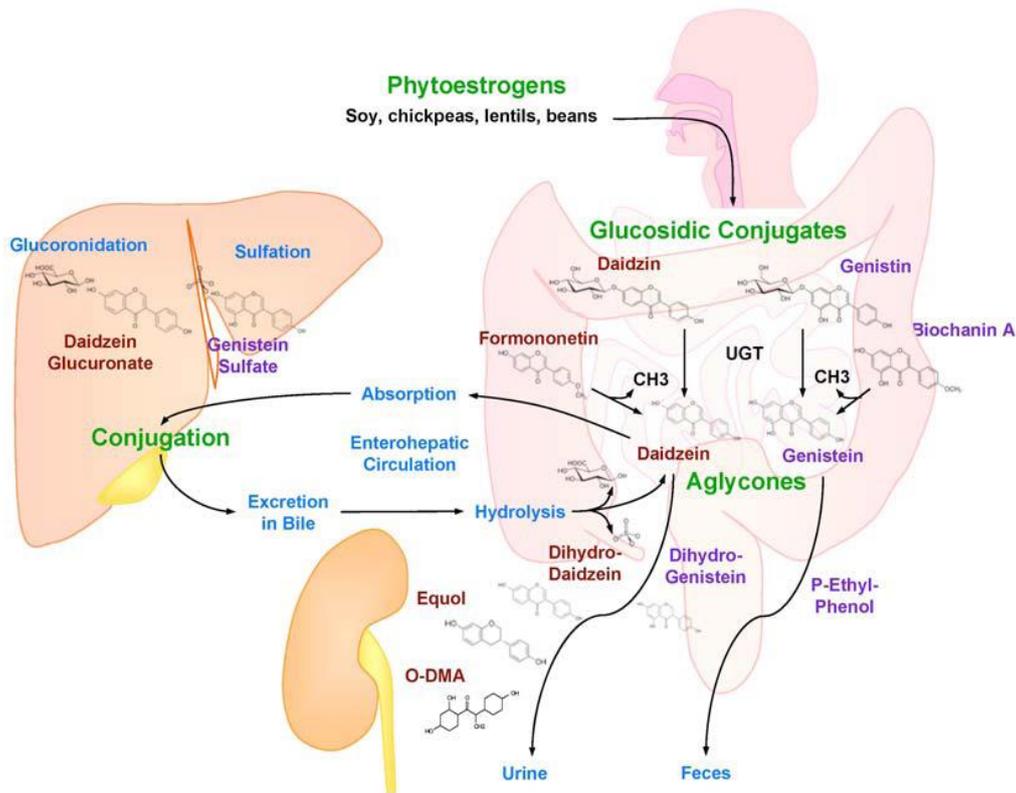


Figura 4. Metabolismo enterohepático de los fitoestrógenos (Gencel y col. 2012)

1.3. MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS FITOESTRÓGENOS

Debido a su similitud estructural con los estrógenos, los mecanismos de acción propuestos para los FE comprenden su unión a receptores estrogénicos (RE) y activación de vías genómicas y no genómicas (Gencel y col. 2012). Los tres principales tipos de RE son (Figura 5):

- receptores citosólicos nucleares $RE\alpha$ y $RE\beta$, los que luego de su unión al ligando se dirigen al núcleo y se unen al promotor de genes específicos para regular la transcripción génica. Estos dos tipos de receptores son productos de genes distintos ubicados en cromosomas diferentes (cromosomas 6 para $RE\alpha$ y cromosoma para 14 $RE\beta$);
- receptores estrogénicos de membrana acoplado a proteína G (GPR30) responsable de la activación de vías de señalización intracelular las que pueden generar respuestas celulares inmediatas, o contribuir a la regulación de la transcripción génica a través de la síntesis de segundos mensajeros que

favorecen la producción de correguladores de la expresión génica. El gen para GPR30 se encuentra en el cromosoma 7.

Se han reportado evidencias de acciones de los FE mediadas por estos 3 tipos de RE. Se propone que, luego de la unión a alguno de estos subtipos de RE, los FE actuarían como moduladores selectivos del receptor de estrógeno (SERM) más que como un estrógeno natural (**Brzezinski y col. 1999**). Esta particularidad de poder comportarse como un modulador pudiendo generar selectivamente respuestas agonistas o antagonistas estrogénicas, dependen de la distribución tisular de los diferentes tipos de RE, de la afinidad por dichos receptores, de la vías de señalización activadas que permiten reclutar diferentes tipos de coactivadores o correpresores de la regulación génica presentes en la célula (Figura 5).

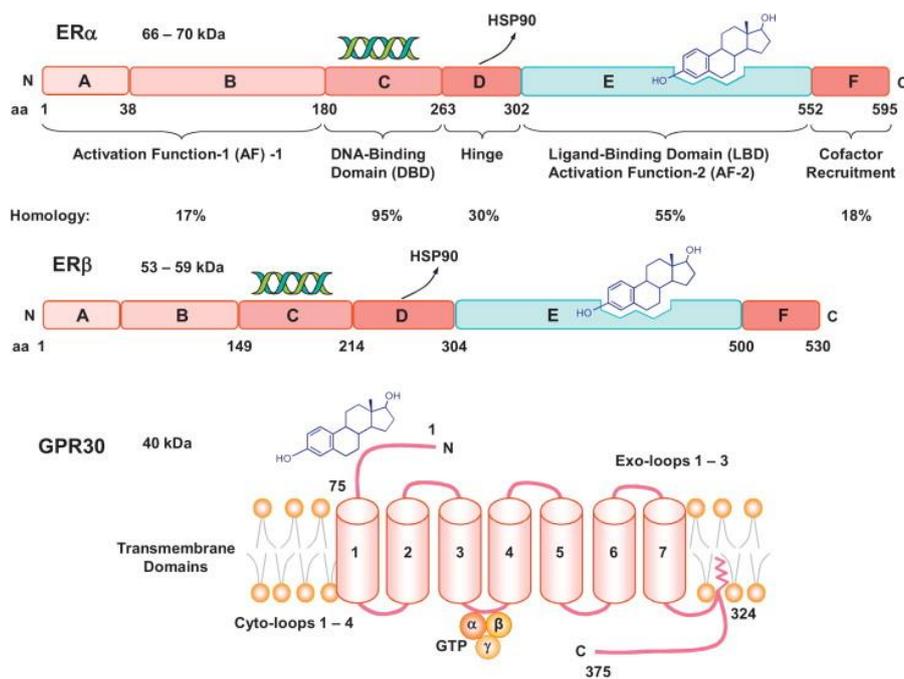


Figura 5. Tipos de receptores estrogénicos (Khalil 2013)

2. SISTEMA VASCULAR

2.1. ESTRUCTURA DE LOS VASOS SANGUINEOS

En la estructura de un vaso sanguíneo se reconocen tres capas o tunicas dispuestas en forma concéntrica (Figura 6):

(A) una túnica íntima (capa más interna) formada por células endoteliales (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 células musculares lisas vasculares (CMLV), fibras elásticas y de colágeno, y la lámina elástica externa. Esta última separa la túnica media de la adventicia. Representa la capa más voluminosa en las arterias y tiene menor espesor en las venas.

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

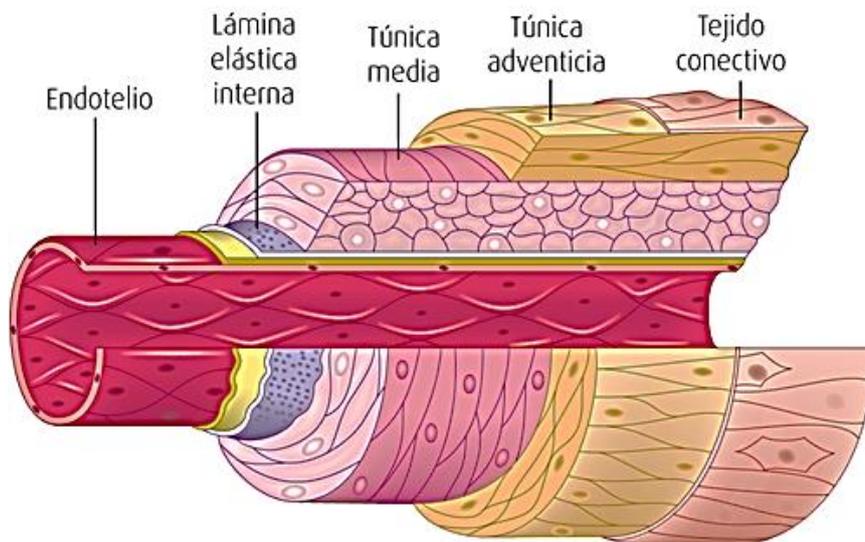


Figura 6. Representación esquemática de la estructura de las grandes arterias

Se diferencian: túnica interna, túnica media y túnica externa (Sepúlveda Saavedra, J. 2013).

2.2. ENDOTELIO

El endotelio es un componente celular y metabólico clave de la pared vascular que regula una gran variedad de eventos fisiológicos y respuestas biológicas. Es considerado un verdadero órgano de secreción endócrino (**Orshal y col. 2004**). Las células endoteliales (CE) regulan el transporte de moléculas entre el lumen y el espacio subendotelial a través de un proceso de permeabilidad selectiva que aporta nutrientes y elimina desechos metabólicos (**Bachetti y col. 2000**). A su vez controlan la hemostasia a través de la síntesis de factores de la coagulación y la regulación de la activación y la agregación plaquetaria (AP); funcionan como un órgano inmunocompetente presentando antígenos a linfocitos T; regulan el tono vascular a través de la síntesis de sustancias vasoactivas (óxido nítrico/NO, prostagandina/PG, endotelina, angiotensina), secreta factores de crecimiento que participan en la neovascularización y en el control del crecimiento de las células musculares lisas vasculares (CMLV), poseen actividad fagocítica selectiva, sintetizan fibronectina, laminina, colágeno, elastina y otros componentes del subendotelio.

2.3. CÉLULAS MUSCULARES LISAS VASCULARES

El otro tipo celular de crucial importancia del sistema arterial son las CMLV ya que son las responsables de mantener el tono vascular. Son células uninucleadas que poseen propiedades de distensibilidad, 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.

2.4. ATEROSCLEROSIS

La aterosclerosis (ATC) es una enfermedad multifactorial que se produce a nivel de la íntima arterial, caracterizada por la formación de placas ateromatosas (ateroma) las que son responsables del engrosamiento de la pared arterial, estrechamiento de la luz vascular y oclusión del vaso afectado. La enfermedad vascular aterosclerótica 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 (**Ross 1999; Witztum 1994**), y la “hipótesis inflamatoria” que considera a la ATC como un proceso inflamatorio crónico en el cual el estrés oxidativo representa un estímulo temprano para la formación de la placa (**de Boer y col. 2000**). La fase temprana de generación de la lesión ateromatosa se caracteriza por una alteración de la permeabilidad selectiva endotelial, seguida de reducción de la biodisponibilidad de NO y aumento de la expresión de moléculas de adhesión celular (CAMs) por el endotelio activado, lo cual origina el reclutamiento de leucocitos sobre la pared vascular y su internalización en la túnica íntima del vaso afectado (**Manduteanu y col. 2012**). La respuesta inicial al daño vascular es la adhesión de plaquetas al endotelio las que liberan citoquinas que promueven la quimiotaxis de monocitos (**Steinhubl y col. 2005**). El reclutamiento de leucocitos sobre la pared vascular comprende múltiples etapas (**Galkina y col. 2009**): inicialmente ocurre una interacción primaria débil y “rodamiento” de los leucocitos sobre la superficie endotelial, luego tiene lugar una adhesión celular más firme y finalmente se produce la transendotelización de los leucocitos hacia el espacio subendotelial (**Ley y col. 2007**). Las proteínas endoteliales P-selectina y E-selectina son responsables de la etapa inicial de adhesión monocítica, mientras que moléculas de adhesión intercelular 1 (ICAM-1) y de adhesión vascular 1 (VCAM-1) intervienen en la adhesión firme y la transendotelización. Los leucocitos que migraron se activan 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 del ateroma. Las citoquinas inflamatorias inducen la migración de CMLV desde la túnica media hacia la íntima. El ambiente proinflamatorio de las lesiones más tempranas crea un efecto de retroalimentación positiva, reclutando más leucocitos desde la circulación y tejidos adyacentes, estimulando una mayor migración, proliferación y cambio de fenotipo de las CMLV, con disminución de sus propiedades contráctiles e inducción de actividad sintética. Se ha propuesto que en la placa ateromatosa el tejido vascular es más susceptible a la apoptosis (**Kockx y col. 2000**). Cuando la lesión progresa se desarrolla una capa fibrosa formada por CMLV y

matriz, que recubren el núcleo necrótico de la placa constituido por leucocitos, lípidos y detritus celular. Los macrófagos activados ocasionalmente pueden liberar enzimas hidrolíticas que degradan la matriz originando hemorragias de la microvasculatura desarrollada dentro de la lesión (Figura 7).

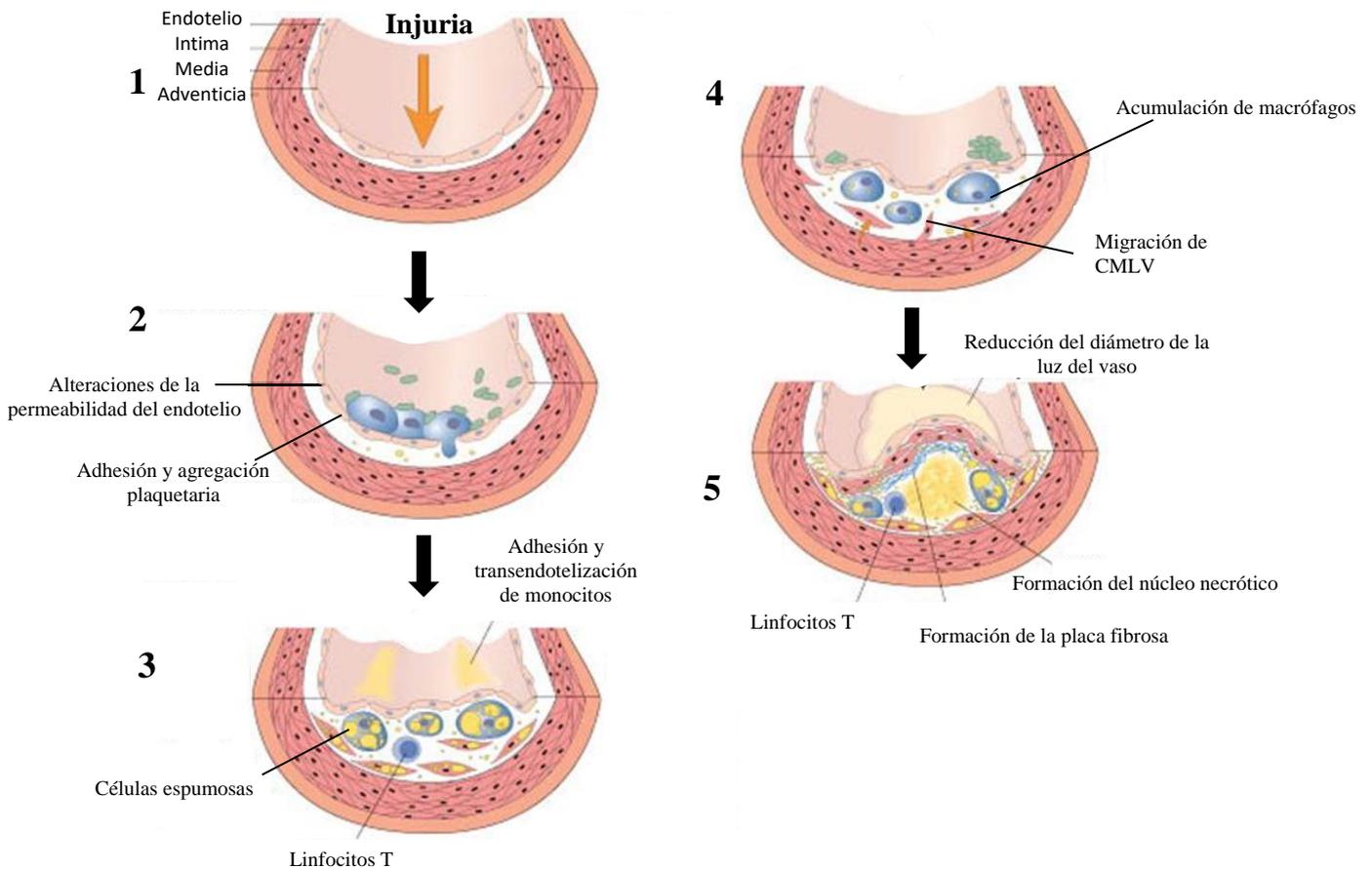


Figura 7. Proceso de formación de la placa aterosclerótica

Modificada de Salamat MS. y col., 2010 (Salamat 2010)

2.5. CALCIFICACIÓN VASCULAR ATROSCLERÓTICA

En las etapas más avanzadas de la lesión vascular la placa aterosclerótica se calcifica. Inicialmente se creía que la calcificación vascular era un proceso de depósito fisicoquímico de calcio en las arterias. Actualmente se sabe que son procesos celulares

activos, bioquímicamente regulados, que se asemejan a los que median la remodelación ósea (Leopold 2014). El tipo de células responsables de la mineralización de la pared vascular es motivo de debate. Existe controversia acerca de que estirpe celular (Mo, CE o CMLV) es más relevante en la calcificación de la placa ateromatosa (Leszczynska y col. 2018). Se propone que las CMLV tienen un rol crucial (Pal y col. 2011). Exhiben transdiferenciación osteogénica, con disminución de la elasticidad, y aumento de migración y secreción de proteínas de matriz ósea. Estas proteínas tienen la capacidad de unirse al calcio y formar hidroxapatita, generando áreas de depósito de calcio. En paralelo, las CE activadas por la injuria sintetizan proteínas morfogénicas óseas (BMPs) que aceleran la transdiferenciación de CMLV y aumentan la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS). El mecanismo de calcificación vascular es regulado por inductores y por inhibidores. Entre los inductores se pueden mencionar (Chistiakov y col. 2015): a) los oxilípidos y las ROS que impactan sobre la CMLV estimulando la expresión factores transcripcionales de diferenciación osteoblástica, como Runx2 que inician la transformación osteogénica de las células musculares, b) Runx2 y las ROS provocan aumento de síntesis endotelial de BMP-2, c) BMP-2 y BMP-4 en las CMLV estimulan la síntesis de proteínas de biomineralización como Pit-1, colágeno tipo I, la enzima de fosfatasa alcalina no específica de tejido (TNAP), las que se incorporan a vesículas que al ser liberadas al espacio extracelular producen su calcificación por formación de nódulos con alto contenido de cristales de hidroxapatita. Se considera que la expresión de TNAP indica transformación irreversible de CMLV a linaje óseo (Boström y col. 2011) d) la aceleración de la apoptosis de CMLV sinergiza el proceso liberando calcio y fósforo que favorece el depósito local de fosfato de calcio. Por su parte los inhibidores de la calcificación incluyen: a) la biodisponibilidad de NO que contribuye a mantener reducida la producción de ROS, y que por activación de la vía GC/GMPc inhibe la desdiferenciación de CMLV a OB inducida por TGF- β ; b) proteína de matriz Gla, actúa localmente neutralizando a BMP2/4 en CMLV y antagonizando la mineralización; c) Osteopontina (OPN), fosfoproteína que inhibe la mineralización in vitro de CMLV; d) fetuina A, glicoproteína hepática captada por las CMLV desde la circulación que inhibe la

formación de núcleos de fosfato de calcio dentro de la matriz y previene la muerte celular.

Por consiguiente, los procesos de apoptosis, adhesión celular, diferenciación, proliferación, migración celular y transdiferenciación a linaje óseo, juegan un rol clave en la enfermedad vascular (Figura 8).

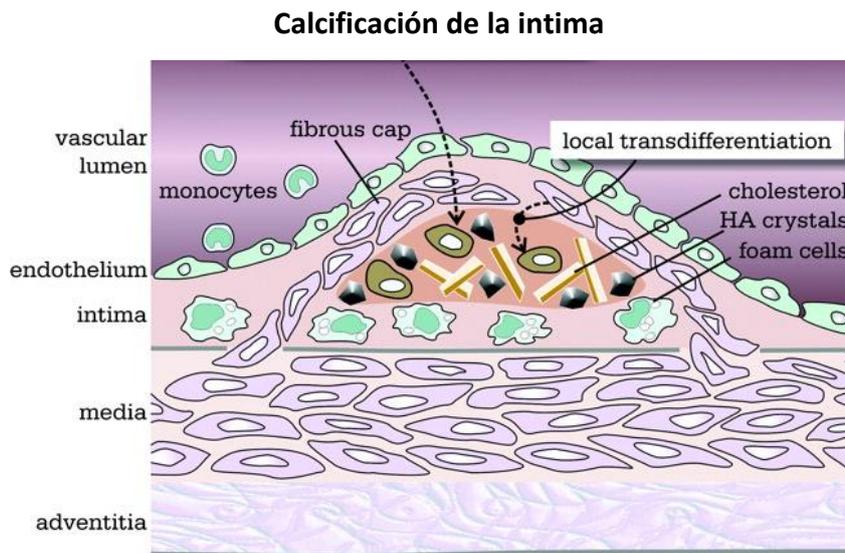


Figura 8. Calcificación de la placa aterosclerótica

2.6. ESTRÓGENOS Y ENFERMEDAD VASCULAR

Si bien la patología vascular es multifactorial en la cual convergen acciones de numerosos agonistas, uno de los reguladores más exhaustivamente investigados es el 17β -estradiol (E_2). Un gran cúmulo de información proveniente de estudios *in vitro* demuestran un efecto protector del estradiol sobre la homeostasis vascular inhibiendo el desarrollo de la lesión aterosclerótica (**Mendelsohn y col. 2005**). Los efectos más relevantes descritos son: estimulación de la producción de vasoactivos y mantenimiento del tono vascular, inhibición de la adhesión y agregación plaquetaria y de la transendotelización monocítica, inhibición del stress oxidativo e inflamatorio, disminución de la migración de CMLV y de su cambio fenotípico. A nivel sistémico el E_2 es un importante regulador del perfil lipídico y de la hemostasia contribuyendo a

mantener un estado antitrombótico. La Figura 9 muestra un resumen de los efectos beneficiosos del E₂ reportados en la literatura internacional, favoreciendo un perfil antiterogénico y antitrombótico.

No obstante, a pesar de estos avances científicos en el conocimiento del mecanismo de acción vascular de los estrógenos, estos efectos beneficiosos no han podido ser reflejados *in vivo* a través de la terapia de sustitución hormonal, en mujeres postmenopausicas.

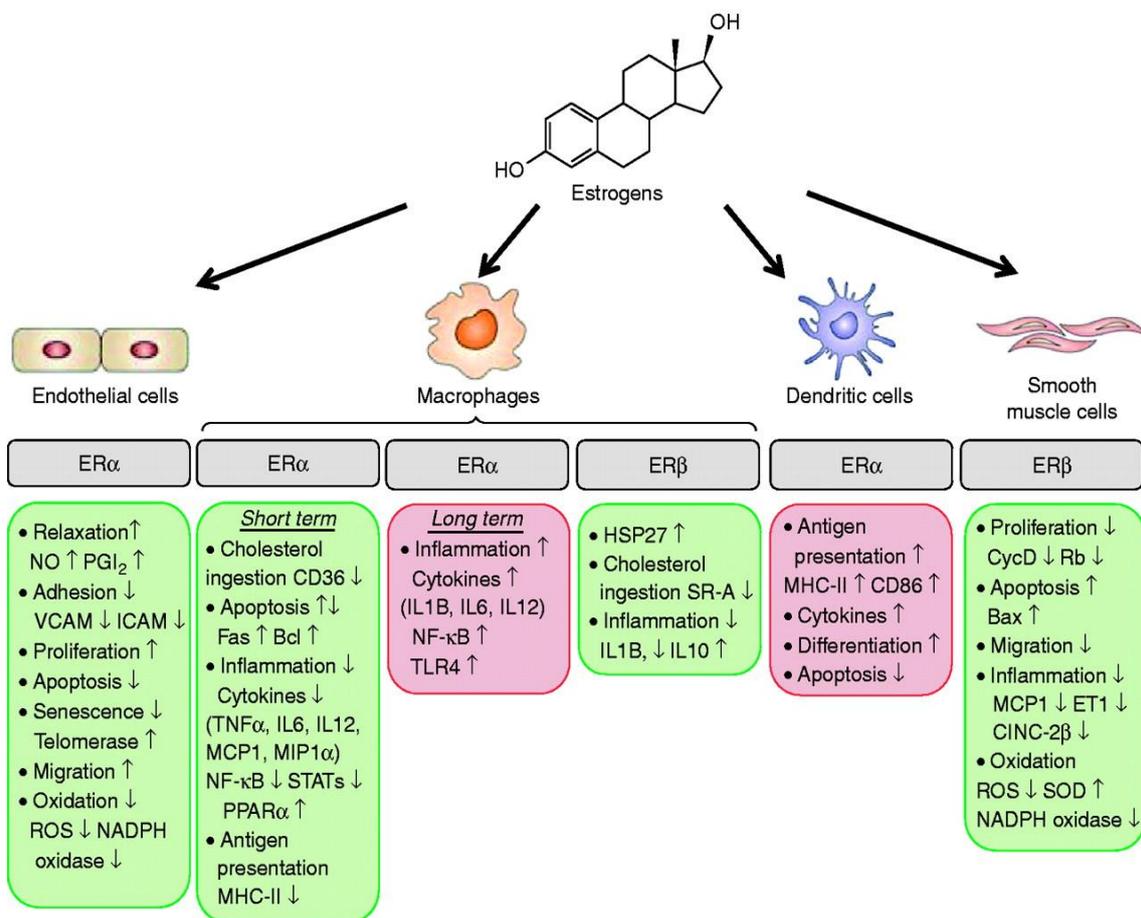


Figura 9. Rol de los estrógenos en la homeostasis vascular (Nofer 2012)

3. SISTEMA ÓSEO

El tejido óseo es un tejido conectivo especializado y mineralizado que junto con el cartílago forma el sistema esquelético. Tiene cuatro funciones fundamentales: a) mecánica, como soporte para la inserción muscular, b) protectora de los órganos y la médula ósea, c) metabólica, como reserva de calcio y fósforo, necesario para mantener la homeostasis fosfocálcica esencial del organismo y d) endócrino **(Florencio-Silva y col. 2015)**. Anatómicamente se distinguen dos tipos de hueso, planos y largos, mientras que morfológicamente, se pueden distinguir el hueso esponjoso o trabecular, y compacto o cortical.

El hueso cortical tiene una estructura de láminas o anillos concéntricos alrededor de canales centrales llamados canales de Havers, que se extienden longitudinalmente **(Marks Jr y col. 1988)**. Los canales de Havers están conectados entre sí por otros canales llamados canales de Volkmann que perforan del periostio. Ambos canales son utilizados por los vasos sanguíneos, linfáticos y nervios para extenderse a lo largo del hueso. Entre las láminas concéntricas de matriz mineralizada existen pequeños orificios o lagunas donde se encuentran los osteocitos, verdaderos cerebros del metabolismo óseo. Estas células intercambian nutrientes con el líquido intersticial a través de una serie de canalículos por donde se extienden prolongaciones celulares citoplasmáticas. Los canalículos están conectados entre sí y, eventualmente a los canales de Havers. El conjunto formado por el canal de Havers, las láminas concéntricas que lo rodean, las lagunas, los canalículos y los osteocitos recibe el nombre de osteona o sistema de Havers. Las restantes láminas entre osteonas se llaman láminas intersticiales. A diferencia del hueso compacto, el hueso trabecular o esponjoso no contiene osteonas, sino que las láminas intersticiales están dispuestas de forma irregular formando unos tabiques o placas llamadas trabéculas. Estos tabiques forman una estructura esponjosa dejando huecos que están llenos de médula ósea. Dentro de las trabéculas están los osteocitos que yacen en sus lagunas con canalículos que irradian desde las mismas. En este caso, los vasos penetran directamente en el hueso esponjoso y permiten el intercambio de nutrientes con los osteocitos **(Klein-Nulend y col. 2003)**. Las diferencias entre ambos tipos de hueso son tanto estructurales como funcionales ya que, mientras el cortical posee funciones mecánicas

y protectoras, el trabecular tiene funciones fundamentalmente metabólicas (Figura 10). En el hueso coexisten varios tipos de células: los osteoblastos son células encargadas de la formación del tejido óseo; los osteocitos son osteoblastos maduros rodeados de matriz mineralizada y los osteoclastos son células encargadas de la resorción ósea (Hadjidakis y col. 2006b).

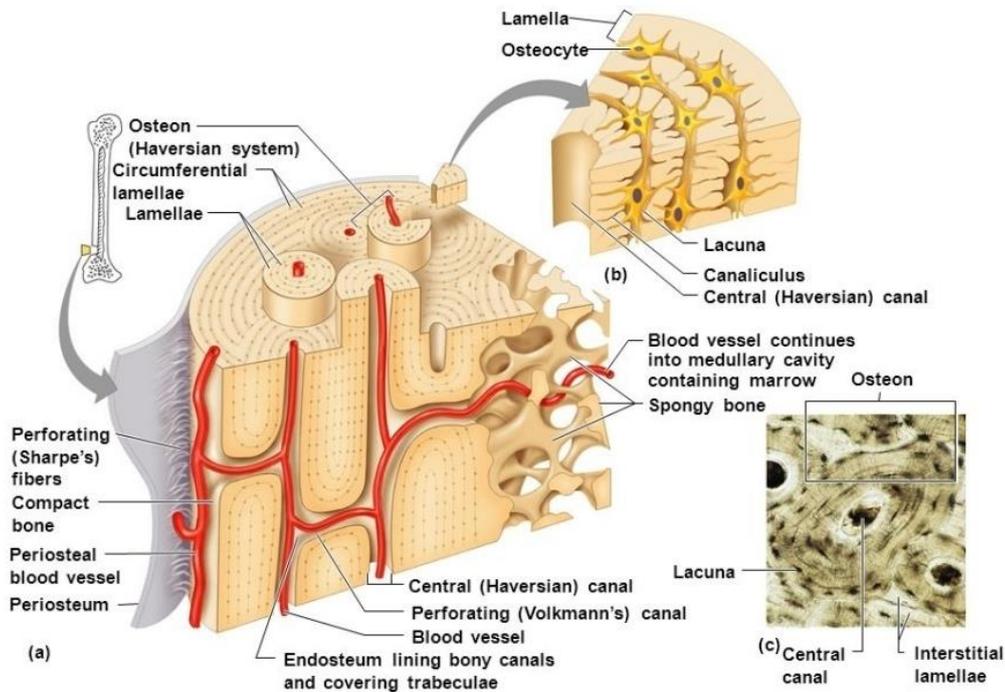


Figura 10. Estructura del hueso largo: hueso cortical y hueso trabecular (Hoehn y col. 2007)

3.1. OSTEOLASTO

Los osteoblastos (OB) son células formadoras óseas que se originan a partir de células madre mesenquimales multipotenciales de la médula ósea (CMM) (Mendez-Ferrer y col. 2010). Las funciones básicas de los osteoblastos son:

- 1) sintetizar proteínas colágenas y no colágenas de la matriz orgánica del hueso
- 2) dirigir la disposición de las fibrillas de la matriz extracelular
- 3) contribuir a la mineralización de la sustancia osteoide, a través de la producción de la fosfatasa alcalina, enzima que hidroliza el pirofosfato aumentando la concentración local de fosfato necesario para la formación de hidroxapatita y consecuente mineralización de la matriz

4) regular la resorción llevada a cabo por los osteoclastos a través de la síntesis de citoquinas específicas

5) sintetizar factores de crecimiento

Las CMM tienen potencial para diferenciarse a OB, condrocito, mioblasto, adipoblasto y fibroblasto (**Kolf y col. 2007**). La diferenciación hacia cada linaje está controlada por señales que regulan la expresión de factores de transcripción linaje específico. Se entiende por osteoblastogénesis al proceso a través del cual un progenitor mesenquimal diferencia hacia un OB maduro. El destino final de los OB puede ser: a) transformarse en osteocitos, b) mantenerse como células de revestimiento o c) ser eliminados por apoptosis.

La osteoblastogénesis comienza con la estimulación de los progenitores que proliferan y se diferencian a preOB. Las CAMs, los factores de crecimiento, las señales mecánicas, las citoquinas como los hedgehogs (Hhs), el factor de crecimiento transformante β (TGF- β), el péptido relacionado a la parathormona (PTHrp), la vía Wnts (Wingless proteins) y las BMPs son algunos de los reguladores de la diferenciación osteoblástica. Particularmente BMP-2 y la señal Wnt juegan un papel importante durante la diferenciación de progenitores tempranos. BMP-2 activa la vía Smad por la fosforilación de Smad1/5/8 que se traslada al núcleo y regula la transcripción de genes específicos, tal como Runx2 (**Zouani y col. 2013**). La señal Wnt conduce a la diferenciación de progenitores hacia linaje óseo por la liberación de β -catenina que se dirige al núcleo donde inicia la transcripción de genes de la matriz, como colágeno tipo I y OPN.

Por su parte Runx2 regula la expresión de las principales proteínas de la matriz ósea (FAL, OC, OP, colágeno tipo I, entre otros) durante esta etapa temprana de la diferenciación de osteoblastos, pero no es esencial para mantener esta expresión genética en osteoblastos maduros (**Komori 2010**). También modula en la expresión de otros factores de transcripción, como osterix (Osx), esencial para la transformación de CMM a preosteoblastos (preOB).

Las BMP y Runx2 tienen un rol crucial en la diferenciación osteoblástica ya que sus acciones determinan que las CMM diferencien a linaje óseo.

En los estadios subsiguientes de la diferenciación los preOB expresan receptores para PTH, Vitamina D, glucocorticoides y RE, que dirigen la regulación endócrina de la osteoblastogénesis. La PTH y el PTHrp ejercen efectos tanto anabólicos como catabólicos sobre el hueso.

Los estrógenos, tanto en la mujer como en el hombre, ejercen una función esencial sobre el hueso, desde la infancia hasta la senectud. Los perfiles de expresión de los receptores de estrógenos, RE α y RE β , varían durante las etapas de diferenciación y maduración del OB. Los niveles de ER α aumentan durante la maduración, luego declinan en la etapa de mineralización. Mientras que la expresión del RE β es relativamente constante y está presente tanto en osteoblastos como en osteocitos (Wiren y col. 2002). La Figura 11 muestra una representación esquemática de la osteoblastogénesis.

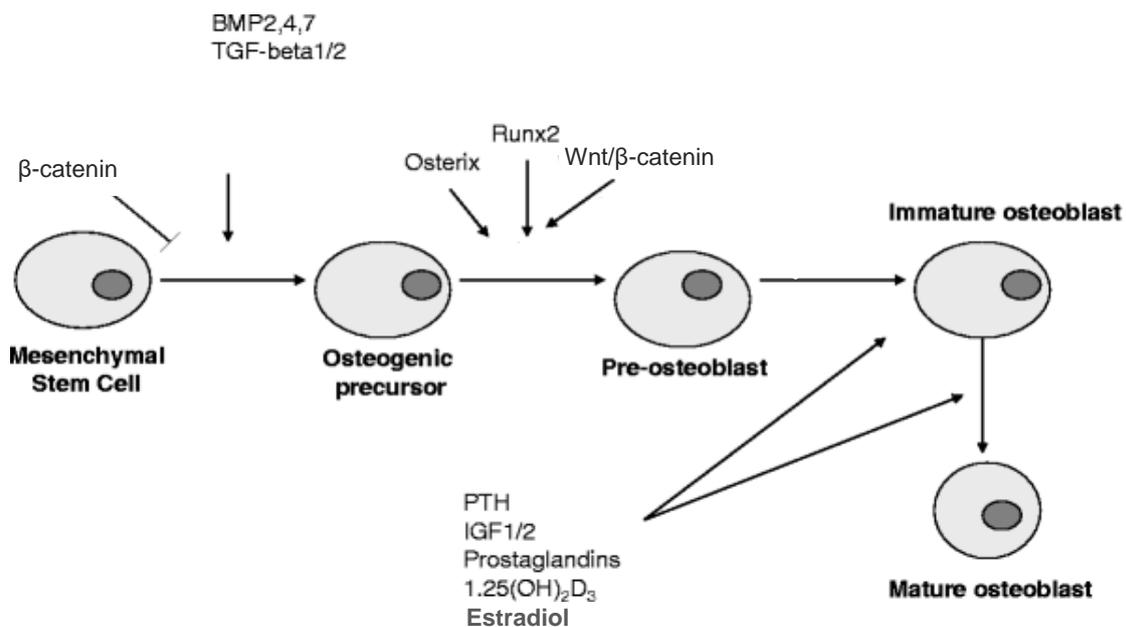


Figura 11. Esquema de la diferenciación de pre-osteoblasto a osteoblasto maduro

Modificada de Dalle Carbonare y col., 2012 (Dalle Carbonare y col. 2012)

3.2. OSTEOCITO

Una vez mineralizada la matriz, algunos osteoblastos quedan atrapados en su interior, transformándose en osteocitos, última etapa de la diferenciación osteoblástica. Los osteocitos son las células más abundantes del hueso dispersos de manera regular a lo largo de la matriz mineralizada. Su cuerpo se sitúa en el interior de lagunas y poseen forma estrellada, con proyecciones citoplasmáticas que se comunican entre sí a través de canalículos llenos de fluido óseo extracelular. De esta forma, los osteocitos se organizan formando un conjunto de células interconectadas que representa una estructura única, con la ventaja de poseer una gran superficie de contacto en el interior y hacia la superficie ósea para asegurarse oxígeno y nutrientes. En respuesta a estímulos mecánicos y hormonales coordinan la función de OB y OC. Los osteocitos juegan un rol fundamental en el control del recambio óseo, controlando tanto la resorción como la formación ósea. Algunas de las acciones reportadas muestran que **(Shah y col. 2017)**: a) forman una red laguno-canalicular de células sensoras que les permite responder a fuerzas mecánicas e iniciar el remodelado, b) regulan la homeostasis del fósforo por la expresión de FGF-23, PDM-1, c) regula el proceso de remodelado a través de la síntesis y liberación hacia el “canopy” de osteoprotegerina (OPG), factor estimulante de las colonias de macrófagos (M-CSF), el ligando del factor activador de receptor nuclear NFkB (RANKL), esclerotina (esta última regula negativamente la formación ósea por ser una proteína inhibitoria de la vía Wnt), d) participan en la activación osteoclástica en los lugares de fractura.

3.3. OSTEOCLASTO

La osteoclastogénesis es el proceso mediante el cual las células madre hematopoyéticas (precursoras de macrófagos y monocitos) se diferencian a osteoclastos (OC). Actualmente se sabe que los osteoblastos (OB) son fundamentales para la generación de osteoclastos (Figura 12). El M-CSF producido por los OB es requerido en las primeras fases de la osteoclastogénesis para la formación de células gigantes multinucleadas a partir de sus progenitores hematopoyéticos **(Boyle y col. 2003)**. Los preOC son células con un solo núcleo que pasan al microambiente óseo por diapédesis, adhiriéndose a las CE que tapizan los capilares. El segundo factor clave

necesario para la diferenciación y supervivencia osteoclástica es el RANKL, sintetizado por OB y osteocitos. Los OB no solo regulan la osteoblastogénesis mediante factores solubles, sino también a través de interacciones célula-célula mediada por CAMs.

Durante la osteoclastogénesis los precursores hematopoyéticos bajo estímulo de M-CSF y RANKL atraviesan diferentes estadios de diferenciación hasta generar un OC. **(Tanaka y col. 2005)**. La osteoprotegerina (OPG) expresada por los OB actúa como un regulador negativo de la osteoclastogénesis, neutralizando al RANKL e impidiendo su unión a su receptor celular RANK en la membrana de los OC. Los OC maduros se diferencian por ser células grandes (100 µm), multinucleadas, ricas en mitocondrias y vacuolas que tienen dos especializaciones en la membrana: un borde en cepillo donde tiene lugar la resorción, y una zona clara o zona de sellado que sirve de anclaje a la matriz. El OC diferenciado adquiere la capacidad de sintetizar enzimas lisosomales, catepsina, anhidrasa carbónica (responsable de generar gradientes de protones y pH ácido extracelular), fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP). La actividad de esta última enzima es aprovechada como marcador de osteoclasto diferenciado, tanto *in vivo* como *in vitro*.

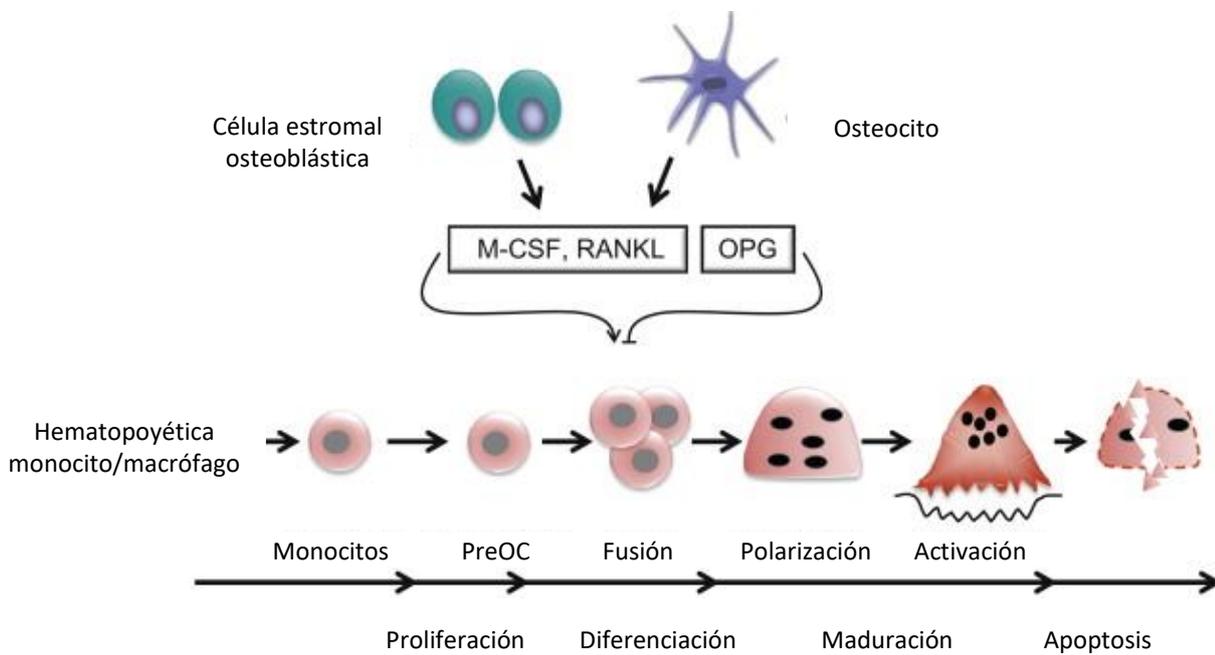


Figura 12. Esquema de diferenciación de Mo a OC maduros

Modificado de Bellido y col., 2014 **(Bellido y col. 2014)**

3.4. MATRIZ ÓSEA

La matriz extracelular ósea está compuesta en un 65% por mineral (hidroxiapatita) y en un 35% por material proteico (colágeno, osteocalcina, OPN y otras proteínas minoritarias). La hidroxiapatita está constituida por fosfato de calcio y componentes minerales minoritarios como Zn, Mg, K, Na. La matriz orgánica está formada fundamentalmente por colágeno tipo I. Las fibras de colágeno están inmersas en una sustancia fundamental amorfa formada por glicoproteínas y proteoglicanos. Las fibras de colágeno y la osteocalcina (Oc) son necesarias para la mineralización de la matriz, ya que unen cristales de hidroxiapatita. Las proteínas no colágenas minoritarias participan en la organización de la matriz extracelular coordinando la interacción célula-matriz y regulando el proceso de mineralización (**Young 2003**).

3.5. REMODELADO ÓSEO

La remodelación ósea es un proceso de autorenovación constante del hueso a través de un equilibrio dinámico entre formación y resorción. Permite el mantenimiento del volumen óseo, la reparación del daño tisular y la regulación del metabolismo fosfocálcico (**Rimbach y col. 2008**). Anualmente se renueva un 5% del hueso cortical y un 20 % del trabecular. El remodelado óseo existe toda la vida, pero sólo hasta la tercera década el balance es positivo. En la treintena luego de adquirido el pico de masa ósea, el remodelado óseo sufre solas pequeñas variaciones hasta los 50 años. A partir de aquí la masa ósea empieza a disminuir.

A nivel microscópico el remodelado óseo se produce en pequeñas áreas de la cortical o de la superficie trabecular, llamadas unidades de remodelado óseo (URO), donde osteoblastos, osteoclastos y células accesorias del estroma forman un paquete celular. La resorción siempre precede a la formación. En el esqueleto joven las cantidades de hueso resorbido son similares a las neoformadas. En condiciones normales es un proceso balanceado, acoplado tanto en el espacio como en el tiempo. En humanos la vida media de cada unidad de remodelado es de 4 a 6 meses y la mayor parte de este período está ocupado por la formación ósea. El esqueleto se renueva totalmente aproximadamente cada 10 años (**Hadjidakis y col. 2006a**).

3.5.1 Fases del remodelado

El remodelado óseo puede ser dividido en las siguientes fases (Figura 13):

A. Fase quiescente

El hueso está en condiciones de reposo.

B. Fase de activación

El osteocito al sentir las señales mecánicas y endócrinas inicia el remodelado óseo. La laguna que los contiene cambia de forma, este cambio se transmite por prolongaciones citoplasmáticas a la superficie, el primer fenómeno que tiene lugar es la retracción de los OB de revestimiento (formación de “canopy”) y la digestión de la membrana endocítica por la acción de las colagenasas. Al quedar expuesta la superficie mineralizada se produce la atracción de precursores osteoclastos los que luego de reclutados se transforman en OC maduros a través del proceso de osteoclastogénesis. El OC diferenciado se activa.

C. Fase de resorción

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

D. Fase de formación

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

E. Fase de mineralización

La etapa final de la remodelación corresponde al depósito de hidroxapatita. Finalizada la mineralización, el hueso viejo es reemplazado por hueso nuevo. Los OB mueren por apoptosis, o bien se transforman en osteocitos o en células de revestimiento.

Las etapas comprendidas entre la formación y mineralización completa son las más lentas de todo el proceso y comprenden aproximadamente 4 meses.

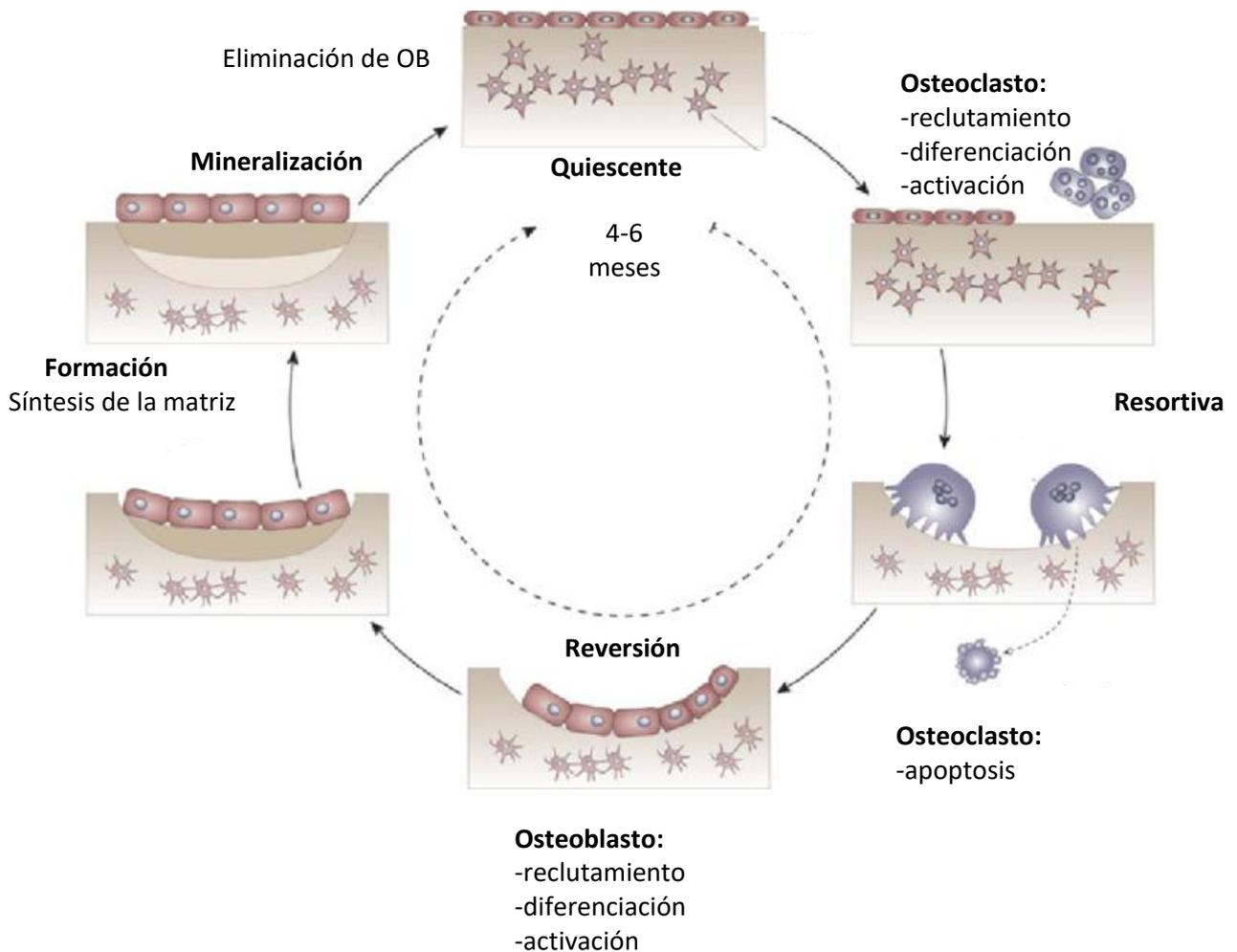


Figura 13. Ciclo de remodelado óseo

Modificado de Bonjour JP y col., 2014 (Angulo-Bejarano y col. 2014)

3.6. OSTEOPOROSIS

La osteoporosis es la enfermedad metabólica ósea más prevalente y uno de los principales problemas de salud pública mundial, debido a los enormes costos sociales y económicos que genera. Según datos de la Fundación Internacional de Osteoporosis (IOF) de América Latina, en Argentina, una de cada cuatro mujeres mayores de 50 años sufre osteoporosis. Más de 34 mil fracturas de cadera se producen cada año en la población mayor de 50 años. Se estima que para el 2025, 3.3 millones de mujeres sufrirán osteopenia, cifra que se elevaría a 5.24 millones para el 2050 (**Clark y col. 2013**). La osteoporosis se define como “una fragilidad del esqueleto caracterizada por una pérdida de masa ósea y deterioro de la microarquitectura, la que aumenta el riesgo de fracturas”. Es un proceso en sí mismo asintomático cuya trascendencia radica en la predisposición al desarrollo de fracturas. La pérdida de masa ósea afecta la calidad del hueso, y es el resultado de un desbalance entre formación y resorción ósea (**Manolagas y col. 2010**). La osteoporosis posmenopáusica se caracteriza por un aumento marcado de la resorción ósea (**Bagur y col. 2004**), cuya causa principal es el descenso de los niveles de estradiol circulante, y la consecuente pérdida del efecto protector óseo de los estrógenos. Las citoquinas (Interleukinas 1/6, factor estimulante de migración/M-SF) se hallan aumentadas estimulando la proliferación, diferenciación y activación de células precursoras de OC, que resulta un balance positivo hacia la resorción ósea (**Kassem y col. 2011**).

Los estrógenos son protectores óseos y conservan la masa ósea (**Eastell y col. 2016**) debido a:

- a) a nivel de OB promueven su diferenciación, aumentan su supervivencia por inhibición de la apoptosis, estimulan la síntesis de OPG y de colágeno estimulando la formación ósea
- b) sobre los OC inhiben la osteoclastogénesis y promueven la apoptosis osteoclastica.
- c) sobre osteocitos aumentan la sensibilidad a señales mecánicas y reducen la expresión y secreción de esclerotina y RANKL al “canopy”

La Figura 14 muestra una representación esquemática de la remodelación ósea en presencia o ausencia de estrógenos.

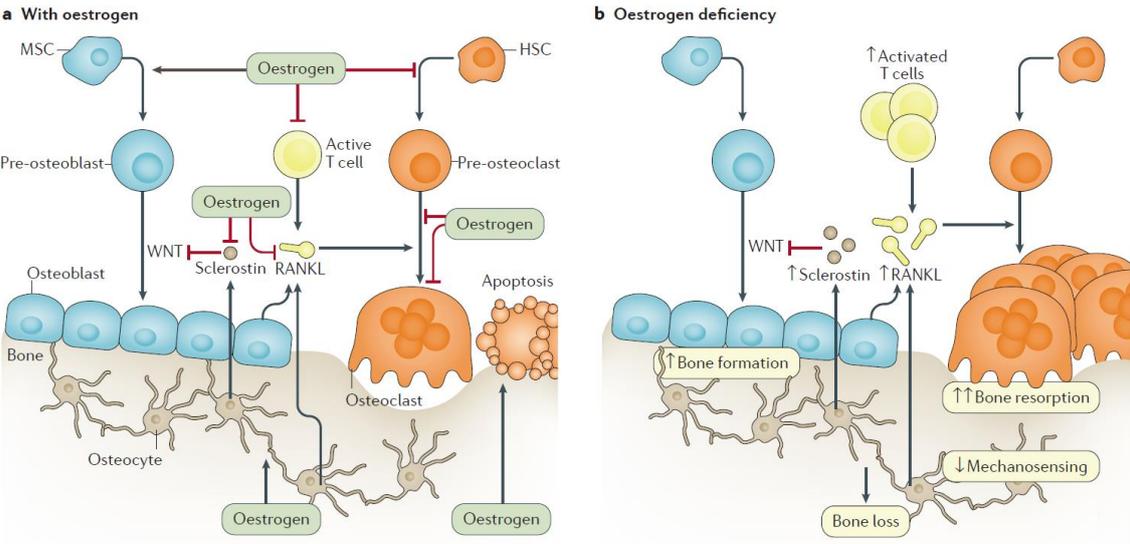


Figura 14. Rol de los estrógenos en la remodelación ósea (Eastell y col. 2016)

4. INTERACCIÓN ÓSEO-VASCULAR

Existe una estrecha vinculación entre el sistema vascular y el óseo, tanto en el desarrollo orgánico como en lo patológico. La fisiología vascular y la osteogénesis (formación y remodelación ósea) comparten una complejidad metabólica y funcional crítica, que ha sido poco explorado en forma conjunta (**Thompson y col. 2012**). Señales celulares, endocrinas y metabólicas fluyen bidireccionalmente para regular la homeostasis vascular y ósea. Un hueso nunca se formaría sin las interacciones vasculares. A su vez, el esqueleto constituye un órgano endócrino que provee hormonas y factores (FGF23; proteína de matriz de dentina/DMP1) que impactan en la salud vascular. Esto ha impulsado la concepción del Eje Óseo-Vascular (EOV) como nuevo área de investigación, con una visión de estudio integrador con la finalidad de identificar vínculos entre ambos sistemas. Las interacciones del EOV son cruciales en la reparación de fracturas, en la vascularización necesaria como aporte de progenitores para contrarrestar la pérdida de masa ósea, en las metástasis óseas, en las calcificaciones vasculares. Los huesos con alta vascularización son los más afectados por las alteraciones en el flujo sanguíneo producto de la estenosis de arterias principales. La perfusión ósea defectuosa conduce a osteonecrosis e incluso transformación tumoral. La estricta regulación de la neovascularización resulta crítica para la supervivencia del tejido (**Kanczler y col. 2008**).

5. MENOPAUSIA

5.1. ATEROSCLEROSIS Y OSTEOPOROSIS

La menopausia, es un período en el cual la probabilidad de contraer enfermedades óseas y cardiovasculares se incrementa notablemente, hecho que ha sido atribuido principalmente a la disminución de los estrógenos circulantes (**Orshal y col. 2004; Pinkerton y col. 1999**). En el mundo hay alrededor de 700 millones de mujeres con más de 50 años. La expectativa de vida de la mujer se ha prolongado y se proyecta que para el año 2030 habrá 1.200 millones de mujeres mayores de 50 años. Justamente, entre los 50 y 65 años de edad, la mujer atraviesa la etapa más crítica respecto a la prevalencia de factores de riesgo cardiovasculares y óseos. La enfermedad

cardiovascular (ECV) es la primera causa de muerte en la mujer en muchos países incluyendo la Argentina, superando al cáncer ginecológico, con una edad de aparición 10 años más tarde que en los hombres **(Orshal y col. 2004)**. El incremento en la expectativa de vida en la mujeres posmenopáusicas (MPM) nos obliga a comprender la fisiopatología y a buscar soluciones a la problemática relacionada con la presencia de ciertas enfermedades crónicas, tales como las cardiovasculares, la osteoporosis, la enfermedad de Alzheimer y el cáncer de mama y endometrio **(Zilberman 2018)**.

5.2. TERAPIA HORMONAL DE REEMPLAZO

La terapia hormonal de reemplazo (THR) en base a estrógenos ó combinada (estrógenos más progestágenos) surgió como alternativa para prevenir la patologías frecuentes en la postmenopausia **(Pinkerton y col. 1999)**. Si bien a nivel óseo ha sido eficaz para prevenir pérdida de masa ósea, a nivel vascular los resultados obtenidos de ensayos clínicos randomizados (PEPI; HOPE; WHI) son contradictorios **(Ouyang y col. 2006)**, y su utilidad clínica es controvertida. A manera de ejemplo cabe mencionar al estudio Women's Health Initiative (WHI) el que debió ser suspendido prematuramente debido al aumento de la incidencia de eventos cardiovasculares en un grupo de pacientes participantes del estudio tratadas con THR **(Hsia y col. 2006)**.

En consecuencia, la búsqueda de alternativas preventivas ó terapéuticas eficaces para minimizar los síntomas asociados al hipoestrogenismo postmenopáusico originó nuevas líneas de investigación orientadas al estudio de los moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERMs) naturales (fitoSERMs) ó sintéticos (S-SERMs) **(Cos y col. 2003; Reinli y col. 1996)**.

Los SERM constituyen compuestos sintéticos diseñados para interactuar con el receptor de estrógenos y reproducir selectivamente los efectos beneficiosos y/o antagonizar los efectos no deseables de los estrógenos. Entre los SERMs el raloxifeno y el bazedoxifeno son SERMs desarrollados específicamente para mantener los efectos beneficiosos del estradiol en hueso y en el perfil lipídico y comportarse como antagonista estrogénico en mama y endometrio. Su uso clínico ha sido aprobado para el tratamiento contra la osteoporosis **(Gómez de Tejada Romero y col. 2012)** siendo poco claros sus efectos vasculares.

Los fitoestrógenos (FE) o fitoSERMs son suplementos dietarios importantes por su valor nutritivo. Evidencias epidemiológicas muestran que tendrían una potencial acción beneficiosa en la prevención de enfermedades, de allí que se los incluye dentro de grupo nutracéuticos. El término nutracéutico (deriva de “nutrición” y “farmacéutico”) hace referencia a alimentos y/o compuestos químicos individuales, asociados con la prevención y/o tratamiento de enfermedades **(Kalra 2003)**.

Dependiendo del tejido, los FE pueden tener propiedades de agonistas estrogénicos pero también actuar como antagonistas parciales del RE **(Cederroth y col. 2009)**. Si bien, en países asiáticos donde es elevado el consumo de soja y sus derivados, existen evidencias de una menor incidencia de ECV y de ciertos tipos de cánceres los resultados no parecen ser concluyentes **(Gencel y col. 2012)**. Está descrito que los FE mejoran el perfil lipídico, inducen vasorelajación en forma dependiente de óxido nítrico y afectan la síntesis de citoquinas proinflamatorias vasculares **(Rimbach y col. 2008)**.

5.3. EL NUTRACÉUTICO GENISTEÍNA

La historia natural de los fitoestrógenos (FE) como remedios fitoterapéuticos es antigua. En 1931 Erwin Walz **(Nilsson 1962)** descubre una acción estrogénica en aquellos vegetales que contienen un elevado contenido de isoflavonas. Pero no será hasta 1946 cuando, asociado a sus efectos similares a los de los estrógenos, comiencen a valorarse estas sustancias denominadas fitoestrógenos. Ahora bien, el interés científico por el análisis y estudio de los fitoestrógenos tendrá su origen en 1982 con Axelson **(Axelson y col. 1982)** y en 1984 con Setchell **(Axelson y col. 1984)**, considerándoseles a ambos responsables de la identificación de las isoflavonas en orina de humanos. Resonantes estudios correlacionaron la dieta a base de derivados de soja con una menor incidencia de ECV **(Dixon y col. 2002; Morabito y col. 2002b)**.

A partir de allí el uso de los FE se volvió muy popular, particularmente a través de alimentos enriquecidos de acceso libre a la población. La comercialización y uso de los suplementos dietarios constituyen un problema, ya que por su categoría de suplementos las normativas vigentes no les exigen los principios básicos de calidad, seguridad y eficacia que deben cumplir los medicamentos para ser aprobados por los

entes reguladores (**Agosto 2004**). El auge de las terapias naturales y las dietas de moda, sumado a la invasión comercial de alimentos enriquecidos en fitoestrógenos, hace que la población esté expuesta al consumo de principios activos de los cuales no se conoce certeramente su acción biológica y/o posibles efectos no deseados. Es por eso que las investigaciones científicas sobre los riesgos/beneficios del consumo de estos derivados vegetales resultan indispensables para clarificar estos aspectos.

A partir del descubrimiento de los FE en la década de los años 80 y hasta la actualidad, las investigaciones sobre estos compuestos orientadas a profundizar sobre sus potencialidades clínicas y terapéuticas (Figura 15) han aumentado notoriamente (**Usui 2006**), en paralelo al auge en el uso de alternativas terapéuticas naturales que buscan mejorar la calidad de vida de la población de mujeres posmenopáusicas (**Poluzzi y col. 2014**).

Existen ventajas económicas y estratégicas que se deben tener en cuenta al evaluar la potencial explotación de nutracéuticos derivados de la soja, como la Gen, en países como el nuestro donde el carácter de país sojero, nos posiciona en el segundo productor en el mundo de esta leguminosa (**Manzanal 2017**).

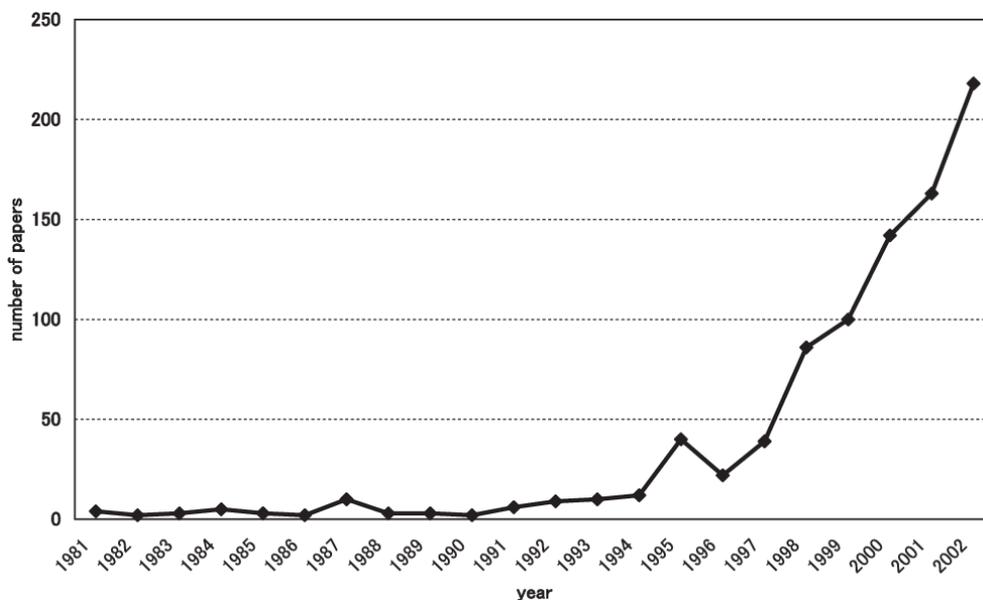


Figura 15. Número de publicaciones científicas sobre los fitoestrógenos desde 1981-2002 (Usui 2006)

5.4. ACCIÓN CARDIOVASCULAR Y ÓSEA DE GENISTEÍNA

Los resultados de los estudios epidemiológicos han sugerido que la ingesta de isoflavonas y/o flavonoides puede contribuir a una baja incidencia de enfermedades cardiovasculares en mujeres japonesas (**Sakaki y col. 2019; Yamori y col. 2001**). En particular respecto a Gen, durante los últimos 15 años estudios extensivos se han centrado en gran medida en dilucidar el efecto de Gen en los perfiles lipídicos porque la hiperlipidemia contribuye a aterosclerosis (**Vitolins y col. 2001**). Sin embargo, los resultados muestran que el efecto de Gen sobre las lipoproteínas de baja densidad y triglicéridos, es esencialmente neutro (**Simons y col. 2000; Zhan y col. 2005**), sugiriendo que el efecto antiaterogénico de la Gen no se debe a un cambio en los lípidos plasmáticos. La evidencia emergente indica que la Gen ejerce efectos antiinflamatorios multifacéticos en la vasculatura, sugiriendo que podría prevenir la aterosclerosis al suprimir inflamación vascular (**Asmis y col. 2006; Liu y col. 2005; Marotta y col. 2006**). En estudios experimentales la suplementación de Gen redujo significativamente la aterosclerosis en varios modelos animales (**García-Martínez y col. 2003; Lee y col. 2004**). Sin embargo, los mecanismos potenciales de acción de la Gen sobre los eventos celulares o moleculares de la aterosclerosis aún no están claros.

Estudios previos de nuestro laboratorio (**Polini y col. 2007; Sandoval y col. 2010**) reportaron que Gen regula los procesos que participan en el inicio de la lesión ateromatosa, con un perfil de respuesta favorable para la homeostasis vascular. En tejido aórtico la Gen, en forma no genómica, estimula la producción de vasoactivos (NO, prostaciclina) e inhibe la activación y agregación plaquetaria al endotelio vascular. En condiciones de inflamación previene la adhesión de monocitos.

Los datos de ensayos clínicos aleatorizados, doble ciego sugieren que la suplementación con Gen (54 mg/día) en la dieta puede ser tan efectiva como la THR para atenuar la pérdida ósea relacionada con la menopausia. **Morabito y col. (Morabito y col. 2002a)** realizaron un estudio aleatorizado, doble ciego y controlado con placebo, para evaluar y comparar la THR con el efecto del fitoestrógeno Gen sobre el metabolismo óseo y la densidad mineral ósea (DMO) en mujeres posmenopáusicas, entre 47 y 57 años de edad. Las mujeres recibieron al azar THR continua durante 1 año, Gen o placebo. Este estudio confirmó los efectos positivos de la Gen aumentando la

DMO en fémur y columna. Resultados similares se encontraron en tratamientos más cortos, en base a una dieta rica en soja o sus derivados (**Albertazzi 2002**). Li y col. reportaron que en ratas OVX los estudios de histomorfometría mostraban que la administración de Gen reduce la pérdida de hueso tanto trabecular como compacto (**Fanti y col. 1998; Li y col. 2003**).

Sin embargo los estudios de ensayos clínicos randomizados son aun contradictorios, mientras algunos describen una acción beneficiosa a nivel vascular y óseo, otros no logran demostrar estos efectos.

Como mencionamos anteriormente la osteoporosis y la aterosclerosis son enfermedades que coexisten en la menopausia, y que presentan activación defectuosa de los procesos de remodelación lo que conlleva a una pérdida de la arquitectura natural de ambos tejidos. La existencia de posibles mecanismos fisiopatológicos comunes presupone la posibilidad de nuevas estrategias terapéuticas. El avance en el conocimiento del EOVS ha incentivado la búsqueda de terapias alternativas con potencial acción dual. Específicamente, agentes terapéuticos eficaces a nivel óseo podrían poseer utilidad clínica a nivel vascular y viceversa. Son escasos los trabajos que estudien el efecto de Gen con una visión integradora sobre los procesos bioquímicos y celulares que median la interacción a nivel del eje óseo-vascular.

OBJETIVO GENERAL E HIPOTESIS DE TRABAJO

Teniendo en cuenta que existe una estrecha vinculación entre el sistema vascular y óseo; que las calcificaciones vasculares y la osteoporosis son situaciones clínicas prevalentes en mujeres postmenopáusicas; la existencia de posibles mecanismos fisiopatológicos compartidos; el **objetivo general** de este trabajo de tesis fue investigar el rol de estrógenos de origen vegetal (fitoestrógenos) en la transformación ósea del lecho vascular (calcificaciones vasculares); en la remodelación ósea y en la interacción óseo-vascular.

Nuestra hipótesis de trabajo plantea que los fitoestrógenos son compuestos activos a nivel vascular y óseo. Exhiben potencialidad antiaterogénica inhibiendo desde etapas tempranas de la lesión ateromatosa los procesos celulares y moleculares conducentes a la calcificación vascular. Poseen impacto positivo a nivel óseo promoviendo la diferenciación y activación de las células implicadas en la remodelación ósea. Sus acciones involucran la interrelación entre ambos sistemas.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Se seleccionó el fitoestrógeno Genisteína y como diseño experimental ensayos *in vitro* y *ex vivo*. Se plantearon los siguientes objetivos específicos.

- I. Para contrastar la hipótesis que plantea que son activos sobre la calcificación vascular:**
 - a)** empleando células vasculares en cultivo investigar el efecto de tratamientos *in vitro* con Gen sobre:
 - los mediadores que inhiben o promueven el progreso de la lesión y la posterior calcificación vascular
 - la transdiferenciación de células musculares lisas vasculares a linaje osteogénico
 - b)** en ensayos *ex vivo* evaluar el efecto del tratamiento con Gen sobre la calcificación vascular en tejido aórtico intacto

II. Para contrastar la hipótesis que son activos a nivel óseo:

- a) empleando cultivos primarios de preosteoblastos tratados *in vitro* con Gen, estudiar el efecto sobre los procesos celulares y moleculares involucrados en la osteoblastogénesis
- b) empleando cocultivos de monocito-osteoblastos estudiar el efecto del tratamiento *in vitro* en la diferenciación osteoclástica.

III. Para investigar las interacciones ósea-vasculares, empleando medios condicionados provenientes de células vasculares u óseas tratados *in vitro* con Gen, estudiar el efecto sobre el crecimiento, la migración celular y la neovascularización

ANIMALES

Se emplearon ratas Wistar hembras de las siguientes edades:

- a) neonatas (1-5 días de edad) para la obtención de cultivo primario de preosteoblastos (preOB)
- b) jóvenes (3-5 semanas) para la obtención de cultivo primario de células endoteliales (CE) y células musculares lisas vasculares (CMLV).
- c) sexualmente maduras (4 a 6 meses), seniles (24 meses) y ovariectomizadas (OVX)

La selección de las edades de los animales de los grupos a y b se fundamenta en que son las que permiten obtener un máximo rendimiento en cantidad y calidad de células, para cada estirpe celular, según la experiencia previa de nuestro laboratorio.

Las ratas OVX, son ratas sexualmente maduras a las que se les remueve quirúrgicamente ambos ovarios. Las ratas OVX se utilizan dos meses post cirugía. En estudios previos, mediante colpocitología, hemos demostrado que este tiempo es suficiente para inducir hipoprogesteronismo (**Massheimer y col. 2002**).

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

SISTEMAS EXPERIMENTALES

A. SISTEMA EXPERIMENTAL I: anillos de aorta

A.1. Obtención de anillos de aorta

Los ratas (4-6 meses), OVX o seniles se sacrifican por dislocación cervical, se remueve la aorta torácica y se coloca de inmediato en solución fisiológica estéril (**Andersen y col. 1999**). Se elimina el tejido conectivo y adiposo adyacente, y se corta en pequeños segmentos en forma de anillo (1-3 mm de longitud). Con la finalidad de preservar la viabilidad del tejido, se realiza todo el procedimiento hasta el momento del ensayo a 4°C.

A.2. Tratamiento *in vitro*

Los anillos (AA) se colocan en 1 mL de medio de incubación, buffer D, cuya composición se detalla en la tabla 1. Se preincuban durante 30 min en baño termostático (Vicking, modelo Dubnoff) a 37°C, con agitación continua. Se inicia el tratamiento con el agregado de la isoflavona por los intervalos de tiempo correspondientes a cada ensayo experimental. Paralelamente se procesa siempre un grupo control, que recibe solamente el vehículo en el cual se solubiliza Genisteína (Gen).

La solución de Gen se prepara por disolución inicial en dimetilsulfóxido (DMSO) (solución stock, 10^{-2} M) y posteriores diluciones en PBS (solución de trabajo). La concentración final de DMSO en los ensayos fue siempre inferior al 0.01%. Las soluciones de Gen empleadas en todo los ensayos fueron siempre preparadas en el día del experimento minutos antes de comenzar el tratamiento.

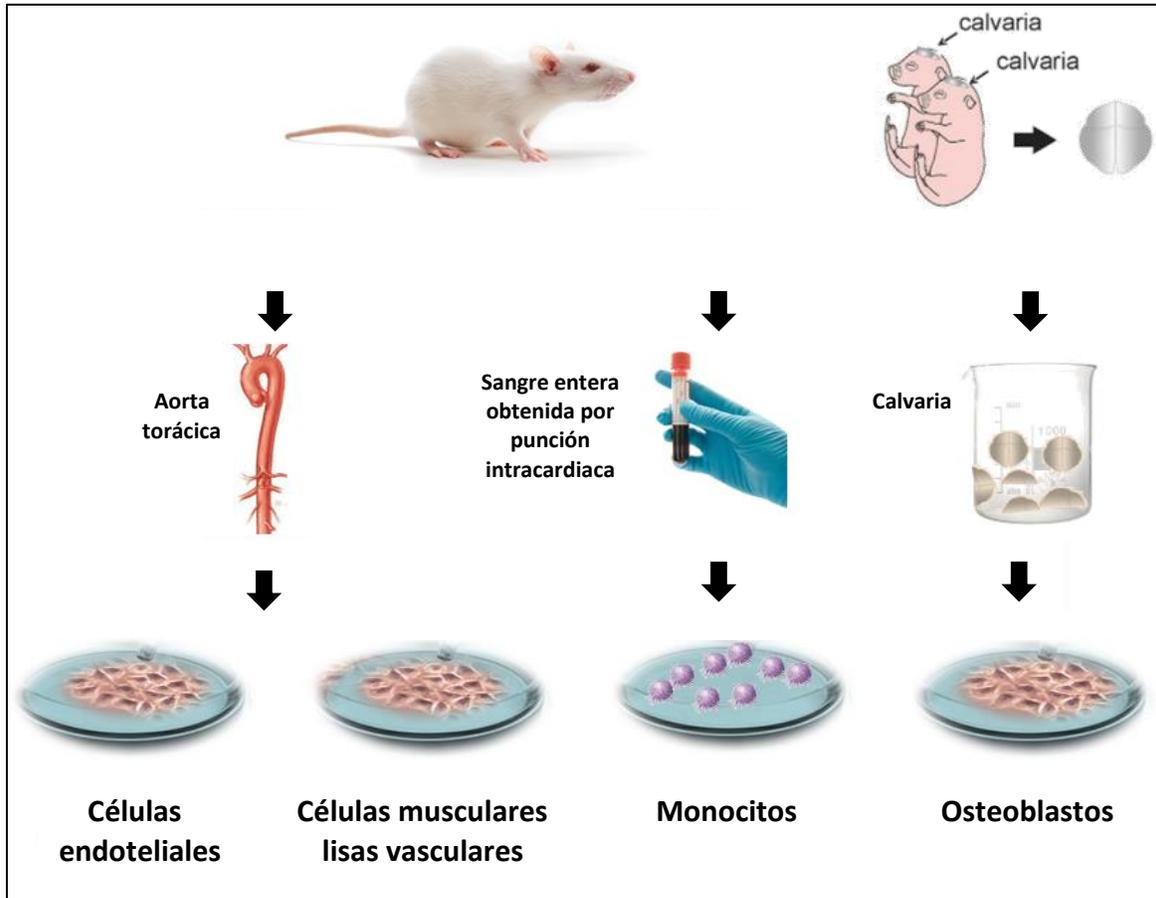
En los ensayos en los que se utilizaron inhibidores o antagonistas, estos se agregaron al medio de incubación 1 hora antes de comenzar el tratamiento con Gen.

	Buffer D
	Concentración final (mM)
NaCl	145
Hepes	10
Glucosa	10
KCl	5
MgSO₄	1
CaCl₂	1.2
pH final	7.4

Tabla 1. Composición del buffer D

B. SISTEMA EXPERIMENTAL II: cultivos celulares

Las CE, CMLV, pre-OB y monocitos (Mo) de rata fueron aisladas de diferentes tejidos de origen como se visualiza en el Esquema 1.



Esquema 1: Tejidos a partir del cual se aislan CE, CMLV, Mo y preOB

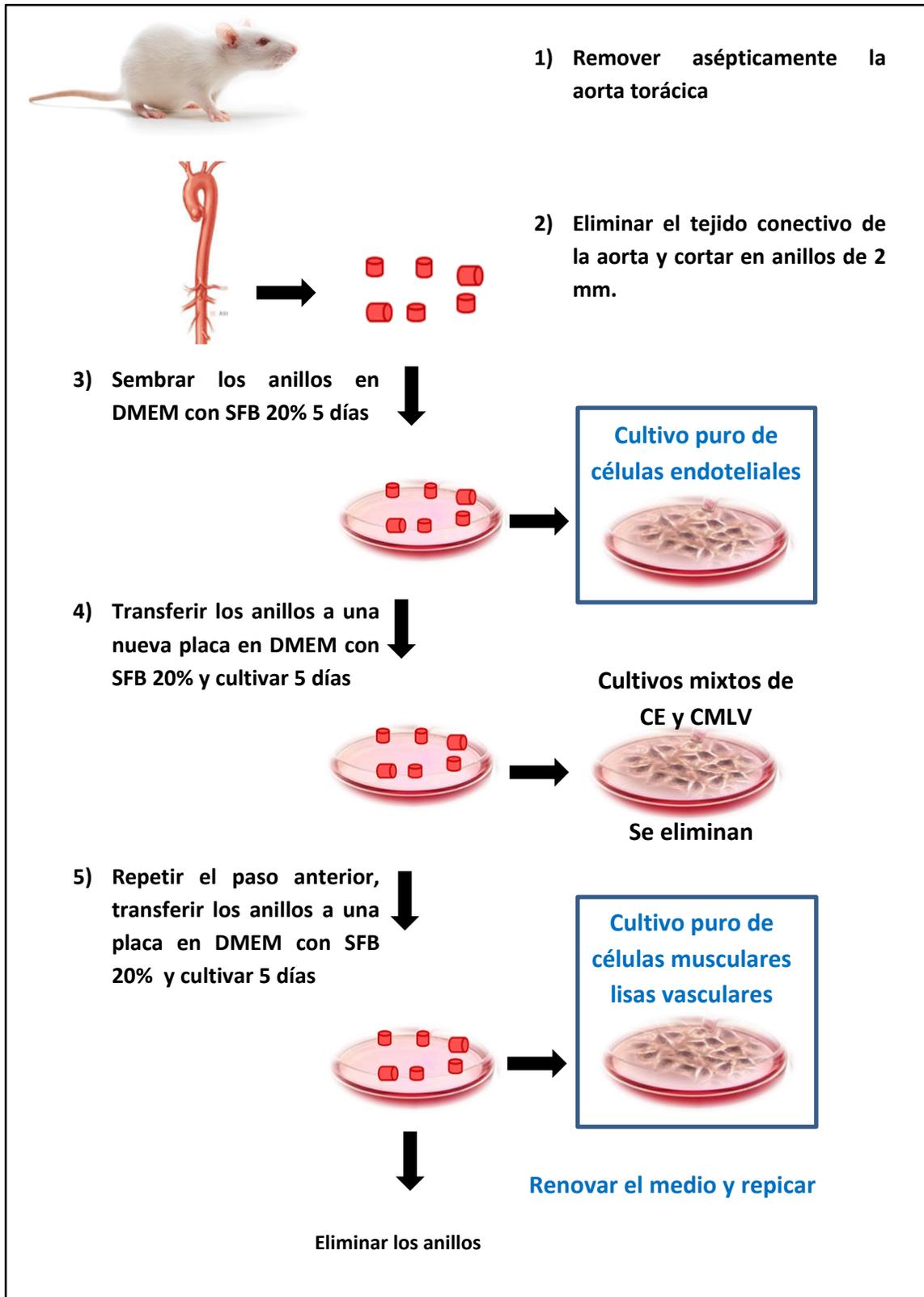
B.1. Cultivos primarios de CE y de CMLV

Se obtienen cultivos primarios de CE y CMLV mediante la técnica de explante a partir de AA aislados de ratas Wistar jóvenes de acuerdo a lo descrito en trabajos previos de nuestro laboratorio (**Cutini y col. 2012**). Para este procedimiento, el quirófano del Bioterio (BByF–UNS) se esteriliza previamente durante 12 horas por irradiación UV. Los animales se sacrifican por dislocación cervical, se les remueve asépticamente la aorta torácica y se las sumerge en PBS (frío y estéril) para su traslado al laboratorio de cultivo celular. A partir de este momento, el procesamiento se continúa en el gabinete de seguridad biológica (Telstar Bio-II-A) ubicado en el Laboratorio de Cultivo Celular (BByF–UNS). Se elimina el tejido conectivo y adiposo adherente, y la aorta se corta en pequeños segmentos en forma de anillo de 2 mm de longitud. Los mismos se siembran en placas de Petri (NUNC)

conteniendo DMEM sin rojo fenol suplementado con 20% de SFB, 2 mM de L-glutamina y 1.7 g/L de bicarbonato de sodio y antimicrobianos (60 µg/mL de penicilina, 10 µg/mL de estreptomycin y 2.5 µg/mL de anfotericina-B). Los anillos se incuban a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ en un incubador metabólico (Revco Habitat, Asheville, USA) con control automático de temperatura y CO₂. Durante los primeros cinco días de cultivo se liberan las CE. Finalizado este periodo los anillos se transfieren a una segunda placa con DMEM fresco suplementado con 10 % de SFB y antimicrobianos para ser incubados por otros cinco días. En esta etapa se obtiene un cultivo mixto de CE y CMLV por lo que se descarta. Los anillos se transfieren nuevamente a una tercera placa en la que se los incuba durante otros cinco días, obteniendo de este modo un cultivo puro de CMLV. A los 15 días de iniciado el procedimiento los anillos finalmente se descartan (Esquema 2).

Tanto a los cultivos de CE como de CMLV se les reemplaza el medio cada 72 horas hasta alcanzar un crecimiento confluyente (aproximadamente a la semana). Los cultivos se repican previa tripsinización controlada de 2 minutos a 37 °C (solución tripsina-EDTA 0.05 mg/L-0.02 g/L) con posterior resiembra en una nueva placa con DMEM fresco suplementado con 10 % de SFB y antimicrobianos. Se usaron cultivos de CE y de CMLV de pasaje 2 a 5 para todos los experimentos.

La pureza de los cultivos de ambos tipos celulares (CE y CMLV) se estableció, tal como fue descrito en trabajos previos de nuestro laboratorio, de la siguiente manera: a) la morfología que adoptan las células en cultivo, en el caso de las CE, se observa la morfología característica de “empedrado” con grandes núcleos y formas redondeadas en cultivos confluentes, mientras que las CMLV poseen forma cilíndrica y alargada con extremos ahusados; (b) a través de inmunohistoquímica se estudió la presencia del factor von Willebrand (FvW), del receptor del factor de crecimiento vascular 2 (VEGFR2) y el marcador CD34 en CE (**Cutini y col. 2014**) y la ausencia del FvW y la presencia de alfa actina en CMLV (sistema Dako Cytomation En Vision), y c) por la capacidad de las CE de sintetizar NO (**Bachetti y col. 2000**).

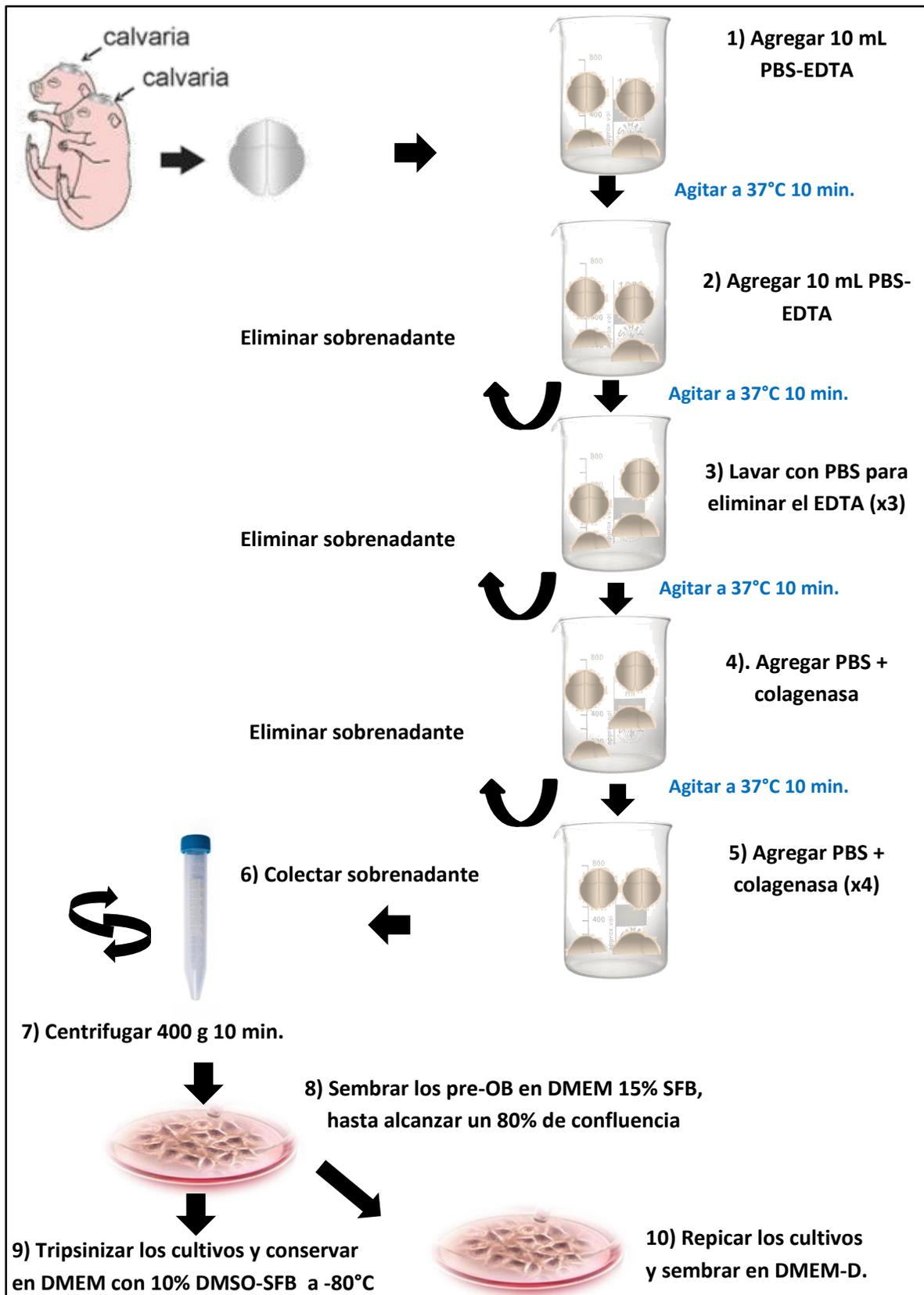


Esquema 2. Representación esquemática del procedimiento para la obtención de cultivos primarios de CE y CMLV

B.2. Cultivo de preOB

Los pre-OB se aíslan a partir de calvaria de ratas neonatas según lo descrito por D'Elia y *col.* (D'Elia y *col.* 2013). Se elimina el tejido conectivo de los huesos del cráneo y se los incuba con 4 mM PBS/EDTA a 37°C durante 10 min (dos períodos). El sobrenadante de estas incubaciones se descarta. Las calvarias se lavan en PBS (tres veces) y se someten a digestión en PBS con 200 UI/mL de colagenasa durante 15 min (cinco períodos). Las células liberadas durante la primera digestión se descartan, se colectan las liberadas durante las subsiguientes, se centrifugan (10 min a 400 g) y se resuspenden en DMEM. Se cultivan a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂ en DMEM suplementado con SFB al 15% y antimicrobianos (60 µg/mL de penicilina, 10 µg/mL de estreptomycin). Después de 24 horas de cultivo, el medio se reemplaza por DMEM fresco conteniendo SFB al 10% y se las cultiva hasta alcanzar el 80% de confluencia (Esquema 3). Los preOB se tripsinizan y se congelan en DMEM con 10% DMSO-SFB.

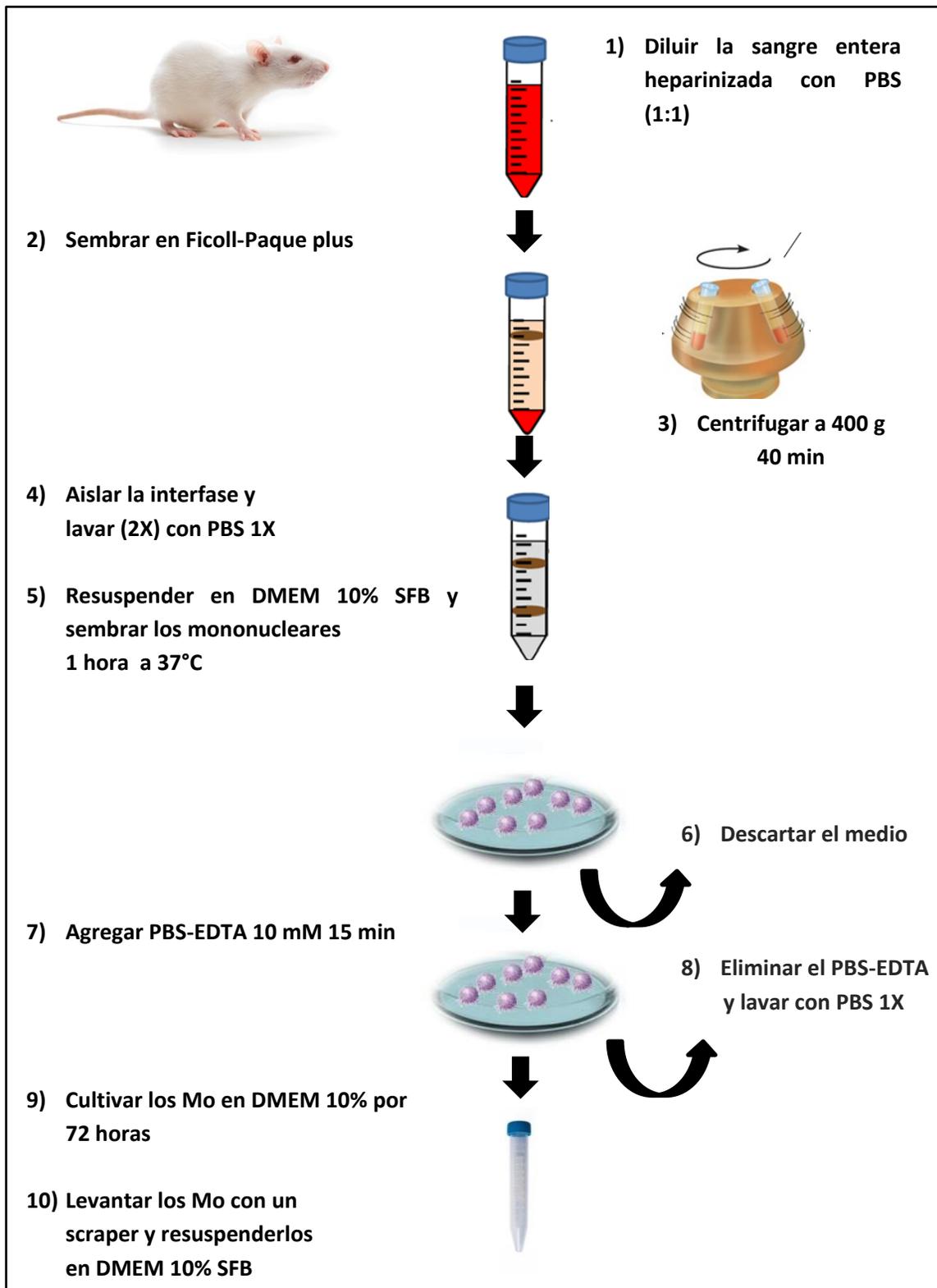
Para inducir diferenciación es necesario repicar las células y el medio se suplementa con 0.05 g/L de ácido ascórbico y 10 mM de β-glicerolfosfato (DMEM-D) con SFB al 1%.



Esquema 3. Representación esquemática del procedimiento para la obtención de cultivos primario de pre-OB a partir de calvaria de rata mediante digestión enzimática

B.3. Cultivo de Mo

Las células mononucleares se aíslan por gradiente de densidad (Ficoll-Paque Plus) a partir de sangre entera obtenida por punción intracardiaca de ratas adultas (4-6 meses). La sangre entera heparinizada se diluye con PBS (1:1), se siembra cuidadosamente sobre el Ficoll-Paque Plus y se centrifuga a 400 g 40 min. Se colecta inmediatamente la interfase que contiene células mononucleares, se lava con PBS 1X y se centrifuga 10 min a 100 g (2 veces). Se verifica la viabilidad por la técnica de exclusión Azul de Tripán. Los Mo se aíslan por la capacidad de adherirse al plástico. Las células mononucleares se resuspenden en DMEM-SFB al 10% y se colocan en placas de Petri (2×10^6 células/mL) durante 1 hora a 37°C para permitir la adhesión de los Mo. Se elimina el sobrenadante y las células adheridas se incuban durante 15 minutos en PBS-EDTA 10 mM, para eliminar las células adheridas inespecíficamente. Se elimina el PBS-EDTA y se lavan las placas con PBS 1X. Los Mo se cultivan en DMEM conteniendo 10% de SFB, 60 mg/mL de penicilina y 100 mg/mL de estreptomina durante 72 horas. Al momento del ensayo los Mo se levantan con la ayuda de un scraper, se suspenden en DMEM con 10% SFB (Esquema 4) y se cuenta el número absoluto de Mo usando un contador automatizado.



Esquema 4. Aislamiento de Mo a partir de sangre entera

B.4. Cocultivo de Mo-OB

Se siembran OB en placas de 96 pocillos con una densidad de 1000 células/0.1 mL de DMEM, suplementado con SFB al 10% (v/v) y antibióticos. Después de 2 días, cuando las células alcanzan el 50% de confluencia, se añaden a cada pocillo 500 Mo/0.1 mL en DMEM con 10% SFB (v/v). El progreso de los cocultivos se monitorea por microscopía óptica empleando un microscopio invertido con contraste de fase (Nikon TS100).

B.5. Inducción a transdiferenciación de CMLV

La inducción a transdiferenciación osteogénica de las CMLV se realiza de acuerdo a lo descrito por Kanno y *col.* (**Kanno y *col.* 2008**). Las células se siembran en placas de 24 pocillos y se cultivan durante 27 días en DMEM suplementado con β -glicerofosfato 10 mM y CaCl_2 4 mM (medio osteogénico: DMEM/ β GP+Ca). El medio osteogénico se reemplaza por medio fresco cada 3 días.

B.6. Tratamientos *in vitro* de los cultivos celulares

Las monocapas de células (CE, CMLV, OB y Mo) se incuban en los respectivos medios de cultivo hasta alcanzar el 60-90% de confluencia. Para los tratamientos el medio de cultivos se reemplaza por medio fresco que contiene 1% SFB. El tratamiento se inicia por el agregado de Gen por los intervalos de tiempo correspondientes a cada ensayo experimental. En todos los ensayos se procesa siempre un grupo control, que recibe solamente el vehículo. En los casos en que se requiere sincronizar las células, las mismas se privan de suero durante 24 horas, reemplazando luego con DMEM fresco suplementado con 1% de SFB, medio en el cual se realizan los tratamientos correspondientes con la isoflavona.

En los ensayos en los cuales se emplean inhibidores y antagonistas, estos se agregan al medio de cultivo 1 hora antes de comenzar el tratamiento con Gen.

Las soluciones de Gen empleadas en todos los ensayos se preparan siempre el día del experimento, minutos antes de comenzar el tratamiento.

B.7. Viabilidad celular: tinción con Azul de Tripán

Para determinar la viabilidad celular, las CE, CMLV, Mo o OB se lavan con PBS 1X, se tripsinizan y se resuspenden en DMEM 10% SFB para evitar la proteólisis. El método de exclusión del colorante Azul Tripán se fundamenta en que solamente aquellas células muertas (no viables) van a incorporar el colorante (**Harold y col. 1992**). Se colecta 100 μ L de la suspensión de células y se mezcla con 100 μ L de una solución 0.4% (m/v) del colorante. Se realiza el recuento en cámara de Neubauer de las células que incorporaron el colorante. Finalmente se determina la cantidad de células viables presentes en la suspensión llevando a cabo el siguiente cálculo:

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

B.8. Ensayos con medios condicionados

B.8.i. Obtención de medio condicionado de CE

Los cultivos de CE a 90 % de confluencia se lavan dos veces con PBS y se incuban con vehículo o Gen en DMEM con SFB al 1% (v/v), durante 30 min a 37°C. Se colecta el medio de incubación el cual se adiciona al cultivo de OB para los ensayos correspondientes. En la sección resultados (capítulo 3) se utilizan las siguientes siglas:

MCCE: medio condicionado proveniente de CE control

MCCE-Gen: medio condicionado de CE tratadas con Gen

B.8.ii. Obtención de medio condicionado de OB

Cultivos de OB con un 90 % de confluencia se lavan dos veces con PBS y se exponen a Gen o vehículo durante 24 horas a 37°C en DMEM con SFB al 1% (v/v). Se colecta el medio de incubación y se adiciona al cultivo de CE para los ensayos correspondientes. En la sección resultados (capítulo 3) se utilizan las siguientes siglas:

MCOB: medio condicionado proveniente de OB control

MCOB-Gen: medio condicionado de OB tratados con Gen

C. SISTEMA EXPERIMENTAL III: ensayos *ex vivo*

C.1. Aislamiento de aortas

Los animales (3-5 semanas) se sacrifican por dislocación cervical, se remueve la aorta torácica, se elimina el tejido conectivo e inmediatamente se coloca en solución fisiológica a 4°C con la finalidad de preservar la viabilidad del tejido. Las aortas enteras (Ao) se usaron dentro de las dos horas posteriores a su aislamiento.

C.2. Tratamiento

Se realiza un tratamiento continuo durante 14 días de incubación de los explantes en DMEM con 10% SFB. La Gen se agrega a las concentraciones requeridas para cada ensayo en cada cambio de medio (cada tres días). En todos los ensayos se procesa siempre un grupo control, que recibe solamente el vehículo. Las soluciones de Gen empleadas en todos los ensayos fueron siempre preparadas en el día del experimento, minutos antes de comenzar el tratamiento. Las Ao se tiñen con nitrato de plata, para revelar las áreas de calcificación o se descalcifican con ácido nítrico (0.6 N) por 24 horas.

ENSAYOS REALIZADOS Y METODOLOGÍA EMPLEADA

1. Medición de la producción de óxido nítrico

La determinación de la producción de NO se realiza en forma indirecta midiendo la producción de nitritos (NO_2^-), uno de los dos productos primarios estables y no volátiles del NO, empleando el método espectrofotométrico de Griess (**Griess 1879; Kleinbongard y col. 2002**). El fundamento de la reacción química se basa en que los nitritos reaccionan en forma secuencial con el reactivo de Griess (ácido sulfanílico y demetil- α -naftilamina 0.1%) para formar un diazo compuesto coloreado cuya intensidad de color se determina a 520 nm.

1.1. En anillos de aorta

Los AA obtenidos como se describe en la sección 2.1, fueron usados dentro de las dos horas posteriores a su aislamiento. Está demostrado que dentro de las primeras dos horas se mantiene el 100% de su viabilidad comprobada por su capacidad de responder al agonista natural del tejido vascular acetilcolina, según lo descrito previamente en nuestro laboratorio (**Selles y col. 2001**). El tratamiento se detiene tomando alícuotas de 400 μ L del medio de incubación (por duplicado) las que se hacen reaccionar secuencialmente con los reactivos de Griess A y B (Laboratorios Britania, Argentina). La reacción consiste en el agregado sucesivo de 40 μ L del reactivo "Griess A" (solución acética de ácido sulfanílico al 1%) y 40 μ L del reactivo "Griess B" (solución acética de dimetil- α -naftilamina 0.1%). Se incuba durante 5 minutos a temperatura ambiente, y se mide la absorbancia a 520 nm de longitud de onda en un lector de placa Synergy-HT (Biotek). El desarrollo de color es estable por más de 30 minutos. La concentración de nitritos en las muestras se determina empleando una curva estándar realizada en la misma matriz de las muestras (buffer D). Paralelamente, los AA se disuelven en NaOH 1 N y se determina el contenido proteico empleando el método de Lowry (**Lowry y col. 1951**). Los resultados de producción de NO se expresaron como nmol NO/mg de proteína.

1.2. En cultivos de CE

Las CE se siembran 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 permite desarrollar el crecimiento celular hasta alcanzar una confluencia del 60-90%. Luego del tratamiento con la isoflavona durante el periodo de tiempo correspondiente, se toman alícuotas de 400 μ L del medio sobrenadante, las cuales se hacen reaccionar con los reactivos A y B de Griess como se describe en la sección 5.1. Se mide la absorbancia a 520 nm en un lector de microplacas (Biotek Synergy-HT) y la concentración de nitritos en las muestras se determina empleando una curva estándar de nitritos. Las células se disuelven en NaOH 1 N y luego se determina el contenido de proteínas por el método de Lowry. Los resultados se expresan como nmoles NO/mg de proteínas.

2. Proliferación celular

2.1. Ensayo de MTT

La proliferación celular se evalúa mediante el ensayo de conversión de MTT (bromuro de 3-(4,5-dimetiltiazolil-2)-2, 5-difeniltetrazolio) (Toledo-Piza y col. 2013). El MTT es un compuesto perteneciente a la familia de sales de tetrazolio. El fundamento del método se basa en que el MTT por acción de las deshidrogenasas mitocondriales genera NADH y NADPH. Estas coenzimas reducidas convierten el MTT en una sal insoluble en medio acuosa (formazano) de color violeta. Para cuantificarlo se disuelve en un solvente orgánico, como DMSO.

Las CE se siembran en placas de 96 pocillos en DMEM suplementado con SFB al 10% (v/v) y se dejan crecer hasta una confluencia del 60-90%. Las células se sincronizan con DMEM privado de suero durante 24 h, y se exponen a Gen o vehículo (control) en DMEM fresco conteniendo SFB 1% (v/v) por el tiempo requerido para cada ensayo. Después del tratamiento, se retira el medio y se añade a cada pocillo solución de MTT (5 mg/mL) seguido de incubación durante 4 horas a 37°C. Inmediatamente después, el sobrenadante se retira cuidadosamente, los cristales de formazano intracelulares resultantes se disuelven en DMSO y se mide el valor de absorbancia a 550 nm en un lector de microplacas (Biotek Synergy-HT). La absorbancia (Abs.) es directamente proporcional al número de células proliferantes.

2.2. Inmunocitoquímica diferencial: DAPI/Texas-Red

Las CMLV se cultivan en placas para inmunofluorescencia con fondo óptico de 96 pocillos (NUNC) hasta alcanzar 60-90% de confluencia, se lavan dos veces con PBS y se fijan con paraformaldehído al 2% (v/v) en PBS durante 15 minutos. Luego, las células se permeabilizan con Triton X-100 al 0.1% (v/v), se lavan con PBS durante 10 minutos y se incuban con 1% de albúmina durante 1 hora para evitar la unión inespecífica de anticuerpos. Se adiciona Texas Red-phalloidin (Sigma-Aldrich) que se une a las proteínas del citoesqueleto (F-actina). Los núcleos celulares se visualizan por la marcación con 4,6-

diamidino-2-fenilindol (DAPI; Sigma-Aldrich) que se une fuertemente a zonas ricas en timina y adenina en la secuencia del ADN. La inmunofluorescencia fue visualizada usando un microscopio Olympus BX41 y acoplado con una cámara digital (Olympus QColor 3).

3. Producción de VEGF

Para estudiar el efecto de Gen en la producción de la proteína VEGF por CE, se utilizó un inmunoensayo ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, Sigma-Aldrich) de diseño sandwich no competitivo. Teniendo en cuenta que la expresión de VEGF se induce en condiciones de hipoxia, se usó el CoCl_2 como control positivo de su síntesis puesto que es un inductor del factor inducible por hipoxia HIF-1. El procedimiento consta de varias etapas: 1-agregado de muestras a los pocillos conteniendo el anticuerpo primario anti VEGF inmovilizado; 2- lavado de los pocillos y agregado del anticuerpo secundario biotinilado específico anti-VEGF; 3-lavado para eliminar anticuerpo biotinilado no unido y agregado de estreptavidina conjugada con la peroxidasa; 4- lavado y agregado del sustrato (TMB) de la peroxidasa y, 5- lectura de la intensidad del color a 450 nm un lector de microplacas (Biotek Synergy-HT). El desarrollo de color es proporcional a la cantidad de proteína unida. En paralelo se procesa una curva de calibrado con diluciones estándar de VEGF. Los resultados se expresaron en pg VEGF/mL.

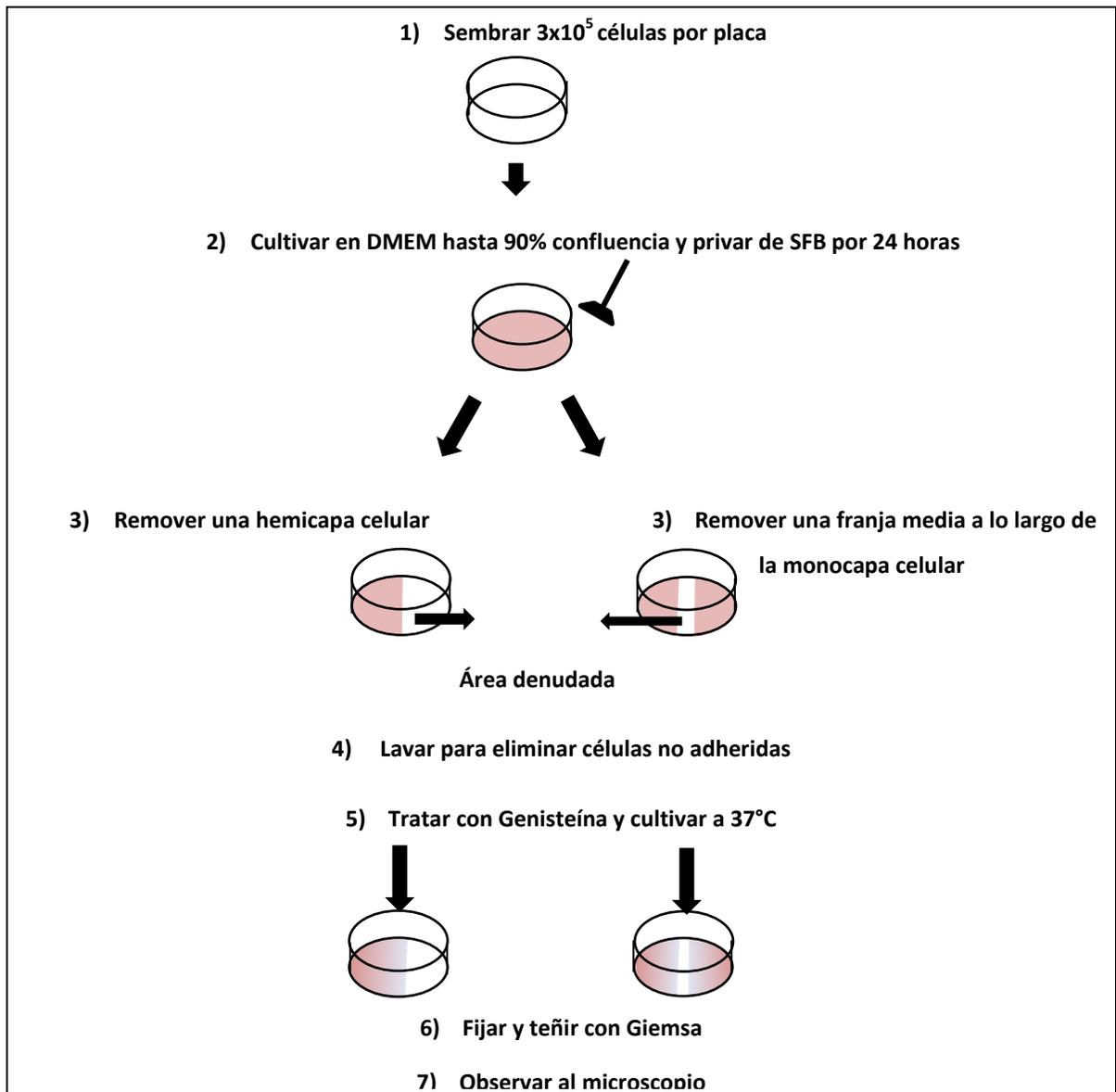
4. Migración celular

La movilización de las células se estudia usando dos procedimientos diferentes:

- a) eliminando una hemicapa de células de cada pocillo
- b) realizando en la zona central de cada pocillo un corte longitudinal a lo largo de la monocapa de células

Para esto, 3×10^5 células/mL se siembran en placas de 48 pocillos (NUNC) con DMEM que contienen SFB al 10% (v/v). Después de alcanzar 90% de confluencia, las células se privan de suero durante 24 horas y se levantan con la ayuda de un scraper o la punta de un tip. Seguidamente, se realizan dos lavados con PBS para eliminar las células removidas. Se agrega medio DMEM fresco suplementado con 1% de SFB. Se realiza el tratamiento con

Gen correspondiente y se cultiva a 37°C hasta finalizar el ensayo. Las células se fijan con metanol durante 7 minutos y tiñen con Giemsa (20 min). La migración celular se cuantifica por recuento del número de células que se movilizan al área desnuda. Se cuentan al menos siete campos microscópicos de cada condición experimental y se calcula el promedio del número de células por campo. Las fotografías fueron registradas utilizando una cámara digital (Nikon D3100) acoplada a un microscopio óptico NikonTS100F. Los resultados se expresan como el número de células migrantes por campo (Esquema 5).



Esquema 5. Ensayo de migración por reparación de herida

4.1. Tinción con Giemsa

Se descarta el medio de cultivo de las células y se fijan con metanol durante 7 minutos. Luego de descartar el alcohol se deja secar completamente al aire. Se agrega la solución de Giemsa (diluida 1:20 con agua destilada desionizada) durante 20 minutos con agitación suave. Se elimina el colorante, se lava exhaustivamente para eliminar el exceso de colorante y se seca a temperatura ambiente.

5. Fragmentación de ADN

Se utiliza un ensayo de fragmentación de ADN con posterior visualización en geles de agarosa. Se utilizan CE (90% de confluencia) cultivadas en placas de 60 mm de diámetro (NUNC). Las células se incuban en 5 mL de DMEM suplementado con 1% de SFB. Como inductor de apoptosis se emplea al peróxido de hidrogeno (H_2O_2). Las CE se trataron con Gen 10 nM por 24 horas en presencia o ausencia de H_2O_2 adicionado en las últimas 18 horas de tratamiento. Finalizado el tratamiento, se extrae el ADN empleando una mezcla de solventes (fenol:cloroformo:alcohol isoamílico; 25:24:21). Se separa por electroforesis en gel de agarosa al 1% (m/v), se introduce el gel de agarosa en la cubeta de electroforesis con el tampón TAE y hacer pasar una corriente de 10 V/cm de gel. Se deja el tiempo necesario para que el frente migre hasta el final del gel. Después se tiñe el gel con bromuro de etidio (10 mg/ml) durante 10 min., se pasa el gel a una cubeta de agua para retirar el exceso (2 min.) y finalmente las bandas se visualizaron utilizando un transiluminador de luz UV (UVP M-15E, Upland, USA) (Ohtsuka y col., 2006). Se obtienen fotografías de los geles utilizando una cámara digital (Nikon D3100).

6. RT-PCR

Las células se cultivan en DMEM (SFB al 10%) hasta un 90% de confluencia. Las monocapas se privan de suero durante 24 horas y luego se tratan con Gen. La extracción total de ARN celular y la obtención del cDNA se realiza empleando un kit comercial Superscript III Cells Direct de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El ADN complementario se

amplifica mediante PCR utilizando un termociclador programado (Biometra Uno II, Biometra, Göttingen, Alemania). Los ciclos de PCR fueron los siguientes: **ICAM-1** (95°C, 3 min, 94°C, 60 s, 64°C, 60 s, 72°C, 60 s, 72°C, 7 min, 32 ciclos). La secuencia de los cebadores fueron las siguientes, directa: 5'-CTG CAG AGC ACA AAC AGC AGA G-3', inversa: 5-AAG GCC GCA GAG CAA AAG AAG C-3' (**Campelo y col. 2012**). **TNAP** (95°C, 3 min, 95°C, 60 sec, 63°C, 60 sec, 72°C, 60 sec, 72°C, 7 min, 35 ciclos). Las secuencias de los cebadores fueron las siguientes, directa: 5'-TGG ACG GTG AAC GGG AGA AC-3', inversa: 5'-TGA AGC AGG TGA GCC ATA GG-3' (**Lomashvili y col. 2008**). **ER α** (94°C, 3 min, 94°C, 60 s, 62°C, 60 s, 72°C, 60 s, 72°C, 7 min, 32 ciclos). Las secuencias de cebadores fueron las siguientes, directa: 5'-AAT TCT GAC AAT CGA CGC CAG ', inversa: 5'-GTG CTT CAA CAT TCT CCC TCC TC-3'. **ER β** (94°C, 3 min, 94°C, 60 s, 61°C, 60 s, 72°C, 90 s, 72°C, 7 min, 26 ciclos). Las secuencias de cebadores fueron las siguientes, directa: 5'-TTC CCG GCA GCA CCA GTA ACC-3 ', inversa: 5'-TCC CTC TTT GCG TTT GGA CTA -3' (**Smith y col. 2011**). **BMP2** (95°C, 3 min, 95°C, 60 s, 60°C, 60 s, 72°C, 60 s, 72°C, 7 min, 32 ciclos). Las secuencias de cebadores fueron las siguientes, directa: 5'-CAG AGC TCC AGA TTT TTC GG-3', inversa: 5'-CTG GAC TTA AGA CGC TTC CG-3' (**Lu y col. 2011**). **Factor de transcripción Runx2** (95°C, 3 min, 95°C, 60 s, 60°C, 60 s, 72°C, 60 s, 72°C, 7 min, 32 ciclos). Las secuencias de cebadores fueron las siguientes, directa: 5'-GTT ATG AAA AAC CAA GTA GCC AGG T-3 ', inversa: 5'-GTA ATC TGA CTC TGT CCT TGT GGA T-3' (**Park y col. 2012**). La expresión del gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH) se usa como control de expresión y fue corroborado para cada conjunto de experimentos de RT-PCR (cebador directo: 5'-TCC CTC AAG ATT GTC AGC AA-3 ', cebador inverso: 5'-AGA TCC ACA ACG GAT ACA TT-3'); pasos de amplificación: 95°C, 3 min, 94°C, 30 s, 53°C, 30 s, 72°C, 45 s, 72°C, 7 min, 35 ciclos). También se procesaron controles negativos (reacción de PCR sin muestra). Los productos de amplificación se resolvieron mediante electroforesis en geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio. La densidad de cada banda en el gel de RT-PCR se cuantificó utilizando el software ImageJ (versión 1.43 c, NIH, Rasband). El ARNm en cada muestra se normaliza frente al ARNm de GAPDH.

7. Citometría de flujo

Las muestras de sangre fresca se tratan con el vehículo o con Gen durante 24 horas. Cuando se empleó LPS el tratamiento se realizó solo por 2 horas (LPS control) o se adiciona durante las 2 últimas horas del tratamiento con Gen para la condición Gen+LPS (37°C en atmósfera de CO₂ al 5%). Se utilizaron anticuerpos monoclonales fluoresceinados contra las siguientes proteínas: CD11b (PE), CD11c (PE), CD18 (PE), CD14 (APC) y CD45 (PerCP). Se marcaron alícuotas de sangre (100 µL) con el correspondiente panel de anticuerpos durante 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente, luego se lava dos veces con solución salina (PBS). Posteriormente se lisan los glóbulos rojos, por el agregado de solución de lisis comercial (BD Biosciences, San José, CA, EE.UU.) durante 10 min a temperatura ambiente. Las células se adquieren con un citómetro de flujo FACS Canto II (Becton Dickinson, EE.UU.) y se analizan usando el software Infinicyt 1.6. La positividad de cada marcador evaluado se determina mediante la intensidad media de fluorescencia (IFM) comparada con los controles de isotipo de cada anticuerpo usado. Los linfocitos, Mo y granulocitos se identifican según los niveles de expresión del CD45, y las características de dispersión frontal y lateral (FSC/SSC, respectivamente). Los Mo se identifican por su marcador específico, el CD14, y sobre esa población de Mo se analiza la expresión de CD11b, CD11c y CD18 (**Wu y col. 2009**).

8. Actividad de la enzima fosfatasa alcalina

La actividad de la enzima fosfatasa alcalina (FAL) se mide empleando un kit comercial (Wiener lab. Argentina) de acuerdo con las instrucciones del fabricante (**Kanno y col. 2008**). La actividad de la enzima se determina usando como sustrato el p-nitrofenilfosfato (p-NFF). La FAL hidroliza al p-NFF (inoloro) produciendo fosfato y p-nitrofenol a pH 9.8. La velocidad de aparición del p-nitrofenol (amarillo), es proporcional a la actividad enzimática de la muestra.

Después del tratamiento, se elimina el medio de cultivo, se lavan las células con PBS 1X y se permeabilizan usando 100 µL Tris-Tritón 0.1% en PBS (10 min) a 37°C. Se agrega 50 µL

de sustrato seguido de una incubación de 10 min a 37°C. Posteriormente se adiciona el reactivo de color y se cuantifica a 520 nm. El contenido de proteínas se mide por el método Lowry (**Lowry y col. 1951**), se agrega NaOH (1N) para lisar las células, a partir de una alícuota de 250 µL de la muestra se determina proteínas por colorimetría. Los resultados se expresan en UI x 10⁻³ /mg de proteína.

9. Estudio de la matriz extracelular:

9.1. Niveles de colágeno: tinción con Rojo Sirio

La presencia de colágeno en la matriz extracelular se analiza mediante tinción con Rojo Sirio. El colorante empleado se disuelve en ácido pícrico acuoso saturado a una concentración de 100 mg/100 mL. La solución de Bouin (fijador) se prepara mezclando 15 mL de ácido pícrico acuoso saturado con 5 mL de formaldehído al 35% y 1 mL de ácido acético glacial.

Las células se lavan exhaustivamente con PBS antes de fijarlas con 1 mL de solución de Bouin durante 1 hora. El fijador se elimina y las células se lavan por inmersión en agua durante 15 minutos. Las placas de cultivo se secan al aire. Se añade 1 mL de solución del colorante Rojo Sirio durante por 1 hora bajo agitación suave. El colorante se elimina y se lava exhaustivamente con agua para eliminar el exceso de colorante. Se obtienen fotos de campos representativos de los cultivos teñidos usando una cámara digital (Nikon D3100) acoplada a un microscopio óptico (Nikon TS100F). Se adiciona NaOH (1N) para solubilizar el colorante. Los niveles de colágeno se determinan midiendo la absorbancia a 550 nm en un lector de microplacas (Biotek Synergy-HT). Los resultados se expresan como Abs./mg de proteínas (**Tullberg-Reinert y col. 1999**).

9.2. Mineralización

9.2.i. Cuantificación espectrofotométrica del contenido de calcio

Las matrices se descalcifican con HCl 0.6 mol/L durante 24 horas, y el contenido de calcio en el sobrenadante se analiza por espectrofotometría usando el método de o-

cresolftaleína complexona (Wiener lab, Argentina). Se mide absorbancia a 550 nm en un lector de microplacas (Biotek Synergy-HT). Luego de la descalcificación, las células se lavan con PBS, se solubilizan con NaOH (1 N) y se mide el contenido proteico mediante el método de Lowry. Los resultados se expresan como $\mu\text{g Ca/mg}$ de proteína.

9.2.ii. Tinción con Rojo de Alizarina

Se analiza la presencia de nódulos calcificados mediante tinción Roja de Alizarina (**Viale-Bouroncle y col. 2014**). Finalizando el tratamiento, las células se fijan en paraformaldehído al 4% durante 10 min. Las células se tiñen con solución de Rojo de Alizarina 2% durante 30 minutos a temperatura ambiente y se lavan con agua destilada la cantidad de veces necesarias para eliminar residuos del colorante. Las placas de cultivo teñidas se fotografían utilizando una cámara digital (Nikon D3100) acoplada a un microscopio óptico NikonTS100F. Se adiciona NaOH (1N) para solubilizar el colorante y se mide el contenido proteico mediante el método de Lowry. Los niveles de calcio se determinan midiendo la absorbancia 560-590 nm en un lector de microplacas (Biotek Synergy-HT). Los resultados se expresan como Abs./mg de proteínas (**Tullberg-Reinert y col. 1999**).

10. Tinción de nitrato de plata

Se analiza la presencia de depósito de calcio en el tejido intacto. Las aortas obtenidas como se especifica en el punto C.1 se lavan 3 veces con PBS y se fijan con formol al 10% por 20 minutos a -4°C . Se elimina el formol con varios lavados con agua, se adiciona nitrato de plata al 5% por 30 minutos en presencia de UV (o luz del día). Los iones plata de la solución de nitrato de plata reaccionan con los iones fosfato en los depósitos almacenados y desplazan los iones calcio. Debido a una fuerte acción de la luz, estos iones plata son reducidos a plata metálica (depósitos negros), la cual es evaluada de forma microscópica. El exceso de nitrato de plata se elimina lavando con agua 3 min. Se agrega tiosulfato de Na por 5 minutos a temperatura ambiente para que los depósitos de plata se

fijen y estabilicen. Se lava con agua 1 min. y se toman fotografías de las Ao utilizando una cámara digital (Nikon D3100).

11. Tinción TRAP

Los cocultivos Mo-OB se incubaron durante 21 días en presencia o ausencia de Gen. Los OC derivados de Mo fueron revelados por tinción de fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP) usando un kit comercial (Sigma-Aldrich) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células se lavan con agua destilada y se fijan con la solución de fijado (citrato:acetona:formaldehído) por 30 segundos. Las células se incuban en la solución con naftol 37°C 1 hora en oscuridad. Se lava con agua a 37°C y se adiciona hematoxilina por 2 minutos. Se lava repetidas veces y se seca al aire. Se procesa en paralelo un control negativo de la tinción. La fosfatasa ácida hidroliza el naftol fosfato generando depósitos insolubles de tinte pardo-rojizo. Las células TRAP positivas se identifican como aquellas que contienen en el citoplasma gránulos de color pardo-rojizos. Se cuentan las células multinucleadas positivas para TRAP y los resultados se expresan como OC/campo. Las imágenes se obtuvieron utilizando una cámara digital (Nikon D3100) acoplada a un microscopio óptico NikonTS100F.

12. Angiogénesis: formación de capilares 3D a partir de AA

Los AA se aislan de ratas Wistar jóvenes, como se describe previamente en la sección A.1. Los anillos se examinan bajo un microscopio de disección para asegurar la uniformidad en su tamaño. Se mantienen en placas Petri con DMEM suplementado con SFB 10% (v/v), 60 µg/mL de penicilina, 10 µg/mL de estreptomina, 2.5 µg/mL de anfotericina-B, 2 mM L-glutamina y 1.7 g/L de bicarbonato de sodio, a 37°C en atmósfera de CO₂ al 5% hasta su siembra sobre la matriz de colágeno (dentro de las 2 horas posteriores a su obtención). Después de lavar con DMEM libre de suero, los AA se siembran sobre la matriz de colágeno (1.3 mg/mL), se incuban 15 días a 37 °C en atmósfera de CO₂ al 5%. El medio se reemplaza con medio fresco dos veces por semana. Los AA se trataron en forma continua

con Gen, MCOB o vehículo durante 15 días. La cuantificación del desarrollo de túbulos alrededor del anillo se realizó usando el programa ImageJ, siguiendo los siguientes pasos: 1. Tomar fotografías de cultivos de anillos aórticos con un aumento de 40x en microscopio de campo claro, 2. Utilice "Archivo> Abrir" la imagen a analizar con ImagenJ, 3. Con la herramienta línea recta, trace una línea en la imagen correspondiente a una distancia conocida en mm. Seleccione la casilla de verificación "Global" para que la escala se transfiera a todas las fotografías posteriores. 4. Seleccione "Analizar> Establecer escala" e ingrese la distancia correspondiente de la línea en el cuadro "Distancia conocida". Indica el unidad de medida (mm) y haga clic en Aceptar. **(Aplin y col. 2011).**

12.1. Obtención de colágeno

Se empleó una adaptación del protocolo de Bell y col. **(Bell y col. 1979)**. Se utilizan 5 colas de rata Wistar (4-6 meses) que se almacenan a -70°C hasta su utilización. Las colas se descongelan en etanol al 70% por 20 min. Empleando un bisturí se disecta la piel, se separan los tendones y se cortan en pequeños fragmentos que se sumergen en 150 mL de ácido acético (1:1000, ácido acético:agua). Se almacena a 4°C por 48 horas, tiempo suficiente para que los tendones se hidraten totalmente, obteniendo una solución de consistencia viscosa. La solución se centrifuga 2 horas a 1000 g. El sobrenadante se filtra y se almacena a 4°C , como solución de colágeno cruda. El colágeno crudo se mezcla con NaOH (0.1N) en una proporción 6:1 (colágeno:NaOH) para neutralizar el ácido acético y se centrifuga a 400 g por 10 min. Se elimina el sobrenadante, se recupera el colágeno precipitado y se resuspende en ácido acético (1:1000, ácido acético:agua). La solución se filtra, el colágeno refinado se liofiliza por 3 días en un equipo liofilizador (Martin Christ Alpha 2-4 LD plus). El colágeno utilizado en cada ensayo se pesa y se rehidrata el día del experimento. Las mallas se preparan con: 8 volúmenes de la solución de colágeno (1.3 mg/mL), 1 volumen de DMEM 10X y 1 volumen de 24.3 mg/mL de NaHCO_3 .

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

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

CAPÍTULO 1: SISTEMA VASCULAR

Como se describe en la introducción, frente a la injuria en el sistema vascular se activan distintos procesos moleculares y celulares que participan en la génesis y progreso de la lesión vascular, como así también otros que contribuyen a la reparación. En este capítulo se presentan los resultados obtenidos de nuestros estudios sobre la producción endotelial de vasoactivos, la síntesis del factor angiogénico VEGF, el crecimiento y muerte celular, y la interacción Mo-CE. A nivel de CMLV, la proliferación y migración celular, y su cambio de fenotipo a linaje óseo.

Las dosis de Gen seleccionadas para todos ensayos se establecieron en base a resultados preliminares de nuestro laboratorio y a los datos bibliográficos publicados en el tema. Nuestro modelo experimental incluyó AA (sistema celular formado por los dos tipos principales de células vasculares: CE y CMLV) y cultivos celulares primarios de CE y CMLV obtenidos a partir de explantes de aorta de rata.

1.1. Efecto de Gen sobre la producción de NO en AA

Iniciamos nuestros estudios evaluando el efecto de Gen sobre la producción de NO en animales normo e hipoestrogénicos. Para ello, se emplearon AA aislados de ratas hembras jóvenes, OVX, seniles tratadas *in vitro* con Gen. La Figura 16 muestra que 20 min. de tratamiento con Gen 10 nM, estimuló la producción de NO en todos los modelos estudiados, con una magnitud de incremento de 24.1% en ratas seniles, 50.0% en ratas OVX y 114.0% en ratas jóvenes (% sobre cada control).

Con el propósito de estudiar el efecto directo de Gen sobre CE, a partir de aquí se emplearon cultivos celulares primarios. Este sistema experimental posee la ventaja que permite diseñar un mayor número de condiciones experimentales con un mayor número de réplicas, reduciéndose así el número de animales empleados.

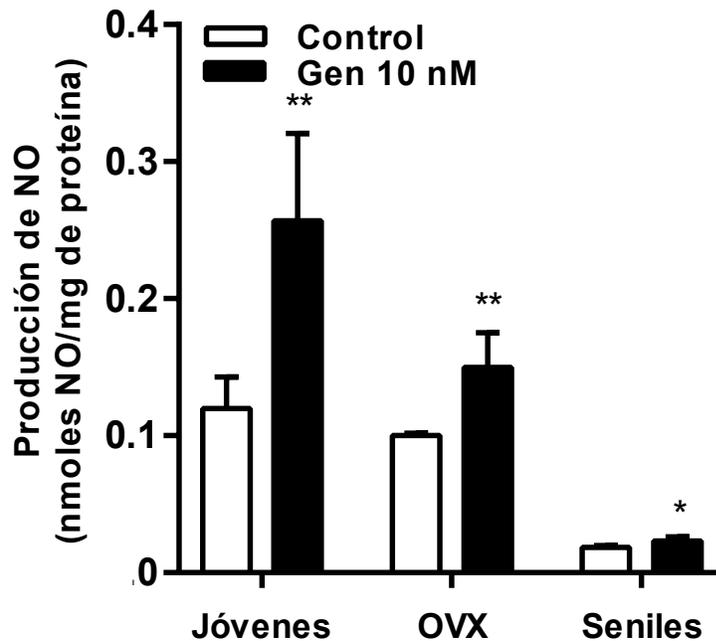


Figura 16. Producción de NO en AA tratados con Gen

Los AA aislados de ratas hembras jóvenes, OVX, seniles, fueron incubados en medio D y tratados con Gen 10 nM durante 20 minutos. La producción de NO liberado al medio se midió mediante la técnica de Griess como se describe en Metodología. Los resultados corresponden el promedio \pm desvío estándar de cuatro experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ respecto al valor de cada control.

1.2. Estudio de la acción de Gen en CE

Teniendo en cuenta los resultados de la Figura 16, se estudió la capacidad de la isoflavona de estimular la síntesis de NO en CE. Los cultivos se trataron con Gen 10 nM a dos tiempos de tratamiento (5 y 15 minutos). Como se observa en la Figura 17, el tratamiento aumentó significativamente la producción NO a los dos tiempos ensayados con una magnitud del 44.0 y 29.6 % sobre el control, respectivamente.

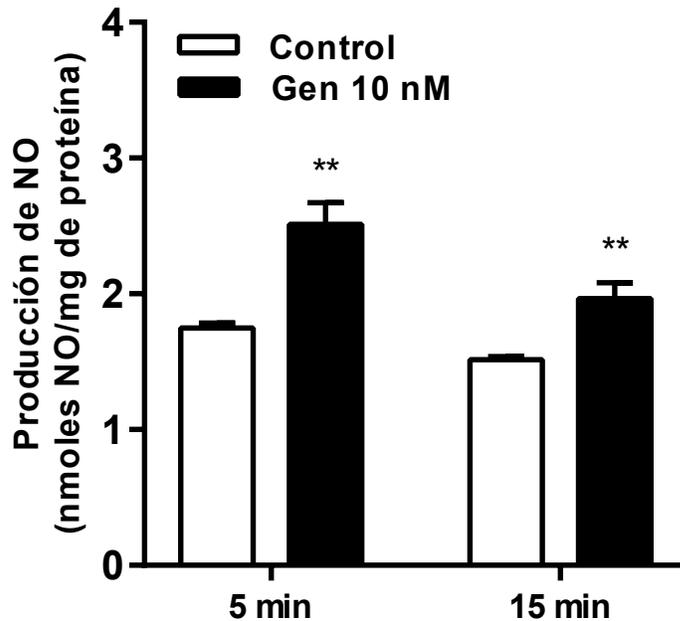


Figura 17. Producción de NO en CE

Las CE en cultivo confluyente incubadas en DMEM suplementado con 1% de SFB fueron tratadas durante 5 y 15 minutos con Gen 10 nM. La producción de NO se midió mediante la técnica de Griess. Los resultados corresponden al promedio \pm desvío estándar de cuatro experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4). **p<0.01 respecto al valor de cada control.

Evaluamos si la acción estimuladora de Gen sobre la producción de NO es dependiente de la participación del RE. Para ello, se seleccionó el compuesto ICI182780, antagonista del RE. La concentración usada se basó en los resultados previos de nuestro laboratorio (**Massheimer y col. 2006**). Se procedió a preincubar las CE con ICI182780 (1 μ M) durante 1 hora, y luego de realizar un cambio de medio, los cultivos se trataron 5 minutos con Gen 10 nM. Como se observa en la Figura 18, la presencia de ICI182780 anuló completamente el estímulo del FE sobre la producción de NO, sugiriendo la participación del RE en la acción de Gen sobre la síntesis del vasoactivo.

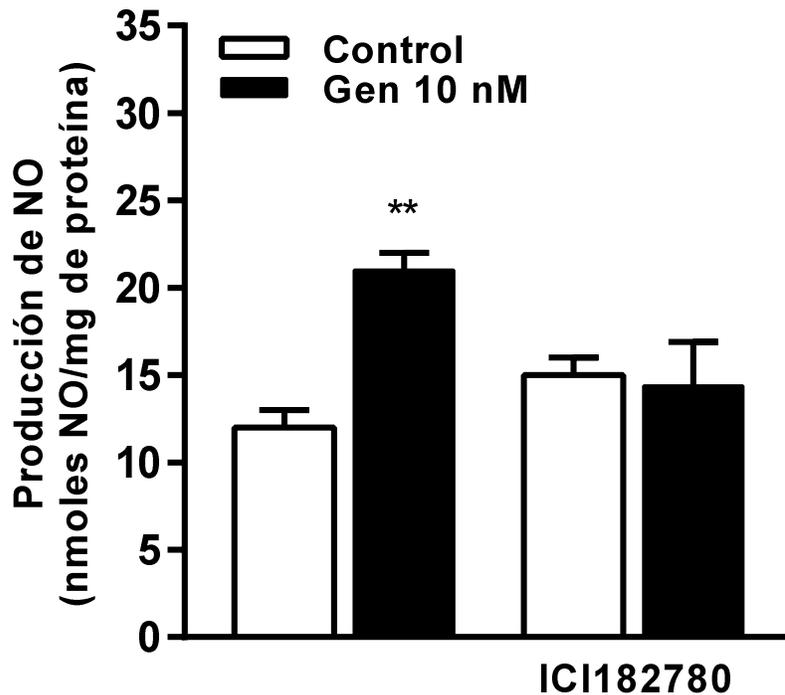


Figura 18. Efecto de ICI182780 sobre la síntesis de NO inducida por Gen

Las CE en cultivo confluyente fueron preincubadas durante 60 minutos con ICI182780 1 μ M e inmediatamente después se trataron con Gen 10 nM durante 5 minutos. La producción de NO se midió según se describe en Metodología. Los resultados corresponden al promedio \pm desvío estándar de cuatro experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4). ** p<0.01 respecto al control.

La homeostasis vascular no solo depende de la capacidad de generar vasoactivos, sino de la regulación de los procesos de crecimiento celular y de mantenimiento de las características fenotípicas de las células vasculares.

Es por ello que comenzamos evaluando el crecimiento celular. Se investigó el efecto de Gen sobre la proliferación de CE empleando diferentes concentraciones de la isoflavona. CE sincronizadas fueron tratadas con Gen (0.01-100 nM) por 24 horas. En la Figura 19 se puede observar que el FE estimuló significativamente la proliferación de

CE, con una magnitud de estímulo del 22.7 al 33.8% para las diferentes concentraciones ensayadas.

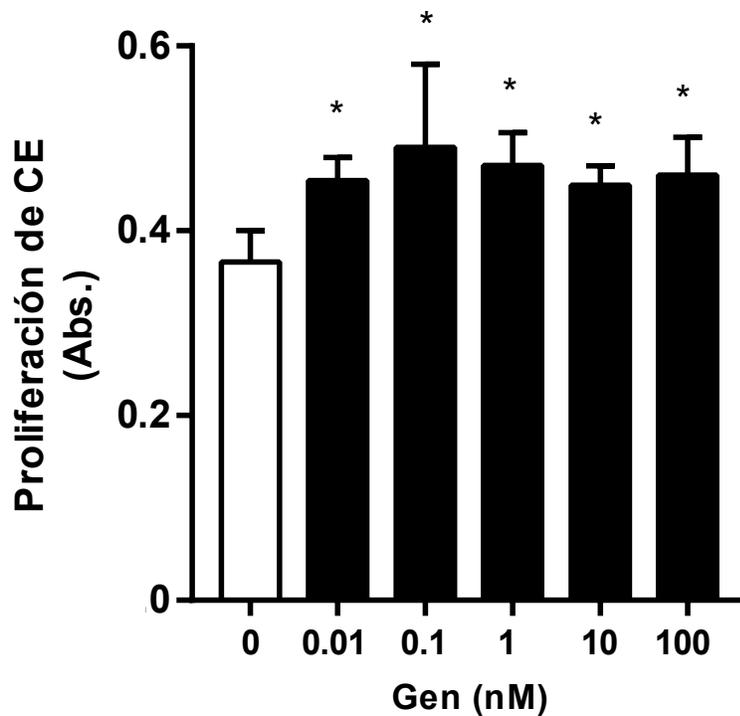


Figura 19. Efecto de Gen sobre la proliferación de CE.

Las CE sincronizadas fueron tratadas durante 24 horas con las concentraciones indicadas de Gen. Se midió la proliferación de CE por medio del ensayo de MTT como se describe en Metodología. Los resultados corresponden al promedio \pm desvió estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado ($n=4$). * $p < 0.05$ respecto al control.

Seleccionamos la concentración 10 nM para estudiar la acción de Gen sobre la proliferación de CE en función del tiempo de tratamiento (4 - 96 h). Como se puede observar en la Figura 20, el estímulo inducido por Gen se evidencia entre las 20 y 72 horas de iniciado el tratamiento, 39 y 25% respectivamente. El perfil de crecimiento de las CE bajo estímulo de Gen acompaña al de las células control. La cinética de proliferación de las CE (control) obtenida en este ensayo fue equivalente a los resultados presentados por nuestro laboratorio empleando conteo celular (**Cutini y**

col. 2016) o la técnica de incorporación de [^3H]-timidina, lo que nos permitió validar el ensayo de MTT como indicador de proliferación celular.

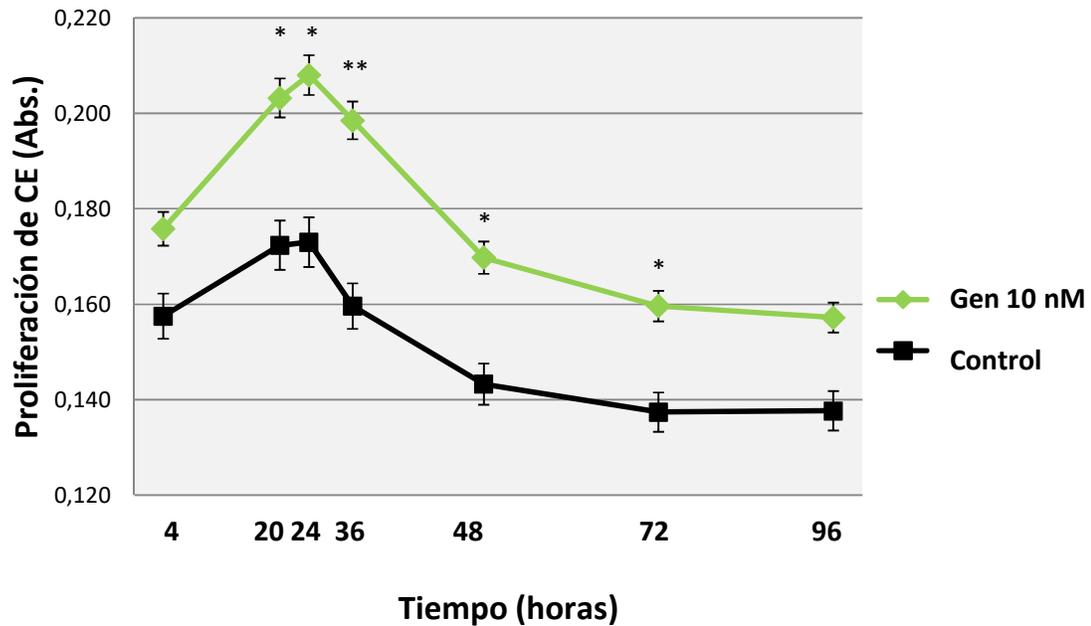


Figura 20. Efecto de Gen sobre el crecimiento de CE

Las CE semiconfluentes sincronizadas fueron tratadas con Gen 10 nM durante 4, 20, 24, 36, 48, 72 ó 96 horas. La proliferación de CE se determinó por ensayo de MTT como se describe en Metodología. Los resultados representan el promedio \pm desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado ($n=4$). * $p<0.05$, ** $p<0.01$ respecto a cada control.

La proliferación y migración endotelial son eventos claves para la reparación y regeneración vascular, como así también para la neovascularización. Estos procesos son regulados por diversos factores propios o ajenos al sistema vascular, siendo el VEGF uno de los principales mediadores. Empleando la técnica de ELISA estudiamos el efecto de Gen sobre la síntesis de VEGF. Como se observa en la Figura 21, el tratamiento de 24 horas con Gen estimuló la síntesis de VEGF, siendo las

concentraciones de 1 y 10 nM las que evidenciaron aumentos significativos en la expresión del vasoactivo (24.6 y 68.9% vs el control, 1 y 10 nM respectivamente).

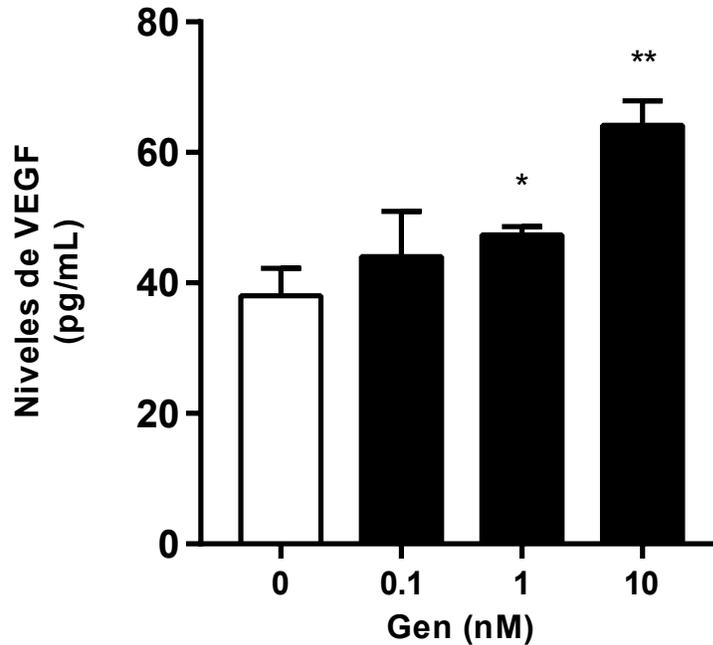


Figura 21. Efecto de Gen sobre niveles de VEGF

Las CE fueron tratadas con Gen a las concentraciones indicadas durante 24 horas. Los niveles de VEGF se cuantifican en el sobrenadante por el método de ELISA como se describe en Metodología. Los resultados representan el promedio \pm desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ respecto al control.

Siendo VEGF un regulador del crecimiento endotelial, evaluamos si las CE eran capaces de responder a este vasoactivo. CE en cultivo fueron tratadas por 24 horas con dos dosis de VEGF. Como se observa en la tabla 2, confirmamos la capacidad de nuestro modelo experimental de responder al factor proangiogénico. Ambas dosis ensayadas estimularon significativamente el crecimiento celular.

	Proliferación de CE (Abs.)
Control	0.366 ± 0.034
VEGF 2.05 pg/mL	0.485 ± 0.023 ** ↑ 32%
VEGF 32 pg/mL	0.442 ± 0.042 * ↑ 21%

Tabla 2. Inducción de la proliferación de CE por VEGF

Las CE semiconfluentes sincronizadas fueron tratadas 24 horas con las concentraciones indicadas de VEGF. La proliferación celular se midió por la técnica de MTT como se describe en Metodología. Los resultados representan el promedio ± desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4). *p< 0.05, **p< 0.02 respecto al control.

Procedimos a estudiar el efecto de Gen sobre la migración de CE. Para ello, se empleó un ensayo que permite visualizar si las células se movilizan en respuesta a un estímulo dado. Las células en cultivo se sincronizaron por privación de suero durante 24 horas para luego remover la mitad de la monocapa celular. La hemicapa restante se trató con diferentes concentraciones de Gen (0.1-100 nM) por 72 horas. Luego de la tinción con Giemsa se cuantificaron las células que migraron al área desnuda (Figura 22A). Como se observa en la Figura 22, Gen (10 y 100 nM) estimuló la migración de CE (20 y 66.6%, respectivamente). Los tratamientos con concentraciones menores del FE no exhibieron cambios respecto al control.

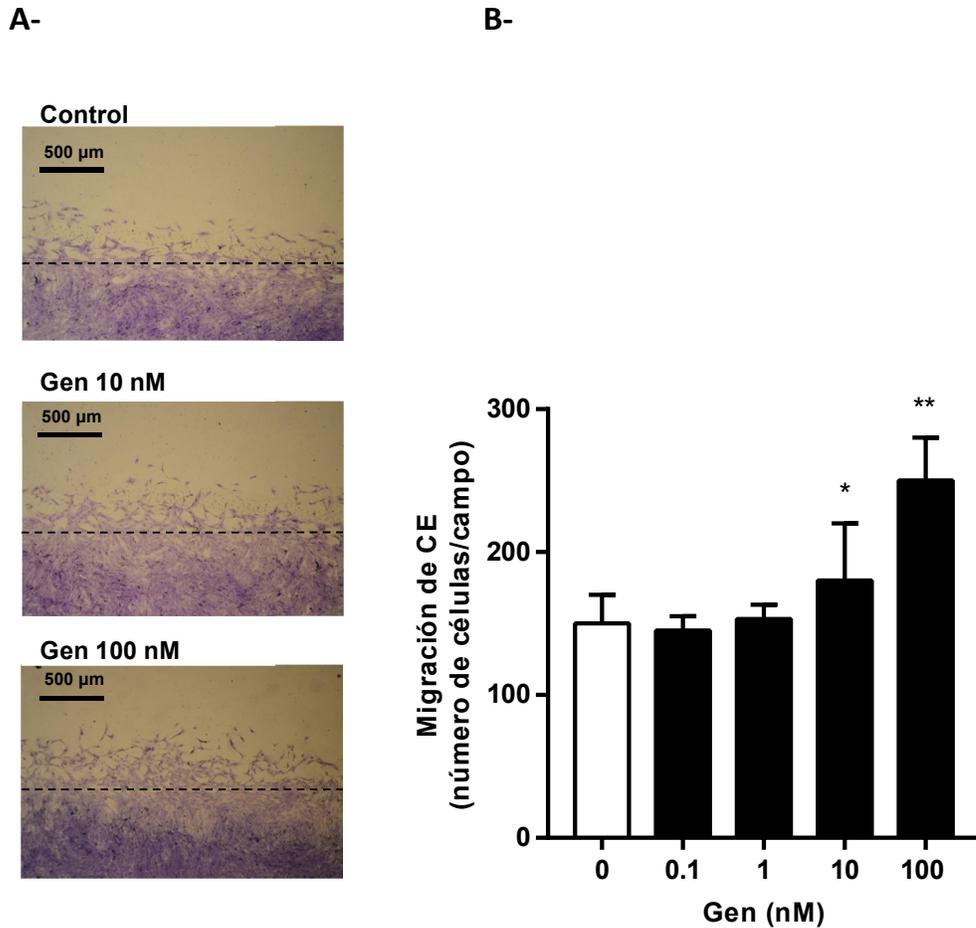


Figura 22. Efecto de Gen sobre la migración de CE

A la monocapa de CE confluentes sincronizadas se les realizó un corte transversal removiendo una hemicapa. Las células restantes se trataron por 72 horas con las concentraciones de Gen indicadas. **A-** Las fotografías (500 μ m, 40X) corresponden a campos representativos de cada una de las condiciones experimentales. Las líneas punteadas indican el límite que separa la hemicapa eliminada en la placa. **B-** Cuantificación de la movilización celular. Los resultados representan el promedio \pm desvío estándar del número de células migrantes por campo de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, respecto al control.

Habiendo descrito una regulación del crecimiento celular por el FE, nos planteamos si el mecanismo de acción endotelial de la isoflavona involucra la modulación de la muerte celular programada. Para ello, se seleccionó la fragmentación de ADN como parámetro a medir, ya que representa uno de los eventos bioquímicos finales del

proceso apoptótico. Se empleó la técnica de “DNA laddering” para visualizar la degradación del ADN en fragmentos de bajo peso molecular. Como inductor de la apoptosis se empleó H_2O_2 . La concentración de H_2O_2 se seleccionó de datos previos de nuestro laboratorio en los cuales se demostró que $200 \mu M$ es la concentración óptima para inducir fragmentación de ADN de CE en cultivo (**Cutini y col. 2010**). Las CE se trataron con Gen 24 horas en presencia o ausencia de H_2O_2 adicionado en las últimas 18 horas del ensayo (Esquema 6). Finalizado el tratamiento, se realizó la extracción de ADN y se revelaron los fragmentos por electroforesis en gel de agarosa al 1%, visualizando con bromuro de etidio. En la Figura 23A se muestra una fotografía de un experimento representativo y en B, los datos cuantitativos procesados con el software ImageJ. En la calle 1 (control) se observa una banda única de gran intensidad en la región correspondiente a ADN de alto peso molecular (ADN intacto), mientras que en la calle 3 (H_2O_2) se detecta un patrón de bandas dispuestas en “escalera” que corresponde a ADN de bajo peso molecular (fragmentado). El análisis de la Figura 23 nos revela que en condiciones basales (ausencia de H_2O_2), el ADN permanece intacto tanto en el grupo control como en el tratado con Gen (calles 1 y 2). La exposición de la CE a H_2O_2 indujo fragmentación total del ADN. El tratamiento con el FE previo al agregado de H_2O_2 redujo significativamente el estímulo apoptótico inducido por el estrés oxidativo. La calle 4 muestra una banda de ADN intacto al tope del gel aunque también se detecta un patrón de bandas en escalera, lo que sugiere una fragmentación parcial del ADN (94 vs. 34% de fragmentación, H_2O_2 vs H_2O_2 +Gen, respectivamente). Resultados similares se obtuvieron con Gen 1 y 100 nM.



Esquema 6

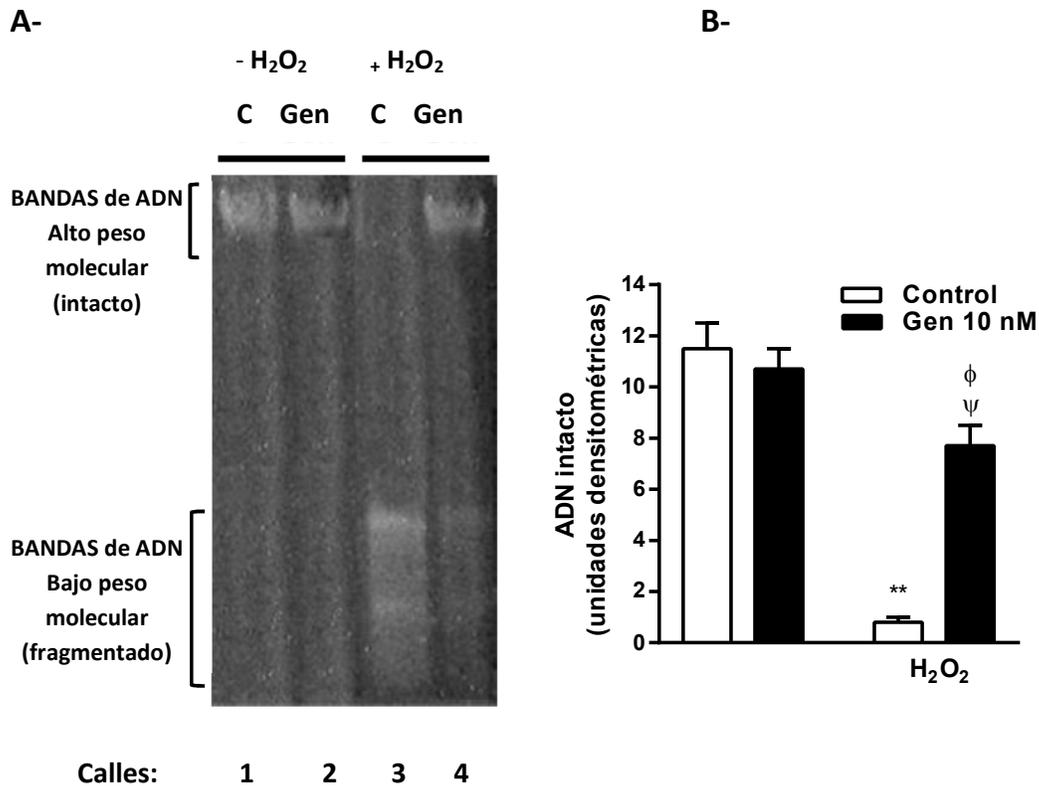


Figura 23. Efecto de Gen sobre la fragmentación de ADN

Las CE fueron incubadas con Gen 10 nM o vehículo por 24 horas en presencia o ausencia de 200 μ M de H₂O₂ adicionado en las últimas 18 horas del tratamiento. El ADN fragmentado fue detectado como se describe en la Metodología. **A-** Fotografía de un gel teñido con bromuro de etidio correspondiente a un experimento representativo. **B-** Representación gráfica de la cuantificación realizada con el software ImageJ. Los resultados representan el promedio \pm desvío estándar de dos experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4). ϕ p<0.01 respecto a Gen, ψ p<0.01 respecto a H₂O₂, **p<0.01 respecto al control sin H₂O₂.

Estos resultados nos sugieren que en un lapso de 24 horas la Gen fue capaz de prevenir la injuria endotelial por estrés oxidativo. Empleando una estrategia experimental equivalente, estudiamos en términos de expresión de moléculas de adhesión celular (CAMs), la acción del FE frente al estrés inflamatorio. Datos previos de nuestro laboratorio mostraron que Gen inhibe la adhesión de Mo a CE inducida por estrés inflamatorio. Sabido es que la adhesión de mononucleares sobre el lecho vascular depende de la formación de puentes entre CAMs endoteliales e integrinas

monocíticas. Para estudiar si la inhibición de la adhesión de Mo inducida por el FE se asociaba con la regulación de la expresión de estas proteínas, evaluamos el efecto de Gen sobre la molécula de adhesión endotelial ICAM-1 y sobre las integrinas monocíticas CD11b, CD11c y CD18.

Empleamos el mismo estrés inflamatorio que en trabajos previos (**Sandoval y col. 2010**), exposición de los cultivos celulares a lipopolisacáridos bacterianos (LPS). El LPS es un agente proinflamatorio que *in vivo* induce injuria endotelial y estimula la adhesión de Mo al endotelio vascular. En primer lugar, analizamos la acción de Gen sobre la expresión de ICAM-1. Para ello, las CE se trataron con Gen 10 nM por 24 horas en presencia o ausencia de LPS (1 µg/mL) agregado 5 horas después de iniciado el tratamiento con Gen. Se procesó en paralelo un control del tratamiento con LPS en el cual las células fueron expuestas al proinflamatorio durante 19 horas (Esquema 7). En la Figura 24 se puede observar un gel representativo y el gráfico de cuantificación. El tratamiento con LPS incrementó los niveles ARNm para ICAM-1 en un 321.0% respecto al control. Gen no modificó sus niveles de expresión mientras que el tratamiento con Gen previo al estrés inflamatorio redujo en un 45.0% la inducción de ICAM por LPS.



Esquema 7

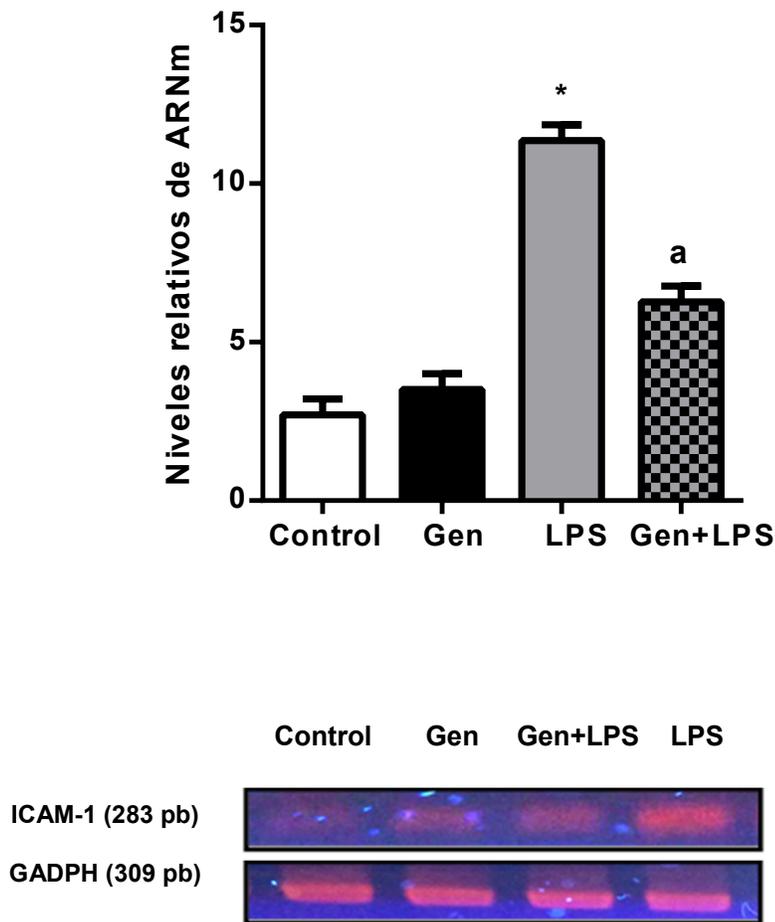


Figura 24. Efecto de Gen sobre los niveles de expresión del ARNm de ICAM-1

Las CE se trataron con Gen 10 nM por 24 horas en ausencia o en presencia de LPS (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$) adicionado en las últimas 19 horas de tratamiento. Los niveles de expresión del ARNm de ICAM-1 se estudiaron por RT-PCR según se describe en Metodología. Se muestra un gel representativo y la cuantificación de la intensidad relativa de cada banda normalizada sobre los niveles del ARNm de GADPH realizado por análisis densitométrico usando el software ImageJ. Los resultados corresponden a dos experimentos independientes realizados por duplicado. * $p < 0.01$ respecto al control, ^a $p < 0.05$ respecto a LPS.

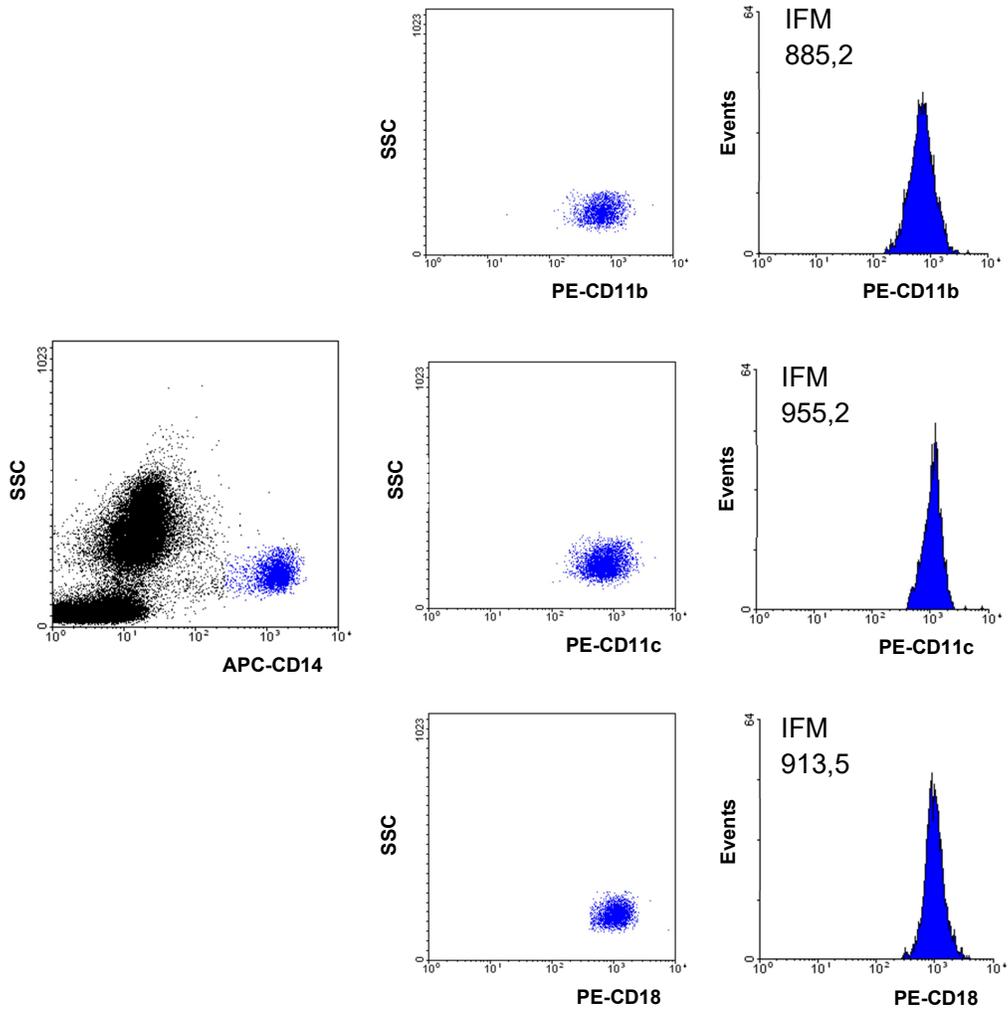
Para estudiar el efecto de Gen sobre la expresión de las integrinas CD11c, CD11b y CD18 en la superficie de los Mo, se empleó como sistema experimental sangre entera. Alícuotas de sangre fueron tratadas con el vehículo (control) o con Gen 10 nM por 24 horas. Las muestras expuestas al proinflamatorio LPS lo recibieron en las últimas 2 horas del ensayo (Esquema 8). La expresión de CD11c, CD11b y CD18 monocíticas se

estudió por citometría de flujo multiparamétrica. La población de Mo se seleccionó en base a parámetros morfológicos como tamaño y complejidad citoplasmática y, por parámetros inmunofluorescentes como positividad para el CD14 y el CD45. En la Figura 25A se muestra, a la izquierda, la selección de la población de Mo del total de leucocitos de la muestra en base a la expresión de CD14, proteína receptora del LPS característica de linaje monocítico. Una vez seleccionada la población de Mo, se analizó la expresión proteica de CD11b, CD11c y CD18 en la superficie leucocitaria usando anticuerpos específicos contra cada integrina unidos al fluorocromo ficoeritrina (PE). Los gráficos de la derecha de la Figura 25A representan los histogramas de frecuencia para cada integrina con la valoración de la expresión proteica en términos de intensidad media de fluorescencia (MFI). En el gráfico de barras se representan los niveles de expresión de CD11b, CD11c y CD18 de cada condición experimental (Figura 25B). Se determinó que el tratamiento con Gen disminuyó significativamente la expresión basal de las tres integrinas (55, 68 y 45 %, debajo del control CD11b, CD11c y CD18 respectivamente) a diferencia del tratamiento con el LPS que las estimuló significativamente (30, 35 y 28 %, sobre el control CD11b, CD11c y CD18 respectivamente). Sin embargo, la exposición de los Mo al FE, previo al agregado del agente proinflamatorio, inhibió el estímulo sobre la expresión de las integrinas monocíticas inducidas por LPS.



Esquema 8

A-



B-

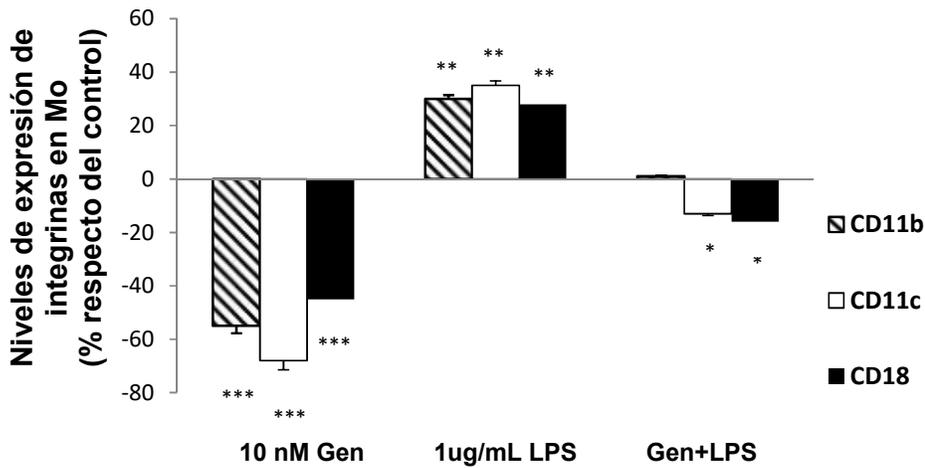


Figura 25. Efecto de Gen sobre la expresión de CD11b, CD11c y CD18 en monocitos

Las muestras de sangre entera fueron tratadas con Gen 10 nM o con el vehículo, durante 24 horas. LPS (1 µg/mL) se adicionó en las 2 últimas horas de tratamiento. Se procedió según lo descrito en Metodología. **A-** Los gráficos del centro de la Figura representan la selección de la población de los Mo con la expresión de las diferentes integrinas. Los histogramas de la derecha representan el nivel de expresión de cada una de ellas. **B-** El gráfico representa la cuantificación de los resultados expresados como porcentaje respecto al control. Los resultados representan al promedio \pm desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4). *p< 0.05, *p< 0.01, ***p< 0.001 respecto al valor de cada control.

Resumen:

Hasta aquí los resultados presentados muestran que a nivel de CE, la Genisteína estimula su crecimiento, movilidad y supervivencia. A nivel molecular, el fitoestrógeno promueve la síntesis de los vasoactivos (NO y VEGF) e inhibe la expresión de ICAM-1 endotelial. Se obtuvo evidencia de la participación del receptor de estrógenos en el mecanismo de acción del fitoestrógeno. El efecto de Genisteína se extiende a los monocitos, inhibiendo la expresión de integrinas que median la adhesión del monocito a la célula endotelial vía ICAM-1.

1.3. Efecto de Gen sobre CMLV

Para estudiar las acciones celulares de Gen sobre los procesos que intervienen en la alteración de la arquitectura vascular que involucra a la CMLV, se seleccionaron los parámetros de proliferación y migración de CMLV.

Inicialmente se estudió el efecto de Gen sobre la proliferación durante un periodo de tiempo comprendido entre 12 y 72 horas. Los cultivos de CMLV fueron sincronizados por privación de suero durante 24 horas y se midió la proliferación mediante la técnica de MTT. En la Figura 26 se observa que la cinética de crecimiento celular es máxima entre 12 y 24 horas, disminuye hasta las 48 horas de cultivo celular y, a partir de allí se mantiene estable hasta las 72 horas. La exposición al FE inhibió significativamente el crecimiento celular a partir de las 24 horas de tratamiento a todos los tiempos ensayados. El perfil de inhibición inducido por la acción de la isoflavona fue constante, con una modalidad bifásica, disminución del crecimiento entre 24 y 48 horas (45.5 % de inhibición) seguido de una fase estable hasta las 72 horas.

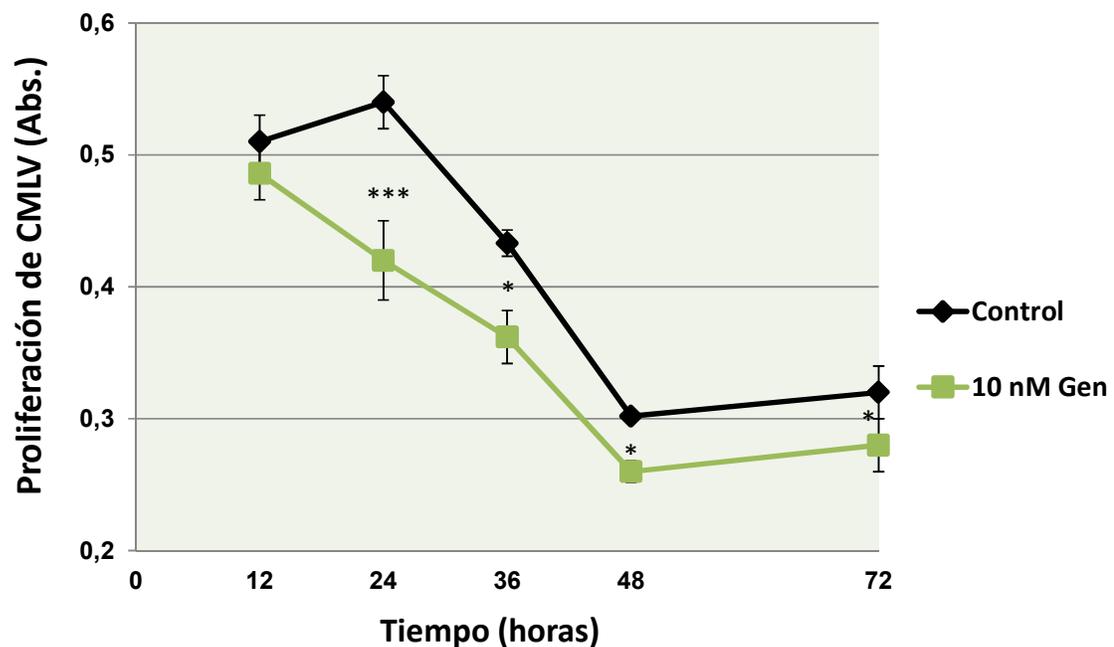


Figura 26. Efecto de Gen sobre la proliferación de CMLV

Las CMLV sincronizadas fueron tratadas con Gen 10 nM a los tiempos indicados. La proliferación se estudió por ensayo de MTT como se describe en Metodología. Los resultados representan el promedio \pm desvío estándar de cuatro experimentos independientes donde

cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4). *p< 0.05, ***p< 0.001 respecto a cada control.

Se evaluó el efecto de un amplio rango de concentraciones de Gen sobre la proliferación de CMLV a 24 horas de tratamiento. Como se observa en la Figura 27, todas las concentraciones (0.01-100 nM) disminuyeron la proliferación de CMLV, en magnitudes del 20-33% de inhibición. La mayor inhibición se observó con el tratamiento de Gen 10 nM.

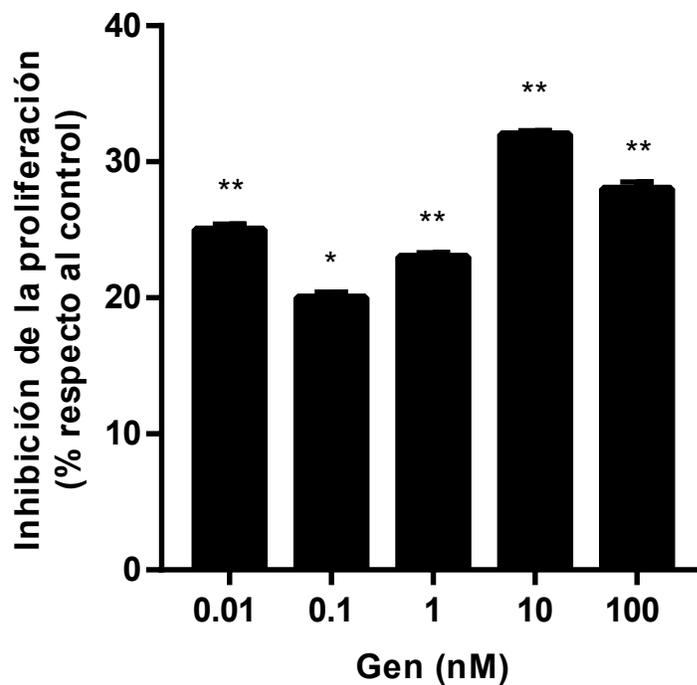


Figura 27. Efecto de Gen sobre la proliferación de CMLV

Las CMLV sincronizadas, fueron tratadas durante 24 horas con las concentraciones de Gen indicadas. La proliferación se estudió por ensayo de MTT como se describe en Metodología. Los resultados representan el promedio \pm desvío estándar de cuatro experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4). *p< 0.05, **p< 0.01 respecto al control.

Este perfil inhibitorio del crecimiento celular se confirmó por inmunocitoquímica, técnica que nos permitió visualizar el número de células en los distintos campos microscópicos en función del tratamiento ensayado. En la Figura 28 se presentan imágenes representativas de un ensayo en el cual las CMLV fueron tratadas con Gen 10 nM a los tiempos indicados. En azul se visualizan los núcleos teñidos con DAPI y en rojo el citoesqueleto teñido con Texas red. A la izquierda se observan las imágenes de las células control donde se evidencia una mayor densidad celular entre 12 y 24 horas respecto a las 48 horas (imágenes 1, 3 y 5). A la derecha, las fotografías muestran el efecto inhibitorio sobre el crecimiento celular inducido por Gen (imágenes 2, 4 y 6).

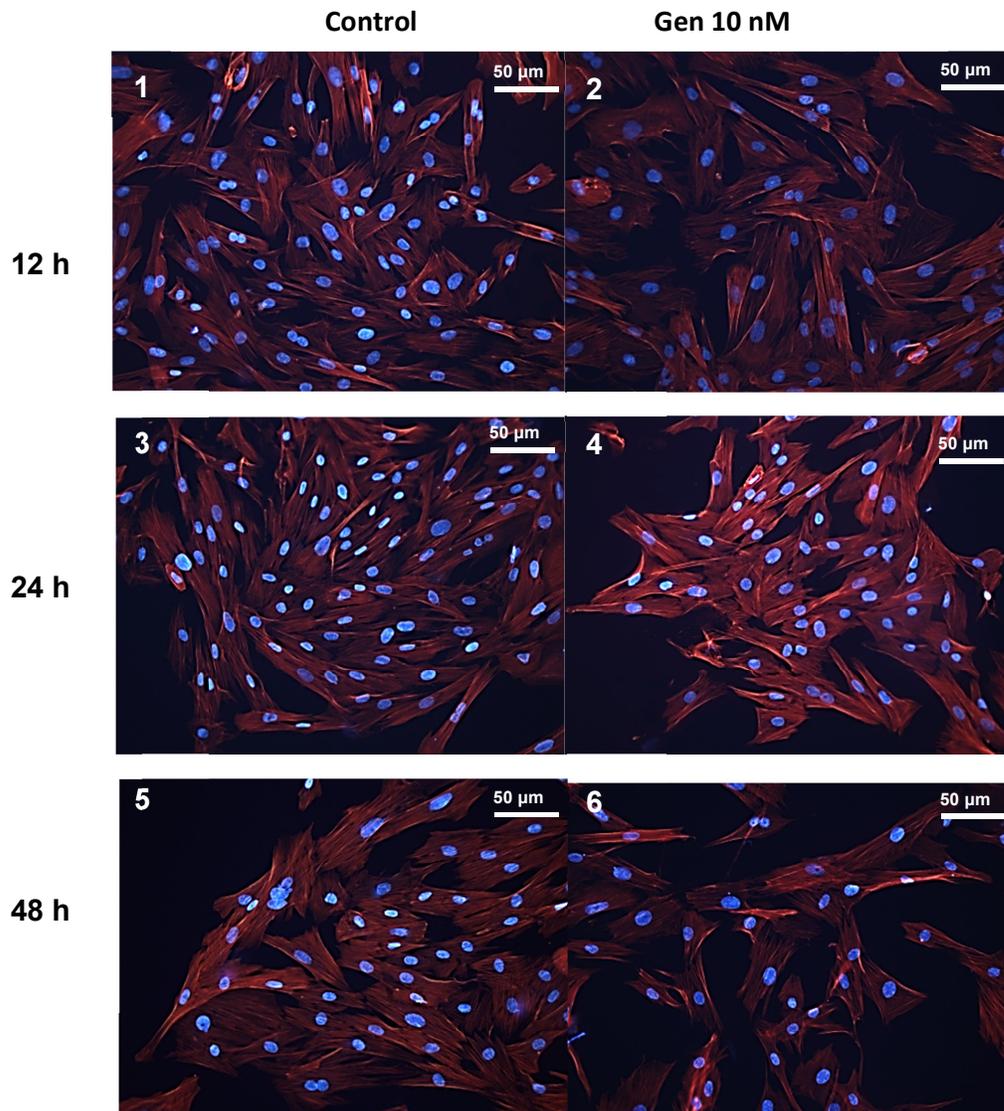
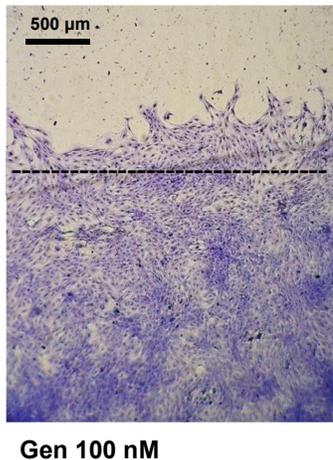
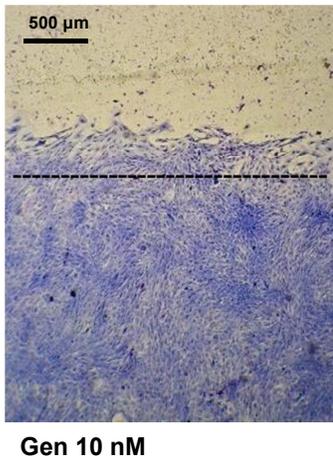
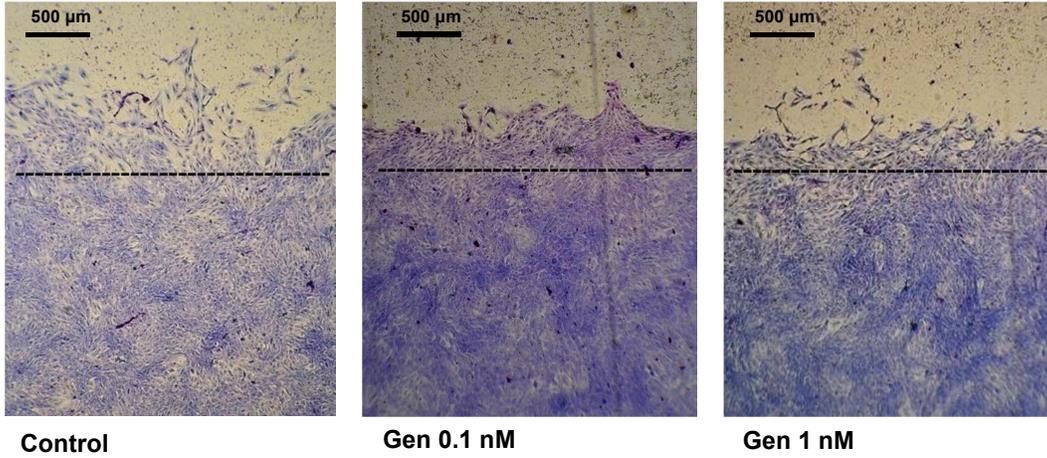


Figura 28. Efecto de Gen 10 nM sobre la proliferación de CMLV

Fotos representativas de la tinción diferencial (DAPI/Texas-Red) de CMLV tratadas con Gen 10 nM a los tiempos indicados.

Para estudiar el efecto de Gen sobre la migración de CMLV, se empleó la técnica de remoción de una hemicapa. Como se indicó anteriormente, esta técnica nos permite visualizar y cuantificar las células que se movilizan hacia el área denudada. Se evaluó la migración en respuesta a diferentes concentraciones de Gen. El FE inhibió la movilización de CMLV a todas las dosis ensayadas, con una magnitud del 84.1, 79.5, 86.7 y 75%, para Gen 0.1, 1, 10 y 100 nM, respectivamente. Las imágenes de la Figura 29A muestran CMLV teñidas con Giemsa en un ensayo de migración representativo donde se aprecia el efecto inhibitorio sobre la movilidad a 72 horas de tratamiento con diferentes concentraciones de la isoflavona. En el gráfico de barras de la Figura 29B se presentan los datos cuantitativos.

A-



B-

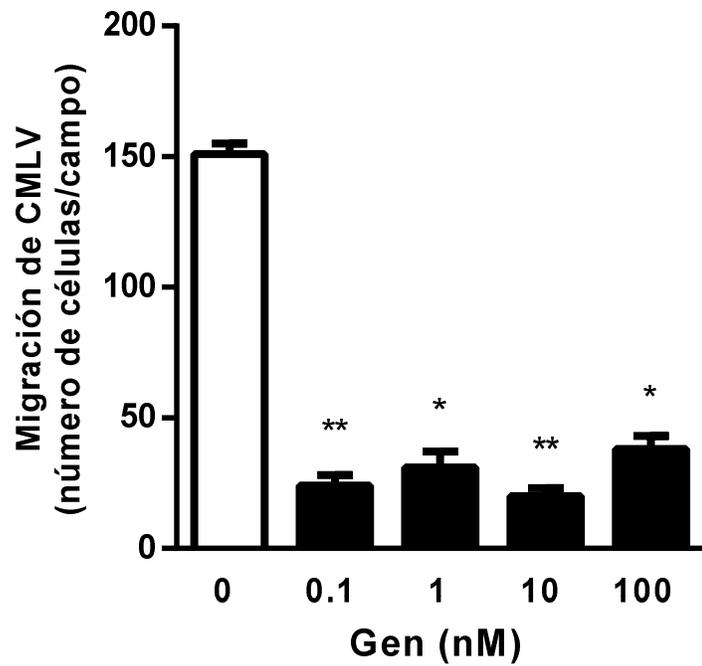


Figura 29. Efecto de Gen sobre la migración de CMLV

A la monocapa de CMLV en confluencia y sincronizadas se le realizó un corte transversal y se removió una hemicapa de CMLV como se describe en Metodología. Se realiza tratamiento con Gen a las dosis indicadas o durante 72 horas. A- Las fotografías (escala 500 µm, 40X)

corresponden a campos representativos de las condiciones experimentales. **B-** Los resultados representan al promedio \pm desvío estándar de células migrantes por campo obtenidas a partir de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4). * p<0.05, ** p<0.01 respecto al control.

1.4. Inducción de la transdiferenciación de CMLV

Como se describió en la introducción, la calcificación vascular comprende varios pasos, siendo la transdiferenciación de CMLV uno de los eventos cruciales. Como modelo experimental de transdiferenciación implementamos cultivos prolongados de CMLV en un medio procalcificante constituido por DMEM con el agregado de 10 mM de β -glicerofosfato y 4 mM de Calcio (DMEM/ β GP+Ca). En base a lo descrito en la literatura, estas condiciones inducen un rápido aumento de la proliferación celular, expresión de marcadores óseos y posterior calcificación de la matriz extracelular.

Iniciamos nuestros estudios caracterizando el sistema experimental. Sabiendo que una de las primeras modificaciones que induce el estrés calcificante está vinculada al cambio de fenotipo de la CMLV, de contráctil a proliferativo, se evaluó el crecimiento de CMLV expuestas 24 horas al medio procalcificante. Como se muestra en la Figura 30 el medio inductor de calcificación aumentó en un 20% el crecimiento celular.

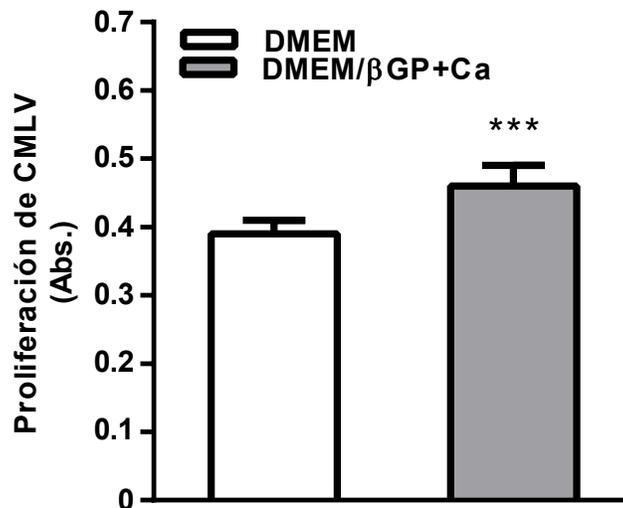


Figura 30. Proliferación de CMLV en un medio procalcificante

Las CMLV sincronizadas fueron incubadas durante 24 horas con medio de cultivo procalcificante. La proliferación se estudió por ensayo de MTT como se describe en Metodología. Los resultados representan el promedio \pm desvío estándar de cuatro experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado ($n=4$). *** $p < 0.001$ respecto al control.

Luego de incubar a las CMLV por 27 días en DMEM/ β GP+Ca evaluamos la expresión de marcadores óseos. Empleando la técnica de RT-PCR estudiamos el perfil de expresión del ARNm de un factor de transcripción clave en la diferenciación de los preOB, Runx2 y de la fosfatasa alcalina no específica de tejido que se expresa en CMLV transdiferenciadas (TNAP) (Chistiakov y col. 2015).

Por convención, para la descripción de los siguientes resultados definimos como CMLV-NT a las células musculares nativas cultivadas en medio control (DMEM) y, como CMLV-OB a las células transdiferenciadas por incubación en DMEM/ β GP+Ca durante 27 días. En la Figura 31 se muestra que la expresión de Runx2 y TNAP es prácticamente indetectable en CMLV-NT, mientras que sus niveles de ARNm aumentan 10 veces en presencia del medio procalcificante.

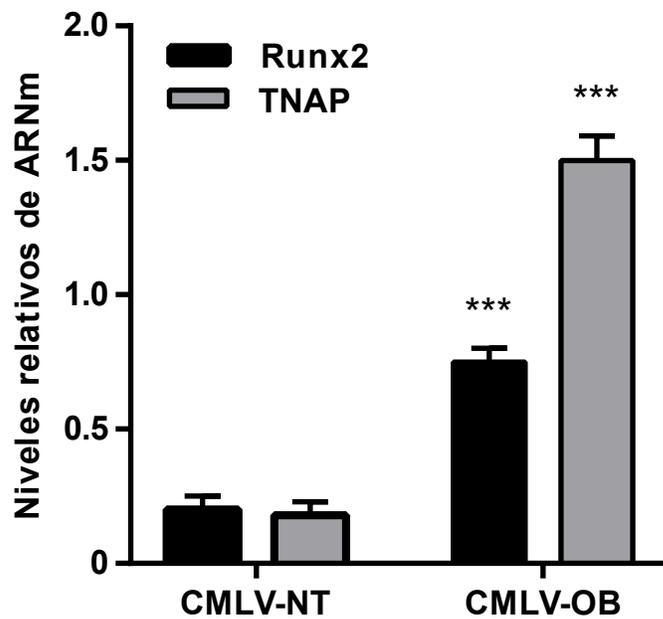
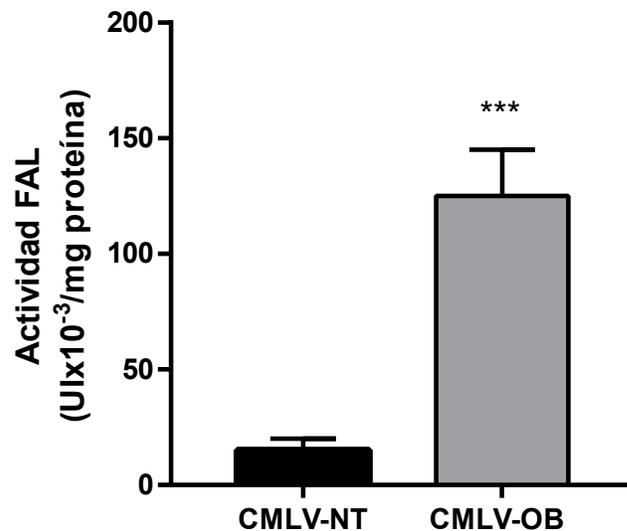


Figura 31. Estudio del perfil expresión de ARNm de Runx2 y TNAP en CMLV-NT y CMLV-OB

Las CMLV se incubaron durante 27 días en DMEM o en medio procalcificante. Los niveles de expresión del ARNm de Runx2 y TNAP se estudiaron por RT-PCR según se describe en Metodología. Los resultados representan la intensidad relativa de cada banda normalizada sobre los niveles del ARNm de GAPDH por análisis densitométrico usando el software ImageJ. Los resultados representan el promedio \pm el desvío estándar de dos experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4). ***p<0.001 respecto al valor de cada control.

Siendo que FAL es una de los principales marcadores de formación ósea y de actividad osteoblástica, procedimos a medir la actividad de esta enzima en nuestro modelo de transdiferenciación. En la Figura 32 se observa que las CMLV expuestas a DMEM/ β GP+Ca por 27 días presentan una actividad FAL 14 veces mayor respecto al control.

**Figura 32. Actividad FAL en CMLV-NT y CMLV-OB**

Las CMLV se cultivaron en DMEM o en β GP+Ca durante 27 días, y se cuantificó la actividad FAL usando un kit comercial como se describe en Metodología. Los resultados representan el promedio \pm desvío estándar de dos experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4). ***p<0.001 respecto a las nativas.

Para evaluar la mineralización extracelular trabajamos con dos procedimientos experimentales: a-extracción ácida del calcio por digestión de la matriz con HCl y posterior cuantificación espectrofotométrica empleando un kit comercial y, b- tinción de la matriz con rojo de Alizarina, colorante con alta afinidad por el calcio. Al evaluar el contenido mineral del medio extracelular se detectó que las CMLV-OB registraban un nivel de calcio 8 veces superior al de las nativas. La tinción con rojo de Alizarina determinó que el calcio se deposita en forma de nódulos refringentes con forma de sobre, característico de los cristales de calcio (Figura 33).

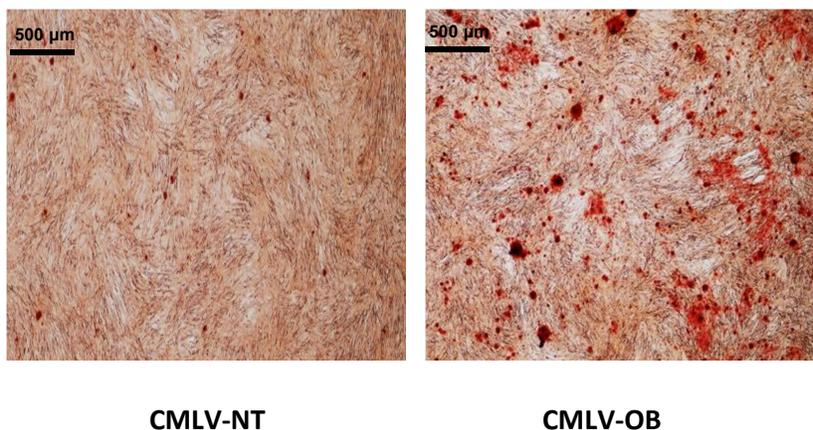
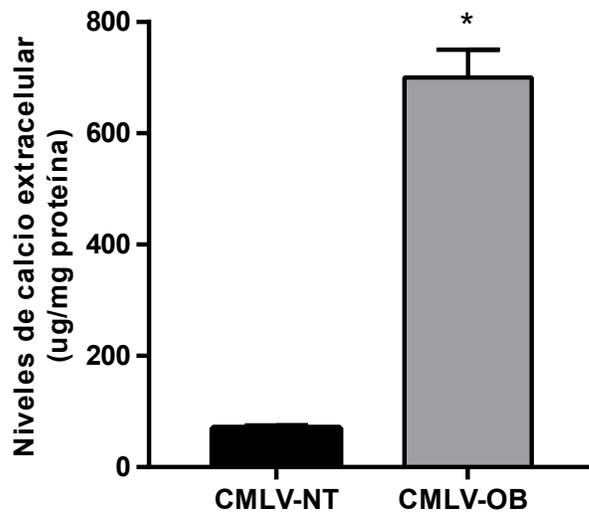


Figura 33. Calcificación de la matriz extracelular

Las CMLV se cultivaron en DMEM o en DMEM/ β GP+Ca por 27 días. La cuantificación del calcio se realizó luego de la descalcificación de la matriz extracelular con HCl, usando un kit comercial

como se describe en Metodología. Se muestran fotos representativas de cultivos, teñidas con rojo de Alizarina. La escala representa 500 μm (40X). Los resultados corresponden al promedio \pm desvío estándar de dos experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4). *p<0.05 respecto al control.

Por consiguiente, el aumento en la expresión de los marcadores óseos, el alto nivel de actividad FAL y la mineralización extracelular detectada en CMLV-OB nos permite concluir que el modelo experimental implementado es válido para el estudio de la transdiferenciación de CMLV.

1.5. Efecto de Gen sobre la transdiferenciación de CMLV a CMLV-OB

Establecido el modelo experimental procedimos a estudiar el efecto de Gen sobre la transdiferenciación de CMLV.

Previamente en la Figura 30 demostramos que el medio procalcificante estimuló la proliferación de CMLV. Para evaluar el efecto del FE, las monocapas de CMLV se expusieron al medio DMEM/ β GP+Ca en ausencia o presencia de Gen 10 nM. En la Figura 34 se puede observar que Gen suprimió el aumento en la proliferación inducida por el medio procalcificante.

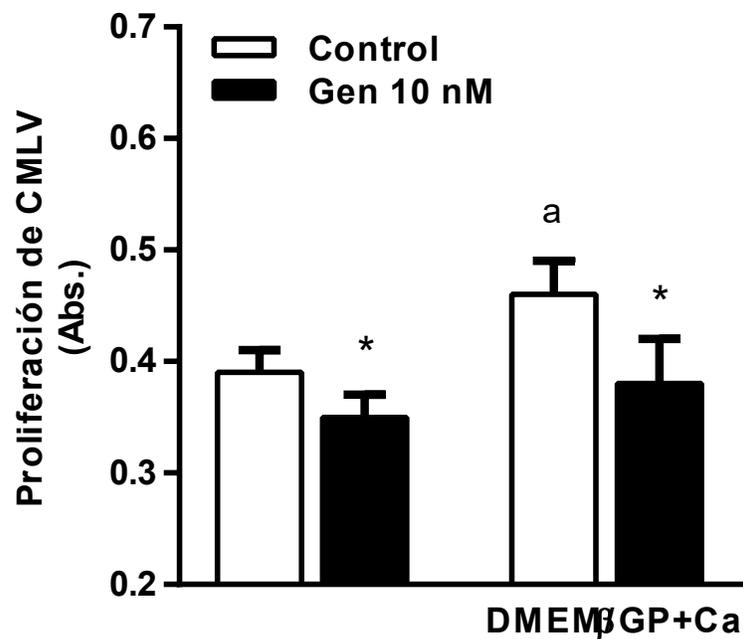


Figura 34. Efecto de Gen sobre la proliferación de CMLV en medio procalcificante

Las CMLV sincronizadas fueron incubadas durante 24 horas con DMEM o medio de cultivo procalcificante en presencia o ausencia de Gen 10 nM. La proliferación se estudió por ensayo de MTT como se describe en Metodología. Los resultados corresponden al promedio \pm desvío estándar de cuatro experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4). * p< 0.5 respecto al valor de cada control, ^ap<0.05 respecto al control con DMEM.

A partir de aquí los resultados que se presentan corresponden a cultivos de CMLV tratadas de forma continua con el FE durante 27 días de inducción de la calcificación. Al evaluar el efecto de diferentes concentraciones de Gen sobre la actividad FAL de CMLV, encontramos que Gen (0.1-10 nM) redujo significativamente la actividad a todas las dosis ensayadas (Figura 35). Las barras de la izquierda de la Figura 35, muestran que la actividad basal FAL de las CMLV-NT no se vio afectada por el tratamiento con Gen (0.1-10 nM).

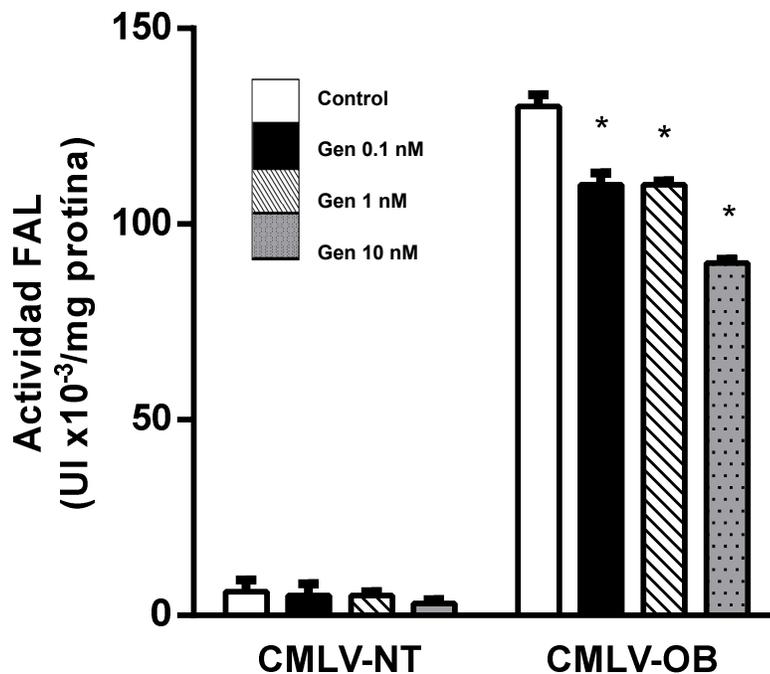


Figura 35. Efecto de Gen sobre la actividad FAL en CMLV-NT y CMLV-OB.

Las CMLV se cultivaron en DMEM o en el medio procalcificante durante 27 días de cultivo en presencia o ausencia de Gen. La actividad FAL se cuantificó usando un kit comercial como se describe en Metodología. Los resultados corresponden al promedio \pm desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado ($n=4$). * $p < 0.05$ respecto a cada control.

A continuación estudiamos el efecto de Gen sobre la calcificación de la matriz extracelular luego del tratamiento apropiado. Como se observa en la Figura 36, los tratamientos continuos con Gen (0.1-10 nM) durante 27 días disminuyeron significativamente el contenido de calcio de la matriz en CMLV-OB, mientras que en CMLV-NT no se evidenció efecto alguno.

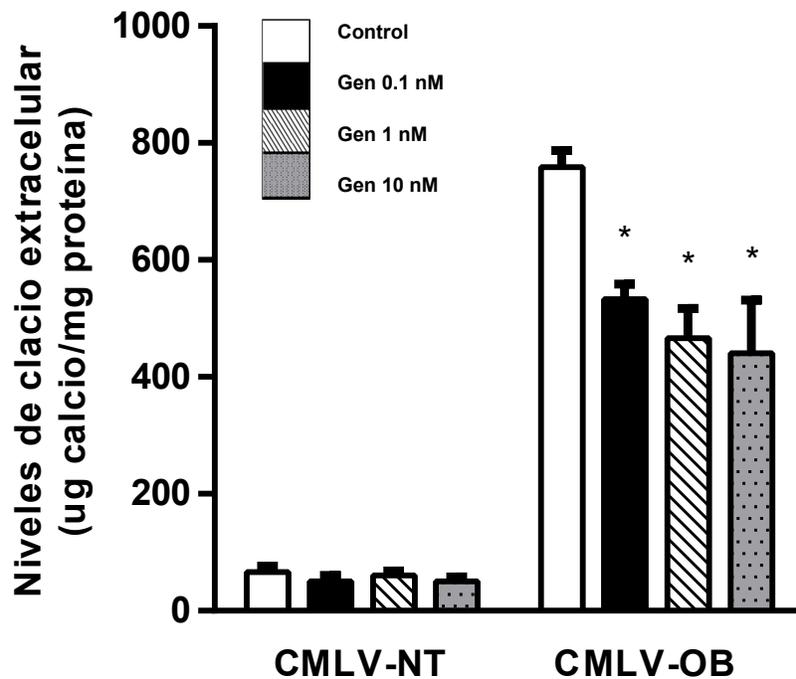


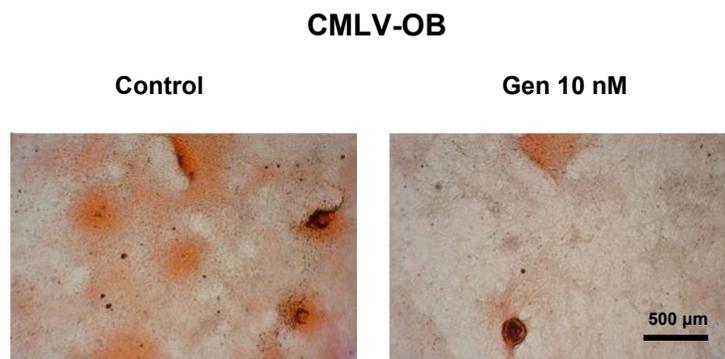
Figura 36. Efecto de Gen sobre el depósito de calcio extracelular en CMLV-NT y CMLV-OB

Las CMLV se cultivaron durante 27 días con DMEM o con medio procalcificante y se trataron durante los 27 días con Gen en las dosis indicadas. Se cuantificó el calcio depositado como se describe en Metodología. Los resultados corresponden al promedio \pm desvío estándar de tres

experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4). * $p < 0.05$ respecto al control.

Confirmamos éstos resultados empleando la técnica de tinción con Rojo de Alizarina. Las imágenes de la Figura 37A permiten apreciar los núcleos de calcificación que se distinguen por su color rojo. El colorante tiene alta afinidad por el mineral óseo, y su color se intensifica en forma proporcional al contenido de calcio. El tratamiento con Gen inhibió el depósito de calcio en la matriz extracelular como lo revela el menor número de nódulos de calcificación presentes. El gráfico de barras (Figura 37B) representa la cuantificación de la intensidad del color luego de la extracción con NaOH. Se puede apreciar una disminución progresiva de la cantidad de nódulos de calcificación en función de la concentración de Gen, evidenciándose el mayor efecto inhibitorio a 10 nM.

A-



B-

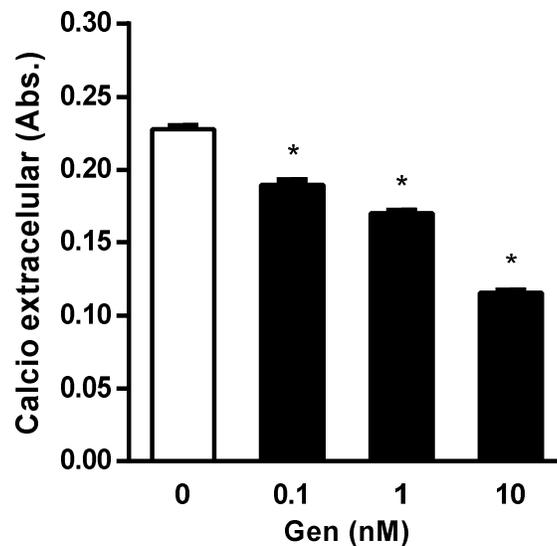


Figura 37. Efecto de Gen sobre la calcificación de la matriz en CMLV-OB

CMLV cultivadas con medio procalcificante se trataron con Gen en las dosis indicadas durante 27 días. **A-** Fotos de campos representativos de CMLV-OB en presencia o ausencia de Gen y teñidas con Rojo de Alizarina. **B-** El calcio depositado se cuantificó por la resuspensión del colorante Rojo de Alizarina con NaOH como se describe en Metodología. Los resultados corresponden al promedio \pm desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4). * $p < 0.05$ respecto al control.

1.6. Modelo *ex vivo* de calcificación vascular: efecto de Gen

A continuación nos planteamos evaluar la calcificación vascular en el tejido vascular intacto, es decir conteniendo todos los tipos celulares y conservando su estructura tisular. Para ello, usamos un modelo experimental *ex vivo*: aortas torácicas se incubaron en DMEM con β GP+Ca durante 14 días suplementado 10% de SFB. Las áreas de calcificación se visualizaron mediante tinción específica (nitrato de plata) que revela las zonas calcificadas por un color negro intenso. Acorde con lo descrito en la literatura, las fotografías de la Figura 38 muestran que las calcificaciones se ubican, principalmente, en el cayado y en la zona cercana a la bifurcación de la aorta descendente (Figura 38, centro). Para cuantificar el contenido de calcio incorporado, los tejidos se descalcificaron con ácido nítrico por 24 horas, y posteriormente se midieron los niveles de calcio usando un kit comercial. Como se observa en la Figura 39 el contenido de calcio en el tejido calcificado resultó ser cuatro veces mayor que en el control.

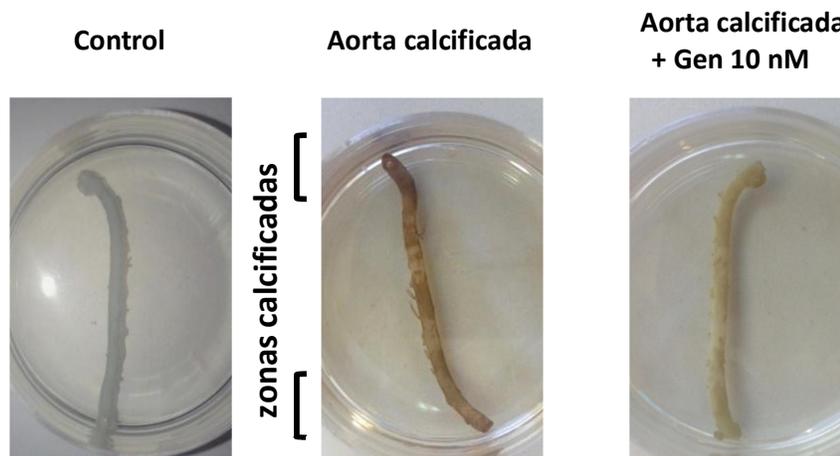
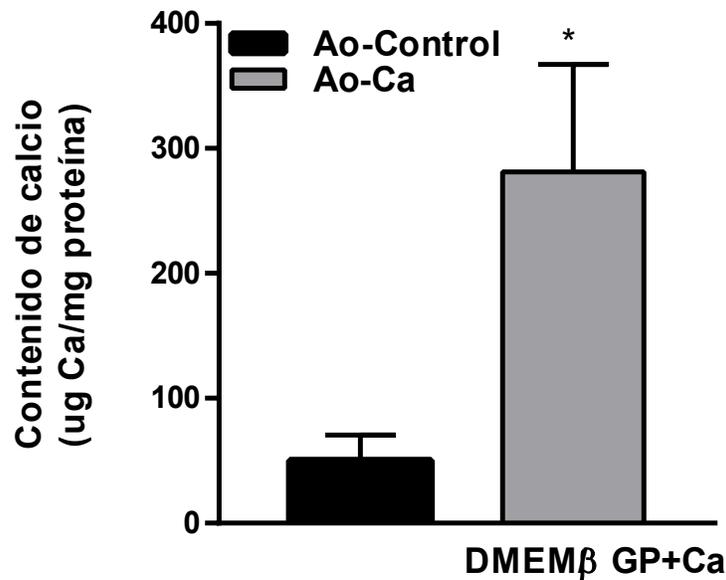


Figura 38. Calcificación de tejido aórtico.

Las fotos son representativas de Ao incubadas en DMEM o en medio procalcificante en presencia o ausencia de Gen durante 14 días. Las áreas de calcificación se visualizaron mediante la tinción con nitrato de plata como se describe en Metodología.

**Figura 39. Calcificación de tejido aórtico**

Las Ao fueron expuestas a DMEM o medio procalcificante durante 14 días. El calcio depositado se cuantificó en solución de ácido nítrico como se describe en Metodología. Los resultados corresponden al promedio \pm desvío estándar de dos experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4). *p < 0.05 respecto al control (DMEM).

Estudiamos el efecto de Gen sobre las calcificaciones vasculares en tejido intacto, realizando un tratamiento continuo con la isoflavona. Las Ao se cultivaron en DMEM con β GP+Ca durante 14 días en presencia de diferentes concentraciones de Gen. Observamos que el contenido basal de calcio en el tejido no inducido a calcificación no se modificó con el tratamiento con Gen (8.3 \pm 1.2 vs 8.1 \pm 0.8 mg Ca/mg proteína, control vs Gen 10 nM). En cambio la Figura 40 se aprecia que a todas las dosis ensayadas, Gen redujo la incorporación de calcio (20.1-57.4% de disminución, Gen 0.1-100 nM respectivamente), siendo más marcada la inhibición en los tratamientos con Gen 10 y

100 nM. Este efecto inhibitorio se puede visualizar en la imagen de la derecha de la Figura 38.

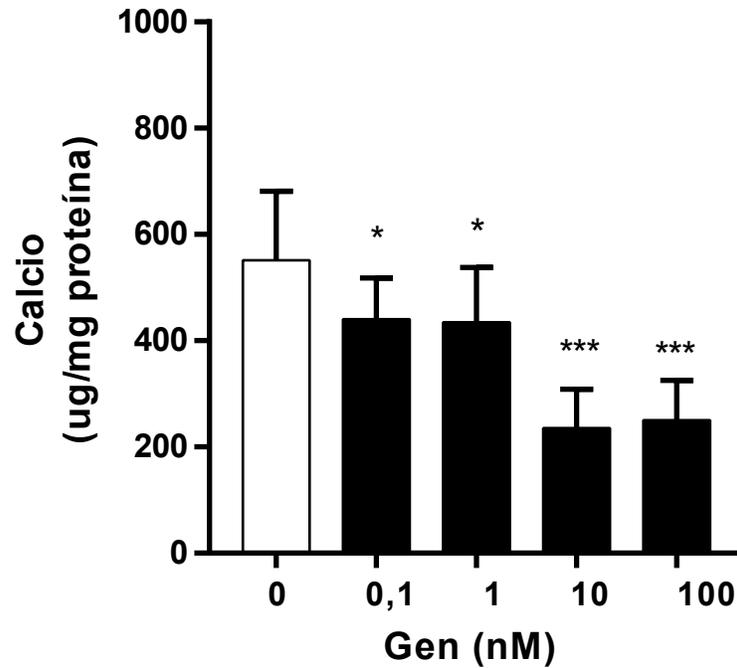


Figura 40. Efecto de Gen sobre la calcificación de Ao ex vivo

Las Ao incubados en medio procalcificante fueron tratadas con Gen en las dosis indicadas durante 14 días. El calcio depositado se cuantificó en solución de ácido nítrico como se describe en Metodología. Los resultados corresponden al promedio \pm desvío estándar de dos experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ respecto al control.

Resumen:

Los datos presentados muestran que se caracterizó y validó un modelo in vitro para estudiar la transdiferenciación de células musculares lisas vasculares, y se aportó evidencia que la Genisteína inhibe la calcificación vascular. Los resultados se corroboraron con experimentos ex vivo en tejido aórtico intacto.

CAPÍTULO 2: SISTEMA ÓSEO

Como se menciona en la introducción, las terapias alternativas con estrógenos de origen vegetal son opciones en la búsqueda de tratamientos para afecciones vasculares y óseas a consecuencia de la pérdida del efecto protector del estradiol en el hipoestrogenismo postmenopáusico. En este capítulo presentamos nuestros resultados del efecto de la isoflavona Gen sobre los procesos celulares que intervienen en la remodelación ósea. Específicamente estudiamos: osteoblastogénesis y osteoclastogénesis.

2.1. Efecto de Gen sobre osteoblastogénesis

2.1.i. Caracterización del sistema experimental

Se emplearon cultivos primarios de preOB obtenidos por digestión enzimática de calvaria de ratas neonatas hembras de hasta de 5 días de vida. Los preOB se cultivaron en un medio diferenciativo (DMEM-D), constituido por DMEM, con el agregado de 50 µg/mL ácido ascórbico y 10 mM de β-glicerofosfato al DMEM, suplementado al 1% de SFB.

La evolución de preOB a OB maduros implica una sucesión de eventos moleculares y celulares consecutivos. Uno de ellos es la expresión de factores de transcripción tempranos, como Runx2. Mediante la técnica de RT-PCR se evaluó el perfil de expresión de Runx2 a tres tiempos de cultivo: 3, 5 y 15 días. En la Figura 41 se observa que la mayor expresión de Runx2 se detectó a los 3 días de cultivo, para luego disminuir la señal a los 5 y 15 días. En la misma Figura se muestra también la expresión temprana de BMP2, REα y REβ. La aparición de estas proteínas y su perfil de expresión temporal es característica de linaje osteoblástico.

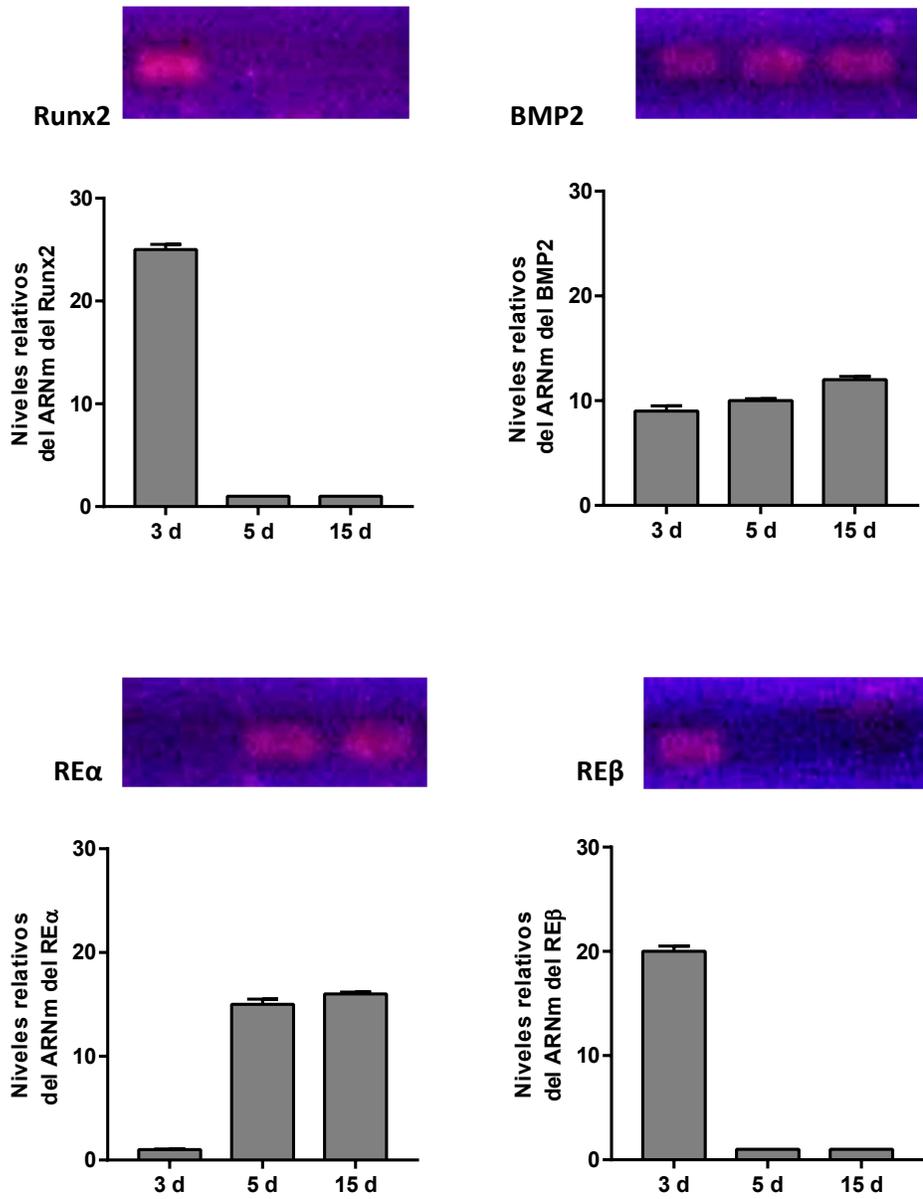


Figura 41. Perfil temporal de expresión de ARNm de Runx2, BMP, RE α y RE β

Los preOB se cultivaron a tres tiempos de ensayo en DMEM-D. Los niveles de expresión del ARNm de Runx2, BMP2, RE α y RE β se estudiaron por RT-PCR según se describe en Metodología. Los resultados representan la intensidad relativa de cada banda normalizada sobre los niveles del ARNm de GAPDH por análisis densitométrico usando el software ImageJ. Los resultados representan al promedio \pm desvío estándar de dos experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4).

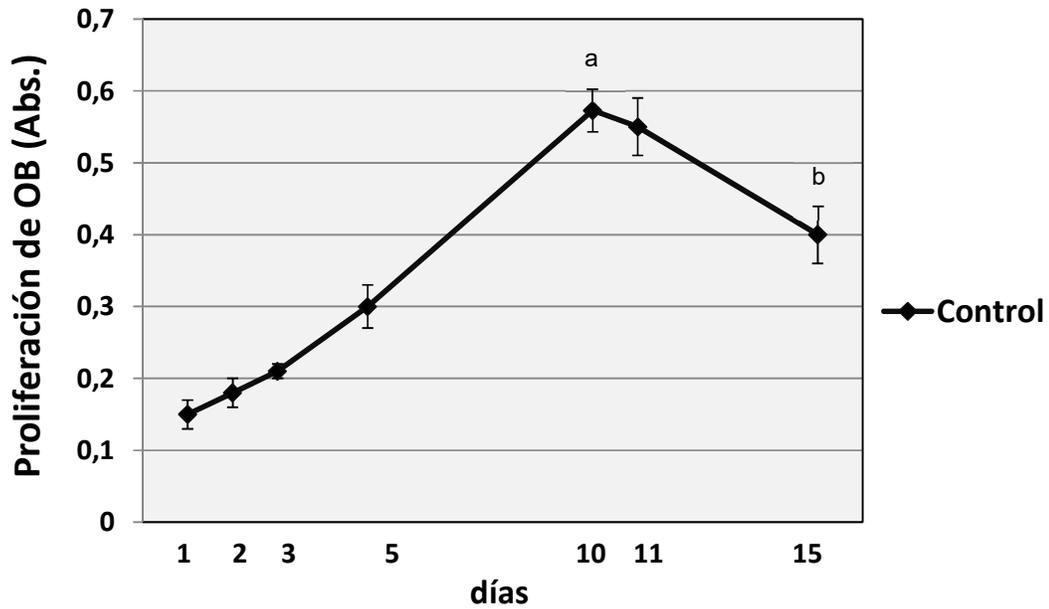


Figura 42. Proliferación de OB

Se emplearon cultivos de OB semiconfluentes y sincronizados. Se midió la proliferación mediante el ensayo de MTT a los tiempos indicados, como se describe en Metodología. Los resultados representan el promedio \pm desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado ($n=4$). ^a $p<0.001$ vs 1-3 días, ^b $p<0.01$ vs 10 días.

Al igual que toda célula indiferenciada que evoluciona a células madura comprometida con un linaje específico, la osteoblastogénesis implica una etapa inicial de alta proliferación que luego disminuye al predominar la etapa diferenciativa celular. Mediante ensayos de MTT, se estudió la cinética de proliferación de los OB a lo largo de 15 días de cultivo. Los preOB se cultivaron en DMEM con 1 % SFB. Como se observa en la Figura 42 la proliferación celular aumenta hasta el día 10, y luego las células ingresan en periodo de menor crecimiento.

Posteriormente, para evaluar la capacidad del OB de diferenciar a célula formadora de hueso, se seleccionaron dos parámetros, la actividad FAL y el depósito de calcio extracelular. Obtuvimos evidencia que en nuestro sistema experimental la actividad FAL se incrementó con los días de cultivo, siendo máxima a 12 días (Figura 43).

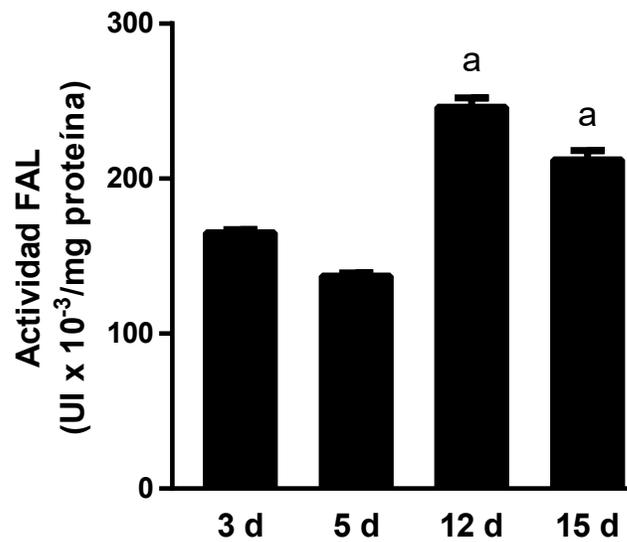


Figura 43. Estudio temporal de la actividad FAL en OB.

Los preOB se cultivaron en DMEM-D. La actividad FAL se cuantificó a los tiempos ensayados, como se describe en Metodología. Los resultados representan al promedio \pm desvío estándar de dos experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4), ^ap<0.5 respecto a 3-5 días.

Con la finalidad de evaluar la capacidad del OB de calcificar la matriz extracelular, se cultivaron preOB en medio diferenciativo a tres tiempos de ensayo: 3, 5 y 15 días. Las células se fijaron y la calcificación de la matriz se evidenció usando la tinción con Rojo de Alizarina. En la Figura 44 se observa que la presencia de los nódulos de calcificación es significativamente mayor a 15 días de cultivo.

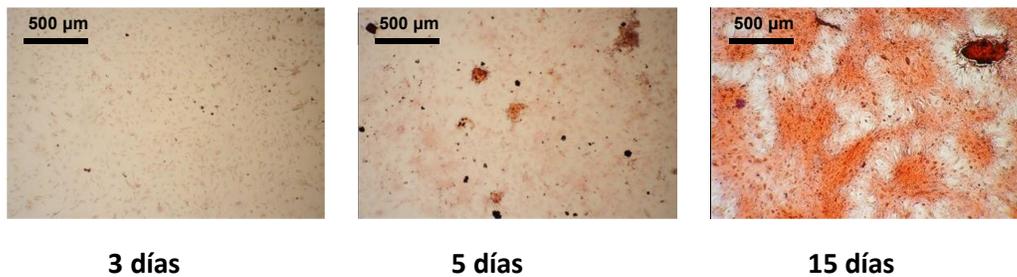


Figura 44. Estudio temporal de calcificación de la matriz extracelular.

Los preOB se cultivaron en DMEM-D a los tiempos indicados y luego fueron teñidos con Rojo de Alizarina. Las fotografías corresponden a campos representativos de las condiciones experimentales (escala 500 μm , 40X). Los resultados representan al promedio \pm desvío estándar de dos experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4).

La Figura 45 resume la evolución de los marcadores de osteoblastogénesis estudiados. De su análisis se desprende que nuestro sistema experimental es aplicable al estudio de la diferenciación de preOB a OB, ya que los parámetros estudiados varían de acuerdo con lo descrito en literatura para osteoblastogénesis (Hsieh y col. 2010; Hu y col. 2011; Wiren y col. 2002).

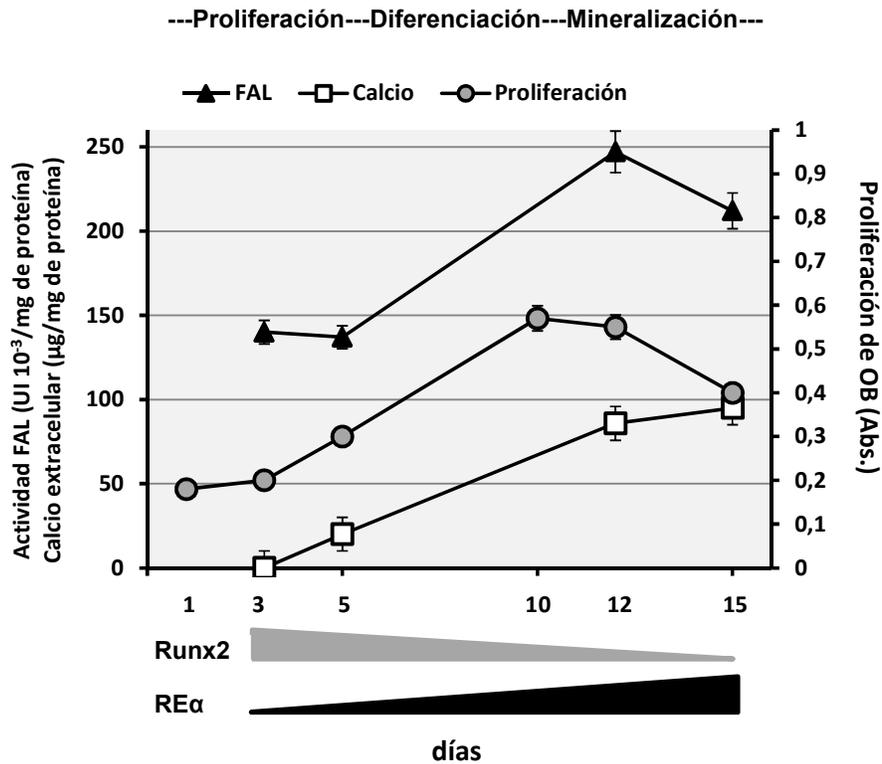
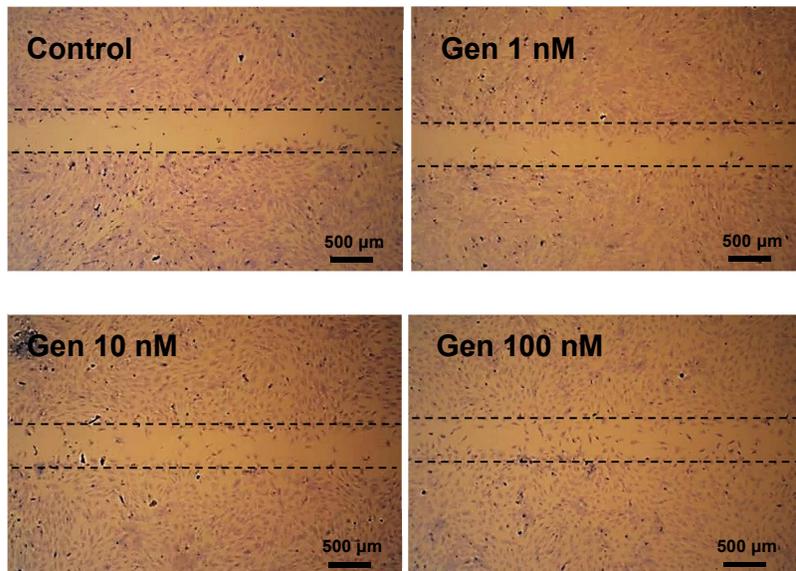


Figura 45. Evolución temporal de marcadores de osteoblastogénesis

2.1.ii. Estudio del efecto de Gen sobre la osteoblastogénesis

Para esta parte del trabajo de tesis empleamos el mismo rango de concentraciones de Gen que el utilizado en el sistema vascular las que a su vez, según literatura, a nivel óseo actúan vía RE (Liao y col. 2014). Sabiendo que los preOB exhiben capacidad migratoria necesaria para movilizarse al sitio de remodelación/reparación, comenzamos estudiando el efecto de Gen sobre la migración de preOB empleando tres concentraciones de Gen (1, 10 y 100 nM). En las fotos de las Figura 46A se muestran campos microscópicos en los que se puede observar como las células bajo estímulo de Gen se movilizaron hacia el área denudada cerraron parcialmente la herida. En la Figura 46B se muestra que todas las concentraciones estudiadas estimularon significativamente la migración de los preOB (0.7, 1 y 2.6 veces sobre el basal, respectivamente).

A-



B-

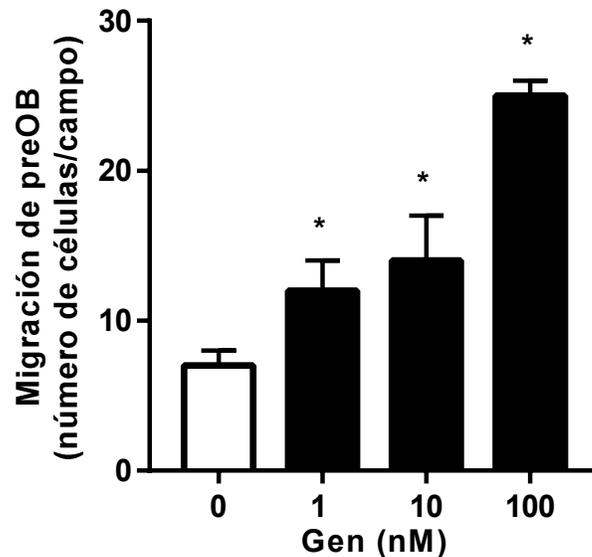


Figura 46. Efecto de Gen sobre la migración de preOB

Los preOB fueron incubados en DMEM suplementado con 1% de SFB. Se realizó un corte transversal y se removió un sector de la monocapa de OB como se describe en Metodología. Las células se trataron con Gen a las concentraciones indicadas o vehículo durante 12 horas. **A-** Se muestran fotos de campos representativos de cultivos teñidos con Giemsa. Las líneas punteadas delimitan el sector denudado de células (escala representa 500 μm , 40X). **B-** Los resultados representan el promedio \pm desvío estándar del número de células migrantes por campo de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4). * $p < 0.05$ respecto al control.

Seguidamente estudiamos el efecto de Gen sobre la proliferación de los OB. En la Tabla 3 se muestran los resultados de experimentos con OB tratados con Gen (10 nM - 1 μM) por 24, 48 y 72 horas. Como se puede observar, el tratamiento con Gen no modificó el nivel de crecimiento celular respecto al control, a ninguna de la dosis y tiempos ensayados. Los resultados fueron confirmados por conteo celular.

(Abs.)	Control	10 nM	100 nM	1 μM
24 horas	0.24±0.03	0.22±0.02 (ns)	0.23±0.02 (ns)	0.22±0.02 (ns)
48 horas	0.26±0.03	0.21±0.01 (ns)	0.22±0.02 (ns)	0.24±0.04 (ns)
72 horas	0.14±0.01	0.14±0.01 (ns)	0.14±0.02 (ns)	0.13±0.01 (ns)

Tabla 3. Efecto de Gen sobre la proliferación de preOB

Los preOB sincronizados en DMEM con 1% de SFB, fueron tratados durante 24, 48 o 72 horas con Gen (10-100 nM - 1 μM). La proliferación se estudió por ensayo de MTT como se describe en Metodología. Los resultados corresponden al promedio ± desvío estándar de cuatro experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4).

Evaluamos el efecto de Gen 10 nM sobre la expresión de Runx2, en cultivo de preOB tratados con Gen 3 y 5 días. Al finalizar los experimentos las células se lisaron y el ARNm de Runx2 se aisló y amplificó empleando la técnica de RT-PCR. En la Figura 47 se observa que el nivel de ARNm para Runx2 aumentó significativamente luego de 5 días de tratamiento con Gen. Los geles de la misma Figura muestran los resultados de un ensayo representativo y el gráfico de barras, la cuantificación de las bandas en cada gel. A 3 días de tratamiento no se detectaron cambios vs control.

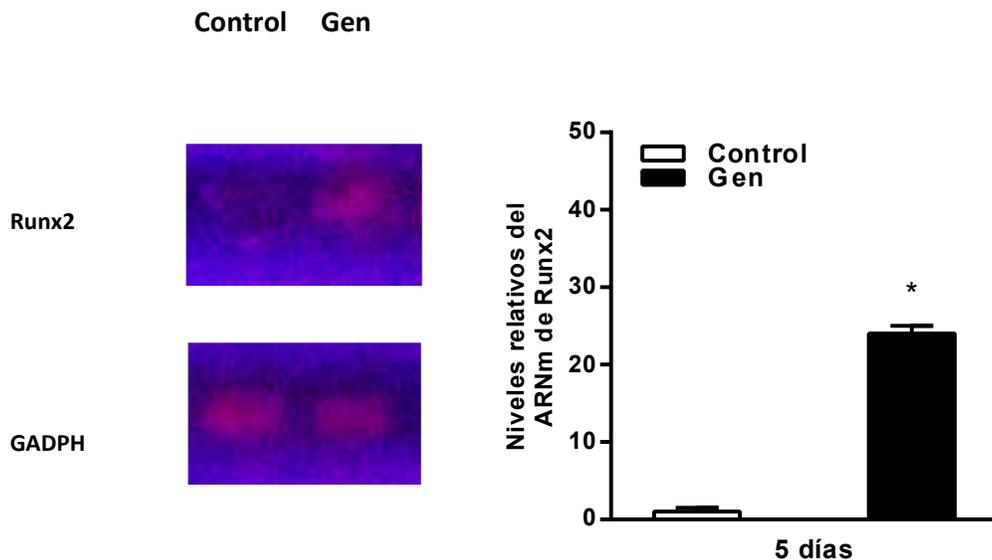


Figura 47. Efecto de Gen sobre los niveles de expresión del ARNm de Runx2

Los preOB fueron tratados con Gen 10 nM durante 5 días de cultivo en DMEM-D suplementado con 1% de SFB. Los niveles de expresión del ARNm de Runx2 se estudiaron por RT-PCR según se describe en Metodología. Las fotografías muestran los productos de amplificación obtenidos. Los resultados corresponden al promedio \pm desvío estándar de cuatro experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4).
*p< 0.05 respecto al control.

En forma equivalente estudiamos el efecto de Gen sobre la expresión del ARNm de RE α . Evaluamos la acción del FE en los primeros estadios de diferenciación OB a 3 y 5 días de cultivo celular. En la Figura 48 se muestra a la izquierda, geles representativos de un ensayo y a la derecha, el gráfico de barras correspondiente a la cuantificación. Genisteína incrementó significativamente los niveles de ARNm de RE α a los días estudiados con una magnitud de aumento mayor a 3 días (17 veces respecto al control).

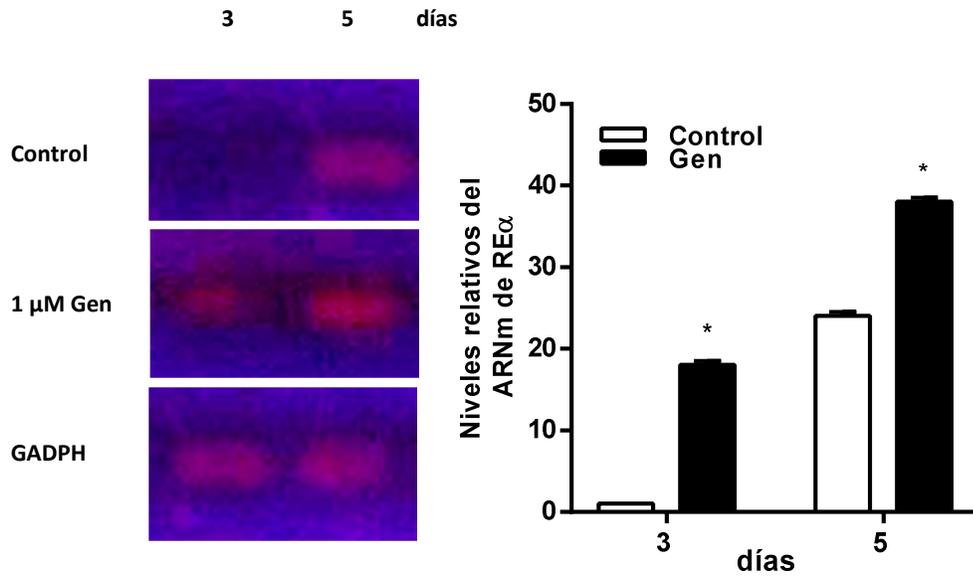


Figura 48. Efecto de Gen sobre los niveles de expresión del ARNm del ER α

Los preOB fueron tratados con Gen 1 μ M durante 3 y 5 días de cultivo en DMEM-D suplementado con 1% de SFB. Los niveles de expresión del ARNm del RE α se estudiaron por RT-PCR según se describe en Metodología. Las fotografías muestran los productos de

amplificación obtenidos. Los resultados corresponden al promedio \pm desvío estándar de cuatro experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4).

*p<0.05 respecto a cada control.

A continuación evaluamos la acción de la isoflavona sobre marcadores tardíos de diferenciación, como son la actividad FAL y la formación de la matriz extracelular (depósito de colágeno y mineralización).

Se midió la actividad FAL en el lisado celular de cultivos de OB tratados con Gen durante 3, 5, 12 y 15 días. La Figura 49 muestra que a tiempos cortos de cultivo no se obtuvieron cambios en la actividad FAL entre control y tratado. En cambio, a 12 días de cultivo el FE estimuló en un 70-80% sobre el control la actividad enzimática. Estímulos similares se observaron a los 15 días de cultivo.

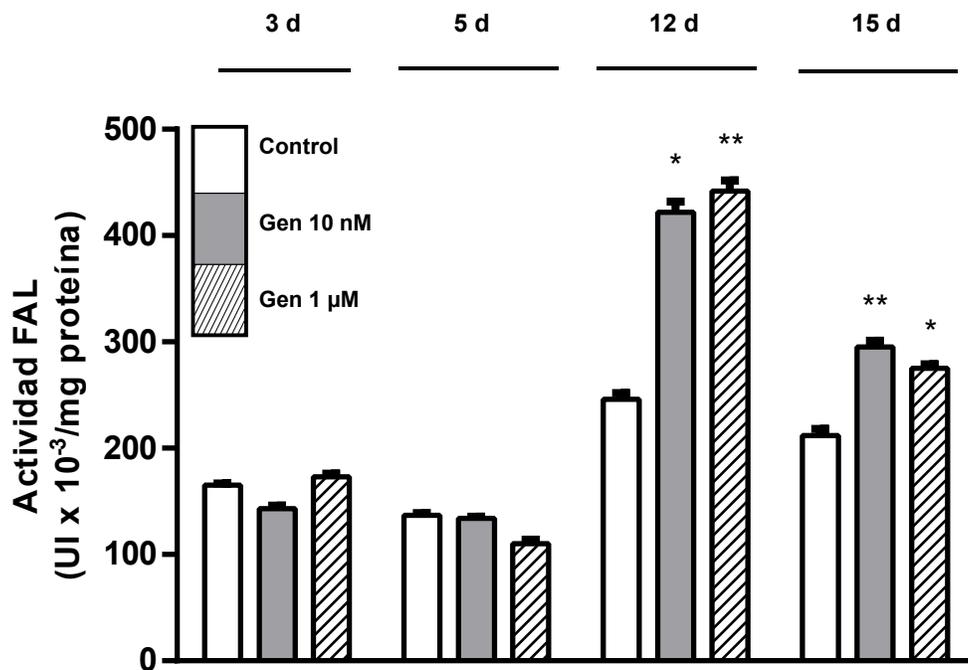


Figura 49. Efecto de Gen sobre la actividad FAL de OB en cultivo.

Osteoblastos fueron cultivados por 3, 5, 12 y 15 días en presencia o ausencia de Gen a las concentraciones indicadas. La actividad FAL se cuantificó como se describe en Metodología. Los resultados corresponden al promedio \pm desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4). *p < 0.05, **p < 0.01 respecto a cada control.

La matriz extracelular esta constituida por mineral (hidroxiapatita) y componente proteico (colágeno, osteocalcina, osteopontina y proteínas minoritarias) que otorgan estructura, rigidez y estabilidad ósea. Estudiamos el efecto de Gen sobre el depósito de colágeno. Para ello, trabajamos con cultivos de OB tratados 11 días con Gen 10 nM y 1 μ M. La Figura 50 muestra que Gen estimuló el depósito de colágeno en un 60 y 79%, 10 nM y 1 μ M respectivamente. En microfotografías el depósito de colágeno se identificó por la presencia de acúmulos rojos teñidos con Rojo Sirio, colorante con alta afinidad por el colágeno extracelular.

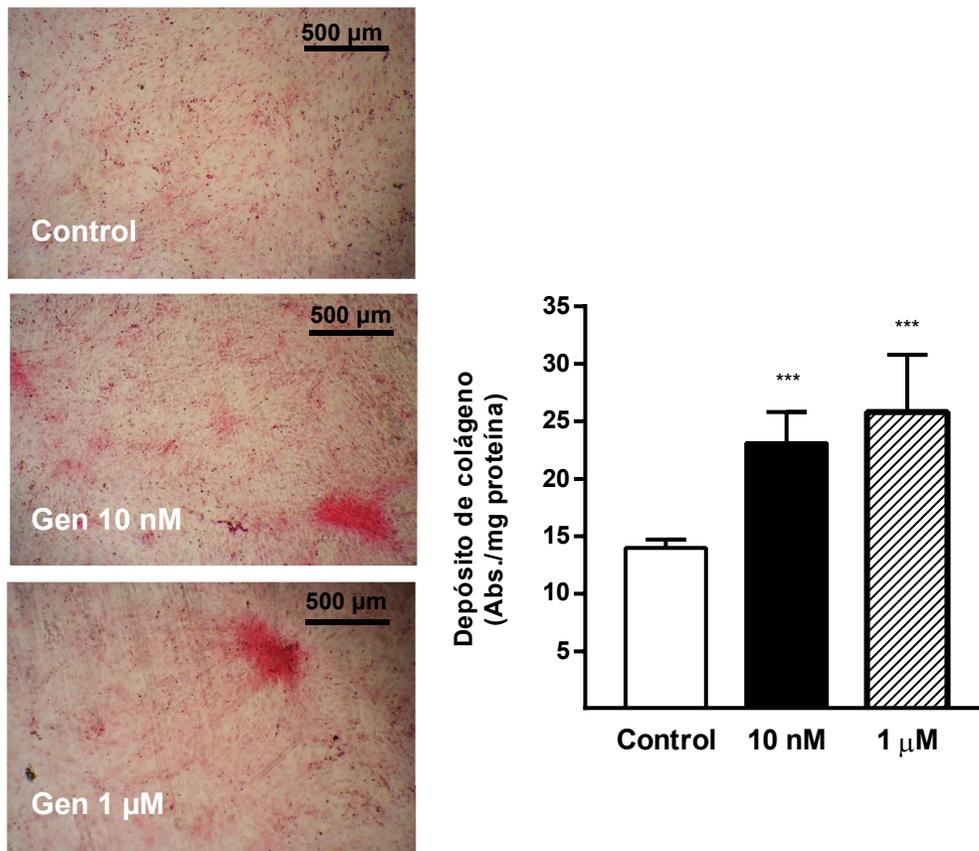


Figura 50. Efecto de Gen sobre el depósito de colágeno extracelular.

Los OB cultivados en DMEM-D se trataron 11 días con Gen 10 nM y 1 μ M. El depósito de colágeno se determinó por resuspensión de Rojo Sirio como se describe en Metodología. Las fotos muestran campos representativos de las condiciones experimentales (escala 500 μ m, 40X). Los resultados corresponden al promedio \pm desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4). ***p < 0.001 respecto al control.

Respecto a la mineralización extracelular evaluamos el efecto de Gen 10 nM y 1 μ M sobre la calcificación de la matriz a 12 y 15 días de cultivo, tiempos a los cuales según datos de la Figura 44, se evidencia la calcificación de la matriz. En la Figura 51 se observa que a 12 días de cultivo las dos concentraciones de Gen aumentaron significativamente el contenido de calcio en matriz con una magnitud de 46.5 y 142.4%

sobre el control, Gen 10 nM y Gen 1 μ M respectivamente, a 12 días de cultivo. El efecto estimulador de Gen se mantuvo a 15 días de cultivo.

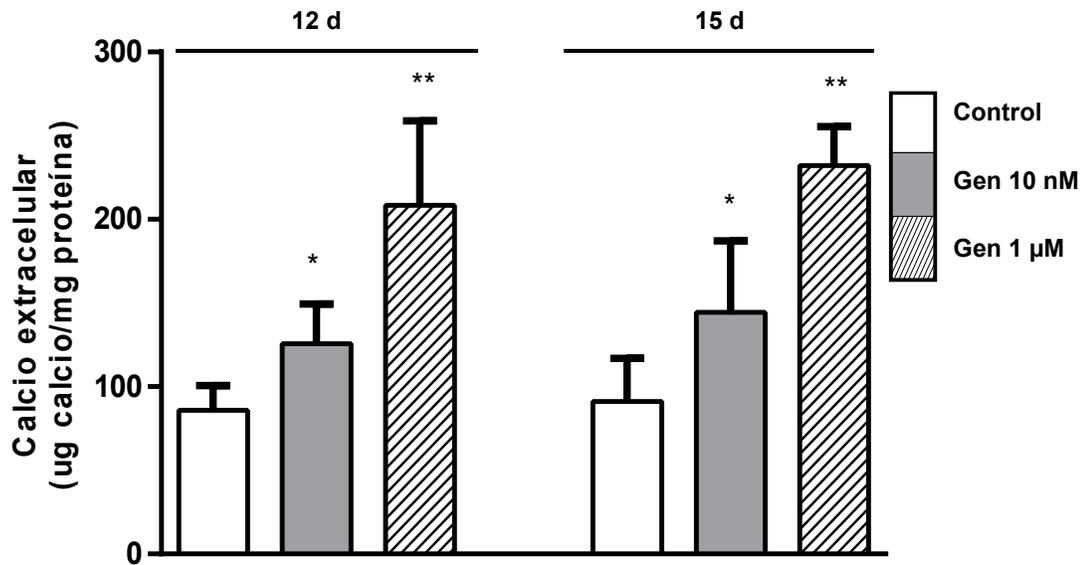


Figura 51. Efecto de Gen sobre la calcificación de la matriz osteoblástica

Los OB cultivados en DMEM-D se trataron con Gen a las dosis indicadas durante 12 o 15 días. El calcio depositado se cuantificó como se describe en Metodología. Los resultados corresponden al promedio \pm desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado ($n=4$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ respecto a cada control.

Confirmamos estos resultados empleando la tinción Rojo de Alizarina. Para ello, usamos monocapas de OB de 15 días de cultivo. La Figura 52 muestra imágenes de un ensayo representativo donde se distingue un aumento en el número de núcleos de calcificación a las dos dosis de Gen ensayadas. El gráfico de barras de la derecha representa la cuantificación del contenido de calcio de los nódulos luego de la extracción con NaOH 1 N.

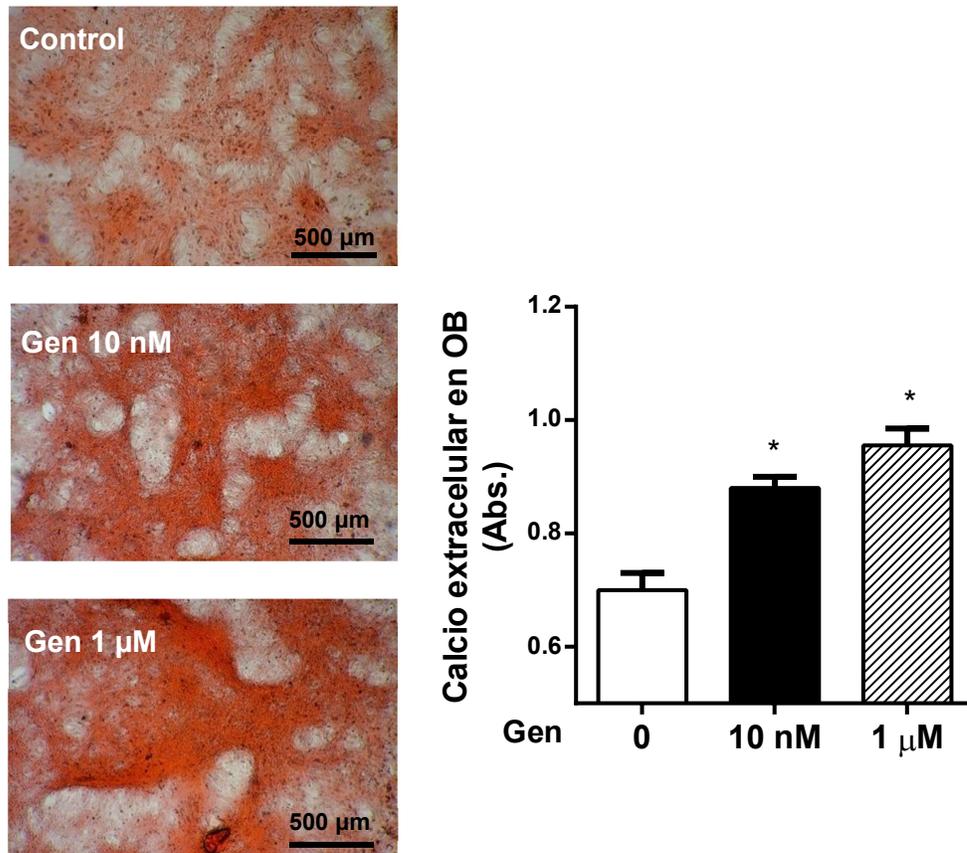


Figura 52. Efecto de Gen sobre la calcificación de la matriz en cultivos OB

Los OB en DMEM-D se trataron con Gen en las dosis indicadas durante 15 días. El calcio depositado se cuantificó por resuspensión del colorante rojo de Alizarina con NaOH como se describe en Metodología. Las fotos muestran campos representativos de las condiciones experimentales (escala 500 μm , 40X). Los resultados corresponden al promedio \pm desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado ($n=4$). * $p < 0.05$ respecto al control.

Resumen:

Los datos obtenidos evidencian que el tratamiento con Genisteína promueve la formación de la matriz extracelular, incrementando el depósito de colágeno y de calcio, eventos característicos de la diferenciación osteoblástica.

2.2. Efecto de Gen sobre la osteoclastogénesis

2.2.i. Caracterización de la diferenciación de Mo a OC

Sabiendo que los OC son células diferenciadas que derivan de precursores hematopoyéticos, para estudiar la osteoclastogénesis empleamos Mo aislados de sangre entera. Morfológicamente, un OC maduro y diferenciado se caracteriza por poseer 3 ó más núcleos y una membrana apical con borde en cepillo, bioquímicamente y por la expresión de enzimas líticas y de fosfatasa ácida tartrato resistente (TRAP).

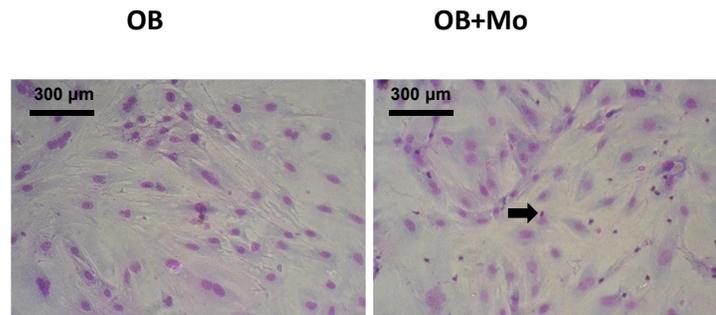
Como parámetros de diferenciación seleccionamos:

- a) capacidad de adhesión a OB
- b) cambios morfológicos (presencia de 3 o más núcleos)
- c) tinción TRAP positiva

En la Figura 53A se muestran fotos de un ensayo representativo de adhesión de Mo a OB a 4 horas de cocultivo. En las imágenes se puede apreciar que 4 horas fueron suficientes para que un gran número de Mo se adhieren a la monocapa de OB.

Posteriormente se evaluó la capacidad de los Mo de diferenciar a un fenotipo osteoclastico, en función del tiempo de cocultivo. Al final de cada ensayo los cocultivos se tiñeron usando un kit comercial para TRAP. En la Figura 53B se presentan tres fotos representativas del progreso de la diferenciación de Mo a OC a lo largo de los 21 días de cocultivo. Como puede observarse, el tamaño de los Mo aumentó con el tiempo de cocultivo. A los 14 días se distinguen células TRAP positivas con una morfología típica de OC, presentan 3 núcleos y con un borde simil "cepillo". Conforme avanzaron los días del cocultivo, la tinción TRAP positiva se intensificó y aumentó la presencia de células multinucleadas con una membrana apical claramente definida de borde en cepillo con numerosas vesículas asociadas (21 días). De hecho, se distingue un tamaño celular significativamente mayor a 21 días respecto a los 11 días. Estos cambios fueron observados en los sucesivos campos microscópicos evaluados.

A-



B-

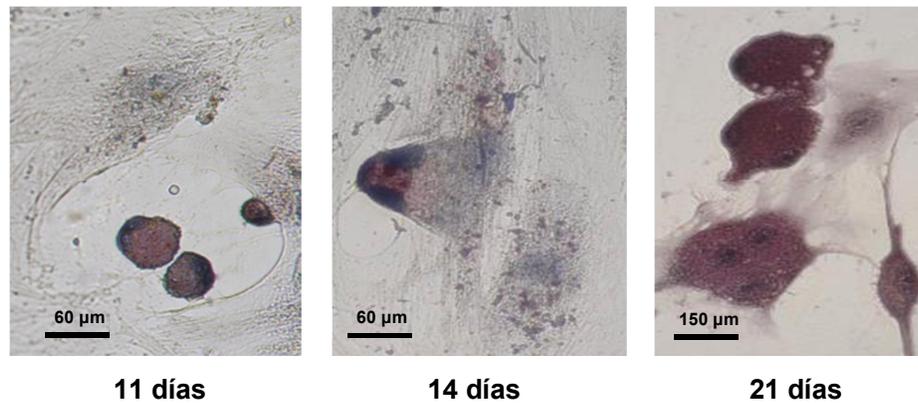


Figura 53. Diferenciación de OC a partir de precursores Mo

Los Mo aislados de sangre entera obtenida por punción intracardiaca, fueron agregados a la monocapa de OB cultivados en DMEM-D. **A-** La foto de la izquierda corresponde a un campo representativo de la monocapa de OB y la de la derecha, a la adhesión de Mo a OB a 4 horas de cocultivos (la flecha señala Mo ubicado cerca del núcleo del OB). Los cocultivos fueron teñidos con Giemsa (escala 300 µm, 200X). **B-** Las fotos corresponden a campos representativos de Mo sembrados sobre OB a diferentes días de cocultivo. Los cocultivos fueron teñidos con tinción TRAP (escala 150-60 µm, 100-400X).

Habiendo caracterizado nuestro sistema, estudiamos el efecto de Gen sobre la adhesión de Mo (4 horas de tratamiento) y sobre la diferenciación a OC (a los 21 días de cocultivo). En la Figura 54 se observa que 4 horas de tratamiento con Gen 10 nM estimularon significativamente la adhesión del leucocito al OB (77% sobre el control).

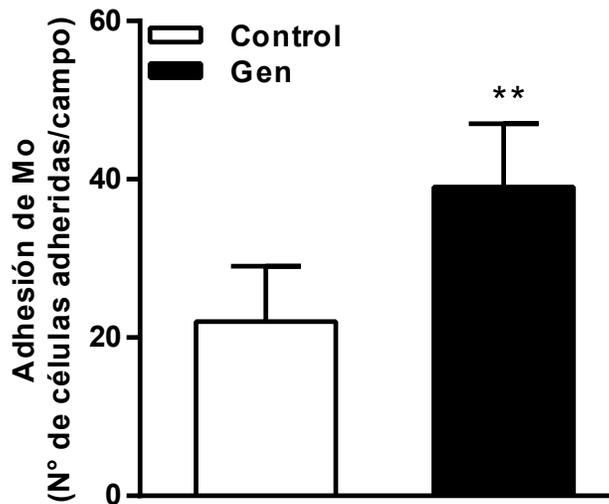
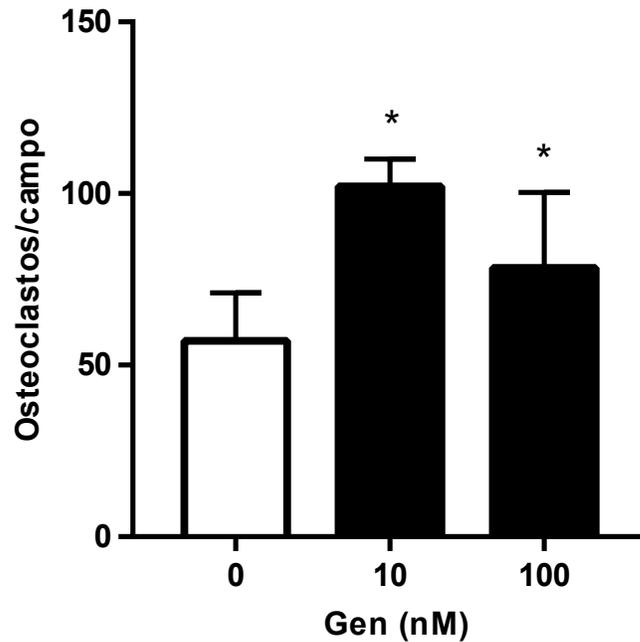


Figura 54. Efecto de Gen sobre la adhesión de Mo a OB en cultivo

Los Mo fueron sembrados sobre la monocapa de OB y el cocultivo se trató por 4 horas con Gen 10 nM. La adhesión de Mo a OB se midió como se detalla en Metodología. Los resultados representan la promedio \pm desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4). **p< 0.01 respecto al control.

Para evaluar el efecto de Gen sobre la diferenciación del Mo a OC, trabajamos con los cocultivos de Mo-OB expuestos en forma continua a Gen (10 y 100 nM) por 21 días. Los cultivos se fijaron y se tiñeron usando un kit comercial para TRAP. En la Figura 55 se observa que el tratamiento con Gen estimuló significativamente la diferenciación de Mo a OC a las dos dosis ensayadas. En las barras de la Figura 55A se puede observar un aumento en el número de células TRAP positivas y multinucleadas en los cocultivos tratados con Gen 10 y 100 nM (79 y 37%, respectivamente). En las imágenes de la Figura 55B en los campos microscópicos correspondientes a tratamientos con Gen se distinguen OC que presentan un fenotipo TRAP positivo, un borde en cepillo característico asociado a vesículas y multinucleados. A su vez, se distinguen cambios morfológicos en los OB, exhibiendo una estructura más ahusada, compatible con estructura osteocítica. Estos cambios fueron observados en los sucesivos campos microscópicos evaluados.

A-



B-

Control

Gen 10 nM

Gen 100 nM

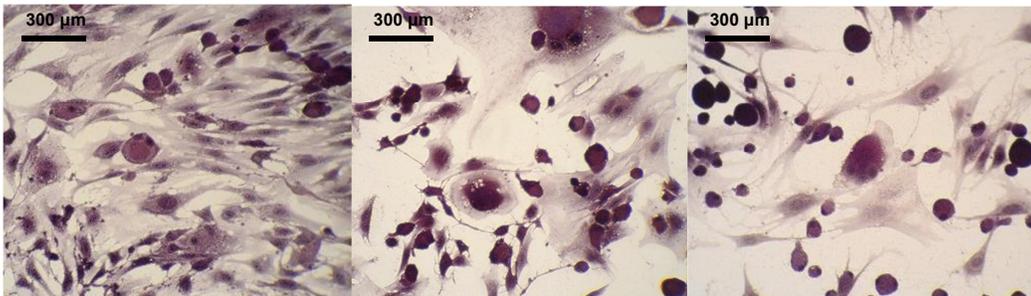


Figura 55. Efecto de Gen sobre la diferenciación de OC

Los Mo sembrados sobre los OB fueron tratados con Gen 10 y 100 nM durante 21 días. Se realizó tinción TRAP como se describe en Metodología y se cuantificaron las células TRAP positivas y multinucleadas. **A-** Los resultados corresponden al promedio y desvío estándar del número de OC de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado ($n=4$). **B-** Las fotos corresponden a campos representativos de OC diferenciados. Los cocultivos fueron teñidos con tinción para TRAP (escala 300 μm , 200X). * $p < 0.05$ respecto al control.

2.3. Mecanismo de acción de Gen en células óseas

Teniendo en cuenta los antecedentes previos en los cuales demostramos que el mecanismo de acción de Gen involucra la participación del RE y la vía NOS/NO, nos planteamos evaluar si estos sistemas mensajeros mediarían la acción de la isoflavona en células óseas. Para ello, empleamos los compuestos ICI182780 y L-NAME en ensayos en los que se midió:

- Actividad FAL
- Depósito de colágeno
- Adhesión de Mo a OB

Para estudiar la participación del RE y de la vía NOS en la acción estimuladora de Gen sobre la actividad FAL, los OB se preincubaron 1 hora con ICI182780 (10 μ M) o L-NAME (10 μ M) y luego de realizar un cambio de medio, los cultivos se trataron con Gen 10 nM por 72 horas. En base a los resultados de la Figura 43, seleccionamos cultivos de OB de 12 días, ya que es el tiempo en el cual se detectó el mayor estímulo de Gen. Como se observa en la Figura 56, la presencia de ICI182780 y de L-NAME anuló el estímulo de la isoflavona sobre la actividad FAL.

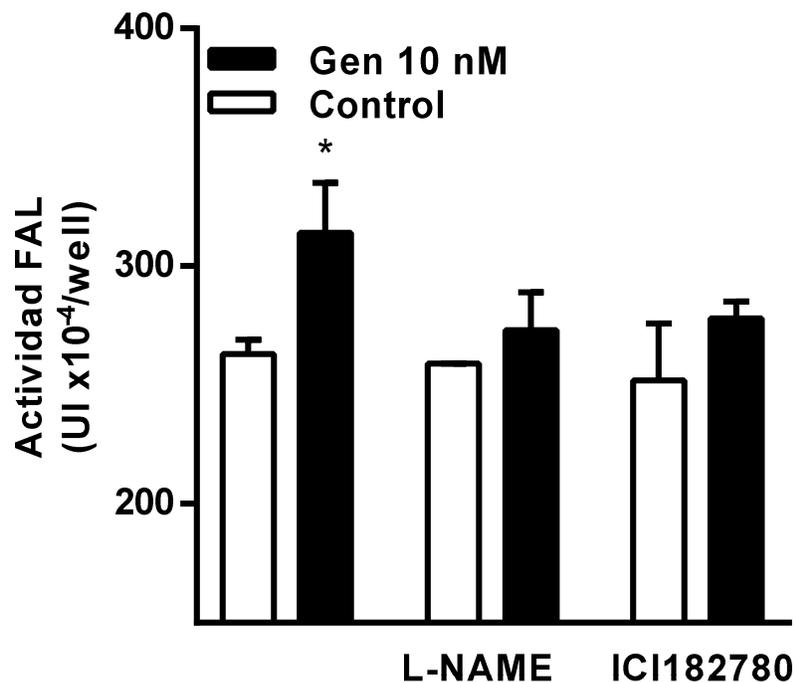
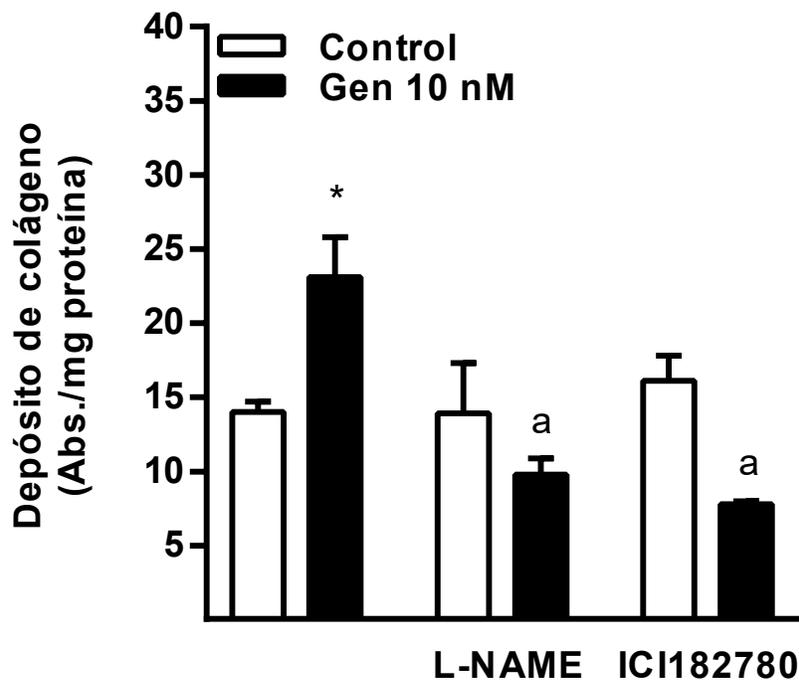


Figura 56. Efecto sobre la actividad FAL inducida por Gen

Los OB de 12 días de cultivo fueron preincubados con ICI182780 (10 μ M) o L-NAME (10 μ M) durante una hora previa al tratamiento con Gen 10 nM durante en las últimas 72 horas de cultivo. La actividad FAL se cuantificó según se describe en Metodología. Los resultados corresponden al promedio \pm desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4). * p<0.05 respecto al control.

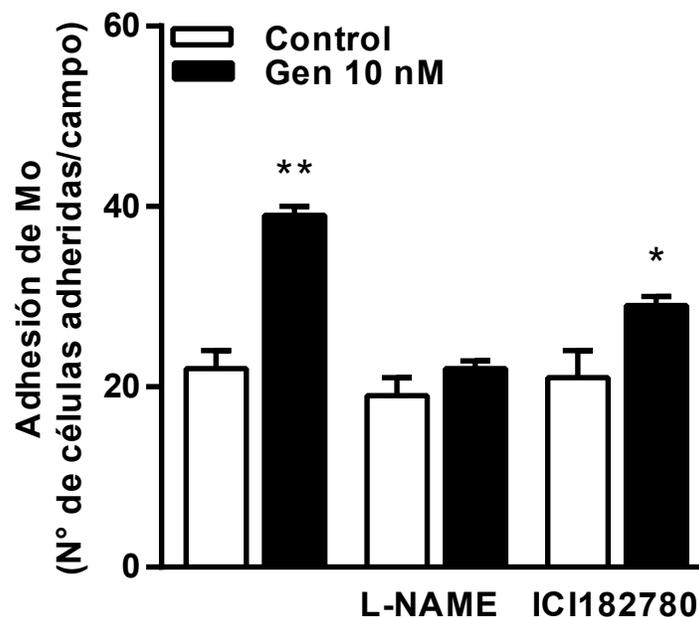
Evaluamos si dichas vías estaban involucradas en el depósito de colágeno inducido por Gen. Se usó la misma estrategia experimental, OB preincubados 1 hora con los compuestos, y posteriormente tratados con Gen las últimas 72 horas. Como se observa en la Figura 57, la presencia de ICI182780 y L-NAME suprimió marcadamente el estímulo sobre el depósito de colágeno inducido por Gen.

**Figura 57. Efecto sobre el depósito de colágeno inducido por Gen**

Los OB de 12 días de cultivo fueron preincubados con ICI182780 (10 μ M) o L-NAME (10 μ M) durante una hora previa al tratamiento con Gen 10 nM en los últimos 3 días de cultivo. El depósito de colágeno se determinó por resuspensión del Rojo Sirio como se describe en

Metodología. Los resultados corresponden al promedio \pm desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado ($n=4$) * $p < 0.05$ respecto al control, ^a $p < 0.01$ respecto a Gen.

Finalmente, estudiamos la participación del RE y de la vía NOS/NO en la adhesión de Mo a OB. Para esto, los cocultivos de Mo-OB se trataron con ICI182780 (10 μ M) o L-NAME (10 nM) por una hora en DMEM-D y luego de un cambio de medio las células se expusieron a Gen 10 nM por 4 horas. El medio se removió, las células se fijaron y se tiñeron con Giemsa para posteriormente realizar el recuento de Mo adheridos. La Figura 58 muestra que Gen estimuló la adhesión de Mo a OB en un 77% sobre el control estímulo que se anuló completamente en presencia del inhibidor de la NOS (L-NAME). En cambio el pretratamiento con ICI182780, produjo una reducción parcial del estímulo de la isoflavona. El incremento del 77% en la adhesión de Mo se reduce en un 40% respecto al control en presencia del antagonista. Las imágenes de la Figura 58 pertenecen a campos representativos de un ensayo de adhesión donde se visualizan los efectos de las condiciones ensayadas.



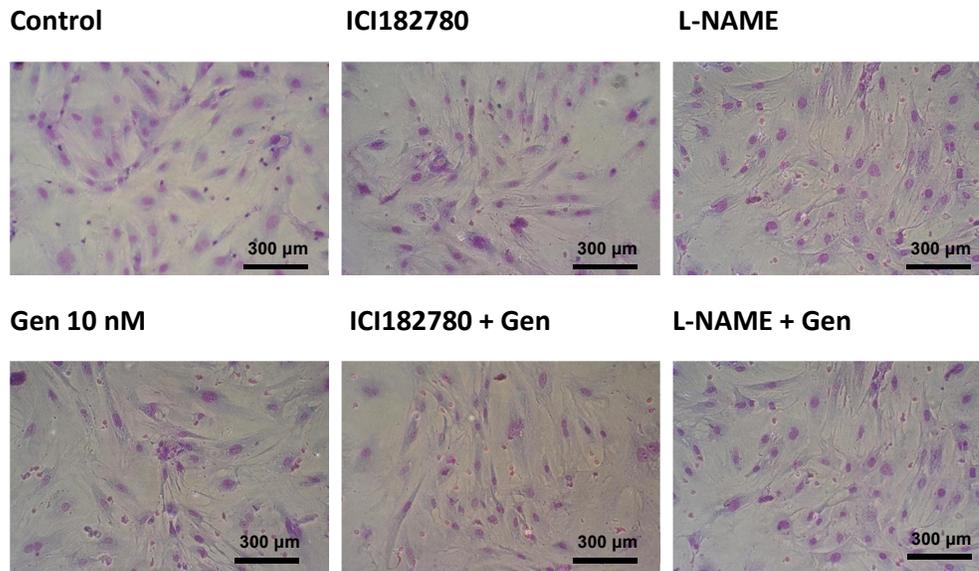


Figura 58. Efecto sobre la adhesión de Mo a OB inducido por Gen

Los cocultivos semiconfluentes de OB fueron pretratados con ICI182780 10 μ M, L-NAME 10 μ M o vehículo una hora antes del tratamiento con Gen 10 nM. La adhesión de Mo a OB se midió luego de 4 horas de cocultivo según se detalla en Metodología. Los resultados representan al promedio \pm desvío estándar de tres experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4). Las imágenes muestran campos representativos de cada condición experimental, la escala representa 300 μ m (200X). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ respecto al control.

Resumen:

Los resultados de este capítulo muestran que Genisteína exhibe una acción positiva sobre los osteoblastos estimulando la osteoblastogénesis lo cual podría interpretarse como una posible acción anabólica sobre el hueso, favoreciendo su formación. Los resultados muestran que el fitoestrógeno favorece la maduración de las células resortivas óseas cuya activación es vital en el proceso de remodelación, esencial para eliminar el hueso envejecido que debe ser reemplazado. Es claro que el sistema experimental empleado no permite discernir si existe una prevalencia de alguna de las dos acciones óseas exhibidas por Genisteína (osteoblastogénesis u osteoclastogénesis). A su vez se aporta evidencia de la participación del RE y de la vía NOS en el mecanismo de acción ósea de Genisteína.

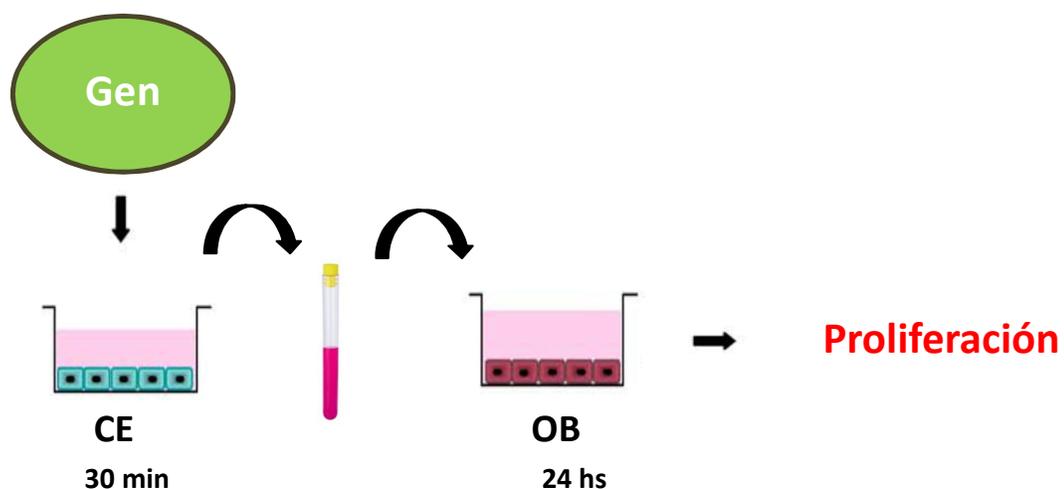
CAPÍTULO 3: INTERACCIÓN ÓSEO-VASCULAR

En este último capítulo de la tesis nos planteamos si existe una interacción entre los efectos óseos y vasculares mediados por Gen.

3.1. Interacción células endoteliales-óseas

En el capítulo anterior presentamos evidencia de que Gen no afecta la proliferación de OB en cultivo (tabla 3). Teniendo en cuenta los principios de la biología celular que propone que el crecimiento celular está determinado en parte, por factores extracelulares provenientes del microambiente que rodea a la célula, nos planteamos si podría existir una regulación del crecimiento de OB a través de CE.

Cultivos de CE fueron tratados con vehículo o Gen (10 nM- 1 μ M) durante 30 min. Se colectó el medio de incubación proveniente del tratamiento con vehículo (MCCE) o con Gen (MCCE-Gen) y se adicionó a cultivos de OB por un periodo de 24 horas (Esquema 9). Se midió proliferación por ensayo de MTT. En la Figura 59 se muestra que la incubación de los OB con MCCE favoreció el crecimiento celular (63% sobre el control). Cuando las células óseas se expusieron al MCCE-Gen 10 nM se detectó un estímulo adicional sobre la proliferación (57 % respecto a MCCE). El tratamiento de las CE con concentraciones mayores de Gen indujo estímulos de menor magnitud.



Esquema 9

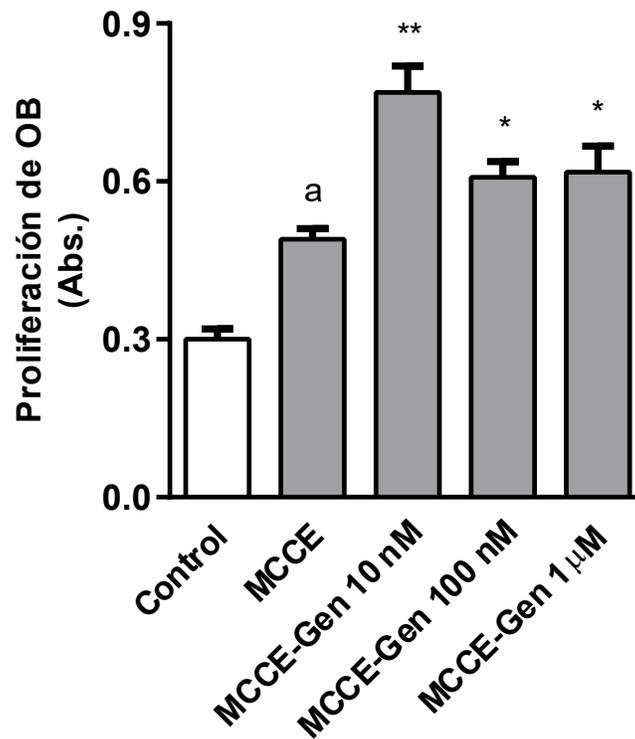


Figura 59. Efecto del MCCE y del MCCE-Gen sobre la proliferación de OB

Los cultivos de OB sincronizados fueron tratados durante 24 horas con medio condicionado de CE tratados con vehículo (MCCE) o con Gen (MCCE-Gen) en las concentraciones indicadas, por 30 min. La proliferación se estudió por ensayo de MTT como se describe en Metodología. Los resultados corresponden al promedio \pm desvío estándar de cuatro experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado ($n=4$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ respecto al MCCE, ^a $p < 0.05$ respecto al control.

El resultado de la Figura 59 plantea una dependencia del crecimiento de OB de factores endoteliales. En base a los datos previamente presentados que demuestran que Gen 10 nM estimula la producción de NO en CE y, siendo el NO un factor difusible, nos planteamos si el NO podría estar modulando la acción mitogénica del MCCE sobre OB. Para esto, las CE se preincubaron con L-NAME (10 nM) 1 hora. Se cambió el medio y se trató con Gen (10 nM) 30 min. Se colectó el MCCE e inmediatamente se adicionó a los cultivos de OB. Se midió la proliferación luego de 24 horas. Como se observa en la Figura 60, el MCCE-Gen 10 nM estimuló significativamente la proliferación de los OB

(75% sobre el control). Cuando el MCCE provino de CE preincubadas con L-NAME, el estímulo sobre la proliferación de OB se suprimió. Este resultado sugiere que la vía NOS/NO mediaría la acción mitogénica del FE dependiente de CE.

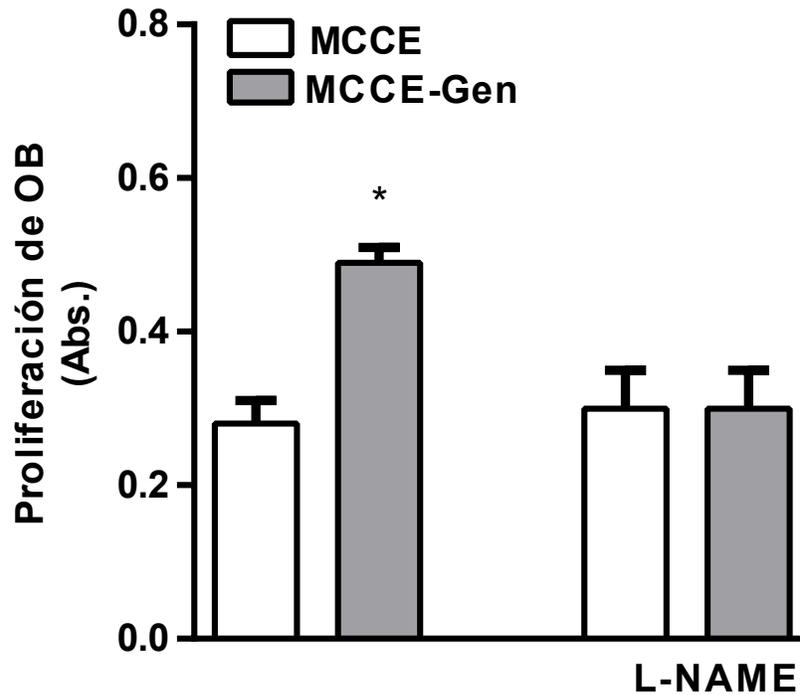


Figura 60. Efecto del MCCE y del MCCE-Gen sobre la proliferación de OB

Cultivos de OB sincronizados, fueron tratados durante 24 horas con medio condicionado de CE pretratadas con vehículo (MCCE) o con Gen (MCCE-Gen) en presencia o ausencia de L-NAME 10 μ M. La proliferación se estudió por ensayo de MTT como se describe en Metodología. Los resultados corresponden al promedio \pm desvío estándar de cuatro experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4). * $p < 0.05$ respecto al control.

Para confirmar la capacidad del NO de estimular la proliferación osteoblástica se trataron OB con un dador externo de NO como lo es el nitroprusiato de sodio (NPS).

En la Figura 61 se observa que 100 μ M NPS estimuló significativamente la proliferación de OB a 24 horas de tratamiento en una magnitud equivalente al estímulo inducido por MCCE-Gen.

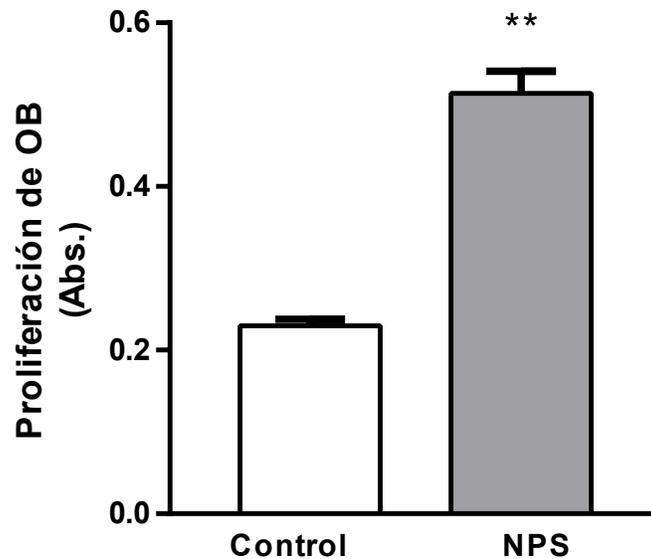


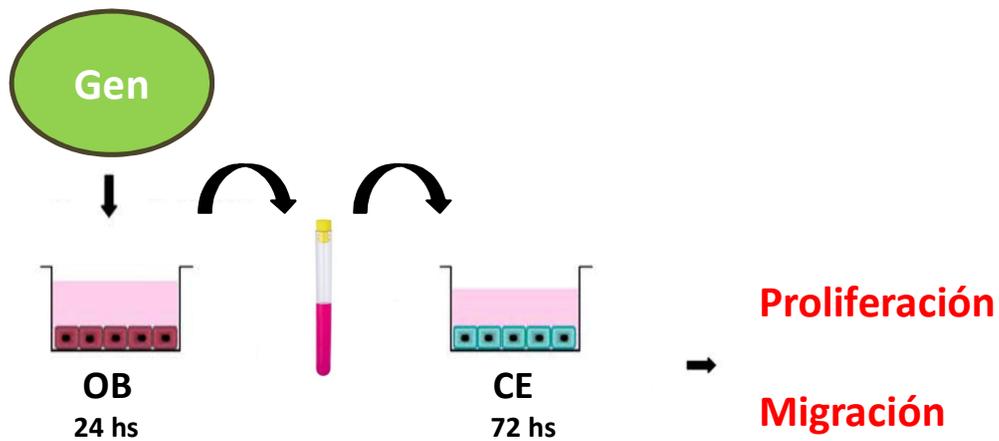
Figura 61. Efecto de NPS sobre la proliferación de OB

Cultivos de OB sincronizados fueron tratados durante 24 horas con vehículo o nitroprusiato de sodio (NPS). La proliferación se estudió por ensayo de MTT como se describe en Metodología. Los resultados corresponden al promedio \pm desvío estándar de 3 experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4). **p < 0.01 respecto al control.

Hasta aquí evidenciamos una acción rápida no genómica de Gen a nivel endotelial, probablemente mediada por NO y que impacta sobre las células óseas estimulando el crecimiento de los OB. Teniendo en cuenta la estrecha vinculación existente *in vivo* entre los vasos sanguíneos y el tejido óseo, nos preguntamos si existía una acción cooperativa intercelular inversa, es decir de OB hacia la CE. Por esto, las CE fueron tratadas con medio condicionado de OB tratados con Gen (MCOB-Gen).

3.2. Interacción células óseas-endoteliales

Comenzamos estudiando el efecto del MCOB sobre la proliferación de CE. Los OB se sincronizaron y se trataron con Gen por 24 horas. Se removió el medio de cultivo y se adicionó a cultivos de CE. Se utilizaron dos concentraciones diferentes de Gen 10 y 100 nM para el tratamiento de los OB. La proliferación de las CE se evaluó a 72 horas del tratamiento con MCOB. El diseño de la estrategia experimental se presenta en el Esquema 10.



Esquema 10

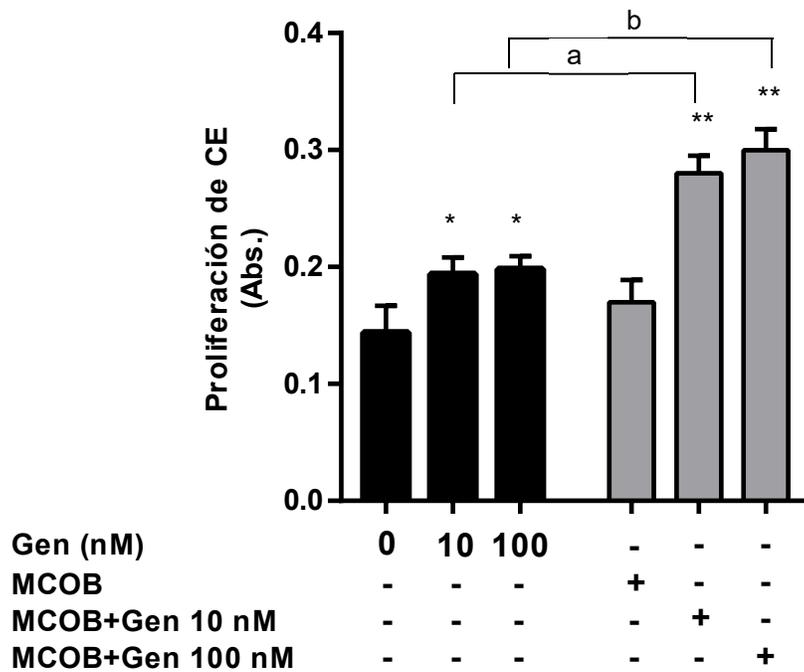


Figura 62. Proliferación CE: interacción OB-CE

Las CE sincronizadas, fueron tratadas durante 72 horas con vehículo, Gen o medio condicionado de OB pretratados con vehículo (MCOB) o con Gen (MCOB-Gen) por 24 horas. La proliferación se determinó con ensayo de MTT como se describe en Metodología. Los resultados corresponden al promedio \pm desvío estándar de cuatro experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4) *p< 0.05, **p< 0.01 respecto a cada control, ^ap< 0.05 Gen 10 nM vs MCOB-Gen 10 nM, ^bp<0.05 Gen 100 nM vs MCOB-Gen 100 nM.

Los resultados (Figura 62) muestran que la Gen estimuló en forma directa la proliferación de CE a las dos concentraciones ensayadas (barras de la izquierda). No obstante, la proliferación aumentó significativamente cuando las CE se trataron con MCOB-Gen. Los resultados de la derecha muestran un crecimiento celular aumentado en un 44.0 y 52.0 % cuando las CE se incubaron con el MCOB-Gen respecto a Gen.

Siguiendo el mismo diseño experimental, estudiamos el efecto del MCOB sobre la migración de CE. Para esto, los cultivos de OB se trataron con Gen 10 o 100 nM por 24 horas. El MCOB-Gen se recuperó para tratar las CE por 72 horas. Como se observa en la Figura 63, el MCOB-Gen indujo un marcado aumento en la migración. En presencia de MCOB-Gen 10 y 100 nM la migración de CE aumentó 0.8 y 2.5 veces respecto al control.

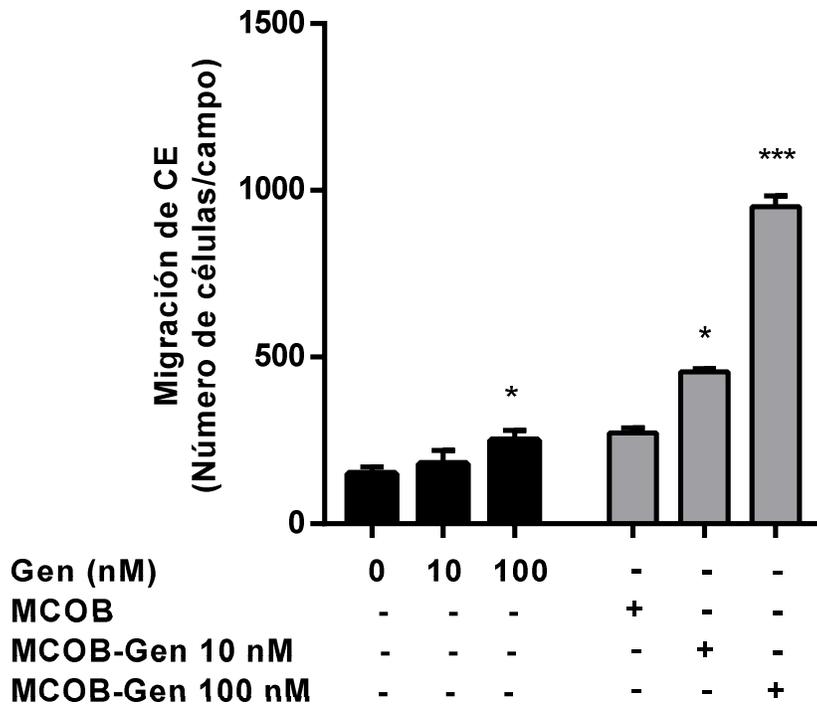
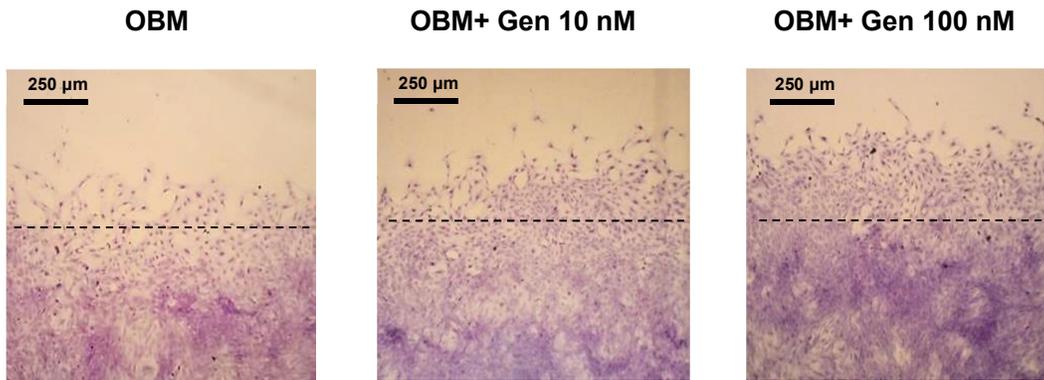
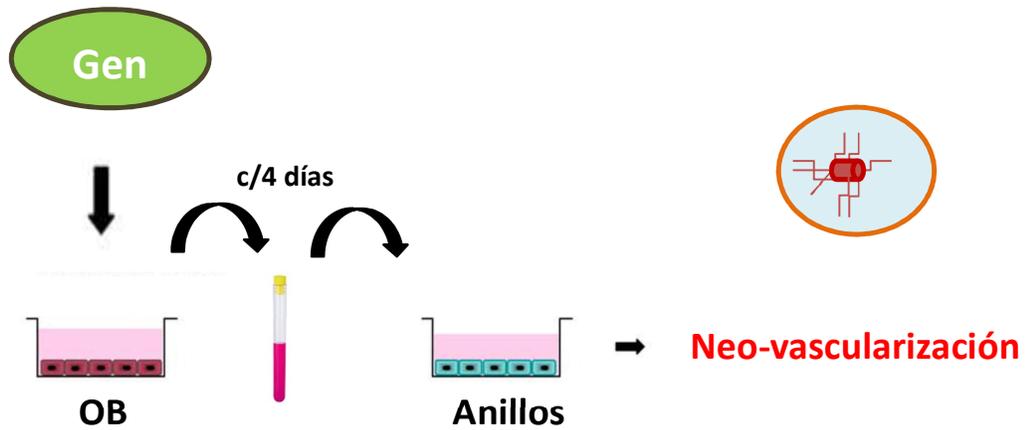


Figura 63. Migración de CE: interacción OB-CE

Las CE sincronizadas, fueron tratadas durante 72 horas con vehículo, Gen o MCOB tratados con vehículo o con MCOB-Gen en las concentraciones indicadas por 24 horas. Se estudió la migración por la técnica de reparación de herida, procesando la placa según se describe en Metodología. Las fotografías corresponden a campos representativos teñidos con Giemsa de las condiciones experimentales (escala 250 μm , 100X). Los resultados corresponden al promedio \pm desvío estándar de cuatro experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4)., * $p < 0.05$, *** $p < 0.01$ respecto a cada control.

Sabiendo que la proliferación y migración de CE son procesos que dirigen la formación de nuevos capilares a partir de vasos preexistentes nos preguntamos si estos efectos de interacción de las células óseas sobre las CE vía Gen podrían traducirse en una capacidad angiogénica. Para ello se midió la capacidad de formar capilares a partir de AA. Los anillos se colocaron en un soporte de colágeno y se trataron por 15 días con Gen 10 nM o con MCOB o MCOB-Gen 10 nM en DMEM con 1% SFB. El MCOB-Gen se obtuvo de OB maduros con tratamiento continuo con el FE durante los 15 días de cultivo. Los MCOB con o sin Gen se iban recuperando de los cultivos y agregando a los AA cada 4 días en los sucesivos cambios de medio (Esquema 11). La fotografía de la Figura 64 muestra como se visualiza la formación de nuevos capilares a partir del anillo. La longitud total de la red de capilares de cada condición experimental se determina usando el programa ImageJ. Los resultados muestran que Gen 10 nM estimuló la formación de nuevos capilares alrededor del anillo. El MCOB-Gen mostró un desarrollo de túbulos alrededor del AA similar al tratamiento con la isoflavona sola, mientras que el mayor desarrollo de capilares se detectó en el tratamiento de los AA con MCOB-Gen (56% respecto a MCOB).



Esquema 11

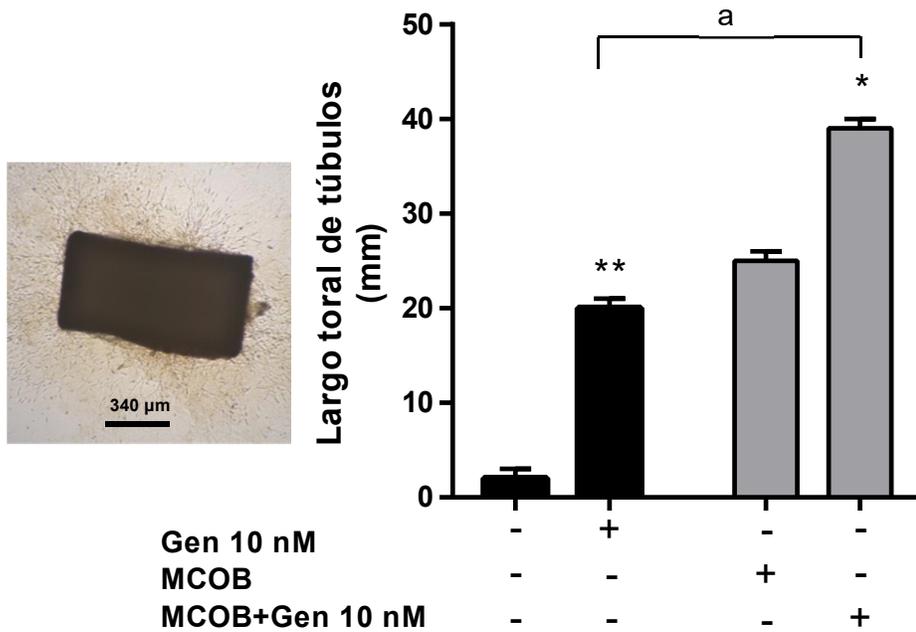


Figura 64. Angiogénesis: interacción OB-CE

Los AA fueron sembrados sobre una matriz de colágeno en DMEM con 1% de SFB y tratados durante 15 días con vehículo, Gen, MCOB o MCOB-Gen 10 nM. La formación de nuevos capilares a partir de AA se cuantificó como se describe en Metodología. La fotografía corresponde a un cultivo representativo (escala 340 μm, 40X). Los resultados corresponden al promedio ± desvío estándar de cuatro experimentos independientes donde cada condición se procesó por cuadruplicado (n=4). *p< 0.05 **p< 0.01 respecto a su control, ^ap< 0.05 respecto al valor de Gen.

Resumen:

Los resultados presentados aportan evidencia de una acción bidireccional de Genisteína. Una acción rápida no genómica de Genisteína sobre células endoteliales que permite el crecimiento de osteoblastos. A su vez, los OB proliferantes bajo acción de Genisteína favorecen los procesos que modulan la generación de nuevos capilares.

Como se menciona en la introducción la lesión vascular y el desarrollo de la placa aterosclerótica comprende diferentes etapas: 1) alteración de la producción de vasoactivos, 2) interacciones plaqueta, Mo, endotelio, 3) transformación fenotípica de CMLV, 4) calcificación vascular.

Previamente, en nuestro laboratorio se aportaron evidencias de una acción positiva de Gen a nivel vascular. Partiendo de esta evidencia en este trabajo de tesis avanzamos estudiando el rol del FE sobre los eventos que conducen a la calcificación vascular.

Es sabido que el óxido nítrico tiene rol crucial en la homeostasis vascular. La biodisponibilidad de este vasoactivo es imprescindible para el mantenimiento de las propiedades antiterogénicas y antitrombóticas del lecho vascular (**Tousoulis y col. 2012**). Los trabajos previos de nuestro laboratorio muestran que en tejido vascular intacto la Gen estimula en forma no genómica la producción de prostaciclina y NO, y consecuentemente inhibe la agregación plaquetaria a través de un mecanismo que incluye la participación del RE (**Polini y col. 2007**). Los primeros resultados de este trabajo de tesis nos aportan evidencia que la acción estimuladora de Gen sobre NO se extiende a animales carentes de función ovárica (OVX y seniles). Así mismo a través del empleo de cultivos de células endoteliales, comprobamos que este efecto descrito en los reportes previos es debido a una acción directa y específica del fitoestrógeno a nivel de células endoteliales y que también involucra al RE. En concordancia con nuestros resultados, en una línea de células endoteliales (EA.hy926) Hwang y col. demostraron la participación del RE y la vía PI3K/Akt en la activación de eNOS por acción de la isoflavona Puerarin (**Hwang y col. 2011**).

En esta tesis empleamos el mismo rango de concentraciones de Gen (0.001-100 nM) que en los trabajos previos (**Polini y col. 2007; Sandoval y col. 2010**). Es importante destacar que es difícil establecer con precisión cuáles son los niveles plasmáticos de Gen que se alcanzan en la población humana consumidora de FE. Esto se debe a la variabilidad biológica interindividual asociadas a la capacidad de absorción y metabolización; a la biodisponibilidad; a la farmacocinética, sumado a las variables analíticas en relación al tipo de técnica empleada para su determinación (**Harsha y col. 2018**). Reportes indican que los niveles plasmáticos alcanzados en poblaciones

asiáticas consumidoras de una dieta rica en soja es de 0.75-2.5 μM (**Izumi y col. 2000**), mientras que en la población occidental, en la cual los niveles de consumo son mucho menores, los niveles séricos son 0.1-100 nM (**Izumi y col. 2000**).

Sabido es que alteraciones en el perfil de crecimiento, supervivencia y muerte celular de las CE favorecen el progreso de la lesión vascular. La respuesta fisiológica al daño celular es la generación de nuevos capilares que permitan adaptarse o resistir a cambios producidos por la hipoxia, estrés oxidativo e isquemia (**Hai-Xin y col. 2016**). Demostramos que Gen estimula la proliferación de CE entre 20-72 horas en el rango de dosis ensayadas. A su vez en este intervalo temporal, el FE previene la apoptosis inducida por estrés oxidativo. La apoptosis, o muerte celular programada, es un proceso fisiológico a través del cual los organismos multicelulares declinan células eficientemente. 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. 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 (**Imanishi y col. 2005**). Las CE son removidas y reemplazadas por endotelio regenerado a partir de CE adyacentes o bien a partir de CE progenitoras circulantes (**Masuda y col. 2003**). Demostramos que Gen previene parcialmente la apoptosis de las CE cuando son expuestas a un agente oxidante (H_2O_2). Resultados similares fueron descritos por Xiao-Hua Fu y *col.* quienes demostraron que 24 horas de tratamiento con Gen inhibió la apoptosis de HUVEC-12 inducidas por el tratamiento con peróxido de hidrógeno (**Fu y col. 2008**).

El efecto proliferativo que describimos con Gen fue acompañado del incremento en la síntesis del VEGF inducido por el FE. El VEGF es uno de los factores endógenos vasculares que en forma paracrina o autocrina regulan el crecimiento de células vasculares (**Ferrara y col. 2003**). La estimulación de la síntesis de VEGF por Gen se detectó al mismo tiempo donde se produce la mayor acción mitogénica de la isoflavona, lo que hace presuponer que este efecto podría modular la regulación del

crecimiento endotelial por Gen. A partir de las 72 horas, cuando la cinética del crecimiento celular disminuye y no se detectan efectos proliferativos de Gen, la isoflavona promueve la migración celular.

El análisis en conjunto de estos resultados sugiere que la Gen favorece los procesos celulares asociados a la reparación tisular. En concordancia Sang Hun Lee y *col.* aportaron evidencias sobre la capacidad de Gen de promover la reparación vascular *in vivo* en ratones BALB/CA-nu/un y la proliferación/migración de HUVEC *ex vivo* (**Lee y col. 2014**).

A su vez los datos obtenidos en el ensayo de fragmentación de ADN no solo evidencia una acción preventiva del FE frente a la inducción de daño al ADN promovida por una de las principales especies reactivas de oxígeno, el H₂O₂, sino que adicionalmente sugieren una acción antioxidante. Si se tiene en cuenta el efecto estimulador de Gen sobre NO, y que mantener la biodisponibilidad de NO constituye la principal defensa celular para inhibir la generación de ROS (**Kitaoka y col. 1998**), en su conjunto los resultados de la figura 2 y 8 sugieren una potencial acción antioxidante de Gen, efecto que será profundizado en futuras investigaciones.

En resumen nuestra evidencia muestra que Gen estimula la producción de NO endotelial a través de un mecanismo de acción que comprende la participación del RE, y promueve los procesos que dirigen la formación de nuevos capilares: síntesis de VEGF, proliferación y migración de CE. La isoflavona exhibe una potencial acción antioxidante.

En condiciones saludables el endotelio se encuentra en un estado no activado. La respuesta inicial al daño vascular es la estimulación del endotelio que conduce al reclutamiento y activación de monocitos. Previamente en nuestro laboratorio se demostró que Gen disminuye la adhesión de Mo a CE inducida por LPS (**Sandoval y col. 2010**). Teniendo en consideración que la adhesión leucocitaria requiere de la expresión de CAMs en la superficie endotelial e integrinas en los monocitos, estudiamos si la

inhibición de la adhesión de Mo podría deberse a una regulación de la expresión de estas proteínas. Para ello evaluamos la expresión de la CAM endotelial, ICAM-1 y de las integrinas monocíticas CD11b, CD11C y CD18. Se empleó LPS como inductor de la expresión de CAMs ya que se sabe que el LPS provoca estrés inflamatorio que resulta en estrés oxidativo, incrementando la producción de especies reactivas de oxígeno y estimulando la transcripción de genes que codifican para CAMs a través de la citoquina, TNF (**Gotsch y col. 1994**). Nuestros datos muestran que Gen reduce los niveles de expresión de ARNm ICAM-1 en CE activado por LPS. El efecto de la isoflavona se amplifica hacia los Mo, inhibiendo la expresión en superficie de las integrinas que a través de puentes con ICAM-1 favorecen la transendotelización de los Mo. Esta información complementa los datos previos de nuestro laboratorio que mostraron que Gen inhibe la expresión de CAMs involucradas en la fase temprana de adhesión y rodamiento de Mo sobre las CE (**Sandoval y col. 2010**). Datos reportados por Hua-ping Zhang y *col.* demostraron que el tratamiento con Gen disminuye la expresión de las moléculas de adhesión I-CAM en HUVEC en un modelo de oxidación inducido por el tratamiento con LDL (**Zhang y col. 2013**).

A medida que progresa la lesión vascular las células que interactúan con el endotelio y el mismo endotelio activado por injuria liberan moléculas bioactivas, citoquinas (IL-1, IL-4, TNF- α) y factores de crecimiento (FGF, factor de crecimiento derivados de plaquetas/PGEF, factor de crecimiento tumoral- β /TGF- β), que median la respuesta inflamatoria en la pared vascular. La respuesta inflamatoria localizada estimula la invasión de la túnica íntima por CMLV que migran desde la túnica media y proliferan. En condiciones patológicas estas CMLV se localizan en la íntima arterial perdiendo su fenotipo contráctil quiescente para adquirir un fenotipo sintético y proliferativo, que resulta en la acumulación atípica de matriz extracelular (**Rudijanto 2007**). Estudiamos el efecto del tratamiento con Gen sobre los primeros eventos que conducen a la alteración estructural de la túnica íntima, como son la proliferación y la migración de CMLV. Si bien la cinética de proliferación basal de las CMLV muestra un aumento a 24 horas con una posterior disminución a 48 horas, la acción de Gen no acompañó este perfil. El efecto de la isoflavona fue de inhibición constante y sostenida del crecimiento celular. Es importante destacar que esta acción inhibitoria no se debió a una pérdida

de la integridad celular, ya que la estructura celular se conserva como muestran las imágenes de la tinción inmunocitoquímica (Figura 28). Demostramos también que el mismo rango de concentraciones de Gen inhibió marcadamente la migración de CMLV. Ling. y *col.* obtuvieron resultados similares trabajando con otra isoflavona Daidzeina (cis-THD) en CMLV humanas. Demostraron que cis-THD 0.1-100 nM inhibe la síntesis de ADN/proliferación de CMLV en forma dosis dependiente y vía RE (Ling y *col.* 2004). Datos de la literatura muestran que 17 β -Estradiol exhibe un perfil inhibitorio del crecimiento celular de CMLV, hecho atribuido a un aumento de la muerte celular (Song y *col.* 1998) o alteraciones fenotípicas de las células (Vazquez-Padron y *col.* 2004). Dado que el estradiol y la Gen actúan a través del receptor de estrógeno, quizá estos efectos puedan estar relacionados con eventos moleculares provocados corriente debajo de la activación del RE. En concordancia con nuestros resultados, otros autores demostraron que, en modelos *in vivo* e *in vitro*, las isoflavonas inhiben el crecimiento, migración e inducen apoptosis en células aórticas humanas y de conejo (Gencel y *col.* 2012). Recientes investigaciones proponen que las proteínas Wnt son reguladores importantes de comportamiento de CMLV a través de la activación de las vías de señal de β -catenina, con posible importancia funcional en la aterosclerosis y la reestenosis (Mill y *col.* 2012). Como se sabe, la señal Wnt es una de las principales cascadas involucradas en osteoblastogénesis (Liu y *col.* 2008). Esta evidencia reportada podría apoyar la idea de un enlace molecular entre los sistemas vasculares y óseos.

La calcificación vascular puede considerarse una osteoblastogénesis que se produce dentro de la pared arterial. Aunque alguna vez se pensó como un evento fisicoquímico pasivo de mineralización extracelular, hoy es sabido que la calcificación vascular es un proceso celular activo sujeto a regulación, en el que intervienen distintos eventos celulares y moleculares (Serrano y *col.* 2011). El tipo de células responsables de la mineralización de la pared vascular es motivo de intenso estudio, considerándose que las CMLV tienen un rol crucial exhibiendo una transdiferenciación osteogénica (Pal y *col.* 2011).

En este trabajo de tesis implementamos un sistema de calcificación *in vitro* siguiendo lo descrito por Kanno y *col.* (Kanno y *col.* 2008). A cultivos primarios de CMLV se los

indujo a transdiferenciar a linaje óseo (CMLV-OB) mediante incubación prolongada en medio procalcificante. En concordancia con lo descrito en la literatura (**Pugliese y col. 2015**), las CMLV-OB presentaron una alta tasa de actividad FAL y capacidad de calcificar la matriz extracelular, como así también un aumento en la proliferación celular en respuesta a la presencia de β -glicerofosfato y calcio. Las CMLV-OB expresaron niveles elevados del marcador temprano de diferenciación osteoblástica Runx2, como así también de la fosfatasa alcalina TNAP. En condiciones fisiológicas la CMLV no expresa TNAP, su aparición indica transdiferenciación osteogénica irreversible de las CMLV (**Chistiakov y col. 2015**). Demostramos que Gen atenúa el proceso de transdiferenciación osteogénico de las CMLV. La presencia de Gen durante todo el proceso de inducción de calcificación redujo la actividad FAL, la mineralización extracelular y disminuyó marcadamente la formación de nódulos en la matriz. Otros autores demostraron que la isoflavona Puerarin inhibe la transdiferenciación de CMLV vía RE/PI3K/Akt (**Lu y col. 2014**).

Decidimos evaluar si esta inhibición de la calcificación vascular evidenciada *in vitro* en cultivos aislados de células musculares, se manifiesta en tejido intacto. Para ello diseñamos ensayos *ex vivo* de tejido aórtico, según lo descrito por Price y col. (**Price y col. 2006**). Obtuvimos evidencia que el tejido expuesto a un medio procalcificante exhibe zonas de calcificación comparado con tejido control y que el tratamiento continuo con Gen durante todo el periodo de calcificación redujo significativamente la incorporación de calcio. Los resultados cualitativos por tinción fueron corroborados por cuantificación del contenido de calcio. De esta manera la hipótesis de los experimentos *in vitro* de transdiferenciación osteogénica de CMLV que sugerían una posible acción inhibitoria de Gen sobre la calcificación vascular fue validada en tejido intacto.

Este conjunto de resultados aportan evidencia que Gen inhibe los procesos que conducen al progreso de la lesión vascular ateromatosa y la calcificación vascular. Específicamente los hallazgos presentados muestran que Gen es capaz de inhibir la formación de puentes proteicos entre CE y Mo, atenuar la transdiferenciación

osteogénica de células vasculares e inhibir la formación de zonas de calcificación en tejido intacto.

La ingesta oral de los suplementos dietarios con FE afecta a todo el organismo. Si bien lo descrito hasta aquí sugiere una acción beneficiosa a nivel vascular, parte de esta evidencia se podría considerar como efectos antióseos, lo que nos llevó a plantearnos ¿cuál sería la acción de Gen a nivel óseo? Por consiguiente, estudiar el rol de la isoflavona sobre la osteoblastogénesis y la osteoclastogénesis resultó esencial para entender su efecto sobre el sistema óseo. Como se describió en la introducción, la osteoblastogénesis es un proceso secuencial que conduce a que una célula progenitora mesenquimal se diferencie a osteoblasto maduro. Involucra una serie de pasos tales como: 1) quimiotaxis y migración de preOB; 2) proliferación, 3) expresión de factores transcripcionales que dirigen y condicionan la diferenciación a linaje osteoblástico; 4) expresión de receptores hormonales (Vitamina D, paratohormona, estrógenos) y proteínas específicas de matriz extracelular; 5) mineralización de la matriz. Es así como el OB maduro libera FAL, colágeno, osteopontina, osteocalcina hacia el espacio extracelular. Finalmente la matriz se mineraliza por depósito de cristales de hidroxapatita **(Stein y col. 2004)**. Uno de los primeros parámetros evaluados fue el efecto de Gen sobre la migración de OB in vitro. El potencial migratorio de las células de linaje osteoblástico fue descrito en detalle por primera vez por Jones & Boyde, 1977 **(Boyde y col. 1996)** quienes trabajaron con explantes de hueso de rata (*Rattus norvegicus*) mediante ensayo de reparación de herida para estimular la migración de OB. Nuestros resultados muestran que la isoflavona es capaz de estimular la migración de los pre-OB a tiempos cortos de tratamiento. Resultados similares con otros FE fueron reportados por Lim y col. quienes describieron que Icarin estimula la migración de células mesenquimales luego de 6 horas de tratamiento **(Lim y col. 2018)**.

Luego del reclutamiento y migración de células progenitoras a las zonas de remodelado, los pre-OB inicialmente proliferan bajo la estimulación de diversos factores humorales, como IGF-1, FGF-2 y BMP **(Zaidi 2007)**. La transición a una fase diferenciativa implica una disminución de la proliferación a medida que aumenta

gradualmente la expresión de marcadores diferenciativos (**Stein y col. 2004**). El efecto de los fitoestrógenos sobre la proliferación celular es variable en los diversos modelos experimentales estudiados. Trabajando con líneas celulares algunos autores describieron un efecto positivo de Gen sobre la proliferación de MC3T3-E1 (**Lee y col. 2001**), mientras que otros reportan un efecto inhibitorio de Gen sobre la proliferación celular dependiente de la dosis (**Polkowski y col. 2000**). Nuestros resultados muestran que tratamientos directos con Gen no modifica el crecimiento de los preosteoblastos de calvaria. En cambio demostramos un efecto indirecto de Gen sobre la proliferación a través de su acción sobre CE. Los ensayos con medio condicionado de células endoteliales muestran que Gen es capaz de estimular el crecimiento de preOB a través de una interacción con CE, sugiriendo que para que el FE exhiba una potencial acción mitogénica sobre preOB se requiere de la presencia en simultáneo de ambos tipos celulares.

Avanzando en el estudio de la diferenciación de preOB a OB maduros, obtuvimos evidencia que entre 3 y 5 días de cultivo celular la Gen estimuló significativamente la expresión de Runx2 y RE α . Es sabido que Runx2 actúa como un promotor transcripcional temprano de la expresión de genes asociados a la diferenciación de los OB, como FAL, OC, colágeno tipo I, RANKL, OP (**Komori 2010**). Jin Dai y *col.* demostraron que Gen estimula la expresión de Runx2 vía activación de RE en hBMSCs (**Dai y col. 2013**). Publicaciones recientes muestran que otras isoflavonas como Daizeina y Puerarin, promueven diferenciación osteoblástica a través de aumentos en la expresión de Runx2, evidencia obtenida empleando líneas celulares (**Yu y col. 2017; Zeng y col. 2018**). Evidencia de la literatura muestra que los niveles de RE α varían con el tiempo de cultivo, aumentando durante la diferenciación osteoblástica y disminuyendo en la etapa de mineralización. En cambio, la expresión de RE β es constante durante todo el proceso madurativo. Por eso se propone a RE α como un buen marcador de diferenciación osteoblástica (**Wiren y col. 2002**). Si bien Gen tiene mayor afinidad por el RE β , nuestros resultados no mostraron una acción regulatoria de Gen sobre su expresión, aunque una modulación por parte del FE no puede ser descartada. Estos estudios deberán complementarse con el análisis de la expresión proteica de los receptores y ampliarse evaluando otros tiempos de cultivo. Nuestros

resultados no nos permiten establecer un orden secuencial a la expresión de marcadores tempranos de diferenciación regulados por Gen. Estos hallazgos serán profundizados en futuras investigaciones que nos permitan entender la acción secuencial de la isoflavona y las vías de señalización involucradas.

Los pasos subsiguientes de la diferenciación osteoblástica implican cambios moleculares y morfológicos que conducen a un fenotipo de osteoblasto maduro, claramente diferenciado de sus progenitores **(Zouani y col. 2013)**. Una de las proteínas claves es la fosfatasa alcalina, enzima que hidroliza pirofosfato para proveer fosfato inorgánico para la síntesis de hidroxapatita a partir del calcio circulante. Este componente mineral de la matriz ósea, a través de su unión a colágeno y osteocalcina le confiere al hueso la rigidez necesaria para la función mecánica. Además desde el punto de vista metabólico, la hidroxapatita constituye una reserva de calcio y fósforo disponible para contrarrestar las fluctuaciones de calcemia y fosfatemia debido a desequilibrios del metabolismo fosfocálcico. El colágeno tipo I constituye el 90% de la matriz orgánica y representa un componente vital para proveer la rigidez, estructura y estabilidad óptima para la función ósea. Demostramos que, a partir de los 11 días de cultivo, los OB incrementan la expresión de FAL y colágeno en respuesta a Gen. En la línea celular MC3T3 se reportó que extractos crudos de soja enriquecidos en FE estimulan la actividad FAL **(Choi y col. 2001)**. En concordancia, en una línea celular de OB humanos, Wang y col. reportaron que la isoflavona Puerarin estimula la expresión de colágeno **(Wang y col. 2013)**. Demostramos también que, el efecto de Gen sobre la formación de la matriz orgánica se ve acompañado por una intensa mineralización. En OB tratados con Gen la isoflavona estimula la mineralización de la matriz extracelular luego de 12 días de cultivo. El efecto se determinó midiendo no solo el contenido mineral sino por la visualización de nódulos de calcio empleando microscopía y tinción específica.

El remodelado que dirige el reemplazo de hueso viejo por hueso nuevo depende del balance entre formación y resorción ósea. Inicialmente nos centramos en entender el efecto de Gen sobre las células que dirigen la formación ósea, preOB y OB maduro. Luego nos focalizamos en el estudio del efecto de Gen sobre las células que dirigen la

resorción ósea. Los osteoclastos son células gigantes multinucleadas que provienen de los precursores hematopoyéticos y pertenecen a la familia monocito/macrofágica. Para la diferenciación osteoclastica es fundamental la presencia de dos citoquinas secretadas por los OB: factor estimulante de colonia de macrófagos y el RANKL. Además, la osteoclastogénesis completa requiere de un contacto físico entre preOC y matriz ósea a través de integrinas de membrana. Así los osteoclastos inmaduros atraviesan cambios estructurales internos como polarización de las células, reacomodamiento del citoesqueleto, generación de un área de sellado y una membrana borde en cepillo (**Tanaka y col. 2005**). El proceso de osteoclastogénesis se completa con la expresión de enzimas líticas como TRAP (**Hayman 2008**), catepsina K, metaloproteasas. En base a esto, para estudiar el efecto de Gen sobre la osteoclastogénesis trabajamos con cocultivos de Mo y OB. Precisamente Suda y col. trabajando con cocultivo de OB y células madres hematopoyéticas describieron la importancia del contacto célula-célula para la diferenciación de los precursores osteoclásticos a osteoclastos maduros mediada por RANKL (**Suda y col. 1999**). En los ensayos de adhesión de Mo a OB nuestros resultados muestran que la isoflavona Gen favorece la adhesión de Mo a la monocapa de OB a tiempos cortos de incubación. Empleando el mismo modelo experimental determinamos que Gen luego de 21 días de tratamiento del cocultivo promueve la osteoclastogénesis, evidenciado por cambios morfológicos y expresión de TRAP. Los Mo diferenciados a OC se detectaron como células de mayor tamaño, multinucleadas, TRAP positivas y con un borde en cepillo asociado a numerosas vesículas, acorde a lo descrito en la literatura (**Rivollier y col. 2004**). Evidencia de la literatura muestra que en cocultivo de Mo/OB la isoflavona Puerarin estimula la osteoclastogénesis a través del balance positivo de la relación RANKL/OPG (**Tiyasatkulkovit y col. 2012**). En contraste otros estudios en líneas celulares de OC describen un efecto inhibitorio de Gen sobre la osteoclastogénesis (**Gao y col. 1999**). Entendemos que se requiere un estudio más profundo que permita discernir sobre la relevancia biológica del efecto de Gen sobre la osteoclastogénesis tanto en modelos *in vitro* como *in vivo* en tejido óseo con integridad estructural y funcional.

Es sabido que en la diferenciación osteoblástica, las vías de señalización BMP y la vía canónica Wnt son los principales transductores intracelulares de la osteoblastogénesis **(Li y col. 2009)**. Por su parte a nivel de la osteoclastogénesis las vías NFκB, ERK y PI3K-Akt son las responsables de la maduración y diferenciación de los precursores de osteoclastos **(Aeschlimann y col. 2004)**. No obstante, en base a nuestros antecedentes previos en sistema vascular que muestran que el mecanismo de acción de Gen involucra la participación de RE y vía NOS, estudiamos la contribución de estos mediadores en la acción ósea de Gen. Esta vía mensajera ha sido involucrada en el efecto de otras isoflavonas, como Icarin, sobre la diferenciación de OB en modelos *in vitro* de células del estroma de medula ósea (sBMSC) **(Zhai y col. 2014)**. Nuestros resultados muestran que el efecto de Gen sobre la actividad FAL y el depósito de colágeno en OB maduros se suprimen antagonizando al RE o inhibiendo la NOS, sugiriendo la participación del RE y la activación de NOS en la osteoblastogénesis inducida por Gen. En concordancia con nuestros datos Haihong L.V. y col. demostraron la participación de la vía RE/NOS/GMPc/Runx2 en la diferenciación de células del estroma de medula ósea humana (sBMSC) tratadas con la isoflavona, Puerarin **(Lv y col. 2015)**.

Está bien descrita el rol del NO como señal intercelular que media la mecanotraducción en el hueso **(McGarry y col. 2005)**, regulando la redistribución del citoesqueleto mediante la activación de las vías de señalización de β-catenina y de PI3K/Akt **(Santos y col. 2010)**. Las tres formas moleculares de NOS han sido descritas en OB y OC. NOS1 y NOS3 son constitutivas mientras que NOS2 es inducida por estrés inflamatorio **(Vatsa y col. 2007)**, en condiciones equivalentes a lo que sucede en sistema vascular. En preOB y en osteocitos *in vitro* el NO tiene un efecto bifásico. Bajas concentraciones de NO promueven proliferación, diferenciación y supervivencia, mientras que elevadas concentraciones de NO tiene efectos contrarios **(Mancini y col. 2000)**. Los efectos del NO son mediados por GMPc/PKG y posterior estimulación de la transcripción de Runx2 y activación de la vía Wnt **(Kalyanaraman y col. 2018)**. Se ha descrito que parte de los efectos diferenciativos de los estrógenos en OB son a través de su unión a receptor de membrana y activación por fosforilación de vía NOS/GMPc/PKG **(O'Shaughnessy y col. 2000)**. Estradiol estimula la expresión de NOS-3

vía acción genómica (**Armour y col. 1998**). Por consiguiente, nuestros resultados, si bien preliminares y requieren profundización mecanística, sugerirían que la Gen podría promover la diferenciación de OB en forma equivalente al estradiol vía RE/NOS/PKG. Demostramos también que RE y la vía NOS mediaría la acción de Gen sobre la adhesión de Mo a OB, primer paso en la diferenciación osteoclastica. Al igual que para OB, se ha descrito una acción dual del NO, estimulando la diferenciación a concentraciones bajas e inhibiendo la osteoclastogénesis a altas concentraciones, efecto mediado principalmente por NOS1 (**Kalyanaraman y col. 2017**). Los datos de ensayos in vitro en OC empleando inhibidores farmacológicos de NOS son variados y a veces discrepantes, quizás dependiendo del tipo de NOS inhibida (**Kalyanaraman y col. 2018**)

En resumen los datos presentados nos permiten entender que Gen promovería la diferenciación de los pre-OB a OB maduros, estimulando la expresión de RE α y Runx2, promoviendo con esto la actividad FAL, el depósito de colágeno y la calcificación de la matriz extracelular. A su vez en un modelo experimental de cocultivo (Mo-OB) demostramos que Gen tiene un efecto positivo sobre la interacción entre OB y precursores osteoclasticos (Mo). Así mismo se aportó información sobre el mecanismo de acción de Gen a nivel óseo, involucrando al RE y la vía NOS.

Las interrelaciones biológicas, la fisiopatología y la existencia de factores comunes compartidos entre las afecciones del esqueleto y el sistema vascular sugieren la existencia de un “cross talk” bidireccional óseo \leftrightarrow vascular (**London 2012**). Numerosos estudios longitudinales en pacientes crónicos han demostrado asociaciones entre osteoporosis y calcificación vascular, así como también que la progresión de la calcificación aórtica disminuye la densidad mineral ósea (**Fujihara y col. 2017; Lampropoulos y col. 2016; Tankó y col. 2005**). Diversos autores han descrito la participación de las vías RE/NOS en la regulación de la expresión de moléculas de adhesión celular en OB, las que mediarían la adhesión de preOC. La naturaleza de estas

relaciones en el eje óseo vascular no son claras. Se propone que: a) la aterosclerosis compromete el aporte circulatorio al esqueleto con una disminución de la perfusión ósea; b) existen factores de riesgo comunes a ambas enfermedades (edad, menopausia, dislipidemias, tabaco, alcohol); c) estrés oxidativo e inflamación activan vías de injuria en ambos sistemas que conducen a calcificaciones vasculares y desmineralización ósea; d) la función endócrina de las células óseas regula la biología vascular; e) células óseas participan en el remodelado vascular. Teniendo presente todos estos determinantes es que evaluamos el efecto de Gen sobre la interacción entre el sistema vascular y óseo trabajando con medios condicionados (**Grellier y col. 2009**). Demostramos una interacción de CE hacia el sistema óseo evidenciada por una regulación positiva del crecimiento de los OB, tanto regulando el crecimiento osteoblástico basalmente (condición control) como cuando el medio condicionado proviene de CE tratadas con Gen. Dado que el tratamiento de las CE con Gen fue a tiempos cortos, nos hizo presuponer que los factores/reguladores que contiene el medio condicionado son producto de una acción no genómica de Gen sobre CE. Teniendo en cuenta lo comentado en el párrafo anterior, y nuestros antecedentes sobre los efectos no genómicos de Gen sobre la síntesis de NO (**Polini y col. 2007**) estudiamos la participación de NO. Obtuvimos evidencia que la acción mitogénica de Gen sobre OB dependiente de CE, es mediada por el NO ya que la preincubación de las CE con el inhibidor irreversible de la NOS suprimió el efecto del medio condicionado. La participación de NO en la regulación del crecimiento de OB se comprobó empleando un dador de NO (nitroprusiato de sodio). Vimal Veeriah y col. demostraron la participación de la NOS en el “crosstalk” entre CE-OB favoreciendo la proliferación y diferenciación de los OB (**Veeriah y col. 2016**). El “feedback” entre CE y OB favoreciendo la proliferación y diferenciación de los OB, ha sido descrita por otros autores (**Stahl y col. 2004**).

Siendo que una adecuada perfusión sanguínea es necesaria para la remodelación y reparación ósea (**Grosso y col. 2017**), ya que aporta células progenitoras como así también mediadores que regulan la diferenciación y activación de las células formadoras y resortivas del hueso, estudiamos la interacción óseo-vascular en la dirección OB → CE → tejido vascular. La proliferación y migración de CE fue

potenciada cuando los ensayos se realizaron en presencia de un medio condicionado proveniente de OB tratados con Gen. Sabido es que la proliferación y migración son dos procesos que dirigen la formación de nuevos capilares a partir de vasos preexistentes. Los factores de crecimiento osteoblásticos regulan la formación de nuevos capilares a partir de la vasculatura preexistente (**Chim y col. 2013**). Empleando AA sobre un soporte de colágeno incubado durante 21 días con el MCOB-Gen, encontramos evidencia de una acción proangiogénica de la Gen a través de una interacción OB-tejido vascular (**Ribatti y col. 2015**). Huang y col. describieron la regulación de OB mediada por VEGF/Cxcl9 sobre la angiogénesis en el hueso, trabajando con medio condicionado de OB sobre CE. Sabido es que la inhibición de la angiogénesis es una de las estrategias químicas presentadas en la terapia oncológica. Se ha descrito acción inhibitoria de Gen sobre angiogénesis en modelos animales de cáncer de mamá, próstata e hígado (**Banerjee y col. 2008**).

En resumen esta última parte del trabajo de tesis demuestra la existencia de una acción bidireccional de Gen a nivel óseo y vascular con una interacción entre ambos sistemas celulares.

El desarrollo de las investigaciones de este trabajo de tesis reveló acciones directas y selectivas de Gen a nivel vascular u óseo, las que nos permitieron individualizar posibles puntos de interacción.

Los resultados reportados corresponden a ensayos *in vitro* empleando sistemas celulares aislados. Si bien en algunos casos se intentó simular situaciones más cercanas a lo que ocurre *in vivo* (medios condicionados, cocultivos, ensayos *ex vivo*), los datos no nos permiten definir la relevancia fisiológica de nuestros hallazgos. No obstante ello, la información obtenida aporta conocimiento básico, que en un futuro, podría tener implicancia en decisiones clínicas a favor de promover terapias naturales para la prevención de enfermedades de alta prevalencia y significativo costo social y económico para la población.

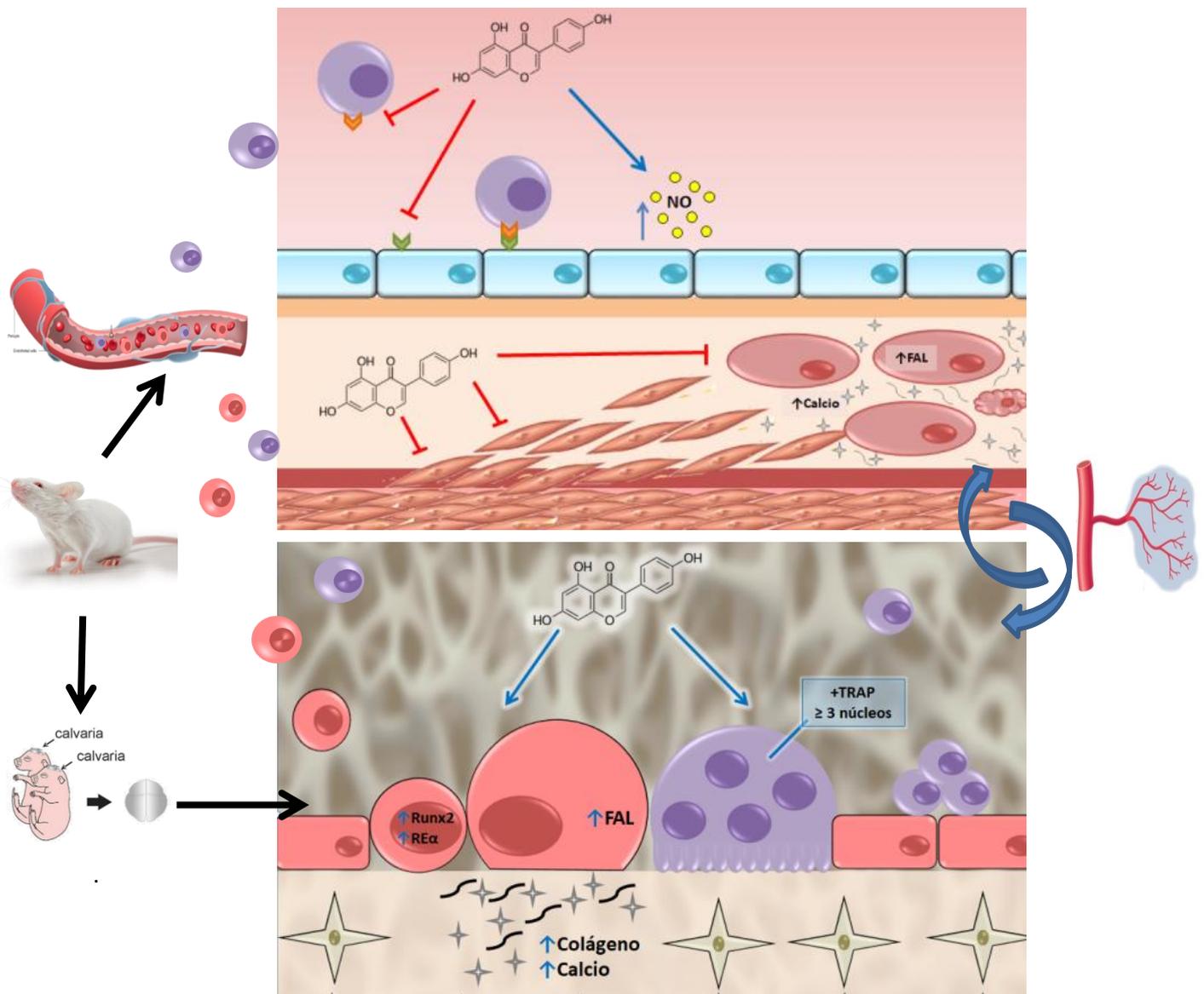
En resumen, los aspectos más destacados de este trabajo de tesis doctoral aportan evidencia que el fitoestrógeno Genisteína exhibe una acción selectiva y diferencial dependiendo del tejido sobre el cual actúa. A nivel vascular inhibe los procesos celulares que conducen a la calcificación vascular lo que puede interpretarse como efecto anti-óseo. En cambio, a nivel óseo Genisteína favorece la diferenciación de los dos principales tipos celulares (OB y OC) responsables de mediar el equilibrio entre formación y remodelación ósea. En un contexto integrado se aportó evidencia de una acción positiva y bi-direccional de Genisteína que comprende la interacción entre ambos sistemas.

Específicamente los resultados presentados nos permiten concluir que:

- Genisteína estimula la síntesis endotelial de los vasoactivos NO y VEGF;
- en células endoteliales, la isoflavona estimula la proliferación y migración celular, e inhibe el efecto apoptótico inducido por especies reactivas de oxígeno;
- en condiciones de stress inflamatorio, la Genisteína previene la inducción de la expresión de moléculas de adhesión celular involucradas en la adhesión firme de monocitos al endotelio vascular (ICAM-1 endotelial y la integrinas monocíticas CD11b, CD11c y CD18);
- en un modelo de transdiferenciación celular se demostró que Genisteína reduce la transformación ósea de las células musculares lisas vasculares a través de la reducción de la actividad FAL y de la mineralización extracelular;
- la inhibición de la calcificación vascular se corroboró en un modelo *ex vivo* de tejido aórtico;
- en cultivos primarios de OB Genisteína promueve la osteoblastogénesis a través de la estimulación de la expresión del $RE\alpha$ y Runx2, de la actividad FAL, del depósito extracelular de colágeno y de la mineralización de la matriz extracelular;
- la isoflavona favorece la diferenciación de monocitos a osteoclastos en el modelo experimental de co-cultivo Mo-OB;

- el mecanismo de acción de la isoflavona comprende la participación del RE y de la vía óxido nítrico sintasa;
- la isoflavona estimula el crecimiento de OB en forma indirecta, a través de su acción sobre CE estimulando la producción de NO endotelial;
- el efecto proangiogénico de Genisteína se potencia a través de su acción sobre los osteoblastos.

Representación esquemática de los principales aportes de este trabajo de Tesis



	CD11/CD18		Monocito		Célula muscular transdiferenciada		Osteoclasto
	ICAM-1		Célula endotelial		Célula muscular lisa vascular		Colágeno
					Osteoblasto		Depósito de Calcio
							Genisteína

AA: anillos de aorta de rata Wistar
Ao: aortas intactas de ratas Wistar
Ao-calcio: aortas calcificadas
ATC: aterosclerosis
ARNm: ácido ribonucleico mensajero
BMPs: proteínas morfogénicas óseas
BMP2: proteína morfogénica ósea 2
BMP4: proteína morfogénica ósea 4
βGP+Ca: medio de cultivo enriquecido en β-glicerofosfato y calcio
CAM: moléculas de adhesión celular
CaV: Calcificación vascular
CD11c: integrina monocítica β-2
CD11b: integrina monocítica β-2
CD18: integrina monocítica β-2
CD34: molécula de adhesión 34
CE: células endoteliales
CMLV: células musculares lisas vasculares
CMLV-NT: células musculares lisas vasculares nativas
CMLV-OB: células musculares lisas vasculares transdiferenciadas
Daid: Daidzeína
DMEM-D: medio de cultivo enriquecido en β-glicerofosfato y calcio
DMEM: medio de cultivo
ECV: enfermedades cardiovasculares
ELISA: ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas
E₂: estradiol
EOV: eje óseo-vascular
FE: fitoestrógeno
FAL: fosfatasa alcalina
FGF-2: factor de crecimiento de fibroblastos 2
FvW: factor von Willebrand
GADPH: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa
Gen: Genisteína
GMPc: Guanosín monofosfato cíclico
GPR30: receptor estrógeno de membrana acoplado a proteína G
H₂O₂: peróxido de hidrogeno
Hhs: hedgehogs
ICAM-1: molécula de adhesión intracelular 1
ICI182780: antagonista del receptor de estrógeno
IGF-1: factor de crecimiento insulínico tipo 1
MCCE: medio condicionado de células endoteliales
MCOB: medio condicionado de osteoblastos
MCCE-Gen: medio condicionado de células endoteliales tratadas con Genisteína

MCOB-Gen: medio condicionado de osteoblastos tratados con genisteína
M-CSF: factor estimulante de la colonia de macrófagos
IFM: intensidad de fluorescencia media
CMM: célula madre mesenquimal
Mo: monocitos
MPM: mujer posmenopáusica
MTT: Bromuro de 3-(4,5- dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol
NO: óxido nítrico
NOS: óxido nítrico sintasa
NPS: nitroprusiato de sodio
L-NAME: inhibidor de la óxido nítrico sintasa
LPS: lipopolisacarido bacteriano
OB: osteoblastos
OC: osteoclastos
Oc: osteocalcina
OPN: osteopontina
OPG: osteoprotegrina
Osx: osterix
OVX: ratas Wistar ovariectomizadas
RANKL: el ligando del factor activador de receptor nuclear NFkB
RE: receptor de estrógeno
RE α : receptor de estrógeno α
RE β : receptor de estrógeno β
ROS: especies reactivas de oxígeno
RT-PCR: reacción en cadena de la polimerasa con transcriptasa inversa
Runx2: factor de transcripción relativo Runx2
PDM-1: proteína de matriz de dentina
Pre-OB: preosteoblasto
PTHrp: péptido relacionado a la parathormona
SFB: suero fetal bovino
SERM: modulador selectivo del receptor de estrógeno
TGF- β : factor de crecimiento transformante β (TGF- β)
THR: terapia hormonal de remplazo
TNAP: fosfatasa alcalina no especifica de tejido
TRAP: fosfatasa ácida tartrato resistente
VEGFR2: receptor del factor de crecimiento del endotelio vascular 2
VEGF: factor de crecimiento del endotelio vascular
VCAM-1: molécula de adhesión vascular 1
Wnts: proteína Wingless

- Aeschlimann D, Evans BA (2004) The vital osteoclast: how is it regulated? *Cell Death Differ* 11 Suppl 1:S5-7
- Agosto C (2004) El medicamento fitoterápico. Legislación argentina. *Dominguezia* 20:18-23
- Albertazzi P (2002) Purified phytoestrogens in postmenopausal bone health: is there a role for genistein? *Climacteric* 5:190-196
- Aplin, A. C., Fogel, E., Zorzi, P., & Nicosia, R. F. (2008). The aortic ring model of angiogenesis. *Methods in enzymology*, 443, 119-136.
- Andersen HL, Weis JU, Fjalland B, Korsgaard N (1999) Effect of acute and long-term treatment with 17-beta-estradiol on the vasomotor responses in the rat aorta. *Br J Pharmacol* 126:159-168
- Angulo-Bejarano P, Martínez-Cruz O, Paredes-López O (2014) Phytochemical content, nutraceutical potential and biotechnological applications of an ancient Mexican plant: nopal (*Opuntia ficus-indica*). *Current Nutrition & Food Science* 10:196-217
- Armour KE, Ralston SH (1998) Estrogen upregulates endothelial constitutive nitric oxide synthase expression in human osteoblast-like cells. *Endocrinology* 139:799-802
- Asmis R, Stevens J, Begley J, Grimes B, Van Zant G, Fanti P (2006) The isoflavone genistein inhibits LPS-stimulated TNF α , but not IL-6 expression in monocytes from hemodialysis patients and healthy subjects. *Clinical nephrology* 65:267-75
- Axelsson M, Kirk DN, Farrant RD, Cooley G, Lawson AM, Setchell KD (1982) The identification of the weak oestrogen equol [7-hydroxy-3-(4'-hydroxyphenyl)chroman] in human urine. *Biochem J* 201:353-357
- Axelsson M, Sjøvall J, Gustafsson BE, Setchell KD (1984) Soya--a dietary source of the non-steroidal oestrogen equol in man and animals. *J Endocrinol* 102:49-56

- Bachetti T, Morbidelli L (2000) Endothelial cells in culture: a model for studying vascular functions. *Pharmacol Res* 42:9-19
- Banerjee S, Li Y, Wang Z, Sarkar FH (2008) Multi-targeted therapy of cancer by genistein. *Cancer Lett* 269:226-242
- Bagur A, Oliveri B, Mautalen C, Belotti M, Mastaglia S, Yankelevich D, Sayegh F, Royer M (2004) Low levels of endogenous estradiol protect bone mineral density in young postmenopausal women. *Climacteric* 7:181-188
- Bell E, Ivarsson B, Merrill C (1979) Production of a tissue-like structure by contraction of collagen lattices by human fibroblasts of different proliferative potential in vitro. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 76:1274-1278
- Boström KI, Rajamannan NM, Towler DA (2011) The regulation of valvular and vascular sclerosis by osteogenic morphogens. *Circulation research* 109:564-577
- Boyde A, Jones SJ (1996) Scanning electron microscopy of bone: instrument, specimen, and issues. *Microsc Res Tech* 33:92-120
- Boyle WJ, Simonet WS, Lacey DL (2003) Osteoclast differentiation and activation. *Nature* 423:337-342
- Brzezinski A, Debi A (1999) Phytoestrogens: the “natural” selective estrogen receptor modulators? *European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology* 85:47-51
- Campelo AE, Cutini PH, Massheimer VL (2012) Cellular actions of testosterone in vascular cells: mechanism independent of aromatization to estradiol. *Steroids* 77:1033-1040
- Carson JA, Manolagas SC (2015) Effects of sex steroids on bones and muscles: Similarities, parallels, and putative interactions in health and disease. *Bone* 80:67-78

- Cederroth CR, Nef S (2009) Soy, phytoestrogens and metabolism: A review. *Mol Cell Endocrinol* 304:30-42
- Chistiakov DA, Orekhov AN, Bobryshev YV (2015) Vascular smooth muscle cell in atherosclerosis. *Acta Physiol (Oxf)* 214:33-50
- Chim SM, Tickner J, Chow ST, Kuek V, Guo B, Zhang G, Rosen V, Erber W, Xu J (2013) Angiogenic factors in bone local environment. *Cytokine Growth Factor Rev* 24:297-310
- Choi EM, Suh KS, Kim YS, Choue RW, Koo SJ (2001) Soybean ethanol extract increases the function of osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Phytochemistry* 56:733-739
- Clark P, Chico G, Carlos F, Zamudio F, Pereira RMR, Zanchetta J, Castillo J (2013) Osteoporosis en América Latina: revisión de panel de expertos. *Medwave* 13:e5791
- Cos P, De Bruyne T, Apers S, Berghe DV, Pieters L, Vlietinck AJ (2003) Phytoestrogens: recent developments. *Planta Med* 69:589-599
- Cutini PH, Massheimer VL (2010) Role of progesterone on the regulation of vascular muscle cells proliferation, migration and apoptosis. *Steroids* 75:355-361
- Cutini PH, Campelo AE, Agriello E, Sandoval MJ, Rauschemberger MB, Massheimer VL (2012) The role of sex steroids on cellular events involved in vascular disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* 132:322-330
- Cutini PH, Campelo AE, Massheimer VL (2014) Differential regulation of endothelium behavior by progesterone and medroxyprogesterone acetate. *J Endocrinol* 220:179-193
- Cutini PH, Rauschemberger MB, Sandoval MJ, Massheimer VL (2016) Vascular action of bisphosphonates: In vitro effect of alendronate on the regulation of cellular events involved in vessel pathogenesis. *J Mol Cell Cardiol* 100:83-92
- Dai J, Li Y, Zhou H, Chen J, Chen M, Xiao Z (2013) Genistein promotion of osteogenic differentiation through BMP2/SMAD5/RUNX2 signaling. *Int J Biol Sci* 9:1089

- D'Elia NL, Gravina AN, Ruso JM, Laiuppa JA, Santillan GE, Messina PV (2013) Manipulating the bioactivity of hydroxyapatite nano-rods structured networks: effects on mineral coating morphology and growth kinetic. *Biochim Biophys Acta* 1830:5014-5026
- Dalle Carbonare L, Innamorati G, Valenti MT (2012) Transcription factor Runx2 and its application to bone tissue engineering. *Stem Cell Reviews and Reports* 8:891-897
- Dixon RA, Ferreira D (2002) Genistein. *Phytochemistry* 60:205-211
- Duncan AM, Phipps WR, Kurzer MS (2003) Phyto-oestrogens. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 17:253-271
- Eastell R, O'Neill TW, Hofbauer LC, Langdahl B, Reid IR, Gold DT, Cummings SR (2016) Postmenopausal osteoporosis. *Nature reviews Disease primers* 2:16069
- Escribano Tórtola JJ (2010) Tesis doctoral: Evaluación de la eficacia de una dosis diaria de 40-80 mg de isoflavonas de soja (*Glycine max* L.) en el tratamiento de la sintomatología climatérica 271-292
- Fanti P, Monier-Faugere M, Geng Z, Schmidt J, Morris P, Cohen D, Malluche H (1998) The phytoestrogen genistein reduces bone loss in short-term ovariectomized rats. *Osteoporosis International* 8:274-281
- Ferrara N, Gerber H-P, LeCouter J (2003) The biology of VEGF and its receptors. *Nat Med* 9:669-676
- Florencio-Silva R, Sasso GR, Sasso-Cerri E, Simoes MJ, Cerri PS (2015) Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *Biomed Res Int* 2015: 1-17
- Fu XH, Wang L, Zhao H, Xiang HL, Cao JG (2008) Synthesis of genistein derivatives and determination of their protective effects against vascular endothelial cell damages caused by hydrogen peroxide. *Bioorg Med Chem Lett* 18:513-517

Fujihara Y, Nawata H, Honda M, Kunitake T, Aida E, Nagai T, Kuramochi H, Ueno J, Yoshimoto S, Muta K (2017) Comparative study of the correlation between atherosclerosis and osteoporosis in women in Japan and Mongolia. *Journal of general and family medicine* 18:237-243

Fukutake M, Takahashi M, Ishida K, Kawamura H, Sugimura T, Wakabayashi K (1996) Quantification of genistein and genistin in soybeans and soybean products. *Food Chem Toxicol* 34:457-461

Galkina E, Ley K (2009) Immune and inflammatory mechanisms of atherosclerosis (*). *Annu Rev Immunol* 27:165-197

Ganai AA, Farooqi H (2015) Bioactivity of genistein: A review of in vitro and in vivo studies. *Biomed Pharmacother* 76:30-38

García-Martínez MC, Hermenegildo C, Tarín JJ, Cano A (2003) Phytoestrogens increase the capacity of serum to stimulate prostacyclin release in human endothelial cells. *Acta obstetricia et gynecologica Scandinavica* 82:705-710

Gao YH, Yamaguchi M (1999) Suppressive effect of genistein on rat bone osteoclasts: apoptosis is induced through Ca²⁺ signaling. *Biol Pharm Bull* 22:805-809

Gencil VB, Benjamin MM, Bahou SN, Khalil RA (2012) Vascular effects of phytoestrogens and alternative menopausal hormone therapy in cardiovascular disease. *Mini Rev Med Chem* 12:149-174

Gómez de Tejada Romero MJ, Corral Goudino L (2012) Bazedoxifeno y osteoporosis: revisión sistemática. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral* 4:5-164

Grellier M, Bordenave L, Amedee J (2009) Cell-to-cell communication between osteogenic and endothelial lineages: implications for tissue engineering. *Trends Biotechnol* 27:562-571

Griess P (1879) Bemerkungen zu der Abhandlung der HH. Weselsky und Benedikt "Ueber einige Azoverbindungen" . *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft* 12:426-428

Grosso A, Burger MG, Lunger A, Schaefer DJ, Banfi A, Di Maggio N (2017) It Takes Two to Tango: Coupling of Angiogenesis and Osteogenesis for Bone Regeneration. *Front Bioeng Biotechnol* 5:1-7

Gotsch U, Jager U, Dominis M, Vestweber D (1994) Expression of P-selectin on endothelial cells is upregulated by LPS and TNF-alpha in vivo. *Cell Adhes Commun* 2:7-14

Hadjidakis DJ, Androulakis, II (2006) Bone remodeling. *Ann N Y Acad Sci* 1092:385-396

Harborne JB (1988) Flavonoids in the environment: structure-activity relationships. *Prog Clin Biol Res* 280:17-27

Harold DE, Walz W (1992) Basic Techniques for Cell Culturing(ed) Practical Cell Culture Techniques, Springer. pp 1-20

Harsha PSS, Wahab RA, Aloy MG, Madrid-Gambin F, Estruel-Amades S, Watzl B, Andrés-Lacueva C, Brennan L (2018) Biomarkers of legume intake in human intervention and observational studies: a systematic review. *Genes Nutr* 13:1-16

Hai-Xin L, Yu W, Qing L, Ming-Zhu Y, Guan-Wei F, Karas RH, Xiu-Mei G, Yan Z (2016) Bidirectional regulation of angiogenesis by phytoestrogens through estrogen receptor-mediated signaling networks. *Chinese journal of natural medicines* 14:241-254

Hayman AR (2008) Tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) and the osteoclast/immune cell dichotomy. *Autoimmunity* 41:218-223

Hoehn K, Marieb en 2007 Human anatomy & physiology. Editorial San Francisco: Pearson Benjamin Cummings: Benjamin Cummings. 7°ed.

Klein-Nulend J, Nijweide PJ, Burger EH (2003) Osteocyte and bone structure. *Current osteoporosis reports* 1:5-10

Kockx MM, Herman AG (2000) Apoptosis in atherosclerosis: beneficial or detrimental? *Cardiovasc Res* 45:736-746

Hsia J, Langer RD, Manson JE, Kuller L, Johnson KC, Hendrix SL, Pettinger M, Heckbert SR, Greep N, Crawford S (2006) Conjugated equine estrogens and coronary heart disease: the Women's Health Initiative. *Arch Intern Med* 166:357-365

Hsieh T-P, Sheu S-Y, Sun J-S, Chen M-H, Liu M-H (2010) Icariin isolated from *Epimedium pubescens* regulates osteoblasts anabolism through BMP-2, SMAD4, and Cbfa1 expression. *Phytomedicine* 17:414-423

Hu R, Liu W, Li H, Yang L, Chen C, Xia Z-Y, Guo L-J, Xie H, Zhou H-D, Wu X-P (2011) A Runx2/miR-3960/miR-2861 regulatory feedback loop during mouse osteoblast differentiation. *Journal of Biological Chemistry*. 286: 12328-39

Hwang YP, Kim HG, Hien TT, Jeong MH, Jeong TC, Jeong HG (2011) Puerarin activates endothelial nitric oxide synthase through estrogen receptor-dependent PI3-kinase and calcium-dependent AMP-activated protein kinase. *Toxicol Appl Pharmacol* 257:48-58

Imanishi T, Hano T, Nishio I (2005) Angiotensin II accelerates endothelial progenitor cell senescence through induction of oxidative stress. *J Hypertens* 23:97-104

Izumi T, Piskula MK, Osawa S, Obata A, Tobe K, Saito M, Kataoka S, Kubota Y, Kikuchi M (2000) Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than their glucosides in humans. *J Nutr* 130:1695-1699

Kalra EK (2003) Nutraceutical-definition and introduction. *Aaps Pharmsci* 5:27-28

Kalyanaraman H, Ramdani G, Joshua J, Schall N, Boss GR, Cory E, Sah RL, Casteel DE, Pilz RB (2017) A Novel, Direct NO Donor Regulates Osteoblast and Osteoclast Functions and Increases Bone Mass in Ovariectomized Mice. *J Bone Miner Res* 32:46-59

- Kalyanaraman H, Schall N, Pilz RB (2018) Nitric oxide and cyclic GMP functions in bone. *Nitric Oxide* 76:62-70
- Kanno Y, Into T, Lowenstein CJ, Matsushita K (2008) Nitric oxide regulates vascular calcification by interfering with TGF- signalling. *Cardiovasc Res* 77:221-230
- Kanczler J, Oreffo R (2008) Osteogenesis and angiogenesis: the potential for engineering bone. *Eur Cell Mater* 15:100-114
- Kassem M, Marie PJ (2011) Senescence-associated intrinsic mechanisms of osteoblast dysfunctions. *Aging Cell* 10:191-197
- Khalil RA (2013) Estrogen, vascular estrogen receptor and hormone therapy in postmenopausal vascular disease. *Biochem Pharmacol* 86:1627-1642
- Kitaoka M, Kadokawa H, Sugano M, Ichikawa K, Taki M, Takaishi S, Iijima Y, Tsutsumi S, Boriboon M, Akiyama T (1998) Prenylflavonoids: a new class of non-steroidal phytoestrogen (Part 1). Isolation of 8-isopentenylnaringenin and an initial study on its structure-activity relationship. *Planta Med* 64:511-515
- Kleinbongard P, Rassaf T, Dejam A, Kerber S, Kelm M (2002) Griess method for nitrite measurement of aqueous and protein-containing samples. *Methods Enzymol* 359:158-168
- Ko K-P (2014) Isoflavones: chemistry, analysis, functions and effects on health and cancer. *Asian Pac J Cancer Prev* 15:7001-7010
- Kolf CM, Cho E, Tuan RS (2007) Mesenchymal stromal cells: biology of adult mesenchymal stem cells: regulation of niche, self-renewal and differentiation. *Arthritis research & therapy* 9:1-10
- Komori T (2010) Regulation of osteoblast differentiation by Runx2. *Advances in Experimental Medicine Biology* 658:43-49

- Labrie F, Labrie C (2013) DHEA and intracrinology at menopause, a positive choice for evolution of the human species. *Climacteric* 16:205-213
- Lampropoulos C, Kalamara P, Konsta M, Papaioannou I, Papadima E, Antoniou Z, Andrianopoulou A, Vlachoyiannopoulos P (2016) Osteoporosis and vascular calcification in postmenopausal women: a cross-sectional study. *Climacteric* 19:303-307
- Lee C-S, Kwon S-J, Na S-Y, Lim S-P, Lee J-H (2004) Genistein supplementation inhibits atherosclerosis with stabilization of the lesions in hypercholesterolemic rabbits. *Journal of Korean medical science* 19:656-661
- Lee SH, Lee JH, Asahara T, Kim YS, Jeong HC, Ahn Y, Jung JS, Kwon S-M (2014) Genistein promotes endothelial colony-forming cell (ECFC) bioactivities and cardiac regeneration in myocardial infarction. *PLoS One* 9:e96155
- Lee Y-S, Chen X, Anderson JJ (2001) Physiological concentrations of genistein stimulate the proliferation and protect against free radical-induced oxidative damage of MC3T3-E1 osteoblast-like cells. *Nutrition Research* 21:1287-1298
- Leopold JA (2014) MicroRNAs Regulate Vascular Medial Calcification. *Cells* 3:963-980
- Leszczynska A, Murphy JM (2018) Vascular Calcification: Is it rather a Stem/Progenitor Cells Driven Phenomenon? *Front Bioeng Biotechnol* 6:1-8
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S (2007) Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol* 7:678-689
- Li B, Yu S (2003) Genistein prevents bone resorption diseases by inhibiting bone resorption and stimulating bone formation. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 26:780-786

- Li X, Yang J, He X, Yang Z, Ding Y, Zhao P, Liu Z, Shao H, Li Z, Zhang Y, *et al.* (2009) Identification of upregulators of BMP2 expression via high-throughput screening of a synthetic and natural compound library. *J Biomol Screen* 14:1251-1256
- Liao MH, Tai YT, Cherng YG, Liu SH, Chang YA, Lin PI, Chen RM (2014) Genistein induces oestrogen receptor-alpha gene expression in osteoblasts through the activation of mitogen-activated protein kinases/NF-kappaB/activator protein-1 and promotes cell mineralisation. *Br J Nutr* 111:55-63
- Lim RZL, Li L, Yong EL, Chew N (2018) STAT-3 regulation of CXCR4 is necessary for the prenylflavonoid Icaritin to enhance mesenchymal stem cell proliferation, migration and osteogenic differentiation. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* 1862:1680-1692
- Ling S, Dai A, Williams MR, Husband AJ, Nestel PJ, Komesaroff PA, Sudhir K (2004) The isoflavone metabolite cis-tetrahydrodaidzein inhibits ERK-1 activation and proliferation in human vascular smooth muscle cells. *J Cardiovasc Pharmacol* 43:622-628
- Liu D, Jiang H, Grange RW (2005) Genistein activates the 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate signaling pathway in vascular endothelial cells and protects endothelial barrier function. *Endocrinology* 146:1312-1320
- Liu F, Kohlmeier S, Wang CY (2008) Wnt signaling and skeletal development. *Cell Signal* 20:999-1009
- Lomashvili KA, Garg P, Narisawa S, Millan JL, O'Neill WC (2008) Upregulation of alkaline phosphatase and pyrophosphate hydrolysis: potential mechanism for uremic vascular calcification. *Kidney Int* 73:1024-1030
- London GM (2012) Bone-vascular cross-talk. *J Nephrol* 25:619-625
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193:265-275

- Lu K, Zeng D, Zhang Y, Xia L, Xu L, Kaplan DL, Jiang X, Zhang F (2011) BMP-2 gene modified canine bMSCs promote ectopic bone formation mediated by a nonviral PEI derivative. *Ann Biomed Eng* 39:1829-1839
- Lu Q, Xiang DX, Yuan HY, Xiao Y, Yuan LQ, Li HB (2014) Puerarin attenuates calcification of vascular smooth muscle cells. *Am J Chin Med* 42:337-347
- Lv H, Che T, Tang X, Liu L, Cheng J (2015) Puerarin enhances proliferation and osteoblastic differentiation of human bone marrow stromal cells via a nitric oxide/cyclic guanosine monophosphate signaling pathway. *Mol Med Rep* 12:2283-2290
- Mendelsohn ME, Karas RH (2005) Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences. *Science* 308:1583-1587
- Manduteanu I, Simionescu M (2012) Inflammation in atherosclerosis: a cause or a result of vascular disorders? *J Cell Mol Med* 16:1978-1990
- Manolagas SC, Parfitt AM (2010) What old means to bone. *Trends Endocrinol Metab* 21:369-374
- Mancini L, Moradi-Bidhendi N, Becherini L, Martineti V, MacIntyre I (2000) The biphasic effects of nitric oxide in primary rat osteoblasts are cGMP dependent. *Biochem Biophys Res Commun* 274:477-481
- Manzanal M (2017) Territorio, Poder y Sojización en el Cono Sur latinoamericano: El caso argentino. *Mundo agrario* 18:00-00
- Marks Jr SC, Popoff SN (1988) Bone cell biology: the regulation of development, structure, and function in the skeleton. *American Journal of Anatomy* 183:1-44
- Masuda H, Asahara T (2003) Post-natal endothelial progenitor cells for neovascularization in tissue regeneration. *Cardiovasc Res* 58:390-398

Massheimer V, Polini N, Alvarez C, Benozzi S, Selles J (2002) 17Beta-estradiol rapid stimulation of rat aorta NOS activity is prevented by oestrogen deficiency. *Maturitas* 43:55-64

Massheimer V, Polini N, Alvarez C, Benozzi S, Rauschemberger MB, Selles J (2006) Signal transduction pathways involved in non-genomic action of estrone on vascular tissue. *Steroids* 71:857-864

Marotta F, Mao G, Liu T, Chui D, Lorenzetti A, Xiao Y, Marandola P (2006) Anti-inflammatory and Neuroprotective Effect of a Phytoestrogen Compound on Rat Microglia. *Ann N Y Acad Sci* 1089:276-281

Mendez-Ferrer S, Michurina TV, Ferraro F, Mazloom AR, Macarthur BD, Lira SA, Scadden DT, Ma'ayan A, Enikolopov GN, Frenette PS (2010) Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature* 466:829-834

McGarry JG, Klein-Nulend J, Prendergast PJ (2005) The effect of cytoskeletal disruption on pulsatile fluid flow-induced nitric oxide and prostaglandin E2 release in osteocytes and osteoblasts. *Biochem Biophys Res Commun* 330:341-348

Mill C, George SJ (2012) Wnt signalling in smooth muscle cells and its role in cardiovascular disorders. *Cardiovasc Res* 95:233-240

Morabito N, Crisafulli A, Vergara C, Gaudio A, Lasco A, Frisina N, D'Anna R, Corrado F, Pizzoleo MA, Cincotta M (2002a) Effects of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early postmenopausal women: a randomized double-blind placebo-controlled study. *Journal of Bone and Mineral Research* 17:1904-1912

Nikolić IL, Savić-Gajić IM, Tačić AD, Savić IM (2017) Classification and biological activity of phytoestrogens: A review. *Advanced Technologies* 6:96-106

Nilsson A (1962) Estrogenic activity of some isoflavone derivatives. *Acta Physiologica Scandinavica* 56:230-236

- Nofer J-R (2012) Estrogens and atherosclerosis: insights from animal models and cell systems. *Journal of molecular endocrinology* 48:R13-R29
- Orshal JM, Khalil RA (2004) Gender, sex hormones, and vascular tone. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286:R233-249
- O'Shaughnessy MC, Polak JM, Afzal F, Hukkanen MV, Huang P, MacIntyre I, BATTERY LD (2000) Nitric oxide mediates 17beta-estradiol-stimulated human and rodent osteoblast proliferation and differentiation. *Biochem Biophys Res Commun* 277:604-610
- Ososki AL, Kennelly EJ (2003) Phytoestrogens: a review of the present state of research. *Phytother Res* 17:845-869
- Ouyang P, Michos ED, Karas RH (2006) Hormone replacement therapy and the cardiovascular system: lessons learned and unanswered questions. *J Am Coll Cardiol* 47:1741-1753
- Pal SN, Golledge J (2011) Osteo-progenitors in vascular calcification: a circulating cell theory. *J Atheroscler Thromb* 18:551-559
- Park ES, Park J, Franceschi RT, Jo M (2012) The role for runt related transcription factor 2 (RUNX2) as a transcriptional repressor in luteinizing granulosa cells. *Mol Cell Endocrinol* 362:165-175
- Pinkerton JV, Santen R (1999) Alternatives to the use of estrogen in postmenopausal women. *Endocr Rev* 20:308-320
- Polini N, Rauschemberger MB, Mendiberri J, Selles J, Massheimer V (2007) Effect of genistein and raloxifene on vascular dependent platelet aggregation. *Mol Cell Endocrinol* 267:55-62
- Polkowski K, Mazurek AP (2000) Biological properties of genistein. A review of in vitro and in vivo data. *Acta Pol Pharm* 57:135-155

- Poluzzi E, Piccinni C, Raschi E, Rampa A, Recanatini M, De Ponti F (2014) Phytoestrogens in postmenopause: the state of the art from a chemical, pharmacological and regulatory perspective. *Curr Med Chem* 21:417-436
- Price PA, Chan WS, Jolson DM, Williamson MK (2006) The elastic lamellae of devitalized arteries calcify when incubated in serum: evidence for a serum calcification factor. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 26:1079-1085
- Pugliese G, Iacobini C, Blasetti Fantauzzi C, Menini S (2015) The dark and bright side of atherosclerotic calcification. *Atherosclerosis* 238:220-230
- Ribatti D, Nico B, Crivellato E (2015) The development of the vascular system: a historical overview. *Methods Mol Biol* 1214:1-14
- Rivollier A, Mazzorana M, Tebib J, Piperno M, Aitsiselmi T, Rabourdin-Combe C, Jurdic P, Servet-Delprat C (2004) Immature dendritic cell transdifferentiation into osteoclasts: a novel pathway sustained by the rheumatoid arthritis microenvironment. *Blood* 104:4029-4037
- Reinli K, Block G (1996) Phytoestrogen content of foods—a compendium of literature values. *Nutr Cancer* 26:123-148
- Rimbach G, Boesch-Saadatmandi C, Frank J, Fuchs D, Wenzel U, Daniel H, Hall WL, Weinberg PD (2008) Dietary isoflavones in the prevention of cardiovascular disease—A molecular perspective. *Food and Chemical Toxicology* 46:1308-1319
- Ross R (1999) Atherosclerosis—an inflammatory disease. *New England journal of medicine* 340:115-126
- Rudijanto A (2007) The role of vascular smooth muscle cells on the pathogenesis of atherosclerosis. *Acta Med Indones* 39:86-93
- Sepúlveda Saavedra, J. (2013). Capítulo 11: Sistema circulatorio. *Texto atlas de histología: biología celular y tisular*. McGraw Hill Mexico. pp 225-235.

Sakaki J, Melough M, Lee SG, Pounis G, Chun OK (2019) Polyphenol-Rich Diets in Cardiovascular Disease Prevention(ed) Analysis in Nutrition Research, Elsevier. pp 259-298

Salamat MS (2010) Robbins and cotran: Pathologic basis of disease. American Association of Neuropathologists, Inc. 69:214

Sandoval MJ, Cutini PH, Rauschemberger MB, Massheimer VL (2010) The soyabean isoflavone genistein modulates endothelial cell behaviour. *Br J Nutr* 104:171-179

Santos A, Bakker AD, Zandieh-Doulabi B, de Blicck-Hogervorst JM, Klein-Nulend J (2010) Early activation of the beta-catenin pathway in osteocytes is mediated by nitric oxide, phosphatidyl inositol-3 kinase/Akt, and focal adhesion kinase. *Biochem Biophys Res Commun* 391:364-369

Selles J, Polini N, Alvarez C, Massheimer V (2001) Progesterone and 17 beta-estradiol acutely stimulate nitric oxide synthase activity in rat aorta and inhibit platelet aggregation. *Life Sci* 69:815-827

Serrano CV, Jr., Oranges M, Brunaldi V, de MSA, Torres TA, Nicolau JC, Ramires JA (2011) Skeletonized coronary arteries: pathophysiological and clinical aspects of vascular calcification. *Vasc Health Risk Manag* 7:143-151

Setchell KD (2001) Soy isoflavones--benefits and risks from nature's selective estrogen receptor modulators (SERMs). *J Am Coll Nutr* 20:354S-362S

Shah FA, Palmquist A (2017) Evidence that Osteocytes in Autogenous Bone Fragments can Repair Disrupted Canalicular Networks and Connect with Osteocytes in de novo Formed Bone on the Fragment Surface. *Calcif Tissue Int* 101:321-327

Si H, Liu D (2007) Phytochemical genistein in the regulation of vascular function: new insights. *Curr Med Chem* 14:2581-2589

Simons LA, von Konigsmark M, Simons J, Celermajer DS (2000) Phytoestrogens do not influence lipoprotein levels or endothelial function in healthy, postmenopausal women. *The American journal of cardiology* 85:1297-1301

Smith JA, Das A, Butler JT, Ray SK, Banik NL (2011) Estrogen or estrogen receptor agonist inhibits lipopolysaccharide induced microglial activation and death. *Neurochem Res* 36:1587-1593

Snedecor GW, Cochran W (1967) Statistical methods, 593 pp. *Iowa State Univ., Ames*

Song J, Wan Y, Rolfe BE, Campbell JH, Campbell GR (1998) Effect of estrogen on vascular smooth muscle cells is dependent upon cellular phenotype. *Atherosclerosis* 140:97-104

Steinhubl SR, Moliterno DJ (2005) The role of the platelet in the pathogenesis of atherothrombosis. *Am J Cardiovasc Drugs* 5:399-408

Stahl A, Wenger A, Weber H, Stark GB, Augustin HG, Finkenzeller G (2004) Bi-directional cell contact-dependent regulation of gene expression between endothelial cells and osteoblasts in a three-dimensional spheroidal coculture model. *Biochem Biophys Res Commun* 322:684-692

Stein GS, Lian JB, van Wijnen AJ, Stein JL, Montecino M, Javed A, Zaidi SK, Young DW, Choi JY, Pockwinse SM (2004) Runx2 control of organization, assembly and activity of the regulatory machinery for skeletal gene expression. *Oncogene* 23:4315-4329

Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ (1999) Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 20:345-357

Tanaka Y, Nakayamada S, Okada Y (2005) Osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling and inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4:325-328

- Tankó LB, Christiansen C, Cox DA, Geiger MJ, McNabb MA, Cummings SR (2005) Relationship between osteoporosis and cardiovascular disease in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 20:1912-1920
- Thompson B, Towler DA (2012) Arterial calcification and bone physiology: role of the bone–vascular axis. *Nature Reviews Endocrinology* 8:529-43
- Tiyasatkulkovit W, Charoenphandhu N, Wongdee K, Thongbunchoo J, Krishnamra N, Malaivijitnond S (2012) Upregulation of osteoblastic differentiation marker mRNA expression in osteoblast-like UMR106 cells by puerarin and phytoestrogens from *Pueraria mirifica*. *Phytomedicine* 19:1147-1155
- Tousoulis D, Kampoli AM, Tentolouris C, Papageorgiou N, Stefanadis C (2012) The role of nitric oxide on endothelial function. *Curr Vasc Pharmacol* 10:4-18
- Toledo-Piza AR, Nakano E, Rici RE, Maria DA (2013) Proliferation of fibroblasts and endothelial cells is enhanced by treatment with *Phyllocaulis boraceiensis* mucus. *Cell Prolif* 46:97-108
- Tullberg-Reinert H, Jundt G (1999) In situ measurement of collagen synthesis by human bone cells with a sirius red-based colorimetric microassay: effects of transforming growth factor beta2 and ascorbic acid 2-phosphate. *Histochem Cell Biol* 112:271-276
- Usui T (2006) Pharmaceutical prospects of phytoestrogens. *Endocrine journal* 53:7-20
- Vatsa A, Smit TH, Klein-Nulend J (2007) Extracellular NO signalling from a mechanically stimulated osteocyte. *J Biomech* 40 Suppl 1:S89-95
- Vazquez-Padron RI, Lasko D, Li S, Louis L, Pestana IA, Pang M, Liotta C, Fornoni A, Aitouche A, Pham SM (2004) Aging exacerbates neointimal formation, and increases proliferation and reduces susceptibility to apoptosis of vascular smooth muscle cells in mice. *J Vasc Surg* 40:1199-1207

- Veeriah V, Zanniti A, Paone R, Chatterjee S, Rucci N, Teti A, Capulli M (2016) Interleukin-1beta, lipocalin 2 and nitric oxide synthase 2 are mechano-responsive mediators of mouse and human endothelial cell-osteoblast crosstalk. *Sci Rep* 6:29880
- Viale-Bouroncle S, Gosau M, Morszeck C (2014) Laminin regulates the osteogenic differentiation of dental follicle cells via integrin-alpha2/-beta1 and the activation of the FAK/ERK signaling pathway. *Cell Tissue Res* 357:345-354
- Vitolins MZ, Anthony M, Burke GL (2001) Soy protein isoflavones, lipids and arterial disease. *Current Opinion in Lipidology* 12:433-437
- Wang Y, Wang WL, Xie WL, Li LZ, Sun J, Sun WJ, Gong HY (2013) Puerarin stimulates proliferation and differentiation and protects against cell death in human osteoblastic MG-63 cells via ER-dependent MEK/ERK and PI3K/Akt activation. *Phytomedicine* 20:787-796
- Wiren KM, Chapman Evans A, Zhang XW (2002) Osteoblast differentiation influences androgen and estrogen receptor-alpha and -beta expression. *J Endocrinol* 175:683-694
- Witztum JL (1994) The oxidation hypothesis of atherosclerosis. *The Lancet* 344:793-795
- Wu H, Gower RM, Wang H, Perrard XY, Ma R, Bullard DC, Burns AR, Paul A, Smith CW, Simon SI, *et al.* (2009) Functional role of CD11c+ monocytes in atherogenesis associated with hypercholesterolemia. *Circulation* 119:2708-2717
- Xiong J 2013 Tesis doctoral: RUNX2 stimulates osteoblast-driven osteoclastogenesis by RANKL presentation: University of Southern California 1-34.
- Yamori Y, Miura A, Taira K (2001) Implications from and for food cultures for cardiovascular diseases: Japanese food, particularly Okinawan diets. *Asia Pacific journal of clinical nutrition* 10:144-145
- Young MF (2003) Bone matrix proteins: their function, regulation, and relationship to osteoporosis. *Osteoporos Int* 14 Suppl 3:S35-42

Yu B, Tang DZ, Li SY, Wu Y, Chen M (2017) Daidzein promotes proliferation and differentiation in osteoblastic OCT1 cells via activation of the BMP-2/Smads pathway. *Pharmazie* 72:35-40

Zaidi M (2007) Skeletal remodeling in health and disease. *Nat Med* 13:791-801

Zeng X, Feng Q, Zhao F, Sun C, Zhou T, Yang J, Zhan X (2018) Puerarin inhibits TRPM3/miR-204 to promote MC3T3-E1 cells proliferation, differentiation and mineralization. *Phytother Res* 32:996-1003

Zhang H-p, Zheng F-l, Zhao J-h, Guo D-x, Chen X-l (2013) Genistein inhibits ox-LDL-induced VCAM-1, ICAM-1 and MCP-1 expression of HUVECs through heme oxygenase-1. *Archives of medical research* 44:13-20

Zouani OF, Rami L, Lei Y, Durrieu MC (2013) Insights into the osteoblast precursor differentiation towards mature osteoblasts induced by continuous BMP-2 signaling. *Biol Open* 2:872-881

Zhai Y-K, Guo X-Y, Ge B-F, Zhen P, Ma X-N, Zhou J, Ma H-P, Xian CJ, Chen K-M (2014) Icariin stimulates the osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells via activating the PI3K-AKT-eNOS-NO-cGMP-PKG. *Bone* 66:189-198

Zhan S, Ho SC (2005) Meta-analysis of the effects of soy protein containing isoflavones on the lipid profile-. *Am J Clin Nutr* 81:397-408

Zilberman JM (2018) [Menopause: Hypertension and vascular disease]. *Hipertens Riesgo Vasc* 35:77-83

Zouani OF, Rami L, Lei Y, Durrieu MC (2013) Insights into the osteoblast precursor differentiation towards mature osteoblasts induced by continuous BMP-2 signaling. *Biol Open* 2:872-881

Publicaciones en revistas internacionales con referato originadas de este trabajo de tesis doctoral:

- Cepeda Sabrina B, Ruaschemberger Belén, Sandoval Marisa J, Massheimer Virginia L “BENEFICIAL ROL OF THE PHYTOESTROGEN GENISTEIN ON VASCULAR CALCIFICATION”. Journal of Nutritional Biochemistry (2017); 50: 26:37.

<https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2017.08.009>

Durante el desarrollo de esta tesis se realizaron 16 presentaciones a congresos cuyos resúmenes fueron publicados en revistas científicas con referato (Bone, Actualizaciones en Osteología, Revista Argentina de Endocrinología y Metabolismo, Revista Medicina).