

INVESTIGACIÓN BÁSICA

El 17- β estradiol induce la expresión de la sintasa de óxido nítrico tipo III en células endoteliales en cultivo

Gabriel Marcelín Jiménez,* Irais Ceja Ochoa,** Ascención Hernández Pérez,** Bruno Escalante Acosta***

Resumen

La menor incidencia de enfermedades cardiovasculares en mujeres premenopáusicas, en comparación con la encontrada en hombres de la misma edad, ha llamado la atención, postulándose la interacción entre la vía del óxido nítrico (NO) y los estrógenos como el mecanismo responsable. El propósito del presente trabajo fue demostrar que el aumento en la liberación de NO en células endoteliales en cultivo, tratadas con 17- β estradiol es debido al aumento en la cantidad de sintasa de óxido nítrico tipo III (eNOS). El tratamiento de las células con 17- β estradiol produjo un aumento significativo en la cantidad de nitritos liberados al medio de cultivo, comparada con la de células no tratadas. Este efecto fue revertido con Tamoxifen, antagonista del receptor estrogénico. Se observó por Western blot que el 17- β estradiol incrementó significativamente la cantidad de eNOS en las células tratadas, en comparación con la de células control. Además, la liberación de nitritos inducida por acetilcolina en células incubadas con 17- β estradiol fue mayor que la producción de nitritos inducida por las mismas dosis de acetilcolina en las células control. En conclusión, nuestros datos resaltan el papel fisiológico del 17- β estradiol al inducir un aumento en la expresión de eNOS, lo que potencia el efecto de agonistas vasculares liberadores de NO, sugiriendo un papel protector cardiovascular.

Palabras clave: Óxido nítrico. Estrógenos. Endotelio.

Key words: Nitric oxide. Estrogens. Endothelium.

Summary

INTERACTION BETWEEN NO AND 17- β ESTRADIOL

It has been suggested that the low incidence of cardiovascular diseases in premenopausal women, compared with that in men of the same age, is related to the interaction between the nitric oxide (NO) pathway and estrogens. The aim of the present work was to characterize the mechanism by which 17- β estradiol produces an increment in NO release in cultured endothelial cells. Treatment of cells with 17- β estradiol significantly increased the amount of nitrites delivered into the culture medium, compared with that from cells without estrogenic treatment. This effect was blocked by the antagonist of estrogen receptors, tamoxifen. By Western blot, it was shown that 17- β estradiol significantly increased the amount of eNOS in treated cells, compared with that from their respective control cells. Moreover, the acetylcholine-induced release of nitrites in cells treated with 17- β estradiol was higher than nitrite production induced by the same dose of acetylcholine in control cells. In conclusion, our data underline the physiological role of 17- β estradiol, which promotes the increase in eNOS expression, potentiating the effects of vascular agonists that release nitric oxide, suggesting a cardiovascular protective role by estrogens.

* Departamento de Fisiología. Escuela Nacional de Ciencias Biológicas del IPN.

** Departamento de Farmacología y Toxicología del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

*** Departamento de Biomedicina Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN.

Correspondencia:

Av. Instituto Politécnico Nacional No. 2508, Col. Sn. Pedro Zacatenco, México D.F. Tel. 57477000 Ext. 5458, Fax: 57477095, E-mail: bescalan@mail.cinvestav.mx

Aceptado: 3 de noviembre de 2000

Introducción

Actualmente se han reportado diversos estudios que muestran diferencias fisiológicas entre los lechos vasculares de hembras y machos. Sánchez y cols (1996) demostraron que la respuesta a fenilefrina es mayor en anillos de aorta de conejo macho comparada con la de anillos de conejos hembra.¹ Resultados similares fueron reportados por Wellman y cols (1996) quienes observaron que la reducción en el diámetro de las arterias coronarias, que produce cambio en la presión de perfusión, es mayor en las coronarias de ratas macho, comparada con la respuesta en las de ratas hembra.² Estas observaciones sugirieron que las arterias de las ratas hembra poseían un mecanismo protector para los efectos de agonistas vasoconstrictores.

La diferencia en la reactividad vascular dependiente del sexo observada en los trabajos anteriores se eliminó al inhibir la sintasa de óxido nítrico (NOS) o al practicar ovariectomía a los animales, lo cual sugirió que las diferencias en la reactividad vascular se deben a una diferencia en la capacidad de síntesis de óxido nítrico (NO) y que las hormonas sexuales femeninas pueden ser las responsables de la diferencia en dicha producción. Esta hipótesis fue comprobada al demostrar que la síntesis de NO basal y la estimulada por acetilcolina en arterias de conejos hembra es mayor que en las arterias de conejos macho.¹

La influencia de las hormonas femeninas en el tono vascular y su relación con el NO también ha sido demostrada en ratas preñadas, en las cuales se produce reducción de la respuesta vasoconstrictora, lo cual ha sido atribuido al aumento de la liberación de NO, en respuesta al agente vasoconstrictor.^{3,4} En estudios previos se ha observado que el aumento en la liberación de NO está relacionado con el aumento de la expresión de la NOS endotelial.⁵

Varios estudios han demostrado que los efectos biológicos de las hormonas esteroideas se deben a la elevación de los niveles de RNAm.⁶⁻⁸ Ceccatelli y cols (1996) demostraron asociación entre el aumento en la expresión de los niveles de RNAm de la NOS y los niveles de 17- β estradiol.⁹ Estos autores demostraron que la expresión de la NOS neuronal (Tipo I) se ve incrementada en la zona nucleoventrómedial del hipotálamo en ratas ovariectomizadas tratadas con 17- β estradiol, en comparación con ratas ovariectomizadas tratadas con vehículo.

Estos datos sugieren que el 17- β estradiol aumenta la producción de NO en células endoteliales mediante la inducción de la expresión y/o aumento de la actividad enzimática de la NOS, por lo que en el presente estudio nos propusimos caracterizar el mecanismo que aumenta la liberación de NO en células endoteliales en cultivo tratadas con 17- β estradiol.

Material y métodos

Reactivos. Bicarbonato de sodio, nitrato de sodio, trizma base, azul brillante de Coomassie R-250, sacarosa, fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), p-tosil-lisin-cloro metil cetona (TLCK), N-etil-maleimida (NEM), Iodoacetamida (IAA), Tween 20, Lipopolisacárido de *E. coli* cepa K-235 (LPS), albúmina sérica bovina, N-naftil-etilendiamina, clorhidrato de procaína, lauril sulfato de sodio, collagenasa tipo IV, 17- β estradiol, tamoxifen, acetilcolina (Ach) y bradicinina de Sigma Chem. Co. Suero fetal bovino (SFB), medio Eagle modificado de Dulbecco alto en glucosa (D-MEM), tripsina-EDTA (0.05%-0.53 mM), cloruro de calcio, amortiguador salino de fosfatos (PBS) y liofilizado de penicilina-estreptomina (10 000 U/mL de penicilina G sódica y 10 000 U/mL de sulfato de estreptomina) de GIBCO BRL. Reactivos para detección por quimioluminiscencia (ECL) y anticuerpo anti-ratón conjugado con peroxidasa de rábano de Amersham Life Science. Anticuerpo monoclonal anti-eNOS de Transduction Laboratories.

Cultivo primario de células endoteliales. Las células endoteliales se obtuvieron de aortas torácicas frescas de ratas Wistar macho con un peso promedio de 250 g, por disección en condiciones asépticas y posterior digestión con collagenasa, incubando a 37°C por 15 minutos.¹⁰ Las aortas fueron transferidas a D-MEM conteniendo SFB al 10% y penicilina/estreptomina, donde se raspó la luz de la aorta para desprender el endotelio, desechando el músculo liso sobrante. La suspensión celular se lavó dos veces con PBS estéril, centrifugando a 2000 rpm/10 min.

Las células fueron resuspendidas en D-MEM, SFB 10%, antibióticos, y se sembraron en placas de poliestireno para cultivo (35 mm de diámetro) pretratadas con colágeno. Estas placas se incubaron a 37°C en una atmósfera humidificada conteniendo 5% de CO₂/95% O₂ por 4 días hasta que las células formaron una monocapa confluyente.

Determinación de nitritos. La determinación de la concentración de nitritos de los sobrenadantes

de los cultivos se realizó por medio de la reacción de Griess modificada.¹¹ Al término del tratamiento se recolectaron los sobrenadantes y se congelaron a -20°C hasta el momento de la determinación. Se realizó una curva estándar de nitritos a partir de una solución madre de KNO_2 10 mM, con las siguientes concentraciones: 0, 0.5, 1, 2, 4, 8, 16, 32 μM en medio de cultivo sin rojo de fenol (D-MEM), tomando 100 μL de los estándares y de los problemas, respectivamente, y adicionando el reactivo de Griess. La reacción se llevó a cabo en placas de 96 pozos, incubando las placas por 10 minutos en la oscuridad. Se procedió a la lectura en un lector de placas de ELISA con un filtro de 550 nm.

Cuantificación de proteínas. La determinación de la concentración de proteínas de células obtenidas de los cultivos se realizó por el método de Bradford.¹² Al término de los tratamientos se recolectaron las células con amortiguador para lisis con inhibidores de proteasas (TLCK, NEM, IAA, PMSF, Tween 20).

Se realizó una curva estándar de calibración de proteínas, partiendo de una solución madre de albúmina sérica bovina (1 mg/mL), con las siguientes concentraciones: 0, 2, 4, 6, 8, 10, 15, 20, 25, 30, 35 $\mu\text{g/mL}$. Las muestras (estándares y problemas) se completaron a un volumen de 100 μL con PBS y a éstos se añadieron 900 μL de reactivo de Bradford. Los tubos se mezclaron perfectamente y se procedió a la lectura en un espectrofotómetro a 595 nm. Las concentraciones se determinaron a partir de la interpolación de los valores obtenidos en la regresión lineal de la curva de calibración.

Determinación de eNOS por Western blot. Una vez cuantificadas las proteínas provenientes de los cultivos, se mezclaron con amortiguador de muestra y se colocaron en baño María a ebullición por 5 min. Se realizó el corrimiento electroforético, colocando 30 μg de proteína/pozo, en SDS-PAGE al 7.5% (80 V/30 min. y 160 V/1 h.). Una vez concluida la electroforesis, las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa en condiciones semisecas (15 V/45 min.) La membrana se bloqueó utilizando PBS-leche 5% por 3 h. a temperatura ambiente.

La membrana se incubó toda la noche a temperatura ambiente con el anticuerpo específico anti-eNOS diluido 1:100 en PBS-leche 5%. Después de lavar con PBS y PBS-tritón, la membrana se incubó con el anticuerpo secundario marcado con peroxidasa, diluido 1:3000 en PBS-leche 5%.

Previo lavado con PBS-tritón y PBS, la membrana se expuso a los reactivos de quimioluminiscencia para su revelado por autorradiografía.¹³

Análisis estadístico. Todos los grupos experimentales fueron de un mínimo de 4 repeticiones por duplicado, calculando en cada grupo la media \pm error estándar (EEM). La comparación de los resultados se realizó por medio de análisis de varianza unifactorial, seguida por una prueba tipo Newman-Keuls. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p < 0.05$.

Resultados

Caracterización del cultivo celular. Las células endoteliales provenientes de aorta torácica de ratas Wistar muestran formas poliédricas con marcadas interdigitaciones, típicas de estas células (Fig. 1).

La presencia de eNOS y del factor von Willebrand es característica de estas células. El análisis por Western blot de células que se incubaron en medio de cultivo mostraron la presencia de una proteína de peso molecular de 140 kDa, que fue reconocida por el anticuerpo específico contra eNOS.

Al realizar la inmunohistoquímica contra el factor von Willebrand de células endoteliales cultivadas en cubreobjetos, se observó la presencia de este factor en más del 90% de las células obtenidas, confirmando la obtención de un cultivo predominante de células endoteliales.

Para demostrar la capacidad de síntesis de NO en las células endoteliales, los cultivos fueron expuestos a bradicinina (10 nM) y acetilcolina (0.1 μM) para estimular la NOS y observar la producción de NO, cuantificado como nitritos. La incubación de las células endoteliales con bradicinina durante 1 hora aumentó la concentración de nitritos en el medio de cultivo de $11.62 \pm 0.7 \mu\text{M}$ a $27.5 \pm 1.57 \mu\text{M}$ de nitritos. De manera similar se observó un incremento importante en la producción de NO cuando las células fueron tratadas con ACh, el cual aumentó hasta $25.01 \pm 6.3 \mu\text{M}$ de nitritos (Fig. 2).

La incubación de células endoteliales con lipopolisacárido (LPS) (1 $\mu\text{g/mL}$) durante 24 horas produjo un aumento importante en la cantidad de nitritos liberados al medio. La concentración de NO aumentó a $2.14 \pm 0.2 \mu\text{M}$ de nitritos, comparada con la concentración de $0.4 \pm 0.3 \mu\text{M}$ de nitritos, en el grupo de células no tratadas. Cuando las células que fueron expuestas al LPS se estimularon con ACh (0.1 μM), la producción de NO aumentó a $3.7 \pm 0.25 \mu\text{M}$ de nitritos, comparado con el efec-

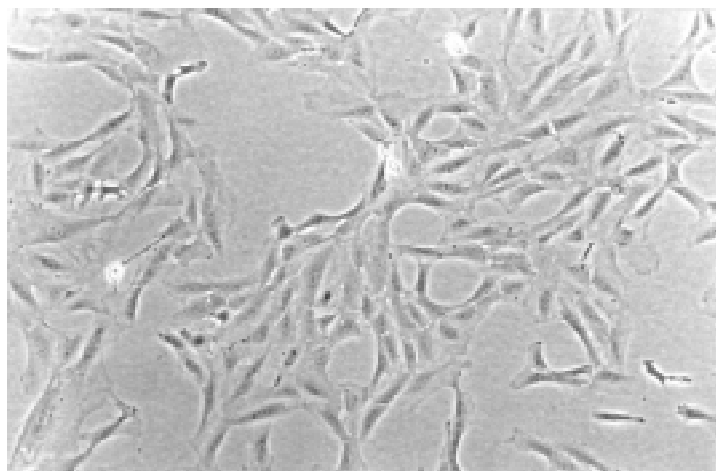


Fig. 1. Cultivo de células endoteliales de aorta torácica de rata Wistar macho, observado por contraste de fases en un microscopio invertido con un aumento de 20X.

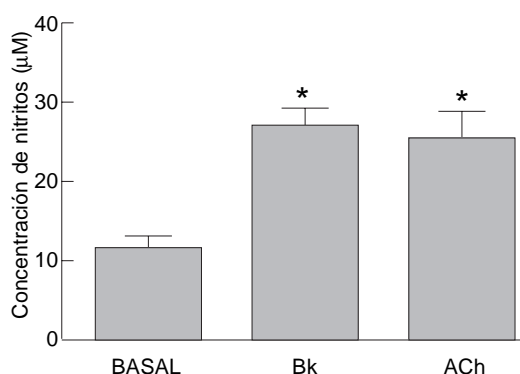


Fig. 2. Concentración en el medio de cultivo de nitritos provenientes de células endoteliales en confluencia total (basal) y al ser estimuladas con bradicinina (Bk 10 nM) o acetilcolina (ACh 0.1 μM). Cada barra representa el promedio \pm EEM de $n = 6$, * $p < 0.05$ con respecto al grupo control.

to de la misma dosis de ACh en células que no fueron incubadas con LPS, donde la concentración de nitritos fue de 2.2 ± 0.4 μM (Fig. 3).

Efecto del 17-β estradiol en la síntesis de NO. La adición de 17-β estradiol (1 nM) a las células endoteliales durante 46 horas incrementó la producción de NO con respecto al grupo control de células que fueron tratadas únicamente con el vehículo del 17-β estradiol. La concentración de NO en el grupo tratado con 17-β estradiol (2.8 ± 0.4 mM de nitritos) fue el triple de la obtenida en el grupo control (0.98 ± 0.03 μM de nitritos). La incubación de las células endoteliales con Tamoxifen (1 μM) antagonista del receptor de estrógenos, no modificó la producción basal de

NO, liberando una concentración de 0.8 ± 0.1 μM de nitritos. Sin embargo, cuando las células se incubaron con Tamoxifen y 17-β estradiol (1 nM), el efecto estimulante del estrógeno se observó claramente disminuido al medir la concentración de nitritos en este grupo, dando un valor de $0.14 \pm .019$ μM (Fig. 4).

Después del tratamiento con 17-β estradiol o su vehículo (control), las células endoteliales fueron estimuladas con ACh para originar un incremento en la producción de NO. Las células endoteliales estimuladas con ACh (1 y 10 μM)

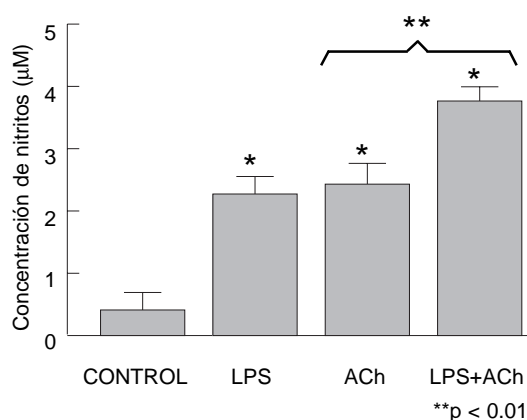


Fig. 3. Concentración en el medio de cultivo de nitritos provenientes de células endoteliales estimuladas con acetilcolina (ACh 0.1 μM) con y sin pretratamiento con lipopolisacárido (LPS 1 μg/mL). Cada barra representa el promedio \pm EEM de $n = 6$, * $p < 0.05$ con respecto al grupo control.

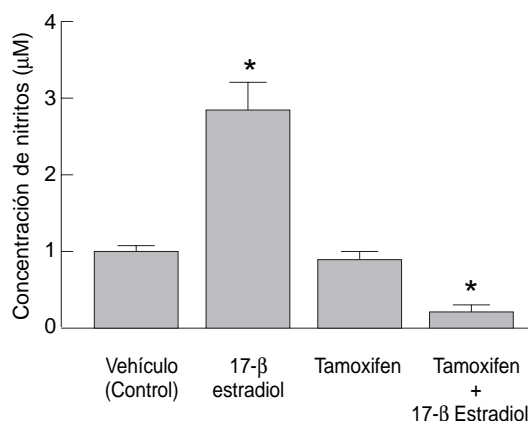


Fig. 4. Concentración en el medio de cultivo de nitritos provenientes de células endoteliales incubadas en presencia de vehículo (control), 17-β estradiol (1 nM), Tamoxifen (0.1 μM) o una combinación de 17-β estradiol (1 nM)+Tamoxifen (0.1 μM). Cada barra representa el promedio \pm EEM de $n = 6$, * $p < 0.05$ con respecto al grupo control.

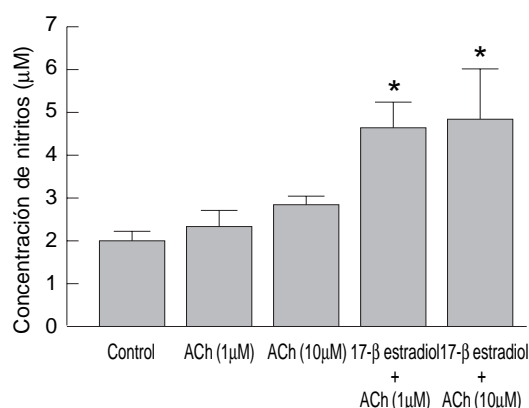


Fig. 5. Concentración en el medio de cultivo de nitritos provenientes de células endoteliales estimuladas con dos dosis de acetilcolina (ACh 1 µM y 10 µM) con y sin pretratamiento de 17-β estradiol (1 nM). Cada barra representa el promedio ± EEM de $n = 6$, * $p < 0.05$ con respecto al grupo de ACh de la misma dosis sin pretratamiento.

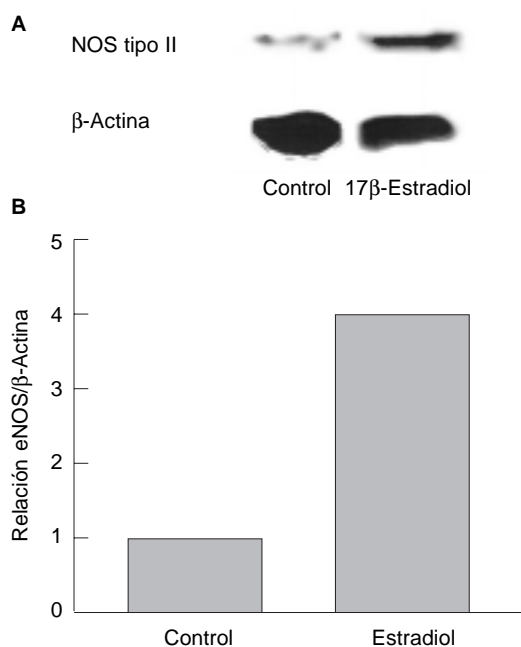


Fig. 6. A) Western blot de la sintasa de óxido nítrico tipo III proveniente de células endoteliales en ausencia (control) y presencia de 17-β estradiol [1 nM] y **B)** Comparación de los valores densitométricos correspondientes a cada proteína, normalizados con respecto a la intensidad de la mancha de β-actina.

presentaron incremento en la producción de NO de 2.37 ± 0.29 y 2.87 ± 0.15 µM de nitritos, respectivamente; en comparación con las células controles no estimuladas, cuya producción de NO fue de 2.0 ± 0.19 µM de nitritos. Sin embargo, en

las células endoteliales que fueron pretratadas con 17-β estradiol, al ser estimuladas con las mismas dosis de ACh (1 y 10 µM), el efecto fue mucho mayor sobre la producción de NO, siendo la cantidad producida de 4.58 ± 0.52 y 4.77 ± 1.33 µM de nitritos, respectivamente. Estos resultados indican que el tratamiento con 17-β estradiol potencia el efecto estimulador de agonistas de la eNOS tales como la ACh (Fig. 5).

Efecto del 17-β estradiol sobre la expresión de eNOS. El Western blot de proteínas provenientes de células endoteliales tratadas con 17-β estradiol (1 nM) mostró un aumento en la expresión de eNOS, en comparación con las células endoteliales incubadas únicamente con el vehículo del 17-β estradiol, que expresan de manera basal dicha proteína. El análisis densitométrico muestra que dicho incremento es de aproximadamente 4.4 veces con respecto a la expresión basal. Para la normalización de las manchas de eNOS se empleó como control interno a la actina, proteína constitutiva de expresión constante (Fig. 6).

Discusión

El cultivo primario de células obtenido de aorta de rata Wistar macho posee las características de células endoteliales que presentan los marcadores típicos del endotelio, tales como la presencia de eNOS y el Factor von Willebrand.¹⁴ Adicionalmente, el cultivo celular posee propiedades que representan las características fisiológicas y bioquímicas importantes, como la presencia de la vía del óxido nítrico, y que puede ser estimulada con agonistas clásicos como la acetilcolina y la bradicinina; además de ser susceptible de inducción génica por un clásico inductor como el LPS.

El uso de un cultivo de células endoteliales con estas propiedades bioquímicas nos permitió estudiar el mecanismo de acción del 17-β estradiol sobre la producción de NO. Nuestros datos claramente muestran que el 17-β estradiol aumenta la producción de NO a través de un mecanismo mediado por el receptor estrogénico, y probablemente asociado a la inducción de la síntesis de la proteína eNOS, por medio de un aumento en el RNAm.

El efecto del 17-β estradiol sobre el RNAm ha sido sugerido previamente por Vagnoni y cols (1998), quienes observaron que el 17-β estradiol incrementó la expresión de la eNOS en endotelio de arterias uterinas; sin embargo, cuando estos autores utilizaron endotelio de arterias de ovejas hembras, no se presentó el mismo efecto, por lo

que afirmaron que el efecto del 17- β estradiol es únicamente a nivel local. Estos datos parecen contradictorios comparados con los datos de Sánchez¹ y Wellman² quienes trabajaron con arteria aorta y arterias coronarias de ratas respectivamente, y demostraron que las diferencias existentes en la reactividad vascular entre ratas macho y hembra se deben a la presencia de las hormonas sexuales femeninas que se presentan en todo el lecho vascular.

La falta de efecto del 17- β estradiol en los niveles de RNAm se puede deber posiblemente al hecho de que en arterias de hembras siempre están presentes los estrógenos, por lo que son menos sensibles a cambios estrogénicos.

Los datos anteriores nos sugirieron que en el presente estudio utilizáramos células endoteliales de aorta de ratas macho, cuya exposición a estrógenos circulantes ha sido mínima, lo que reduciría la posibilidad de eventos asociados a concentraciones altas de 17- β estradiol.¹⁵

El 17- β estradiol provocó un aumento en la producción de NO en células endoteliales, como se observa al medir la liberación de nitritos. Se demostró que este efecto es dependiente del receptor a estrógenos, por el bloqueo específico que provocó el tamoxifen, antagonista del receptor a estrógenos, el cual se utilizó simultáneamente para comprobar la presencia de dichos receptores en estas células.

El aumento en la producción de NO dependiente del 17- β estradiol pudiera atribuirse al menos a tres mecanismos del complejo hormona-receptor, tales como: a) La estimulación directa de la NOS, lo cual incrementaría la producción de NO, b) Una respuesta secundaria característica de los estrógenos, los cuales inducen la expresión de genes cuyos productos a su vez inducirían la expresión del gen de la eNOS,¹⁶ y c) Una respuesta primaria característica de los estrógenos, en la cual el complejo hormona-receptor induce directamente la expresión de la eNOS por un aumento de la trans-

cripción del gen de dicha sintasa, al unirse el complejo hormona-receptor a su motivo específico dentro de la región promotora del gen de la eNOS.¹⁶

El efecto inductor del 17- β estradiol sobre la expresión de la eNOS se confirmó al realizar el Western blot de células endoteliales tratadas con dicho estrógeno, comparadas con células controles, lo que mostró un incremento en el contenido proteico de eNOS, debido al 17- β estradiol. Por lo anterior, se puede decir que el mecanismo de acción del 17- β estradiol, al aumentar la producción de NO, se lleva a cabo por el complejo hormona-receptor a nivel nuclear, teniendo como resultado final el incremento en el contenido de la eNOS.

Aun cuando este aumento en la cantidad de eNOS en las células endoteliales es de relevancia por producir un aumento en la liberación basal de NO, adquiere una mayor importancia cuando se observa el efecto de agonistas clásicos de la vía del NO, como la ACh. La potenciación del efecto de ACh sobre la producción de NO sugiere que niveles altos de 17- β estradiol pueden condicionar un aumento en los efectos vasorrelajantes de ACh. Los datos presentados sugieren que el incremento de la expresión de la eNOS en lechos vasculares donde circulen estrógenos puede estar asociado al papel protector cardiovascular que se observa en mujeres premenopáusicas, y a las diferencias en la reactividad vascular entre machos y hembras, lo cual explicaría la menor incidencia de hipertensión en mujeres en edad fértil que en hombres de edades similares.

Conclusiones

Nuestros datos resaltan la importancia fisiológica que el 17- β estradiol tiene al interactuar con el receptor a estrógenos, para inducir un incremento en la expresión de la eNOS, lo cual aumenta la producción basal de NO y potencia el efecto de agonistas vasculares que liberan NO, lo que se refleja en su papel protector a nivel cardiovascular.

Referencias

1. SÁNCHEZ LA, GÓMEZ MJ, DORANTES AL, ROSALES JL, PASTELÍN G, DÍAZ V, ET AL: *The effect of ovariectomy on depressed contractions to phenylephrine and KCl and increased relaxation to acetylcholine in isolated aortic rings of female compared to male rabbits*. Br J Pharmacol 1996; 118: 2017-2022.
2. WELLMAN GC, BONEV AD, NELSON MT, BRAYDEN JE: *Gender differences in coronary artery diameter involve estrogen, nitric oxide and calcium-dependent potassium channels*. Circ Res 1996; 79(5): 1024-1030.
3. BOBADILLA RA, HENKEL CC, HENKEL EC, ESCALANTE B, HONG E: *Possible involvement of endothelium derived hyperpolarizing factor in vascular responses of abdominal aorta from pregnant rats*. Hypertension 1997; 30(3P2): 596-602.

4. GOETZ RM, MORANO I, CALOVINI T, STUDER R, HOLTZ J: *Increased expression of endothelial constitutive nitric oxide synthase in rat aorta during pregnancy*. *Biochem Biophys Res Com* 1994; 205(1): 905-910.
5. VAGONNI KE, SHAW CE, PHERNETTON TM, MEGLIN BM, BIRD IM, MAGNESS RR: *Endothelial vasodilator product by uterine and systemic arteries. Ovarian and estrogen effects on NO synthase III*. *Am J Physiol* 1998; 275(5P2): H1845-56.
6. LEMEUR M, GLANVILLE N, MANDEL JL: *The ovalbumin gene family: Hormonal control of X and Y gene transcription and mRNA accumulation*. *Cell* 1981; 23: 561-571.
7. MCKNIGHT GS, PALMITER RD: *Transcriptional regulation of the ovalbumin and conalbumin genes by steroid hormones in chick oviduct*. *J Biol Chem* 1979; 254: 9050-9058.
8. MEANS AR, CONSTOCK JP, ROSENFELD GC: *Ovalbumin messenger RNA of chick oviduct: Partial characterization, estrogen dependence and translation in vitro*. *Proc Natl Acad Sci* 1972; 56: 686-693.
9. CECCATELLI S, GRANDISON L, SCOTT REM, PFAF DW, KOW LEE M: *Estradiol regulation of nitric oxide synthase mRNA's in rat hypothalamus*. *Neuroendocrinology* 1996; 64: 357-363.
10. GRYGLEWSKY RJ, MONCADA S, PALMER RMJ: *Bioassay of prostacyclin and endothelium derived relaxing factor (EDRF) from porcine aortic endothelial cells*. 1985. *Br J Pharmacol* 1997; 120(4): 494-503.
11. GREEN LC, WAGNER DA, GLOGOWSKI J, SKIPPER PL, WISHNOK JS, TANNENBAUM SR: *Analysis of nitrite, nitrate and [15N]-nitrite in biological fluids*. *Anal Biochem* 1982; 126: 131-138.
12. BRADFORD MM: *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding*. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-254.
13. ZEMBOWICZ A, TANG J, WU KK: *Transcriptional induction of endothelial nitric oxide synthase type III by lysophosphatidylcholine*. *J Biol Chem* 1995; 270(28): 17006-17010.
14. SIMIONESCU N, SIMIONESCU M: *The cardiovascular system*. In: Weiss L, Greep RO. "Histology", 4th ed. New York. McGraw-Hill Inc., 1977; 373-432.
15. DOERR P, PIRKE KM: *Regulation of plasma oestrogens in normal adult males. II Response of oestradiol, oestrogens, testosterone and cortisol to dexamethasone and ACTH administration*. *Acta Endocrinol* 1975; 78(3): 531-538.
16. POWER RF, CONNEELY OM, O'MALLEY BW. *New insights into activation of the steroid hormone receptor superfamily*. *TIPS* 1992; 13(8): 318-323.