

Tesis Doctoral

Activación de vías involucradas en la apoptosis y proliferación en huvec. Agonistas relacionados con hormonas determinantes del sexo. Efecto sobre la liberación del factor Von Willebrand y Adamts13

Powazniak, Yanina

2008

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Powazniak, Yanina. (2008). Activación de vías involucradas en la apoptosis y proliferación en huvec. Agonistas relacionados con hormonas determinantes del sexo. Efecto sobre la liberación del factor Von Willebrand y Adamts13. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Powazniak, Yanina. "Activación de vías involucradas en la apoptosis y proliferación en huvec. Agonistas relacionados con hormonas determinantes del sexo. Efecto sobre la liberación del factor Von Willebrand y Adamts13". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2008.



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES  
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales  
Departamento de Química Biológica

Tesis presentada para optar al título de  
Doctor de la Universidad de Buenos Aires  
en el área de Química Biológica

**Yanina Powazniak**

Tema de Investigación: **Activación de vías involucradas en la apoptosis y proliferación en HUVEC. Agonistas relacionados con hormonas determinantes del sexo. Efecto sobre la liberación del factor von Willebrand y ADAMTS 13.**

Director de Tesis: **Dra. Maria A. Lazzari**, Departamento de Hemostasia y Trombosis, Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano R. Castex", Academia Nacional de Medicina.

Consejero de Estudios: **Dra. Alcira Nesse**, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA

Lugar de trabajo: División Química. Departamento de Hemostasia y Trombosis. Instituto de Investigaciones Hematológicas "Mariano R. Castex". Academia Nacional de Medicina.

**Buenos Aires, 2008.**

# **Activación de vías involucradas en la apoptosis y proliferación en HUVEC. Agonistas relacionados con hormonas determinantes del sexo. Efecto sobre la liberación del factor von Willebrand y ADAMTS 13.**

## **Resumen**

El VWF es una glicoproteína adhesiva, sintetizada en las CE y megacariocitos. Se sintetiza en forma monomérica, luego se organiza en dímeros y se multimeriza. El VWF media la adhesión de plaquetas al subendotelio vascular dañado y el transporte del factor FVIII.

La ADAMTS13, proteasa que cliva al VWF, pertenece a la familia de metaloproteasas ADAMTS, llamadas así por la combinación característica de una desintegrina y una metaloproteasa con motivos trombospondina tipo 1. La ADAMTS13 es sintetizada en el hígado. Además, se ha demostrado que se sintetiza y almacena en las CE, y que tiene actividad en los lisados celulares en condiciones estáticas y de flujo. La ADAMTS13 está involucrada en el proceso fisiológico de clivar a los multímeros extragrandes altamente trombogénicos, que cuando están presentes en el plasma o en la superficie de las CE llevan a una agregación intravascular y a la formación de un trombo plaquetario. Hemos observado que los niveles de ADAMTS13 disminuyen, mientras que los del VWF aumentan a medida que progresa el embarazo. En 1972, varios autores han descrito el aumento del  $17\beta$  estradiol. También se ha observado que la administración de estradiol a las CE en dosis no fisiológicas produce un aumento de VWF. Hay antecedentes acerca de la acción de las hormonas determinantes del sexo en la muerte o proliferación celular en distintas líneas celulares y cultivos primarios. Se demostró la existencia de un factor embrionario liberador de histamina y una alta expresión de receptores para histamina durante la gestación en humanos. Además, se observó un aumento en los niveles de histamina en las últimas semanas de gestación en modelos de ratas y hamsters dorados.

Los objetivos de esta tesis fueron: 1- analizar si los cambios hormonales que inducen o inhiben la síntesis o liberación de VWF y ADAMTS13 tienen influencia en la muerte o proliferación celular y 2- qué modificaciones producen las hormonas y concentraciones altas de histamina en la producción de VWF y ADAMTS13.

Los experimentos se realizaron en cultivos de HUVEC. Se analizaron los efectos de las hormonas, a distintas dosis, en la proliferación o apoptosis, mediante el uso de técnicas de citometría de flujo y ensayo por colorimetría (MTS). Para evaluar el mecanismo de señalización se analizó la fosforilación de MAPK utilizando la técnica de SDS-PAGE e inmunotransferencia. Se observó que el efecto proliferativo del estradiol

en HUVEC, ocurre a través de un aumento de la fosforilación de ERK2, inducido por el estímulo de la privación del suero. La progesterona y testosterona en dosis suprafisiológicas promovieron la apoptosis de HUVEC vía activación de p38 y JNK.

Además se analizaron los niveles de mRNA (por Real Time PCR) y proteína intracelular y liberada (por SDS-PAGE e inmunotransferencia y ELISA) de VWF y ADAMTS13, en respuesta a los distintos tratamientos hormonales y con histamina. El estradiol, la progesterona y testosterona, no produjeron ningún cambio en la liberación de VWF en las HUVEC, sin embargo combinadas con histamina, agonista de la liberación de VWF, produjeron inhibición de la actividad de la histamina. Por otra parte el estradiol, la progesterona y la testosterona no produjeron cambios significativos en la liberación de ADAMTS13, sin embargo el tratamiento con histamina indujo una disminución en los niveles de ADAMTS13, que fue revertida en la combinación con estradiol y progesterona. Finalmente, el estradiol, produjo un aumento en los niveles de mRNA de VWF y ADAMTS13. En la síntesis de ambos mRNA, el estradiol y la histamina presentan un efecto antagónico y la combinación de la progesterona y la histamina presentarían un efecto sinérgico.

**Palabras claves:** VWF, ADAMTS13, estradiol, progesterona, testosterona, histamina, proliferación, apoptosis.

# **Activation of pathways involved in HUVEC apoptosis and proliferation. Sex hormones agonist related. Effect of hormones on von Willebrand factor and ADAMTS 13 release.**

## **Summary**

VWF is a multimeric protein produced by endothelial cells and megakaryocytes. It is synthesized into a monomeric form, arranged into dimers and multimers. VWF promote the platelet adhesion to the vascular subendothelium, also plays critical role in blood coagulation as it is the carrier protein for FVIII. ADAMTS13, the 13<sup>th</sup> member of the ADAMTS family of metalloprotease characterized by the combination of A disintegrin-like metalloprotease with Thrombospondin type 1 motif, is the main physiological modulator of the size of VWF in plasma. ADAMTS13 is synthesized in liver cells. Recently it has been shown that ADAMTS13 it is synthesized and stored in the EC, and it has enzymatic activity using both stationary and flow assays. ADAMTS13 impairs the physiological process of cleavage of the largest, highly thrombogenic multimers of VWF which, when present in plasma and/or on the endothelial cell surface, lead to massive intravascular aggregation and platelet thrombus formation in the terminal circulation. We have observed that during pregnancy VWF levels increased and ADAMTS13 levels decreased. Since 1972, several authors have described the increase of 17 $\beta$  estradiol levels. Also, it has been observed that the treatment of EC with estradiol induced an increase in VWF, in non physiological dose. There are several reports about the sexual hormones action in different cell lines and primary cultures, either in cell death or cell proliferation. It was shown the existence of an embryonic histamine-releasing factor and a high expression of receptors for histamine during gestation in humans. In addition, there was an increase of histamine levels in the final weeks of gestation in models of golden hamsters and rats.

The thesis objectives were: 1- to analyze if the hormonal changes that induce or inhibit the synthesis or release of VWF and ADAMTS13 have influence in the cell death or cell proliferation and 2- what changes are produced with hormone and high histamine levels in the production of VWF and ADAMTS13.

The experiments were carried out in HUVEC cultures. The effects of different doses of hormones on the proliferation or apoptosis were analyzed by flow cytometry techniques and testing by colorimetry (MTS). The MAPK phosphorylation was tested by SDS-Page and immunoblotting to check the signal mechanism. It was noted that the proliferative effect of estradiol on HUVEC, occurred through an increase in phosphorylation of ERK2, induced by the deprivation of serum. Progesterone and testosterone promoted

apoptosis, via activation of p38 and JNK, in supraphysiological doses. In addition, VWF and ADAMTS13 were analyzed by: 1- levels of mRNA (Real Time PCR) and 2- levels of intracellular VWF and ADAMTS13 and their release induced by hormonal and histamine treatments (by SDS-Page, immunoblotting and ELISA). Estradiol, progesterone and testosterone did not produce any change in the VWF and ADAMTS13 released from HUVEC. However, when the hormones were combined with histamine (agonist for VWF release), they induced the inhibition of the histamine effect. On the other hand, the treatment with histamine produced a decrease in ADAMTS13 levels, which was reversed by the combination of histamine with estradiol and progesterone. Finally, estradiol increased mRNA levels of VWF and ADAMTS13. Estradiol and histamine had an opposite effect in the synthesis of both mRNA. The combination of progesterone and histamine present a synergistic effect.

**Keywords:** VWF, ADAMTS13, estradiol, progesterone, testosterone, histamine, proliferation, apoptosis.

## **Agradecimientos**

A mi directora de Tesis Dra. María Ángela Lazzari por su importante apoyo.

A mi Jefa de División, Dra. Ana C. Kempfer, por haberme ayudado a crecer y por enseñarme que la recompensa más valiosa es la satisfacción del trabajo bien realizado.

A mi compañero de vida, Gastón, por su apoyo incondicional, por compartir conmigo su sabiduría y fortaleza, y por su enorme paciencia en cada etapa de esta travesía.

A mis padres por su generosidad y su amor por entregarme la posibilidad de estudiar y por haberme apoyado en cada objetivo.

A mi hermano Alejandro, que siempre creyó en mí, y con el cual compartimos momentos maravillosos.

A mis amigos Paula y Roberto, por su cariño y lealtad a toda prueba.

A mis compañeros y amigos de laboratorio, Silvana, Catalina, María de la Paz, Cristina, Leticia, María Marta y Julio quienes pasaron a ser parte de mi familia durante estos años.

A la Bioquímica María P Domínguez y el Lic. Julio C Calderazzo por su ayuda y colaboración, la cual fue indispensable en el desarrollo de este trabajo.

Al Dr. Armando L Karara por haberme permitido entrar en este mundo maravilloso de la ciencia y ayudarme en mis primeros pasos.

A toda la gente del Laboratorio de Inmunología Oncológica y Citometría de Flujo por su ayuda y colaboración.

## Tabla de Contenido

	Página
Abreviaturas	10
Introducción	12
1. Factor von Willebrand (VWF)	12
1.1. Síntesis y estructura	12
1.2. Función	14
1.3. Clasificación de la enfermedad	14
2. ADAMTS13	15
2.1. Síntesis y estructura	15
2.2. Función y enfermedades relacionadas con su deficiencia	16
3. Endotelio	19
3.1. Función endotelial normal	19
3.2. Niveles de alteración endotelial	19
4. Histamina	20
5. Estrógenos y andrógenos	21
5.1. Relación con proteínas endoteliales	23
5.2. Relación con proliferación y apoptosis	26
Objetivos Generales	30
Objetivos Específicos	31
Actividades y Metodologías	32
1. Células endoteliales	32
2. Población, obtención de muestras	32
3. Tratamiento de las HUVEC	32
4. Evaluación de sobrevida celular	33
4.1 Método	33
5. Medición de apoptosis	33
5.1 Método	33
6. Evaluación de la fosforilación en tirosina de las MAPK	34
6.1 SDS-PAGE. Cuantificación relativa de proteínas	34
6.1.1 Materiales	34
6.1.2 Soluciones tampón	34
6.1.3 Preparación de las muestras	35
6.1.4 Electroforesis en SDS-PAGE	35



6.1.5 Inmunotransferencia	35
6.1.6 Anticuerpos utilizados	35
7. Medición de la concentración de VWF:Ag liberado por las HUVEC	36
7.1 ELISA	36
7.1.1 Anticuerpos	36
7.1.2 Soluciones tampón	36
7.1.3 Método	36
8. Identificación y cuantificación relativa de la ADAMTS13 liberada por as HUVEC	37
9. Identificación y cuantificación relativa de VWF y ADAMTS13 intracelular	37
10. Medición de niveles de mRNA de VWF y ADAMTS13 utilizando la técnica de Real Time PCR	37
10.1 Aislamiento de RNA	37
10.2 Retrotranscripción	38
10.2.1 Primers	38
10.2.2 Preparación de la MIX	38
10.2.3 Adición del templado y primers en la reacción de MIX	38
10.2.4 Programación para transcripción reversa	38
10.3 Real Time PCR	39
10.3.1 Programación del instrumental de LightCycler	39
10.3.2 Primers	39
10.3.3 Preparación de la Mix de PCR	39
11. Análisis estadístico	39
Resultados	41
1.1. Evaluación de sobrevivida celular	41
1.2. Evaluación de apoptosis	42
1.3. Evaluación de fosforilación MAPK	43
1.4. Resumen: Evaluación de un posible mecanismo de acción de las hormonas determinantes del sexo sobre las vías de proliferación y apoptosis en HUVEC.	47
2.1. Evaluación de la liberación del VWF y ADAMTS13 al medio de cultivo de HUVEC. Evaluación intracelular de VWF y ADAMTS13	47
2.2. Evaluación de síntesis mRNA VWF y ADAMTS13	51
2.3. Resumen: Efecto de las hormonas determinantes del género y de la histamina en la producción de VWF y ADAMTS13 en HUVEC	55
Discusión	
1. Rol de los estrógenos y andrógenos en la proliferación y apoptosis de las células endoteliales.	56
1.1. Estradiol y proliferación en HUVEC vía fosforilación ERK2	56
1.2. Progesterona y apoptosis en HUVEC, vía fosforilación p38 y JNK	56
1.3. Testosterona y apoptosis en HUVEC, vía fosforilación p38 y JNK	58
2. Rol de los estrógenos y andrógenos en la producción y liberación de	

VWF y ADAMTS13 en las células endoteliales. Su relación con histamina	58
2.1. Regulación producida por estradiol del sistema VWF/ADAMTS13	60
2.1.1 Inhibición producida por estradiol en la respuesta de histamina	60
2.2. Sinergismo en la regulación de VWF y ADAMTS13 por la combinación de progesterona e histamina.	60
2.3. Inhibición en la liberación de VWF y ADAMTS13 producida por la combinación de testosterona e histamina.	61
3. Implicancias clínicas	61
Conclusiones	63
Material adicional (Tablas)	64
Bibliografía	73

## Abreviaturas

ADAMTS13: desintegrina y metaloproteasa con motivos trombospondina 1, miembro 13 de la familia ADAMTS

C: control

CE: células endoteliales

Ci: cimetidina

Cl: clobenpropit

Cp: números de ciclos del umbral

DNA: ácido desoxirribonucleico

cDNA: ácido desoxirribonucleico complementario

EGF: factor de crecimiento endotelial

EGFR: receptor del EGF

E2: 17 $\beta$  estradiol

ER: receptor para estradiol

FVIII: factor VIII

F: flutamida

Fu: fulvestrant

GP: glicoproteína

H: histamina

HUVEC: células endoteliales de vena umbilical humana

I: inhibidores de histamina

IP: yoduro de propidio

IL 6: interleuquina 6

K: ketotifeno

KD: kilodalton

mRNA: ácido ribonucleico mensajero

PNE: plasma normal de embarazada

PNH: plasma normal de hombre

PNM: plasma normal de mujer

P: progesterona

PTT: púrpura trombocitopénica trombótica

RE: retículo endoplasmático

RNA: ácido ribonucleico

SFB: suero fetal bovino

T: testosterona

TA: temperatura ambiente

TNF $\alpha$ : factor de necrosis tumoral  $\alpha$

VWF: factor von Willebrand

VWFpp: propéptido VWF

VWD: enfermedad de von Willebrand

WPB: Cuerpos de Weibel Palade

## Introducción

### 1. VWF

#### 1.1 Síntesis y estructura

El VWF es una glicoproteína adhesiva multimérica que resulta del ensamble de una subunidad monomérica de 250-270 KD que posteriormente se multimeriza (multímeros pequeños, intermedios, grandes y extragrandes) conteniendo más de 100 subunidades (Figura 1). El VWF es la más grande de las proteínas circulantes con un peso molecular que excede los 10000 kD. Está presente en los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas, en los cuerpos de WPB de las CE y en el subendotelio (1). Se sintetiza en los megacariocitos (2) y en las CE (3). El gen que codifica para la síntesis del VWF se ha localizado en el brazo corto del cromosoma 12, aunque se ha identificado un pseudogen en el cromosoma 22. Dicho gen de 178 kb, contiene 52 exones (4-6). El VWF se forma dentro del retículo endoplasmático como un dímero, llamado pre-pro-VWF (2813 aa), comprende un péptido señal (22 aa), el propéptido (VWFpp) (741 aa) y la subunidad madura (2050 aa) (7). El dímero se forma por un puente disulfuro en la región C-terminal de dos monómeros que se glicosila (azúcares simples) durante el transporte al aparato de Golgi. El péptido señal es clivado y los hidratos de carbono se procesan a azúcares más complejos dentro del aparato de Golgi. La multimerización de la región N-terminal ocurre en el compartimento ácido del post-Golgi (Figura 1). También se ha demostrado que existe sulfatación de la molécula del VWF (8-10). La furina cliva al VWFpp del VWF maduro (11, 12). La presencia del VWFpp es necesaria para la multimerización y para el transporte del VWF a las organelas de depósito en las CE y plaquetas. La función extracelular del VWFpp no está definida. Aproximadamente el 1% del VWF circulante en el plasma contiene el propéptido (7). Los multímeros se conservan para su liberación regulada en los WPB y en los gránulos  $\alpha$  de los megacariocitos (13-16). Además del VWF, los WPB contienen otras proteínas como P-selectina, CD63, IL-8, etc (17-21). Recientemente se ha descrito que existen 3 vías de secreción del VWF, la constitutiva, la basal y la regulada (Figura 1). En cultivos de HUVEC, se observó que la mayoría del VWF sintetizado es secretado en forma basal, no constitutiva, desde una organela de almacenaje post-Golgi, presumiblemente los WPB (22). La vía regulada, se origina en los WPB (15) y su liberación, in vitro, ocurre rápidamente después de la estimulación con trombina, A23187 (ionóforo del calcio), histamina, etc. (1, 23). Su concentración plasmática es de 7  $\mu\text{g/mL}$ .

Los multímeros extragrandes se encuentran en el endotelio, subendotelio y en los gránulos  $\alpha$  de las plaquetas, mientras que en la sangre un clivaje proteolítico reduce el tamaño de los multímeros después de la secreción (24). La proteína del VWF está

compuesta por una serie de segmentos homólogos (dominios), cada uno de los cuales está repetido de dos a cuatro veces (25-27). Hay 3 repeticiones de A, 3 de B, 2 de C y 4 de D. Las diversas funciones de enlace del VWF parecen estar localizadas en estos dominios. El sitio de interacción con GPIIb $\alpha$  está localizado entre los aa 449-728 correspondiente al dominio A1 (28-31), donde también hay un sitio de enlace para el colágeno entre los aa 542-622 y otro para la heparina entre los aa 566-578 (32-34). Se ha localizado el dominio de enlace para el FVIII en el fragmento compuesto por 272 aa en la región N-terminal, correspondiente a los dominios D' y parte del D3 (35-37). Los aa 948 y 998 en el dominio A3 forman otro sitio de enlace para el colágeno (34-38). Se ha sugerido que este enlace es el sitio fisiológico de interacción con el colágeno (39-40). El tetrapéptido RGDS, que media el enlace del VWF al complejo  $\alpha_{IIb}\beta_3$  (GPIIb-IIIa) de plaquetas activadas, se encuentra cerca de la región C-terminal en el dominio C1 (41).

**Figura 1**

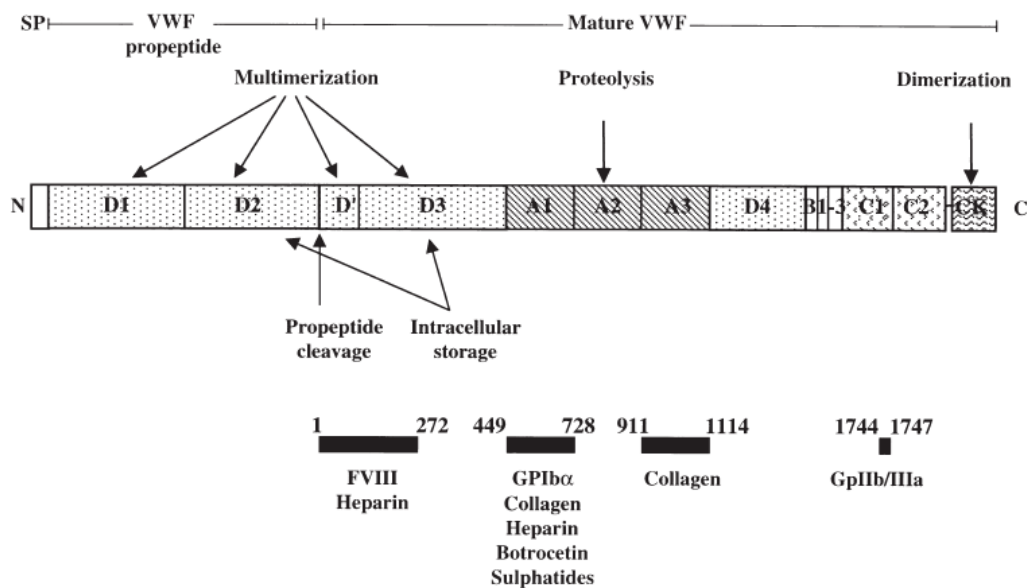


Figura 1: Representación esquemática de pre-pro-VWF. El pre-pro-VWF está conformado por un péptido señal (SP) de 22 aa, el propeptido por 741 aa, y el VWF maduro por 2050 residuos. Los dominios implicados en la biosíntesis y almacenaje están indicados por flechas, así también el sitio de corte de ADAMTS13. Los dominios funcionales que unen distintos ligandos están indicados por rectángulos negros. (Denis C. International Journal of Hematology. 2001)

**Figura 2**

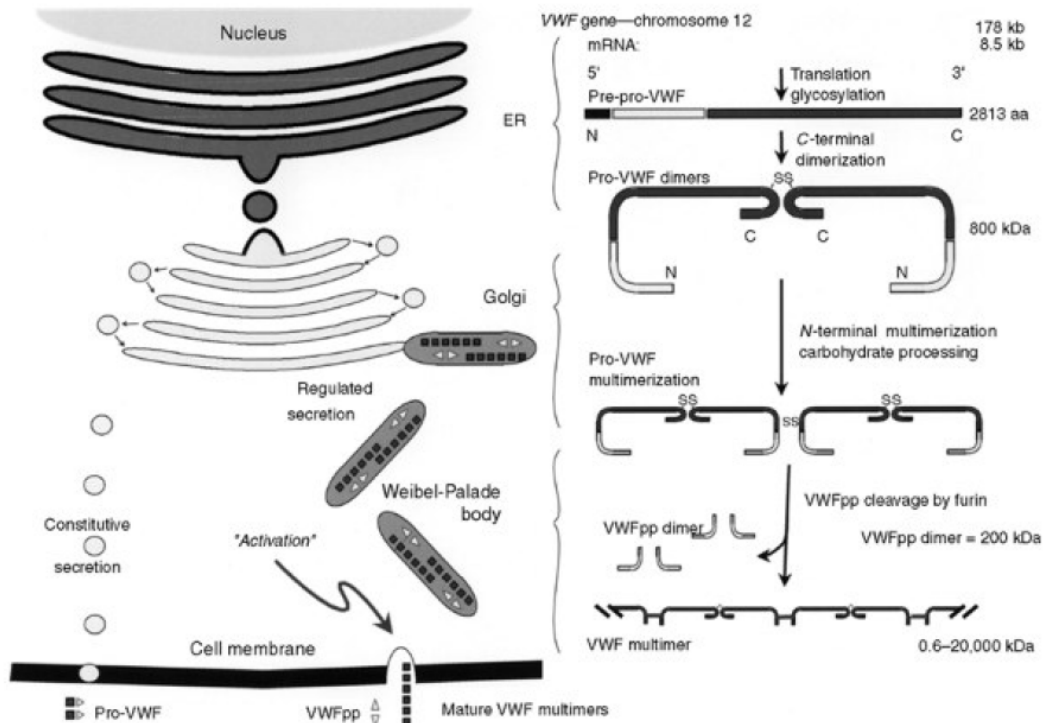


Figura 2: Secreción constitutiva y regulada de VWF. Dimerización y multimerización de VWF en el retículo endoplasmático y el aparato de Golgi. ER: retículo endoplasmático. (Haberichter S y col. Hemostasis and Trombosis: Basic Principles and Clinical Practice, 5th Edition 2006. Editors: Colman)

### 1.2 Función del VWF

El VWF tiene tres funciones principales. Promueve la adhesión de las plaquetas a las estructuras subendoteliales en el sitio de injuria vascular. Aquí el VWF se une al colágeno expuesto a través del dominio A3; esto produce un cambio conformacional en el VWF que expone el dominio A1, sitio de unión de la GP Ib de las plaquetas. Además promueve la interacción plaqueta-plaqueta uniéndose a la GP IIb-IIIa. Ambas funciones requieren la presencia de toda la población multimérica y un alto shear stress. El shear rate es la relación del flujo sanguíneo sobre el diámetro interno del vaso, y el shear stress es proporcional al shear rate y la viscosidad del medio. Por otro lado, el VWF, protege al FVIII de su inactivación y rápido catabolismo, por formación de un complejo no covalente con el mismo, a través de los dominios D'-D3, sitio de unión del FVIII. (42).

### 1.3 Clasificación de la enfermedad

La VWD es ocasionada por una deficiencia cualitativa o cuantitativa del VWF, que impide la formación del tapón plaquetario. Es la enfermedad hemorrágica más frecuente, con una prevalencia que oscila entre 0,8 y 1,3 % de la población.

Ha sido subdividida en dos grandes categorías, que reflejan la fisiopatología de la enfermedad: variantes cuantitativas y cualitativas; los tipos 1 y 3 son variantes cuantitativas, se refieren respectivamente a la disminución parcial o total del VWF mientras que el tipo 2 refiere a deficiencias cualitativas. Sadler (43) sugiere en la clasificación revisada introducida en 1994, subdividir al tipo 2 en 4 variantes (2 A, 2B, 2M, 2N o Normandy) de acuerdo a específicos detalles del fenotipo.

## 2. ADAMTS13

### 2.1 Síntesis y estructura

ADAMTS13 es uno de los mayores miembros de la familia ADAMTS, y exhibe la estructura de dominios característica. A diferencia de otros miembros de la familia, ADAMTS13 contiene la secuencia de 2 dominios CUB C-terminal. Los dominios CUB se encuentran en muchas proteínas reguladoras del desarrollo y pueden desempeñar un papel en la interacción proteína-proteína (44). Los motivos TSP1 también son conocidos por mediar interacciones proteína-proteína, especialmente entre las proteínas de la matriz extracelular (45). Por último, los dominios tipo desintegrina unen integrinas a través de una secuencia RGD también presente en el dominio rico en cisteína (46). Así, a través de sus múltiples dominios, ADAMTS13 es potencialmente capaz de interactuar con una amplia variedad de moléculas.

**Figura 3**



Figura 3: Estructura de la proteína de ADAMTS13. (Sadler JE, y col. Hematology 2004)

Abreviaciones: MP, dominio metaloproteasa (proteolítico); TSP, dominio trombospondina tipo 1.

El gen de ADAMTS13 humano comprende 29 exones que abarcan aproximadamente 37 kb de secuencia genómica (47). El cDNA de ADAMTS13 predice una proteína de 1427 aminoácidos con una masa molecular calculada de 145 kDa, en contraste con la aparente masa molecular de aproximadamente 190 kDa observada para ADAMTS13 purificada del plasma humano (48-49). La glicosilación



puede ser la causa de la diferencia de peso molecular (50). ADAMTS13 se sintetiza fundamentalmente en el hígado (47, 51) pues por investigaciones previas se ha observado actividad de ADAMTS13 plasmática muy disminuída en atresia biliar que fue restaurada con trasplante hepático de donantes vivos (49, 52-53). Se ha observado también una expresión variable en otros tejidos y tipos de células, incluidas las plaquetas (54). Recientemente Turner et al demostraron que la ADAMTS13 es sintetizada y almacenada en la CE, y que la enzima tiene actividad en los lisados celulares en condiciones estáticas y de flujo (55). También demostraron que el antígeno de ADAMTS13 es detectable por inmunohistoquímica en crío secciones de HUVEC que co-expresaban VWF. Sin embargo sólo una pequeña fracción de células es positiva para ambos antígenos. La baja correlación *in vivo* indicaría que la expresión de VWF y ADAMTS13 en las CE está altamente regulada.

## **2.2 Función y enfermedades relacionadas con su deficiencia**

Desde el aislamiento y la clonación de cDNA de ADAMTS13, varios laboratorios han expresado ADAMTS13 recombinante en cultivos celulares. La ADAMTS13 recombinante cliva al VWF *in vitro*, proporcionando una demostración formal de que ADAMTS13 es, en efecto, la proteasa que cliva al VWF (50, 56).

Por otra parte, varios grupos han realizado estudios sobre la estructura o función de ADAMTS13 para determinar los requisitos estructurales necesarios para su actividad. Dos grupos han investigado los efectos de truncar el extremo C-terminal en la secreción y actividad de ADAMTS13 (50, 57). Un truncamiento de ADAMTS13 distal o en el interior del dominio TSP1 resulta en una proteína activa, mientras que truncamientos proximales a TSP1 (dominios proteasa, TSP1, rico en cisteína, o espaciador) dan lugar a una proteína inactiva. Estos resultados indican que las secuencias dentro de la región que abarca desde el dominio proteasa hasta el espaciador son suficientes para la actividad, por lo menos *in vitro*. El truncamiento de ADAMTS13 entre el dominio rico en cisteína y el dominio espaciador resulta en una secreción variable desde célula. Además, la mutación de la secuencia RGD en el dominio rico en cisteína no tiene ningún efecto sobre la secreción o actividad de la ADAMTS13 *in vitro* (58).

También se han realizado estudios *in-vitro* que demuestran la existencia de defectos en la secreción de una proteína que no contiene el primer dominio CUB (59-60), que el dominio rico en cisteína y el dominio espaciador contribuyen al reconocimiento del VWF (58), que sin los dominios TSP-1 y los dos dominios CUB presenta actividad proteolítica (61) y que un polipéptido de CUB 1, se enlaza a los multímeros extragrandes del VWF sugiriendo que el dominio es un sitio de enlace (62). Una

variante de ADAMTS 13 sin la región C terminal, 2 dominios TSP-1 y dos dominios CUB muestra actividad similar a la ADAMTS 13 entera (63).

El propéptido de ADAMTS13 contiene 41 aminoácidos, en contraste con los 200 aminoácidos que conforman los propéptidos de los otros miembros de la familia ADAMTS (64-65). Además, el propéptido de ADAMTS13 no parece contener un motivo "cisteína-switch". En otras metaloproteasas, este motivo, cumple la función de inhibir la actividad proteasa mediante la coordinación con el sitio activo de  $Zn^{2+}$  para mantener la molécula en una forma inactiva hasta la separación del propéptido coincidente con la secreción desde la célula (66). En contraste con lo que se ha observado para otras metaloproteasas, la supresión del propéptido de la ADAMTS13 no afecta la secreción o actividad enzimática, lo que demuestra que el propéptido no es necesario para el plegamiento o secreción y probablemente no desempeña la función de mantener a la ADAMTS13 en una forma inactiva (65). Sin embargo, la secuencia del propéptido de ADAMTS13 se ha conservado a través de una amplia distancia evolutiva (de peces a los mamíferos), sugiriendo que podría tener una función que hasta ahora se desconoce.

ADAMTS13 cliva al VWF en condiciones de flujo en un sistema *in vitro*. El VWF se secreta desde las CE y plaquetas con multímeros extragrandes (67), la deficiencia de ADAMTS13 en clivar esos multímeros puede producir PTT, un desorden infrecuente caracterizado por una trombosis microvascular diseminada rica en plaquetas (68- 69). La PTT puede ser causada por una deficiencia congénita de ADAMTS13 o por el desarrollo de anticuerpos (70-71).

Las plaquetas en reposo se adhieren transitoriamente al endotelio de una forma VWF dependiente (72). Después de la unión inicial, las plaquetas son liberadas de la superficie endotelial a través de un mecanismo, que se hipotetiza, está mediado por ADAMTS13 como consecuencia de su acción sobre la molécula de VWF (73). Estudios recientes han abordado esta hipótesis utilizando un sistema *in vitro* en HUVEC cultivadas en una cámara de flujo (74-75). La perfusión de plasma normal que contiene ADAMTS13 (o ADAMTS13 parcialmente purificada) resulta en casi una inmediata separación de las plaquetas y el VWF (con multímeros extragrandes) que fue liberado en respuesta a agonistas endoteliales. Este efecto no se observó cuando se utilizó plasma de los pacientes con PTT (deficiente en ADAMTS13), (74). Estos resultados apoyan el concepto de que ADAMTS13 en efecto, cliva los multímeros extragrandes de VWF recién secretados en la superficie de las CE, que de no mediar la enzima, persisten el tiempo suficiente para inducir la adhesión plaquetaria.

Figura 4

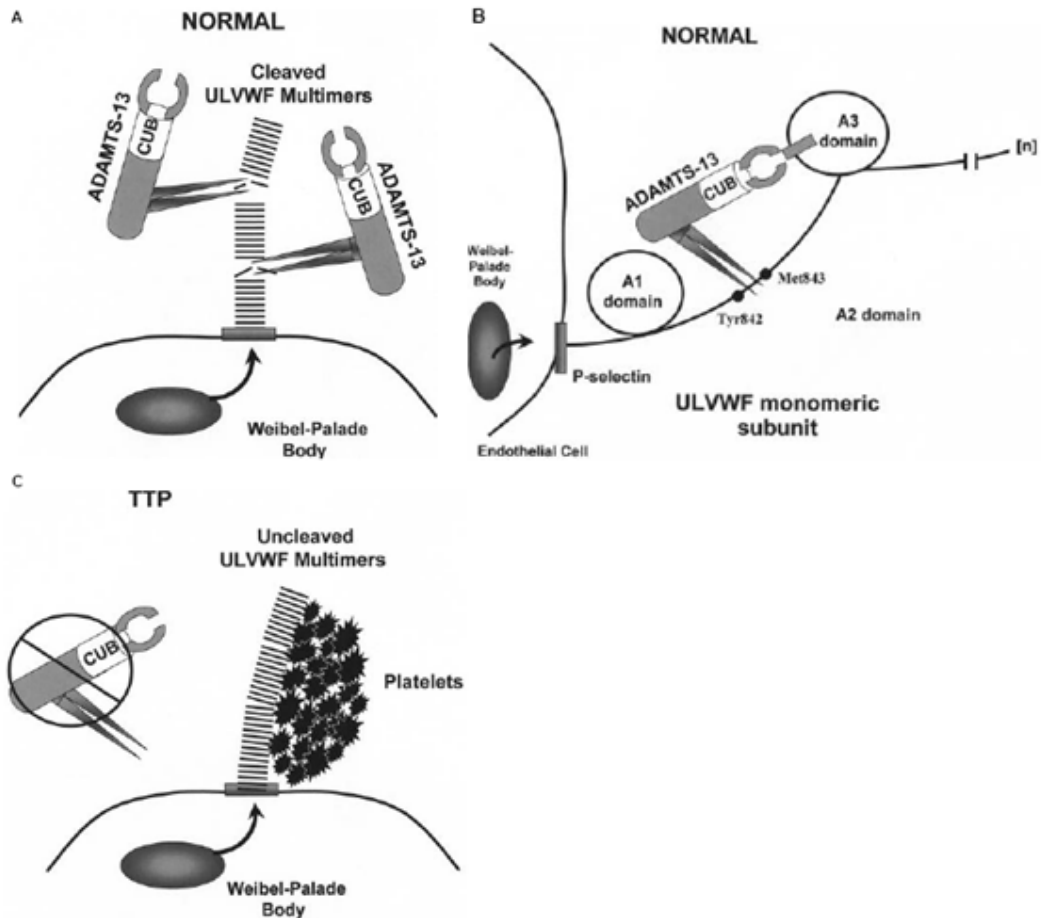


Figura 4: A. En individuos normales ADAMTS13 cliva a los multímeros extragrandes que son secretados desde las células endoteliales. B. Los multímeros extragrandes se anclan a la membrana de las células endoteliales por P-selectina, que es secretada junto con el VWF desde los cuerpos de Weibel Palade. Cada molécula de ADAMTS13 se ancla al dominio A3 de VWF, y cliva en dominio adyacente A2. Las formas mas pequeñas de VWF que circulan no inducen adhesión y agregación de las plaquetas. C. La ausencia o reducción severa de la actividad de ADAMTS13 en pacientes con PTT previene el clivado de los multímeros extragrandes de VWF secretados por las células endoteliales. Los multímeros extragrandes sin clivar inducen la adhesión y agregación de las plaquetas. (Sadler JE, y col. Hematology 2004)

La interacción entre ADAMTS13 y los multímeros extragrandes de VWF ha quedado demostrada en condiciones estáticas y de flujo (74). Se demostró que el VWF liberado de HUVEC es capaz de adherirse a placas recubiertas con ADAMTS13. También, ADAMTS13 puede unirse al dominio A3 del VWF inmovilizado, sugiriendo que este

dominio puede ser un sitio de anclaje de ADAMTS13. Por último, la IL 6 cuando está presente en niveles considerablemente superiores a las observadas normalmente en vivo inhibe, en gran medida, la capacidad de ADAMTS13 de clivar los multímeros extragrandes de VWF en condiciones de flujo (76). Este efecto de IL 6 en la actividad de ADAMTS13, puede representar otro enlace entre inflamación y trombosis.

### **3. Endotelio**

#### **3.1 Función Endotelial Normal.**

El endotelio tiene capacidad de producir más de 60 moléculas, que cumplen importantes funciones en la hemostasia y homeostasis vascular. Ante las cuales se destacan: a) la regulación del tono vascular, que realiza mediante la producción de numerosas sustancias vasodilatadoras y vasoconstrictoras. Dentro de las primeras, el óxido nítrico es la molécula antiaterogénica más importante sintetizada por el endotelio, con propiedades capaces de regular la vasodilatación y con efectos antiproliferativos, antiinflamatorios y antitrombóticos. Dentro de las sustancias vasoconstrictoras, se encuentra la angiotensina II, que es la principal molécula proaterogénica, y cuyo 90% se sintetiza en el endotelio. La presencia en éste de la enzima convertidora (ECA tisular) le permite cumplir múltiples funciones: vasoconstricción, favorece la proliferación de células musculares lisas, produce radicales libres con generación de estrés oxidativo e inflamación y, propicia enlaces protrombóticos. Otra molécula vasoconstrictora es la endotelina 1, con potencia muy superior a la angiotensina II, y que participa en múltiples mecanismos aterogénicos. También la prostaglandina H2 y el ácido araquidónico, son potentes moléculas vasoconstrictoras. b) Modulador del crecimiento celular, acción que ejerce produciendo factor de crecimiento plaquetario, factor de crecimiento fibroblástico básico y el insulinoide 1. c) Modulador de la inflamación, elaborando en su estado disfuncionante, moléculas de adhesión como ICAM, VCAM, E selectina y PECAM, todas neutralizadas por el óxido nítrico si el estado de función endotelial es normal. d) Regulador de la trombosis-fibrinólisis con la generación del activador tisular del plasminógeno, inhibidor del activador del plasminógeno, VWF (que es el mejor marcador serológico de disfunción endotelial) y el factor tisular.

#### **3.2 Niveles de Alteración Endotelial.**

1) La activación endotelial es un fenómeno inicial que ejercita el endotelio diariamente, para mantener la homeostasis de las múltiples funciones que regula. La disfunción endotelial leve es aquella por la cual múltiples factores de riesgo alteran la regulación del endotelio y comienza a primar la producción de moléculas de adhesión y proinflamatorias, asociada a elevadas citocinas. Finalmente, la fase de disfunción

endotelial avanzada presenta alteraciones anatómicas y funcionales profundas, que favorecen mecanismos inflamatorios y protrombóticos. En todo este proceso, el denominador común es la endotelitis, que progresa desde las etapas iniciales a las avanzadas, y establece el puente con la trombosis, elemento que evoluciona rápidamente a la aterosclerosis y conduce a sus complicaciones, como son entre otros los síndromes coronarios agudos y el stroke. Los múltiples factores de riesgo generan estrés oxidativo y este fenómeno conduce a la disfunción endotelial en toda su magnitud. En estadios avanzados predominan los mecanismos de vasoconstricción, proliferación celular, inflamación y trombosis, actuando todos según la teoría denominada de la "respuesta a la injuria".

#### **4. Histamina**

La histamina es un neurotransmisor que participa en una gran variedad de procesos fisiológicos (77-78). Para algunos autores, la histamina es considerada como una "hormona" debido a las múltiples funciones que realiza en diferentes lugares del organismo y por la autorregulación en su propia producción (79-81). Los mastocitos y basófilos son por excelencia los sitios en los que predomina el almacenamiento de la histamina; dichas células se encuentran en altas concentraciones en la piel y las mucosas (79-80, 82).

Cuando la histamina es liberada de mastocitos, basófilos, neuronas histaminérgicas u otras células, se debe unir a un receptor de histamina: H1, H2, H3 o H4 (81-85). Los receptores para histamina (H1, H2 y H3) son moléculas acopladas a proteínas G, que transducen señales extracelulares via Gq, Gs y Gi/o respectivamente (86) Así, de acuerdo con el receptor estimulado, se presentarán los efectos en los diferentes tejidos. El receptor H1 se localiza en el músculo liso de vía aérea y gastrointestinal, aparato cardiovascular, médula suprarrenal, células endoteliales, linfocitos, y sistema nervioso central. Participa en la contracción del músculo liso bronquial, prurito, dolor, permeabilidad vascular aumentada, hipotensión, rubicundez facial, liberación de mediadores de la inflamación, generación de prostaglandinas, reclutamiento de células inflamatorias, secreción de moco de la mucosa bronquial, cefalea, taquicardia, activación de nervios aferentes vagales de vías aéreas y tiempo de conducción del nodo atrioventricular. Un efecto inmunomodulador del receptor H2 incluye la inhibición de la respuesta de proliferación linfocitaria ante mitógenos, así como la disminución de la síntesis de anticuerpos y la quimiotaxis, la disminución en la proliferación de células T, la citólisis mediada por células y la producción de citocinas, además disminuye la liberación de histamina por los mastocitos y basófilos (80). En el sistema nervioso central existe un mayor predominio del receptor H3 que permite autorregular su propia

producción de histamina como neurotransmisor. De esta forma, se intensifica el estado de vigilia, por medio del receptor H1, además del sueño, el apetito y la termorregulación (80, 87-90). El receptor H3 también se encuentra en otros tejidos periféricos, incluyendo corazón, vasos (vena safena), tejido linfóide (adenoides), aparato digestivo y vía aérea; en esta última se ha encontrado en los nervios colinérgicos posganglionares y su función es la de mediar la transmisión colinérgica en el bronquio humano, evitando un efecto de “exceso de broncoconstricción” (87). Actualmente, el receptor H4 se encuentra aún en estudio, pero se sabe que su función está regulada por la producción de citocinas inflamatorias, por lo que participan en los procesos inflamatorios (81, 91-92).

En un estudio realizado en ratas, Kameswaran L y col. (93) demostraron que en las últimas semanas de gestación, hay un aumento de la liberación de histamina producida por el feto. También se observó el incremento de histamina en las últimas semanas de gestación en hámsteres dorados (94). Un relevamiento realizado sobre publicaciones efectuadas entre 1910 y 2008 se concluyó que la alta expresión de receptores para histamina, y la existencia de un factor embrionario liberador de histamina (EHRF) sugieren un rol fisiológico de la histamina durante la gestación humana (95).

## **5. Estrógenos y Andrógenos**

Los andrógenos, estrógenos y progesterona son todas ellas hormonas esteroídicas que se sintetizan en el ovario o el testículo a partir del colesterol aunque también pueden ser producidas en las glándulas suprarrenales.

Estrógenos: los estrógenos cuyos miembros más importantes son el estradiol, la estrona y el estriol tienen tres importantes funciones:

1. Promueven el desarrollo y el mantenimiento de las estructuras reproductoras de la mujer (en particular la mucosa del endometrio), de sus características sexuales (voz, distribución de la grasa, distribución del vello, etc)
2. Ayudan al mantenimiento del control del balance electrolítico
3. Aumentan el anabolismo de las proteínas, siendo sinérgicos en este aspecto con la hormona del crecimiento.

Unos niveles moderados de estrógenos en sangre inhiben la liberación de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) hipotalámica con la consiguiente reducción de la producción de la hormona luteínica (LH) y la hormona estimulante del folículo (FSH) por la pituitaria. Esta inhibición es el fundamento del mecanismo de acción de las píldoras contraceptivas.

Progesterona: la progesterona actúa principalmente en el útero preparando el endometrio para la implantación de un ovocito fertilizado mediante la secreción de

glucógeno y algunas proteínas específicas y aumentando el desarrollo de los capilares del estroma endometrial. También actúa sobre la mama produciendo el desarrollo de los acini mamarios. A nivel hipotalámico la progesterona actúa frenando la liberación de la GnRH (aunque menos que los estrógenos) y excitando el centro térmico, lo que provoca el aumento de temperatura que se observa, como veremos, en la segunda mitad del ciclo. Una importante acción de la progesterona es la disminución del número de receptores estrogénicos del endometrio y el aumento de las enzimas que metabolizan el estradiol. Por ambos mecanismos, la progesterona tiene un efecto antiestrogénico que previene el efecto cancerígeno que tienen los estrógenos. Este es uno de los motivos que explican porqué en la terapia hormonal sustitutiva siempre se asocia progesterona a andrógenos.

Andrógenos: los andrógenos sirven fundamentalmente como precursores de los estrógenos aunque tienen algunos efectos sobre el vello pubiano y axilar y sobre el desarrollo del clítoris. La transformación de andrógenos a estrógenos tiene lugar en las células intersticiales del folículo y en la grasa. Esta última reviste una gran importancia en la importancia en el mantenimiento de unos niveles de estrógenos después de la menopausia.

En las mujeres postmenopáusicas la producción ovárica de estrógenos disminuye mucho y los niveles séricos de estradiol bajan hasta menos de 25 pg/ml. En ellas, casi la totalidad de los estrógenos provienen de la síntesis extragonadal en el hígado y otros tejidos, como el adiposo, que expresan CYP19-aromatasa, enzima que convierte andrógenos como la testosterona o la androstendiona en estrógenos. Esos precursores androgénicos son producidos principalmente en las glándulas suprarrenales y, en menor proporción, en el ovario. La aromatización de la androstendiona da lugar a la formación de estrona, el estrógeno más abundante en el suero de las mujeres postmenopáusicas, aunque también se producen estradiol y estriol, pero en cantidades menores. Aunque los andrógenos se consideran hormonas típicamente masculinas, también están presentes en la mujer. En el período fértil, el 25% de la testosterona se produce en el ovario, otro 25% en las suprarrenales y el 50% restante en los tejidos periféricos, a partir de otros precursores liberados por las suprarrenales. En las mujeres postmenopáusicas la producción ovárica de andrógenos también desciende, por lo que la inmensa mayoría de los andrógenos provienen de las suprarrenales, tanto directamente, como por metabolización periférica de sus precursores. En los varones, la testosterona es el andrógeno principal. En un 95% proviene de la síntesis testicular pero también se produce una cierta cantidad en los tejidos periféricos, a partir de la androstendiona suprarrenal. En algunos tejidos parte de la testosterona es metabolizada a dihidrotestosterona. Esa conversión depende de

la actividad de la enzima 5-alfa-reductasa, que se expresa abundantemente en tejidos como la próstata o la piel. En los varones también se producen estrógenos, sobre todo por aromatización de los precursores androgénicos en los tejidos periféricos. A diferencia de lo que ocurre en las mujeres con la menopausia, los varones no experimentan un cese brusco de la síntesis gonadal de esteroides sexuales. Sin embargo, con la edad se observa una disminución progresiva de la actividad androgénica, que depende de una cierta disminución de la síntesis testicular y, sobre todo, del aumento de los niveles de la proteína transportadora (sex-hormone binding globulin, SHBG), lo que reduce la fracción de testosterona libre. Así, entre los 25 y los 75 años la concentración sérica de testosterona libre se reduce en un 50%. Hay que tener en cuenta que las células de muchos tejidos, incluido el hueso, expresan diferentes enzimas necesarias para la síntesis de los esteroides sexuales. Por tanto, estos esteroides pueden tener, además de un efecto "hormonal" (es decir, un efecto en un tejido distante del lugar donde son producidos y al que llegan a través de la sangre), un efecto "paracrino" o "intracrino", esto es, un efecto local en el mismo tejido donde son sintetizados.

El efecto de los estrógenos y los andrógenos sobre las células diana depende de su fijación a receptores específicos. Existen al menos dos tipos de receptores estrogénicos, alfa y beta. Estos receptores parecen encontrarse tanto en el citoplasma como en el núcleo. Una vez ligado el estrógeno a ellos, los complejos estrógeno-receptor se unen a regiones específicas del ADN, como los ERE (elementos de respuesta a estrógenos), y, con la colaboración de otras moléculas, modulan la transcripción de diversos genes. En los últimos años se ha demostrado que existe otro mecanismo de acción de los estrógenos, llamado "no-genotrópico" porque no depende de la unión del complejo estrógeno-receptor al ADN genómico. Este mecanismo participa en varias de las acciones de los estrógenos a nivel de los tejidos no reproductivos, como la vasodilatación arterial, la activación neuronal o ciertas acciones sobre las células óseas. Esas acciones parecen depender de la fijación del estrógeno a una variante de receptores estrogénicos unidos a la membrana celular. Dichos receptores tienden a localizarse en invaginaciones de la membrana llamadas cavéolas y modulan la actividad de ciertas proteinquinasas que, a su vez, influyen en diversos procesos celulares (96).

### **5.1 Relación con proteínas endoteliales**

La regulación hormonal de la función endotelial puede depender de mecanismos ligados a receptores, o ser independiente de ellos. En el endotelio vascular se han identificado receptores estrogénicos (ER), receptores de progesterona (PR) y receptores androgénicos (AR). También los ER y AR se han encontrado en las células



musculares lisas, macrófagos y plaquetas (97-98). Los efectos de los estrógenos sobre la hemostasia sanguínea son uno de los factores importantes en la protección que estos agentes producen en la fisiología cardiovascular. En la hemostasia participan tres mecanismos básicos: el vascular, la hemostasia primaria y la coagulación sanguínea (99). La modulación de los estrógenos sobre el sistema vascular se encuentra relacionada con la liberación de diversos factores que intervienen en la modulación de los tonos vasculares (99) tales como agentes derivados del endotelio intacto, como la prostaciclina, el óxido nítrico, la endotelina, el heparán sulfato con efecto anticoagulante y la trombomodulina, sustancia captadora de trombina que regula y activa al plasminógeno generando plasmina local que produce lisis de los coágulos. Se ha descrito que los estrógenos orales afectan algunos componentes de la cascada de la coagulación como los factores VII, IX y X, el fibrinógeno, antitrombina III, proteína S (inhibidor de la coagulación) y el inhibidor del factor tisular. Gottsäter A y col. en un estudio evaluaron el efecto de valerato de estradiol durante 3 meses de tratamiento en mujeres postmenopáusicas sanas. Se encontró una disminución en los niveles del fibrinógeno ( $P < 0.001$ ), de la antitrombina III y de la proteína S total ( $P < 0.001$ ) con aumento del FVII ( $P < 0.01$ ). Estos resultados indicaron que la administración exógena de los estrógenos puede estar simultáneamente asociada con efectos benéficos y de tipo trombogénico (100). Por otro lado, Koh KK y col investigaron en mujeres postmenopáusicas los efectos de los estrógenos equinos conjugados solos o en combinación con acetato de medroxiprogesterona administrados por vía oral y por vía transdérmica. Estos autores encontraron que los estrógenos equinos conjugados solos o en combinación con acetato de medroxiprogesterona por vía oral, disminuyeron los niveles del inhibidor del activador del plasminógeno 1 ( $P < 0.001$ ) que se encuentra aumentado en la sangre de mujeres postmenopáusicas. También observaron incrementos en los niveles plasmáticos del dímero D ( $P = 0.001$ ), indicador de la actividad fibrinolítica. Contrastando con estos datos el tratamiento por vía transdérmica no produjo cambios significativos en los mismos parámetros (101). Se han realizado estudios en poblaciones de mujeres normales, no embarazadas, embarazadas y post parto (102), donde los niveles de ADAMTS13 descienden y los de VWF y 17- $\beta$  estradiol (103) aumentan hacia fines del tercer trimestre de embarazo. Diversos estudios demuestran que el endotelio participa en importantes y variados procesos fisiológicos que incluyen el control del tráfico celular, la regulación del tono vasomotor, el mantenimiento de la fluidez de la sangre y el crecimiento de nuevos vasos sanguíneos.

Los estrógenos y los progestágenos son hormonas endógenas que producen gran variedad de efectos fisiológicos. En el caso de las mujeres, dichos efectos comprenden

acciones vinculadas con el desarrollo, efectos neuroendócrinos involucrados en el control de la ovulación, preparación cíclica de las vías de reproducción para la fecundación e implantación y los principales efectos sobre el metabolismo de minerales, carbohidratos, proteínas y lípidos. Actúan sobre el sistema cardiovascular (104) y sobre el mecanismo de coagulación de la sangre (105), favoreciendo una disminución en el tiempo de coagulación y un aumento en el número de plaquetas (106). Los estrógenos afectan a diferentes proteínas plasmáticas, en particular aquellas que participan en la unión a hormonas y en la cascada de la coagulación (107). Se ha demostrado que el estradiol produce un cambio en el balance hemostático de las CE disminuyendo los niveles del inhibidor de la vía extrínseca de la coagulación (TFP-1) secretados por el endotelio (108), y que la incubación de las HUVEC con E2 en dosis suprafisiológicas aumenta la producción de VWF (109). Elevados niveles de testosterona en el embarazo están relacionados con una disminución del crecimiento del feto en el útero y un desbalance hemostático (110). En un estudio realizado en hombres y mujeres transexuales, en donde se administró ethinilestradiol, acetato de ciproterona, y esteroides de testosterona respectivamente, se observó que los estrógenos y andrógenos tenían un claro efecto en los niveles plasmáticos de proteínas marcadoras del endotelio (111). Los estrógenos generan una estimulación de la enzima óxido nítrico sintetasa, actuando a través del sistema mediado por sus receptores. Además, pueden regular la síntesis de prostaglandinas y tienen efectos beneficiosos frente a la injuria vascular y la aterosclerosis, favoreciendo la expresión del factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), inhibiendo la apoptosis de las células endoteliales y la migración y proliferación de las células musculares lisas. Los andrógenos también han demostrado favorecer la regulación del VEGF y de la óxido nítrico sintetasa.

Los efectos de las hormonas sexuales y su comportamiento diferencial en ambos sexos han sido estudiados extensamente, por los métodos de valoración de la vasodilatación endotelial mediada por el flujo, en los territorios coronarios y periféricos. Dichos efectos agudos han sido evaluados en dosis suprafisiológicas y en estudios a largo plazo en subpoblaciones con deficiencia o exceso hormonal, como lo representan mujeres postmenopáusicas o transexuales. En hombres, el uso de andrógenos como testosterona produce vasodilatación arterial por mecanismos independientes del endotelio, probablemente involucrando canales de potasio ATP sensitivos, presentes en las células musculares lisas. En tanto, los esteroides anabólicos (nandrolona) tanto en estudios con animales como en humanos, no mejoran la función endotelial, y su uso en fisicoculturistas no muestra diferencias en la reactividad vascular, verificándose incluso un efecto deletéreo en los que tienen un alto nivel de ejercicio. En jóvenes genéticamente mujeres pero transexuales, altas dosis de testosterona se asocian con una alteración de

la vasodilatación endotelio dependiente. El síndrome de ovario poliquístico se asocia a disfunción endotelial y enfermedad coronaria extensa (leve hiperandrogenismo), (112) Además, en este síndrome se asocian otras potenciales anormalidades metabólicas proaterogénicas, como la insulino-resistencia que puede sumar su rol androgénico en la capacidad de deteriorar la función endotelial (113).

El efecto de las hormonas sexuales en la función endotelial y reactividad vascular se encuentra claramente influenciado por los sexos. En mujeres, la función endotelial es marcadamente superior a la de los hombres, disminuyendo después de la menopausia. Esta ventaja, está vinculada en parte a la protección hormonal estrogénica y en parte al menor tamaño de sus vasos. Los estrógenos tienen efecto beneficioso sobre la función endotelial por mecanismos receptor dependiente e independiente. En tanto, los andrógenos modulan la función endotelial de manera deletérea, dependiendo de la edad, sexo, dosis y ruta de administración. Los estudios de la función endotelial de tipo no invasivo, a nivel de la arteria braquial, han demostrado ser un marcador precoz de lesión vascular aterogénica, e incluso un valioso método pronóstico de riesgo cardiovascular, demostrado por múltiples estudios prospectivos, como el WISE (Women's Ischemia Syndrome Evaluation), (114). Sin embargo, existe una respuesta paradójica entre los beneficios obtenidos en la función endotelial principalmente con los estrógenos y el resultado de los últimos estudios prospectivos, donde se observa un incremento del riesgo que se producirían por un efecto proinflamatorio y protrombótico generado por la hormona de reemplazo. Este fenómeno se observó tanto en la rama estrógeno-progesterona, con incremento del riesgo cardiovascular del 22%, como también la segunda rama del estudio con 7 años de seguimiento en la que se había empleado sólo estrógeno, con efectos neutros a nivel coronario, pero con incremento del riesgo de stroke (115).

## **5.2 Relación con proliferación y apoptosis.**

La apoptosis parece ser el principal mecanismo de muerte del endotelio en condiciones fisiológicas. Por otra parte, el equilibrio proliferación-apoptosis de las CE desempeña un papel crítico en la formación y regresión de los vasos sanguíneos, especialmente las arteriolas y los capilares. Por ello, una excesiva apoptosis de estas células puede estar implicada tanto en la disfunción endotelial, como en la inhibición de la angiogénesis, descritas en diversas enfermedades vasculares (116).

Como las necesidades de una determinada hormona cambian continuamente, se hace estrictamente necesario que sus concentraciones estén sujetas a regulación, por lo tanto cuando ocurre un descontrol en la secreción hormonal se pierde la homeostasis celular, generándose potencialmente algunas alteraciones. Algunas hormonas pueden bajo ciertas circunstancias actuar estimulando la proliferación celular (117). A nivel

celular, estradiol actúa a través de receptores intracelulares (citoplasmáticos y nucleares). Estos receptores pertenecen a la superfamilia de los receptores nucleares, conformada por un gran grupo de reguladores transcripcionales como los receptores para hormonas esteroidales y tiroideas, retinoides, vitamina D, entre otros (118). Además, se ha demostrado la presencia del ER $\alpha$  en los “ruffles” y la membrana plasmática, pudiendo ser encontrado en vesículas asociadas con caveolina 1, denominadas caveolas (119). Una vez activados, los receptores unidos al ligando (complejo receptor-estradiol), translocan al núcleo, donde actúan como factores reguladores de la transcripción (potencialmente dependientes del ligando), uniéndose a elementos específicos de respuesta a estradiol y que regularán genes blancos (efectos genómicos), (118-120). Además de estos efectos reguladores de la transcripción, existen respuestas muy rápidas generadas por la hormona que no proceden por activación inmediata de procesos de transcripción, que se han denominado efectos no genómicos. Estos efectos son independientes de los procesos de transcripción génica y traducción de proteínas y contemplan la modulación, por el complejo estradiol-ER, de diferentes proteínas regulatorias ubicadas en el citoplasma o bien asociadas con membranas celulares (119, 121).

Se ha informado sobre un receptor distinto a los anteriores cuyo ligando puede ser estradiol: es un receptor intracelular de transmembrana acoplado a proteína G (proteínas heptahelicoides que se expresan en la superficie de membranas, donde la unión a un agonista inicia la activación de proteínas heterotriméricas de unión a guanina y proteínas reguladoras río abajo) denominado GPR30 (receptor acoplado a proteína G 30), localizado en el retículo endoplásmico, donde se une específicamente al estrógeno. Al activarse el GPR30 por medio de su unión a estradiol, se activan diferentes vías de señalización como la movilización de calcio intracelular y la síntesis nuclear de fosfatidilinositol 3, 4, 5-trifosfato, contribuyendo a la explicación de los mecanismos fisiológicos y fisiopatológicos asociados a la hormona (120-121). Algunos estudios indican que el ER de membrana (formando parte de caveolas y dominios rafts de membrana plasmática), estarían asociados a subunidades  $\alpha$  de proteína G, explicando la regulación positiva sobre algunas vías intracelulares mitogénicas. La consecuencia celular de estos mecanismos incluye adhesión, migración, sobrevivencia, proliferación celular y neoplasia (119). En la actualidad aún se desconoce si existe algún grado de homología estructural entre el GPR30 y el ER $\alpha$  que explique la unión de estradiol al receptor asociado a proteína G (119-121).

Uno de los mecanismos no genómicos es la señalización bidireccional que existe entre el ER $\alpha$  y uno o más miembros de la familia de EGFR, moléculas ubicadas en la membrana plasmática y que poseen actividad tirosina quinasa. El EGFR estimula la

síntesis de ADN y la transcripción génica relacionada con la probable activación del ER nuclear en forma independiente de E. Esta situación estaría dada por la transducción de señales intracelulares estimuladas por el receptor de EGF, conduciendo a la fosforilación y activación del ER nuclear y de proteínas co-reguladoras. La fosforilación de la serina 118 del dominio A/B del ER $\alpha$ , permite la transactivación de genes relacionados al ER, los que serían regulados positivamente por el EGFR (119, 121).

El ER $\alpha$  unido a su ligando actúa asimismo sobre metaloproteinasas de matriz (MMP-2 y 9) de la membrana plasmática de células neoplásicas de origen mamario; esta actividad está mediada por subunidades de proteína G y una proteína tirosina quinasa citosólica denominada Src, liberando HB-EGF (factor de crecimiento epidermal asociado a heparina). Este último factor es capaz de unirse al EGFR de la misma membrana, lo que se traduce en una activación tanto de quinasas, entre las cuales están las que responden a señales extracelulares (ERKs), como asimismo otras vías alternativas de señalización de proliferación y sobrevivencia celular. Se ha demostrado que el EGFR transloca al núcleo de la célula, donde puede unirse a secuencias del DNA ricas en adenina y timina, que modulan la transcripción del gen de ciclina D1 (119).

La familia de las MAPK está involucrada en distintos tipos de respuesta, pueden promover la supervivencia, así también como la muerte celular. ERK es una integrante de la familia de MAPK que media un efecto protector en las células, mediante la fosforilación de BAD (proteína proapoptótica) previniendo la inducción de la apoptosis. Dentro de la misma familia existe la p38 que induce la translocación de BAX (proteína proapoptótica) desde el citosol a la mitocondria promoviendo la muerte celular (122-126). Kingle y otros demostraron que concentraciones nanomolares de E activaron la vía de las MAPK, cuyas implicancias fisiológicas correspondería a un mecanismo de protección vascular (127). En la línea celular de cáncer de mama humano MCF-7, la exposición al E produjo una rápida activación de ERK1/2 (124). Además, se observó que el tratamiento con E, en neuronas corticales de rata, provocó una activación rápida y sostenida de ERK2 (129-130). Un estudio realizado en macrófagos de ratones machos obtenidos después de un trauma hemorrágico, demostró que la fosforilación de p38 estaba significativamente aumentada en ratones intactos comparándolos con ratones castrados. Los autores concluyeron que la testosterona podría ser responsable de lo observado, mientras que el estradiol no tuvo efecto sobre la activación de p38 (131). Wang y col. demostraron que la testosterona endógena causa una activación de p38 en la recuperación funcional del miocardio luego de una reperfusión aguda de la isquemia (132). También se observó que el tratamiento con andrógenos en células LNCaP produjo un aumento de la expresión de

SPAK, que modula la actividad de p38 (133). Ling y col. concluyeron que la T en niveles fisiológicos produjo un daño apoptótico en una línea de CE vasculares humanas cultivadas con medio privado de suero (134).

## **Objetivo General**

El objetivo de este trabajo es investigar el efecto de las hormonas esteroideas en un modelo celular *in vitro*. La regulación de la respuesta proliferativa y/o apoptótica tiene una considerable relevancia clínica peri-embarazo. Debido a las diferentes patologías presentes en el embarazo, es importante descubrir cuales son las causas que las producen. Se evaluará si están relacionadas con cambios hormonales, con variaciones en el sistema VWF/ADAMTS13 ó con el incremento fisiológico de histamina.

Así podrían inferirse nuevos mecanismos fisiopatológicos subyacentes en las potenciales pérdidas fetales, preferentemente asociadas a desniveles de los parámetros previamente mencionados.

## **Objetivos Específicos**

Objetivo específico 1: analizar la proliferación o apoptosis celular producida por estradiol, progesterona y testosterona en HUVEC y evaluar el mecanismo de señalización asociado.

Objetivo específico 2: evaluar el efecto de estradiol, progesterona y testosterona sobre los niveles de mRNA y proteína de VWF y ADAMTS13 en HUVEC.

Objetivo específico 3: determinar si estradiol, progesterona y testosterona presentan una interacción con histamina en la liberación de VWF, en niveles presentes en el tercer trimestre de embarazo.



## **Actividades y Metodología**

### **1. Células endoteliales (HUVEC)**

Las HUVEC se obtuvieron (3) a partir de la vena del cordón umbilical humano, que fue sometido a una disgregación enzimática con una solución de colagenasa al 0.1% preparada en RPMI 1640 durante 15 min a 37° C. Posteriormente, la solución con HUVEC fue colectada en tubos estériles y centrifugada a 500g durante 10 min. El botón celular obtenido fue sembrado en cajas de cultivo de 25cm<sup>2</sup>. Se mantuvieron en cultivo a 37°C en una estufa gaseada con atmósfera humificada al 95% con 5% de CO<sub>2</sub> en frascos de cultivo de 25 cm<sup>2</sup> pretratados con gelatina al 1%. Las HUVEC se cultivaron en medio RPMI 1640 suplementado con SFB (GIBCO) al 10%, previamente descomplementado por calentamiento a 56° durante 30 minutos, 100 U/ml de penicilina, 100 ug/ml de estreptomina, 0.25mg/ml de heparina, 2mM de l-glutamina y 50 ug/ml de suplemento de crecimiento para HUVEC que fueron despegadas con tripsina-EDTA (GIBCO).

### **2. Poblaciones, obtención de muestras**

Se obtuvieron muestras de sangre, en condiciones estériles, de mujeres normales (n=30), plasma normal de mujeres embarazadas (n=30), de hombres normales (n=30). De las muestras de sangre extraídas con citrato de sodio 12.9mM, fue separado el plasma en forma inmediata por doble centrifugación (1500g, 25 min., TA) y se guardó en alícuotas (-80°C) hasta su utilización.

### **3. Tratamientos de las HUVEC**

Las HUVEC se incubaron con plasma normal de mujer, plasma normal de embarazada, plasma normal de hombre, E2 (SIGMA, St. Louis, USA), E2 + fulvestrant (SIGMA, St. Louis, USA), T (SIGMA, St. Louis, USA), T + flutamida (SIGMA, St. Louis, USA), P (SIGMA, St. Louis, USA), P + fulvestrant. El fulvestrant y la flutamida fueron utilizados como inhibidores a nivel de receptor de E2, P y T respectivamente. Las concentraciones de hormonas que se utilizaron, tienen una relación directa con la concentración fisiológica (1nM E2, 1µM P, 60 nM T). Además, para el ensayo de proliferación celular, fue realizada una curva de concentración de las hormonas vs. respuesta de las HUVEC. La H (100µM) fue utilizada como agonista para la liberación de VWF. En las mediciones de VWF y ADAMTS13 las HUVEC fueron sometidas a los tratamientos antes descritos en presencia o ausencia de H y sus respectivos inhibidores (HRH1: K, HRH2: Cimetidina y HRH3: Clobenpropit) (Sigma, St. Louis, USA). Antes de realizar las distintas incubaciones para evaluar los efectos sobre las

MAPK, las HUVEC fueron incubadas en medio libre de SFB por 6 horas. Si en las incubaciones era utilizado un inhibidor, este se agregaba 30 minutos antes del agonista. Como control de los tratamientos se utilizaron HUVEC incubadas con el vehículo en el que fue disuelta la hormona.

#### **4. Evaluación de sobrevivencia celular**

El CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay es un método colorimétrico para determinar el número de células viables en ensayos de proliferación o citotoxicidad.

La proliferación y muerte celular de las HUVEC producida por los diferentes tratamientos, fue evaluada por colorimetría con el reactivo MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, inner salt). El MTS es bio-reducido por las células convirtiéndose en un producto coloreado de formazan que es soluble en los medios de cultivo (135-136).

##### **4.1 Método**

Las HUVEC se expusieron a los distintos tratamientos por 24, 48 y 72h para la evaluación de sobrevivencia celular. Se adicionaron 20µl de CellTiter 96 AQueous One Solution Reagent en cada well de la placa de 96-well, que contienen 100µl de medio de cultivo. Se incubaron por 1 hora a 37°C en una atmósfera humificada con 5% CO<sub>2</sub>. Se registró la absorbancia a 490nm utilizando un lector de placas de 96 wells. El número de células fue calculado por comparación con una curva estándar.

#### **5. Medición de la apoptosis**

Determinación de la externalización de fosfatidilserina (citometría de flujo). La fosfatidilserina, un fosfolípido que normalmente se encuentra en la cara interna de la membrana plasmática, se trasloca a la cara externa de la membrana durante la apoptosis. Como la proteína Anexina V se une a fosfatidilserina en presencia de Ca<sup>2+</sup> la incubación de las HUVEC con Anexina unida a un fluorocromo permite detectar células apoptóticas. Para evaluar si los tratamientos realizados indujeron apoptosis en las HUVEC, se evaluó si hubo pérdida de asimetría de los fosfolípidos en la membrana plasmática (apoptosis in situ): Anexina V-isotiocianato fluoresceinado e IP (137). El control positivo fueron HUVEC tratadas con factores inductores de la apoptosis (TNF- $\alpha$ ). Se diferenciaron: células vivas no apoptóticas (Anexina V-/ IP), apoptóticas tempranas (anexina V+/IP-) y necróticas (IP+).

##### **5.1 Método**

Para la determinación de la externalización de fosfatidilserina, las HUVEC se expusieron por 24/48 hs. a los distintos tratamientos con plasmas y hormonas. Las

células fueron previamente heparinizadas (100µM/ml) antes de la exposición con los plasmas para prevenir la formación de coágulos.

La suspensión de células se ajustó a  $1 \times 10^6$  células/ml. A 0.5ml de la suspensión en un tubo Eppendorff, y se le agregó 10µl de buffer media binding reagent y 1.25µl de Anexina V-FITC, posteriormente se incubó 15 minutos a TA en oscuridad. Se centrifugó a 1000g a TA y el medio fue removido. Se resuspendieron las células en 0.5ml de buffer binding frío y se adicionaron 10 µl de ioduro de propidio. Las muestras se pusieron a 4°C y en oscuridad, y se analizaron por citometría de flujo inmediatamente. (Annexin V FITC Apoptosis detection kit, Calbiochem, Darmstadt, Germany)

## **6. Evaluación de fosforilación en tirosina de MAPK**

Para evaluar las posibles vías de activación de las HUVEC, se establecieron los niveles de activación de las proteínas ERK1/2, p38 y JNK por cuantificación de los mismos por SDS-PAGE e inmunotransferencia. Las células fueron homogeneizadas y solubilizadas en buffer muestra, en condiciones reducidas (138). Las proteínas fueron separadas en un gel de SDS-12% PAGE. La inmunotransferencia fue desarrollada utilizando anticuerpos anti P-ERK1/2, P-p38 y P-JNK. Para cuantificar los niveles antigénicos de las muestras, se incubaron las mismas membranas con un anticuerpo anti β-actina. Las proteínas se revelaron mediante luminiscencia (ECL). Con el programa Image Master (Pharmacia), se realizó un análisis densitométrico de la intensidad de pixeles de las bandas de cada tratamiento para cada MAPK y se lo relacionó con la banda correspondiente a β-actina, graficando esta relación. Para la evaluación de la fosforilación en tirosina de las MAPK las células fueron expuestas a los distintos tratamientos por 5 min, 15 min, 30 min y 60 min.

### **6.1 SDS-PAGE. Cuantificación relativa de proteínas**

#### **6.1.1 Materiales**

Marcadores de peso molecular preteñidos para geles de SDS (Kaleidoscope Prestained Standards, BIO-RAD), cubetas para electroforesis de proteínas mini-protean (BIO-RAD).

Reactivo de quimioluminiscencia ECL: western blotting analysis reagents (Sigma, St.Louis, Mo)

#### **6.1.2 Soluciones tampón**

Solución de electroforesis: 5 mM Tris, 40 mM glicina, 0.2% SDS pH 8.3.

Gel de separación: 12% acrilamida/bisacrilamida (37:1), 375 mM Tris pH 8.8, 0.1% SDS, 0.05% persulfato de amonio, 0.05% TEMED.

Gel concentrador: 3% acrilamida/bisacrilamida (37:1), 125 mM Tris pH 6.8, 0.1% SDS, 0.05% persulfato de amonio, 0.05% TEMED.

Buffer de transferencia: 48 mM Tris pH 9.2, 39 mM glicina, 20% metanol.

Buffer muestra: 50 mM Tris.HCl pH 6.8, 6M urea, 6% 2-mercaptoetanol, 3% SDS, 0.003% azul de bromofenol.

### **6.1.3 Preparación de las muestras**

Preparación de extractos celulares totales

Se lavaron  $1 \times 10^6$  células una vez con PBS frío, se solubilizaron y resuspendieron en 200  $\mu$ l de buffer muestra con 1mM PMSF, 1mg/ml de leupeptina y 1mg/ml de aprotinina.

### **6.1.4 Electroforesis de proteínas**

Tras resuspender las muestras en buffer muestra, se incubaron 5 minutos a 95°C y se sonicaron (30% amplitud) durante 10 segundos. Finalmente, las muestras se sembraron en un SDS-PAGE al 12% y la electroforesis se desarrolló a 40mA.

### **6.1.5 Inmunotransferencia**

Para transferir las proteínas del gel a membranas de nitrocelulosa (Hybond-C Extra, Amersham, UK) se siguió la técnica de la transferencia con el sistema Trans-Blot SD (Bio-Rad) a 100mA durante 1 hora, utilizando la solución de transferencia descrito anteriormente.

Finalmente, se identificaron las proteínas objeto de estudio realizando los siguientes pasos: -Bloqueo de la membrana durante toda la noche a 8 °C con 2.5% de albumina bovina (Sigma, St. Louis, Mo) en solución PBS/0.05% Tween 20 (polyoxyethylenesorbitan monolaurate, Sigma, St. Louis). - Incubación 1 hora a TA con agitación suave, con el primer anticuerpo, diluído en solución de lavado (SL, PBS/0.05% Tween 20).- 3 lavados de 10 minutos con SL. - Incubación con un segundo anticuerpo conjugado con peroxidasa (HRP), durante 1 hora a TA y suave agitación.- 3 lavados de 10 minutos con SL.- Revelado mediante quimioluminiscencia con el reactivo ECL.

### **6.1.6 Anticuerpos utilizados**

Anticuerpos primarios:

Anticuerpo monoclonal anti-fosfo ERK1 (pThr<sup>202</sup> / pTyr<sup>204</sup>) y ERK2 (pThr<sup>185</sup> / pTyr<sup>187</sup>) MAPK, anticuerpo anti IgG de ratón (Sigma, St. Louis, USA). Concentración 1:1000

Anticuerpo monoclonal anti-JNK activado, clon JNK-PT48, anticuerpo anti IgG de ratón (Sigma, St. Louis, USA). Concentración 4 $\mu$ g/ml

Anticuerpo de conejo anti-p38 MAPK (pThr<sup>180</sup> / pTyr<sup>182</sup>), anticuerpo anti IgG de conejo (Calbiochem, Darmstadt, Germany). Concentración 1:1000.

Anticuerpo monoclonal anti  $\beta$ -actina, clon AC-15 (Sigma, St. Louis, Mo, USA).  
Concentración 0.5 $\mu$ g/ml

Anticuerpos secundarios:

Anticuerpo secundario anti-inmunoglobulinas (anti-IgG) de conejo (Calbiochem, San Diego, USA) y anti-IgG de ratón (SIGMA, St. Louis), acoplados a peroxidasa, concentración 1/4000.

## **7. Medición de concentración de VWF:Ag liberado por las HUVEC**

Para determinar el efecto de los tratamientos sobre la liberación de VWF, se obtuvieron los sobrenadantes de los cultivos, se dializaron y concentraron las muestras. El contenido de VWF fue cuantificado por la técnica de ELISA. Las células fueron expuestas a los tratamientos con hormonas e H y sus respectivos inhibidores por 24 h.

### **7.1 ELISA**

#### **7.1.1 Anticuerpos**

Anticuerpo de conejo anti-VWF (DAKO, Denmark). Concentración 1:200.

Anticuerpo anti-VWF acoplado a peroxidasa (DAKO, Denmark). Concentración 1:400.

#### **7.1.2 Soluciones tampón**

Solución tampón de ELISA (0.12M NaCl, 0.02M Imidazol, 0.005M Ac cítrico, pH:7.3)

Solución bloqueante: Buffer ELISA 10% albúmina bovina (BSA, Sigma, St. Louis, USA).

Solución de lavado y dilución de muestras: Solución de ELISA 0.5% BSA.

Solución de reacción: a 10ml de buffer (7.6mM ac. cítrico, 13.2mM  $\text{PO}_4\text{Na}_2\text{H}$ , pH: 5), se agrega 1 pastilla de OPD (o-Phenylenediamine dihydrochloride, Sigma, St. Louis, USA) y 25  $\mu$ l de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

Solución de frenado: 1.6 % ac. sulfúrico.

#### **7.1.3 Método**

Los pocillos de las placas se sensibilizaron por incubación con 100  $\mu$ L del anticuerpo de conejo anti-VWF durante toda la noche a 4 $^{\circ}$ C. Se removió el contenido y los pocillos fueron lavados 3 veces con 100 $\mu$ L de buffer ELISA. El bloqueo de los sitios residuales fue realizado por incubación con 100 $\mu$ L de solución bloqueante durante 1 h a 37 $^{\circ}$ C. Nuevamente se realizó el vaciado de los pocillos y fueron lavados 3 veces con 100 $\mu$ L de solución de lavado. Las muestras se diluyeron 1:80, 1:40 y 1:20, y se incubaron 100 $\mu$ L de la dilución durante 2h a 37 $^{\circ}$ C. El contenido de los wells fue aspirado y lavado 3 veces con 100 $\mu$ L de solución de lavado. La placa fue incubada durante 1h con 100 $\mu$ L de la dilución de anticuerpo anti-VWF acoplado a peroxidasa. Nuevamente el contenido de los pocillos fue aspirado y fueron lavados 3 veces con

100µL de solución de lavado. El revelado fue realizado por incubación con 100µL de la solución de reacción. La reacción se detiene por adición de 100 µL de solución de frenado. La lectura del color desarrollado fue realizada a 490nm.

Para cuantificar el VWF, se realizó una curva con diluciones seriadas de pool de plasma (1/40 a 1/1280), controlado por estándar internacional, en buffer ELISA 0.5 % BSA. La concentración de proteínas totales se cuantificó por la técnica de Bradford (BIORAD), utilizando albúmina sérica bovina como referencia (139).

### **8. Identificación de ADAMTS13 liberada por HUVEC**

Con las muestras obtenidas en **7-** se realizó una separación en un gel de SDS-PAGE 6%, en condiciones no reducidas. La inmunotransferencia, detallada en **6-**, se desarrolló utilizando un anticuerpo anti-“blocking peptide” ADAMTS13 (ABCAM). Las proteínas se revelaron mediante luminiscencia (ECL) y fueron evaluadas por densitometría. La concentración de proteínas totales se cuantificó por la técnica de Bradford (BIORAD), utilizando albúmina sérica bovina como referencia (139). Por electroforesis se fraccionaron 250 µg de proteína de cada muestra.

### **9. Identificación de VWF y ADAMTS13 intracelular**

Luego de los tratamientos, las HUVEC fueron resuspendidas en una solución tampón de PBS con tritón 0.3% y distintos inhibidores de proteasas (N-etilmaleimida, PEFABLOC, EDTA). Fueron incubadas 30 minutos a 30°C, y luego sonicadas (30% amplitud) 8 min con una amplitud de 30% (BRANDSON, Digital Sonifier). Para el análisis de las muestras se realizó el mismo procedimiento que en **7-** y **8-**.

### **10. Medición de niveles de mRNA de VWF y ADAMTS13 utilizando la técnica de real time PCR**

Debido a que las hormonas tienen efectos génicos y no-génicos, se evaluaron los niveles de mRNA de VWF y ADAMTS13. Luego de los distintos tratamientos, se obtuvo el RNA total de las HUVEC, utilizando Trizol, extracción con cloroformo y precipitación con isopropanol. El RNA fue transcrito a cDNA y luego sujeto a los ciclos de PCR utilizando primers específicos para VWF y ADAMTS13. Se utilizó β-actina como gen de referencia.

#### **10.1 Aislamiento de RNA**

El RNA total fue aislado siguiendo el método que utiliza Trizol (GIBCO BRL). Se agregó 1ml de Trizol al pellet de células ( $6 \times 10^6$  células), se resuspendió el pellet y se mezcló en vortex. Se agregaron 200 µl de cloroformo frío, se agitó por 15 seg y luego

se dejó reposar 3 min a TA. Se centrifugó a 12000g por 10 minutos a 4°C. Se separó la fase acuosa y se traspasó a otro tubo Eppendorf. Se agregaron 500 µl de isopropanol frío, se mezclaron y se dejó actuar 10 min a TA. Se centrifugó a 12000g por 10 min a 4°C, se descartó el sobrenadante. Se lavó el pellet con 500 µl de etanol 70% frío, se centrifugó a 7500g por 5 min a 4°C, se descartó el sobrenadante. Se secó el pellet 5-10 min a TA, y se resuspendió en 10 µl de agua libre de nucleasas. La concentración y pureza del RNA se midió en un espectrofotómetro a 260 y 280 nm.

## **10.2 Retrotranscripción (ImPromII Reverse Transcriptase)**

Preparación de RNA target y primers

La reacción de transcriptasa reversa tiene un volumen final de 20µl, con 1µg de templado de RNA, 0.5µg de primers y agua libre de RNAsas para llevar a volumen. Se incubó a 70°C por 5 min, se realizó un shock térmico a 4°C por 5 min y luego se mantuvo a 4°C.

### **10.2.1 Primers**

a- VWF

Forward: 5´AGA AAC GCT CCT TCT CGA TTA TTG 3´

Reverse: 5´TGT CAA AAA ATT CCC CAA GAT ACA 3´

Tm: 58-60°C. Estos primers generan un amplicón de 84pb

b- ADAMTS13

Forward: 5´ AGG AGG ACA CAG AGC GCT ATG 3´

Reverse: 5´CAC CTG CCG GTT ACC ATC A 3´

Tm: 55-56°C. Estos primers generan un amplicón de 280pb

c- β-actina

Forward: 5´TCA CCA ACT GGG ACG ACA TG 3´

Reverse: 5´GTA CAG GCA TAG CAC AGC CT 3´

Tm: 56-57°C. Estos primers generan un amplicón de 200pb

### **10.2.2 Preparación de la Mix**

Cada 20µl de la mix, se combinaron: buffer de reacción, MgCl<sub>2</sub> 3mM, dNTPs, inhibidor de ribonucleasas, y agua libre de RNAsas. Se vortexearon y se agregaron 15µl a cada tubo de reacción.

### **10.2.3 Adición del templado y primers en la reacción de Mix**

Para cada reacción individual se agregaron 5µl de la mix templado + primers a la mix de RT-PCR.

### **10.2.4 Programación para Transcripción Reversa**

Anneal a 25°C por 5 min, la extensión se realizó por 60 min a 42°C. Se inactivó la enzima incubando a 70°C por 15 min.

### **10.3 Real Time-PCR (SYBR Green PCR)**

Esta técnica se basa en la utilización de fluorocromo que se hibrida inespecíficamente con el DNA de doble cadena. Al avanzar los ciclos de amplificación, permite la cuantificación indirecta de DNA amplificado por ciclo. Para normalizar los resultados se utilizó el mRNA de  $\beta$ -actina como gen de referencia. La cuantificación relativa se llevó a cabo utilizando el programa Light Cycler (Roche) que relaciona los Cp (punto de la curva de amplificación en que el valor aumenta sobre la señal de fondo, número de ciclo del umbral) medios de los mRNA blanco y de referencia.

#### **10.3.1 Programación del Instrumental de LightCycler**

Temperatura de desnaturalización: 95°C, tiempo: 10 min.

Cuantificación (amplificación): a- temperatura de desnaturalización: 95°C, tiempo: 10 seg.; b- temperatura de annealing: 60°C, tiempo: 11 seg.; c- temperatura extensión: 74°C, tiempo: 4 seg., con modo de adquisición simple.

Curvas de melting: a- temperatura de desnaturalización: 95°C, tiempo: 0 seg.; b- temperatura de annealing: 65°C, tiempo: 15 seg.; c- temperatura extensión: 95°C, tiempo: 0 seg., con modo de adquisición continuo.

Temperatura de enfriamiento: 40°C, tiempo: 30 seg.

#### **10.3.2 Primers**

Se utilizan los mismos primers que para la reacción de retrotranscripción.

#### **10.3.3 Preparación de la Mix de PCR**

Se colocaron los capilares en el adaptador de centrífuga enfriado.

Mix: Agua (grado PCR),  $MnCl_2$  (VWF/  $\beta$ -actina: 3mM, ADAMTS13: 0.5mM) PCR primer mix (VWF: 0.9 $\mu$ M,  $\beta$ -actina/ADAMTS13: 0.7 $\mu$ M), LightCycler RNA Master SYBR Green 2 $\mu$ l (10x concentración). Volumen final: 18 $\mu$ l. Los componentes de la mix se agregaron en el orden mencionado.

Se agregaron 18 $\mu$ l de la mix en cada capilar, y se adicionaron 2 $\mu$ l del templado de RNA. Luego se centrifuga a 3000g (Standard) para que el volumen descienda a la base del capilar, y se transfirieron los capilares al instrumental de LightCycler.

### **11. Análisis estadístico:**

Uno de los principales objetivos del análisis de los datos de un diseño experimental es cuantificar y evaluar la importancia de las fuentes de variación (tratamientos). Esto puede ser obtenido a través del análisis de varianza (ANOVA). Para aplicar el test de ANOVA, se comprobó la normalidad de los datos mediante la Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilks modificado, y la homogeneidad de varianzas mediante la Prueba F para homogeneidad de varianzas. Si se cumplían los requisitos, se aplicaba el



ANOVA, y luego se realizaba el análisis a posteriori de Student-Newman-Keuls (SNK) para evaluar las diferencias entre los distintos grupos. Los resultados obtenidos de la evaluación de apoptosis por Anexina V-IP, fueron evaluados por ANOVA-SNK. Cuando no se cumplía alguno de los requisitos del ANOVA, se aplicaba una transformación de datos. A los resultados obtenidos de la evaluación de la fosforilación de MAPK, liberación y niveles intracelulares de ADAMTS13, y niveles de mRNA de ADAMTS13 y VWF, se les aplicó una transformación logarítmica, y luego fueron evaluados por ANOVA-SNK. En los casos en que la transformación de datos tampoco cumpliera con los requisitos para aplicar el test de ANOVA, se utilizó el test no paramétrico de Kruskal Wallis. Los resultados obtenidos de MTS y VWF:Ag (intracelular y sobrenadante) se analizaron por el test no paramétrico de Kruskal Wallis.

Una  $p < 0,05$  se consideró estadísticamente significativo. Se utilizaron los programas INFostat/Estudiantil y PRIMER.

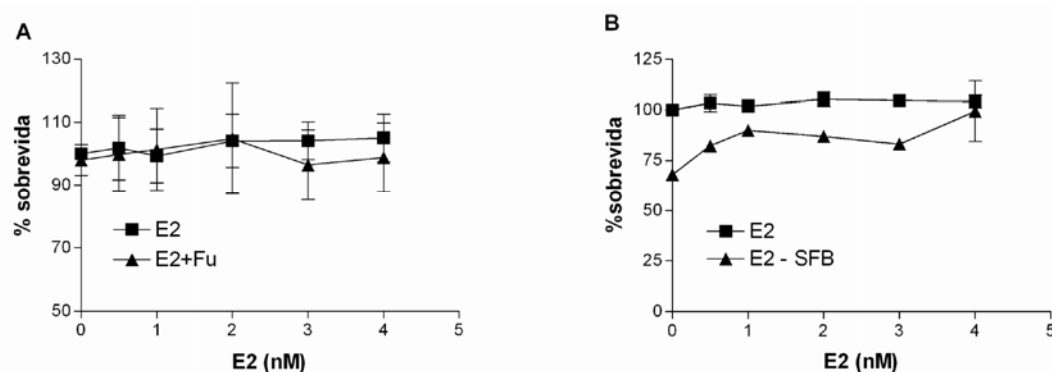
## Resultados

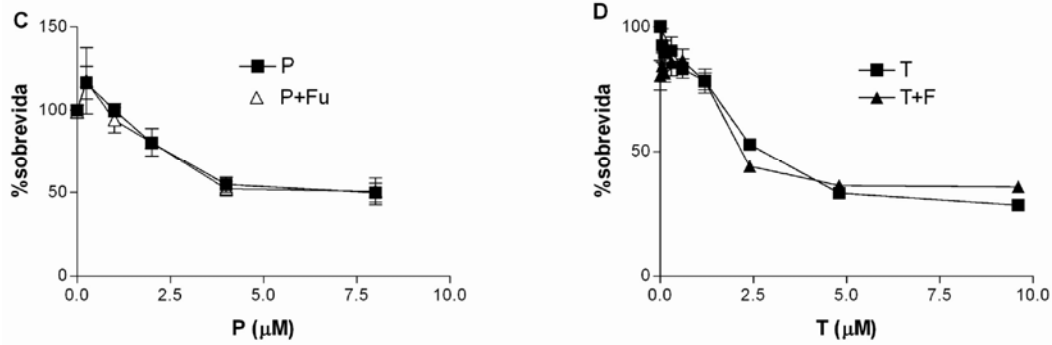
### 1.1 Evaluación de sobrevida celular

Para el estudio de la proliferación celular se añadió el reactivo MTS a cada pocillo 90 minutos antes de la lectura de las muestras con el lector de placa a 492 nm. La cantidad de reactivo MTS, fue medida por densidad óptica, siendo directamente proporcional al número de células vivas. Cada placa (blanco, control, y control con tratamiento con diferentes concentraciones de hormona y/o inhibidor) se realizó por triplicado. Los controles consistieron en las células incubadas con el vehículo de la hormona. El experimento se repitió en tres ocasiones diferentes, utilizando como control a las HUVEC incubadas con el vehículo en el que fue disuelta la hormona.

Los resultados para E2 se muestran en la Figura 5 (A, B) que representa la sobrevida celular a concentraciones crecientes de E2 (0.5-4nM). En la Figura 5A se observa que las distintas concentraciones de E2 no producen efecto en la sobrevida celular, así como tampoco el agregado de fulvestrant. Cuando las células son sometidas a condiciones de hambreado el agregado de E2 con y sin SFB no produce diferencias significativas (Figura 5B). Por lo tanto observamos un estímulo proliferativo de E2 en condiciones adversas para el crecimiento celular. En la Figura 5C se representa la inhibición del crecimiento celular tras la adición de concentraciones crecientes de P (0.3-8 $\mu$ M). La utilización de concentraciones fisiológicas de P no produjo un cambio en la viabilidad celular. Aunque la exposición a concentraciones suprafisiológicas produjo una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) de la sobrevida celular (80%  $\pm$  4 a 52%  $\pm$  11 sobrevida celular). La Figura 5D representa la variación de la concentración de células a concentraciones crecientes de T (0.3-9.6  $\mu$ M). La incubación con T (75  $\pm$  12% a 28  $\pm$  19% sobrevida celular) produjo el mismo fenómeno de inhibición del crecimiento celular que la incubación con P ( $p < 0.05$ ), (Tabla 1).

Figura 5





**Figura 5: Proliferación y Muerte Celular.** Los datos corresponden a medias  $\pm$  DS. La DO de las muestras control se refirió a 100. Cada condición se desarrolló en 4 wells y cada experimento se repitió por triplicado. Análisis estadístico: Los datos obtenidos fueron evaluados usando el test ANOVA, con un nivel de significación de  $p < 0.05$ .

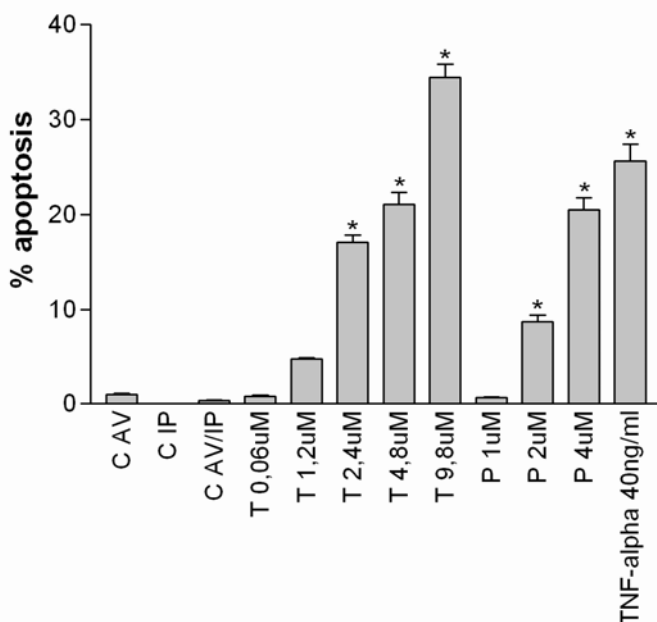
(A) Las células fueron estimuladas con E2, E2+Fu (fulvestrant). (B) En condiciones de hambre las células fueron estimuladas con E2. (C) Las células fueron estimuladas con P, P+Fu. (D) Las células fueron estimuladas con T, T+F (flutamida).

## 1.2 Evaluación de apoptosis

Debido a que el ensayo de MTS no discrimina la muerte celular producida por necrosis o apoptosis, se realizó el ensayo de anexina V/IP por citometría de flujo. Los controles consistieron en HUVEC incubadas con el vehículo de la hormona.

Luego de 24 y 48 h de tratamientos con plasma normal de hombre, plasma normal de mujer, plasma normal de mujer embarazada, E2 y control, no se observaron cambios en el porcentaje de apoptosis (Figura 6). En contraste, los tratamientos con T y P en dosis supra fisiológicas y  $TNF\alpha$ , resultaron en un incremento significativo de apoptosis en las HUVEC (Figura 6, Tabla 2). Se observó un aumento significativo del número de células apoptóticas tratadas con  $2\mu M$  ( $8 \pm 1\%$ ) y  $4\mu M$  ( $20 \pm 2\%$ ) de P, mientras que el tratamiento con  $1\mu M$  de P era no tenía diferencias significativas con el control (Figura 6, Tabla 2). Cuando las HUVEC fueron expuestas a  $0.06\mu M$  de T por 24 horas, se detectó un bajo número de células positivas para anexina V. Al utilizar concentraciones mayores a la fisiológica aumentó significativamente el número de células positivas para anexina V observadas:  $21 \pm 2\%$  para  $4.8\mu M$  y  $34 \pm 2\%$  para  $9.8\mu M$ . El número de células apoptóticas observadas en este ensayo es consistente con el número de muerte celular observado en el ensayo de viabilidad.

**Figura 6**



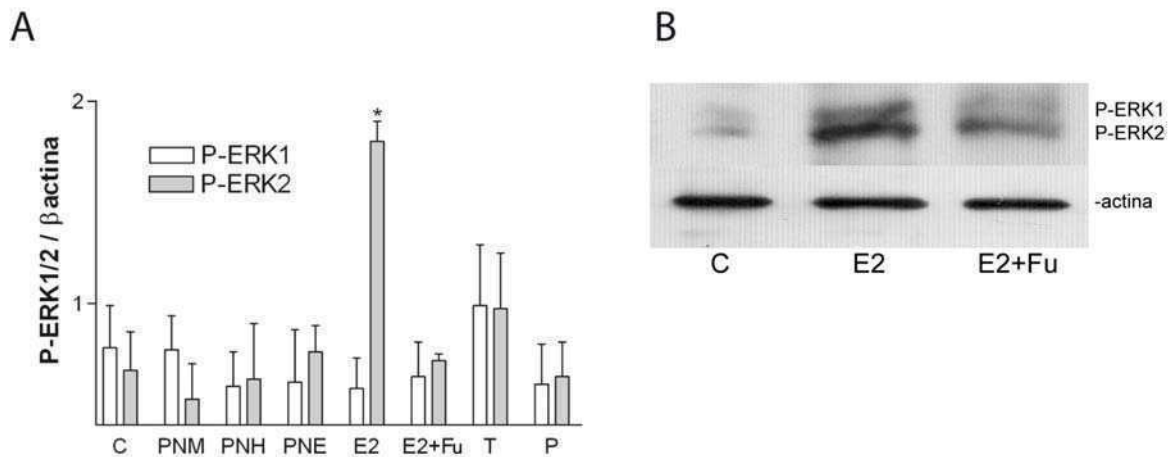
**Figura 6: Porcentaje de apoptosis en HUVEC.** Las células fueron estimuladas con PNM (plasma normal mujer), PNE (plasma normal mujer embarazada), PNH (plasma normal hombre), E2, P y T. Luego de la estimulación, las células fueron analizadas por citometría de flujo con marcación para anexina V. Los resultados corresponden a medias  $\pm$  DS de 3 experimentos independientes. \*  $p < 0.05$  tratamientos respecto control.

### 1.3 Evaluación de fosforilación MAPK

En distintos sistemas se ha demostrado que el efecto mitogénico de E2 requiere la activación de la cascada de ERK. Para comprobarlo, se determinó en HUVEC si la incubación con E2 incrementaba la fosforilación de ERK1/2. La Figura 7 indica que hubo un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en la proporción de proteínas ERK2 fosforiladas respecto de  $\beta$ -actina, luego de 1 h de estimulación con E2. Sin embargo no se encontró un aumento significativo para la razón ERK1 fosforilada/  $\beta$ -actina. Este último resultado tiene una validez relativa, dado que la señal de la proteína fosforilada en el control era muy débil para esta isoforma de ERK (Figura 7B). En la Figura 7B se observa que la incubación con E2 + fulvestrant fue capaz de revertir de forma significativa ( $p < 0.05$ ) el aumento de la fosforilación de ERK2 producido por E2.

No se observaron diferencias significativas en las HUVEC tratadas con plasma normal de mujer, plasma normal de mujer embarazada, plasma normal de hombre, T, P y control (Figura 7A).

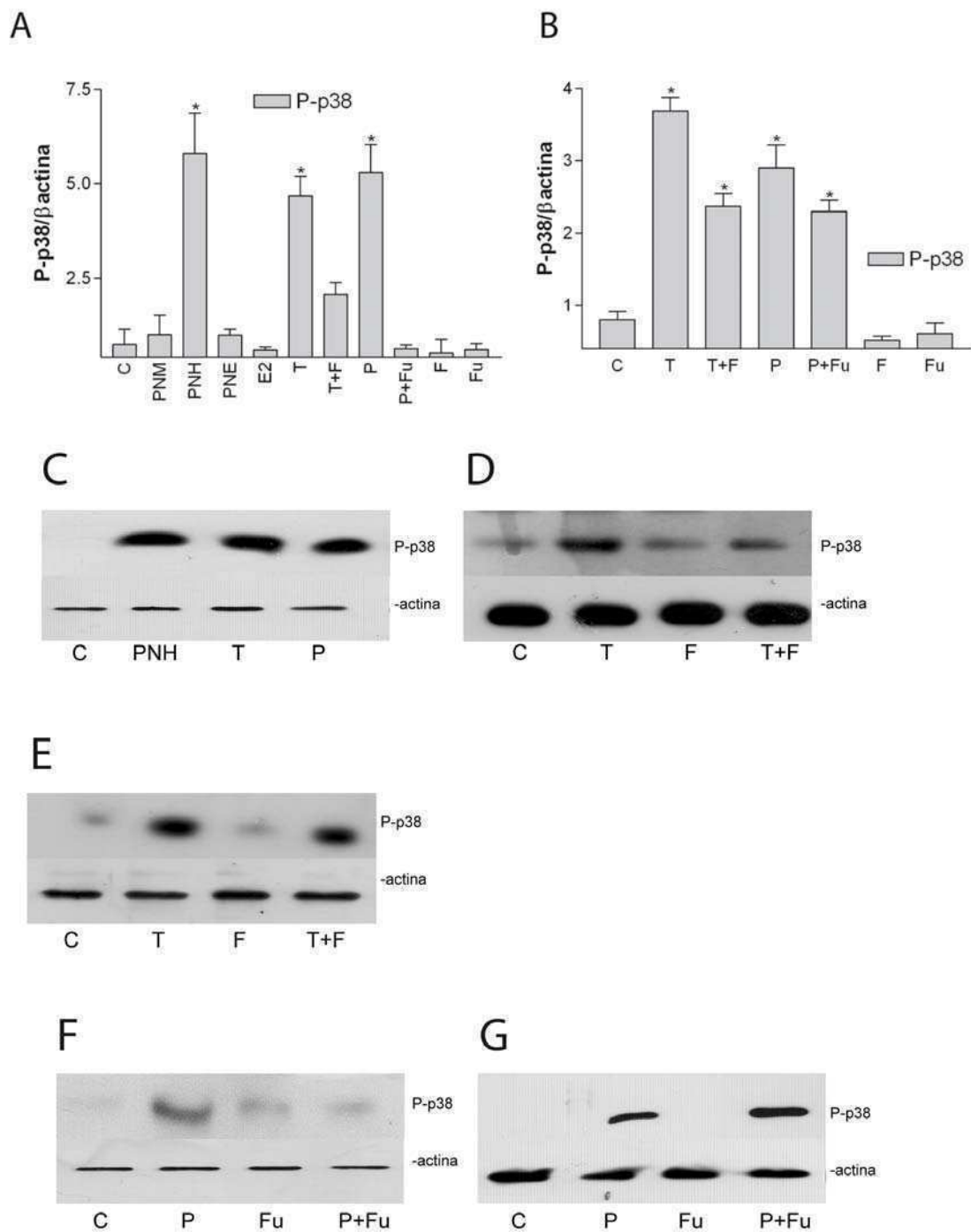
**Figura 7**



**Figura 7: P-ERK1/2 en extractos celulares de HUVEC.** Células sin tratar o tratadas con PNM, PNE, PNH, E2, E2+Fu, T y P por 1 h fueron analizadas por inmunoblotting para detectar cambios en la fosforilación de ERK1/2. Los lisados de HUVEC fueron incubados con un anticuerpo específico anti fosfo ERK1/2, y reincubados con anti β-actina. **(A)** Relación de píxeles obtenidas del análisis densitométrico del Western blot de anti-P-ERK1/2. Los datos son presentados como un aumento en la fosforilación de ERK1/2 relativos a los niveles de β-actina. Los resultados corresponden a medias  $\pm$  DS de tres experimentos separados, \*  $p < 0.05$ , determinado por ANOVA. **(B)** Análisis representativo del western blot de los lisados celulares.

Para estudiar la posible actuación de p38 como intermediario en la señalización de la vía apoptótica en las HUVEC, se realizaron incubaciones con P y T en dosis fisiológicas y suprafisiológicas. Se encontró que, independientemente de la dosis utilizada, P y T producían un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en la fosforilación de p38 (Figura 8A, B, D-G). También se observó que la incubación de las HUVEC con el plasma normal de hombre producía un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en la fosforilación de p38 (Figura 8A, C). Cuando las HUVEC fueron incubadas con plasma normal de mujer, plasma normal de mujer embarazada y E2 no se observaron diferencias significativas (Figura 8A). Los inhibidores utilizados para P y T, fueron capaces de revertir el efecto de aumento de fosforilación de p38 cuando las dosis utilizadas eran fisiológicas. Sin embargo, cuando las dosis utilizadas de las hormonas eran suprafisiológicas, tanto fulvestrant como flutamida, eran incapaces de revertir el efecto (Figura 8A, B, D-G).

**Figura 8**



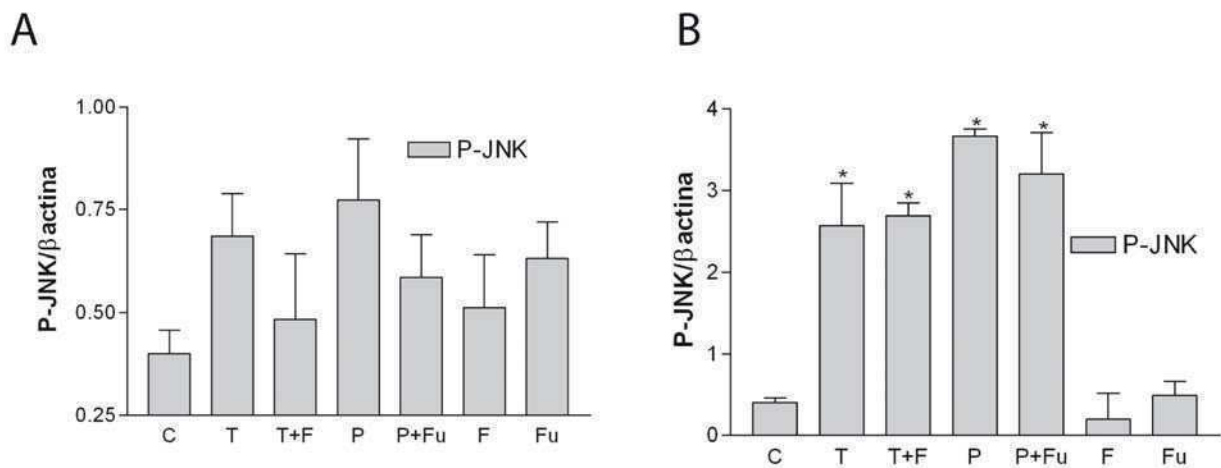
**Figura 8: P-p38 en extractos celulares de HUVEC.** Células sin tratar o tratadas con PNM, PNE, PNH, E2, E2+Fu, P, P+Fu, T, T+F por 1 h, fueron analizadas por inmunoblotting para cambios en la fosforilación de p38. Los lisados de HUVEC fueron incubados con un anticuerpo

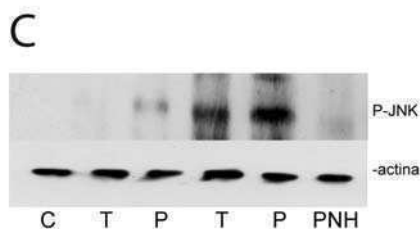
específico anti fosfo p38, y reincubados con anti  $\beta$ actina. **(A)** Análisis densitométrico del Western blot de anti-P-p38. Las células fueron incubadas con dosis fisiológicas de las hormonas. Los datos son presentados como un aumento en la fosforilación de p38 relativos a los niveles de  $\beta$ actina. Los resultados son medias  $\pm$  DS de tres experimentos separados, \*  $p < 0.05$ , determinado por ANOVA. **(B)** Análisis densitométrico del Western blot de anti-P-p38. Las células fueron incubadas con dosis suprafisiológicas de las hormonas. Análisis representativo del Western blot de los lisados celulares. **(C)** HUVEC tratadas con PNH, T y P a dosis fisiológicas. **(D)** HUVEC tratadas con T, T+F a dosis fisiológicas. **(E)** HUVEC tratadas con T, T+F a dosis suprafisiológicas. **(F)** HUVEC tratadas con P, P+Fu a dosis fisiológicas. **(G)** HUVEC tratadas con P, P+Fu a dosis suprafisiológicas.

Debido a que la activación de p38, es indiferente al estímulo con distintas dosis hormonales, se ha estudiado la posibilidad de que JNK intervenga en la señalización de la vía apoptótica, activada por dosis suprafisiológicas de P y T. Se observó que a dosis suprafisiológicas, tanto P como T eran capaces de aumentar de forma significativa ( $p < 0.05$ ) la fosforilación de JNK (Figura 9B, C). Además, se observó que a dosis fisiológicas las hormonas no eran capaces de activar JNK (Figura 9A, C). Los inhibidores de P y T, no fueron capaces de revertir los efectos de fosforilación de JNK, cuando las hormonas estaban en dosis suprafisiológicas.

Todas las diferencias de fosforilación se verificaron mediante la media de las intensidades de pixeles (Tabla 3-5).

**Figura 9**





**Figura 9:** P-JNK en extractos celulares de HUVEC. Células sin tratar o tratadas con P, P+Fu, T, T+F por 1 h, fueron analizadas por inmunoblotting para cambios en la fosforilación de JNK. Los lisados de HUVEC fueron incubados con un anticuerpo específico anti fosfo JNK, y reincubados con anti  $\beta$ actina. **(A)** Análisis densitométrico del Western blot de anti-P-JNK. Las células fueron incubadas con dosis fisiológicas de las hormonas. Los datos son presentados como un aumento en la fosforilación de JNK relativos a los niveles de  $\beta$ -actina. Los resultados son medias  $\pm$  DS de tres experimentos separados, \*  $p < 0.05$ , determinado por ANOVA. **(B)** Análisis densitométrico del Western blot de anti-JNK. Las células fueron incubadas con dosis suprafisiológicas de las hormonas. Análisis representativo del Western blot de los lisados celulares. **(C)** HUVEC tratadas con PNH, T y P a dosis fisiológicas ( $0.06\mu\text{M}$  T,  $1\mu\text{M}$  P) y suprafisiológicas ( $2.4\mu\text{M}$  T,  $2\mu\text{M}$  P)

#### 1.4 Resumen: Evaluación de un posible mecanismo de acción de las hormonas determinantes del sexo sobre las vías de proliferación y apoptosis en HUVEC.

Se ha analizado la acción de las hormonas determinantes del sexo en la apoptosis y proliferación de las HUVEC. Los datos de este trabajo demuestran que: a) el efecto proliferativo del estradiol en HUVEC, ocurre a través de un aumento de la fosforilación de ERK2, inducido por el estímulo de la privación del suero. b) la P y T en dosis suprafisiológicas promueven la apoptosis de HUVEC vía activación de p38 y JNK.

#### 2.1 Evaluación de la liberación del VWF y ADAMTS13 al medio de cultivo de HUVEC. Evaluación intracelular de VWF y ADAMTS13.

Las células HUVEC se eligieron como modelo porque responden a estímulos hormonales (97-98), y expresan tanto VWF como ADAMTS13 *in vitro*. Además, las HUVEC secretan VWF *in vitro* en respuesta a estímulos con H.

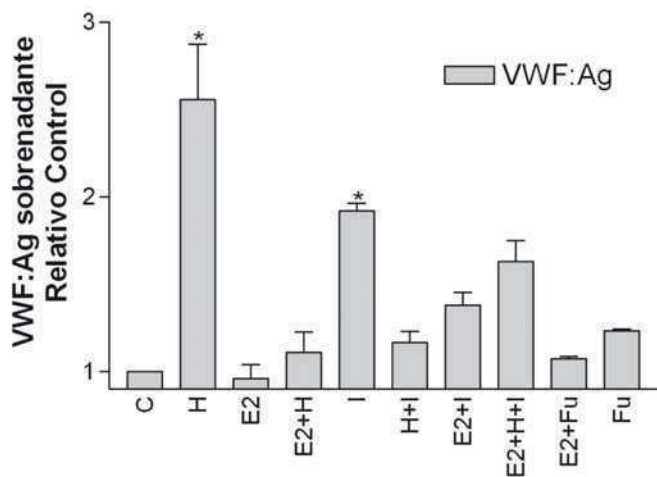
Luego de los tratamientos, se cuantificó la concentración de VWF en los sobrenadantes de los cultivos de HUVEC por la técnica de ELISA. El VWF:Ag se expresó como la razón entre las unidades de VWF de los tratamientos y el control. En la Figura 10 (A, B, C) se observan los resultados expresados como la media  $\pm$  DS. La concentración de VWF observada en el control, corresponde al que contiene el SFB utilizado para el sustento de los cultivos, además del VWF liberado en forma basal.



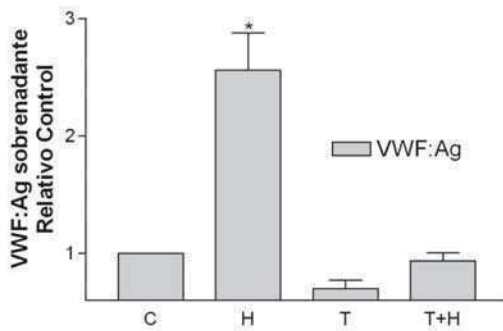
La comparación estadística entre los tratamientos (Tabla 6A, B, C) indicó que existen diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre H y otros tratamientos. El tratamiento con E2 no produjo aumento de la liberación de VWF, y su combinación con H produjo una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) de VWF con respecto a H. El tratamiento con los inhibidores de H produjo un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) con respecto al control. En las combinaciones con E2 e inhibidores de H, hubo una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto a H sola. Los estímulos con P y T no produjeron un aumento en la liberación de VWF, y las combinaciones con H produjeron una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) con respecto al tratamiento con H.

**Figura 10**

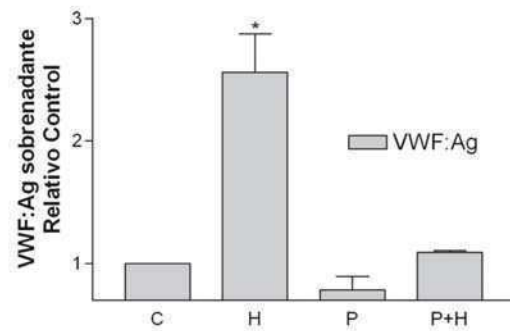
**A**



**B**



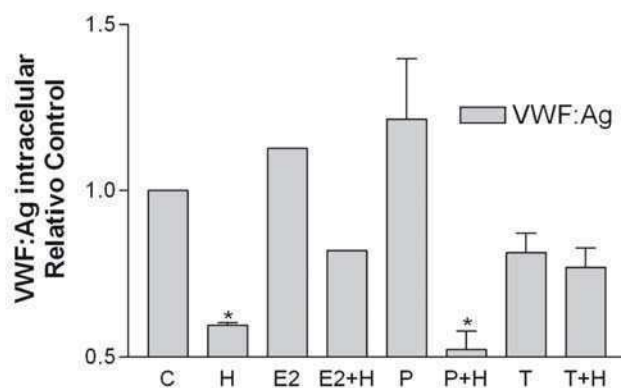
**C**



**Figura 10: VWF:Ag medido en sobrenadantes de cultivos de HUVEC.** El VWF: Ag se expresa como la razón entre las unidades de VWF de los trataminetos y el control. Los resultados son medias  $\pm$  DS de 6 experimentos separados, \*  $p < 0.05$ , determinado por Kruskal Wallis. **(A)** HUVEC incubadas con H, E2, E2+H, Fu, E2+Fu, E2+I (inhibidores de histamina), E2+H+I. **(B)** P P+H. **(C)** T y T+H.

También se determinó el contenido intracelular de VWF, cuando las HUVEC fueron incubadas con las distintas hormonas e H, mediante la técnica de ELISA. En la Figura 11 se observa que el contenido intracelular disminuyó significativamente ( $p < 0.05$ ) en 2 veces cuando las células fueron incubadas con H, en comparación con el control. Además, se observó que el tratamiento con P+H produjo una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) de 2 veces en el contenido intracelular de VWF con respecto al control y al tratamiento con P. El resto de los tratamientos no produjo cambios significativos en los valores de VWF intracelulares (Figura 11, Tabla7).

**Figura 11**

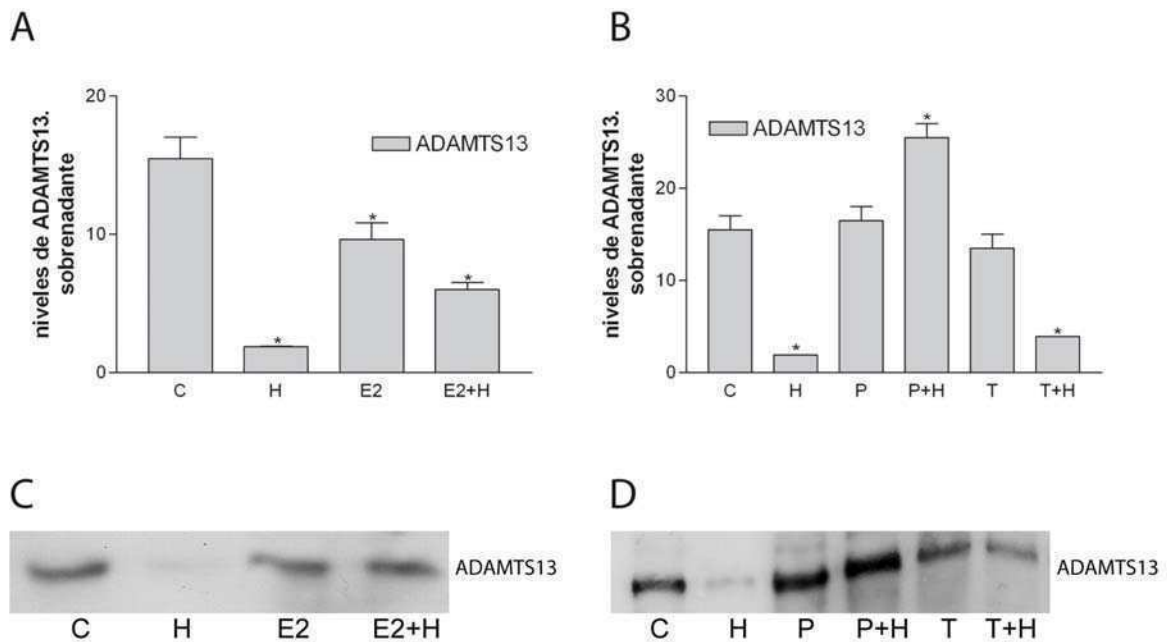


**Figura 11: VWF:Ag medido en los extractos celulares de cultivos de HUVEC.** El VWF: Ag se expresa como la razón entre las unidades de VWF de los trataminetos y el control. Los resultados son medias  $\pm$  DS de 3 experimentos separados, \*  $p < 0.05$  entre control y tratamientos, determinado por Kruskal Wallis. HUVEC incubadas con H, E2, E2+H, P, P+H, T y T+H.

Para analizar la liberación de ADAMTS13, se utilizaron los sobrenadantes de las HUVEC de los distintos tratamientos. Los niveles de ADAMTS13 se cuantificaron por analisis densitométrico de las muestras analizadas mediante PAGE-SDS e inmunotransferencia en iguales concentraciones proteicas.

En las HUVEC tratadas con E2 y en las HUVEC tratadas con H, se produjo una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en la liberación de ADAMTS13 de 1.6 y 8 veces con respecto al control. Sin embargo, el tratamiento con E2+H produjo un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en la liberación de ADAMTS13 de 3 veces con respecto a H (Figura 12A, C; Tabla 8). Además, el tratamiento de T+H, produjo una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) en la liberación de 4 veces con respecto al control. Cuando las HUVEC fueron incubadas con P+H, se produjo un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en los niveles de ADAMTS13 comparado con el control (Figura 12 B, D; Tabla 8). También se observó que no había diferencias significativas entre el control y los tratamientos con P y T (Figura 12 B, D; Tabla 8).

**Figura 12**

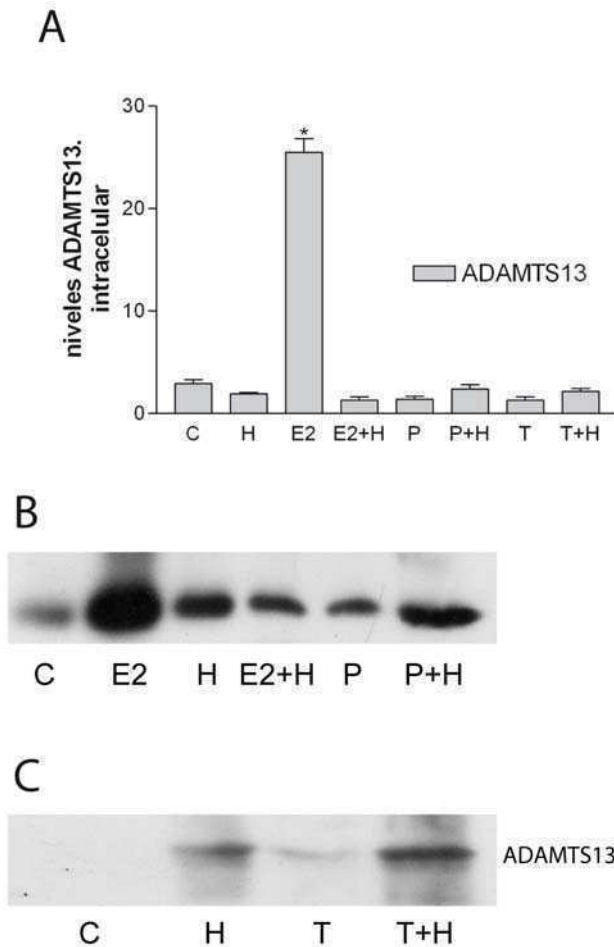


**Figura 12:** ADAMTS13 en sobrenadantes celulares de HUVEC. Células sin tratar o tratadas con H, E2, E2+H, P, P+H, T, T+H. Análisis densitométrico del western blot de anti-ADAMTS13. Los datos son representados como un aumento en los niveles de ADAMTS13. Los resultados son medias  $\pm$  DS de 3 experimentos separados, \*  $p < 0.05$  determinado por ANOVA. HUVEC incubadas con **(A)** H, E2, E2+H. **(B)** H, P, P+H, T, T+H. Análisis representativo del Western blot para la evaluación ADAMTS13 en sobrenadantes celulares de HUVEC. De cada muestra, 250  $\mu$ g de proteína se fraccionaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% en condiciones no reducidas. HUVEC incubadas con **(C)** H, E2, E2+H. **(D)** H, P, P+H, T, T+H.

De la misma manera se analizó el contenido intracelular de ADAMTS13 en HUVEC. Como se muestra en la Figura 13 A y B, cuando las HUVEC fueron incubadas con E2

los niveles intracelulares de ADAMTS13, aumentaron significativamente ( $p < 0.05$ ) en 8 veces con respecto al control (Tabla 9). Sin embargo, los tratamientos con H y E2+H, no produjeron diferencias significativas con respecto al control (Figura 13A, B; Tabla 9). Cuando se analizaron los efectos de P y T en los niveles intracelulares de ADAMTS13, se observó que no había diferencias significativas con respecto al control. Lo mismo se observó cuando P y T fueron combinadas con H (Figura 13A, B, C, Tabla 9).

**Figura 13**



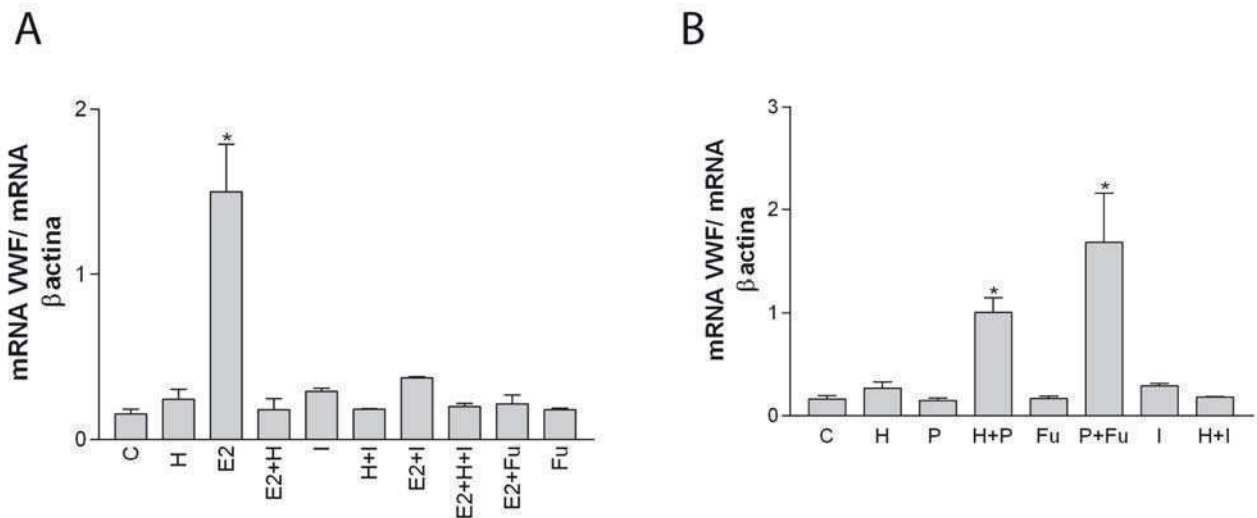
**Figura 13: ADAMTS13 en extractos celulares de HUVEC.** Células sin tratar o tratadas con H, E2, E2+H, P, P+H, T, T+H. Análisis densitométrico del western blot de anti-ADAMTS13. Los datos son representados como un aumento en los niveles de ADAMTS13. Los resultados son medias  $\pm$  DS de 3 experimentos separados, \*  $p < 0.05$  determinado por ANOVA. HUVEC incubadas con **(A)** H, E2, E2+H, P, P+H, T, T+H. Análisis representativo del western blot para la evaluación ADAMTS13 en sobrenadantes celulares de HUVEC. De cada muestra, 250  $\mu$ g de proteína se fraccionaron por electroforesis en gel de poliacrilamida al 6% en condiciones no reducidas. HUVEC incubadas con **(B)** H, E2, E2+H, P, P+H. **(C)** H, T, T+H.

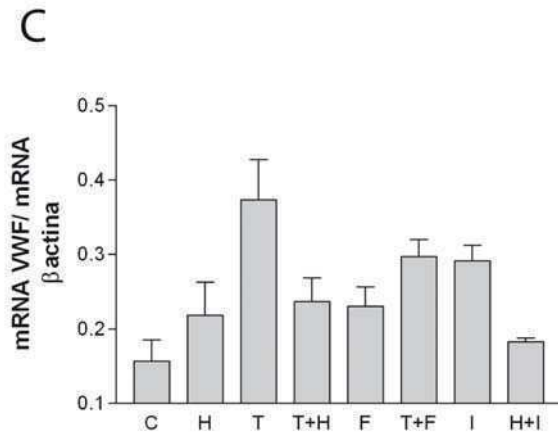
## 2.2 Evaluación de mRNA VWF y ADAMTS13

Para comprobar si los distintos tratamientos que inducían variaciones de ADAMTS13 y VWF, tanto intracelulares o liberados desde las HUVEC, tenían incidencia en la síntesis de ambas proteínas, se realizó un estudio de cuantificación relativa de los mRNA VWF y ADAMTS13, mediante la técnica de real time PCR.

La amplificación del producto deseado obtenido por la técnica de real time PCR, se confirmó por la temperatura de melting de los productos que se correspondían con la presencia de una banda en una corrida en gel de agarosa (ADAMTS13/ $\beta$ -actina: 2% agarosa, VWF: 4% agarosa), y posterior revelado con bromuro de etidio. Las temperaturas de melting para los distintos productos fueron: ADAMTS13: 86°C,  $\beta$ -actina: 89°C, VWF: 82°C. También se observa que en los controles negativos, puede haber un pico de temperatura de melting que corresponde a dímeros de primer. La Figura 14 muestra los resultados del efecto de E2, H, inhibidores de H y sus combinaciones sobre la síntesis del mRNA VWF en HUVEC. Se observó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de 9 veces en los niveles de mRNA VWF, cuando las HUVEC fueron incubadas con E2. Sin embargo, cuando E2 se combinó con H, se produjo una disminución significativa ( $p < 0.05$ ) de 8 veces en los niveles de mRNA VWF (Tabla 10). Los niveles de mRNA de VWF no se modificaron con los demás tratamientos (Figura 14).

**Figura 14**





**Figura 14: Análisis de cuantificación relativa de mRNA VWF.** Los datos corresponden a la media  $\pm$  DS de 5 experimentos separados, \*  $p < 0.05$  determinado por ANOVA. HUVEC incubadas con **(A)** H, E2, E2+H, I, H+I, E2+I, E2+H+I, 2+Fu, Fu. **(B)** H, P, P+H, Fu, P+Fu, I, H+I. **(C)** H, T, T+H, F, T+F, I, H+I.

También se analizó el efecto de P sobre la síntesis de mRNA de VWF (Figura 15B). Se observó que la incubación con P de las HUVEC no producía diferencias significativas en los niveles de mRNA VWF con respecto al control. Sin embargo, cuando P era combinada con H, se observaba un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de 6 veces con respecto al control, y un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de 4 y 7 veces con respecto a H y P respectivamente. Además, se observó que cuando P era combinada con su inhibidor fulvestrant, se producía un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de 11 veces con respecto a P, y que cuando las HUVEC eran incubadas sólo con fulvestrant no se producía ninguna modificación en los niveles de mRNA con respecto al control y a P (Figura 14, Tabla 10).

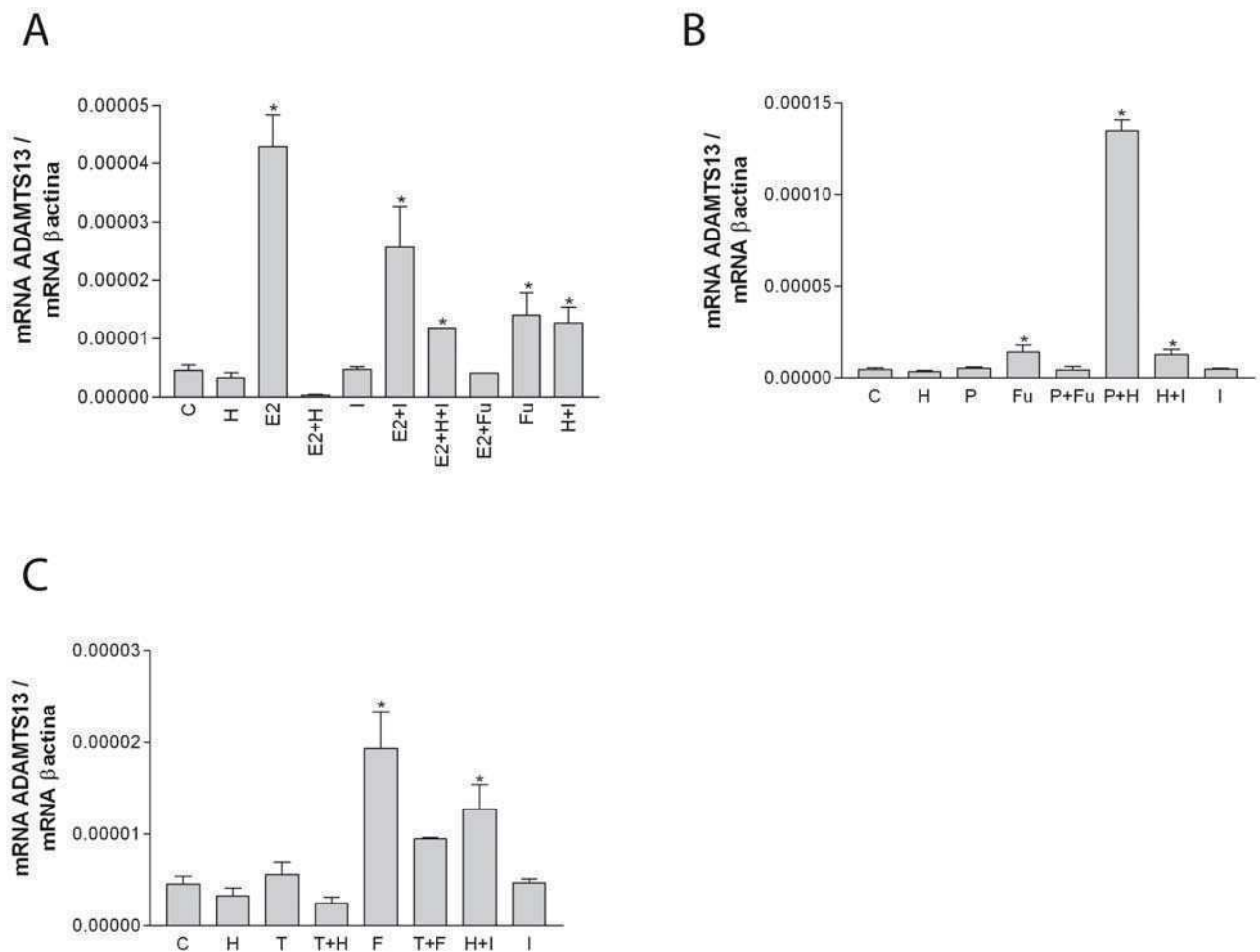
De la misma manera se analizó la respuesta de las HUVEC en las incubaciones con T. La Figura 14 muestra que el contenido de mRNA VWF como respuesta a las incubaciones con T, H, flutamida y sus combinaciones, no cambió de forma significativa con respecto al control (Tabla 10).

A continuación se determinó si los niveles de mRNA ADAMTS13 eran afectados por las distintas hormonas utilizadas, o por la combinación de estas con H.

El tratamiento de las HUVEC con E2 fue significativamente ( $p < 0.05$ ) diferente a los tratamientos con H, inhibidores de H, y sus combinaciones con E2, aumentando 9 veces los niveles de mRNA ADAMTS13. Cuando E2 se combinó con H, los niveles del mensajero disminuyeron significativamente ( $p < 0.05$ ) 140 veces con respecto a E2 (Figura 15, Tabla 11). Cuando E2 y H fueron combinadas con los inhibidores de H se produjo un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de los niveles entre 3 y 5 veces con

respecto al control. Así como la incubación de las HUVEC con P no produjo un aumento significativo del mRNA de VWF, tampoco tuvo efecto sobre el mRNA de ADAMTS13. Sin embargo, su combinación con H, produjo un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de 30 veces con respecto al control de células sin tratar (Figura 15, Tabla 11). Las incubaciones de las HUVEC con T y sus combinaciones con H, inhibidores de H y flutamida no produjeron diferencias significativas en los niveles de mRNA ADAMTS13, pero el tratamiento con flutamida produjo un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de 4 veces con respecto al control (Figura 15, Tabla 11).

**Figura 15**



**Figura 15: Análisis de cuantificación relativa de mRNA ADAMTS13.** Los datos corresponden a la media  $\pm$  DS de 5 experimentos separados, \*  $p < 0.05$  entre tratamientos y

control determinado por ANOVA. HUVEC incubadas con **(A)** H, E2, E2+H, I, H+I, E2+I, E2+H+I, 2+Fu, Fu. **(B)** H, P, P+H, Fu, P+Fu, I, H+I. **(C)** H, T, T+H, F, T+F, I, H+I.

### **2.3 Resumen: Efecto de las hormonas determinantes del sexo e histamina en la producción de VWF y ADAMTS13 en HUVEC.**

En las HUVEC, E2 produce un aumento del mRNA VWF y mRNA ADAMTS13, así como también un aumento de la ADAMTS13 intracelular, sin embargo no afecta el contenido intracelular, ni la liberación de VWF. Cuando E2 es combinado con H no producen cambios en los niveles de los mRNA, pero si disminuye la liberación de VWF producida por la H, y aumenta la liberación de ADAMTS13 inhibida por H.

Los tratamientos con P y T no modifican ninguno de los parámetros evaluados, tanto para VWF como para ADAMTS13. Sin embargo cuando se combina P con H se produce un aumento en los niveles de ambos mRNA. Este aumento observado se traduce para ADAMTS13 en proteína liberada, sin embargo se observa una disminución de VWF tanto liberado como intracelular. La combinación de T con H, no produce aumento de los mRNA, pero si una disminución en la liberación de ambas proteínas.



## Discusión

### 1. Rol de los estrógenos y andrógenos en la proliferación y apoptosis de las células endoteliales.

En los últimos años se han descrito numerosos síntomas y efectos adversos asociados con el desbalance de la relación estrógenos-andrógenos. La disminución de los niveles de andrógenos en la mujer, con predominio de la influencia estrogénica, ha sido relacionada con la aparición de numerosos efectos adversos, entre los que ocupa un papel destacado el aumento de la incidencia de tumores ginecológicos. Sin embargo, encontramos diversas situaciones (terapia hormonal sustitutiva, transsexualidad femenina a masculina, entre otras) en las que el desbalance favorece a los andrógenos, alcanzándose niveles supranormales de los mismos. Estos elevados niveles de andrógenos también han sido correlacionados con la aparición de efectos adversos sobre el sistema reproductivo femenino, incluyendo el crecimiento anormal y la posible tumorigenicidad. Debido a la importancia del desbalance en las hormonas esteroideas, es necesario poder predecir las consecuencias en la respuesta celular (proliferación-apoptosis). Este estudio eligió las HUVEC como modelo celular "in vitro" para evaluar el efecto apoptótico o proliferativo de las hormonas esteroideas.

#### 1.1 Estradiol y proliferación en HUVEC vía fosforilación ERK2.

Harrison y Mckee demostraron que la utilización de dosis no fisiológicas de E2 en cultivo de CE, producía un leve incremento en la replicación celular (109). Kawagoe y col. demostraron que el raloxifeno, que tiene acciones vasoprotectoras parecidas al estrógeno, producía un aumento en la proliferación celular (140). Se ha descrito que E2 promueve la activación de ERK1/2 en distintas líneas celulares y cultivos primarios (128-129, 141). Sin embargo, en referencia a las CE, se ha descrito que el E2 en distintos experimentos *in vitro*, promueve efectos divergentes en la vía de transducción de señales. Sengupta y col. han demostrado que el E2, luego de 1h de exposición, causa un aumento en la fosforilación de ERK1/2 en las HUVEC, que es sostenido por 4h (142). Por otro lado Juan y col., observaron que E2 inhibe la vía de las ERK en las CE, a través de la supresión de la expresión del gen ET-1 (143).

Los resultados presentados en esta tesis, indican que E2 a dosis fisiológicas, tiene un efecto proliferativo sobre las HUVEC, que estaría mediado por la activación de ERK2. El efecto se observa durante el período de 1h de incubación. No se observa una fosforilación de ERK1. Cuando las HUVEC fueron incubadas en un medio completo, no había diferencias significativas con el agregado de E2 en distintas concentraciones, sin embargo, cuando el medio carecía de SFB, las HUVEC solo eran capaces de crecer en presencia de E2.

## **1.2 Progesterona y apoptosis en HUVEC, vía fosforilación p38 y JNK.**

Vázquez y col, presentaron un trabajo utilizando CE de dermis humana, incubadas con concentraciones subfisiológicas (menores a 1µM) de P. Ellos evaluaron que en esas condiciones P, producía una reducción en la incorporación de <sup>3</sup>H (técnica utilizada para medir proliferación) (144). También se han realizado trabajos donde se combinan las incubaciones de E2 y P en CE del endometrio humano, donde se observó que el incremento de las concentraciones de P en combinación con E2 disminuía el porcentaje de células apoptóticas observadas (145). Además, en un estudio realizado en ratas Sprague–Dawley preñadas, donde se midió la actividad de diferentes caspasas, se observó que había un aumento de la caspasa 2, 8 y 9 que se correspondían con el pico de la concentración de P en la hembra preñada, produciendo un aumento en el número de células apoptóticas de ovario (146).

Los datos de este trabajo demuestran que P en dosis suprafisiológicas promueve la apoptosis en las HUVEC, y produce una activación de p38 y JNK. No hemos probado dosis subfisiológicas de P, por lo tanto es difícil comparar las condiciones presentadas por Vázquez y col. Sin embargo, se puede concluir que en dosis fisiológicas P no promueve la muerte celular en las HUVEC. El estudio realizado por Sha y col. combina E2 y P, observando una disminución en el porcentaje de células apoptóticas. Aunque a priori, nuestros resultados no tienen concordancia debido a los efectos de P, si coinciden los resultados obtenidos para la incubación de las HUVEC con E2, en donde se observaron efectos proliferativos. Podría especularse, que la combinación de ambas hormonas a la dosis utilizada por Sha y col, inhibe el efecto de la incubación con P. Además, el estudio se realiza en diferentes tipos celulares, CE en nuestro caso vs las células endometriales en el reporte de Sha.

Reportamos por primera vez que P en dosis suprafisiológicas es capaz de aumentar la fosforilación de p38 y JNK. A partir de la activación de JNK, se fosforila y activa c-jun, que es un componente del factor de transcripción AP-1, que regula distintos genes involucrados en la apoptosis (147). Los efectos de la fosforilación de p38 son similares a los de JNK (148) involucrando factores de transcripción y citoquinas proinflamatorias. Por lo tanto P estaría induciendo la apoptosis en las HUVEC a través de la activación de p38 y JNK. No se encontró bibliografía que documente la activación de p38 y JNK en HUVEC debido a la acción de P. Sin embargo, un trabajo realizado en una línea celular de cáncer de mama (T47D-YB) demuestra que la incubación de estas células con 20nM R5020 (análogo de progestina) y 30 ng/ml de EGF (factor de crecimiento epidérmico) producen un aumento en la fosforilación de de ERK1/2, p38 y JNK (149). Aunque las células y las condiciones dispuestas por Lange y col. para visualizar la activación de JNK y p38 por análogos de progesterona, son distintas a las utilizadas

en este trabajo, podría utilizarse como antecedente de que P tiene una acción directa sobre la vía de las MAPK.

### **1.2 Testosterona y apoptosis en HUVEC, vía fosforilación p38 y JNK.**

Se sabe que T promueve la apoptosis en líneas de CE, observándose una reducción de la expresión de Bcl-2 (antiapoptótica) y un incremento en el número de células apoptóticas (134). En este trabajo se observó el mismo fenómeno, aunque en concentraciones de la hormona mayores a las fisiológicas. Quizás la diferencia del efecto de las concentraciones resida en el uso de cultivos primarios o líneas celulares y el número de receptores para la hormona en cada uno.

Así como no se encontraron antecedentes en HUVEC para la activación de p38 y JNK debido a P, tampoco se encontraron con respecto a T. Sin embargo, un estudio realizado en macrófagos de ratones machos obtenidos después de un trauma hemorrágico, demostró que la fosforilación de p38 estaba significativamente aumentada en ratones intactos comparándolos con ratones castrados. Los autores concluyeron que la testosterona podría ser responsable de lo observado (131). Estos resultados, apoyarían los observados en este trabajo, en cuanto al estímulo producido por T en la activación de p38. Una observación interesante sería la realizada por Shimada y col. (150), en la cual, en células de cáncer de próstata (LNCaP) incubadas con dihidrotestosterona era necesaria la activación de p38 y JNK para que las células entraran en apoptosis. Lo anterior, permitió suponer que cuando se observaba un aumento en el número de células apoptóticas por la incubación con T (asimismo con P), podría estar activándose JNK además de p38. Los resultados posteriores confirmaron este supuesto, observándose que T en dosis suprafisiológicas producía un incremento en la fosforilación de p38 y JNK.

## **2. Rol de los estrógenos y andrógenos en la producción y liberación de VWF y ADAMTS13 en las células endoteliales. Su relación con histamina.**

Se sabe que, durante el embarazo, ocurren cambios en los mecanismos hemostáticos: la concentración plasmática de fibrinógeno y de Factor XII aumentan, y se observa un aumento muy significativo de Factor VIII, y VWF. Moser y col. observaron que el aumento en la concentración de VWF en perras Doberman-pinschers embarazadas puede estar asociado con cambios en las concentraciones de hormonas reproductivas. Sin embargo, el aumento de la concentración de VWF durante el embarazo puede implicar otros factores, debido a que la concentración de VWF no ha cambiado durante el ciclo estral de las perras no embarazadas, a pesar del aumento en las concentraciones de  $17\beta$ -estradiol y progesterona (151). Ha sido descrito que la terapia hormonal en la postmenopausia, produce un aumento en los factores de riesgo

para la trombosis arterial y venosa. En un estudio realizado con 220 mujeres sanas, a las que les fue suministrada una dosis baja de raloxifeno (agonista del estradiol), se observó un incremento en los niveles de VWF (152). Por otro lado, la terapia hormonal oral redujo los niveles plasmáticos de moléculas de adhesión, mientras que la terapia con estrógenos transdérmicos redujo los niveles de VWF (153).

En un estudio realizado en células U2-OS/ER $\alpha$  (línea celular de osteosarcoma humano) incubadas con fitoestrógenos, se observó un incremento del mRNA de VWF vía ER $\alpha$  y ER $\beta$  (154).

Clásicamente se ha considerado que los estrógenos orales, por su paso hepático, aumentan el riesgo de trombosis. Esto ha sido reafirmado por observaciones que muestran que las mujeres usuarias de terapia hormonal de reemplazo tienen mayor riesgo de enfermedad tromboembólica (155-156). Diferentes estudios han mostrado que la terapia oral aumenta algunos factores de coagulación, pero compensa este efecto, aumentando la fibrinólisis. Scarabin demostró que el estradiol oral, no así el transdérmico, favorecía la coagulación, aumentando el péptido de activación de la protrombina y disminuyendo la actividad de la antitrombina, e incrementaba la actividad fibrinolítica reduciendo el inhibidor del activador del plasminógeno (PAI-1) y del plasminógeno de tipo tisular (157). Este autor no observó cambios, entre las usuarias del cualquiera de los tipos de estrógenos y las mujeres controles, en los niveles de fibrinógeno, factor VII, VWF, proteína C, dímero D de fibrina y plasminógeno. Kroon, en otro estudio, encontró que los estrógenos transdérmicos administrados como gel, tienen un perfil antitrombótico, ya que disminuyen el fibrinógeno y el factor VII, pero también disminuyen la antitrombina (158). Sin embargo, no hay información, acerca del VWF y su relación con la testosterona, ya sea en cuanto a la síntesis o liberación de este.

La PTT es un desorden hematológico, que está clínicamente caracterizado por trombocitopenia, anemia hemolítica microangiopática, fiebre, síntomas neurológicos, renales y cardíacos. La PTT estaría asociada con una disminución en la actividad de la ADAMTS13 o con la presencia de autoanticuerpos contra ADAMTS13. Es conocida la relación entre PTT y embarazo. Un aumento del riesgo de episodios agudos de PTT durante el embarazo puede estar relacionado con el aumento de la concentración plasmática de VWF que se produce durante el embarazo (159), asociado con una disminución correspondiente de ADAMTS13 (160). La mayor frecuencia de PTT-HUS entre las mujeres, especialmente durante el embarazo, también podría estar relacionada con la capacidad del estrógeno para potenciar la activación plaquetaria y agregación (161). Cualquier condición que cause un aumento de la concentración de VWF en el plasma (162), potencialmente puede causar una disminución

correspondiente de ADAMTS13 (163-164). Sin embargo, no hay información, acerca de la ADAMTS13 y su relación directa con hormonas esteroideas, ya sea en cuanto a la síntesis o liberación de esta.

### **2.1 Regulación producida por estradiol del sistema VWF/ADAMTS13.**

Los resultados obtenidos, indican que E2 estaría actuando a nivel de la regulación de la expresión del mRNA en ambos genes. Sin embargo, el VWF tanto intracelular como liberado, no aumenta con respecto a la transcripción del mensajero. Esto podría explicarse si existiera algún mecanismo que regule la traducción de la proteína del VWF. Este mecanismo no involucraría al E2, ya que el mRNA de ADAMTS13 se traduce a proteína. En la bibliografía no se encuentra ningún antecedente sobre la regulación de la traducción de VWF. Sin embargo, se ha descrito que en células HeLa cotransfectadas con ADAMTS13 y VWF, la ADAMTS13 es capaz de degradar al VWF en el retículo endoplasmático (RE), ya que el VWF tiene expuesto el sitio de clivaje de la enzima (165-166). Esto lleva a pensar, que el exceso de ADAMTS13 producido por la estimulación con E2, sería capaz de clivar al VWF en el RE, y por consiguiente no se observa el aumento de la proteína.

#### **2.1.1 Inhibición producida por estradiol en la respuesta de histamina.**

Cuando E2 se combina con H, se produce una inhibición de la síntesis de ambos mensajeros, así como también una inhibición en la liberación de VWF. La H es capaz de regular la transcripción de genes, a través de la vía de la PKC (167), por medio de esta u otra vía H podría estar regulando la transcripción de los mRNA de VWF y ADAMTS13.

La liberación de VWF producida por H, es regulada por picos de aumento en los niveles de  $Ca^{2+}$  citoplasmáticos (168). Se ha descubierto que E2 en dosis farmacológicas, regula de forma activa canales de  $Ca^{2+}$  en la membrana mitocondrial, aumentando el pasaje de  $Ca^{2+}$  citoplasmático a la mitocondria (169). Además, H regula la liberación de  $Ca^{2+}$  intracelular, a través de su interacción con el citocromo P450 en la membrana del RE liso (170). Esta unión puede ser inhibida por diferentes hormonas tales como, estradiol, progesterona y testosterona (171). Con respecto al mecanismo de inhibición producido por E2, podría decirse que E2 estaría inhibiendo la acción del citocromo P450 y activando los canales de  $Ca^{2+}$  mitocondriales, disminuyendo de esta forma los niveles citoplasmáticos, e impidiendo la formación de picos de  $Ca^{2+}$  que permitan la liberación del VWF desde los cuerpos de Weibel-Palade.

### **2.2 Sinergismo en la regulación de VWF y ADAMTS13 por la combinación de progesterona e histamina.**

Los resultados mostraron que P a dosis fisiológicas, no interviene en los mecanismos de regulación de VWF y ADAMTS13. Cuando P es incubada con H se observa un

aumento en la transcripción de ambos mRNA. Sin embargo, en la evaluación de VWF tanto intracelular como liberado, se observó una disminución en los niveles de VWF. Esta observación podría justificarse con el aumento de ADAMTS13 observado, pudiendo esta clivar en el RE al VWF sintetizado. Además de este mecanismo, podría estar participando el mecanismo de inhibición de la progesterona con el citocromo P450.

### **2.3 Inhibición en la liberación de VWF y ADAMTS13 producida por la combinación de testosterona e histamina.**

Las observaciones para las incubaciones de las HUVEC con T, no produjeron diferencias con respecto a los controles utilizados. Sin embargo, en la combinación con H, se observó una inhibición producida por T, con respecto a la liberación de VWF producida por H, y una inhibición de H con respecto a la liberación de ADAMTS13 producida por T. Se podría pensar que la inhibición de la liberación del VWF en la incubación con T combinada con H, podría deberse a la interacción de T con el citocromo P450, inhibiendo así el influjo de  $Ca^{2+}$  al citoplasma e impidiendo la liberación de VWF desde los cuerpos de Weibel-Palade. Con respecto a la liberación de ADAMTS13, no hay antecedentes que justifiquen lo observado, siendo además T la única en producir este efecto de todas las hormonas evaluadas.

### **3. Implicancias clínicas**

Un aumento en la concentración de histamina durante el tercer trimestre de embarazo, no produciría liberación crítica de VWF desde las CE, posiblemente por el aumento de estradiol, que produce inhibición sobre el efecto de la histamina. Los niveles disminuidos de ADAMTS13, inducidos por la combinación de histamina y estradiol como se mostró en los resultados de esta tesis, son característicos del final del embarazo.

Además, el aumento de estradiol promovería la característica proliferación celular del embarazo, vía activación de ERK2. El aumento de mRNA de VWF y mRNA ADAMTS13 producido por la combinación de progesterona e histamina, no tiene un paralelismo con aumento de liberación de las mismas. Sin embargo, la liberación observada de estas proteínas por el estímulo con progesterona tiene relación con los resultados observados para estradiol. Esto se relacionaría con el hecho de que ambas hormonas se encuentran en las concentraciones habituales del tercer trimestre. Además, se observó que a concentraciones suprafisiológicas la progesterona induce apoptosis en las HUVEC, vía activación de p38 y JNK. Una disminución en los niveles de progesterona, suele estar acompañada de una pérdida del embrión, pero no hay antecedentes con respecto a un incremento en sus niveles. La testosterona en

concentraciones fisiológicas no produce efectos sobre la liberación de VWF y ADAMTS13, y presenta el mismo efecto que la progesterona en condiciones suprafisiológicas, con respecto a la apoptosis celular. Estos resultados podrían ser similar a los que se obtiene en el embarazo de mola, en el cual hay elevados niveles de testosterona y no se observa la formación del embrión; o en los casos en que los elevados niveles de testosterona están relacionados con una disminución del crecimiento en el útero.

## **Conclusiones**

**1-** el efecto proliferativo del estradiol en HUVEC, ocurre a través de un aumento de la fosforilación de ERK2, inducido por el estímulo de la privación del suero.

**2-** la progesterona y testosterona en dosis suprafisiológicas promueven la apoptosis de HUVEC vía activación de p38 y JNK

**3-** el estradiol, la progesterona y testosterona, no producen ningún cambio en la liberación de VWF en las HUVEC, sin embargo combinadas con histamina, agonista de la liberación de VWF, producen inhibición de la actividad de la histamina

**4-** en la evaluación de la liberación de ADAMTS13 de las HUVEC, se observó que los tratamientos con estradiol, progesterona y testosterona no producían un cambio significativo, sin embargo el tratamiento con histamina produjo una disminución en los niveles de ADAMTS13, que fue revertida al combinarse con estradiol y progesterona.

**5-** el estradiol, produce un aumento en los niveles de mRNA VWF y mRNA ADAMTS13. En la síntesis de ambos mRNA, los estradiol y la histamina presentan un efecto antagónico y la combinación de progesterona e histamina presenta un efecto sinérgico.



## Material Adicional

Tabla 1: Análisis estadístico. Proliferación y muerte celular

A

Con respecto al control			
	media	DS	p
E2 0,5nM	101,5	10,3	0,796
E2 1nM	99,0	8,6	0,764
E2 2nM	103,9	8,5	0,237
E2 3nM	104,1	5,9	0,103
E2 4nM	104,9	7,5	0,103
Con respecto a E2			
	media	DS	p
E2 0nM +Fu	98,0	4,9	0,2
E2 0,5nM+Fu	99,2	11,7	0,72
E2 1nM+Fu	100,6	13,0	0,87
E2 2nM+Fu	103,7	17,5	1
E2 3nM+Fu	95,9	11,2	0,082
E2 4nM+Fu	98,3	11,0	0,256

B

Con respecto a E2			
	media	DS	p
E2 0nM	67,958112	2,6622429	<0,05
E2 0,5nM	82,340926	0,1050619	0,007
E2 1nM	89,985249	2,4540989	0,064
E2 2nM	86,968725	4,2726008	0,011
E2 3nM	83,125735	2,56276	<0,05
E2 4nM	98,264612	21,218012	0,607

C

Con respecto al control			
	media	DS	p
P 0,25µM	112,67	19,37	0,196
P 1µM	100,38	7,1	1
P 2µM	80,81	4,06	<0,05
P 4µM	56,94	9,35	<0,05
P 8µM	51,74	10,79	<0,05
Con respecto a P			
	media	DS	p
P 0,25µM+Fu	116,42	28,16	0,805
P 1µM+Fu	92,79	11,16	0,224
P 2µM+Fu	78,15	12,78	0,73
P 4µM+Fu	50,05	7,53	0,25
P 8µM+Fu	46,84	13,66	0,53

D

Con respecto al control			
	media	DS	p
T 0,06µM	88,78	12,89	0,116
T 0,3µM	92,37	15,17	0,32
T 0,6µM	88,7	11,13	0,072
T 0,12µM	79,49	11,11	<0,05
T 1,2µM	83,57	8,28	<0,05
T 2,4µM	62,72	10,94	<0,05
T 4,8µM	50,05	17,05	<0,05
T 9,6µM	38,72	14,85	<0,05
Con respecto a T			
	media	DS	p
T 0,06µM+F	93,27	14,31	0,607
T 0,3µM+F	93,81	16,21	0,93
T 0,6µM+F	90,51	14,14	0,83
T 0,12µM+F	81,63	12,47	0,84
T 1,2µM+F	90,63	12,39	0,37

**Tabla 1:** Análisis estadístico de los porcentajes de sobrevida en HUVEC incubadas con distintas dosis de **(A)** E2, **(B)** E2 en condiciones normales y de hambreado **(C)** P y **(D)** T. Test: Kruskal-Wallis ( $\alpha=0.05$ ).

**Tabla 2: Análisis Estadístico. Apoptosis, Anexina V/Ioduro de propidio**

	Media	D.E.	p
C AV/IP	0,96	0,21	<0,05
E2 1nM	1,09	0,18	0,46
P 1uM	0,63	0,17	0,102
P 2uM	8,7	1,24	<0,05
P 4uM	20,56	2,2	<0,05
PNH	0,79	0,13	0,299
PNM	0,63	0,24	0,148
PNE	0,42	0,16	0,069
T 0,06uM	0,79	0,13	0,269
T 1,2uM	4,73	0,16	<0,05
T 2,4uM	17,07	1,39	<0,05
T 4,8uM	21,13	2,13	<0,05
T 9,8uM	34,45	2,38	<0,05
TNF-alpha 40ng/ml	25,65	2,98	<0,05

**Tabla 2:** Análisis estadístico de los porcentajes de apoptosis en HUVEC incubadas con PNM, PNE, PNH, E2, P y T. Test: ANOVA, comparación a posteriori: SNK ( $\alpha=0.05$ ).

**Tabla 3: Análisis Estadístico. P-ERK1/2**

	P-ERK1			P-ERK2		
	media	DS	p	media	DS	p
C	0,8	0,21		0,7	0,19	
NFP	0,8	0,17	1	0,5	0,17	0,246
NMP	0,6	0,17	0,288	0,6	0,27	0,628
NFP-p	0,6	0,26	0,391	0,8	0,13	0,494
E2	0,6	0,15	0,268	1,8	0,10	<0,05
E2+F	0,6	0,17	0,269	0,7	0,04	1
T	1,0	0,30	0,398	1,0	0,27	0,191
P	0,6	0,20	0,298	0,6	0,17	0,534

**Tabla 3:** Análisis estadístico de la fosforilación de ERK1/2 en HUVEC incubadas con PNM, PNE, PNH, E2, P y T. Test: ANOVA, comparación a posteriori: SNK ( $\alpha=0.05$ ). La comparación es entre el control y tratamientos.

**Tabla 4: Análisis Estadístico. P-p38**

**A**

	P-p38	dosis fisiológicas	
	media	DS	p
C	0,6	0,90	
PNM	1,0	0,90	0,615
PNH	5,8	1,86	<0,05
PNE	1,0	0,27	0,502
E2	0,6	0,15	1
T	4,7	0,89	<0,05
T+F	2,1	0,55	0,19
P	5,3	1,29	<0,05
P+Fu	0,6	0,17	1
F	0,3	0,89	0,702
Fu	0,6	0,26	1

**B**

	P-p38	dosis no fisiológicas	
	media	DS	p
C	0,8	0,20	
T	3,7	0,33	<0,05
T+F	2,4	0,31	<0,05
P	2,9	0,55	<0,05
P+Fu	2,3	0,26	<0,05
F	0,5	0,10	0,081
Fu	0,6	0,26	0,351

**Tabla 4:** Análisis estadístico de la fosforilación de p38 en HUVEC incubadas con PNM, PNE, PNH, E2, P y T. Test: ANOVA, comparación a posteriori: SNK ( $\alpha=0.05$ ). Las comparaciones son con respecto al control. **(A)** Dosis fisiológicas de hormonas. **(B)** Dosis suprafisiológicas de hormonas.

**Tabla 5: Análisis Estadístico. P-JNK**

**A**

	P-JNK	dosis fisiológicas	
	media	DS	p
C	0,400	0,10	
T	0,655	0,20	0,06
T+F	0,489	0,26	0,41
P	0,757	0,26	0,094
P+Fu	0,583	0,17	0,196
F	0,525	0,21	0,482
Fu	0,627	0,17	0,154

**B**

	P-JNK	dosis no fisiológicas	
	media	DS	p
C	0,406	0,10	
T	3,467	0,90	<0,05
T+F	2,964	0,27	<0,05
P	3,819	0,15	<0,05
P+Fu	4,088	0,89	<0,05
F	0,743	0,55	0,312
Fu	0,789	0,30	0,106

**Tabla 5:** Análisis estadístico de la fosforilación de JNK en HUVEC incubadas con P P+Fu T y T+F. Test: ANOVA, comparación a posteriori: SNK ( $\alpha=0.05$ ). Las comparaciones son entre tratamientos y control. **(A)** Dosis fisiológicas de hormonas. **(B)** Dosis suprafisiológicas de hormonas.

**Tabla 6: Análisis Estadístico. VWF: Ag**

**A**

con respecto a E2			
	media	DS	p
E2+Fu	1,07	0,02	0,34
E2+H	1,11	0,26	0,32
E2+H+I	1,63	0,21	<0,05
H	2,56	0,63	<0,05
con respecto a H			
	media	DS	p
E2	0,96	0,18	<0,05
E2+H	1,11	0,26	<0,05
H+I	1,17	0,11	<0,05
I	1,92	0,08	0,148

**B**

con respecto a P			
	media	DS	p
H	2,63	0,63	<0,05
P+H	1,05	0,1	0,088
con respecto a H			
	media	DS	p
P	0,76	0,2	<0,05
P+H	1,05	0,1	<0,05

**C**

con respecto a T			
	media	DS	p
H	2,56	0,63	<0,05
T+H	0,94	0,12	0,079
con respecto a H			
	media	DS	p
T	0,7	0,13	<0,05
T+H	0,94	0,12	<0,05

**Tabla 6:** Análisis estadístico de la liberación de VWF:Ag en HUVEC. Test: ANOVA, comparación a posteriori: SNK ( $\alpha=0.05$ ). HUVEC incubadas con **(A)** H, E2, E2+H, Fu, E2+Fu, E2+I, E2+H+I. **(B)** P P+H. **(C)** T y T+H.

**Tabla 7: Análisis Estadístico. VWF:Ag intracelular**

con respecto H			
	media	DS	p
E2	1,13	0,04	<0,05
P	1,21	0,32	<0,05
T	0,81	0,08	0,061
E2+H	0,82	0,06	0,063
P+H	0,53	0,11	0,339
T+H	0,77	0,1	0,055
con respecto a E2			
	media	DS	p
E2+H	0,82	0,06	<0,05
con respecto a P			
	media	DS	p
P+H	0,53	0,11	<0,05
con respecto a T			
	media	DS	p
T+H	0,77	0,1	0,617

**Tabla 7:** Análisis estadístico de VWF:Ag intracelular en HUVEC. Test: Kruskal Wallis. HUVEC incubadas con H, E2, E2+H, P P+H, T y T+H.

**Tabla 8: Análisis Estadístico. ADAMTS13 liberada**

**A**

con respecto a C			
	media	DS	p
H	1,89	0,02	<0,05
E2	9,61	2,1	<0,05
E2+H	6,01	0,85	<0,05
P	16,48	2,69	0,734
P+H	25,48	1,69	<0,05
T	13,48	2,53	0,401
T+H	3,89	2,25	<0,05
con respecto a E2			
	media	DS	p
H	1,89	0,02	<0,05
E2+H	6,01	0,85	<0,05

**B**

con respecto a P			
	media	DS	p
H	1,89	0,02	<0,05
P+H	25,48	1,69	<0,05
con respecto a T			
	media	DS	p
H	1,89	0,02	<0,05
T+H	3,89	2,25	<0,05

**Tabla 8:** Análisis estadístico de la liberación de ADAMTS13 en HUVEC. Test: ANOVA, comparación a posteriori: SNK ( $\alpha=0.05$ ). HUVEC incubadas con H, E2, E2+H, P, P+H, T y T+H.

**Tabla 9: Análisis Estadístico. ADAMTS13 intracelular**

con respecto a C			
	media	DS	p
H	1,89	0,25	0,078
E2	25,48	2,36	<0,05
E2+H	1,29	0,58	<0,05
P	1,39	0,45	<0,05
P+H	2,39	0,75	0,443
T	1,27	0,23	<0,05
T+H	2,13	0,56	0,213

**Tabla 9:** Análisis estadístico de ADAMTS13 en los extractos celulares de HUVEC. Test: ANOVA, comparación a posteriori: SNK ( $\alpha=0.05$ ). HUVEC incubadas con H, E2, E2+H, P, P+H, T y T+H.

**Tabla 10: Análisis Estadístico. mRNA VWF**

con respecto a C			
	media	DS	p
H	0,24	0,15	0,504
E2	1,5	0,5	<0,05
E2+H	0,18	0,12	0,907
I	0,29	0,05	0,073
H+I	0,18	0,01	0,819
E2+I	0,38	0,01	0,059
E2+H+I	0,2	0,03	0,533
E2+Fu	0,22	0,08	0,461
Fu	0,17	0,01	1
P	0,15	0,04	0,69
P+H	1	0,25	<0,05
P+Fu	1,68	0,83	<0,05
T	0,37	0,13	0,051
T+H	0,24	0,06	0,259
T+F	0,3	0,04	0,054
F	0,23	0,05	0,294

**Tabla 10:** Análisis estadístico del mRNA de VWF. Test: ANOVA, comparación a posteriori: SNK ( $\alpha=0.05$ ). Letras distintas significan diferencias significativas. ( $p<0.05$ ). HUVEC incubadas con H, E2, E2+H, E2+I, E2+H+I, Fu, E2+Fu, P, P+H, P+Fu, T, T+H, F y T+F.



**Tabla 11: Análisis Estadístico. mRNA ADAMTS13**

con respecto a C			
	media	DS	p
H	3,30E-06	2,10E-06	0,519
E2	4,30E-05	1,10E-05	<0,05
E2+H	3,00E-07	2,30E-07	0,53
I	4,70E-06	8,30E-07	0,949
H+I	1,30E-05	6,10E-06	<0,05
E2+I	2,60E-05	1,40E-05	<0,05
E2+H+I	1,20E-05	1,20E-05	<0,05
E2+Fu	4,10E-06	1,30E-06	0,767
Fu	1,40E-05	6,60E-06	<0,05
P	5,20E-06	1,70E-06	0,742
P+H	1,40E-04	1,10E-05	<0,05
P+Fu	4,30E-06	2,60E-06	0,89
T	5,60E-06	3,00E-06	0,753
T+H	2,50E-06	1,50E-06	0,268
T+F	9,50E-06	2,10E-07	<0,05
F	1,90E-05	7,10E-06	<0,05

**Tabla 11:** Análisis estadístico del mRNA ADAMTS13. Test: ANOVA, comparación a posteriori: SNK ( $\alpha=0.05$ ). HUVEC incubadas con H, E2, E2+H, E2+I, E2+H+I, Fu, E2+Fu, P, P+H, P+Fu, T, T+H, F y T+F.

## **Bibliografía**

1. Wagner DD. Cell biology of von Willebrand factor. *Annu Rev Cell Biol* 1990; 6: 217-246.
2. Nachman R, Levine R, Jaffe EA. Synthesis of factor VIII antigen by cultured Guinea pig megakaryocytes. *J Clin Invest* 1977; 60: 914-921.
3. Jaffe EA, Hoyer LW, Nachman RL. Synthesis of antihemophilic factor antigen by cultured human endothelial cells. *J Clin Invest* 1973; 52: 2757-2764.
4. Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, Worrall NK, Shelton-Inloes BB, Sorace JM, Alevy YG, Sadler JE. Structure of the gene for human von Willebrand factor. *J Biol Chem* 1989; 264: 19514-19527.
5. Mancuso DJ, Tuley EA, Westfield LA, Lester-Mancuso TL, Le Beau MM, Sorace JM, Sadler JE. Human von Willebrand factor gene and pseudogene: Structural analysis and differentiation by polymerase chain reaction. *Biochemistry* 1991; 30: 253-259.
6. Shelton-Inloes BB, Chehab FF, Mannucci PM, Federicci AB, Sadler JE. Gene deletions correlated with the development of alloantibodies in vWD. *J Clin Invest* 1987; 79: 1459-1462.
7. Fay PJ, Kawai Y, Wagner DD, Ginsburg D, Bonthron DT, Ohlsson-Wilhelm BM, Chavin SI, Abraham GN, Handin RI, Orkin SH, Montgomery RR, Marder VJ: Propeptide of von Willebrand factor circulates in blood and is identical to von Willebrand antigen II. *Science* 1986.; 232: 995-998.
8. Titani K, Kumar S, Takio K et al: Amino acid sequence of human vWf. *Biochemistry* 1986; 25: 3171-3184.
9. Matsui T, Kihara C, Fujimura Y, Mizuochi T, Titani K: Carbohydrate analysis of human vWf with peroxidase-conjugated lectins. *Biochem Biophys Res Commun* 1991; 178: 1253-1259.
10. Matsui T, Kihara C, Mizuochi T: Structures of the asparagine-linked oligosaccharide chains of human vWf. Occurrence of blood group A, B, and H (O) structures. *J Biol Chem* 1992; 267: 8723-8731.
11. van de Ven WJM, Voorberg J, Fontijn R, Pannekoek H, van den Ouwenland AMW, van Duinoven HLP, Roebroek AJM, Siezen RJ. Furin is a subtilisin like proprotein processing enzyme in higher eukaryotes. *Mol Biol Rep* 1990; 14: 265-275.
12. Wise RJ, Barr PJ, Wong PA, Kiefer MC, Brake AJ, Kaufman RJ. Expression of a human proprotein processing enzyme. Correct cleavage of von Willebrand factor

precursor at a paired basic amino acid site. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 9378-9382.

13. Dent JA, Berkowitz SD, Ware J, Kasper CK, Ruggeri ZM. Identification of a cleavage site directing the immunochemical detection of molecular abnormalities in type IIA von Willebrand factor. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990; 87: 6306-6310.

14. Dent JA, Galbusera M, Ruggeri ZM. Heterogeneity of plasma von Willebrand factor multimers resulting from proteolysis of the constituent subunit. *J Clin Invest* 1991; 88: 774-782.

15. Wagner DD, Olmsted JB, Marder VJ. Immunolocalization of von Willebrand protein in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *J Cell Biol*. 1982;95:355–360

16. Ewenstein BM, Warhol MJ, Handin RI, Pober JS. Composition of the von Willebrand factor storage organelle (Weibel- Palade body) isolated from cultured human umbilical vein endothelial cells. *J Cell Biol*. 1987;104:1423–1433

17. Sadler JE. Biochemistry and genetics of von Willebrand factor. *Annu Rev Biochem*. 1998;67:395-424

18. Russel FD, Skepper JN, Davenport AP. Evidence using immunoelectron microscopy for regulated and constitutive pathways in the transport and release of endothelin. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1998; 31:1184-1191

19. Utgaard JO, Jahnsen FL, Bakka A, Brandtzaeg P, Haraldsen G. Rapid secretion of prestored interleukin 8 from Weibel-Palade bodies of microvascular endothelial cells. *J Exp Med*. 1998;188: 1751-1756.

20. Wolff B, Burns AR, Middleton J, Rot A. Endothelial cell “memory” of inflammatory stimulation: human venular endothelial cells store interleukin 8 in Weibel-Palade bodies. *J Exp Med*. 1998;188: 1757-1762.

21. Schnyder-Candrian S, Borsig L, Moser R, Berger EG. Localization of  $\alpha$ 1,3-fucosyltransferase VI in Weibel-Palade bodies of human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2000; 97:8369-8374

22. Giglin JP, Hewlett LJ and Hannah MJ. Basal secretion of VWF from human endothelial cells. *Blood* 2008; 112: 957-964

23. Wagner DD. The Weibel-Palade body: the storage granule for von Willebrand factor and P-selectin. *Thromb Haemost* 1993; 70:105-110.

24. Ruggeri Z. von Willebrand Factor. *J Clin Invest* 1997; 99: 559-564.

25. Bonthron DT, Handin RI, Kaufman RJ, Wasley LC, Orr EC, Mitscock LM, Ewenstein B, Loscalzo J, Ginsburg D, Orkin SH. Structure of pre-pro-von Willebrand factor and its expression in heterologous cells. *Nature* 1986; 324: 270-273.

26. Shelton-Inloes BB, Broze GJ Jr, Miletich JP, Sadler JE. Evolution of human von Willebrand Factor: cDNA sequence polymorphisms, repeated domains, and

relationship to von Willebrand antigen II. *Biochem Biophys Res Commun* 1987; 144: 657-665.

27. Verweij CL, Diergaarde PJ, Hart M, Pannekoek H. Full-length von Willebrand factor (vWF) cDNA encodes a highly repetitive protein considerably larger than the mature vWF subunit. *EMBO J* 1986; 5: 1839-1847.

28. Mohri H, Fujimura Y, Shima M, Yoshioka A, Houghten RA, Ruggeri ZM, Zimmerman TS. Structure of the von Willebrand Factor domain interacting with glycoprotein Ib. *J Biol Chem* 1988; 263: 17901-17904.

29. Mohri H, Yoshioka A, Zimmerman TS, Ruggeri ZM. Isolation of the von Willebrand factor domain interacting with platelet glycoprotein Ib, heparin and collagen and characterization of its three distinct functional size. *J Biol Chem* 1989; 264: 17361-17367.

30. Sugimoto M, Mohri H, McClintock RA, Ruggeri ZM. Identification of discontinuous von Willebrand factor sequences involved in complex formation with bothroctin. A model for the regulation of von Willebrand factor binding to platelet glycoprotein Ib. *J Biol Chem* 1991; 266: 18172-18178.

31. Vicente V, Houghten RA, Ruggeri ZM. Identification of a site in the alpha-chain of platelet glycoprotein-Ib that participates in von Willebrand factor binding. *J Biol Chem* 1990; 265: 274-280.

32. Fujimura Y, Titani K, Holland LZ, Roberts JR, Kostel P, Ruggeri ZM, Zimmerman TS. A heparin-binding domain of human von Willebrand factor. Characterization and localization of a tryptic fragment extending from amino acid residue Val449 to Lys728. *J Biol Chem* 1987; 262: 1734-1739.

33. Pareti FI, Fujimura Y, Dent JA, Hollan LZ, Zimmerman TS, Ruggeri ZM. Isolation and characterization of a collagen binding domain in human von Willebrand factor. *J Biol Chem* 1986; 261: 15310-15315.

34. Roth GJ, Titani K, Hoyer LW, Hickey MJ. Localization of binding site within human von Willebrand factor for monomeric Type III collagen. *Biochemistry* 1986; 25: 8357-8361.

35. Bahou WF, Ginsburg D, Sikkink R, Litwidler R, Fass DN. Monoclonal antibody to von Willebrand factor (vWF) inhibits Factor VIII binding. Localization of its antigenic determinant to a nonadecapeptide at the aminoterminal of the mature vWF polypeptide. *J Clin Invest* 1989; 84: 56-61.

36. Foster PA, Fulcher CA, Marti T, Titani K, Zimmerman TS. A major factor VIII binding domain resides within the amino-terminal 272 aminoacid residues of von Willebrand factor. *J Biol Chem* 1987; 262: 8443-8446.

37. Takahashi Y, Kalafatis M, Girma JP, Sewerin K, Andersson RO, Meyer D. Localization of a factor VIII binding domain on a 34 kilodalton fragment of the N-terminal portion of von Willebrand factor. *Blood* 1987; 70: 1679-1682.
38. Kalafatis M, Takahashi Y, Girma JP, Meyer D. Localization of a collagen-interactive domain of human von Willebrand factor between aminoacid residues Gly911 and Glu1365. *Blood* 1987; 70: 1577-1583.
39. Cruz MA, Yoan H, Lee JR, Wise RJ, Handin RI. Interaction of the von Willebrand factor (vWF) with collagen. Localization of the primary collagen-binding site by analysis of recombinant vWF A domain polypeptides. *J Biol Chem* 1995; 270: 10822-10827.
40. Lankhof H, Van Hoeij M, Schiphorst ME, Bracke M, Buw YP, Ijsseldijk MJ, Vink T, de Groot PG, Sixma JJ. A3 domain is essential for interaction of von Willebrand factor with collagen type III. *Thromb Haemost* 1996; 75: 950-958.
41. Beacham DA, Wise RJ, Turci CM, Handin RI. Selective inactivation of the Arg-Gly-Asp-Ser (RGDS) binding site in von Willebrand factor by site-directed mutagenesis. *J Biol Chem* 1992; 267: 3409-3415.
42. Bolton-Maggs PH, Lillicrap D, Goudemand J, Berntorp E. von Willebrand disease update: diagnostic and treatment dilemmas. *Haemophilia*. 2008; 3:56-61.
43. Sadler JE. A revised classification of von Willebrand disease. For the Subcommittee on von Willebrand Factor of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. *Thromb Haemost*. 1994;71:520-5.
44. Bork P, Beckmann G. The CUB domain: a widespread module in developmentally regulated proteins. *J Mol Biol*. 1993;231:539-545.
45. Bornstein P. Thrombospondins as matricellular modulators of cell function. *J Clin Invest*. 2001; 107:929-934
46. McLane MA, Marcinkiewicz C, Vijay-Kumar S, Wierzbicka-Patynowski I, Niewiarowski S. Viper venom disintegrins and related molecules. *Proc Soc Exp Biol Med*. 1998;219:109-119.
47. Levy GG, Nichols WC, Lian EC, et al. Mutations in a member of the ADAMTS gene family cause thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nature*. 2001; 413:488-494.
48. Gerritsen HE, Robles R, Lammle B, Furlan M. Partial amino acid sequence of purified von Willebrand factor-cleaving protease. *Blood*. 2001;98: 1654-1661.
49. Fujikawa K, Suzuki H, McMullen B, Chung D. Purification of human von Willebrand factor-cleaving protease and its identification as a new member of the metalloproteinase family. *Blood*. 2001;98: 1662-1666.
50. Kokame K, Matsumoto M, Soejima K, et al. Mutations and common polymorphisms in ADAMTS13 gene responsible for von Willebrand factor-cleaving protease activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002; 99:11902-11907.

51. Zheng X, Chung D, Takayama TK, Majerus EM, Sadler JE, Fujikawa K. Structure of von Willebrand factor cleaving protease (ADAMTS13), a metalloprotease involved in thrombotic thrombocytopenic purpura. *J Biol Chem*. 2001;276: 41059-41063.
52. Furlan M, Robles R, Galbusera M, et al. Von Willebrand factor-cleaving protease in thrombotic thrombocytopenic purpura and the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med* 1998; 339: 1578-1584
53. Furlan M, Robles R, Lämmle B. Partial purification and characterization of a protease from human plasma cleaving von Willebrand factor to fragments produced by in vivo proteolysis. *Blood* 1996; 87: 4223-4234
54. Suzuki M, Murata M, Matsubara Y, et al. Detection of von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS 13) in human platelets. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;313:212-216.
55. Turner L, Nolasco Z, Tao J, et al. Human endothelial cells synthesize and release ADAMTS 13. *J Thromb Haemost* 2006; 4: 1396–1404
56. Plaimauer B, Zimmermann K, Volkel D, et al. Cloning, expression, and functional characterization of the von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13). *Blood*. 2002;100:3626-3632.
57. Zheng X, Nishio K, Majerus EM, Sadler JE. Cleavage of von Willebrand factor requires the spacer domain of the metalloprotease ADAMTS13. *J Biol Chem*. 2003; 278:30136- 30141.
58. Soejima K, Matsumoto M, Kokame K, et al. ADAMTS 13 cysteine-rich/spacer domains are functionally essential for von Willebrand factor cleavage. *Blood*. 2003; 102:3232-3237.
59. Pimanda JE, Maekawa A, Wind T, Paxton J, Chesterman CN, Hogg PJ. Congenital thrombotic thrombocytopenic purpura in association with a mutation in the second CUB domain of ADAMTS13. *Blood*. 2004;103:627-9,
60. Plaimauer B, Fuhrmann J, Mohr G, Wernhart W, Bruno K, Ferrari S, Konetschny C, Antoine G, Rieger M, Scheiflinger F. Modulation of ADAMTS13 secretion and specific activity by a combination of common amino acid polymorphisms and a missense mutation. *Blood*. 2006;107:118-25
61. Tao Z, Wang Y, Choi H, Bernardo A, Nishio K, Sadler JE, López JA, Dong JF. Cleavage of ultralarge multimers of von Willebrand factor by C-terminal-truncated mutants of ADAMTS 13 under flow. *Blood*. 2005;106:141-3.
62. Tao Z, Peng Y, Nolasco L, Cal S, Lopez-Otin C, Li R, Moake JL, López JA, Dong JF. Recombinant CUB-1 domain polypeptide inhibits the cleavage of ULVWF strings by ADAMTS13 under flow conditions. *Blood*. 2005;106:4139-45

63. Banno F, Kaminaka K, Soejima K, Kokame K, Miyata T. Identification of strain-specific variants of mouse Adamts13 gene encoding von Willebrand factor-cleaving protease. *J Biol Chem.* 2004;279:30896-903
64. Cal S, Obaya AJ, Llamazares M, Garabaya C, Quesada V, Lopez-Otin C. Cloning, expression analysis, and structural characterization of seven novel human ADAMTSs, a family of metalloproteinases with disintegrin and thrombospondin-1 domains. *Gene.* 2002;283:49-62.,
65. Majerus EM, Zheng X, Tuley EA, Sadler JE. Cleavage of the ADAMTS13 propeptide is not required for protease activity. *J Biol Chem.* 2003; 278:46643-46648
66. Van Wart HE, Birkedal-Hansen H. The cysteine switch: a principle of regulation of metalloproteinase activity with potential applicability to the entire matrix metalloproteinase gene family. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87:5578-5582
67. Moake JL, Rudy CK, Troll JH, Weinstein MJ, Colannino NM, Azocar J, Seder RH, Hong SL and Deykin D. Unusually large plasma factor VIII: von Willebrand factor multimers in chronic relapsing thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 1982; 307:1432–1435
68. Asada Y, Sumiyoshi A, Hayashi T, Suzumiya J and Kaketani K. Immunohistochemistry of vascular lesion in thrombotic thrombocytopenic purpura, with special reference to factor VIII related antigen. *Thromb. Res.* 1985; 38:469–479.
69. Rock GA, Shumak KH, Buskard NA, Blanchette VS, Kelton JG, Nair RC and Spasoff RA. Comparison of plasma exchange with plasma infusion in the treatment of thrombotic thrombocytopenic purpura. Canadian Apheresis Study Group. *N Engl J Med* 1991; 325:393–397.
70. Furlan M and Lammle B. Deficiency of von Willebrand factor-cleaving protease in familial and acquired thrombotic thrombocytopenic purpura. *Ballieres Clin Haematol* 1998; 11:509–514.
71. Tsai HM and Lian EC. Antibodies to von Willebrand factor-cleaving protease in acute thrombotic thrombocytopenic purpura. *N Engl J Med* 1998; 339:1585–1594.
72. Savage B, Almus-Jacobs F, Ruggeri ZM. Specific synergy of multiple substrate-receptor interactions in platelet thrombus formation under flow. *Cell.* 1998;94:657-666.
- Andre P, Denis CV, Ware J, et al. Platelets adhere to and translocate on von Willebrand factor presented by endothelium in stimulated veins. *Blood.* 2000;96:3322-3328
73. Wagner DD, Burger PC. Platelets in inflammation and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.*2003;23:2131-2137

74. Dong JF, Moake JL, Nolasco L, et al. ADAMTS 13 rapidly cleaves newly secreted ultralarge von Willebrand factor multimers on the endothelial surface under flowing conditions. *Blood*. 2002;100:4033-4039.,
75. Padilla A, Moake JL, Bernardo A, et al. P-selectin anchors newly released ultralarge von Willebrand factor multimers to the endothelial cell surface. *Blood*. 2004;103:2150-2156.
76. Bernardo A, Ball C, Nolasco L, Moake JF, Dong JF. Effects of Inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultra-large von Willebrand factor multimers under flow. *Blood*. 2004; 104:100-106.
77. Mondillo AC, Patrignani AZ, Reche AC, Rivera EB, Pignataro OA. Dual Role of Histamine in Modulation of Leydig Cell Steroidogenesis via HRH1 and HRH2 Receptor Subtypes1. *Biol Reprod* 2005; 73:899-907
78. Falus A, Darvas S, Grossman N, (eds.) Histamine: Biology and Medical Aspects. Budapest: SpringMed Publishing Ltd.; 2004
79. Babe K, Serafin W. Histamina, Bradicinina y sus antagonistas. En: Goodman y Gilman A. Las bases farmacológicas de la terapéutica. México: Interamericana, 1996; 621-641.
80. Simons F. Antihistamines. In: Middleton (ed). *Alergy: Principles and practice*. USA: Mosby, 1998; 612-637
81. Liu C, Ma X, Jiang X et al. Cloning and pharmacological characterization of a fourth histamine receptor [H(4)] expressed in bone marrow. *Mol Pharmacol* 2001; 59: 420-426.
82. Katzung G, Julius D. Histamina, serotonina y alcaloides del comezuelo del centeno. En: *Farmacología básica y clínica*. México: El Manual Moderno, 2002; 307-336.
83. Arranc JM, Garbarg M, Schwartz JC. Auto-inhibition of brain histamine release mediated by a novel class (H3) of histamine receptor. *Nature* 1982; 302 (5911): 832-837.
84. Arrang JM, Garbarg M, Schwartz JC. Autoinhibition of histamine synthesis mediated by presynaptic H3-receptors. *Neuroscience* 1987; 23: 149-157.
85. Bedarida G, Bushell E, Blaschke TF et al. H1-and H2-histamine receptor-mediated vasodilation varies with aging in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1995; 58: 73-80.
86. Hough LB. Genomics meets histamine receptors: new subtypes, new receptors. *Mol Pharmacol* 2001; 59:415-419
87. Hill SJ, Ganellin CR, Timmerman H et al. International Union of Pharmacology. Classification of histamine receptors. *Pharmacol Rev* 1997; 49: 253-278



88. Wieland K, Laak AM, Smit MJ et al. Mutational analysis of the antagonist-binding site of the histamine H(1) receptor. *J Biol Chem* 1999; 274: 29994-30000.
89. Ter Laak AM, Venhorst J, Donne-Op den Kelder GM et al. The histamine H1-receptor antagonist binding site. A stereoselective pharmacophoric model based upon (semi)rigid H1-antagonists and including a known interaction site on the receptor. *J Med Chem* 1995; 38: 3351-3360.
90. Ter Laak AM, Timmerman H, Leurs R et al. Modelling and mutation studies on the histamine H1-receptor agonist binding site reveal different binding models for H1-agonists: Asp116(TM3) has a constitutive role in receptor stimulation. *J Comput Aided Mol Des* 1995; 9: 319-330
91. Nakamjura T, Itadani H, Kidaka Y et al. Molecular cloning and characterization of a new human histamine receptor, HH4R. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 279 (2): 615-620.
92. Ling P, Ngo K, Nguyen S et al. Histamine H4 receptor mediates eosinophil chemotaxis with cell shape change and adhesion molecule upregulation. *Br J Pharmacol* 2004; 142: 161-171
93. Kameswaran L, Pennefather JN, West GB. Possible role of histamine in rat pregnancy. *J Physiol* 1962; 164:138-149
94. Hine RJ, Orsini MW and Hegstrand LR. Changes in tissue histamine during the estrous cycle, pregnancy and pseudopregnancy in the golden hamster. *EBM* 1985; 179:271-278
95. Maintz L, Schwarzer V, Bieber T, van der Ven K and Novak N. Effects of histamine and diamine oxidase activities on pregnancy: a critical review *Hum Reprod* 2008 doi:10.1093/humupd/dmn014
96. Gruber CJ, Tschugguel W, Schneeberger C, et al. Mechanisms of disease: production and actions of estrogens. *N Engl J Med* 2002; 346:340-52
97. Coth B, Saadat G, Geller A, Scholz C, Schulze S, Friese K, Jeschke U. Human umbilical vascular endothelial cells express estrogen receptor beta (ER $\beta$ ) and progesterone receptor A (PR-A), but not ER $\alpha$  and PR-B. *Histochem Cell Biol* 2008; doi:10.1007/s00418-008-0426-7
98. Xuan Z, Wang LY, Jiang TY, Zhang HP, Dou Y, Zhao JH, Hong Z, Qiao ZD, Qiao JT. Effects of testosterone and 17- $\beta$ -estradiol on TNF- $\alpha$ -induced E-selectin and VCAM-1 expression in endothelial cells analysis of the underlying receptor pathways. *Life Sciences* 2002; 71:15-29
99. Izaguirre AR. Mecanismos Hemostáticos. En: *Fundamentos de Hematología*. Ruiz Argüelles GJ., eds. 1ª. Edición. Ed. Panamericana. México 1995: 190-204

100. Gottsäter A, Rendell M, Hulthén UL, Berntorp E, Mattiasson I. Hormone replacement therapy in healthy postmenopausal women: a randomized, placebo-controlled study of effects on coagulation and fibrinolytic factors. *J Intern Med* 2001; 249: 237-246
101. Koh KK, Mincemoyer R, Bui MN, Csako G, Pucino F, Guetta V, Waclawiw M, Cannon RO 3rd. Effects of hormone-replacement therapy on fibrinolysis in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1997; 336: 683-90
102. Sánchez Luceros A Farías CE, Amaral MM, Kempfer AC, Votta R, Marchese C, Salviú MJ, Woods AI, Meschengieser SS, Lazzari MA. von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) activity in normal non-pregnant women, pregnant and post-delivery women. *Thromb Haemost* 2004; 92: 1320-6
103. Tulchinsky D., Hobel C. H., Yeager E., Marshall J. R. Plasma estrone, estradiol, estriol, progesterone and 17-hydroxyprogesterone in human pregnancy: I. Normal pregnancy. *Am J Obstet Gynecol* 1972; 112:1095-1100
104. Sullivan JM and Fowlkes LP. The clinical aspects of estrogen and the cardiovascular system *Obstet Gynecol* 1996; 87:S36-S43
105. Scarabin PY, Alhenc-Gelas M, Plu-Bureau G, Taisne P, Agher R, Aiach M Effects of oral and transdermal estrogen/progesterone regimens on blood coagulation and fibrinolysis in postmenopausal women. A randomized controlled trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1997; 17:3071-8
106. Leng XH, Zhang W, Nieswandt B, Bray PF. Effects of estrogen replacement therapies on mouse platelet function and glycoprotein VI levels. *Circ Res* 2005; 97:415-7
107. Taner MZ Ozpolat E, Taskiran C, Onan MA, Gursel T, Karabulut E, Gursoy R, Himmetoglu O. Effects of four different regimens of hormone replacement therapy on hemostatic parameters: a prospective randomized study. *Maturitas* 2006; 53:267-73.
108. Bilsel AS, Onaran N, Moini H, Emerk K. Long-term effect of 17beta-estradiol and thrombin on tissue factor pathway inhibitor release from HUVEC. *Thromb Res* 2000; 2:173-178
109. Harrison RL and McKee PA. Estrogen stimulates von Willebrand factor production by cultured endothelial cells. *Blood* 1984; 63: 657-685
110. Carlsen SM, Jacobsen G and Romundstad P. Maternal testosterone levels during pregnancy are associated with offspring size at birth *European Journal of Endocrinology* 2006; 155:365–370
111. van Kesteren PJ, Kooistra T, Lansink M, van Kamp GJ, Asscheman H, Gooren LJ, Emeis JJ, Vischer UM, Stehouwer CD. The effects of sex steroids on plasma levels of marker proteins of endothelial cell functioning. *Thromb Haemost* 1998; 79:1029-33

112. Cussons AJ, Stuckey BG, Watts GF. Cardiovascular disease in the polycystic ovary syndrome: New insights and perspectives. *Atherosclerosis* 2006; 25: 227-239
113. Yilmaz M, Bukan N, Ayvaz G, Karakoc A, Toruner F, Cakir N, Arslan M. Glucose intolerance, insulin resistance and cardiovascular risk factors in first degree relatives of women with polycystic ovary syndrome. *Hum. Reprod.* 2005; 20: 2414-20
114. Kip KE, Marroquin OC, Kelley DE, Johnson BD, Kelsey SF, Shaw LJ, Rogers WJ, Reis SE. Clinical importance of obesity versus the metabolic syndrome in cardiovascular risk in women: a report from the Women's Ischemia Syndrome Evaluation (WISE) study. *Circulation.* 2004;109:706-13
115. Hays J, Ockene JK, Brunner RL, Kotchen JM, Manson JE, Patterson RE, Aragaki AA, Shumaker SA, Brzyski RG, LaCroix LA, Granek A, Valanis BG. Effects of Estrogen plus progestin on health-related quality of life. *N Engl J Med* 2003; 348: 1839-1854
116. Karsan A and Harlan JM. Modulation of endothelial cell apoptosis: mechanisms and pathophysiological roles. *J Atheroscler Thromb* 1996; 3: 75-80
117. Da Silva AE, Serakides R, Cassali GD. Hormonal carcinogenesis and hormone dependent neoplasias. *Cienc Rural* 2004; 34:625-633
118. Ruff M, Gangloff M, Wurtz JM, Moras D. Estrogen receptor transcription and transactivation: Structure-function relationship in DNA- and ligand-binding domains of estrogen receptors. *Breast Cancer Res* 2000; 2:353-359
119. Levin ER. Bidirectional signaling between the estrogen receptor and the epidermal growth factor receptor. *Mol Endocrinol* 2003; 17:309-317
120. Revankar CM, Cimino DF, Sklar LA, Arterburn JB, Prossnitz ER. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science* 2005; 307:1625-1630
121. Filardo EJ. Epidermal growth factor receptor (EGFR) transactivation by estrogen via the G-protein-coupled receptor, GPR30: a novel signaling pathway with potential significance for breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2002; 80:231-238.
122. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, et al. Mitogen activated protein (MAP) kinase pathways: Regulation and physiological functions. *Endocr Rev* 2001; 22: 153-183.
123. Cobb MH. MAP kinase pathways. *Prog Biophys Mol Biol* 1999; 71:479-500
124. Minden A, Karin M. Regulation and function of the JNK subgroup of MAP kinases. *Biochim Biophys Acta* 1997; 1333:85-104.
125. Davis RJ. Signal transduction by JNK group MAP kinases. *Cell* 2000; 103: 239-252.
126. Wilkinson MG and Millar JB. SAPKs and transcription factors do the nucleocytoplasmic tango. *Genes Dev* 1998; 12:1391-1397

127. Klinge CM, Blankenship KA, Risinger KE, et al. Resveratrol and Estradiol Rapidly Activate MAPK Signaling through Estrogen Receptors and in Endothelial Cells. *J Biol Chem* 2005; 280:7460–7468
128. Migliaccio A, DiDomenico M, Castoria G, et al. Tyrosine kinase/p21<sup>ras</sup>/MAP-kinase pathways activation by estradiol receptor complex in MCF-7 cells. *EMBO J* 1996; 15:1292-1300
129. Singer CA, Figueroa-Masot XA, Batchelor RH, et al. The mitogen-activated protein kinase pathway mediates estrogen neuroprotection after glutamate toxicity in primary cortical neurons. *J Neurosci* 1999; 19:2455-2463
130. Watters JJ, Campbell JS, Cunningham MJ, et al. Rapid membrane effects of steroids in neuroblastoma cells: effects of estrogen on mitogen activated protein kinase signalling cascade and c-fos immediate early gene transcription. *Endocrinology* 1997; 138 :4030-4033
131. Angele MK, Nistch S, Knöferl MW, et al. Sex-specific p38 MAP kinase activation following trauma-hemorrhage: involvement of testosterone and estradiol. *Am J Physiol Endocrinol Metab* 2003; 285:189-196
132. Wang M, Tsai BM, Kher A, et al. Role of endogenous testosterone in myocardial proinflammatory and proapoptotic signalling after acute ischemia-reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2005; 288:221-226
133. Qui H, Labrie Y, Grenier J, et al. Androgens induce expression of SPAK, a STE20-SPS1-related kinase, in LNCaP human prostate cancer cells. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 182:181-192
134. Ling S, Dai A, Williams MRI, Myles K, Dilley RJ, Komesaroff PA and Sudhir K Testosterone (T) Enhances Apoptosis-Related Damage in Human Vascular Endothelial Cells. *Endocrinology*, 2002, 143:1119–1125
135. Malich G, Markovic B, Winder C. The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines, *Toxicol* 1997; 124: 179-192.
136. Bakand S, Winder C, Hayes A. Comparative in vitro cytotoxicity assessment of selected gaseous compounds in human alveolar epithelial cells, *Toxicol In Vitro* 2007; 7 1341-7.
137. Vermes I, Haanen C, Steffens-Nakken H, Reutelingsperger C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled annexin V, *J Immunol Methods* 1995; 184 39–51.
138. Laemmli UK, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 1970; 227: 680-685.

139. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of micrograms quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72:248-254
140. Kawagoe J, Ohmichi M, Tsutsumi S, Ohta T, Takahashi K and Kurachi H. Mechanism of the Divergent Effects of Estrogen on the Cell Proliferation of Human Umbilical Endothelial Versus Aortic Smooth Muscle Cells. *Endocrinology* 2007; 148:6092-6099.
141. Wade CB, Robinson S, Shapiro RA, Dorsa DM. Estrogen receptor (ER)alpha and ERbeta exhibit unique pharmacologic properties when coupled to activation of mitogen-activated protein kinase pathway. *Endocrinology* 2001; 142:2336-2342
142. Sengupta K, Banerjee S, Saxena NK, Banerjee SK. Thombospondin-1 Disrupts Estrogen-Induced Endothelial Cell Proliferation and Migration and Its Expression Is Suppressed by Estradiol. *Mol Cancer Res* 2004; 2:150-158
143. Juan SH, Chen JJ, Chen CH, Lin H, Cheng CF, Liu JC, Hsieh MH, Chen YL, Chao HH, Chen TH, Chan P, Cheng TH. 17 $\beta$ -estradiol inhibits cyclic strain-induced endothelin-1 gene expression within vascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2004; 287:H1254-H1261
144. Vázquez F, Rodríguez-Manzanegue JC, Lydon JP, Edwardsi, Bert DP, O'Malley W, and Iruela-Arispe ML. Progesterone Regulates Proliferation of Endothelial Cells. *J Biol Chem* 1999; 274:2185–2192
145. Sha GH, Lin SQ. A potential mechanism of breakthrough bleeding associated with progestin: involvement in alteration of endometrial endothelial cells. *Chin Med Sci J*. 2008; 1:32-7
146. Peluffo MC, Bussmann L, Stouffer R L and Tesone M. Expression of caspase-2, -3, -8 and -9 proteins and enzyme activity in the corpus luteum of the rat at different stages during the natural estrous cycle. *Reproduction* 2006; 132:465-475
147. Derijard B, Hibi M, Wu IH, Barrett T, Su B and Deng T. JNK1: A protein kinase stimulated by UV light and Ha-Ras that binds and phosphorylates the c-Jun activation domain. *Cell* 1994; 76:1025-1037
148. Harper SJ and LoGrasso P. Signalling for survival and death in neurones: The role of stress- activated kinases, JNK and p38. *Cell Signal* 2001; 13:299-310
149. Lange CA, Richer JK, Shen T, and Horwitz KB. Convergence of Progesterone and Epidermal Growth Factor Signaling in Breast Cancer. Potentiation Of Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways. *J Biol Chem* 1998; 273:31308–31316
150. Shimada K, Nakamura M, Ishida E, Kishi M and Konishi N. Roles of p38- and c-jun NH2-terminal kinase-mediated pathways in 2-methoxyestradiol-induced p53 induction and apoptosis. *Carcinogenesis* 2003; 24:1067-1075

151. Moser J, Meyers KM, Russon RH, Reeves JJ. Plasma von Willebrand factor changes during various reproductive cycle stages in mixed-breed dogs with normal von Willebrand factor and in Doberman pinschers with type-I von Willebrand's disease. *Am J Vet Res.* 1998; 59:111-8.
152. Eilertsen AL, Sandvik L, Steinsvik B, Sandset PM. Differential impact of conventional-dose and low-dose postmenopausal hormone therapy, tibolone and raloxifene on C-reactive protein and other inflammatory markers. *J Thromb Haemost.* 2008; 6:928-34.
153. Hemelaar M, van der Mooren MJ, van Baal WM, Schalkwijk CG, Kenemans P, Stehouwer CD. Effects of transdermal and oral postmenopausal hormone therapy on vascular function: a randomized, placebo-controlled study in healthy postmenopausal women. *Menopause.* 2005; 12:488-91.
154. Effenberger KE, Johnsen SA, Monroe DG, Spelsberg TC, Westendorf JJ. Regulation of osteoblastic phenotype and gene expression by hop-derived phytoestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005; 96:387-99.
155. Varas-Lorenzo C, Garcia-Rodriguez LA, Cattaruzzi C, Troncon MG, Agostinis L, Perez-Gutthann S. Hormone replacement therapy and the risk of hospitalization for venous thromboembolism: a population-based study in southern Europe. *Am J Epidemiol* 1998; 147: 387-90.
156. Lowe G, Woodward M, Vessey M, Rumley A, Gough P, Daly E. Thrombotic variables and risk of idiopathic venous thromboembolism in women aged 45-64 years. Relationships to hormone replacement therapy. *Thromb Haemost* 2000; 83:530-5.
157. Scarabin PY, Alhenc-Gelas M, Plu-Bureau G, Taisne P, Agher R, Aiach M. Effects of oral and transdermal estrogen/progesterone regimens on blood coagulation and fibrinolysis in postmenopausal women. A randomized controlled trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17:3071-8.
158. Kroon UB, Tengborn L, Rita H, Backstrom AC. The effects of transdermal oestradiol and oral progestogens on haemostasis variables. *Br J Obstet Gynaecol* 1997; 104:32-7.
159. Stirling Y, Woolf L, North WRS, Seghatchian MJ, Meade TW. Haemostasis in normal pregnancy. *Thromb Haemost* 1984; 52:176-182.
160. Mannucci PM, Canciani MT, Forza I, et al. Changes in health and disease of the metalloprotease that cleaves von Willebrand factor. *Blood* 2001; 98:2730- 2735.
161. Moro L, Reineri S, Piranda D, et al. Nongenomic effects of 17beta-estradiol in human platelets: potentiation of thrombin-induced aggregation through estrogen receptor-beta and Src kinase. *Blood* 2005; 105:115-121.

162. Collet JP, Montalescot G, Vicaud E, et al. Acute release of plasminogen activator inhibitor-1 in ST-segment elevation myocardial infarction predicts mortality. *Circulation* 2003; 108:391-394.
163. Reiter RA, Knobl P, Varadi K, Turecek PL. Changes in von Willebrand factor-cleaving protease (ADAMTS13) activity after infusion of desmopressin. *Blood* 2003; 101:946-948.
164. Mannucci PM, Parolari A, Canciani MT, Alemanni F, Camera M. Opposite changes of ADAMTS 13 and von Willebrand factor after cardiac surgery. *J Thromb Haemost* 2005; 3:397-399.
165. Majerus E, Zheng X, Tuley EA and Sadler E. Cleavage of the ADAMTS13 propeptide is not required for protease activity. *JBC* 2003; 278:46643-46649.
166. Shang D, Zheng XW, Niiya M and Zheng L. Apical sorting of ADAMTS13 in vascular endothelial cells and Madin-Darby canine kidney cells depends on the CUB domains and their association with lipid rafts. *Blood* 2006; 108:2207-2215.
167. Wang L D, Wang M, Todisco A, Grand E, and del Valle J. The human histamine H<sub>2</sub> receptor regulates c-jun and c-fos in a differential manner. *Am J Physiol Cell Physiol* 2000; 278:C1246-C1255.
168. Cleator JH, Zhu WQ, Vaughan DE and Hamm HE. Differential regulation of endothelial exocytosis of P-selectin and von Willebrand factor by protease-activated receptors and cAMP. *Blood*. 2006; 107:2736–2744.
169. Lobatón CD, Vay L, Hernández-SanMiguel E, SantoDomingo J, Moreno A, Montero M and Alvarez J. Modulation of mitochondrial Ca<sup>2+</sup> uptake by estrogen receptor agonists and antagonists. *Br J Pharmacol* 2005; 145:862–871.
170. Xiao YF, Huang L and Morgan JP. Cytochrome P450: a novel system modulating Ca<sup>2+</sup> channels and contraction in mammalian heart cells *J Physiol* 1998; 508:777-792.
171. Labella FS, Brandes LJ. Interaction of histamine and other bioamines with cytochromes P450: implications for cell growth modulation and chemopotentiality by drugs. *Semin Cancer Biol* 2000; 10:47-53.