

11281
37

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO



FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

REGULACION DE LAS CELULAS ENDOTELIALES POR
HORMONAS ESTEROIDEAS, INDUCCION DE LA SECRECION
DE FACTORES QUIMIOATRAYENTES PARA MACROFAGOS
Y SU RELACION CON LA FORMACION DE PLACAS
ATEROMATOSAS.

TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS
(BIOQUIMICA)

PRESENTA:

M. en C. EMMA RODRIGUEZ MALDONADO

ASESOR: DR. LUIS FELIPE MONTAÑO ESTRADA



MEXICO, D. F.

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas
UNAM a difundir en formato electrónico o imp.
contenido de mi trabajo recepción.
NOMBRE: Emma Rodríguez
Maldonado
FECHA: 28 Mayo / 03
FIRMA: [Firma]

2003

A

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Esta tesis fue realizada en el Departamento de Biología Celular del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", bajo la tutoría del Dr. Luis Felipe Montaña Estrada y la cotutoría del Dr. Felipe Massó Rojas. Este trabajo fue realizado con el apoyo económico parcial de PADEP, UNAM.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

B

A Viridiana y Marcos
El principal motor de mi vida

A Hugo
Por su apoyo y esfuerzo

A Edith, Esther, Elias, Francisco y Blanca
Con mucho cariño

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

A los miembros de mi jurado por su cuidadosa revisión y valiosas críticas

**Dr. Vianney Ortiz Navarrete
Dr. Alejandro Zentella Dehesa
Dr. Luis Felipe Montaña Estrada
Dr. Edgar Arturo Zenteno Galindo
Dr. Marco Antonio Juárez Oropeza
Dr. Enrique Pedemera Astegiano
Dra. Verónica Guamer Lans**

Al Dr. René Méndez y a la Dra. Georgina Álvarez, por sus atinados consejos y la revisión del escrito.

A Felipe y Araceli, por su gran apoyo crítico y resolutivo, por su amistad.

A Edith Rodríguez y a Estrella Zapata, por la elaboración de las ilustraciones.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**A Luis
Por todo.**

**A Estre
Por los éxitos, los fracasos, las lágrimas, las sonrisas,
Por que crecer duele menos cuando se está acompañado.**

**A todos mis compañeros y amigos, cuya lista es interminable,
por compartir conmigo alegrías, sinsabores o tan solo un breve espacio de nuestra vida.**

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONTENIDO

	Página
1. Glosario	3
2. Resumen	4
3. Abstract	5
5. Introducción	6
5.1 Origen de la aterosclerosis	6
5.2 Endotelio y aterosclerosis	8
5.3 Adhesión de leucocitos	9
5.4 Moléculas quimioatrayentes	12
5.5 Estrógenos y pared vascular	12
6. Justificación	20
7. Objetivos	21
8. Hipótesis	21
9. Material y métodos	22
9.1 Obtención de células endoteliales	22
9.2 Caracterización de células endoteliales	23
9.3 Subcultivo de células endoteliales	24
9.4 Migración de leucocitos en geles de agarosa	24
9.5 Quimiotaxis de monocitos	25
9.6 Cuantificación de MCP-1 e IL-8	26
9.6 Expresión de MCP-1 e IL-8	27
9.7 Expresión de RE- α y RE- β	28
10. Resultados	30
11. Discusión	46
12. Conclusiones	52
13. Bibliografía	53
14. Anexo (copia del artículo publicado)	61

GLOSARIO

E2 :	17β-estradiol
TNF:	TNF-α; factor de necrosis tumoral alfa
Tmx:	Tamoxifen
HUVECs:	Células endoteliales de vena de cordón umbilical
LPS:	Lipopolisacárido
MCF-7:	Células tumorales derivadas de un cáncer de mama
MCP-1:	Proteína quimioatrayente para macrófagos -1
IL-8:	Interleucina -8
LDL:	Lipoproteína de baja densidad
HDL:	Lipoproteína de alta densidad
SFB:	Suero fetal de bovino
RE-α:	Receptor de estrógenos alfa
RE-β:	Receptor de estrógenos beta
HRT	Terapia de Reemplazo Hormonal

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

RESUMEN

La adhesión de los leucocitos al endotelio y su subsecuente transmigración al espacio subendotelial son los eventos iniciales observados durante la aterogénesis, los cuales son mediados por las células endoteliales activadas. La activación de dichas células puede ser inducida por un aumento en las concentraciones circulantes de moléculas proinflamatorias como TNF- α (TNF) e IL-1 o bien, de colesterol asociado a lipoproteínas de baja densidad (LDL-colesterol). En mujeres postmenopáusicas que se encuentran bajo terapia de reemplazo hormonal se ha observado menor incidencia de enfermedades cardiovasculares, lo cual se ha atribuido a los efectos que los estrógenos pueden tener sobre la activación del endotelio, ya que algunos estudios han mostrado que el 17 β -estradiol (E2) es capaz de disminuir las concentraciones circulantes de LDL-colesterol y la expresión de moléculas de adhesión en la superficie apical de las células endoteliales. Sin embargo, no se sabe exactamente cuál es el papel de los estrógenos durante la aterogénesis. El objetivo de este trabajo fue determinar si el E2 tiene un efecto regulatorio sobre la adhesión y quimioatracción de linfocitos al endotelio. Se realizaron ensayos de adhesión de células U-937 en células endoteliales de vena de cordón umbilical (HUVECs) estimuladas con TNF en presencia o ausencia de E2 y también se cuantificó la concentración de las quimiocinas IL-8 y MCP-1 en los sobrenadantes del cultivo. Se determinó la presencia de los receptores de estrógenos α - y β mediante las técnicas de "Western blot" y "RT-PCR", respectivamente; en tanto que la evaluación de la transcripción de ambas quimiocinas se realizó mediante "RT-PCR". Los resultados mostraron una disminución del 35% en la adhesión de monocitos U-937 a HUVECs estimuladas con TNF en presencia de dosis fisiológicas (0.3 y 1 ng/ml) de E2, así como una disminución del 54% y del 65% en la secreción de IL-8 y de MCP-1. El E2 no tuvo efecto inhibitorio sobre la transcripción de ambas quimiocinas en tanto que, el tamoxifen (modulador de la activación del receptor de estrógenos) revirtió el efecto del E2. Por lo tanto, se puede concluir que en nuestro modelo, el E2 inhibió la adhesión de los leucocitos a las células endoteliales, al inhibir la secreción pero no la transcripción de las moléculas quimioatrayentes.

ABSTRACT

Inflammation, and especially mononuclear cell adhesion to endothelium, is an important physiopathological component of atherosclerosis. Since coronary heart disease in women of reproductive age and/or with estrogen replacement therapy is reduced, our aim was to determine if 17 β -estradiol (E2) had a regulatory effect on the adhesion of lymphocytes to the endothelium. We performed U-937 cells adhesion assays in TNF- α -stimulated HUVECs, and we also quantitated IL-8 and MCP-1 in culture supernatants, in the presence or not of 17 β -estradiol. The presence of α - and β -estrogen receptors was determined by Western blot and RT-PCR, respectively, whereas the transcription of both chemokines was evaluated by RT-PCR. The results showed a 35% decrease in the adhesion of U-937 monocyte cells to TNF- α -stimulated HUVECs, and a 54% and 65% inhibition of TNF- α -induced IL-8 and MCP-1 secretion by physiological and physiologically high doses of E2. The hormone did not affect the transcription of both chemokine genes. Tamoxifen reverted the inhibitory effect induced by E2. In conclusion, E2 modifies the adhesion of leukocytes to endothelial cells by inhibiting the secretion, but not the gene transcription, of proinflammatory chemokines.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

INTRODUCCION

La aterosclerosis es la alteración más frecuente que conduce al desarrollo de enfermedades isquémicas como el infarto al miocardio y enfermedad coronaria, las cuales son la causa mas frecuente de muerte en las sociedades occidentales. Esta alteración se caracteriza por la formación de una placa fibro-grasa topográficamente aislada, en la íntima de las arterias de mediano y grueso calibre, la cual está determinada por múltiples factores, especialmente genéticos, hemodinámicos y metabólicos. En humanos, los sitios de mayor predisposición para la formación de la placa son las ramificaciones aórticas, los arcos aórticos, la aorta descendente, las coronarias, los primeros seis centímetros de las carótidas internas, el polígono de Willis y las arterias de las extremidades inferiores.

Origen de la aterosclerosis

Se ha propuesto que el inicio de la aterosclerosis es resultado de alguna forma de daño directo sobre el endotelio arterial (1). El daño puede conducir rápidamente al desarrollo de una respuesta inflamatoria crónica que se caracteriza por la acumulación de leucocitos en el espacio subendotelial. Los factores que producen la lesión pueden ser mecánicos, como el aumento en la tensión intramural, el estrés por fricción ligera u oscilatoria y el flujo turbulento; o bien, por factores químicos o biológicos, como el aumento en las concentraciones plasmáticas de colesterol, la acumulación de toxinas o la agresión por agentes virales o bacterianos. La persistencia del daño sobre el endotelio conduce a la activación endotelial crónica que favorece la proliferación y activación de las células musculares vasculares y gradualmente conduce a la denudación endotelial. La pérdida del endotelio facilita la ruptura y erosión vasculares, las hemorragias, las ulceraciones y la formación de trombos que finalmente conducen a la isquemia. Sin embargo, se sabe que diferentes agentes pueden estar involucrados en la aparición de la aterosclerosis y se considera que está precedida y acompañada por la inflamación, aunque no se conocen con exactitud los mecanismos por los cuales se origina y progresa (2).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Un primer aspecto visible de la aterosclerosis es la formación de la estría grasa, la cual está constituida por agregados de células espumosas en el espacio subendotelial. Estas células derivan en su mayoría de los leucocitos tanto mononucleares como polimorfonucleares que han sido reclutados y, de células de músculo liso vascular, las cuales gradualmente almacenan colesterol en el citoplasma en vesículas lipídicas (3). Estas vesículas son el producto de la endocitosis de LDL oxidadas que interactúan de manera específica con los receptores "scavenger" tipo I y tipo II expresados en macrófagos y en las células musculares; dichas vesículas están recubiertas por clatrina, participan en el transporte citosólico y se fusionan con lisosomas. Sin embargo, los receptores "scavenger" no están sujetos a una regulación negativa, por lo que es probable que se generen mecanismos que interfieran con la degradación del colesterol, ya que no existe recirculación de receptores y por ende, regulación del metabolismo del colesterol (4, 5). La estría grasa puede aparecer en la primera década de la vida y permanecer por muchos años sin causar problemas de salud, lo cual depende de la predisposición genética y de la exposición a factores de riesgo. El desarrollo de la estría grasa es muy lento hasta los 30 años en promedio, época en la que si existe predisposición, el proceso se acelera rápidamente, especialmente en los varones; entonces se observan incrementos en la acumulación de lípidos, en la migración y proliferación de músculo liso y en el depósito de proteínas de matriz extracelular, lo que transforma a la lesión en una placa de ateroma (6).

La lesión fundamental de la aterosclerosis es el ateroma o placa fibro-grasa. Esta es la lesión que causa el estrechamiento de la luz de la arteria, conduce a calcificaciones de la pared arterial, debilitamiento de la actividad muscular y predispone la formación de trombos. El ateroma se distingue como una estructura redondeada de color blanquecino cuya cubierta fibrosa limita a un tejido conectivo ligeramente denso, constituido por células derivadas en su mayoría de músculo liso, pocos linfocitos T y macrófagos inmersos en una matriz de proteínas como fibrina, colágeno y mucopolisacáridos. En la parte central del ateroma se localiza el centro "necrótico", constituido por desechos celulares, gotas de lípidos, cristales de colesterol, depósitos de calcio y algunas células espumosas. Frecuentemente se observan pequeños vasos sanguíneos proliferando (neovascularización) alrededor de la placa ateromatosa y en dirección a la adventicia vascular, lo que se puede correlacionar con un crecimiento acelerado

del ateroma (7). El origen y el crecimiento de la placa dependen en gran medida del estado funcional del endotelio, por lo que es importante conocer los mecanismos celulares de respuesta de este tejido ante los diversos factores que pueden alterarlo o dañarlo.

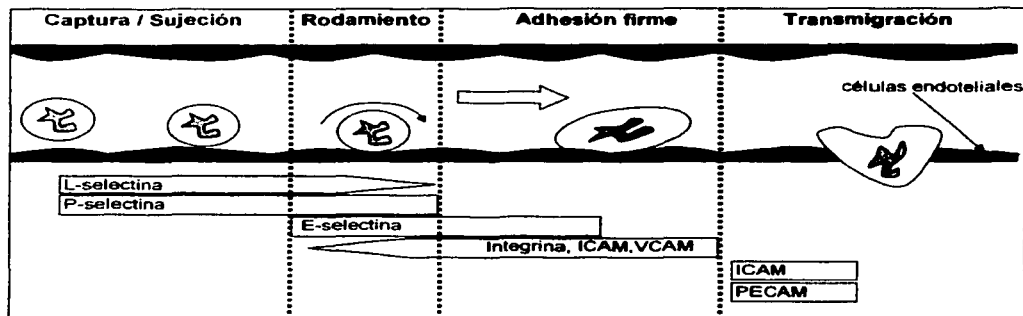


Figura 1.- Pasos secuenciales de la adhesión de los leucocitos a las células endoteliales. La sujeción o adhesión suave está mediada por L-, P-, y E-selectinas ; la adhesión firme se realiza mediante las moléculas de adhesión ICAM -1, ICAM-2 y VCAM . La transmigración se realiza al establecerse un gradiente quimiotáctico y se ve facilitada con la expresión de PECAM (CD31) entre las uniones intercelulares endoteliales.

El endotelio y la aterosclerosis

El endotelio está constituido por una capa de células unidas a una lámina basal y, además de ser una barrera selectiva entre la sangre y los tejidos, es un tejido multifuncional que regula la fisiología vascular y constituye la interfase entre los elementos sanguíneos circulantes y el resto de los tejidos y los órganos del cuerpo. Su situación estratégica le permite hacer un monitoreo sistémico y responder a estímulos locales para realizar cambios funcionales en forma adaptativa y mantener la homeostasia. Sin embargo, en respuesta a la presencia de algún estímulo patofisiológico, como la hipercolesterolemia o la presencia de agentes inmunológicos, se producen modificaciones en la estructura y función endoteliales que conducen a alteraciones localizadas, agudas o crónicas, que afectan la relación del endotelio con los componentes moleculares y/o celulares de la circulación. Las alteraciones observadas

incluyen: aumento en la permeabilidad a lipoproteínas plasmáticas oxidadas, incremento en la adhesión y reclutamiento de leucocitos, producción desbalanceada de factores de crecimiento, pro- y anti-trombóticos, así como de factores reguladores del tono vascular (8). Estas son las manifestaciones de la disfunción endotelial, la cual juega un papel muy importante en la aparición, progreso y complicaciones de la aterosclerosis. Actualmente se sabe que las plaquetas podrían participar en las etapas iniciales de la aterosclerosis ya que la disfunción endotelial o la presencia de algún factor en la circulación pueden activar la secreción de PDGF (factor de crecimiento derivado de plaquetas) que favorece la migración y proliferación de células musculares vasculares en la íntima (7).

Adhesión de Leucocitos

Desde el punto de vista celular, la aterosclerosis se inicia con la adhesión de monocitos y linfocitos circulantes sobre las células endoteliales y su subsecuente migración y reclutamiento en el espacio subendotelial (Figura 1). El proceso de captura de los leucocitos con el endotelio activado consta de tres fases bien definidas. La primera, conocida como “sujeción”, se realiza a través de la interacción del CD15 (antígeno de Lewis sialilado) de los leucocitos con la E- y P-selectinas expresadas en la superficie de las células endoteliales (Figura 2). Las selectinas son moléculas de superficie que se caracterizan por tener una lectina dependiente de Ca^{++} en el dominio amino terminal, un dominio de unión al FCE (factor de crecimiento epidérmico), un dominio transmembranal y un dominio carboxi-terminal citosólico. La E-selectina es expresada constitutivamente por las células endoteliales mientras que la P-selectina, localizada en vesículas cercanas a la membrana plasmática, es rápidamente exocitada cuando la célula endotelial se activa por el primer contacto de los leucocitos con la E-selectina (9). La unión de estas moléculas a su ligando es inicialmente de baja afinidad y conforme avanza el proceso de activación endotelial la afinidad de la unión aumenta considerablemente debido a cambios conformacionales de las integrinas $\alpha_4\text{-}\beta_1$ y $\alpha_1\text{-}\beta_2$ en la superficie de los leucocitos. Los ligandos de estas selectinas son oligosacáridos sialilados o fucosilados, tales como el antígeno sialilado de Lewis-X, el cual es parte de una cadena oligosacáridica más larga, presente de manera abundante en las glicoproteínas y los glicolípidos de los leucocitos y de algunas células endoteliales (Figura 3).

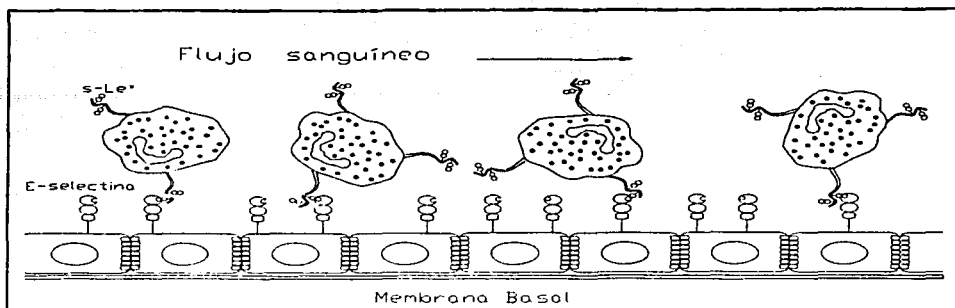


Figura 2.- Interacciones adhesivas leucocito- endotelio. Las selectinas inducidas sobre el endotelio interactúan con sus ligandos de carbohidratos (sialil-Lewis^x) del leucocito permitiendo un anclaje suave. entonces el leucocito rueda sobre el endotelio a consecuencia de la fuerza de roce del flujo sanguíneo.

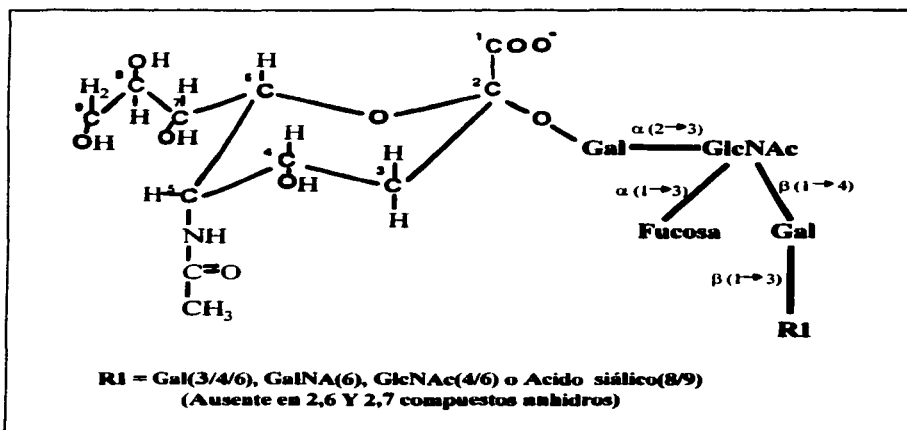


Figura 3.- Estructura del antígeno de sialilado de Lewis-X. Este antígeno está conformado por cuatro azúcares fucosa, N-acetilglucosamina (GlcNAc), galactosa (Gal) y ácido siálico.

En la segunda fase conocida como “disparo”, los leucocitos son activados por moléculas quimioatrayentes que son secretadas por la célula endotelial activada como consecuencia de la “sujeción” (Figura 4). Finalmente, se inicia la tercera fase conocida como “retención”, en la que el leucocito se une firmemente a la superficie de la célula endotelial a través de las adhesinas ICAM-1 (molécula de adhesión celular intercelular –1), ICAM-2, VCAM-1 (molécula de adhesión celular vascular –1) y MAdCAM-1 (molécula de adhesión celular de adreína de la mucosa) que se expresan en la superficie de la célula endotelial, ya sea de manera constitutiva o inducida (8,10). Tanto ICAM como VCAM son adhesinas relacionadas frecuentemente con el proceso aterogénico y se caracterizan por tener un dominio transmembranal, un dominio carboxi terminal citoplasmático y dos o más dominios homólogos extracelulares (5, 2 y 6 dominios para ICAM-1, ICAM-2 y VCAM-1, respectivamente) hacia el extremo amino terminal. Estas moléculas se expresan en la superficie de las células endoteliales activadas y sus ligandos específicos se localizan en los leucocitos. Las adhesinas ICAM-1 e ICAM-2 son reconocidas por la integrinas $\alpha_1\beta_2$ (CD11/CD18), mientras que la VCAM-1, lo es por la integrina $\alpha_4\beta_1$ (11). Aunque ICAM-1 y VCAM-1 se relacionan estrechamente en estructura y función, estudios recientes muestran que VCAM-1 juega un papel dominante en el inicio de la aterosclerosis (12). Se han identificado varios factores capaces de inducir la expresión de moléculas de adhesión sobre el endotelio y, como consecuencia, el reclutamiento de leucocitos. Entre dichos factores se consideran la interleucina-1 (IL-1), el factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α), el interferón-gama (INF- γ) y las lipoproteínas de baja densidad oxidadas (LDLox). Subsecuentemente a la adhesión firme se realiza la trans migración de los leucocitos al espacio subendotelial, que depende de la activación de PECAM (molécula de adhesión celular plaqueta-endotelio) y de la formación de un gradiente quimiotáctico. PECAM es otra adhesina que se encuentra entre las uniones intercelulares, se expresa tanto en células endoteliales como en leucocitos y participa en el proceso de trans migración de los leucocitos al espacio subendotelial (12).

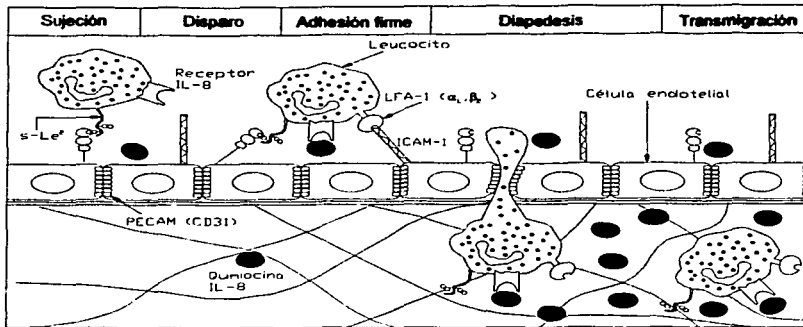


Figura 4.- Fases del proceso de captura y trasmigración de los leucocitos. Un aumento en la secreción de IL-8 establece un gradiente quimiotáctico para los leucocitos que tienen en su superficie receptores CXC que reconocen a la IL-8. Las interacciones más fuertes ocurren como resultado de la inducción de ICAM sobre las células endoteliales y la activación de su receptor LFA-1 y Mac-1 en el leucocito.

Moléculas quimioatrayentes

El reclutamiento de células mononucleares en el subendotelio está regulado por moléculas quimioatrayentes o quimiocinas secretadas por las células endoteliales vasculares activadas (13). Las quimiocinas son proteínas quimioatrayentes de 70 a 130 aminoácidos, que participan en la activación y favorecen la migración unidireccional de poblaciones de leucocitos. Con base en el número de residuos de cisteína, se reconocen por lo menos cuatro familias, pero solo se han caracterizado extensamente: las familias α y β que contienen 4 cisteínas (tabla 1) (14). La familia α (CXC) incluye moléculas como la interleucina-8 (IL-8), el péptido activador de neutrófilos-2 (NAP-2) y el factor plaquetario-4 (PF-4), en las que un aminoácido separa a las dos primeras cisteínas y participan en las reacciones de inflamación aguda a través de la activación y atracción de neutrófilos. En cambio, los miembros de la familia β (CC) intervienen en la inflamación crónica a través de la atracción de linfocitos y monocitos y se caracterizan por tener las dos primeras cisteínas adyacentes. Algunos de sus miembros son RANTES ("regulated on activation, normal T-cell expressed and secreted"), la proteína

inflamatoria de macrófagos-1 (MIP-1) α y β y la proteína quimioatrayente de monocitos-1 (MCP-1). Las quimiocinas se expresan en muchos tipos celulares incluyendo leucocitos y células endoteliales. Sus ligandos son receptores citoplasmáticos (CCR o CXCR) acoplados a proteínas G (15) que se caracterizan por tener siete dominios transmembranales y se expresan principalmente en leucocitos. La unión entre las quimiocinas y sus receptores se incrementa por la presencia de glucosaminoglucanos en la superficie de los leucocitos, induciendo la polimerización de las moléculas quimioatrayentes y aumentando así su concentración local (16).

El mecanismo de reclutamiento de leucocitos hacia el espacio subendotelial posee dos componentes esenciales: la diapédesis y la migración. En la diapédesis los leucocitos cruzan la pared endotelial, en este paso se requieren moléculas tales como LFA-1 (leukocyte functional antigen-1), Mac-1 (Receptor de complemento tipo 3) y PECAM (también conocida como CD31). La interacción de estas moléculas con los leucocitos en el espacio intercelular endotelial facilitan el acceso de los leucocitos a través de las células endoteliales hacia los tejidos subepiteliales, dicho acceso está mediado por la acción de enzimas proteolíticas (i.e. metaloproteasas) secretadas por los leucocitos, sobre las estructuras de la membrana basal (17).

En cuanto a la migración de los leucocitos a través de los tejidos, se sabe que depende en gran medida de la presencia de moléculas quimioatrayentes o quimiocinas (9). Los leucocitos son extremadamente sensibles a variaciones en la concentración de las quimiocinas, ya que concentraciones tan bajas como 10-100 pg/ml son suficientes para activar su migración direccional (18-20). Un modelo propuesto de migración celular implica la formación de un gradiente de concentración de diversas moléculas quimioatrayentes. Este gradiente se genera en el sitio de infección en el que los macrófagos tisulares al activarse secretan de manera inicial TNF, que a su vez activa a los mismos macrófagos y a las células endoteliales para que posteriormente secreten IL-8, la cual se une a proteoglicanos de la matriz extracelular formando dicho gradiente, a lo largo del cual los leucocitos polimorfonucleares pueden migrar al foco de infección.


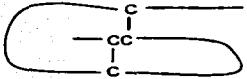
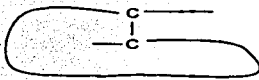
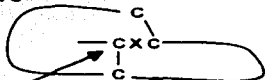
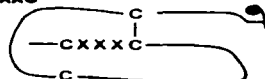
	Quimiocina	Receptor	Tipo Celular que secreta la quimiocina
			
	MCP-3, MCP-4 MIP-1 α RANTES eotaxina-1	CCR1 CCR3	Eosinófilo
CC		CCR-2	Basófilo Monocito Linfocito T Células NK
	MCP-1, 2, 3, 4, 5	CCR-5	Monocitos Linfocitos T
	MIP-1 α MIP-1 β RANTES	CCR-4	Linfocitos T
	TARC	CCR-7 CX ₂ CR1 CXCR3 ? ? CXCR4	Linfocitos T Células T en reposo Células NK
C		?	
	MIP-3 β Fractalcina IP-10, MIG, I-TAC PARC, DC-CK1 Linfotactina SDF-1		
CXC		IL-8, GCP-2	CXCR4
	IL-8, GCP-2	CCR1 CXCR-2	Neutrófilos Linfocitos T
	Ácido glutámico Leucina-arginina		
	IL-8, GCP-2 IL8, GCP-2 GRO- α , β ENA-78, NAP-2		
CXXXC		Fractalcina	CX ₂ CR1
	Fractalcina		Células NK

Tabla 1.- Quimiocinas y sus receptores. Las quimiocinas son proteínas homólogas de 8-10 kd que se subdividen con base en la posición relativa de los residuos de cisteína. Las quimiocinas α tienen los dos primeros residuos de cisteína separados por un aminoácido (CXC), mientras que las quimiocinas β tienen sus dos primeras cisteínas adyacentes (CC). Las quimiocina (C) linfotactina tiene solo dos cisteínas en la proteína madura, y la quimiocina fractalcina (CXXXC) tiene tres aminoácidos separando las dos primeras cisteínas. Los receptores de las quimiocinas son proteínas de membrana que están acopladas a proteínas G que se expresan en la superficie de los linfocitos. En humanos se han identificado cuatro receptores CXC (CXCR1 a R4), ocho receptores CC (CCR1 a R8) y un solo receptor CXXXC (CX₂CR1).

El papel que juega el TNF en la contención de los procesos infecciosos e inflamatorios es vital ya que su función primordial es la de activar a cuantos polimorfonucleares existan en la zona para dos propósitos fundamentales: liberar moléculas quimioatrayentes que permitan la destrucción del patógeno y además, formar una barrera de contención conocida como granuloma. Los efectos inductores del TNF también son reproducidos por los lipopolisacáridos (LPS) ya que se ha establecido que las células endoteliales pueden responder de manera directa a la presencia de la infección gracias a receptores como CD13 y TR4 (21,22). Se sabe que las primeras células atraídas al sitio de inflamación son neutrófilos y que cerca de seis horas después de haberse iniciado la respuesta inflamatoria, se inicia la atracción de monocitos circulantes a través de la acción de MCP-1. La exposición a bajas concentraciones de moléculas quimioatrayentes induce la polarización del leucocito y la subsiguiente formación de pseudópodos. A medida que la concentración de la quimiocina aumenta se favorece el movimiento direccional de la célula hasta que en concentraciones muy altas y uniformes del quimioatrayente, la célula pierde su migración direccional y entonces se mueve al azar. La unión del quimioatrayente con un receptor específico acoplado a proteína G induce la formación de campos eléctricos que conducen a la despolarización rápida de la membrana asociada con un incremento en la concentración de Ca^{++} intracelular y con la activación de la proteína cinasa-C (PKC), la fosfatidil inositol 3-cinasa (PI-3K) y la proteína mitógeno-activada cinasa (MAPK), las cuales se han asociado con la polimerización de filamentos de actina y la remodelación de la membrana plasmática (23,24).

Estrógenos y pared vascular

La deficiencia de estrógenos en las mujeres se asocia con alteraciones en la función del endotelio, tales como aumento en la producción de radicales libres y en la vasoconstricción inducida por angiotensina II (25). También es bien sabido que tanto las células endoteliales como las células vasculares de músculo liso expresan receptores para estrógenos, por lo que algunas de sus funciones son reguladas por acción estrogénica (26,27). Así mismo se ha demostrado una fuerte asociación entre las alteraciones del endotelio con la inflamación. Las respuestas celulares que los estrógenos pueden inducir, implican mecanismos relacionados tanto con la expresión genética (moleculares o genómicos) como bioquímicos (no genómicos); los primeros inducen la activación de genes específicos tales como los de MCP-1 o IL-8,

(HDL) hasta en un 15%, además eleva los niveles de triglicéridos en 20-25% en mujeres posmenopáusicas (33). Diferentes estudios en modelos animales y humanos muestran que una disminución de la relación colesterol-LDL/colesterol-HDL, mejora la disponibilidad y el metabolismo del colesterol, como lo demuestra un trabajo en el que se examinaron 113 corazones de varones con enfermedad coronaria que murieron repentinamente, mostrando una correlación directa entre la ruptura de placas sensibles y una relación LDL/HDL elevada (34). Las LDL son susceptibles de sufrir oxidación y existe una asociación directa entre la formación de células espumosas en el espacio subendotelial y un aumento en la oxidación de LDL (LDLox); sin embargo, se ha observado también que los estrógenos pueden reducir el nivel de oxidación de este tipo de lipoproteínas (35). Además de ser un antioxidante de lípidos circulantes, el E2 reduce la formación intracelular de especies de oxígeno reactivas en las células musculares del sistema vascular (36).

Efecto de los estrógenos sobre la inflamación

Las citocinas IL-1, IL-6, IL-8, MCP-1, las moléculas de adhesión y el factor de necrosis tumoral son algunas de las moléculas sintetizadas por el endotelio durante la inflamación. Los efectos de los estrógenos sobre la síntesis y expresión de dichas moléculas son contradictorios, pues se ha observado que tienen tanto acción inhibitoria, estimuladora o nula, lo cual puede depender del modelo o del método utilizado para la determinación del efecto. En modelos ateroscleróticos (conejo y rata hipercolesterolémicos) se ha observado que el E2 inhibe la expresión de IL-1 y de IL-6, mientras que favorece un incremento en las concentraciones plasmáticas de estas citocinas en mujeres sanas (37). En cuanto al TNF, la mayoría de los reportes indican que los estrógenos tienen un efecto inhibitorio, tanto en su expresión como en sus concentraciones plasmáticas (38,39).

El TNF es producido por linfocitos T y B, mastocitos, células NK, osteoblastos, monocitos y macrófagos y pertenece a una superfamilia de citocinas relacionadas con la respuesta inmune innata y adaptativa. Estas citocinas tienen funciones de activación endotelial, apoptosis de linfocitos activados y células tumorales, inflamación local, activación y proliferación de linfocitos B y linfocitos T, citotoxicidad dependiente de Ca^{++} , estimulación de osteoclastos, y reabsorción de hueso, a través de numerosos y diferentes receptores específicos (9); sus

reabsorción de hueso, a través de numerosos y diferentes receptores específicos (9); sus efectos benéficos sobre la respuesta inmune pueden revertirse dependiendo de la concentración sérica, ya que también un exceso de TNF circulante puede generar choque séptico.

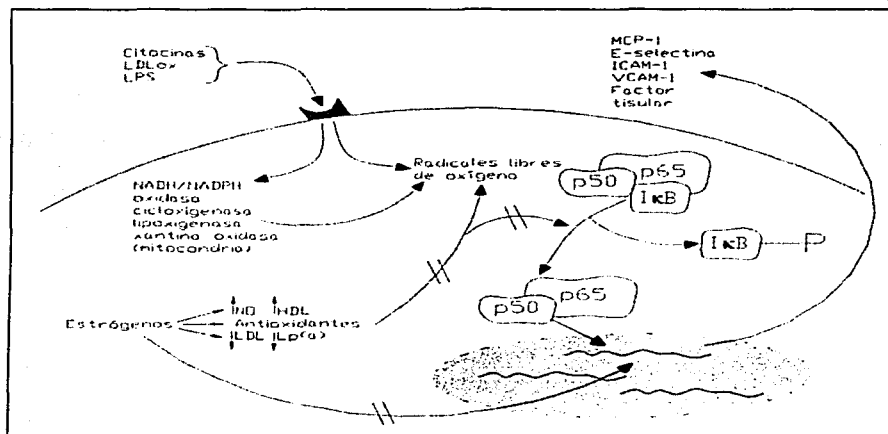


Figura 6.- Estrógenos e inflamación. Las células endoteliales responden a muchos estímulos que inician la transcripción de genes que codifican proteínas mediadoras de inflamación. El estrógeno puede modular este proceso al inhibir la activación de factores de transcripción nuclear como el NFκB.

La transcripción de moléculas de adhesión como ICAM-1 y VCAM-1, así como de moléculas quimioatrayentes como MCP-1 e IL-8, está regulada por el factor de transcripción nuclear NF-κB (40). Este factor inactivo está conformado por tres subunidades proteicas, de las cuales, la subunidad IκB es reguladora. La disociación de IκB permite la activación del factor, el cual se desplaza al núcleo e interactúa con secuencias regulatorias y de este modo, favorece la expresión de genes dependientes de él. La activación de NF-κB puede ser inducida por moléculas proinflamatorias como IL-1, IL-6 y TNF. Aunque no se dispone de mucha

muestra que existe una relación directa entre la unión del E2 con su receptor y una disminución en la actividad de NF- κ B (41) (Figura 6).

En cuanto a los efectos que pueden tener los estrógenos sobre la expresión de moléculas de adhesión, existen hallazgos contradictorios, ya que en un estudio realizado por Caulin-Glaser y colaboradores (42), se observó que en las células endoteliales tratadas con E2 durante 48 h se inhibía la expresión de las moléculas de adhesión, en tanto que Cid y colaboradores (43), al tratar las células endoteliales simultáneamente con E2 y TNF, observaron un incremento en la expresión de moléculas de adhesión que se correlacionó con un aumento en la adherencia de células mononucleares.

Existe muy poca información acerca de cómo los estrógenos pueden regular la síntesis y expresión de quimiocinas. La citocina MCP-1 es una de las quimiocinas más estudiadas y se considera actualmente como un marcador serológico de inflamación, el cual puede ser modulada por E2. En las mujeres sanas bajo terapia de reemplazo hormonal se encontró que el tratamiento combinado de progesterona con estrógenos equino-conjugados (CCE), durante dos meses, disminuyó los niveles sanguíneos de MCP-1 hasta en un 35% (44). En estudios *in vitro* se ha encontrado que los estrógenos pueden modular de diferente manera la secreción y expresión de MCP-1 por tejidos específicos, pues en células MCF-7(45) y en macrófagos (46) se observa una regulación negativa. Sin embargo, en células endometriales humanas tratadas con dosis fisiológicas de E2 se registró un aumento significativo del mensajero de MCP-1 (47). Por otro lado, aunque existen pocos estudios sobre la regulación de los estrógenos en la síntesis y expresión de IL-8, se ha observado, que de manera semejante a lo ocurre con MCP-1, la respuesta depende del tejido utilizado. Se ha observado una modulación negativa del E2 en células de melanoma metastásico humano (48) y en el plasma proveniente de varones con cirugía coronaria tratados con E2 dos días previos a la cirugía (49). Mientras que, en folículos preovulatorios humanos (50) y en células de endometrio ectópico humano (51) no se detectó efecto alguno.

JUSTIFICACION

La mujer en la etapa reproductiva presenta menor incidencia de enfermedades cardiovasculares en relación con hombres de la misma edad (52), la cual puede ser hasta 50% menor (53); lo anterior se ha atribuido principalmente a la acción los estrógenos. Aunque diferentes estudios epidemiológicos muestran que las mujeres postmenopáusicas bajo terapia de reemplazo hormonal (HRT) tienen una mejor prevención contra la aparición y desarrollo de enfermedades cardiovasculares (33,54). En un estudio reciente de prevención secundaria (corazón y reemplazo de estrógeno/progestina, HERS) no se encontró evidencia de que la HRT reduzca el riesgo en mujeres con enfermedad coronaria establecida (55-58), por lo que los mecanismos de acción de los estrógenos durante la HRT aún están en debate. Sin embargo, actualmente se sabe que un factor de riesgo para la aparición y desarrollo de la aterosclerosis es una elevada concentración plasmática de lipoproteínas de baja densidad y que los estrógenos son capaces de disminuirla; además, favorecen la vasodilatación, lo cual está relacionado con un menor riesgo de enfermedad isquémica (32). Por otro lado, existen estudios morfológicos en humanos y en modelos animales que muestran que los estrógenos pueden reducir el desarrollo de ateromas (59,60). Aunado a ello, se sabe que el origen de la aterosclerosis está relacionado con un incremento en la síntesis de moléculas proinflamatorias, de adhesión y quimioatrayentes, que favorecen la adhesión y migración de leucocitos al espacio subendotelial. Sin embargo, existen discrepancias sobre cual es mecanismo exacto por el que los estrógenos pueden modular la síntesis y la expresión de dichas moléculas. Por lo tanto, resulta de interés estudiar el papel de los estrógenos sobre la secreción y expresión de quimiocinas, como IL-8 y MCP-1, involucradas en los procesos de infiltración y activación endotelial.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

OBJETIVO GENERAL

Determinar el papel del 17β -estradiol en la regulación de moléculas quimioatrayentes MCP-1 e IL-8 por parte de las células endoteliales.

Objetivos Particulares

- I. Establecer cultivos primarios de células endoteliales a partir de cordón umbilical humano (HUVECs), dada su accesibilidad.
- II. Determinar si la migración de leucocitos en geles de agarosa, en respuesta a medios condicionados (sobrenadantes) de HUVECs estimuladas con Lipopolisacárido (LPS) es moduladas por 17β -estradiol.
- III. Evaluar la migración de monocitos (U937) mediante quimiotaxis, es respuesta a sobrenadantes de HUVECs estimuladas con $TNF-\alpha$ es reguladas por 17β -estradiol.
- IV. Determinar si la secreción y la expresión de IL-8 y MCP-1 por HUVECs estimuladas con $TNF-\alpha$ son moduladas por 17β -estradiol.
- V. Determinar la presencia de los receptores de estrógenos alfa ($RE-\alpha$) y beta ($RE-\beta$) en las HUVECs y su posible relación con la expresión de IL-8 y de MCP-1.

HIPÓTESIS

Si el 17β -estradiol reduce la formación de la placa aterosclerótica en los procesos iniciales, como son la adhesión y la migración de leucocitos al espacio subendotelial, entonces el 17β -estradiol inhibirá la secreción y expresión de moléculas quimioatrayentes por las células endoteliales.

MATERIAL Y METODOS

Obtención de células endoteliales

Las células endoteliales juegan un papel muy importante en la fisiología y patofisiología vasculares. Una fuente muy accesible de este tipo de células son las venas de los cordones umbilicales (HUVECs), cuya función es temporal y termina con el nacimiento. Entre las ventajas de utilizar HUVECs están: a) no muestran diferencias funcionales con las células endoteliales de adultos; b) son de los pocos tejidos humanos accesibles, cuya función termina con el nacimiento; c) no presentan procesos de aterosclerosis, lo cual permite contar con un modelo cercano a un estado fisiológico normal que puede ser manipulado para observar los efectos de una sola sustancia y d) pueden ser subcultivadas para obtener una cantidad relativamente alta de células, provenientes de un solo individuo.

Las células endoteliales se obtuvieron de venas de cordones umbilicales humanos de sujetos sanos mediante el método de Gimbrone, y colaboradores (61). Los cordones se colectaron en medio M199 (Gibco BRL) preparado para el transporte [10% CPSR-3 (Sigma), 5 U/ml de heparina, 1% de solución de antibiótico (Sigma), 10 mM HEPES (Gibco BRL) y 2mM glutamina (Sigma)] y se mantuvieron a 4° C hasta que fueron procesados. En la campana de flujo laminar, los cordones se limpiaron con etanol al 75% y gasas estériles y se canalizaron ambos extremos de la vena de cada cordón. La vena se lavó con 10 ml de solución salina de HEPES (HSS) [HEPES 1 M, 0.15 M de NaCl (Sigma), 4 mM de KCl (Sigma), 2.2 g/L de glucosa (INC biochemicals, pH 7.5)] para eliminar residuos de sangre. Para la disgregación de las células endoteliales, la vena se incubó con 10 ml de HSS-0.2 % colagenasa tipo II (Gibco BRL), durante 15 min a 37° C. Las células disgregadas se recuperaron en tubos de centrifuga con 10 ml de medio de transporte y se centrifugaron a 900 rpm durante 5 min. El botón celular se resuspendió con 3 ml de medio M199 suplementado [20 % SFB (Fetal Clon), 5 U/ml heparina, 1% solución de antibióticos, 10 mM HEPES, 2 mM glutamina y 40 µg/ml de factor de crecimiento de células endoteliales (Sigma)]. Las células endoteliales de cada cordón se sembraron en botellas de cultivo de 25 cm² y se mantuvieron a 37° C, con humedad relativa del 95 % y una atmósfera de 7 % bióxido de carbono-93 % aire, hasta alcanzar la confluencia

y entonces fueron subcultivadas para obtener un número de células endoteliales suficiente para los ensayos.

Caracterización de las células endoteliales

Las células endoteliales fueron caracterizadas por su morfología típica, la cual asemeja un conjunto de adoquines cuando están en confluencia; y por su capacidad específica de producir el factor Von Willebrand, que actúa como acarreador del factor VIII de coagulación, el cual se detectó mediante inmunocitoquímica. Se sembraron 5×10^4 células en un cubreobjetos en presencia de medio de cultivo M199, durante 24 h. Una vez adheridas al cubreobjetos, las células se fijaron con paraformaldehído (Sigma) al 4 % en solución amortiguadora de fosfatos (PBS) (Na_2HPO_4 , 0.015 M; $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.015 M; NaCl, 0.15 M; pH 7.4), durante 10 min y enseguida se lavaron con 5 ml de PBS. Posteriormente se bloquearon estas preparaciones incubando con solución de albúmina sérica bovina (BSA) (Sigma-) al 0.1 % en PBS, durante 15 min a temperatura ambiente. El primer anticuerpo utilizado fue el anti- von Willebrand humano desarrollado en conejo, fracción IgG (Sigma) en dilución 1:100 en PBS-0.1 % BSA, con el que se incubaron las preparaciones durante 45 min a temperatura ambiente. Posterior al lavado con PBS, se utilizó un anticuerpo secundario anti-conejo acoplado con rodamina (Sigma) en dilución 1:200 en PBS-0.1 % BSA, para revelar la presencia del anticuerpo primario. Las preparaciones se incubaron durante 45 min a temperatura ambiente, se lavaron y posteriormente fueron observadas en el microscopio de fluorescencia con filtro para rodamina (excitación: 552 nm, emisión: 570 nm); se realizaron 4 conteos de 100 células cada uno.

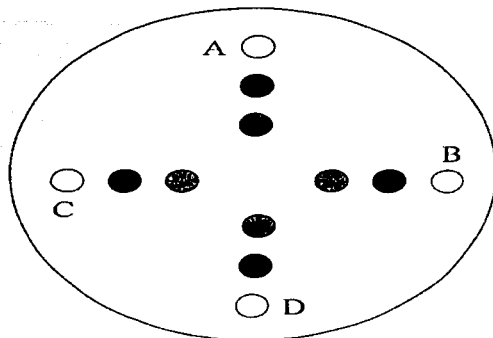
Subcultivo de células endoteliales

Para su propagación, las células en confluencia fueron despegadas con solución 1% tripsina-33 % EDTA(Sigma)-HSS, incubándolas durante 2-3 min a 37° C. Se recuperó la suspensión celular en un tubo de centrifuga y se adicionaron 10 ml del medio M199-10 % CPSR-3, para detener la reacción enzimática. Se centrifugaron a 800 rpm durante 5 min. y el botón celular se resembró en medio de cultivo en 1-2 botellas de 75 cm². Para los ensayos se utilizaron las células endoteliales subcultivadas del segundo al quinto pase. En todos los experimentos de estimulación con E2 se utilizó el medio M119 sin rojo de fenol (Gibco BRL) adicionado con

20 % de sustituto de suero CPSR-1 (deslipidizado, Sigma), 5 U/ml de heparina, 1 % de solución de antibiótico, 10 mM Hepes, y 2 mM glutamina.

Migración de leucocitos en geles de agarosa

Se sembraron 2.5×10^5 células por pozo en cajas de 24 pozos, después de 24 h se lavaron con solución HSS y se estimularon con E2 (0, 0.03, 0.3, 3 ng/ml) y/o LPS (10 ng/ml), durante 1, 2, 3, 5 y 8 h y se colectaron los sobrenadantes, que se utilizaron en los ensayos de migración. Los leucocitos humanos se obtuvieron de sangre periférica de donadores sanos. Se tomaron 10 ml de sangre con una jeringa heparinizada y se diluyeron con 10 ml de medio RPMI 1640, enseguida se colocó esta dilución en un tubo de centrifuga sobre 10 ml de Histopaque-1077 (Sigma) con lo que se forma un gradiente; posteriormente se centrifugó a 1500 rpm durante 30 min. En este gradiente los eritrocitos se localizan en el fondo del tubo y los leucocitos en la interfase histopaque-medio. Los leucocitos se recuperaron por aspiración, se lavaron dos veces con medio RPMI 1640 y se resuspendieron en 10% SFB-RPMI 1640 para ser utilizados inmediatamente. Los geles se prepararon de acuerdo con el método de Al-Sumidaie y colaboradores (62): se colocaron 4 ml de PBS-agarosa al 0.8 % en cajas petri de 60 mm de diámetro, una vez que gelificó se agregaron 4 ml más de PBS-agarosa al 0.1 %. Se realizaron perforaciones en series de tres (ver esquema) con un horador de 2.5 mm de diámetro. En el pozo central se colocaron 2×10^5 leucocitos en 200 μ l de medio 10% SFB-RPMI-1640, los pozos laterales contenían el medio de cultivo utilizado para células endoteliales como control y uno de los sobrenadantes de células endoteliales estimuladas. La distancia de migración se observó mediante microscopía óptica y para la medición se utilizó una lente con reglilla óptica de 10 μ m, y se expresó como porcentaje, considerando como 100 % la distancia de migración no específica (alrededor del pozo).



Esquema que muestra una distribución de los pozos en los gels de agarosa para la migración de leucocitos. El diámetro de cada pozo fue de 2.5 mm. En el pozo central (negro) se colocaron los linfocitos en medio RPMI 1640-10 % SFB; en el pozo lateral interno (punteado) se colocó el medio M199-20 % SFB como control negativo; en el pozo externo (blanco) se colocó el sobrenadante de células endoteliales (CE) incubadas a diferentes tiempos con LPS (10 ng/ml) y/o diferentes concentraciones de E2. Sobrenadantes: A.- CE sin estimular; B.- CE con LPS; C.- CE con E2; D.- CE con LPS y E2.

Quimiotaxis de monocitos

El estudio de la migración de las células U-937 se realizó en cámaras de quimiotaxis de 24 pozos, utilizando membranas con poros de 0.5 μm . Las células U-937, una línea de monocitos humanos, que se reproduce y mantiene con facilidad, se marcaron con BCECF-AM (Molecular Probes, Inc.), de acuerdo a las indicaciones del proveedor. Se incubaron 1×10^6 células U-937 con solución de BCECF-AM-DMSO anhidro (1 mM), en proporción 1:500 con HSS, durante 1 h a 4° C y se utilizaron inmediatamente. Por otra parte, las HUVECs aisladas de 4 diferentes cordones se incubaron durante 24 h en presencia o ausencia de E2 (3 ng/ml), con la finalidad de mantener las células endoteliales expuestas al E2 previamente a la estimulación con TNF, simulando un ambiente hormonal que podría presentarse en las células endoteliales de mujeres premenopáusicas o bajo HRT previo a un evento inflamatorio agudo. Posteriormente, tanto las HUVECs pretratadas (expuestas previamente al E2) como las no

pretratadas, se lavaron con HSS y se estimularon por 2 h con TNF (0 y 25 UI/ml) y con E2 (0, 0.3 y 1 ng/ml). Al término de las incubaciones se colectaron los sobrenadantes y se colocaron 250 μ l de cada uno de ellos en la parte inferior de los pozos de quimiotaxis, mientras que, en la parte superior se colocaron 5×10^5 monocitos marcados U-937-BCECF resuspendidos en 250 μ l de RPMI 1641-10% SFB. Las membranas de los pozos se removieron después de 90 min de incubación a 37° C, las células que migraron se cosecharon con pipeta y se lavaron con medio RPMI-1640 libre de suero, y se adicionaron 1.5 ml de amortiguador de lisis (10% Tritón X-100 in 10 mM Tris, pH 9.0) y se incubaron a temperatura ambiente por 20 min. Posteriormente se recuperó la suspensión de lisis y se leyó a 490 nm en un espectrofotómetro de luminiscencia LS 50B (Perkin-Elmer). Las células U-937 no marcadas se utilizaron como un control negativo. Todos los experimentos se realizaron por duplicado. La fluorescencia absoluta se determinó con 5×10^5 células U-937 marcadas.

Cuantificación de MCP-1 e IL-8

La evaluación de la secreción de moléculas quimioatrayentes (MCP-1 e IL-8) se realizó mediante ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay). La estimulación de las HUVECs se realizó con diferentes concentraciones de LPS (0, 10 y 100 ng/ml) y de TNF (0, 25 y 100 UI/ml). Se sembraron 1.5×10^5 células por pozo en cajas de multipozos (24 pozos) durante 24 h, posteriormente las células se lavaron con HSS y se estimularon con LPS o TNF y diferentes concentraciones de E2 (0, 0.3, 3 y 10 ng/ml) durante dos horas a 37° C. En algunos experimentos, las células fueron estimuladas 24 h antes del ensayo con una dosis fisiológica alta (3 ng/ml) de E2 como anteriormente se mencionó. Se obtuvieron los sobrenadantes, se centrifugaron 3000 rpm por 5 min en una microfuga Eppendorf para eliminar las células flotantes y se almacenaron a -20° C hasta la cuantificación de las quimiocinas mediante ensayos de ELISA. Para la cuantificación de MCP-1 e IL-8 se utilizaron estuches comerciales (R & D Systems), siguiendo las instrucciones del fabricante. Al final de proceso las placas se leyeron a 450 nm con corrección a 570 nm en un lector de ELISA EL-311 (Bio-Tek Instruments). Los resultados fueron expresados en ng/ml y analizados utilizando el programa KC-4 (software) de Bio-Tek. En los experimentos posteriores se usaron las concentraciones de TNF y E2 con las cuales se observó mayor efecto. Las HUVECs pretratadas y no pretratadas

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

durante 24 h con 3 ng/ml de E2 fueron estimuladas con 25 UI/ml de TNF y dos diferentes concentraciones de E2 (0.3, 1 ng/ml) por 2 h a 37 ° C en una atmósfera humidificada y 7 % de CO₂. humidified atmosphere. Los sobrenadantes se colectaron y almacenaron en las condiciones antes mencionadas para la posterior cuantificación de las quimiocinas.

Expresión de MCP-1 e IL-8

La expresión de MCP-1 e IL-8 se realizó mediante la técnica de RT-PCR. Las células endoteliales de cada cordón se sembraron de cajas de petri de 100 mm de diámetro (2 X 10⁶ células/caja) en un volumen total de 6 ml de medio M199-20% CPSR-1 y se estimularon de manera semejante que en los experimentos de secreción y además, en algunos ensayos se utilizó tamoxifen (1 x 10⁻⁹ M) solo o en combinación con el E2, para determinar si era capaz de revertir el efecto del E2 sobre la expresión de IL-8. Para la extracción del RNA total, al término de la incubación, las células endoteliales se lavaron con 5 ml de HSS y se incubaron con 500 µl de reactivo TRIzol (Gibco BRL) por 5 min a temperatura ambiente para la extracción de RNA. El lisado celular fue raspado y colectado en tubos Eppendorf de 1.5 ml y se mantuvo a 4° C para continuar el procedimiento de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El RNA total se resuspendió en 22 µl de agua ultra-pura y tratada con 0.02 % (peso/ volumen) de dietil pirocarbonato (DEPC) y se cuantificó determinando la absorbancia a OD₂₆₀, la pureza se determinó mediante el cálculo del índice de absorbancia OD₂₆₀/OD₂₈₀, que para todas las muestras tuvo un valor superior a 1.9. La calidad del RNA extraído fue probada mediante la detección de las bandas de RNA ribosomal en geles de agarosa al 2 %.

La transcripción reversa y la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizaron mediante un procedimiento de un solo paso, utilizando el sistema "Access RT-PCR" (Promega) y un termociclador (modelo "Touchdown, Hybaid Thermal Cycler" de Perkin-Elmer). La mezcla de reacción contenía: 1 µg de la mezcla de RNA; 5 U de la transcriptasa reversa AMV; 5 U de polimerasa TflDNA; 10 µl de amotiguador de reacción 5x AMV/ Tfl; MgSO₄ 25 mM; 10 mM de cada uno de los cuatro desoxiribonucleótidos y agua-DEPC hasta completar el volumen final de 50 µl; La mezcla de reacción se incubó a 48° C por 45 min, seguida por un ciclo de desnaturalización a 94° C por 2 min. Posteriormente, se realizaron 40

ciclos a 94° C por 30 s, 60° C por 1 min, 68° C por 2 min, y finalmente 68° C por 7 min. Se utilizaron 10 µl de cada reacción y se analizaron los productos de PCR mediante electroforesis con geles de agarosa al 2 % en solución estándar de tris-boratos y EDTA (TBE) conteniendo bromuro de etidio; los geles fueron observados en un transiluminador y fotografiados. El análisis semicuantitativo de los productos de RT-PCR se realizó al determinar la densitometría de las bandas utilizando un densitómetro G5-670 de Bio-Rad y el programa "molecular analyst" versión 1.1. Los oligonucleótidos utilizados como cebadores, para la detección de moléculas específicas a partir de cDNA fueron:

IL-8.- 5'-ATTTCTGCAGCTCTGTGTGAAGGTGC-3' (sentido)

5'-TTGTGGATCCTGGCTAGCAGA-3' (contrasentido) (63)

MCP.- 5'-CAAAGTGAAGCTCGCACTCTCGCC-3' (sentido)

5'-ATTCTTGGGTTGTGGAGTGAGTGTTC-3' (contrasentido) (64)

β-actina.- 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCCA-3' (sentido)

5'-CTCCTTAATGTCACGCACGATTT-3' (contrasentido) (64).

El gene que se expresa constitutivamente y que fue utilizado como control de reacción fue β-actina. El tamaño de los productos de PCR esperados fue: 749 bp para IL-8; 354 bp para MCP-1 y 548 bp para β-actina.

Expresión de RE-α y RE-β

La expresión de los receptores de estrógenos alfa y beta (RE-α y RE-β) en las HUVECs se determinó mediante RT-PCR, siguiendo las condiciones previamente descritas. Los primers específicos fueron 5'-AGGCTGCGCTTCGGC-3' (sentido) y 5'-ACGCATACTTCCCTTGTCAT-3' (contrasentido), para el RE-α; y 5'-TTCCAGCAATGTCACCTAACT-3' (sentido) y 5'-CTCTTTGAACCTGGACCAGTA-3' - (contrasentido) para el RE-β. El tamaño esperado de los productos de la amplificación fue de 410 bp y de 258 bp, respectivamente (65). Además, se obtuvo RNA de endometrio humano (HUE), perteneciente a una mujer que fue sometida a histerectomía por presentar miomatosis. Los productos de RT-PCR obtenidos a partir de dicho RNA fueron utilizados como controles positivos.

Detección del RE- α .- La presencia del ER- α se determinó en células MCF-7 (línea celular de cáncer de mama que expresa los receptores ER- α y RE- β) y en 1×10^6 HUVECs estimuladas durante 8 h con E2 (3 ng/ml), mediante el ensayo de inmunodetección tipo “Western Blot”, para lo cual se obtuvo la proteína total al lisar las células con un amortiguador de lisis compuesto por: 50 mM de Tris, 120 mM de NaCl, 0.5 % de NP-40, 100 μ M de NaF, 200 mM de NaV, 3 μ l/ml de aprotinina, 10 μ g/ml de leupeptina, y 0.58 mM de fluoruro de fenil metanosulfonil. Se realizó la resolución de las proteínas mediante electroforesis (SDS-PAGE) al colocar 100 μ g de cada extracto por pozo, en geles al 7.5% de poliacrilamida. Las proteínas resueltas fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa y posteriormente, fueron bloqueadas con una suspensión al 5% de leche en polvo libre de grasa en 20 mM de Tris, 137 mM de NaCl, 3 mM de KCl y 0.1% de Tween; pH 7.6. Después de 4 h de incubación con el anticuerpo anti-ER- α (HC20, Santa Cruz Biotechnology) en dilución 1:500, las membranas se lavaron tres veces con NaCl/Tris/Tween por 5 min, luego se incubaron con un anti-IgG biotinilado de conejo, desarrollado en cabra en dilución 1:2000 por 30 min, enseguida, las membranas se lavaron nuevamente en las condiciones antes descritas y finalmente, se incubaron durante 30 min con el complejo estreptavidina-peroxidasa y se lavaron tres veces más con NaCl/Tris/Tween. La peroxidasa unida a la membrana se reveló mediante un sustrato quimioluminiscente (“Supersignal West Pico Chemiluminiscent Substrate”).

Análisis estadístico.- Los resultados fueron calculados como la media \pm la desviación estándar. La significancia de los cambios experimentales fue validada a través de la prueba estadística t de Student. Los ensayos de migración fueron analizados mediante las pruebas de ANOVA y de Tukey-HSD, utilizando el programa “Statistica version 5”.

RESULTADOS

Caracterización de las células endoteliales

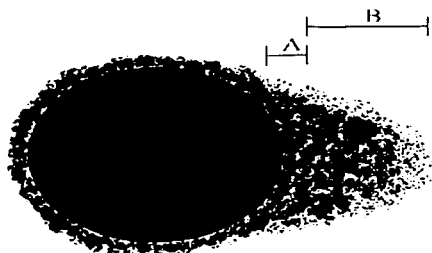
El número promedio de células endoteliales obtenidas por cordón umbilical de 12-15 cm de longitud correspondió a aproximadamente 4×10^5 células. Para determinar la pureza de estas células, se marcaron con anticuerpo anti-factor von Willebrand, que se expresa de manera exclusiva en las células endoteliales, y los resultados mostraron que el 80 % de las células obtenidas fueron positivas. En evaluaciones posteriores efectuadas por otro grupo de nuestro laboratorio, utilizando el marcador CD105 que es característico de las células endoteliales, se ha observado que existen subpoblaciones endoteliales que son antígeno de von Willebrand negativo y CD105 (endoglina) positivo (66), de tal manera que aproximadamente el 99% de las células en nuestros cultivos son CD105 positivas.

Migración de leucocitos

Los leucocitos sembrados en los pozos de agarosa migraron de forma inespecífica, haciendo una circunferencia alrededor del pozo. Sin embargo, los leucocitos sembrados en agarosa con medios condicionados o sobrenadantes de células endoteliales (HUVECs) colocados en un pozo adyacente, formaron un "pico" de migración específica, el cual se observa en la figura 7. La distancia de migración inespecífica se considero como el 100% y fue el valor de referencia que se utilizó para calcular el porcentaje de migración específica. En la gráfica de la figura 8 se muestra el porcentaje de migración de los leucocitos humanos en respuesta a los medios condicionados de células endoteliales obtenidas de 6 diferentes cordones umbilicales. Las células se estimularon con LPS (10 µg/ml) y diferentes concentraciones de E2 (0, 0.03, 0.3 y 3 ng/ml) durante diferentes periodos de tiempo (1, 2, 3, 5 y 8 h). El medio condicionado de células endoteliales sin ningún tratamiento indujo una migración muy semejante a la observada con el medio sin células. Al comparar la migración basal (sobrenadante de HUVECs sin ningún estímulo) con la migración producida en condiciones de estimulación con LPS se observó un incremento hasta del 120 % a las 8 h de cultivo; sin embargo, no hubo diferencia significativa entre los diferentes tiempos de cultivo. En la gráfica también se muestra una tendencia en la disminución de la migración de los leucocitos a medida que

aumenta la concentración de E2. Tampoco hubo diferencias significativas entre los medios condicionados de HUVECs cultivadas con distintas concentraciones de E2.

1)



2)

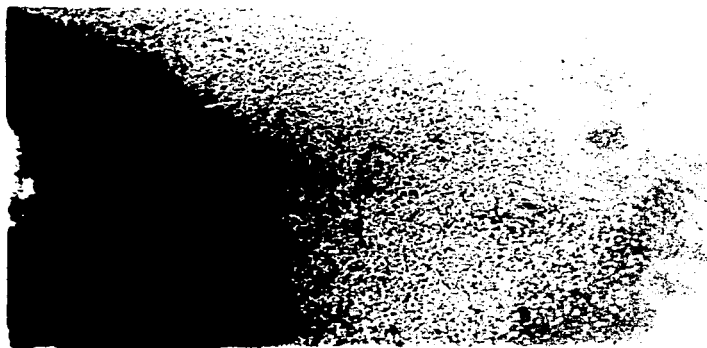


Figura 7. Migración de leucocitos humanos en geles de agarosa en dirección al pozo que contiene sobrenadante de HUVECs. 1) Esquema del pozo central conteniendo los leucocitos, donde se representa el "pico" de migración. A) representa la distancia de migración no dirigida (alrededor del pozo) y B) es la distancia de migración dirigida hacia el pozo que contiene el sobrandante de HUVECs. 2) Fotografía (40X) de una porción del pozo que contiene los leucocitos, mostrando el "pico de migración".

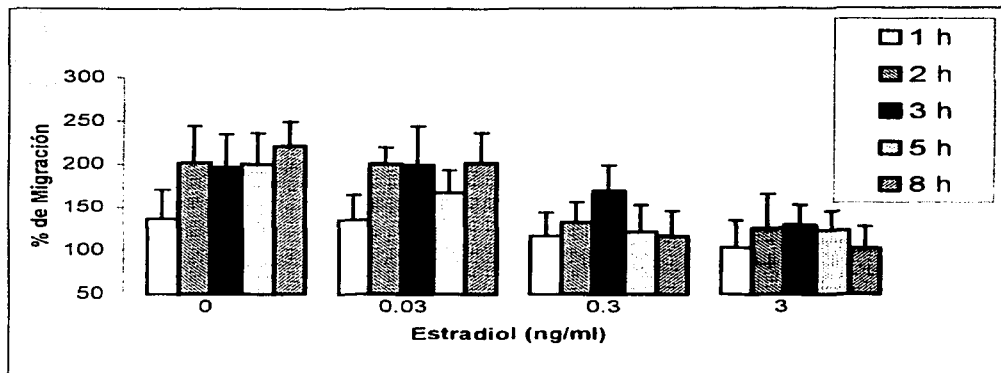


Figura 8. Migración de leucocitos humanos en geles de agarosa en respuesta a los sobrenadantes de HUVECs estimuladas con LPS (10 ng/ml) y con diferentes concentraciones de 17β-estradiol en diferentes tiempos.

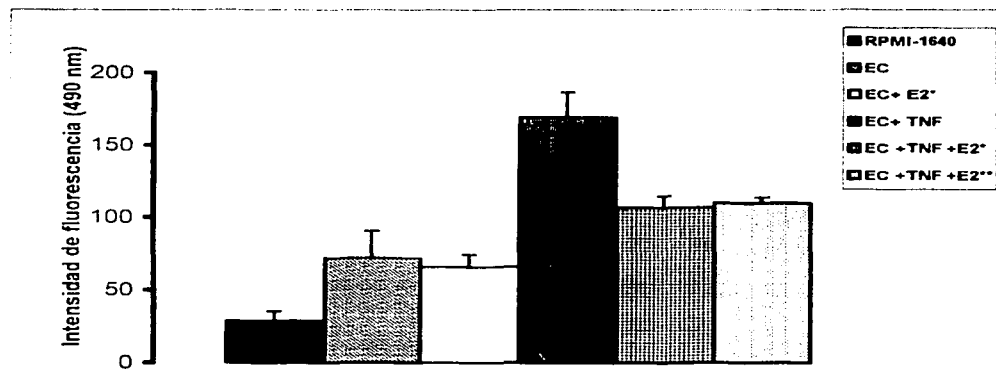


Figura 9. Migración de las células U-937 en respuesta a los sobrenadantes de HUVECs (EC). Los resultados representan la media \pm desviación estándar de los experimentos realizados por duplicado con las células endoteliales de 4 diferentes cordones umbilicales, en presencia o ausencia de TNF (0.25 ng/ml) y/o E2 (17β-estradiol). La comparación entre los grupos se realizó utilizando la prueba de Tukey-HSD post-ANOVA múltiple ($p < 0.0002$). E2* = 0.3 ng/ml, E2** = 1 ng/ml.

Quimiotaxis de monocitos

La evaluación de la migración de células U-937 resultó ser mas adecuada al usar cámaras de quimiotaxis con membranas que permiten la transmigración celular. No se ha encontrado ningún reporte de que el TNF pueda inducir la migración por si mismo, sino a través de estimular la síntesis de moléculas de adhesión y quimiocinas en las células endoteliales (67). En la figura 9 se observa la intensidad de fluorescencia de las células U-937 marcadas con BCECF, en respuesta a los medios condicionados de células endoteliales estimuladas con TNF (25 UI/ml) y dos concentraciones de E2 (0.3 y 1 ng/ml). Los medios condicionados de HUVECs sin estimular atrajeron más monocitos que el medio de cultivo solo, sin embargo, el E2 por si mismo no inhibió la quimiotaxis de forma significativa. Los sobrenadantes de las HUVECs tratadas con TNF mostraron un incremento 2.3 veces mayor sobre la migración de monocitos con respecto a lo observado con las células no estimuladas. Cuando las células endoteliales fueron tratadas al mismo tiempo con TNF y E2 se observó una disminución de hasta del 37 % con respecto al estímulo producido por los sobrenadantes de HUVECs tratadas sólo con TNF. No hubo diferencia significativa en la migración celular entre las distintas concentraciones de E2 utilizadas.

Secreción de IL-8 y MCP-1

HUVECs estimuladas con LPS. Las células endoteliales de 4 cordones umbilicales se incubaron individualmente con diferentes concentraciones de LPS (0, 10, 100 ng/ml) y de E2 (0, 0.3, 3 y 10 ng/ml). En la figura 10 se muestra la concentración de MCP-1 e IL-8 en ng/ml y se observa que no hubo efecto estimulatorio significativo debido a LPS, para ninguna de las citocinas. Tampoco se observó que el E2 pudiera tener un efecto en la producción de ninguna de las citocinas.

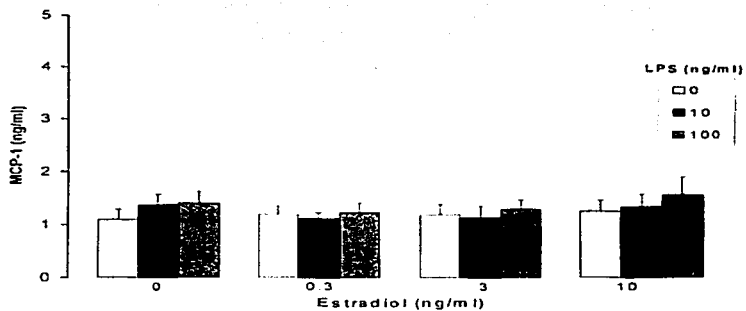
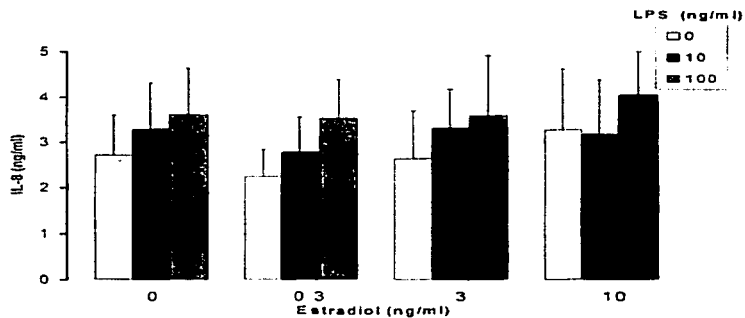
A**B**

Figura 10. Cuantificación por ELISA de MCP-1 (A) y de IL-8 (B) en el sobrenadante de HUVECs estimuladas durante 2 h con LPS y 17 β -estradiol.

HUVECs estimuladas con TNF. Las células endoteliales de 10 cordones se incubaron individualmente con las diferentes concentraciones de TNF y E2. En la tabla 2 se muestran los resultados de la concentración de IL-8 y MCP-1 en ng/ml. En el análisis de estos datos no se observaron diferencias significativas, por lo que se graficaron los porcentajes de cambio con respecto al control, lo que permitió observar mejor las tendencias. En la figura 11 se presentan los porcentajes de cambio con respecto al basal (sin TNF ni E2) de las concentraciones de IL-8 en los sobrenadantes de HUVECs. La producción de IL-8, en comparación con los controles no estimulados, aumentó de manera importante con TNF (83.9 % con 25 U/ml y 73.6 % con 100 U/ml) cuando las HUVECs no fueron pretratadas con E2; en tanto que, el aumento fue menos notorio cuando las HUVECs estimuladas con TNF estuvieron previamente expuestas al E2 (41.6 % con 25UI/ml; 25.6 % con 100 UI/ml). Cuando las HUVECs fueron incubadas con E2 se observó una tendencia muy marcada de disminución en la concentración de IL-8 conforme aumentó la concentración de E2, inclusive cuando las células no fueron estimuladas con TNF. El mayor efecto se observó con 0.3 ng/ml de E2, tanto en células no pretratadas (-15.3%) como en pretratadas (-7.2%).

En la figura 12 se muestran los porcentajes de cambio con respecto al basal de las concentraciones de MCP-1. La mayor estimulación se observó con 25 UI/ml de TNF (25.6%), sin embargo, se presentó una mayor disminución debida al E2 (-35.9%, con 0.3 ng/ml y -43.6% con 3 ng/ml), en comparación con lo observado para IL-8. No se encontraron diferencias significativas intraensayo para ambas quimiocinas, excepto en la secreción de IL-8 de HUVECs estimuladas con TNF y no pretratadas con E2. A pasar de ello, se pueden observar una tendencia a la inhibición de la secreción de IL-8 y MCP-1 por el E2. De acuerdo con los gráficos, se pueden hacer las siguientes observaciones: las HUVECs fueron capaces de secretar mayor cantidad de IL-8 que MCP-1; el efecto inhibitorio desaparece con 10 ng/ml de E2 (concentración suprafisiológica); en condiciones de pretratamiento el efecto estimulador del TNF se reduce en casi el 50% para ambas quimiocinas. Algunos cordones respondieron menos al efecto estimulador que otros e incluso no mostraron diferencia en la respuesta a ambas concentraciones de TNF- α .

A

E2 (ng/ml)	IL-8			MCP-1		
	TNF (ng/ml)			TNF (ng/ml)		
	0	25	100	0	25	100
0	2.06 ± 1.0	4.52 ± 1.8	4.49 ± 4.6	2.48 ± 1.2	2.75 ± 1.3	2.54 ± 0.5
0.3	2.34 ± 1.1	4.10 ± 2.0	3.76 ± 1.8	2.18 ± 0.4	2.31 ± 0.3	2.11 ± 0.4
3	2.38 ± 1.3	3.83 ± 2.1	4.01 ± 2.4	2.34 ± 1.7	2.20 ± 1.4	2.06 ± 0.8
10	2.98 ± 1.9	3.91 ± 1.3	4.84 ± 2.6	1.94 ± 0.8	1.90 ± 1.2	1.88 ± 0.8

B

E2 (ng/ml)	IL-8			MCP-1		
	TNF (ng/ml)			TNF (ng/ml)		
	0	25	100	0	25	100
0	2.71 ± 1.2	3.82 ± 1.4	3.41 ± 2.7	1.53 ± 0.6	2.13 ± 0.6	1.89 ± 0.4
0.3	2.52 ± 1.5	3.38 ± 0.6	3.09 ± 0.7	1.16 ± 0.4	1.99 ± 0.7	1.83 ± 0.5
3	3.17 ± 0.9	3.32 ± 0.4	2.94 ± 0.7	1.29 ± 0.7	1.69 ± 0.6	1.47 ± 0.5
10	2.54 ± 0.6	3.22 ± 0.5	2.74 ± 0.6	1.28 ± 0.8	1.80 ± 1.2	1.56 ± 0.4

TABLA 2. Secreción de MCP-1 e IL-8 por HUVECs estimuladas durante 2 h con diferentes concentraciones de TNF- α (TNF) y 17 β -estradiol (E2). (A) HUVECs sin pretratamiento con E2. (B) HUVECs pretratadas con 3 ng/ml de E2 durante 24 h.

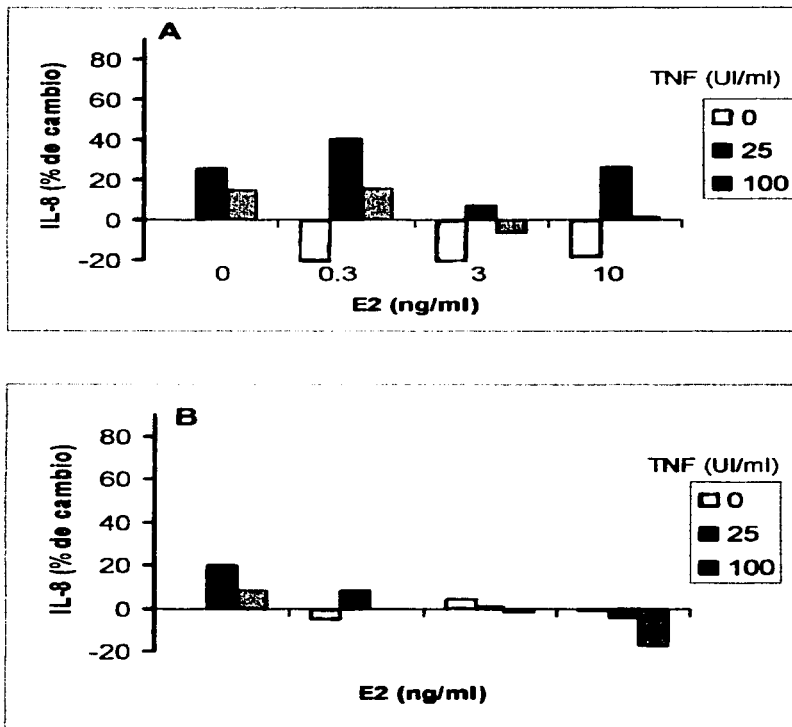


Figura 11.- Secreción de IL-8 expresada como porcentaje de cambio con respecto al control. Las HUVECs fueron estimuladas durante 2 h con diferentes concentraciones de TNF- α (TNF) y de 17 β -estradiol (E2) (A) HUVECs sin pretratamiento con E2. (B) HUVECs pretratadas con 3 ng/ml de E2 durante 24 h.

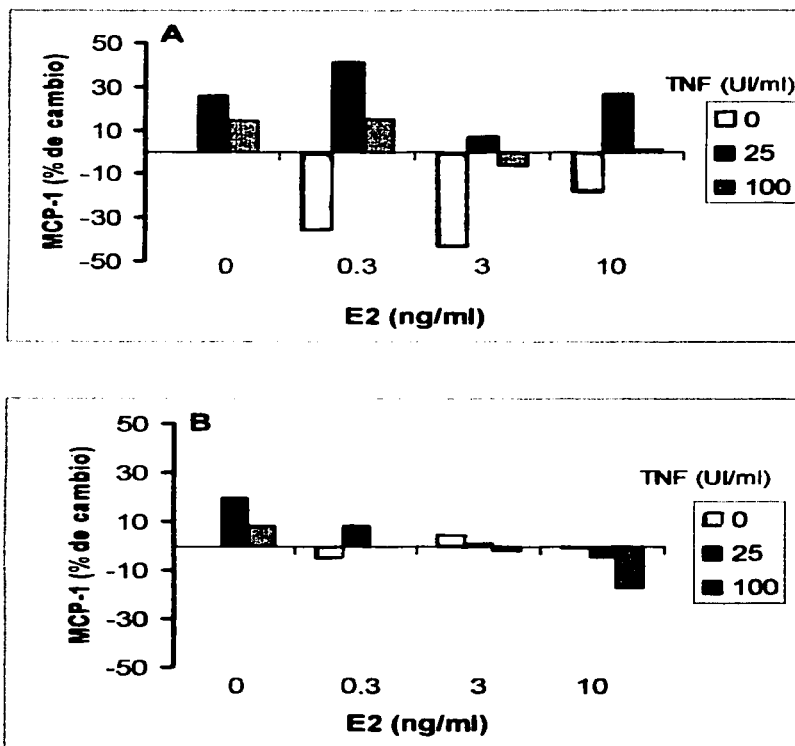


Figura 12.- Secreción de MCP-1 expresada como porcentaje de cambio con respecto al control. Las HUVECs fueron estimuladas durante 2 h con diferentes concentraciones de TNF- α (0, 25, 100 UI/ml) y de 17 β -estradiol (E2). (A:) HUVECs no pretratadas con E2; (B) HUVECs pretratadas con 3 ng/ml de E2 durante 24 h.

Con el objeto de lograr un mejor análisis del efecto inhibitorio del E2, se seleccionaron las células de los 5 cordones más respondedores a la estimulación con TNF, los cuales se estimularon con la dosis de TNF- α que había mostrado tener el máximo efecto estimulador (25 UI/ml). Los resultados de dicho análisis se muestran en la tabla 3. La secreción basal de IL-8 (2.42 ng/ml) y de MCP-1 (2.18 ng/ml), aumentó bajo el estímulo con TNF de forma significativa (4.45 ng/ml para IL-8 y 2.83 ng/ml para MCP-1). En condiciones de pretratamiento (3 ng/ml de E2), el efecto inhibitorio del E2 fue menos importante, pues solo se observó una disminución del 25 % y 24 % (2.67 y 2.52 ng/ml vs. 3.54 ng/ml; $p < 0.01$ para ambos valores). Los resultados mostraron que en las HUVECs pretratadas hay una menor secreción (20 %) en la secreción de IL-8 comparada con las células no pretratadas (3.54 vs. 4.45 ng/ml). No se observaron diferencias significativas en la disminución de la secreción de IL-8 con concentraciones altas de E2 (3 ng/ml). Cuando las HUVECs no fueron pretratadas, el E2 en concentraciones fisiológicas (0.3 y 1 ng/ml), disminuyó significativamente la secreción de IL-8 (54 y 51%, respectivamente).

El E2 también inhibió la secreción de MCP-1 en las HUVECS estimuladas con TNF, tanto pretratadas como no pretratadas con E2. En las células no pretratadas, se observó una disminución significativa del 25% (2.83 vs. 2.1 ng/ml) con la dosis fisiológica (0.3 ng/ml de E2). El efecto inhibitorio se mantuvo en proporciones semejantes con las dosis mayores de E2 (19% con 1 ng/ml y 23% con 3 ng/ml). En condiciones de pretratamiento, la producción de MCP-1 disminuyó significativamente cuando las células endoteliales fueron expuestas a dosis fisiológicas de E2 (49% con 0.3 ng/ml y 42% con 1 ng/ml). Las HUVECs estimuladas con TNF pretratadas con E2, produjeron menos MCP-1 (30 %), en comparación con las HUVECs estimuladas con TNF no pretratadas con E2 (1.96 vs. 2.18 ng/ml).

Expresión de MCP-1 e IL-8

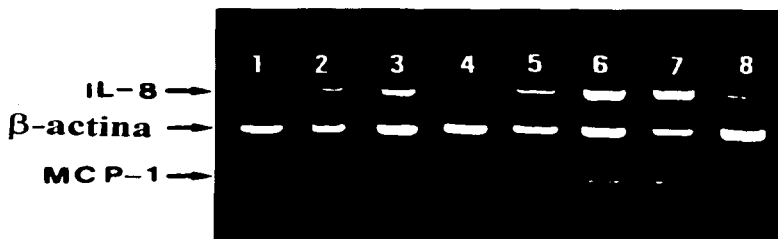
Para determinar el posible mecanismo de la secreción de ambas quimiocinas se utilizó RT-PCR. En las HUVECs pretratadas con 3 ng/ml de E2 se detectaron los productos de ambas quimiocinas (figura 13), sin embargo, no se pudo observar el RNAm de MCP-1 en las células no pretratadas. Fue interesante observar que la expresión semicuantitativa del mensajero de

IL-8, resultó mas baja en condiciones de pretratamiento con relación a las células no pretratadas, y que además, tanto TNF como E2 son muy buenos inductores de los mensajeros de ambas quimiocinas, principalmente para IL-8 en las HUVECs pretradas con E2.

TABLA 3.- Concentración de IL-8 y de MCP-1* en sobrenadantes de células HUVEC en cultivo, pretratadas y no pretratadas con 17β-estradiol.

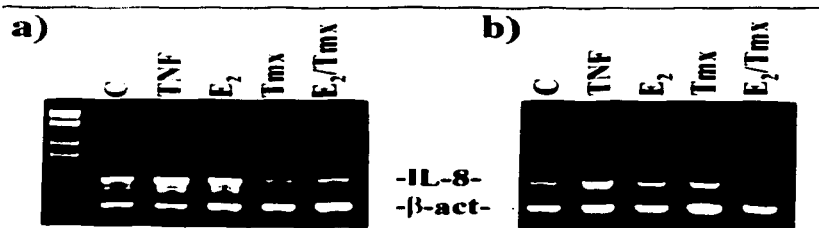
	no pretratadas con E2		pretratadas con E2	
	IL-8	MCP-1	IL-8	MCP-1
Basal	2.42 ± 0.39	2.18 ± 0.36	2.45 ± 0.81	1.56 ± 0.42
+ E2 (0.3 ng/ml)	2.16 ± 0.18	1.90 ± 0.25	2.50 ± 0.47	N.D.
+ TNF	4.45 ^a ± 0.65	2.83 ^c ± 0.55	3.54 ^a ± 0.52	1.96 ^c ± 0.21
TNF				
+ E2 (0.3 ng/ml)	2.05 ^b ± 0.62	2.10 ^d ± 0.26	2.67 ^b ± 0.60	1.00 ^d ± 0.30
+ E2 (1 ng/ml)	2.18 ^b ± 0.36	2.28 ^d ± 0.54	2.52 ^b ± 0.43	1.14 ^d ± 0.19
+ E2 (3 ng/ml)	2.45 ± 0.81	2.16 ± 0.40	2.54 ± 0.47	1.27 ± 0.23

*La concentración de las quimiocinas esta en ng/ml. El pretratamiento con 3 ng/ml de 17β-estradiol (E2) se realizó durante 24 h. En los experimentos (n= 10), la incubación se realizó por 2 h con o sin 25 UI/ml de TNF-α recombinante (TNF) y diferentes concentraciones de E2. Los resultados están expresados como el promedio de la concentración en ng/ml ± la desviación estándar. N.D.= no determinado. a vs. b= p< 0.01, c vs. d= p< 0.05.



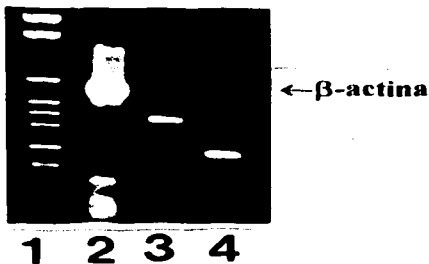
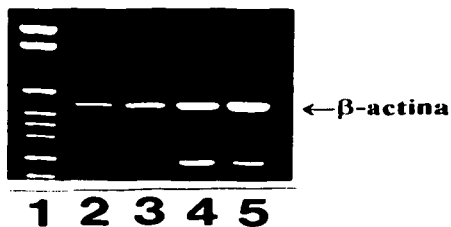
	1	2	3	4	5	6	7	8
IL-8	-	0.3	0.47	0.07	0.52	1.0	1.25	0.23
MCP-1	-	-	-	-	-	0.17	0.32	0.02

Figura 13.- RNAm de IL-8 y MCP-1 de HUVECs cultivadas sin 17β -estradiol (E2) ni $TNF-\alpha$ (TNF) (carriles 1 y 5); con 25 U/ml de TNF (líneas 2 y 6); con 0.3 ng/ml de E2 (líneas 3 y 7) y con E2 + TNF (líneas 4 y 8). Las células utilizadas para la obtención de RNAm de las de las líneas 5-8 fueron pretratadas durante 24 h con una dosis fisiológica alta (3 ng/ml) de E2, mientras que de las líneas 1-4 no fueron pretratadas. Los números en el recuadro están expresados como un índice de los valores semicuantitativos de las quimiocinas en relación a β -actina.



	C	TNF	E ₂	Tmx	E ₂ /Tmx
IL-8 (a)	1.04	2.13	1.0	0.18	.36
IL-8 (b)	0.46	0.98	0.55	0.38	nd*

Figura 14.- RNAm de IL-8 obtenido de células endoteliales pretratadas durante 48 h con 3 ng/ml de 17 β -estradiol. (a) HUVECs no pretratadas (el primer carril en la fotografía corresponde al marcador de pesos moleculares) y (b) no pretratadas. (C) corresponde a HUVECs no estimuladas; (TNF) HUVECs estimuladas con 25 UI/ml de TNF- α ; E₂) HUVECs estimuladas con 3 ng/ml de 17 β -estradiol Tmx), HUVECs estimuladas con 1 \times 10⁻⁸M de tamoxifen. Los números en el recuadro representan los valores semicuantitativos de IL-8 en relación con β -actina (β -act). * nd = no detectado.

A**B**

carril	2	3	4	5
	nd*	0.13	0.69	0.42

Figura 15.- Expresión del receptor de estrógenos mediante RT-PCR A) RNAm obtenido de endometrio humano (HUE): marcador de pesos moleculares VI (carril 1), β-actin (carril 2), receptor de estrógenos alfa (ER-α, carril 3), receptor de estrógenos beta (RE-β, carril 4) moleculares VI (línea 4). B). RT-PCR del mRNA obtenido de HUVECs (carriles 2 y 3) y HUE (carriles 4 y 5). Las células fueron estimuladas con 3ng de 17β-estradiol (carriles 3 y 5). Los números en el recuadro representan el valor semicuantitativo del ER-β en relación a β-actina. *nd= no detectado

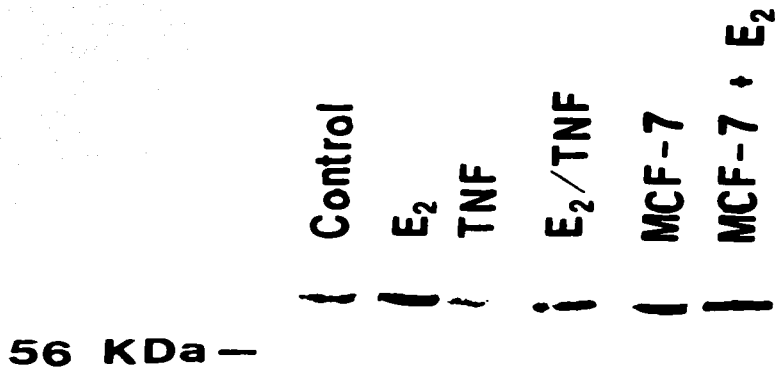


Figura 16.- Análisis por Western blot del receptor de estrógenos α (ER- α) en HUVECs no estimuladas (control) y estimuladas con 17 β -estradiol (E₂, 3 ng/ml), con TNF- α (TNF, 25 UI/ml) y con ambos. Se utilizaron como controles positivos las células de la línea MCF-7 no estimuladas y estimuladas con 17 β -estradiol (E₂, 3 ng/ml). El marcador de 56 kDa es la proteína piruvato-cinasa.

Con el propósito de analizar si el efecto del E2 está mediado a través de sus receptores, las HUVECs fueron estimuladas con tamoxifen, que es un antagonista de E2 a través del RE. Se determinó únicamente la expresión de IL-8, donde el efecto de E2 fue más importante sobre ella. Los resultados (figura 14) mostraron que en las células pretratadas con 3 ng/ml de E2, tanto el TNF como el E2 estimularon la expresión de la quimiocina y que el tamoxifen pudo revertir dicho efecto. Pero, en las células no pretratadas, la estimulación con E2 no fue tan importante y se observó una mayor inducción debida al tamoxifen. Es, es interesante observar que al estimular al mismo tiempo con E2 y tamoxifen, se observó un efecto inhibitorio muy significativo, por lo que es probable que exista competencia por el receptor. Lo anterior permite suponer que el efecto inhibitorio del E2 puede ser a través del RE.

Expresión de receptores de estrógenos

Para corroborar la presencia del receptor de estrógenos se analizó la expresión del RNAm de los receptores α y β de estrógenos (RE- α y RE- β). Se utilizó como control RNA total de endometrio humano (HUE) en el cual se observó la expresión de ambos receptores (figura 15). Cuando las células endoteliales se estimularon con E2 se pudo detectar la presencia del RE- β , aunque de manera muy tenue en relación con el HUE, donde la expresión del RE- β se incrementó en un 29 % con E2, respecto al HUE no estimulado. Dado que en nuestras condiciones experimentales no se pudo detectar el mensajero de RE- α mediante la técnica de "RT-PCR", se realizó un análisis por "Western blot", para determinar si dicho receptor estaba realmente ausente en las HUVECs. Los resultados (figura 16) mostraron que la proteína del RE- α está presente en las células endoteliales de cordón umbilical y que su expresión puede inducirse con E2. Fue interesante observar que el TNF- α mostró un efecto inhibitorio sobre la síntesis del RE- α , aún en presencia de E2.

DISCUSIÓN

Desde hace mucho tiempo se sabe que las mujeres en edad reproductiva tienen una menor incidencia de eventos cardiovasculares secundarios a procesos de aterosclerosis. También es bien sabido que al llegar la menopausia, la incidencia de procesos cardiovasculares alcanza cifras similares o idénticas a las de los hombres. Estas observaciones, apoyadas por estudios epidemiológicos de prevención primaria y secundaria de enfermedades isquémicas cardiovasculares, hacen pensar que los estrógenos pueden ejercer un papel importante en la prevención de la aterosclerosis en las mujeres. Actualmente se piensa que la aterosclerosis está íntimamente relacionada con la disfunción del endotelio y que las hormonas femeninas pueden jugar un papel regulador sobre la función endotelial. Aunado a este hecho se sabe que los estrógenos tienen acción regulatoria sobre diferentes tipos de células vasculares a través de muy diversas vías que involucran mecanismos de activación génica (genómicos) y de regulación a nivel citoplasmático (no genómicos) (32). La migración de los leucocitos al espacio subendotelial, fenómeno mediado por el endotelio, es uno de los pasos iniciales en el proceso aterogénico, por lo que la intención de este trabajo fue determinar si el E2, uno de los tres estrógenos principales que se encuentran en la circulación y el biológicamente más activo, modula adhesión y la migración transendotelial, de células inflamatorias, procesos relacionados con el inicio de la placa ateromatosa.

Debido a que el objetivo fue evaluar la acción del estradiol sobre el endotelio se decidió obtener células endoteliales a partir de una fuente relativamente accesible, confiable y ampliamente utilizada, como los cordones umbilicales; además de que estas células nos daban una ventaja agregada, que es que derivan embriológicamente del producto y no de la madre (68), por lo que se tenía la seguridad de que cualquiera que fuese la respuesta obtenida en este u otro estudio sería que la célula no estuvo expuesta previamente a los numerosos factores de riesgo involucrados en el desarrollo del proceso ateroescleroso (69). En un intento de disminuir los factores hereditarios solamente se utilizaron cordones umbilicales de madres que no tuvieran historia de hiperlipidemia, tabaquismo o hipertensión arterial. Los resultados mostraron que el 99% de las células de los cultivos primarios obtenidos, tenían características morfológicas y bioquímicas correspondientes a las reportadas para las células endoteliales. La

expresión del factor von Willebrand, se ha considerado como un marcador típico de las células endoteliales, sin embargo, cerca del 10% de nuestras células endoteliales no fueron positivas para este factor. Estudios recientemente realizados en nuestro laboratorio, mediante citofluorometría, muestran que existe expresividad variable del factor von Willebrand e inclusive, se han localizado diferentes subpoblaciones celulares endoteliales que expresan de forma variable moléculas de adhesión celular (ICAM-1, VCAM-1, entre otras). A pesar de ello, más del 99% de las HUVECs fueron positivas para endogлина/CD105 (66), que es una proteína integral de membrana de 180 kd, involucrada en el camino de señalamiento del factor-beta transformante de crecimiento y que se expresa casi únicamente en células endoteliales (70).

Una vez probada la pureza de las HUVECs, se decidió estimularlas tanto con LPS como con TNF, de tal manera que se contara con un modelo *in vitro* que asemejara las condiciones proinflamatorias. También se sabe que ambas moléculas son capaces de estimular la secreción de quimiocinas por las células endoteliales (71-73). Los experimentos iniciales se realizaron utilizando LPS; sin embargo, tanto en los ensayos de migración como de secreción no pudimos encontrar diferencias significativas en ninguno de los casos. Cuando las células se estimularon simultáneamente con LPS y E2, observamos una tendencia de disminución en la migración de leucocitos; sin embargo, con estradiol no se observó ningún efecto sobre las secreción de IL-8 y de MCP-1 por HUVECs estimuladas con LPS. Es posible que no encontrar diferencias se deba a la falta de sensibilidad del método y a las diferencias biológicas de cada cordón, pues las células endoteliales de algunos cordones umbilicales no respondieron a la estimulación con LPS. Además, tampoco se puede descartar el hecho de que la inducción de la quimiotaxis se debe al LPS *per se*, en vez de los productos de secreción de las HUVECs.

Se ha reportado que el TNF es un mejor inductor de la secreción de quimiocinas (74,75) que la IL-1 β o el LPS, lo que se corrobora con nuestros resultados, pues el TNF fue capaz de incrementar la secreción basal de IL-8 hasta en un 80% en las HUVECs. Actualmente se sabe que la aterosclerosis es un proceso que involucra las respuestas inflamatoria y

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

fibroproliferativa, ante el daño endotelial (1,7,76), y que el TNF es una molécula que favorece la adherencia de monocitos y promueve su migración al espacio subendotelial, por lo que el uso del TNF permitió mantener un estado proinflamatorio *in vitro*.

De acuerdo con los resultados obtenidos en los ensayos de migración, tanto en geles de agarosa como en los experimentos de quimiotaxis, las HUVECs no estimuladas en cultivo, fueron capaces de favorecer la migración, tanto de leucocitos sistémicos como de monocitos U-937 (línea de un mieloma humano). Además, se mostró que las HUVECs pueden ser activadas *in vitro*, ya que se observó un aumento en la migración basal cuando las células endoteliales se incubaron con TNF, lo que permite contar con un modelo proinflamatorio adecuado.

De manera consistente se observó, tanto en condiciones basales como de estimulación, que el E2 tuvo un efecto inhibitorio sobre la migración inducida por las secreciones de las células endoteliales al medio. Estos resultados apoyan la evidencia de que la regulación de la migración de leucocitos al espacio subendotelial por el E2 requiere de la participación del endotelio, como ha sido reportado por Hofbauer et. al. (77) y Nathan et. al. (78).

Desde hace varios años, se ha aceptado que los estrógenos tienen un papel ateroprotector, aunque los resultados de estudios recientes, hechos por Hully, y cols. (55) y Simon y cols. (56), han creado ciertas dudas sobre el verdadero efecto preventivo de los estrógenos, cuando se utilizan como terapia de reemplazo hormonal en mujeres postmenopáusicas. Sin embargo, es claro que los estrógenos tienen efectos regulatorios sobre la tonicidad vascular (79,80), y la transcripción de genes endoteliales específicos (81). Por lo que decidimos determinar el efecto del E2, en concentraciones equivalentes (fase folicular: 30-260 pg/ml; fase preovulatoria: 120-500 pg/ml) o más altas (3 y 10 ng/ml) que las detectadas en las mujeres premenopáusicas, así como en las mujeres que estaban bajo terapia de reemplazo hormonal (HRT) (82,83), sobre la secreción de moléculas quimioatrayentes. Nuestros resultados confirmaron que los sobrenadantes de las HUVECs estimuladas con TNF y con dosis fisiológicas de E2, disminuyeron la migración de las células U-937. Experimentos posteriores demostraron que el E2 en concentraciones fisiológicas y mayores disminuyeron la secreción de IL-8 y de MCP-1,

lo cual se correlaciona con los resultados de Yamanda et. al. (84) y de Caulin-Glaser et. al. (42). Una interesante observación fue que la adición de dosis fisiológicas de E2 en células endoteliales pretratadas, disminuyeron muy poco la secreción de IL-8, lo cual sugiere que el efecto inhibitorio del E2, sobre la secreción de quimiocinas, tiene un límite. Nuestros resultados indican claramente la capacidad regulatoria del E2 sobre IL-8 y MCP-1, moléculas relacionadas con la transmigración de neutrófilos y monocitos en el proceso inflamatorio crónico (85). Un estudio reciente hecho por Koh et. al. (44) que apoya nuestros hallazgos, muestra que la terapia de reemplazo hormonal disminuye significativamente las concentraciones plasmáticas de MCP-1, lo que permite suponer que tendría como beneficio, una reducida transmigración endotelial de monocitos, si bien es cierto que las concentraciones plasmáticas no necesariamente reflejan lo que sucede en las zonas de migración. Otra observación interesante fue que las células endoteliales expuestas previamente al E2 mostraron una menor respuesta a efectores proinflamatorios, como el TNF, lo que indica que para obtener mejores efectos, los estrógenos deben estar presentes de manera crónica, esto es, de forma similar a lo que ocurre en las mujeres en edad reproductiva. De este modo se pueden excluir o minimizar los efectos benéficos de las terapias estrogénicas a corto plazo.

En un inicio se pensó que la reducción en la secreción de IL-8 y MCP-1, como se ha observado para IL-6 (86), era consecuencia de un efecto inhibitorio sobre el proceso de transcripción de los genes de ambas quimiocinas, como se ha reportado para MCP-1 en macrófagos peritoneales murinos (46) y en moléculas de adhesión expresadas en HUVECs (87). Sin embargo, cuando se evaluó la expresión del RNAm de MCP-1 y de IL-8, se encontró que no hubo una disminución sino por el contrario, hubo un aumento debido al E2, lo que indica que probablemente el E2 inhibe la secreción de quimiocinas al regular los mecanismos traduccionales, postraduccionales o de exocitosis. En un trabajo realizado por EL Mezquini y colaboradores (88) se mostró que los estrógenos pueden modular la concentración del RNAm de la proteína PAM ("Peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase") afectando la estabilidad del precursor. Sin embargo, la acumulación del mensajero de las quimiocinas, observada en el presente trabajo, permite suponer que los RNAm son estables y que la modulación del estrógenos pudiera ser posterior. Actualmente no existe mucha información de si los estrógenos pueden tener efectos a nivel traduccional o postraduccional, pero sería

interesante investigar si el E2 puede modular la translocación de los mensajeros al citoplasma o pudiera tener alguna actividad inhibitoria sobre la maquinaria traduccional. Aunque aún no podemos saber cual es el mecanismo responsable de la disminución de IL-8 y de MCP-1 en las células endoteliales, existe evidencia que demuestra que la exocitosis, relacionada con proteínas VAMP-2 SNARE, puede ser inhibida por E2 (89). Otra alternativa puede ser que la regulación del E2 involucre mecanismos no genómicos, como la modificación de las condiciones de oxido-reducción intracelular (90).

Los mecanismos involucrados en los diversos efectos de los estrógenos generalmente se relacionan con la presencia de un receptor específico. Los estrógenos forman un complejo al unirse con su receptor, el cual se dimeriza y se une a una región que contiene una secuencia reguladora consenso e induce o reprime la transcripción de genes seleccionados o blanco (40), o a través de su interacción con factores de transcripción inducibles. Todavía no es muy claro como se sintetizan y recambian los receptores de estrógenos en las células endoteliales de cordón umbilical, pues Jensen et. al. (91) reportaron que no detectaron receptores de estrógenos (RE) en dichas células, mientras que, en estudios previos han afirmado que sí (26, 92). Es probable que estos datos contradictorios se debieran a las variaciones propias de los ensayos o al método de detección. En nuestras condiciones, se pudo observar mediante RT-PCR el RE- β pero no el RE- α , sin embargo, cuando utilizamos un anticuerpo dirigido contra el RE- α , si se pudo localizar la proteína mediante Western Blot. Es probable que el mensajero de la isoforma α no sea muy estable o bien sea rápidamente utilizado para la síntesis proteica del receptor. Si bien es cierto que no se pudo afirmar cual fue el tipo de receptor más abundante, si se observaron diferencias en su expresión, lo que permite suponer que estas variaciones están relacionadas con la función. En estudios previos se encontró que la isoforma β está vinculada con la regulación de la oxido nítrico sintasa (eNOS) a través de mecanismos no genómicos, en caveolas de células endoteliales (93). Por lo que es probable que el E2 pudiera favorecer su expresión en nuestras condiciones experimentales. Dado que las isoformas de los receptores pueden tener funciones tejido-especificas o bien respondan a señales diferentes es posible que en las HUVECs el RE- β sea más abundante o permanezca más tiempo que la isoforma α , o bien, no se degrade tan fácilmente.

Los experimentos con el tamoxifen no fueron suficientes para indicarnos los posibles mecanismos involucrados en el efecto inhibitorio del E2, pues el tamoxifen puede competir por los receptores de estrógenos como un antagonista (94) como es el caso de la glándula mamaria o como un agonista (95), en el caso del tejido óseo. Además, el tamoxifen es una molécula anti-inflamatoria por si misma (96) e inhibe la expresión de algunos factores de transcripción (97). Recientemente se ha reportado que el tamoxifen puede tener efectos benéficos sobre el sistema cardiovascular, por ejemplo: el tamoxifen y el estradiol evitan la reducción del diámetro de la aorta de conejos hipercolesterolémicos (98), y aumentan la producción de óxido nítrico en ratas ovariectomizadas (99). Es posible que la acción del tamoxifen sea dependiente del tejido y de la concentración de estrógenos circulantes, ya que en las HUVECs no pretratadas con E2 se observó un efecto inhibitorio sinérgico sobre la expresión de IL-8, en tanto que en las HUVECs pretratadas, se observó efecto antagonista entre E2 y tamoxifen.

En conclusión, el 17β -estradiol tiene efecto inhibitorio en la secreción pero no en la transcripción de IL-8 y MCP-1 de células endoteliales de cordón umbilical. También se observó que las HUVECs previamente tratadas con E2 secretan menos quimiocinas inducidas por TNF- α , que las células no previamente expuestas al E2, lo que permite suponer que el E2 puede estar generando un bloqueo que se mantiene de forma prolongada y que es posible que involucre la regulación de moléculas relacionadas con el proceso de traducción o de factores de transcripción como el NF κ B, manteniendo un estado de óxido-reducción de tal manera que se dificulte la disociación de la subunidad regulatoria I κ B; o bien, que el E2 pudiera inhibir la actividad de moléculas relacionadas con la exocitosis, evitando la secreción. Por lo tanto, parece ser que en mujeres expuestas crónicamente a estrógenos pueden tener una menor activación endotelial que las expuestas de forma aguda.

CONCLUSIONES

1. Se obtuvieron cultivos primarios de HUVECs con pureza mayor del 95%.
2. El 17 β -estradiol inhibió la migración de leucocitos en geles de agarosa, inducida por sobrenadantes de HUVECs estimuladas con LPS.
3. El 17 β -estradiol inhibió la quimiotaxis de monocitos U-937 en respuesta sobrenadantes de HUVECs estimuladas con TNF- α .
4. El 17 β -estradiol disminuyó la secreción de MCP-1 e IL-8 por HUVECs estimuladas con TNF- α .
5. El 17 β -estradiol no tuvo efecto inhibitorio sobre la formación de los mensajeros de MCP-1 e IL-8 en HUVECs estimuladas con TNF- α .
6. Se detectó la expresión de RE- α y RE- β en la HUVECs en nuestras condiciones la cual fue estimulada con 17 β -estradiol.
7. El tamoxifen tuvo un efecto inhibitorio sinérgico con el 17 β -estradiol sobre la expresión de IL-8 en HUVECs pretratadas con estradiol y estimuladas con TNF- α .
8. El tamoxifen mostró un efecto antagónico sobre la expresión de IL-8 en HUVECs no pretratadas con estradiol y estimuladas con TNF- α .

BIBLIOGRAFÍA

1. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis and update. *New England of Medicine* 1989;314:488-500.
2. Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-9.
3. Aqel NM, Ball RY, Waldmann H, Mitchnson MJ. Identification of macrophages and smooth muscle cells in human atherosclerosis using monoclonal antibodies. *Journal of Pathology* 1985; 146:197-200.
4. Hobbs HH, Russell DW, Brown MS, Golstein JL. The LDL receptor locus in familial hypercholesterolemia: mutational analysis of a membrane protein. *Annual review of genetics* 1990; 24:133-70.
5. Pearse BM. Clatrin and coated vesicles. *EMBO Journal* 1987; 6:2507-12.
6. Braunwald E, editor. *The myocardium: failure and infarction*. HP Publishing Co., Inc. New York. 1974, pp 155-160.
7. Munro JM, Cotran RS. *Biology of disease. The pathogenesis of atherosclerosis: atherosclerosis and inflammation*. Laboratory Investigation 1988; 58:249-61.
8. Cines DB, Pollak EL, Buck CA, Loscalzo J, Zimmerman GA, MaEver RP, Pober JS, Wick TM, Konkle BA, Schwartz BS, Barnathan ES, McCrae KR, Hug BA, Schmidt AM, Stern DM. Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. *Blood* 1998; 91:3527-61.
9. Janeway C, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *ImmunoBiology* 5. The immune system in health and disease. 5th ed. Garland Publishing, New York, USA. 2001, pp 69-78.
10. Roitt I, Brostoff J, Male D. *Immunology*. Mosby-Year Book Europe Ltd, London Eng. 1996, 4th ed. pp 14.1-6.
11. Price DT, Loscalzo J. Cellular adhesion molecules and atherogenesis. *The American Journal of Medicine* 1999; 107:85-97.
12. Cybulsky MI, Iiyama K, Li H, Zhu S, Chen M, Iiyama M, Davis V, Gutierrez-Ramos JC, Connelly PW, Milstone DS. A major role for VCAM-1, but not ICAM-1, in early atherosclerosis. *Journal of Clinical Investigation* 2001; 107:1255-62.
13. Brown Z, Gerritsen ME, Carley WW, Strieter RM, Kunkel SL, Westwick J. Chemokine gene expression and secretion by cytokine-activated human microvascular endothelial cells. *American Journal of Pathology* 1994; 145: 913-21.

14. Luster AD. Chemokines-chemotactic cytokines that mediate inflammation. *The New England Journal of Medicine* 1998; 388:436-45.
15. Baggiolini M, Loetscher P. Chemokines in inflammation and immunity. *Immunology Today* 2000; 21: 418-20.
16. Hoogewerf AJ, Kuschert GSV, Proudfoot AEI, Borlat F, Clark-Lewis I, Power CA, Wells TNC. Glycosaminoglycans mediate cell surface oligomerization of chemokines. *Biochemistry* 1997; 36:13570-78.
17. Faveeuw C, Preece G, Ager A. Transendothelial migration of lymphocytes across high endothelial venules into lymph nodes is affected by metalloproteinases. *Blood* 2001, 98:688-95.
18. Male D, Cooke A, Owen M, Trowsdale J, Champion B. *Advanced Immunology*. Mosby-Year Book Europe Ltd, London Eng. 1996. 3th ed. pp 14.4-14.14.
19. Corsi MM, Leone G, Fulgenzi A, Wasserman K, Leone F, Ferrero ME. RANTES and MCP-1 chemokine plasma levels in chronic renal transplant dysfunction and chronic renal failure. *Clinical Biochemistry* 1999, 32:455-60.
20. Frering B, Philip I, Dehoux M, Rolland C, Langlois JM, Desmonts JM. Circulating cytokines in patients undergoing normothermic cardiopulmonary bypass. *Journal of Thoracic Cardiovascular Surgery* 1994, 108:636-41.
21. Larsson BM, Larsson K, Malmberg P, Palmberg L. Gram positive bacteria induce IL-6 and IL-8 production in human alveolar macrophages and epithelial cells. *Inflammation* 1999, 23:217-30.
22. Ziaber J, Baj Z, Pasnik J, Chmielewski H, Tchorzewski H. Expression of aminopeptidase N (APN) on peripheral blood mononuclear cells' surface as a marker of these cells' transendothelial migration properties in the course of multiple sclerosis. *Mediators of Inflammation* 2000;9:45-8.
23. Zhao M, Pu J, Forrester JV, McCaig CD. Membrane lipids, EGF receptors, and intracellular signals colocalize and are polarized in epithelial cells moving directionally in a physiological electric field. *FASEB Journal* 2002; 16:857-9.
24. Kahler CM, Pischel AB, Haller T, Meierhofer C, Djanani A, Kaufmann G, Wiederman CJ. Signal transduction pathways in directed migration of human monocytes induced by human growth hormone in vitro. *International Immunopharmacology* 2001; 1:1351-61.
25. Wassmann S, Baumer AT, Strehlow K, van Eickels M, Grohe C, Ahlbory K, Rosen R, Bohm M, Nickenig G.. Endothelial dysfunction and oxidative stress during estrogen deficiency in spontaneously hypertensive rats. *Circulation* 2001, 103:435-41.
26. Kim-Schulze S, McGowan KA, Hubchak SC, Cid MC, Martin MB, Kleinman HK, Greene GL, Schnaper HW. Expression of an estrogen receptor by human coronary artery and umbilical vein endothelial cells. *Circulation* 1996; 94:1402-07.

27. Karas RH, Patterson BI, Mendelsohn ME. Human vascular smooth muscle cells contain functional estrogen receptor. *Circulation* 1994; 89:1943-50.
28. Wong CW, McNally C, Nickbarg E, Komm BS, Cheskis BJ. Estrogen receptor-interacting protein that modulates its nongenomic activity-crosstalk with Src/Erk phosphorylation cascade. *Proceeding of the National Academy of Sciences* 2002, 99(23):14783-8.
29. Geraldes P, Sirois MG, Bernatchez PN, Tanguay JF. Estrogen regulation of endothelial and smooth muscle cell migration and proliferation: role of p38 and p42/44 mitogen-activated protein kinase. *Arteriosclerosis Thrombosis and Vascular Biology* 2002, 22:1585-90.
30. Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, Sessa WC. Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature* 1998; 392:821-24.
31. Venema RC, Nishida K, Alexander RW, Harrison DG, Murphy TJ. Organization of bovine gene encoding the endothelial nitric oxide synthase. *Biochemical et Biophysical Acta* 1994; 1218:413-20.
32. Mendelsohn ME, Karas RH. Estrogen and the blood vessel wall. *Current Opinion in Cardiology* 1994; 9:619-26.
33. Koh KK, Cardillo C, Bui MN, Hathaway L, Csako G, Wacławski MA, Panza JA, Cannon RO 3rd. Vascular effects of estrogen and cholesterol-lowering therapies in hypercholesterolemic postmenopausal women. *Circulation* 1999; 99:354-60.
34. Burke AP, Farb A, Malcom GT, Liang YH, Smialek J, Virmani R. Coronary risk factors and plaque morphology in men with coronary disease who died suddenly. *New England Journal of Medicine* 1997; 336:1276-82.
35. Sack MN, Rader DL, Cannon III RO. Oestrogen and inhibition of oxidation of low-density lipoprotein. *Lancet* 1994; 343:269-70.
36. Yoon BK, Oh WJ, Kessel B, Roh CR, Choi D, Lee JH, Kim DK. 17beta-E2 inhibits proliferation of cultured vascular smooth muscle cells induced by lysophosphatidylcholine via a nongenomic antioxidant mechanism. *Menopause* 2001; 8:58-64.
37. Koh KK. Effects of estrogen on the vascular wall: vasomotor function and Inflammation. *Cardiovascular Research* 2002; 55:714-26.
38. Kim MS, Chae HJ, Shin TY, Kim HM, Kim HR. Estrogen regulates cytokine release in human mast cells. *Immunopharmacology and Immunotoxicology* 2001;23:495-504.
39. Ito A, Buenafe AC, Matejuk A, Zamora A, Silverman M, Dwyer J, Vandenbark AA, Offner H. Estrogen inhibits systemic T cell expression of TNF-alpha and recruitment of TNF-alpha(+) T cells and macrophages into the CNS of mice developing experimental encephalomyelitis *Clinical Immunology* 2002 Mar;102:275-82.

40. Rodríguez-Maldonado E, Hernández-Rebollar A, López-Marure R, Massó F, Montañó LF. Participación del factor de necrosis tumoral- α en la aterosclerosis. Archivos de Cardiología de México 2001; 71:241-49.
41. Harnish DC, Scicchitano MS, Adelman SJ, Lyttle CR, Karathanasis SK. The role of CBP in estrogen receptor cross-talk with nuclear factor- κ B in HepG2 cells. Endocrinology 2000; 141: 3403-11.
42. Caulin-Glaser T, Watson CA, Pardi R, Bender JR. Effects of 17 β -E2 on cytokine-induced endothelial cells adhesion molecule expression. Journal of Clinical Investigation 1996; 98:36-42.
43. Cid MC, Kleinman HK, Grant DS, Schnaper HW, Fauci AS, Hoffman GS. E2 enhances leukocyte binding to tumor necrosis factor (TNF)-stimulated endothelial cells via an increase in TNF-induced adhesion molecules E-selectin, intercellular adhesion molecule type I, and vascular cell adhesion molecule type I. Journal of Clinical Investigation 1994; 93:17-25.
44. Koh KK, Son JW, Ahn JY, Lee HY, Hwang HY, Kim DS, Jin DK, Ahn TH, Shin EK. Effect of hormone replacement therapy on oxide nitric bioactivity and monocyte chemoattractant protein-1 levels. Internal Journal of Cardiology 2001; 81:43-50.
45. Inadera H, Sekita T, Yoshimura T, Matsushima K. Molecular análisis of the inhibition of monocyte chemoattractant protein-1 gene expression by estrogens in MCF-7 cells. Endocrinology 2000; 141:50-9.
46. Frazier-Jessen MR, Kovacs EJ. Estrogen modulation of JE/monocyte chemoattractant protein-1 mRNA expression in murine macrophages. Journal of Immunology 1995; 154:1838-45.
47. Boucher A, Mourad W, Mailloux J, Lemay A, Akoum A. Ovarian hormones modulate monocyte chemotactic protein-1 expression in endometrial cells of women with endometriosis. Molecular Human Reproduction 2000; 6:618-26.
48. Kanda N, Watanabe S. 17 β -E2, progesterone, and dihydrotestosterone suppress the growth of human melanoma by inhibiting interleukine-8 production. Journal Investigation of Dermatology 2001; 117:274-83.
49. Wei M, Kuukasjarvi P, Kaukinen S, Laurikka J, Pehkonen E, Laine S, Moilanen E, Metsanoja R, Tarkka M. Anti-inflammatory effects of 17 β -estradiol pretreatment in men after coronary artery surgery. Journal of Cardiothoracic Vascular Anesthesia 2001; 15:455-9.
50. Runesson E, Ivarsson K, Janson PO, Brannstrom M. Gonadotropin- and cytokine-regulated expression of the chemokine interleukin-8 in the human preovulatory follicle of the menstrual cycle. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism 2000; 85:4387-95.
51. Akoum A, Lawson C, McColl S, Villeneuve M. Ectopic endometrial cells express high concentration of interleukin (IL)-8 in vivo regardless of the menstrual cycle phase and respond to eE2 by up-regulating IL-1-induced IL-8 expression in vitro. Molecular Human Reproduction 2001; 7:859-66.

52. Kannel WB, Hjortland MC, McNamara PM, Gordon T. Menopause and cardiovascular disease: the Framingham study. *Annals of Internal Medicine* 1976; 85:447-52.
53. Gossland IF, Wynn V, Crook D, Miller NE. Sex, plasma lipoproteins, and atherosclerosis: prevailing assumptions and outstanding questions. *American Heart Journal* 1987; 114:1467-503.
54. Nabulsi AA, Folsom AR, White A, Patsch W, Heiss G, Wu KK, Szklo M. Association of hormone-replacement therapy with various cardiovascular risk factors in postmenopausal women. The Atherosclerosis Risk in Communities Study Investigators. *The New England Journal of Medicine* 1993; 328:1069-75.
55. Hulley SB, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *Journal of the American Medical Association* 1998; 280:605-13.
56. Simon JA, Hsia J, Cauley JA, Richards C, Harris F, Fong J, Barret-Connor E, Hulley SB. Postmenopausal hormone therapy and risk stroke. The heart and estrogen-progestine replacement study (HERS). *Circulation* 2001; 103:638-42.
57. Samaan SA, Crawford MH. Estrogen and cardiovascular function after menopause. *Journal of the American College of Cardiology* 1995; 26:1403-10.
58. Venkavaara S, Hakala-Ala-Pietilä T, Virkamäki A, Bergholm B, et. al. Differential effects of oral and transdermal estrogen replacement therapy on endothelial function in postmenopausal women. *Circulation* 2000; 102:2687-93.
59. Finking G, Krauss N, Romer S, Eckert S, Lenz C, Kamenz J, Menke A, Brehme U, Hombach V, Hanke H. 17beta-E2, gender independently, reduces atheroma development but no neointimal proliferation after balloon injury in the rabbit aorta. *Atherosclerosis* 2001; 154:39-49.
60. Karas RH. Animal models of the cardiovascular effects of exogenous hormones. *American Journal of Cardiology* 2002; 90:22F-25F.
61. Gimbrone MA Jr, Cotran RS, Folkman J. Human vascular endothelial cells in culture. Growth and DNA synthesis. *Journal of Cellular Biology* 1974; 60:673-84.
62. Al-Sumidaie AM, Jones DL, Young HL. Characterization of the under-agarose method for quantifying migration of highly purified human monocytes. *Journal of Immunology Methods* 1984; 75:129-40.
63. Kumar NM, Rabadi NH, Sigurdson LS, Schünemann HJ, Lwebuga-Mukasa JS. Induction of interleukin-1 and interleukin-8 mRNAs and proteins by TGFβ₁ in rat lung alveolar epithelial cells. *Journal of Cellular Physiology* 1996; 169:186-199.

64. Negus RPM, Stamp GWH, Relf MG, Burke F, Malik STA, Bernasconi S, Allavena P, Sozzani S, Montovani A, Balkwill FR. The detection and localization of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) in human ovarian cancer. *Journal of Clinical Investigation* 1995; 95:2391-96.
65. Branderberger AW, Tee MK, Lee JY, Chao V, Jaffe RB. Tissue distribution of estrogen receptors alpha (ER- α) and beta (ER- β) mRNA in the midgestational human fetus. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism* 1997; 82:3509-12.
66. Paez A, Archundia A, Mendez Cruz R, Rodriguez E, Lopez Marure R, Masso F, Aceves JL, Flores L, Montano LF. A subpopulation of large granular von Willebrand Ag negative and CD105 positive endothelial cells, isolated from abdominal aortic aneurysms, overexpress ICAM-1 and Fas antigen. *Arch Cardiol Mex* 2002 Apr-Jun;72:99-104.
67. Dixit VM, Green S, Sarma V, Holzman LB, Wolf FW, O'Rourke K, Ward PA, Prochownik EV, Marks RM. Tumor necrosis factor- α induction of novel gene products in human endothelial cells including a macrophage-specific chemotaxin. *The Journal of Biological Chemistry* 1990; 265:2973-8.
68. Carlson BM. *Embriología humana y biología del desarrollo*. Segunda Ed. Ediciones Harcourt, S.A. Madrid, España. 2000, pp 110-131.
69. Luedemann J, Schminke U, Berger K, Piek M, Willich SN, Doring A, John U, Kessler C. Association between behavior-dependent cardiovascular risk factors and asymptomatic carotid atherosclerosis in a general population. *Stroke* 2002 ;33:2929-35.
70. Miller DW, Graulich W, Karges B, Stahl S, Ernst M, Ramaswamy A, Sedlacek HH, Muller R, Adamkiewicz J. Elevated expression of endoglin, a component of the TGF-beta-receptor complex, correlates with proliferation of tumor endothelial cells. *International Journal of Cancer* 1999; 81:568-72.
71. Young SK, Worthen GS, Haslett C, Tonnesen MG, Henson PM. Interaction between chemoattractants and bacterial lipopolysaccharide in the induction and enhancement of neutrophil adhesion. *The American Journal of Respiration Cellular and Molecular Biology* 1990; 2:523-32.
72. Sica A, Wang JM, Colotta F, Dejana E, Mantovani A, Oppenheim JJ, Larsen CG, Zachariae CO, Matsushima K. Monocyte chemotactic and activating factor gene expression induced in endothelial cells by IL-1 and tumor necrosis factor. *Journal of Immunology* 1990; 144:3034-8.
73. Kopydlowski KM, Salkowski CA, Cody MJ, van Rooijen N, Major J, Hamilton TA, Vogel SN. Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide in vitro and in vivo. *Journal of Immunology* 1999;163:1537-44.
74. Nooteboom A, Van Der Linden CJ, Hendriks T. Tumor necrosis factor-alpha and interleukin-1beta mediate endothelial permeability induced by lipopolysaccharide-stimulated whole blood. *Critical Care Medicine* 2002, 30:2063-8.

75. Van Kampen C, Mallard BA. Regulation of bovine E-selectin expression by recombinant tumor necrosis factor alpha and lipopolysaccharide. *Veterinarian Immunology and Immunopathology* 2001, 79:151-65.
76. Krishnaswamy G, Kelley J, Yerra L, Smith JK, Chi DS. Human endothelium as a source of multifunctional cytokines: molecular regulation and possible role in human disease. *Journal of Interferon Cytokine Research* 1999, 19:91-104.
77. Hofbauer R, Frass M, Gmeiner B, Salfinger H, Salzer H, Kos T, Wagner O, Kapiotis S, Kaye AD. Oral contraceptives that contain ethinyl estradiol (0.035 mg) and cyproterone acetate (2 mg) inhibit leukocyte transmigration through endothelial cell monolayers. *Fertility and Sterility* 1999, 72:652-6.
78. Nathan L, Pervin S, Singh R, Rosenfeld M, Chaudhuri G. Estradiol inhibits leukocyte adhesion and transendothelial migration in rabbits *in vivo*: possible mechanisms for gender differences in atherosclerosis. *Circulation and Research*, 1999 20:85:377-85.
79. Zhang L, Kosaka H. Sex-specific acute effect of estrogen on endothelium-derived contracting factor in the renal artery of hypertensive Dahl rats. *Journal of Hypertension* 2002, 20:237-46.
80. Leong S, Docherty JR. Vascular inhibitory actions of 17beta-oestradiol in rat portal vein. *Journal of Autonomic Pharmacology* 2001, 21:95-9.
81. Villablanca AC, Lewis KA, Rutledge JC. Time- and dose-dependent differential upregulation of three genes by 17beta-estradiol in endothelial cells. *Journal of Applied Physiology* 2002, 92:1064-73.
82. Johnson SR. Menopause and hormone replacement therapy. *The Medical Clinics of North America* 1998; 82: 297-320.
83. Wiegartz I, Fink T, Rohr UD, Lang E, Leukel P, Kuhl H. Cross-over comparison of the pharmacokinetics of estradiol during hormone replacement therapy with estradiol valerate or micronized estradiol. *Zentralblatt für Gynäkologie* 2001;123: 505-12.
84. Yamada K, Hayashi T, Kuzuya M, Naito M, Asai K, Iguchi A. Physiological concentration of 17 beta-estradiol inhibits chemotaxis of human monocytes in response to monocyte chemoattractant protein 1. *Artery* 1996; 22:24-35.
85. Johnston B, Burns AR, Suematsu M, Issekutz TB, Woodman RC, Kubes P. Chronic inflammation upregulates chemokine receptors and induces neutrophil migration to monocyte chemoattractant protein-1. *The Journal of Clinical Investigation* 1999; 103:1269-76.
86. Ray A, Prefontaine KE, Ray P. Down-modulation of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol in the absence of high affinity DNA binding by the estrogen receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 1994; 269:12940-6.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

87. Nakai K, Itoh C, Hotta K, Itoh T, Yoshizumi M, Hiramori K. estradiol-17 beta regulates the induction of VCAM-1 mRNA expression by interleukin-1 beta in human umbilical vein endothelial cells. *Life Sciences* 1994; 54:L221-L7.
88. El Mezquini R, Boudouresque F, Ouafik L. Estrogen regulation of peptidylglycine alpha-amidating monooxygenase messenger ribonucleic acid levels by a nuclear posttranscriptional event. *Endocrinology* 1997;138:5256-65.
89. Majo G, Lorenzo MJ, Blasi J, Aguado F. Exocytotic protein components in rat pituitary gland after long-term estrogen administration. *The Journal of Endocrinology* 1999; 161:323-31.
90. Janssen-Heininger YM, Poynter ME, Baeuerle PA. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappa B. *Journal of Free Radicals in Biology and Medicine* 2000; 28:1317-27.
91. Jensen I, Rinaldo CH, Nordbo Berge L, Seternes OM, Moens U. Human umbilical vein endothelial cells lack expression of the estrogen receptor. *Endothelium* 1998;6:9-21
92. Venkov CD, Rankin AB, Vaughan DE. Identification of authentic estrogen receptor in cultured endothelial cells. *Circulation* 1996; 94:727-33.
93. Chambliss KL, Yuhanna IS, Anderson RG, Mendelson ME, Shaul PW. ERbeta has nongenomic action in caveolae. *Molecular Endocrinology* 2002; 16:938-46.
94. O'Regan RM, Jordan VC. The evolution of tamoxifen therapy in breast cancer: selective oestrogen-receptor modulators and downregulators. *Lancet Oncology* 2002;3:207-14.
95. Lu YC, Jiann BP, Chang HT, Huang JK, Chen WC, Su W, Jan CR Effect of the anti-breast cancer drug tamoxifen on Ca(2+) movement in human osteosarcoma cells. *Pharmacology and Toxicology* 2002; 91:34-9.
96. Cushman M, Costantino JP, Tracy RP, Song K, Buckley L, et al. Tamoxifen and cardiac risk factors in healthy women: suggestion of an anti-inflammatory effect. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2001; 21:255-61.
97. Mendenson ME. Genomic and nongenomic effects of the estrogens in the vasculature. *American Journal of Cardiology* 2002; 90(suppl):3F-6F.
98. Sugama D, Nakajima H, Machara K, Hara I, Lawlor GF, Inazu M, Yamashina A, Matsumiya T. Anti-atherosclerotic effects of tamoxifen in cholesterol-fed ovariectomized rabbits. *Japanese Heart Journal* 2002;43:545-58.
99. Simoncini T, Varone G, Fornari L, Mannella P, Luisi M, Labrie F, Genazzani AR. Genomic and nongenomic mechanisms of nitric oxide synthesis induction in human endothelial cells by a fourth-generation selective estrogen receptor modulator. *Endocrinology* 2002 Jun;143(6):2052-61.

ANEXO

Life Sciences 71 (2002) 2181-2193

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

17 β -estradiol inhibits the adhesion of leukocytes in TNF- α stimulated human endothelial cells by blocking IL-8 and MCP-1 secretion, but not its transcription

Emma Rodríguez, Rebeca López, Araceli Paez, Felipe Massó, Luis F. Montaña*

Depto. Biología Celular, Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez", Juan Badiano 1, Tlalpan 14080, México, D.F., Mexico

Received 4 October 2001; accepted 16 May 2002

Abstract

Inflammation, and especially mononuclear cell adhesion to endothelium, is an important physiopathological component of atherosclerosis. Since coronary heart disease in women of reproductive age and/or with estrogen replacement therapy is reduced, our aim was to determine if 17 β -estradiol had a regulatory effect on the adhesion of lymphocytes to the endothelium. We performed U-937 cells adhesion assays in TNF- α -stimulated HUVECs, and we also quantitated IL-8 and MCP-1 in culture supernatants, in the presence or not of 17 β -estradiol. The presence of α - and β -estrogen receptors was determined by Western blot and RT-PCR, respectively, whereas the transcription of both chemokines was evaluated by RT-PCR. The results showed a 35% decrease in the adhesion of U-937 monocyte cells to TNF- α -stimulated HUVECs, and a 54% and 65% inhibition of TNF- α -induced IL-8 and MCP-1 secretion by physiological and physiologically high doses of 17 β -estradiol. The hormone did not affect the transcription of both chemokine genes. Tamoxifen reverted the inhibitory effect induced by 17 β estradiol. In conclusion, 17 β -estradiol modifies the adhesion of leukocytes to endothelial cells by inhibiting the secretion, but not the gene transcription, of proinflammatory chemokines.

© 2002 Elsevier Science Inc. All rights reserved.

Keywords: Atherosclerosis; Estrogen; Chemokines; Endothelial cells; Cytokines

* Corresponding author. Tel.: +52-5-573-2911x1337; fax: +52-5-573-0926.
E-mail address: lfmontmx@yahoo.com (L.F. Montaña).

Introduction

The atherogenic process is the consequence of protective, although sometimes excessive, responses to insults to the endothelium and smooth muscle cells of the wall of the artery, preceded and accompanied by inflammation [1]. In this context, the recruitment and migration of important immune cells into the arterial intima are important in the pathogenesis of the disease. Women of reproductive age are protected against coronary heart disease [2], the incidence being half of that observed in age matched males [3]. Although the protective role of estrogen replacement therapy in the prevention of cardiovascular disease [4] in women with documented coronary heart disease is currently under scrutiny [5], the mechanism is still under debate [6]. Estrogens have gene and transcription regulatory effects [7], modify lipid or carbohydrate metabolism [8], modulate the thrombotic milieu [9], and exert other direct effects on the vasculature, i.e., inhibition of LDL oxidation in the subendothelial space [10], all of which may contribute to a direct or indirect prevention of cardiovascular diseases.

The recruitment of mononuclear cells to the endothelium is regulated by chemoattracting molecules secreted by activated vascular endothelial cells [11]. Specific chemotactic cytokines have been classified and subdivided into the CXC and the CC family; IL-8, a mediator of acute inflammatory reactions, is a key member of the former, and MCP-1, a mediator in chronic inflammation, of the latter [12]. During monocyte:endothelial cell interaction there is an increased production of IL-8 and MCP-1 [13], but very little information exists on the possible role of estrogens in this cellular interaction. The aim of this work was to determine if physiological concentrations of estrogen inhibit the adhesion of mononuclear cells to TNF- α -stimulated human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), and whether regulation of chemotactic molecules is involved.

Methods

Water soluble 17 β -estradiol, fetal calf serum, L-glutamine, N-[2-hydroxyethyl]piperazine-N'-[ethanesulfonic acid](HEPES), bovine gelatine, controlled process serum replacement-1 (CPSR-1), Triton X-100, Tris, streptavidin-peroxidase complex, diethyl pyrocarbonate, and porcine heparin were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO). M-199 medium with or without phenol red, type II collagenase, RPMI-1640, TRIZOL, liquid trypsin-EDTA (1 \times) were from Gibco Laboratories (Grand Island, NY). Recombinant TNF- α and endothelial cell growth supplement were from Boehringer-Mannheim Bioquímica (Mexico, DF). Nitrocellulose membranes were from Bio-Rad (Hercules, CA). Purified mouse anti-human Von Willebrand factor and rhodamine-labelled goat anti-mouse IgG were from Serotec (Raleigh, NC). Biotin-labelled goat anti-rabbit Ig was from Dako (Carpinteria, CA). Rabbit polyclonal anti-ER α (HC20) antibody was from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). BCECF-AM was from Molecular Probes Inc. (Eugene, OR). Quantikine human IL-8 and MCP-1 immunoassays were from R&D Systems (Minneapolis, MN); and agarose and Access RT-PCR system from Promega (Madison, WI). Transwell membranes (5 μ m-pore size in 24 wells) were from Costar (Cambridge, MA). Supersignal West Pico Chemiluminescent Substrate was from Pierce (Rockford, IL).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) isolation and culture

HUVECs isolated from umbilical veins (kindly donated by Dr. Valero, Hospital "Angeles", Mexico DF) were obtained with 0.2% type II collagenase and were serially passaged on gelatine-free flasks in phenol red-containing M-199 medium (Gibco Laboratories, Grand Island, NY) containing 20% heat-inactivated fetal calf serum and supplemented with HEPES (10 mM), penicillin (100 ug/ml), streptomycin (100 ug/ml), L-glutamine (2 mM), porcine heparin (5 IU/ml), and endothelial cell growth supplement (40 ug/ml). Trypsin-treated cells obtained from the flasks were extensively washed with 2% heat-inactivated fetal calf serum/HEPES saline solution (HSS)(1 M HEPES, 0.15 M NaCl, 2.2 g/l glucose, 4 mM KCl, pH 7.5) and seeded at 2×10^5 cells/well in 500 μ l of phenol red-free M-199 medium containing 20% of CPSR-1 and supplemented with HEPES and L-glutamine 48 h before experiments. The evaluation of IL-8 and MCP-1 expression and secretion was performed individually for each one of the umbilical cords. Unless otherwise indicated, the endothelial cells were pre-treated with 1×10^{-8} M/ml of 17β -estradiol for 24 h; pre-treatment in expression experiments lasted 48 h. Inhibition experiments were performed with tamoxifen (1×10^{-9} M). Cells were used within three passages and were identified as endothelial by their characteristic morphology and presence of von Willebrand antigen. Endothelial cell viability was not affected by the 17β -estradiol concentrations used in the experiments.

Migration assays

Cell migration was assessed in 24-well chemotaxis chambers fitted with 5.0 μ m transwell membranes. HUVECs obtained from four different umbilical cords were used. Supernatants of TNF- α -stimulated and non-stimulated as well as 17β -estradiol pre-treated and non-treated endothelial cells were added to the lower wells and 5×10^5 BCECF-labelled monocyte U-937 cells in 250 μ l RPMI-1640 supplemented with 10% FCS were added to the upper wells. The transwell membranes were removed after 90 min of incubation at 37 $^{\circ}$ C, and the migrated cells were harvested by pipetting, washed with serum-free RPMI-1640 twice before adding 1.5 ml of lysis buffer (10% Triton X-100 in 10 mM Tris, pH 9.0) for 20 min. The lysis buffer was recovered and was read at 490 nm in a LS 50B luminescence spectrometer (Perkin-Elmer). Non-labelled U-937 cells served as negative control. All the experiments were performed in duplicate. Absolute fluorescence was determined with 5×10^5 labelled U-937 cells. The U-937 cells were labelled with BCECF-AM according to manufacturer's instructions. Briefly, 1×10^6 /ml U-937 cells were incubated for 20 min with 20 μ l of a 1:500 dilution in PBS of a 1 mM stock solution and they were suspended in 500 μ l of PBS before being used.

IL-8 and MCP-1 secretion

Twenty-four hours 17β -estradiol pre-treated and non-treated endothelial cells were extensively washed with HSS twice and then stimulated with 0.25 ng/ml of TNF- α and two different concentrations of 17β -estradiol (1×10^{-9} and 3.3×10^{-9} M) for 2 h at 37 $^{\circ}$ C in a 7% CO $_2$ humidified atmosphere. Afterwards the cell supernatant was collected, centrifuged at 3,000 rpm in an Eppendorf microfuge for 5 min, and kept at -20 $^{\circ}$ C until use. Extracellular immunoreactive IL-8 and MCP-1 was quantitated with a commercially available kit, following manufacturer's instructions. At the end of the procedure, the plates were read at 450 nm with a 570 nm correction in an EL-311 enzyme-linked immunosorbent assay

reader (Bio-Tek Instruments, Winooski, VT). Results expressed as ng/ml were analysed with Bio-Tek's KC-4 software.

RNA extraction

2×10^6 endothelial cells were incubated in 6 ml volume and 100 mm diameter glass Petri dishes coated with 1% gelatine in HSS. Similarly to the other experiments, some plates were pre-treated with 1×10^{-8} M 17β -estradiol for 48 hrs. Afterwards the plates were washed with HSS, and stimulated with 0.25 ng/ml of recombinant TNF- α and 1×10^{-9} M/ml of 17β -estradiol for 2 h at 37 °C in a 7% humidified atmosphere before obtaining the RNA. At the end of the incubation time, media were eliminated and the cells were washed with HSS before total RNA was extracted. TRIzol (800 μ l) were added to HSS-washed Petri dishes for 5 min at room temperature before collecting the cells with a cell scraper. Cell lysate was collected into cold 1.5 ml Eppendorf tubes and the rest of the procedure was done according to Gibco BRL instructions. RNA was resuspended in 22 μ l of ultra-pure water containing 0.02% (w/vol) of diethyl pyrocarbonate. Total RNA was quantified using a spectrophotometer at OD₂₆₀ and the purity was assessed by determining the OD₂₆₀/OD₂₈₀ ratio. All samples had ratios above 1.9. The quality of the extracted RNA was assessed by 2% agarose gel electrophoresis.

RT-PCR

Reverse transcription and PCR reactions were performed by a single step procedure using the Access RT-PCR system in a Touchdown, Hybaid Thermal Cycler (Perkin-Elmer) thermocycler. The final volume of the reaction was 50 μ l of a mixture containing: 1 μ g of sample RNA; 5 U of AMV reverse transcriptase; 5 U of TfdNA polymerase; 10 μ l of $5 \times$ AMV/Tfl reaction buffer; 25 mM magnesium sulphate; 10 mM of each of the four deoxynucleotides; and nuclease-free water. The reaction mixture was incubated at 48 °C for 45 min followed by one denaturation cycle at 94 °C for 2 min, cycling conditions (40 cycles) were 94 °C for 30 s, 60 °C for 1 min, 68 °C for 2 min, and finally 68 °C for 7 min. Ten microliters of each PCR reaction sample were migrated on 2% TBE agarose gels containing ethidium bromide and photographed. Semiquantitative analysis of the RT-PCR products was performed by densitometric analysis of the gels using Bio-Rad's G5-670 densitometer and the molecular analyst version 1.1 software. The oligonucleotide primers used for the detection of specific cDNA were: 5'-ATTTCTGCAGCTCTGTGTGAAGGTGC-3' upstream and 5'-TTGTGGATCCTGGCTAGCAGA-3' downstream, for interleukin-8, and 5'-CAAACCTGAAGCTCGCACTCTCGCC-3' upstream and 5'-ATTCTTGGGTTGTGGAGTGAGTGTTCA-3' downstream, for MCP-1. The primers used for the constitutively expressed 'housekeeping' gene β -actin were 5'-GTGGGGCGCCCCAGGCACCCA-3' upstream and 5'-CTCCTTAATGTACGCACGATTT-3' downstream. For α -estrogen receptor specific primers were 5'-AGGCTGCGCTTCGGC-3' upstream and 5'-ACGCATACTTCCCTTGTCAT-3' downstream, and for β -estrogen receptor (ER β) specific primers were 5'-TTCCCAGCAATGTCAC-TAACT-3' up-stream and 5'-CTCTTTGAACCTGGACCAGTA-3' downstream. The expected length of the PCR product was: IL-8, 749 bp; MCP-1,354 bp; β -actine, 548 bp; ER α , 410 bp and ER β , 258 bp. In order to evaluate the RT-PCR conditions, human uterine endometrium obtained from a biopsy specimen from a woman undergoing total hysterectomy due to myomatosis, was used as positive control.

Western blot

The presence of α -estrogen receptor was determined in the breast cancer MCF-7 cell line (known to express α E₂R and β E₂R) and in 1×10^6 HUVECs stimulated for 8 h with 17- β -estradiol (1×10^{-8} M). Total protein was obtained from stimulated cells lysed with lysis buffer containing 50 mM Tris, 120 mM NaCl, 0.5% NP-40, 100 μ M NaF, 200 mM NaV, 3 μ l.ml⁻¹ aprotinin, 10 μ g.ml⁻¹ leupeptin, and 0.58 mM phenyl methanesulfonyl fluoride; 100 μ g protein were loaded per lane and resolved by SDS-PAGE on 7.5% polyacrylamide gels. Proteins were transferred to nitrocellulose membranes and the membranes were blocked with a suspension of 5% fat-free milk powder in 20 mM Tris, 137 mM NaCl, 3 mM KCl and 0.1% Tween, pH 7.6. After 4 h incubation with HC20 antibody, the blots were washed thrice for 5 min each in NaCl/Tris/Tween, a biotinylated goat anti-rabbit Ig was added for 30 min, blots were washed thrice with NaCl/Tris/Tween, followed by a 30 min incubation with a streptavidin-peroxidase complex and washed thrice with NaCl/Tris/Tween. The peroxidase bound to the blot was detected using the Supersignal West Pico Chemiluminiscent Substrate.

Statistical analysis

Results were calculated as the mean \pm the standard deviation of the mean. Significance of experimental changes was assessed through Student's t-test. Migration assays were analyzed by ANOVA and the Tukey-HSD test using Statistica version 5 software.

Results

Effect of TNF- α in endothelial cells

The purity of the cultures was confirmed by uniform positive staining for von Willebrand factor. The viability of endothelial cells exposed to concentrations as high as 100 ng/ml of recombinant TNF- α was not altered, but we had previously established that there is a diminished [³H]-thymidine incorporation, meaning diminished cell proliferation, as the TNF- α concentration increases in the endothelial cell cultures [14].

Supernatants of endothelial cells attract monocytes

The supernatant of the endothelial cells attracted more U-937 cells than the medium alone, nevertheless, the stimulation of endothelial cells with 0.25 ng/ml of TNF- α for 2 h induced migration of significantly more cells than the supernatant of non-stimulated endothelial cells (Fig. 1).

Effect of 17 β -estradiol on monocyte attraction by endothelial cells

The migration of monocytes induced by the 24 h supernatant of the endothelial cells stimulated with 0.25 ng/ml of TNF- α for 2 h diminished when physiological (1×10^{-9} M) or physiologically high (3.3×10^{-9} M) doses of 17 β -estradiol were added to the cell culture; pre-treatment of HUVEC cultures with 1×10^{-8} M 17 β -estradiol did not increase the already diminished monocyte migration (Fig. 1).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

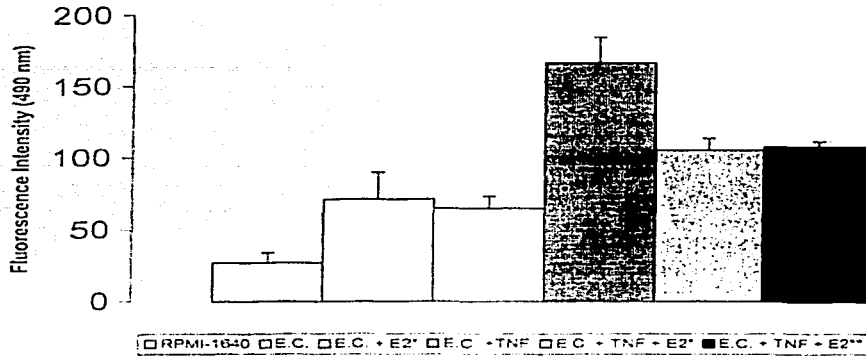


Fig. 1. U-937 migration assay results. The results represent the mean \pm standard deviation of the experiments performed in duplicate with four different endothelial cell supernatants non-stimulated and stimulated with 1×10^{-9} M* or 3.3×10^{-9} M** 17 β -estradiol, and 0.25 ng/ml of recombinant TNF- α . Using the post-ANOVA multiple comparison Tukey-HSD test the differences among the groups showed a $p < 0.0002$, although there was no statistical difference between both 17 β -estradiol concentrations.

Effect of 17 β -estradiol on IL-8 secretion

The maximum IL-8 (4.45 ng/ml) secretion induced by TNF- α showed a 54% and 51% diminution in the presence of 1×10^{-9} M and 3.3×10^{-9} M doses of 17 β -estradiol in the cell cultures. To confirm the inhibitory role of 17 β -estradiol we repeated the experiments with endothelial cells pre-treated with 1×10^{-8} M 17 β -estradiol for 24 h before stimulation with TNF- α . The results showed a 20% reduction

Table 1
Interleukin-8 and MCP-1 concentration* in culture supernatant of HUVEC cells non-exposed and previously exposed to a high dose (1×10^{-8} M) of 17 β -estradiol (E₂)

	Non-exposed to E ₂		Previously exposed to E ₂	
	IL-8	MCP-1	IL-8	MCP-1
Basal	2.42 \pm 0.39	2.18 \pm 0.36	2.45 \pm 0.81	1.56 \pm 0.42
+ 1×10^{-9} M E ₂	2.16 \pm 0.18	1.90 \pm 0.25	2.50 \pm 0.47	N.D.
+ TNF- α	4.45 ^a \pm 0.65	2.83 ^c \pm 0.55	3.54 ^d \pm 0.52	1.96 ^e \pm 0.21
+ 1×10^{-9} M E ₂	2.05 ^b \pm 0.62	2.10 ^d \pm 0.26	2.67 ^b \pm 0.60	1.00 ^d \pm 0.30
+ 3.3×10^{-9} M E ₂	2.18 ^b \pm 0.36	2.28 ^d \pm 0.54	2.52 ^b \pm 0.43	1.14 ^d \pm 0.19
+ 1×10^{-8} M E ₂	2.45 \pm 0.81	2.16 \pm 0.40	2.54 \pm 0.47	1.27 \pm 0.23

Results are expressed as the mean concentration in ng/ml \pm standard deviation of the mean. N.D. = not determined. a vs. b = $p < 0.01$, c vs. d = $p < 0.05$.

* Chemokine concentration is in ng/ml. Pre-exposure with 1×10^{-8} M 17 β -estradiol was carried out for 24 h. All the experiments (n = 10), independently from previous or not exposure to 17 β -estradiol, were incubated for 2 h with 0.25 ng/ml of recombinant TNF- α and different concentrations of 17 β -estradiol.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

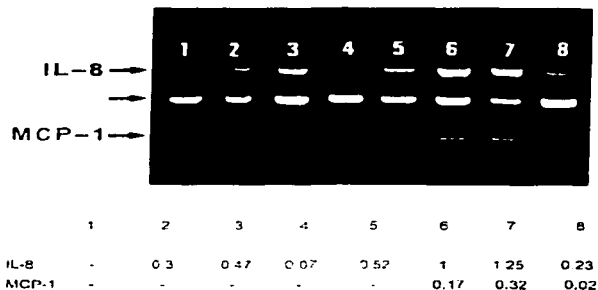


Fig. 2. mRNA transcripts of cultured human endothelial cells without 17β -estradiol and TNF- α (lanes 1 and 5), 0.25 ng/ml of TNF- α (lanes 2 and 6), 1×10^{-9} M pg/ml of 17β -estradiol (lanes 3 and 7) and 17β -estradiol + TNF- α (lanes 4 and 8). Cells used to obtain mRNA obtained in lanes 1 to 4 were not pre-treated with the high dose (1×10^{-8} M) of 17β -estradiol, whereas those from lanes 5 to 8 were. The middle arrow in the left margin of the photograph corresponds to β -actin. The numbers in the inset, expressed as an index, represent the semiquantitative value of the chemokine in relation to β -actin.

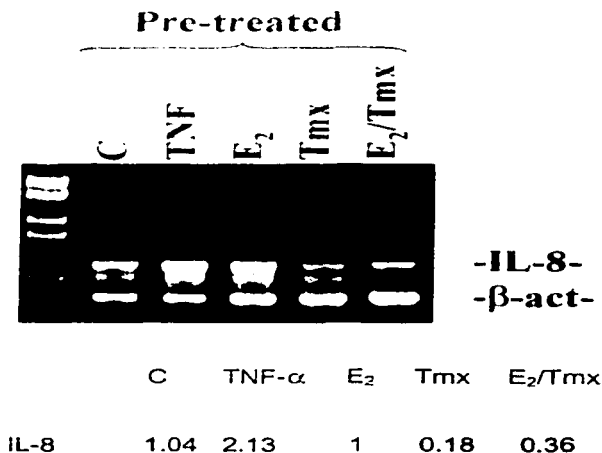


Fig. 3. mRNA of IL-8 from 1×10^{-8} M 17β -estradiol for 48 h pre-treated endothelial cells. The first lane on the photograph corresponds to molecular weight markers. C = non-stimulated HUVECs; the cell cultures were stimulated with TNF- α (0.25 ng/ml), E₂ (1×10^{-9} M), Tmx (1×10^{-9} M tamoxifen), E₂ + Tmx. The numbers in the inset, expressed as an index, represent the semiquantitative value of the chemokine in relation to β -actin.

in IL-8 secretion compared to non pre-treated cells (4.45 vs. 3.54 ng/ml). The addition of 1×10^{-9} M or 3.3×10^{-9} M 17β -estradiol to these pre-treated cell cultures induced a much smaller inhibition (24% and 29%, respectively) (Table 1).

Effect of 17β -estradiol on MCP-1 secretion

Estradiol also inhibited the secretion of MCP-1 by TNF- α stimulated HUVECs. The physiological dose of 17β -estradiol inhibited by 25% MCP-1 secretion, a percentage maintained with the 3.3×10^{-9} M (19%) and the 1×10^{-8} M (23%) dose. When MCP-1 secretion was determined in 17β -estradiol pre-treated HUVECs, the TNF- α induced MCP-1 secretion showed a 49% diminution in cultures exposed to the physiological dose of 17β -estradiol (1 vs. 1.96 ng/ml), but compared with the not 17β -estradiol pre-treated culture the inhibition reached a 65% value (2.83 vs. 1 ng/ml)(Table 1).

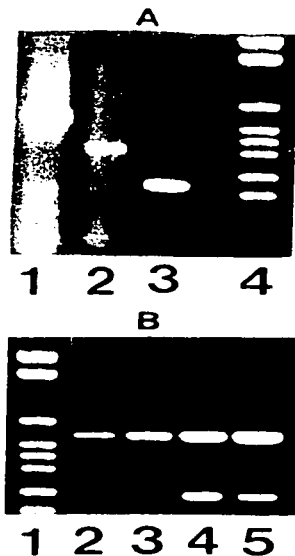


Fig. 4. A) RT-PCR of mRNA obtained from human uterine endometrium (HUE) β -actin (lane 1), estrogen receptor α (lane 2), estrogen receptor β (lane 3) and molecular weight marker VI (lane 4). B) RT-PCR of mRNA obtained from HUVECs and HUVEs. The number in brackets shows the index value that corresponds to the semi-quantitative value of the βE_2R in relation with β -actin. Lane 1, molecular weight marker VI; lane 2, non E_2 -stimulated HUVECs (0); lane 3, E_2 -stimulated HUVECs (0.13); lane 4, E_2 -stimulated HUVEs (0.69); lane 5, non E_2 -stimulated HUVEs (0.42).

Chemokine mRNA production by endothelial cells

In order to determine the possible mechanism of chemokine secretion, the expression of IL-8 and MCP-1 was assessed by RT-PCR; mRNA of both chemokines was detected in 17 β -estradiol pre-treated HUVECs but it was interesting to observe that, in not pre-treated cells, MCP-1 mRNA could not be detected and that the semiquantitative expression of IL-8 mRNA was lower in relation to the pre-treated HUVECs. It was also interesting to observe that although 17 β -estradiol and TNF- α were good inducers of both mRNAs there was a strong inhibition in the expression of both mRNAs, especially the IL-8 messenger, in 17 β -estradiol pre-treated HUVECs (Fig. 2).

Effect of tamoxifen on the expression of IL-8 mRNA

Because our previous results (Fig. 2) had shown that there was an enhanced quantitative expression of IL-8 in 17 β -estradiol pre-treated/TNF- α stimulated HUVECs, we decided to evaluate whether the effects induced by 17 β -estradiol reverted with tamoxifen. The results showed that similar to the observation made with TNF- α and 17 β -estradiol, tamoxifen + 17 β -estradiol inhibited the expression of the IL-8 messenger (Fig. 3).

Expression of α - or β -estrogen receptor in HUVECs

To evaluate whether the effects induced by 17 β -estradiol were mediated by its receptors, we analyzed the expression of α E₂R and β E₂R mRNA. Both mRNAs were expressed in control human uterus (Fig. 4-A). nevertheless, under our experimental conditions, α E₂R mRNA was not observed in non-pretreated and pre-treated HUVECs (Fig. 4-B). On the other side, it is worth while mentioning that although β -estrogen receptor was weakly observed in 1×10^{-8} M 17 β -estradiol pre-treated HUVECs it was not present in non-pretreated cells (Fig. 4-B).

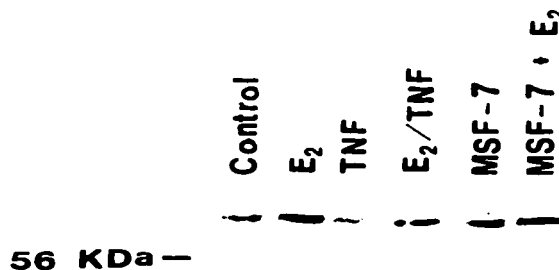


Fig. 5. Western blot analysis of α -estrogen receptor in HUVECs non-stimulated (control), E₂-stimulated (3.3×10^{-9} M), TNF- α stimulated (0.25 ng/ml). Positive control experiments were performed with the MCF-7 cell line non-stimulated and 3.3×10^{-9} M estrogen-stimulated. The 56 kDa protein is pyruvate-kinase.

To determine if α -estrogen receptor was really absent in stimulated HUVECs a Western blot analysis in TNF- α stimulated cell cultures was done. The results showed the presence of the α -receptor although in small quantities (Fig. 5). The qualitative analysis of the α E₂R protein in HUVECs and control MCF-7 cells showed that E₂ alone or in combination with TNF- α , enhanced the secretion of the protein in comparison to non-stimulated HUVECs (Fig. 5).

Discussion

Atherosclerosis is tightly related to inflammation and fibroproliferative responses after insults to the endothelium [1]. To induce a proinflammatory status we stimulated HUVECs with TNF- α because, it is a fast and better inducer of chemokines secretion as compared to interleukin-1 β or lipopolysaccharide [15]. Besides, it enhances adherence of monocytes to the endothelium and promotes migration of inflammatory cells into the intercellular matrix [16]. Although vascular endothelium from different anatomical compartments possess different properties *in vivo* [17], some responses are identical in human arterial and venous endothelial cells [18].

The first results of this study, using migration assays, corroborated that TNF- α enhances the secretion by endothelial cells of MCP-1 and IL-8, chemoattractant molecules produced by macrophages and endothelial cells at inflammation sites, as suggested by Lukacs et al. [13]. Our data show that the supernatants of TNF- α stimulated HUVECs cultures attracted more U-937 cells than the non-stimulated culture supernatants.

Estrogens have been consistently regarded as atheroprotective, although the results of recent studies by Hully et al. [5] and Simon et al. [19] have raised some doubts as to the real preventive effects of estrogen and estrogen replacement therapy in postmenopausal women. Nevertheless, it is clear that estrogens have gene and transcription regulatory effects; therefore, we decided to determine if 17 β -estradiol, at doses equivalent or higher to those detected in non-menopausal and HRT-treated women [20,21], had a regulatory effect upon the secretion of both chemoattractant molecules. Our results confirmed that the supernatant obtained from TNF- α stimulated HUVECs cultured with physiological doses of estradiol had a reduced migration activity for U-937 cells. Further experiments demonstrated that estrogen, at physiological and physiologically high concentrations, diminished the secretion of IL-8 and MCP-1, in accordance to the results of Yamada et al. [22] and those of Caulin-Glaser et al. [23]. An interesting observation was that the addition of physiological doses of estradiol to 17 β -estradiol pre-treated cultures did not diminish further the secretion of IL-8, which suggests that the inhibitory effect of estradiol upon this chemokine has a limit. Our results indicate that estradiol has an inhibitory activity upon IL-8 and MCP-1, especially IL-8, chemokines related to monocyte and neutrophil trafficking in the chronic inflammatory process [24]. They also show that to achieve these effects estradiol has to be present in a chronic manner, that is, similarly as in women in reproductive stage, thus excluding its beneficial effects in short-term estrogen therapies.

To assess the effect of estrogen in endothelial cells we evaluated the presence of estrogen receptors in HUVECs and found that both receptors, which can be induced by 17 β -estradiol pre-treatment [23], were present although in small quantities. It is known that the signal in the RT-PCR assays can be low because the kinetics of expression do not allow for appropriate induction [25] or because the expression of ER mRNA fluctuates [26]. Nevertheless, it was interesting to observe that secretion of both chemokines

diminished in the presence of 17 β -estradiol despite the fact that cell secretion events are reinforced when estrogen binds its own receptor [27].

The mechanism involved in the multiple estrogen effects is usually related to the presence of an estrogen receptor. Estrogen regulates the expression of target genes by binding to its receptor, which in turn dimerizes, binds to genes containing consensus regulatory sequences, and induces or represses the transcription of the selected genes [28] through interactions with ubiquitous transcription factors [29]. We initially thought that the reduced secretion of IL-8 and MCP-1 was, similarly to IL-6 [30], secondary to an inhibitory effect on the transcription mechanism of both chemokine genes, as has been observed for MCP-1 in murine peritoneal macrophages [31] and HUVEC-expressed adhesion molecules [32], but when we evaluated the IL-8 and MCP-1 mRNA content we found that the genes were not inhibited but actually their expression was enhanced. A recent paper by Koh et al. [33] shows that hormone replacement therapy diminishes significantly the plasma levels of MCP-1. We do not know which is the mechanism responsible for the low secretion of IL-8 and MCP-1 by endothelial cells, but there is evidence that demonstrates that the exocytosis-related VAMP-2 SNARE proteins can be downregulated by 17 β -estradiol [34]. Alternatively, non-genomic estrogen mechanisms, such as different intracellular oxido-reduction conditions [35], could be responsible. Tamoxifen experiment results do not shed light on the possible mechanism involved in the inhibitory effect of 17 β -estradiol. Tamoxifen is not only an inhibitor of estradiol receptors but an important anti-inflammatory molecule in itself [36] and an inhibitor of the expression of transcription proteins [37].

In summary our results suggest that estradiol inhibits the secretion but not the synthesis of certain chemokines in endothelial cells, thus making the endothelium less responsive to the inflammatory microenvironment that arises in damaged endothelial regions.

References

- [1] Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993;362:801–9.
- [2] Kannel WB, Hjortland MC, McNamara PM, Gordon T. Menopause and cardiovascular disease: the Framingham study. *Annals of Internal Medicine* 1976;85:447–52.
- [3] Gossland IF, Wynn V, Crook D, Miller NE. Sex, plasma lipoproteins, and atherosclerosis: prevailing assumptions and outstanding questions. *American Heart Journal* 1987;114:1467–503.
- [4] Grodstein F, Stampfer M. The epidemiology of coronary heart disease and estrogen replacement in postmenopausal women. *Progress in Cardiovascular Diseases* 1995;38:199–210.
- [5] Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. *Journal of the American Medical Association* 1998;280:605–13.
- [6] Samaan SA, Crawford MH. Estrogen and cardiovascular function after menopause. *Journal of the American College of Cardiology* 1995;26:1403–10.
- [7] Slater EP, Hesse H, Beato M. Regulation of transcription by steroid hormones. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1994;733:103–12.
- [8] Nabulsi AA, Folsom AR, White A, Patsch W, Heiss G, et al. Association of hormone-replacement therapy with various cardiovascular risk factors in postmenopausal women. The Atherosclerosis Risk in Communities Study Investigators. *The New England Journal of Medicine* 1993;328:1069–75.
- [9] Grady D, Rubin SM, Petitti DB, Fox CS, Black D, et al. Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. *Annals of Internal Medicine* 1992;117:1016–37.
- [10] Nathan L, Chaudhuri G. Antioxidant and prooxidant actions of estrogens: potential physiological and clinical implications. *Seminars in Reproductive Endocrinology* 1998;16:309–14.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- [11] Brown Z, Gerritsen ME, Carley WW, Strieter RM, Kunkel SL, Westwick J. Chemokine gene expression and secretion by cytokine-activated human microvascular endothelial cells. *American Journal of Pathology* 1994;145:913–21.
- [12] Baggiolini M, Loetscher P. Chemokines in inflammation and immunity. *Immunology Today* 2000;21:418–20.
- [13] Lukacs NW, Strieter RM, Elnor V, Evanoff HL, Burdick MD, Kunkel SL. Production of chemokines, interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1, during monocyte: endothelial cell interactions. *Blood* 1995;86:2767–73.
- [14] Lopez-Marure R, Ventura JL, Sanchez L, Montañón LF, Zentella A. Ceramide mimics tumour necrosis factor- α in the induction of cell cycle arrest in endothelial cells. Induction of the tumour suppressor p53 with decrease in retinoblastoma/protein levels. *European Journal of Biochemistry* 2000;267:4325–33.
- [15] Dixit VM, Green S, Sarma V, Holzman LB, Wolf FW, et al. Tumor necrosis factor - alpha induction of novel gene products in human endothelial cells including a macrophage-specific chemotaxin. *The Journal of Biological Chemistry* 1990; 265:2973–8.
- [16] Tracey KJ, Cerami A. Tumor necrosis factor: a pleiotropic cytokine and therapeutic target. *Annual Review of Medicine* 1994;45:491–503.
- [17] Page C, Rose M, Yacoub M, Pigott R. Antigenic heterogeneity of vascular endothelium. *American Journal of Pathology* 1992;141:673–83.
- [18] Amberger A, Maczek C, Jurgens G, Michaelis D, Schett G, et al. Co-expression of ICAM-1, VCAM-1, ELAM-1 and Hsp60 in human arterial and venous endothelial cells in response to cytokines and oxidized low-density lipoproteins. *Cell Stress & Chaperones* 1997;2:94–103.
- [19] Simon JA, Hsia J, Cauley JA, Richards C, Harris F, et al. Postmenopausal hormone therapy and risk of stroke. The heart and estrogen-progestin replacement study (HERS). *Circulation* 2001;103:638–42.
- [20] Johnson SR. Menopause and hormone replacement therapy. *The Medical Clinics of North America* 1998;82:297–320.
- [21] Wiegatz I, Fink T, Rohr UD, Lang E, Leukel P, Kuhl H. Cross-over comparison of the pharmacokinetics of estradiol during hormone replacement therapy with estradiol valerate or micronized estradiol. *Zentralblatt für Gynäkologie* 2001;123:505–12.
- [22] Yamada K, Hayashi T, Kuzuya M, Naito M, Asai K, Iguchi A. Physiological concentration of 17 beta-estradiol inhibits chemotaxis of human monocytes in response to monocyte chemoattractant protein 1. *Artery* 1996;22:24–35.
- [23] Caulin-Glaser T, Watson CA, Pardi R, Bender JR. Effects of 17beta-estradiol on cytokine-induced endothelial cell adhesion molecule expression. *The Journal of Clinical Investigation* 1996;98:36–42.
- [24] Johnston B, Burns AR, Suematsu M, Issekutz TB, Woodman RC, Kubes P. Chronic inflammation upregulates chemokine receptors and induces neutrophil migration to monocyte chemoattractant protein-1. *The Journal of Clinical Investigation* 1999;103:1269–76.
- [25] Bergman MD, Schachter BS, Karelus K, Combatsiaris EP, Garcia T, Nelson JF. Up-regulation of the uterine estrogen receptor and its messenger ribonucleic acid during the mouse estrous cycle: the role of estradiol. *Endocrinology* 1992;130:1923–30.
- [26] Fusani L, Van't Hof T, Hutchison JB, Gahr M. Seasonal expression of androgen receptors, estrogen receptors, and aromatase in the canary brain in relation to circulating androgens and estrogens. *Journal of Neurobiology* 2000;43: 254–68.
- [27] Molina J, Masso F, Paez A, Mendez C, Rodríguez E, et al. Differential effect of estradiol on antibody secretion of murine hybridomas. *Hybridoma* 1999;18:377–83.
- [28] Kumar V, Chambon P. The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell* 1988;55:145–56.
- [29] Simoncini T, Genazzani AR, De Caterina R. Towards a molecular understanding of the atheroprotective effects of estrogens: a review of estrogen effects on endothelial activation. *Italian Heart Journal* 2000;1:104–7.
- [30] Ray A, Prefontaine KE, Ray P. Down-modulation of interleukin-6 gene expression by 17 beta-estradiol in the absence of high affinity DNA binding by the estrogen receptor. *The Journal of Biological Chemistry* 1994;269:12940–6.
- [31] Frazier-Jessen MR, Kovacs EJ. Estrogen modulation of JE/monocyte chemoattractant protein-1 mRNA expression in murine macrophages. *Journal of Immunology* 1995;154:1838–45.
- [32] Nakai K, Itoh C, Hotta K, Itoh T, Yoshizumi M, Hiramori K. Estradiol-17 beta regulates the induction of VCAM-1 mRNA expression by interleukin-1 beta in human umbilical vein endothelial cells. *Life Sciences* 1994;54:L221–7.
- [33] Koh KK, Son JW, Ahn JY, Lee SK, Hwang HY, Kim DS, Jin DK, Ahn TH, Shin EK. Effect of hormone replacement therapy on nitric oxide bioactivity and monocyte chemoattractant protein-1 levels. *International Journal of Cardiology* 2001;81:43–50.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- [34] Majo G, Lorenzo MJ, Blasi J, Aguado F. Exocytotic protein components in rat pituitary gland after long-term estrogen administration. *The Journal of Endocrinology* 1999;161:323–31.
- [35] Janssen-Heininger YM, Poynter ME, Baeuerle PA. Recent advances towards understanding redox mechanisms in the activation of nuclear factor kappa B. *Journal of Free Radicals in Biology and Medicine* 2000;28:1317–27.
- [36] Cushman M, Costantino JP, Tracy RP, Song K, Buckley L, et al. Tamoxifen and cardiac risk factors in healthy women: suggestion of an anti-inflammatory effect. *Arteriosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology* 2001;21:255–61.
- [37] Hsu SM, Chen YC, Jiang MC. 17 beta-estradiol inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced nuclear factor-kappa B activation by increasing nuclear factor-kappa B p105 level in MCF-7 breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 2000;279:47–52.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN