



**ȘCOALA DE STUDII AVANSATE A ACADEMIEI ROMÂNE
INSTITUTUL DE BIOLOGIE ȘI PATOLOGIE CELULARĂ
„NICOLAE SIMIONESCU”**

**REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT
cu titlul**

**„Efectul stimulării cu hormoni estrogeni al celulelor stem
obținute din sânge de cordon ombilical și gelatina
Wharton asupra regenerării țesutului cardiac”**

**Susținută în data de 30.07.2020,
Aula George Emil Palade, Institutul de Biologie și Patologie Celulară
„Nicolae Simionescu”**

Conducător științific:

Acad. MAYA SIMIONESCU

Doctorand:

MARIA-CRISTINA MIHAI (COROTCHI)

Teza de doctorat poate fi consultată la Institutul de Biologie și Patologie Celulară
„Nicolae Simionescu”

CUPRINS

Cuvânt înainte	1
Listă abrevieri	2
I. STADIUL ACTUAL AL CUNOȘTINTELOR	7
I.1. Hormonii estrogeni	7
I.1.1. Descrierea și efectele biologice ale estrogenilor	7
I.1.2. Procesul de sinteză și metabolismul estrogenilor	8
I.2. Receptorii estrogeni	10
I.2.1. Mecanisme de acțiune a receptorilor estrogenici (ERs)	12
I.2.1.1. Mecanismul genomic sau „clasic” de acțiune al receptorilor estrogenici	12
I.2.1.2. Mecanismul alternativ de acțiune non-genomică al receptorilor estrogenici	12
I.3. Boala cardiovasculară și necesitatea regenerării cardiace	15
I.3.1. Ateroscleroza	15
I.3.2. Terapia de substituție hormonală, menopauza și bolile cardiovasculare	17
I.4. Inductori ai regenerării vasculare în bolile cardiovasculare	18
I.4.1. Introducere în lumea celulelor stem	18
I.4.2. Celulele stem mezenchimale (MSCs)	21
I.4.2.1. Scurt istoric al apariției celulelor stem mezenchimale în lumea științifică	21
I.4.2.2. Celulele stem mezenchimale derivate din gelatina Wharton (Wharton’s jelly - WJ)	21
I.4.2.3. Bolile cardiovasculare: terapia cu MSCs și conexiunea MSCs cu estrogenii	25
I.4.3. Celule endoteliale progenitoare (EPCs)	29
I.4.3.1. Scurtă descriere istorică a apariției și evoluției celulelor endoteliale progenitoare	29
I.4.3.2. Celule endoteliale progenitoare derivate din sângele cordonului ombilical	30
I.4.3.3. Celulele endoteliale progenitoare, estrogenii și implicarea lor în mecanismul de regenerare după ischemie	33
II. CONTRIBUTII ORIGINALE	40
II.1. Efectul 17-beta estradiolului (E2) asupra celulelor stem mezenchimale (MSCs) demonstrate prin studii <i>in vitro</i>	40
II.1.1. Introducere și obiective	40
II.1.2. Materiale și metode	43
II.1.2.1. Izolarea celulelor stem mezenchimale din gelatina Wharton (WJ)	43
II.1.2.1.1. Caracterizarea și diferențierea celulelor stem mezenchimale	44
II.1.2.1.2. Caracterizarea imunofenotipică a MSCs prin tehnica de citometrie în flux	47

II.1.2.2. Testarea caracterului citotoxic, adeziunii, viabilității și proliferării MSCs după tratamentul cu hormonul sexual, E2	48
II.1.2.3. Caracterizarea imunofenotipică a MSCs stimulate cu E2	49
II.1.2.4. Analiza cantitativă PCR în timp real (qRT-PCR)	50
II.1.2.5. Tehnica Western blot – determinarea expresiei proteice	50
II.1.2.6. Eliberarea de oxid nitric (NO) a MSCs stimulate cu E2	51
II.1.2.7. Analiza proteomică a MSCs după expunerea la hormonul sexual E2	52
II.2. Studii <i>ex-vivo</i>: efectele 17-beta estradiolului (E2) exercitate asupra integrării și migrării celulelor stem mezenchimale (MSCs) în țesutul cardiac lezat	54
II.2.1. Introducere si obiective	54
II.2.2. Materiale si metode	55
II.2.2.1. Stabilirea condițiilor optime de obținere a țesuturilor cardiace murine. Teste de viabilitate	55
II.2.2.2. Evaluarea interacțiunii și răspunsului chemotactic al MSCs cu secțiunile de țesut cardiac prin sistemul de analiză în timp real - xCELLigence	57
II.2.2.3. Evaluarea integrării MSCs în secțiunile de țesut cardiac prin tehnica de imunohistochimie	58
II.2.2.4. Detectarea proteinelor MMP-2, MMP-9, Angiogenin (ANG), și VEGF secretate în mediul recoltat obținut în urma sistemului de co-cultură indirectă dintre MSCs ± E2 și secțiunile de țesut cardiac	59
II.3. Studii <i>in vivo</i>: stimularea MSCs cu E2 duce la inițierea procesului de neovascularizare/angiogeneză după ovariectomizare la șoarecii C57Bl/6	59
II.3.1. Introducere si obiective	59
II.3.2. Materiale si metode	61
II.3.2.1. Modelul C57Bl/6 ovariectomizat (OVX)	61
II.3.2.2. Tehnica ELISA	64
II.3.2.3. Tehnica de angiogeneză <i>in vivo</i> : studiul formațiunilor de Matrigel sau “Matrigel plugs” implantate la femelele C57Bl/6	64
II.3.2.4. Analiza proteomică a implanturilor de Matrigel	66
II.4. Analiza statistică	68
II.5. Rezultate	69
II.5.1. Efectele 17-beta estradiolului (E2) asupra celulelor stem mezenchimale demonstrate prin studii <i>in vitro</i>	69
II.5.2. Studii <i>ex-vivo</i> : efectele 17-beta estradiolului (E2) exercitate asupra integrării și migrării celulelor stem mezenchimale în țesutul cardiac lezat	92
II.5.3. Studii <i>in vivo</i> : stimularea celulelor stem mezenchimale cu E2 conduce la inițierea procesului de neovascularizare/angiogeneză după ovariectomizare (model experimental <i>in vivo</i>)	102
II.6. Discuții și concluzii parțiale	111
II.7. Efectul 17-beta estradiolului (E2) asupra celulelor endoteliale progenitoare (EPCs) - studii <i>in vitro</i> și <i>ex-vivo</i>	127
II.7.1. Introducere și obiective	127

II.7.2. Materiale și metode	134
II.7.2.1. Izolarea celulelor endoteliale progenitoare din sângele din cordonul ombilical (UCB)	134
II.7.2.1.1. Caracterizarea celulelor endoteliale progenitoare	135
II.7.2.2. Testarea caracterului citotoxic, a adeziunii, viabilității și proliferării celulelor endoteliale progenitoare după tratamentul cu hormonul sexual, E2	137
II.7.2.3. Caracterizarea imunofenotipică a celulelor endoteliale progenitoare stimulate cu E2	138
II.7.2.4. Analiza cantitativă PCR în timp real (qRT-PCR)	138
II.7.2.5. Tehnica Western blot – determinarea expresiei proteice	139
II.7.2.6. Analiza prin spectrometrie de masă (LC-MS) a EPCs supuse tratamentului cu E2	140
II.8. “Scratch Wound Healing Assay” aplicată EPCs supuse tratamentului cu E2. Folosirea unui sistem brevetat de noi pentru măsurarea în timp real a deplasării celulelor <i>in vitro</i> folosind impedanța celulară și un dispozitiv separator original aplicat pentru modificarea plăcii de cultură celulară	141
II.9. Testarea efectelor estrogenilor asupra EPCs. Identificarea și evaluarea receptorilor hormonal; inducerea stresului oxidativ la EPCs	146
II.9.1. Detectarea receptorilor estrogeni (ERs) pe celulele endoteliale progenitoare	146
II.9.2. Tehnica Matrigel: evaluarea formării structurilor tubilor vasculari în urma stimulării cu hormoni sexuali a celulelor endoteliale progenitoare.	146
II.10. Studii <i>ex-vivo</i>: efectele 17-beta estradiolului (E2) exercitate asupra integrării și migrării celulelor endoteliale progenitoare în țesutul cardiac lezat	148
II.10.1. Introducere și obiective	148
II.10.2. Materiale și metode	149
II.10.2.1. Obținerea secțiunilor de țesut cardiac murin. Testul MTT	149
II.10.2.2. Analiza în timp real a procesului de chemotaxie a celulelor endoteliale progenitoare către secțiunile de țesut cardiac - sistemul CIM-plate xCELLigence	151
II.10.2.3. Analiza imunohistochimică a încorporării EPCs ± E2 în secțiunile de țesut cardiac	151
II.10.2.4. Detectarea proteinelor Angiogenin (ANG), VEGF și PlGF secretate în mediul de cultură de către celulele endoteliale progenitoare stimulate cu E2 după contact indirect cu țesutul cardiac (co-cultură indirectă)	153
II.11. Analiza statistică a rezultatelor	153
II.12. Rezultate	154
II.12.1. Efectul 17-beta estradiolului (E2) asupra EPCs demonstrate prin studii <i>in vitro</i>	154
II.12.2. “Scratch Wound Healing Assay” aplicată EPCs supuse tratamentului cu hormonul sexual – sistem brevetat de noi	166
II.12.3. Testarea efectelor estrogenilor asupra celulelor endoteliale progenitoare. Identificarea și evaluarea receptorilor hormonal	169
II.12.4. Efectele 17-beta estradiolului (E2) asupra integrării și migrării celulelor endoteliale progenitoare în țesutul cardiac lezat; studii <i>ex-vivo</i>	172
II.13. Discuții și concluzii parțiale	176

CONCLUZII GENERALE	186
PERSPECTIVE	190
BIBLIOGRAFIE	192

Cuvinte cheie: Celule stem mezenchimale, celule endoteliale progenitoare, hormoni estrogeni, 17-beta estradiol, receptori pentru estrogeni (alfa și beta), terapii celulare, boli cardiovasculare, sânge placentar, gelatina Wharton, secțiuni de țesut cardiac.

Număr total de pagini – 220

Număr de figuri în partea I – „Stadiul actual al cunoștințelor” – 11

Număr de figuri în partea a II-a – „Contribuții originale” – 57

Număr tabele – 3

Indicații bibliografice – 210

Lucrări publicate în reviste internaționale indexate ISI – 6 (4 autor principal)

Lucrări publicate în reviste internaționale indexate BDI – 1 (1 co-autor)

Brevete naționale – 2

Rezumate publicate în reviste indexate ISI – 1 (autor principal)

Rezumate publicate în reviste indexate BDI – 1 (autor principal)

Lucrări în pregătire – 3

Comunicări orale susținute la manifestări științifice internaționale – 9 (5 autor principal)

Comunicări orale susținute la manifestări științifice naționale – 1 (1 autor principal)

Postere prezentate la manifestări științifice internaționale – 20 (17 autor principal)

Postere prezentate la manifestări științifice naționale – 1 (1 autor principal)

Cursuri și specializări – 8

Premii internaționale – 2

Premii naționale – 7

Burse obținute pe durata programului doctoral – 4

Participarea la proiecte de cercetare internaționale/naționale – 8

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Hormonii sunt definiți ca fiind substanțe chimice elaborate de o celulă sau grup de celule specializate (numite celule endocrine) și care sunt transportate prin sistemul circulator la o celulă țintă care răspunde printr-o modificare a funcției sale.¹

Estrogenii sau Oestrogenii, sunt un grup de compuși din clasa hormonilor steroidici ce și-au primit denumirea în funcție de importanța lor atât în ciclul menstrual cât și în ciclul reproductiv. În organismul uman, estrogenii se găsesc sub trei forme: estradiol (produși de către ovare), estrone (produși în timpul menopauzei) și estriol (produși de către placentă).

În afara de protecția ce o oferă sistemului reproducător, hormonii estrogeni sunt cunoscuți a fi benefici și pentru alte organe și țesuturi. Efectele benefice ale estrogenilor s-au observat în creier (oferă neuroprotecție în cazul bolii Alzheimer), în ficat (reglarea colesterolului și a lipoproteinelor), la oase (previne apariția osteoporozei), în piele (combate îmbătrânirea) și poate reduce riscul cancerului de colon.^{2,3}

De asemenea, s-a demonstrat că, estrogenii exercită efecte protectoare și asupra sistemului cardiovascular, asupra procesului de ischemie/reperfuzie, asupra țesutului cardiac lezat în urma unui infarct miocardic.^{4,5}

Corpul uman produce trei forme de hormoni estrogeni, și anume estradiol (E2, C₁₈H₂₄O₂), estronă (E1, C₁₈H₂₂O₂) și estriol (E3, C₁₈H₂₄O₃). Cea mai studiată formă dintre cele 3 menționate anterior, este 17-beta estradiolul (E2), fiind și principalul contributor la activitatea estrogenică a femeilor aflate în perioada de pre-menopauză.

Pentru a-și exercita funcțiile biologice, hormonii estrogeni se leagă la situsuri de recunoaștere specifice numite **receptori**. Existența unui receptor estrogenic a fost demonstrată de Elwood Jensen în 1958, iar gena corespunzătoare a fost clonată tocmai în anul 1985.⁶

Mortalitatea cauzată de bolile cardiovasculare este rară în cazul femeilor aflate în pre-menopauză. Bărbații cu vârstă similară în comparație cu femeile aflate la pre-menopauză, prezintă un risc mai mare de a dezvolta hipertensiune arterială, precum și alte afecțiuni cardiovasculare (exemplu: boala arterială coronariană), însă, în cazul femeilor situația este diferită atunci când se instalează menopauza sau deja se afla la post-menopauză.

Mai multe studii observaționale și unele studii clinice efectuate la femei aflate la post-menopauză susțin ipoteza cu privire la E2 că este hormonul sexual ce acționează ca un "protector" al sistemului cardiovascular și circulator.^{7,8}

Pe de altă parte, progrese continue se înregistrează în terapiile destinate regenerării țesuturilor ce folosesc celule stem pluripotente adulte/precursori pentru a reconstrui sau regenera diferite țesuturi.

Domeniul celulelor stem mezenchimale (MSCs) a înregistrat progrese considerabile în ultimul deceniu, iar în rândul surselor multiple de celule stem, MSCs derivate din matricea ombilicală umană, și anume, gelatina Wharton (WJ), au fost propuse ca o nouă sursă potențială de celule care pot fi utilizate pentru tratamentul bolilor cardiovasculare (CVD) și în cazul terapiilor pentru cancer.⁹

Datorită descoperirii caracteristicilor excepționale ale MSCs și a încurajării de a implica MSCs atât în studii pre-clinice cât și clinice, se acceptă acum pe scară largă faptul că MSCs vor oferi un avantaj revoluționar în viitorul apropiat în intervenția terapeutică a diferitelor boli sau în regenerarea țesuturilor.

Rezultatele multiplelor studii clinice și pe animale (dar nu toate) au evidențiat potențialul de îmbunătățire a neovascularizării, reducerea cicatricilor și recuperarea funcțională atunci când se folosesc MSCs. Mai mult, modelele *in vitro* și *in vivo* sugerează că MSCs grăbesc angiogeneza post-ischemică și formarea vaselor de sânge.²⁵

Cu toate acestea, o capcană majoră a terapiei cu MSCs este greșea scăzută a celulelor transplantate în zonele infarctizate, adică circa 0,5% din MSCs transplantate au rămas în miocard după 4 zile.¹⁰ Deși calea de administrare, adică intravasculară sau intra-cardiacă, poate explica diferențele, greșea sau integrarea MSCs rămâne procentual scăzută (între 1-3%).¹¹

Deficiențele profunde în înțelegerea mecanistică a reparațiilor și regenerării cardiace mediate de MSCs rămân încă un obstacol în avansarea, optimizarea și implementarea terapiei cu acest tip de celule.

Constatările de mai sus evidențiază nevoia crescută de optimizare a terapiei cu MSCs. În plus, identificarea moleculelor speciale pentru a putea pre-condiționa MSCs în scopul creșterii eficienței lor de adaptare și retenție și de a migra sau a fi redirecționate către locul potrivit (leziune sau țesut ischemic) rămâne o mare provocare, însă reprezintă și o caracteristică importantă pentru regenerarea țesutului sau organului respectiv.¹²

În sistemul reproductiv, estradiolul declanșează remodelarea țesuturilor, prin urmare, este posibil ca acest hormon sexual să faciliteze procesele de protecție, inclusiv repararea leziunilor ischemice. Se presupune că estrogenii pot facilita procesele biochimice și celulare în MSCs, generând factori paracrini, care facilitează greșea și integrarea MSCs, astfel, ajutând la repararea cardiacă.

Un alt tip de celule cu potențial angiogenic sunt celulele endoteliale progenitoare (EPCs) obținute fie din surse fetale, fie din sânge periferic.

EPCs au fost descrise pentru prima dată de către Asahara et al ²⁰ ca fiind celule CD34⁺, care sunt capabile să participe la procesele de vasculogeneză; de atunci, biologia EPCs a câștigat o atenție deosebită și rapidă.

Pentru a recrea un endoteliu sănătos, este necesar a se lua în considerare o sursă exogenă de EPCs mai tinere și mai sănătoase. Pentru a atinge acest obiectiv, EPCs derivate din sângele din cordonul ombilical ar putea reprezenta candidații potriviți pentru re-endotelializarea vaselor cărora li s-a aplicat un tratament vascular sau au suferit o leziune.

Aceste tipuri noi de celule endoteliale sunt relativ ușor de obținut, au un potențial proliferativ ridicat, sunt potrivite pentru transplant și posedă o toleranță imună care permite transplantarea cu succes în ciuda disparității antigenului leucocitelor umane (HLA), sau se pot potrivi de la donator la pacientul primitor prin utilizarea HLA-urilor prezente și cunoscute.^{14,15}

Celulele din sângele cordonului ombilical pot, de asemenea, să se dividă și să formeze un număr de celule de 100 de ori mai mare comparativ cu numărul de celule obținut din sângele periferic, și să aibă o cantitate semnificativ mai mare de activitate telomerazică.¹⁶

Motivele posibile pentru care nivelurile de EPCs scad odată cu vârsta includ o capacitate redusă de a se mobiliza sau de a se diferenția și/sau epuizarea celulelor stem/progenitoare din măduva osoasă. EPCs pot avea o sensibilitate crescută la apoptoză din cauza unui dezechilibru între factorii pro- și anti-apoptotici și/sau scăderea apărării împotriva radicalilor liberi. Dovezi recente au arătat că EPCs derivate din măduva osoasă sunt direcționate spre locurile cu leziuni vasculare și aderă la peretele vascular rănit pentru a recrea un strat endotelial intact.^{17,18} Creșterea numărului de EPCs circulante după administrarea de statine, estrogen, VEGF, G-CSF și efectuarea exercițiilor fizice, au arătat o re-endotelializare îmbunătățită după lezarea vasculară.^{19,20}

De asemenea, odată cu trecerea anilor, studii recente au arătat că procesul de îmbătrânire este mediat de către 17-beta estradiol. Acest hormon sexual a demonstrat efectele sale benefice prin reducerea senescentei EPCs datorită scăderii receptorului angiotensinei de tip 1²¹ și prin promovarea activității telomerazei.²²

Luând în considerare datele existente în literatura de specialitate, **scopul** acestui proiect cuprins în teza de doctorat a fost evaluarea rolului hormonului estrogenic 17-beta estradiol (E2) asupra adeziunii, proliferării, migrării și încorporării în țesutul cardiac a celulelor stem obținute din sânge de cordon ombilical (celule endoteliale progenitoare) și din gelatina Wharton (celule

stem mezenchimale) și descifrarea mecanismelor moleculare implicate în procesele de angiogeneză, remodelare și regenerare tisulară folosind sisteme *in vitro*, *ex-vivo* și *in vivo*.

Prezenta teză de doctorat conține **2 studii majore**.

În **prima parte** a tezei de doctorat - **Stadiul actual al cunoștințelor** - organizată în 4 capitole, sunt prezentate noțiuni teoretice referitoare la caracterizarea, efectele biologice și mecanismele de acțiune ale estrogenilor și receptorilor estrogenici. De asemenea, sunt prezentate posibilitățile terapeutice existente, dar și necesitatea dezvoltării unor noi strategii terapeutice ce implică utilizarea unor tipuri de celule stem considerate posibili agenți terapeutici în bolile cardiovasculare.

În a doua parte a lucrării de doctorat - **Contribuții originale** - cercetările noastre au fost concentrate în două studii majore legate de efectul E2 asupra proliferării, migrării/integrării MSCs sau EPCs în regenerarea țesutului cardiac (studii *in vitro*, *ex vivo* și *in vivo*).

Deoarece estrogenii stimulează creșterea și activitatea celulelor cardiovasculare^{23,24}, împreună cu faptul că promovează creșterea și angiogeneza în celulele endoteliale progenitoare și în celulele stem^{25,26}, **primul nostru obiectiv** a fost să identificăm dacă E2 poate facilita/crește adeziunea și proliferarea MSCs/EPCs și dacă caracterul de celulă stem al MSCs/EPCs este păstrat și după tratamentul cu hormonul sexual. Pentru a atinge acest obiectiv, în primul rând, am izolat și caracterizat MSCs/EPCs din gelatina Wharton și sângele cordonului ombilical, apoi am testat concentrația optimă de E2 pentru aceste tipuri de celule stem.

Recent, rezultatele multor studii oferă dovezi că E2 influențează biologia și fiziologia vasului de sânge și a inimii, prin interacțiunea directă cu celulele vaselor de sânge (celulele musculare netede, celulele endoteliale) și cu a celulelor existente în inima (miocite și fibroblaste) prin intermediul receptorilor estrogenici (ERs), ER-alfa și ER-beta. Prin urmare, **cel de-al doilea obiectiv** a fost de a elucida rolul celor doi ERs, în medierea efectelor anterior menționate.

Mai mult, **al treilea obiectiv** a fost acela de a examina prin analiza proteomică potențialele procese pro-reparatorii, căile și mecanismele afectate de modificările pe care le-ar putea provoca E2 în MSCs după tratamentul adecvat cu acest hormon.

Un **al patrulea obiectiv**, l-a constituit confirmarea și/sau validarea datelor obținute *in vitro*, iar pentru îndeplinirea acestui obiectiv, am procedat la studiul *in vivo* pe animale de laborator.

În concluzie, studiile noastre s-au axat pe elucidarea potențialului de adeziune, proliferare și/sau a mecanismelor apărute în urma expunerii MSCs/EPCs la tratamentul cu E2, tratament ulterior ce poate spori capacitatea celulelor stem de a repara/regenera țesutul cardiac lezat.

Concluzii generale obținute în cadrul prezentei teze de doctorat

1. Celulele umane (folosite în studiile noastre) supuse stimulării cu E2 ar putea constitui un instrument util în tratarea leziunilor cardiace, în special la femei.
2. Utilizarea celulelor stem provenite din sângele de cordon ombilical și gelatina Wharton tratate cu estradiol poate fi o alternativă utilă pentru depășirea limitărilor terapeutice pentru tratarea leziunilor cardiace la femei.
3. Accesul facil și cultivarea MSCs sau EPCs din sursele alese în studiile noastre ocolește problemele etice cu care se confruntă celulele stem embrionare.
4. Infuzarea celulelor tratate cu estradiol pentru o scurtă durată (48 ore) ar limita riscul de carcinogeneză asociată estrogenului și ar permite tratarea leziunilor cardiace.
5. Mecanismele celulare, biologice și moleculare identificate în celulele umane tratate cu estradiol utilizând screening-ul proteomic, pot oferi noi perspective în înțelegerea și dezvoltarea strategiilor de optimizare a tratamentului miocardului lezat, mai ales la femei.
6. Boala cardiovasculară crește în cazul femeilor aflate la menopauză, perioadă caracterizată prin scăderea nivelului de estrogeni. Deoarece subiecții din acest grup au o mare probabilitate de a suferi boli de inimă pentru care necesita tratament, stimularea celulelor izolate din surse fetale cu estrogen, precum și pre-tratamentul subiecților de sex feminin, ar putea favoriza grefarea celulelor, rezultând o refacere eficientă a funcției cardiace.
7. Elaborarea unui sistem *in vitro* original, **brevetat** de noi și aplicat celulelor endoteliale progenitoare supuse tratamentului cu hormonul sexual E2, care demonstrează în timp real migrarea și interacțiunea celulă-celulă (tehnica de “scratch/wound healing”), proces modulat de prezența antagonistului de moleculă.

Bibliografie

1. Crisp TM, Clegg ED, Cooper RL, et al. Environmental Endocrine Disruption: An Effects Assessment and Analysis*. *Env Heal Perspect.* 1998;1(1):6-11. doi:10.1289/ehp.98106s111
2. Almeida M, Laurent MR, Dubois V, et al. Estrogens and Androgens in Skeletal Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev.* 2017;97(1):135-187. doi:10.1152/physrev.00033.2015
3. Burns KA, Korach KS. Estrogen receptors and human disease: an update. *Arch Toxicol.* 2012;86(10):1491-1504. doi:10.1007/s00204-012-0868-5
4. Dubey RK, Jackson EK, Gillespie DG, Zacharia LC, Imthurn B, Keller PJ. Clinically used estrogens differentially inhibit human aortic smooth muscle cell growth and mitogen-activated protein kinase activity. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2000;20(4):964-972. doi:10.1161/01.ATV.20.4.964
5. Turgeon JL, Carr MC, Maki PM, Mendelsohn ME, Wise PM. Complex Actions of Sex Steroids in Adipose Tissue, the Cardiovascular System, and Brain: Insights from Basic Science and Clinical Studies. *Endocr Rev.* 2006;27(6):575-605. doi:10.1210/er.2005-0020
6. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1996;93(12):5925-5930. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8650195>. Accessed October 1, 2018.
7. Manson JE, Chlebowski RT, Stefanick ML, et al. Menopausal Hormone Therapy and Health Outcomes During the Intervention and Extended Poststopping Phases of the Women's Health Initiative Randomized Trials. *JAMA.* 2013;310(13):1353. doi:10.1001/jama.2013.278040
8. Manson JE, Hsia J, Johnson KC, et al. Estrogen plus Progestin and the Risk of Coronary Heart Disease. *N Engl J Med.* 2003;349(6):523-534. doi:10.1056/NEJMoa030808
9. Corotchi MC, Popa MA, Simionescu M. Testosterone stimulates proliferation and preserves stemness of human adult mesenchymal stem cells and endothelial progenitor

- cells. *Rom J Morphol Embryol*. 2016;57(1):75-80. doi:10.1093/bioinformatics/btl627
10. Müller-Ehmsen J, Krausgrill B, Burst V, et al. Effective engraftment but poor mid-term persistence of mononuclear and mesenchymal bone marrow cells in acute and chronic rat myocardial infarction. *J Mol Cell Cardiol*. 2006;41(5):876-884. doi:10.1016/j.yjmcc.2006.07.023
 11. Hou D, Youssef EA-S, Brinton TJ, et al. Radiolabeled cell distribution after intramyocardial, intracoronary, and interstitial retrograde coronary venous delivery: implications for current clinical trials. *Circulation*. 2005;112(9 Suppl):I150-6. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.104.526749
 12. Ray R, Novotny N, Crisostomo PR, Lahm T, Abarbanell A, Meldrum DR. Sex steroids and stem cell function. *Mol Med*. 2008;14(7-8):1. doi:10.2119/2008-00004.Ray
 13. Asahara T, Murohara T, Sullivan A, et al. Isolation of putative progenitor endothelial cells for angiogenesis. *Science*. 1997;275(5302):964-967. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9020076>. Accessed November 26, 2018.
 14. Ghen MJ, Roshan R, Roshan RO, et al. *Potential Clinical Applications Using Stem Cells Derived from Human Umbilical Cord Blood*. Vol 13.; 2006. doi:10.1016/S1472-6483(10)60646-3
 15. Brown MA, Zhang L, Levering VW, et al. Human umbilical cord blood-derived endothelial cells reendothelialize vein grafts and prevent thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2010;30(11):2150-2155. doi:10.1161/ATVBAHA.110.207076
 16. Ingram DA, Mead LE, Tanaka H, et al. Identification of a novel hierarchy of endothelial progenitor cells using human peripheral and umbilical cord blood. *Blood*. 2004;104(9):2752-2760. doi:10.1182/blood-2004-04-1396
 17. Zammaretti P, Zisch AH. Adult 'endothelial progenitor cells.' *Int J Biochem Cell Biol*. 2005;37(3):493-503. doi:10.1016/j.biocel.2004.06.018
 18. Aoki J, Serruys PW, van Beusekom H, et al. Endothelial Progenitor Cell Capture by Stents Coated With Antibody Against CD34. *J Am Coll Cardiol*. 2005;45(10):1574-1579. doi:10.1016/j.jacc.2005.01.048
 19. Wassmann S, Werner N, Czech T, Nickenig G. Improvement of Endothelial Function by Systemic Transfusion of Vascular Progenitor Cells. *Circ Res*. 2006;99(8):e74-83.

doi:10.1161/01.RES.0000246095.90247.d4

20. Asahara T, Bauters C, Pastore C, et al. Local delivery of vascular endothelial growth factor accelerates reendothelialization and attenuates intimal hyperplasia in balloon-injured rat carotid artery. *Circulation*. 1995;91(11):2793-2801. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7758186>. Accessed November 26, 2018.
21. Stice JP, Lee JS, Pechenino AS, Knowlton AA. Estrogen, aging and the cardiovascular system. *Future Cardiol*. 2009;5(1):93-103. doi:10.2217/14796678.5.1.93
22. Imanishi T, Hano T, Nishio I. Estrogen reduces endothelial progenitor cell senescence through augmentation of telomerase activity. *J Hypertens*. 2005;23(9):1699-1706. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16093915>. Accessed November 26, 2018.
23. Li J, Peng X, Zeng X, et al. Estrogen Secreted by Mesenchymal Stem Cells Necessarily Determines Their Feasibility of Therapeutical Application. *Sci Rep*. 2015;5:15286. doi:10.1038/srep15286
24. Ijichi N, Shigekawa T, Ikeda K, et al. Estrogen-related receptor γ Modulates cell proliferation and estrogen signaling in breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2011;123(1-2):1-7. doi:10.1016/j.jsbmb.2010.09.002
25. Baruscotti I, Barchiesi F, Jackson EEK, et al. Estradiol Stimulates Capillary Formation by Human Endothelial Progenitor Cells Role of Estrogen Receptor- α/β , Heme Oxygenase 1, and Tyrosine Kinase. 2010;56(3):397-404. doi:10.1161/HYPERTENSIONAHA.110.153262.Estradiol
26. Cai JJ, Wen J, Jiang WH, Lin J, Hong Y, Zhu YS. Androgen actions on endothelium functions and cardiovascular diseases. *J Geriatr Cardiol*. 2016;13(2). doi:10.11909/j.issn.1671-5411.2016.02.003