

## ARTÍCULOS ORIGINALES / Originals

# EFFECTOS VASCULARES DE RALOXIFENO Y ALENDRONATO

María Belén Rauschemberger<sup>1,2</sup>, Pablo Hernan Cutini<sup>1,2</sup>, Marisa Julia Sandoval<sup>1,3</sup>, Virginia Laura Massheimer<sup>1,2</sup>

1. Cátedra de Bioquímica Clínica II, Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia, Universidad Nacional del Sur. Bahía Blanca. 2. INBIOSUR. CONICET-UNS. 3. Unidad de Química. Universidad Tecnológica Nacional. FRBB.

### Resumen

El objetivo del trabajo fue estudiar y comparar los efectos vasculares de fármacos empleados en el tratamiento de la osteoporosis: el modulador selectivo del receptor de estrógenos raloxifeno y el bisfosfonato alendronato. Se investigaron las acciones *in vitro* sobre procesos celulares vitales para la salud vascular: la biodisponibilidad de óxido nítrico y la interacción monocito-plaqueta-endotelio. Ambos fármacos estimularon la producción del vasoactivo en las dosis ensayadas (56; 64% sobre control, raloxifeno; alendronato). Para el estudio del mecanismo de acción se emplearon el antagonista del receptor de estrógenos ICI 182780 e inhibidores específicos de las vías MAPK (PD98059) y PI3K (LY294002). El receptor de estrógenos y la vía PI3K participan en el mecanismo de acción del raloxifeno, mientras que la vía MAPK en la acción vascular del alendronato. En condiciones de elevado

calcio extracelular, el alendronato mantuvo su capacidad de estimular la síntesis de óxido nítrico (80,5% sobre el control,  $p < 0,05$ ), mientras que el raloxifeno pierde su potencial de acción sobre la producción del vasoactivo. En ensayos de agregación plaquetaria determinamos que el raloxifeno ejerce un marcado efecto antiagregante (65; 76% de inhibición con respecto al control, raloxifeno 1; 10 nM,  $p < 0,05$ ). Al estudiar la interacción monocito-endotelio, el alendronato no modificó la adhesión basal de monocitos, pero suprimió parcialmente la adhesión inducida por el proinflamatorio lipopolisacárido bacteriano. En síntesis, si bien basalmente cada fármaco regula positivamente la función vascular con mecanismos de acción específicos, ante condiciones de estrés solo el alendronato exhibe una capacidad de sustentar los efectos beneficiosos.

**Palabras clave:** calcio; raloxifeno; alendronato; óxido nítrico; calcificaciones vasculares.

\* Dirección Postal: Dra. Virginia Laura Massheimer. Depto BByF-UNS. San Juan 670. B8000ICN. Bahía Blanca. Correo electrónico: [massheim@uns.edu.ar](mailto:massheim@uns.edu.ar)



## SUMMARY

### VASCULAR EFFECTS OF RALOXIFENE AND ALENDRONATE

The aim of this work was to study and compare the vascular effects of two drugs frequently used osteoporosis treatment, the estrogen receptor modulator raloxifene and the bisphosphonate alendronate. We investigate the *in vitro* actions of raloxifene and alendronate on key cellular processes involved in vascular homeostasis such as the bioavailability of nitric oxide, and monocyte-platelet-endothelium interactions. Using endothelial cells cultures we found that, both drugs significantly enhanced nitric oxide production (56; 64% over control, raloxifene; alendronate respectively). The mechanism of action evoked by each drug was studied employing an estrogen receptor antagonist (ICI 182780 compound), and specific MAPK (PD98059) y PI3K (LY294002) inhibitors. The evidence obtained shows that estrogen receptor and PI3K mediated vascular raloxifene actions, meanwhile the effect of alendronate was dependent on MAPK signalling transduction pathway. When endothelial cells were incubated in high extracellular calcium concentrations, only alendronate was able to sustain its stimulatory action on nitric oxide synthesis. In platelet aggregation assays, we found that raloxifene exhibits a potent antiaggregatory action. To study monocyte-endothelium interactions, the effect of alendronate on monocyte adhesion to endothelial cells was evaluated. The bisphosphonate did not affect basal mononuclear adhesion, but significantly prevented monocyte adhesion induced by inflammatory environment represented by the presence of bacterial lipopolysaccharide. In summary, although both drugs elicited potential beneficial action on key process involved in vascular health, under stress conditions only alendronate maintain its capability to modulate the synthesis of the main vasoactive factor, nitric oxide.

**Keywords:** cardiovascular system; raloxifene; alendronate; nitric oxide; vascular calcifications.

## Introducción

Teniendo en cuenta la integridad del eje óseo-vascular, se considera que drogas utilizadas para el tratamiento de la osteoporosis (bifosfonatos, moduladores selectivos del receptor de estrógenos o SERMs, calcitriol)<sup>1</sup> pueden afectar la salud vascular, y por el contrario, los fármacos empleados en la terapéutica cardiovascular (estatinas, inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina y antagonistas del receptor de angiotensina II) pueden afectar el metabolismo óseo. La osteoporosis y las enfermedades cardiovasculares (ECV) son patologías prevalentes en la menopausia, hecho que ha sido atribuido principalmente a la disminución de los estrógenos circulantes. Diversos estudios epidemiológicos y preclínicos han demostrado una interesante relación entre osteoporosis, ECV y mortalidad asociada.<sup>2,3</sup> Aunque tradicionalmente estas enfermedades se han considerado como procesos independientes relacionados con la edad y *status* ovárico, cada vez existe mayor evidencia que confirma que ambas entidades comparten mecanismos fisiopatológicos.

La terapia hormonal de reemplazo (THR) en base a estrógenos, o combinada (estrógenos más progestágenos), surge como alternativa para prevenir patologías posmenopáusicas.<sup>4</sup> Si bien a nivel óseo los resultados de ensayos clínicos aleatorizados sobre el sistema cardiovascular han sido satisfactorios, los estudios HERS (*Heart and Estrogen progestin Replacement Study*), WHI (*Women's Health Initiative*) y ERAS (*Estrogen Replacement and Atherosclerosis Study*) pusieron en duda la utilidad clínica de la THR para la prevención de ECV.<sup>5</sup> Los SERMs han sido propuestos como alternativa de terapia para minimizar los síntomas asociados al hipoestrogenismo posmeno-

páusico. Constituyen compuestos sintéticos diseñados para interactuar con el receptor de estrógenos (RE), reproducir selectivamente los efectos beneficiosos y/o antagonizar los efectos no deseables de los estrógenos. El raloxifeno (RAL) es un SERM desarrollado específicamente para mantener los efectos beneficiosos del 17 $\beta$ -estradiol en hueso y en el perfil lipídico y comportarse como antagonista estrogénico en mama y endometrio. Su uso clínico fue aprobado para el tratamiento contra la osteoporosis,<sup>6</sup> siendo poco claros sus efectos vasculares. Se propone que tendría un impacto positivo a nivel cardiovascular; sin embargo, el estudio RUTH (*Raloxifene Use for The Heart*) no pudo confirmar una acción beneficiosa en la prevención de ECV posmenopáusica e incluso alertó sobre un riesgo incrementado de tromboembolismo venoso y accidentes cerebrovasculares.<sup>7</sup> No obstante ello, algunos estudios recientes refieren una acción protectora del RAL sobre la función endotelial<sup>8</sup> y proponen que, en mujeres posmenopáusicas, el RAL incrementa la concentración de osteoprotegerina en el entorno vascular,<sup>9</sup> lo que reduciría el riesgo de calcificaciones vasculares. Por consiguiente, el impacto vascular del RAL sigue siendo motivo de estudio y debate.

Los bifosfonatos (BP) son análogos del pirofosfato con gran afinidad por el tejido óseo. Los BP reducen la resorción ósea y disminuyen el riesgo de fractura, y constituyen uno de los tratamientos de primera línea para la osteoporosis. En particular, aquellos compuestos que tienen un nitrógeno en su estructura molecular exhiben mayor potencia; tal es el caso del alendronato (ALN). Existe poca información en la literatura acerca de los efectos celulares y moleculares de los BP a nivel vascular. Los datos existentes provienen mayoritariamente de estudios clínicos en pacientes con patología renal crónica y diabetes, que proponen que los BP reducen el engrosamiento de la íntima arterial<sup>10</sup> e inhiben la calcificación vascular (CaV). Sin embargo,

los resultados son contradictorios y no está claro aún si actúan en forma directa sobre células vasculares o indirectamente a través de su acción sobre el sistema óseo.<sup>11</sup>

La aterosclerosis, principal ECV, es una patología crónica inflamatoria que conduce a una pérdida de la arquitectura vascular y generación de una lesión vascular (ateroma) que ocluye el vaso afectado.<sup>12</sup> Se inicia con una disfunción endotelial, evento caracterizado por un desequilibrio en la producción de factores vasodilatadores y vasoconstrictores. Se observa una marcada disminución en la biodisponibilidad de óxido nítrico (NO), lo que conduce a un estado de vasoconstricción, pro-oxidante, proinflamatorio y protrombótico.<sup>13</sup> La respuesta inicial al daño vascular es el aumento de la permeabilidad endotelial y la secreción de citoquinas inflamatorias, lo que provoca la adhesión de plaquetas al endotelio activado por la injuria. A su vez, las plaquetas activadas promueven el reclutamiento de monocitos y su activación a macrófagos. La adhesión de monocitos cargados de lípidos y su migración a través del endotelio constituye el factor más importante de aceleración de la aterogénesis.<sup>14</sup> Producto de la activación de células endoteliales (CE) y de monocitos, aumenta la expresión de moléculas de adhesión celular en ambos sistemas celulares. La proliferación y migración de células musculares lisas vasculares (CMLV) provoca la formación de la neoíntima y la estenosis del vaso. La lesión y muerte del endotelio vascular inducido por el ambiente inflamatorio contribuye a la desestabilización de la placa y ruptura hemorrágica del ateroma. La etapa más avanzada de la lesión es la calcificación aterosclerótica de la íntima, consistente en un reemplazo casi completo del tejido vascular por tejido similar osteogénico. Es la forma de vasculopatía calcificante más común, resultado de la inducción de una transdiferenciación osteogénica de subpoblaciones de células vasculares como consecuencia del microambiente inflamatorio. Aproximadamente el 15% de las pla-



cas ateromatosas humanas desarrollan una completa calcificación, con una arquitectura indiferenciable de la estructura histológica trabecular.<sup>15</sup>

El objetivo del presente trabajo fue estudiar y comparar los efectos vasculares de fármacos empleados en el tratamiento de la osteoporosis. Para ello seleccionamos el SERM RAL y el bifosfonato ALN, e investigamos sus acciones *in vitro* sobre procesos celulares vitales para la salud vascular como son la biodisponibilidad de NO y la interacción monocito-plaqueta-endotelio.

## Materiales y métodos

### Materiales

Los reactivos de Griess fueron adquiridos en Laboratorios Britania (Buenos Aires, Argentina). Tripsina/EDTA (10x), L-glutamina (100x), anfotericina-B (0,25 mg/ml), penicilina/estreptomicina (100x) y suero fetal bovino (SFB) fueron obtenidos en Laboratorios GBO. El medio de cultivo Dulbecco's Eagle's modificado (DMEM), los inhibidores LY294002 y PD98059, el lipopolisacárido de origen bacteriano (LPS), RAL, ALN y demás reactivos empleados fueron adquiridos en Sigma (St. Louis, MO, USA). El antagonista del RE ICI 182780 se obtuvo en Bioscience Tocris (Park Ellisville, USA).

### Cultivo de CE de aorta de rata

Se emplearon CE obtenidas por cultivo primario de explante a partir de anillos de aorta de ratas Wistar de 4 a 6 semanas de edad, según lo descrito previamente.<sup>16,17</sup> Se cortaron anillos de 1 a 2 mm de longitud y se sembraron en placas de Petri (NUNC) de 5 cm de diámetro, en medio de cultivo DMEM, suplementado con 10% de SFB, penicilina (100 U/ml), estreptomicina (100 µg/ml), anfotericina-B (2,5 µg/ml) y L-glutamina (2 mM). Se incubaron a 37 °C en atmósfera de 95% aire y 5% de CO<sub>2</sub> durante 5 días. Transcurrido este tiempo, los anillos fueron removidos y las CE se cultivaron

hasta alcanzar un crecimiento confluyente. La identidad de las CE fue determinada por: a) la observación en microscopio de contraste de fase (Nikon Eclipse TS100) de las características morfológicas típicas de las CE cuando crecen en monocapa, b) por la reacción inmunocitoquímica positiva con Factor VIII, y con anti-Vimentina, clone V9 usando Sistema En-Vision DakoCytomation, y c) la capacidad de síntesis de NO.<sup>16</sup> Para todos los ensayos se emplearon cultivos de CE de pasajes 2 a 4.<sup>18</sup> Los trabajos con animales se llevaron a cabo en el Bioterio del Departamento de Biología, Bioquímica y Farmacia de la Universidad Nacional del Sur.

### Medición de la producción de NO

Se utilizó el método colorimétrico de Griess, como se describió previamente.<sup>19</sup> Las CE se siembran en una densidad de 3,5×10<sup>4</sup> células/pocillo y, luego de alcanzar un 90% de confluencia, se tratan con RAL o ALN en medio DMEM que contiene 1% de suero fetal bovino (SFB). Se procesó siempre en paralelo un grupo control con vehículo solamente (isopropanol para RAL, agua para ALN) adicionados en concentración <0,1%. Inmediatamente después del tratamiento se midió la producción de nitritos (productos estables y no volátiles del NO liberado) en el medio de incubación. Cuando se emplearon los compuestos ICI 182780 (antagonista del RE), LY294002 o PD98059 (inhibidores de vías mensajeras PI3K y MAPK, respectivamente), estos fueron agregados al medio de cultivo 30 minutos antes del tratamiento con los fármacos. En los ensayos donde se estudió la contribución de altas concentraciones de calcio (5 mM), las CE se cultivaron en un medio enriquecido en calcio durante 24 horas previas a la adición de RAL o ALN. Alícuotas del sobrenadante fueron mezcladas con el reactivo de Griess y se incubaron durante 10 minutos a temperatura ambiente. La absorbancia fue medida a 548 nm en lector de placas multimodo Synergy HT (Biotek, USA). La concentración de NO se de-

terminó por referencia a una curva estándar realizada con nitrito de sodio en la misma matriz. Las células se disolvieron en NaOH 1 M y se determinó contenido proteico por el método de Lowry. Los resultados se expresaron como nmoles de NO/mg de proteína.

### Ensayos de agregación plaquetaria

La agregación plaquetaria se evaluó empleando un método turbidimétrico de acuerdo con lo descrito previamente.<sup>20</sup> Las CE se cultivaron en multiplacas de 24 pocillos (NUNC) en una densidad de  $3 \times 10^4$  células/pocillo en DMEM suplementado con 10% de SFB. Luego de alcanzar un 90% de confluencia, el medio de cultivo fue reemplazado por 400  $\mu$ l de un *pool* de plasma rico en plaquetas (PRP,  $3 \times 10^8$  plaquetas/ml) y se trató con RAL. Se procesó en paralelo un grupo control que recibió vehículo solamente (isopropanol <0,1%). Finalizado el tratamiento, se tomaron alícuotas de 285  $\mu$ l del PRP y se colocaron en la cubeta del agregómetro (CronoLog 430). Se inició la agregación plaquetaria con el agregado de adenosina difosfato (ADP)  $2 \times 10^{-5}$  M. Se registraron los cambios en la transmisión de luz en un intervalo de 5 minutos. Las CE se disolvieron con NaOH 1 M y se tomaron alícuotas para la determinación de las proteínas por el método de Lowry. Los resultados se expresaron como porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria por mg de proteína. La agregación plaquetaria máxima se consideró aquella inducida por el grupo control.

### Ensayo de adhesión de monocitos a CE

El aislamiento de los monocitos se realizó mediante un gradiente de densidad (Ficoll-Paque Plus) de acuerdo con lo descrito previamente por nuestro laboratorio.<sup>21</sup> Una vez aislados, los monocitos se cultivaron en medio DMEM con 10% de SFB. Las CE fueron tratadas con ALN durante 24 horas en medio DMEM suplementado con 1% de SFB. Este tratamiento se realizó en ausencia y presencia del agente proinflamatorio LPS

(1  $\mu$ g/ml), el cual se agregó durante las últimas 21 horas de tratamiento con el fármaco. Finalmente, un número exacto de monocitos se sembraron sobre las CE pretratadas y se incubaron durante 2 horas a 37 °C.<sup>22</sup> Se colectó el medio y el número de monocitos adheridos a las CE fue calculado por diferencia entre el total de monocitos sembrados y el total de monocitos no adheridos presentes en el sobrenadante.

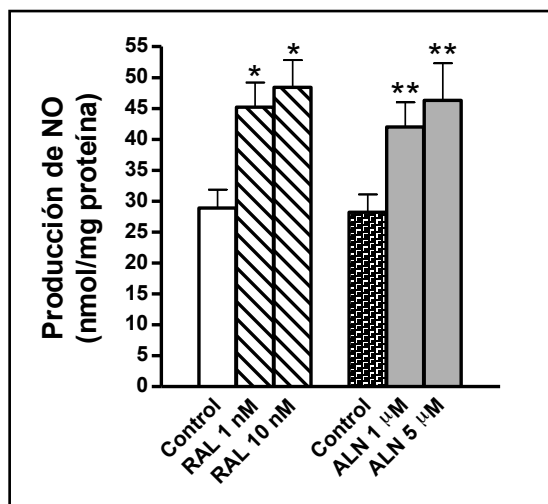
### Análisis estadístico

Cada condición experimental fue realizada en tres experimentos independientes hechos por cuadruplicado. Los datos se expresan como la media  $\pm$  desvío estándar (SD). Se utilizó el test t de Student para la comparación entre dos medias independientes y para las comparaciones múltiples ANOVA de una y dos vías seguido de la prueba LSD de Fisher. Las diferencias de  $p < 0,05$  se consideraron significativas.

### Resultados

Empleando el método de Griess evaluamos los efectos de RAL y ALN sobre la producción de NO en CE. Como se observa en la Figura 1, ambos fármacos estimulan significativamente la producción del vasoactivo en las distintas dosis ensayadas (56 y 67% sobre su control, RAL 1 y 10 nM respectivamente,  $p < 0,05$ ; 49 y 64% sobre su control, ALN 1 y 5  $\mu$ M, respectivamente,  $p < 0,01$ ). Evaluamos la participación del RE en la transducción de la señal mediada por el RAL. Se observó que el efecto estimulador de RAL (55% sobre control) se suprime en presencia del antagonista del RE, ICI 182780 1  $\mu$ M (47,2 $\pm$ 2,5 vs. 29,0 $\pm$ 1,5 nmoles NO/mg proteína, RAL vs. RAL+ICI 182780, respectivamente) (Tabla 1).

Teniendo en cuenta que las vías de señalización intracelular MAPK y PI3K regulan la actividad de la óxido nítrico sintasa (NOS) y la producción de NO mediada por agonistas naturales del sistema vascular, estudiamos la participación de estas cascadas de señalización en el mecanismo de acción de RAL y



**Figura 1.** Efecto de raloxifeno (RAL) y alendronato (ALN) sobre la producción de óxido nítrico (NO) en células endoteliales.

Las células se incubaron durante 15 minutos con RAL (1 y 10 nM), ALN (1 y 5  $\mu$ M) o sus respectivos vehículos (isopropanol y H<sub>2</sub>O, respectivamente). La producción de NO se midió por el método de Griess como se describe en Materiales y métodos. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes (n=4). \* $p$ <0,05 vs. control de RAL, \*\* $p$ <0,01 vs. control de ALN. Test estadístico: ANOVA seguido de LSD de Fisher.

ALN. Para ello se realizaron ensayos de medición del vasoactivo en presencia de inhibidores de las vías MAPK (PD98059, 5  $\mu$ M) y PI3K (LY294002, 1  $\mu$ M). En presencia del inhibidor de PI3K se suprimió la síntesis de NO mediada por el SERM (29,5 $\pm$ 1,9 vs. 30,4 $\pm$ 2,1 nmoles NO/mg proteína, C+LY294002 vs. RAL+LY294002, respectivamente), mientras que en los ensa-

yos realizados en presencia del inhibidor de MAPK, el RAL mantuvo su efecto estimulatorio sobre la actividad de NOS (Tabla 1). Al evaluar las vías de señalización involucradas en la transducción de señales mediadas por ALN, la supresión del estímulo en la síntesis de NO se observó en cultivos de CE previamente incubados con PD98059 (67,3 vs. 3,2% sobre el

**Tabla 1.** Efecto de raloxifeno (RAL) y alendronato (ALN) sobre la producción de NO en células endoteliales: participación del RE y las vías mensajeras de MAPK y PI3K.

Las células endoteliales se preincubaron con ICI 1828780 (1  $\mu$ M), LY294002 (1  $\mu$ M) ó PD98059 (5  $\mu$ M) durante 30 minutos e inmediatamente después se trataron con raloxifeno (RAL) 10 nM, alendronato (ALN) 5  $\mu$ M ó vehículo durante 15 minutos. La producción de óxido nítrico (NO) se midió por el método de Griess como se describe en Materiales y métodos. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes (n=4). Test estadístico: ANOVA seguido de LSD de Fisher.

Tratamiento	Vehículo	+ICI 182780	+ LY294002	+ PD98059
Control	30.3 $\pm$ 2.1	28.3 $\pm$ 1.4	29.5 $\pm$ 1.9	31.2 $\pm$ 1.6
RAL 10 nM	47.2 $\pm$ 2.5* ( $\uparrow$ 55.8%)	29.0 $\pm$ 1.5	30.4 $\pm$ 2.1	50.3 $\pm$ 1.9* ( $\uparrow$ 61.2%)
ALN 5 $\mu$ M	50.7 $\pm$ 2.3* ( $\uparrow$ 67.3%)	ND	48.7 $\pm$ 2.0* ( $\uparrow$ 65%)	32.2 $\pm$ 1.7

\* $p$ <0.05 frente a sus respectivos controles.

ND: no determinado.

$\uparrow$ : aumento

control, ALN vs. ALN+PD98059,  $p<0,05$ ). La preincubación con LY294002 no afectó el incremento en NO inducido por ALN (67,3 y 65% sobre control, ALN y ALN+LY294002, respectivamente,  $p<0,05$ ) (Tabla 1). Estos resultados sugieren que la vía PI3K participa en el mecanismo de acción de RAL y la vía MAPK en la acción vascular de ALN.

Mantener la biodisponibilidad de NO por parte de las CE es uno de los eventos moleculares que inhiben la CaV. Considerando esto evaluamos el efecto de RAL 10 nM y ALN 5  $\mu$ M sobre la producción de NO en CE cultivadas en condiciones fisiológicas o de calcificación (1 o 5 mM calcio en el medio extracelular, respectivamente). Como se aprecia en la Tabla 2, en condiciones fisiológicas, los dos fármacos estimularon marcadamente la producción de NO en CE ( $23\pm 1,3$ ;  $37,0\pm 1,8^{**}$  y  $41,0\pm 1,6^*$  nmoles NO/mg proteína; control; RAL y ALN;  $**p<0,01$ ,  $*p<0,05$ , respectivamente). Cuando los ensayos de producción de NO se realizaron en condiciones de CaV (calcio 5 mM en el medio extracelular), el ALN mantuvo su capacidad de estimu-

lar la síntesis del vasoactivo en CE (80,5% de estímulo sobre el control,  $p<0,05$ ). En cambio, en condiciones de elevado calcio extracelular, el RAL pierde su acción sobre la síntesis de NO.

Se evaluó el efecto del RAL sobre la agregación plaquetaria dependiente del endotelio vascular. Para llevar a cabo el experimento, las CE se incubaron en PRP y se trataron con RAL (1 y 10 nM) durante 10 minutos. Finalizado el tratamiento, se midió la agregación plaquetaria inducida por ADP  $2\times 10^{-5}$  M. Como se aprecia en los registros de agregación plaquetaria mostrados en la Figura 2A, el tratamiento con RAL 1 y 10 nM indujo una agregación plaquetaria marcadamente inferior a la correspondiente al grupo control. La cuantificación de este efecto se puede observar en la Figura 2B, donde se grafica el porcentaje de inhibición de la agregación plaquetaria con respecto al grupo control. El tratamiento con el fármaco inhibió significativamente la agregación plaquetaria (65 y 76% de inhibición con respecto al control, RAL 1 y 10 nM, respectivamente,  $p<0,05$ ). Estos resultados ponen

**Tabla 2.** Efecto del calcio sobre la producción de óxido nítrico (NO) mediada por raloxifeno (RAL) ó alendronato (ALN).

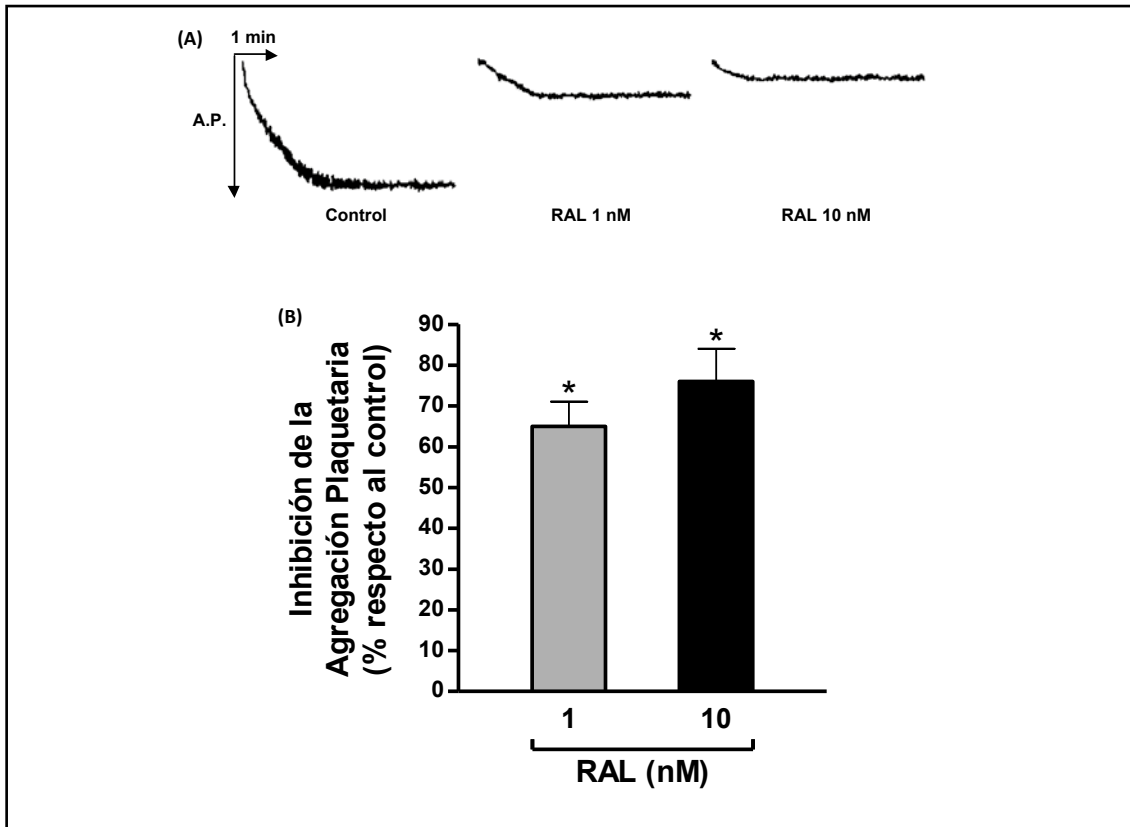
Cultivos de células endoteliales se incubaron en medio con calcio (1 mM ó 5 mM) durante 24 hs y luego se trataron con RAL 10 nM, ALN 5  $\mu$ M ó sus respectivos vehículos (isopropanol y H<sub>2</sub>O respectivamente) durante 15 minutos. La producción de óxido nítrico se midió por el método de Griess como se describe en Materiales y métodos. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes (n=4). Test estadístico: ANOVA seguido de LSD de Fisher.

Tratamiento	Calcio 1 mM	Calcio 5 mM
<b>Control</b>	23.0 $\pm$ 1.3	20.0 $\pm$ 1.8
<b>RAL 10 nM</b>	37.0 $\pm$ 1.8** ( $\uparrow$ 60.9%)	21.2 $\pm$ 1.2
<b>ALN 5 <math>\mu</math>M</b>	41.0 $\pm$ 1.6* ( $\uparrow$ 78.3%)	36.1 $\pm$ 1.0* ( $\uparrow$ 80.5%)

\* $p<0.05$  frente a su respectivo control;

\*\* $p<0.01$  frente a su respectivo control.

$\uparrow$ : aumento



**Figura 2.** Efecto de raloxifeno (RAL) sobre la agregación plaquetaria.

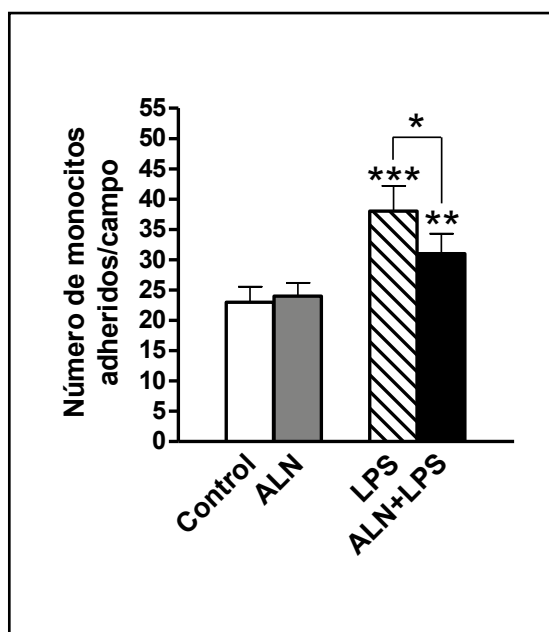
Se muestran registros representativos de la agregación plaquetaria (A) y la respectiva cuantificación (B) de la inhibición de la agregación plaquetaria inducida por raloxifeno. Las CE se incubaron en 400  $\mu$ l de PRP en ausencia (control) o presencia de las concentraciones indicadas de raloxifeno o vehículo (isopropanol) durante 10 minutos. Finalizado el tratamiento, el PRP se retiró rápidamente y se inició la agregación de las plaquetas por adición de  $2 \times 10^{-5}$  M de ADP. Se midió el aumento en la transmisión de luz como se describe en Materiales y métodos. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes ( $n=4$ ). \* $p < 0,05$  frente al control. Test estadístico: test t de Student.

en evidencia que el SERM ejerce un marcado efecto antiagregante.

De acuerdo con lo reportado en la literatura, la adhesión de monocitos al endotelio es uno de los eventos celulares que promueven la formación de calcificaciones vasculares. Por este motivo investigamos el efecto de ALN sobre la adhesión de monocitos a cultivos de CE en respuesta a un estímulo proinflamatorio inductor de adhesión. Como estímulo de inflamación empleamos LPS. Las células se trataron duran-

te 24 horas con el bisfosfonato (5  $\mu$ M) en ausencia o presencia de LPS (1  $\mu$ g/ml), el cual se agregó en las últimas 21 horas del tratamiento con ALN. Finalizado este, las células se incubaron con la suspensión de monocitos durante 2 horas adicionales. En la Figura 3 se muestran los resultados de la cuantificación de la adhesión de los mononucleares a las CE. Como se puede observar, el tratamiento con LPS indujo una mayor adhesión de monocitos a las CE con respecto al grupo control ( $23,06 \pm 2,53$  vs.





**Figura 3.** Efecto de alendronato (ALN) sobre la adhesión de monocitos a células endoteliales.

Las células endoteliales fueron tratadas con ALN (5  $\mu$ M) o su correspondiente vehículo ( $H_2O$ ) durante 24 horas en presencia o ausencia de LPS (1  $\mu$ g/ml), el cual se agregó durante las últimas 21 horas del tratamiento con el bisfosfonato. Finalizado este, los monocitos se sembraron sobre la monocapa de CE durante 2 horas adicionales. Inmediatamente después se retiró el sobrenadante y se realizó el recuento de monocitos adheridos de acuerdo con lo descrito en Materiales y métodos. Los resultados representan la media  $\pm$  SD de tres experimentos independientes ( $n=4$ ). \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$  vs. ALN, \*\*\* $p<0,001$  vs. control. Test estadístico: ANOVA seguido de LSD de Fisher.

38,12 $\pm$ 4,2 células/campo, control vs. LPS, respectivamente,  $p<0,001$ ). Cuando las CE son tratadas con ALN no se modifica la adhesión basal de monocitos. Sin embargo, si las CE son previamente expuestas al bisfosfonato, se suprime parcialmente el estímulo inducido por el agente proinflamatorio (65% vs. 34% sobre el grupo control, LPS vs. LPS+ALN, respectivamente,  $p<0,05$ ).

### Discusión

Los resultados presentados muestran que ambos fármacos son activos a nivel vascular, potenciando la producción del principal vasoactivo (NO) e inhibiendo la interacción de plaquetas o de monocitos con las células endoteliales. En su conjunto, estas representan acciones saludables sobre la homeostasis de los vasos sanguíneos. Si bien cada fármaco exhibe un mecanismo de acción específico, el análisis estadístico no mostró diferencias significativas entre los efectos de cada uno de ellos, por lo que hasta el presente no podemos establecer si alguno posee un mayor potencial de acción. Sí encontramos diferencias

bajo condiciones de estrés (elevado calcio extracelular), donde solo el ALN conservó su capacidad de estimular la síntesis de NO aun en condiciones desfavorables.

El NO es el regulador por excelencia del metabolismo vascular. Prácticamente todas las funciones vasculares dependen del NO, por eso se lo conoce como el segundo mensajero vascular. Mantener la biodisponibilidad de NO es indispensable para prevenir la enfermedad aterosclerótica, y aun en caso de una lesión establecida actúa como inhibidor de la calcificación vascular. Ambos fármacos estimularon significativamente la producción de NO. Como era de esperar, siendo el RAL una droga del grupo de los SERM, su mecanismo de acción involucra la participación del RE. Las concentraciones de RAL empleadas en este estudio son cercanas a los niveles circulantes reportados para seres humanos bajo terapéutica estándar con RAL (1-2 nM).<sup>23</sup> Por su parte, los niveles de BP empleados concuerdan con el rango de concentración descrito en la literatura para el cual el ALN previene la apoptosis osteoblástica y favore-



ce la viabilidad de osteoblastos osteocitos.<sup>24</sup> El mecanismo a través del cual los fármacos estimulan la síntesis de NO es selectivo. En el caso del RAL comprende la participación del RE y de la vía PI3K/Akt. Este mecanismo es similar al empleado por 17 $\beta$ -estradiol en la activación de NOS endotelial.<sup>25</sup> Para el ALN la acción es mediada por la vía MAPK, sistema de señalización intracelular que participa activamente en el control del tono vascular, el crecimiento celular y la antiaterogenicidad. Las células vasculares expresan el sensor de calcio. En estados de hipoxia o estrés oxidativo es precisamente la vía MAPK la responsable de transmitir la señal de activación del sensor de calcio desde la membrana plasmática al interior celular.<sup>26</sup>

Como se mencionó en la introducción, la adhesión y agregación plaquetaria y la adhesión de monocitos al endotelio vascular son eventos que condicionan fuertemente el progreso de la lesión vascular. Demostramos que ambos fármacos modulan estos procesos, inhibiendo la agregación plaquetaria en el caso del RAL y previniendo la adhesión monocítica inducida por estrés inflamatorio para el ALN. Estos efectos podrían interpretarse como positivos y potencialmente beneficiosos para la homeostasis vascular, ya que ante una injuria podrían contribuir a inhibir la génesis de la lesión ateromatosa.

La calcificación de la íntima arterial constituye la etapa más avanzada de la lesión vascular. Mantener la capacidad de síntesis de NO es uno de los eventos clave que inhiben

la transdiferenciación de células vasculares a linaje osteogénico y previene el depósito de cristales de hidroxiapatita en la matriz extracelular.<sup>15</sup> Utilizando condiciones de elevado calcio en el medio extracelular obtuvimos evidencia de que solo el ALN conserva la capacidad de estimular la síntesis endotelial de NO en una magnitud equivalente al efecto observado en condiciones fisiológicas (1 mM calcio). Si bien estos resultados requieren una investigación más exhaustiva empleando estrategias experimentales de simulación completa del proceso de calcificación vascular, preliminarmente sugieren que, ante condiciones de estrés, existe una capacidad de sustentar efectos beneficiosos a favor del ALN.

En conclusión, lo descrito en este trabajo sostiene la premisa de mantener una mirada fisiopatológica y farmacológica integral del eje óseo-vascular.

### Agradecimientos

La realización de este trabajo ha sido sustentado por subsidios de la SGCyT, Universidad Nacional del Sur, Argentina (PGI 24/B159); Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (PIP 5790, PIP 0350, CONICET, Argentina).

### Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener conflictos de intereses.

(Recibido: agosto 2013.

Aceptado: septiembre 2013)

### Referencias

1. Demer L, Tintut Y. Vascular calcification: pathobiology of a multifaceted disease. *Circulation* 2008; 117:2938-48.
2. Tanko LB, Christiansen C, Cox DA, Geiger MJ, McNabb MA, Cummings SR. Relationship between osteoporosis and cardiovascular disease in postmenopausal women. *J Bone Miner Res* 2005; 20:1912-20.
3. McFarlane SI, Muniyappa R, Shin JJ, Bahtiyar G, Sowers JR. Osteoporosis and cardiovascular disease: brittle bones and boned arteries, is there a link?. *Endocrine* 2004; 23:1-10.
4. Pinkerton J, Santen R. Alternatives to the use of estrogen in postmenopausal women. *Endocr Rev* 1999; 20:308-20.
5. Ouyang P, Michos E, Karas R. Hormone replacement therapy and the cardiovascular

- system lessons learned and unanswered questions. *J Am Coll Cardiol* 2006; 47:1741-53.
6. Delmas PD, Bjarnason NH, Mitlak BH, et al. Effects of raloxifene on bone mineral density, serum cholesterol concentrations, and uterine endometrium in postmenopausal women. *N Engl J Med* 1997; 337:1641-7.
  7. Karwowski W, Naumnik B, Szczepanski M, Mysliwiec M. The mechanism of vascular calcification-a systematic review. *Med Sci Monit* 2012; 18:RA1-11.
  8. Wong CM, Yung LM, Leung FP, et al. Raloxifene protects endothelial cell function against oxidative stress. *Br J Pharmacol* 2008; 155:326-34.
  9. Fernández-García D, Muñoz-Torres M, Mezquita-Raya P, et al. Effects of raloxifene therapy on circulating osteoprotegerin and RANK ligand levels in post-menopausal osteoporosis. *J Endocrinol Invest* 2008; 31:416-21.
  10. Santos L, Cavalcanti T, Bandeira F. Vascular effects of bisphosphonates-a systematic review. *Clin Med Insights Endocrinol Diabetes* 2012; 5:47-54.
  11. Price P, Faus SA, Williamson M. Bisphosphonates alendronate and ibandronate inhibit artery calcification at doses comparable to those that inhibit bone resorption. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21:817-24.
  12. Ross R. Atherosclerosis-an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340:115-26.
  13. Libby P. Inflammation in atherosclerosis. *Nature* 2002; 420:868-74.
  14. Van Gils JM, Zwaginga JJ, Hordijk PL. Molecular and functional interactions among monocytes, platelets, and endothelial cells and their relevance for cardiovascular diseases. *J Leukoc Biol* 2009; 85:195-204.
  15. Boström K, Nalini M, Rajamannan, Towler D. The regulation of valvular and vascular sclerosis by osteogenic morphogens. *Circ Res* 2011; 109:564-77.
  16. Cutini P, Selles J, Massheimer V. Cross-talk between rapid and long term effects of progesterone on vascular tissue. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2009; 115:36-43.
  17. Bachetti T, Morbidelli L. Endothelial cells in culture: a model for studying vascular functions. *Pharmacol Res* 2000; 42:9-19.
  18. Polini N, Rauschemberger MB, Mendiberri J, Selles J, Massheimer V. Effect of genistein and raloxifene on vascular dependent platelet aggregation. *Mol Cell Endocrinol* 2007; 267:55-62.
  19. Rauschemberger MB, Selles J, Massheimer V. The direct action of estrone on vascular tissue involves genomic and non-genomic actions. *Life Sci* 2008; 82:115-23.
  20. Cutini P, Campelo A, Agriello E, Sandoval M, Rauschemberger MB, Massheimer V. The role of sex steroids on cellular events involved in vascular disease. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2012; 132:322-30.
  21. Sandoval MJ, Cutini PH, Rauschemberger MB, Massheimer VL. The soyabean isoflavone genistein modulates endothelial cell behaviour. *Br J Nutr* 2010; 104:171-9.
  22. Pawlowski NA, Abraham EL, Pontier S, Scott WA, Cohn ZA. Human monocyte-endothelial cell interaction in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 82:8208-12.
  23. Heringa M. Review on raloxifene: profile of a selective estrogen receptor modulator. *Int J Clin Pharmacol Ther* 2003; 41:331-45.
  24. Plotkin L, Manolagas S, Bellido T. Dissociation of the pro-apoptotic effects of bisphosphonates on osteoclasts from their anti-apoptotic effects on osteoblasts/osteocytes with novel analogs. *Bone* 2006; 39:443-52.
  25. Serock MR, Wells AK, Khalil RA. Modulators of vascular sex hormone receptors and their effects in estrogen-deficiency states associated with menopause. *Recent Pat Cardiovasc Drug Discov* 2008; 3:165-86.
  26. Li GW, Xing WJ, Bai SZ, et al. The calcium-sensing receptor mediates hypoxia-induced proliferation of rat pulmonary artery smooth muscle cells through MEK/ERK1,2 and PI3K pathways. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 2011; 108:185-93.