



UNIVERSIDAD DE MURCIA
DEPARTAMENTO DE FISIOLÓGÍA

**Efectos cardiovasculares de los Estrógenos
en un modelo experimental de menopausia:
Papel del Óxido Nítrico endotelial
y Angiotensina II.**

Juan Luis Delgado Marín

2013

Este Proyecto de Investigación ha sido dotado con una Beca FIS (exp. 94/0764) con el título: “MODIFICACIONES CARDIOVASCULARES EN LA MENOPAUSIA. PAPEL DEL OXIDO NITRICO ENDOTELIAL Y SU RELACION CON LA TERA-PIA HORMONAL SUSTITUTIVA”, cuyo IP fue Juan José Parrilla Paricio.

Todas las gráficas y esquemas modificados de esta Tesis Doctoral han sido realizados por el propio autor de este trabajo, excepto los gráficos que se especifican como originales en el texto.



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. ISABEL HERNANDEZ GARCÍA, Profesora Titular de Universidad del Área de FISIOLÓGÍA HUMANA en el Departamento de FISIOLÓGÍA, autoriza:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada

“Efectos cardiovasculares de los Estrógenos en un modelo experimental de menopausia: Papel del Óxido Nítrico endotelial y Angiotensina II”

realizada por D. JUAN LUIS DELGADO MARÍN, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 5 de Diciembre de 2013



UNIVERSIDAD DE
MURCIA

D. JUAN JOSÉ PARRILLA PARICIO, Catedrático de Universidad del Área de OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA en el Departamento de CIRUGÍA, PEDIATRÍA, OBSTETRICIA Y GINECOLOGÍA, autoriza:

La presentación de la Tesis Doctoral titulada

“Efectos cardiovasculares de los Estrógenos en un modelo experimental de menopausia: Papel del Óxido Nítrico endotelial y Angiotensina II”

realizada por D. JUAN LUIS DELGADO MARÍN, bajo mi inmediata dirección y supervisión, y que presenta para la obtención del grado de Doctor por la Universidad de Murcia.

En Murcia, a 5 de Diciembre de 2013



ÍNDICE y ABREVIATURAS

ÍNDICE

01	ÍNDICE y ABREVIATURAS
03	Índice
07	Abreviaturas
13	INTRODUCCIÓN
15	Capítulo I: Consideraciones generales
15	A. Historia
16	B. Síntesis de los estrógenos
18	C. Fuentes endógenas de estrógenos
19	D. Transporte y metabolismo de los estrógenos
23	Capítulo II: Mecanismo de acción de los estrógenos
26	A. Señales estrogénicas vía receptor clásico intracelular
26	A.1. El receptor estrogénico clásico
26	A.2. Estructura del receptor estrogénico clásico
29	A.3. Distribución del receptor clásico
30	A.4. Mecanismo de acción hormonal a través del receptor clásico
32	A.5. Modulación de la acción hormonal
36	B. Señales estrogénicas vía receptores de membrana
36	B.1. Receptores estrogénicos plasmáticos asociados a membrana (mER)
40	B.2. El receptor intracelular trans-membrana unido a la proteína G (GPER)
41	B.3. Señalización rápida de estrógenos a través del citoesqueleto de actina
43	Capítulo III: Estrógenos y enfermedad cardiovascular
44	A. Efecto de los estrógenos sobre el endotelio vascular
44	A.1. Fisiología del endotelio vascular
44	A.1.a. Prostaciclina - Pgl ₂
45	A.1.b. Óxido Nítrico - NO
45	A.1.c. Factor hiperpolarizante derivado del endotelio - EDHF
45	A.1.d. Endotelina - ET
46	A.1.e. Tromboxano A ₂ - TXA ₂
49	A.2. Acción de los estrógenos sobre los mediadores de función endotelial
49	A.2.a Efecto de los E sobre la biodisponibilidad de NO y función endotelial
49	A.2.a.1. Estrógenos y función endotelial
50	A.2.a.2. Deprivación estrogénica y función endotelial
50	A.2.a.3. Mecanismos que posibilitan el aumento de biodisponibilidad de NO
55	A.2.b. Efecto de los estrógenos sobre otros factores endoteliales
55	A.2.b.1. Estrógenos y Prostaglandinas
56	A.2.b.2. Estrógenos y Monóxido de carbono (CO)
56	A.2.b.3. Estrógenos y Factor Hiperpolarizante Derivado del Endotelio
58	A.2.b.4. Estrógenos y Endotelina-I

60	B. Efecto de los estrógenos sobre las células musculares lisas vasculares (VSM)
62	B.1. Acción mediada por endotelio
62	B.2. Acción directa sobre la VSM
62	B.2.a. Efectos sobre los canales de iones
63	B.2.b. Acción sobre Protein Kinasa C (PKC)
64	B.2.c. Acción sobre Rho-Kinasas
64	B.3. Remodelado vascular
65	C. Interacción de los estrógenos sobre el Sistema Renina-Angiotensina (SRA)
65	C.1. Estrógenos y renina
65	C.2. Estrógenos y angiotensinógeno
66	C.3. Estrógenos y Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA)
66	C.4. Estrógenos y receptores de Angiotensina II
67	C.5. Estrógenos y IECA - Antagonistas del receptor AT 1/2
69	Capítulo IV: THS y riesgo de enfermedad cardiovascular
81	HIPÓTESIS y OBJETIVOS
85	MATERIAL y MÉTODOS
87	I. Material: Animales de experimentación
88	A. Valoración hormonal de los animales: métodos histopatológicos
90	B. Valoración hormonal de los animales: métodos bioquímicos
91	II. Metodología
91	A. Estudio de la respuesta vascular de anillos de aorta in vitro
91	A.1. Obtención de anillos vasculares
91	A.2. Preparación de la cámara de órganos con los anillos vasculares
93	A.3. Protocolo de estudio de respuesta vascular a diferentes sustancias
94	B. Estudio de función hemodinámica de la rata in vivo
94	A.1. Preparación quirúrgica previa del animal
95	A.2. Determinación de las variables hemodinámicas
97	C. Determinaciones bioquímicas
99	III. Protocolos experimentales
106	IV. Estudio estadístico
109	RESULTADOS
111	Objetivo 1: Evaluar si la deprivación crónica de Estrógenos tras ovariectomía induce cambios hemodinámicos en la rata hembra.
113	Objetivo 2: Determinar si estos cambios se acompañan de una disfunción del endotelio vascular.
113	2.1. Respuesta de relajación de anillos de aorta a la ACh y NP.
115	2.2. Respuesta de relajación de anillos de aorta a la SOD.
116	Objetivo 3: Estudiar los mecanismos fisiopatológicos de la disfunción endotelial presente en ratas hembras privadas crónicamente de Estrógenos.
116	3.1. Evaluar si la ovariectomía da lugar a una disminución en la producción de NO.
116	3.1.1. Estudio bioquímico de los niveles de Nitritos y Nitratos.
117	3.1.2. Hemodinámica en rata consciente ante inhibición de la síntesis de NO.

119	3.2. Valorar la participación del stress oxidativo en ratas ovariectomizadas.
119	3.2.1. Estudio bioquímico de marcadores de stress oxidativo.
120	3.2.2. Efecto de la NAC en la relajación de anillos de aorta inducida por ACh.
122	Objetivo 4: Comprobar si la THS con Estradiol puede prevenir estos cambios.
122	4.1. Prevención de cambios en la hemodinámica basal.
124	4.2. Prevención de la disminución de la producción de NO.
124	4.2.1. Estudio bioquímico de los niveles de Nitritos y Nitratos.
125	4.2.2. Hemodinámica en rata consciente ante inhibición de la síntesis de NO.
127	4.2.3. Estudio del stress oxidativo, como causa de la menor disponibilidad de NO.
129	Objetivo 5: Interacción entre NO y Angiotensina II en los efectos cardiovasculares de la administración aguda de Estradiol.
129	Protocolo 5.1. Estudio hemodinámico E ₂ vs vehículo.
131	Protocolo 5.2. Estudio hemodinámico E ₂ + NAME vs vehículo + NAME.
134	Protocolo 5.3. Estudio hemodinámico E ₂ + PE vs vehículo + PE.
136	Protocolo 5.4. Estudio hemodinámico E ₂ + NAME vs Losartan + E ₂ + NAME.
139	DISCUSIÓN
159	CONCLUSIONES
163	TABLAS
173	BIBLIOGRAFÍA

ABREVIATURAS

AA	Ácido Araquidónico
AC	Adenilato Ciclasa
ACh	Acetilcolina
ACV	Accidente Cerebro-Vascular
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Akt	Proteína Kinasa B
AMP	Acetato de Medroxi-Progesterona
AMPc	Adenosín monofosfato cíclico
ARE	Elemento de Respuesta Antioxidante
ARN	Ácido ribonucleico
AT-I	Angiotensina I
AT-II	Angiotensina II
AT ₁	Receptor 1 de Angiotensina
AT ₂	Receptor 2 de Angiotensina
BK	Bradikina
BPR	Blood Production Rate - Tasa de producción sanguínea
c-Src	Coactivador de receptor nuclear tipo C
Ca ⁺²	Calcio iónico
CaD	Calmodulina
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la Calcitonina
CHD	Enfermedad Coronaria
CIK	Cloruro Potásico
CNP	Péptido Natriurético del grupo C
COMT	Catecol O-metil-transferasa
COX	Ciclooxigenasa
CV	Conductancia Vascular
DBD	Dominio de unión a ADN
DERKO	Double Estrogen Receptor Knock Out ER α /ER β
DHA	Dehidroepiandrosterona
E	Estrógeno/s
E ₁	Estrona
E ₁	Estriol
E ₂	Estradiol - 17 β -Estradiol - β -Estradiol
ECA	Enzima Convertidora de Angiotensina
ECE	Estrógenos Conjugados Equinos
ECV	Enfermedad Cardio-Vascular

Abreviaturas

EDHF	Factor Hiperpolarizante Derivado del Endotelio
EDRF	Factor Relajante Dependiente del Endotelio
EGF	Epidermal Growth Factor - Factor de crecimiento epidérmico
eNOS	Endothelial Nitric Oxide Syntase - Óxido Nítrico Sintasa Endotelial
ER	Receptor de estrógenos
ERE	Elemento de Respuesta a los Estrógenos
ERH	Elemento de Respuesta a las Hormonas
ERK	Protein-Kinasa Activada por Mitógeno
ET-I	Endotelina-I
ETB	Receptor de Endotelina-I
FC	Frecuencia Cardíaca
FMD	Dilatación mediada por flujo
FSH	Follicle Stimulant Hormone - Hormona Folículo Estimulante
GC	Guanilato Ciclasa
GC	Gasto Cardíaco
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
GPGR	G Protein Estrogen Recepto - Receptor transmembrana unido a la proteína G
HAT	Histona Acetil Transferasa
Hb	Hemoglobina
HDAC	Histona deacetilasa
HERS	Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study
HNE	4-Hidroxialkenol
HSP	Proteína de respuesta al estrés
HTA	Hipertensión arterial
Hto	Hematocrito
IC	Intervalo de Confianza
IC	Índice Cardíaco
ICV	Índice de Conductancia Vascular
IECA	Inhibidor de la Enzima Convertidora de Angiotensina
IGF	Insulin Growth Factor - Factor de crecimiento insulínico
IMC	Índice de Masa Corporal
iNOS	Inducible Nitric Oxide Syntase - Óxido Nítrico Sintasa Inducible
K⁺	Ion Potasio
L-NAME	L-N ^G nitroarginina metil éster
L-NMMA	L-N ^G monometil arginina
LBD	Dominio de unión a ligando
Los	Losartan
MAPK	Protein-Kinasa Activada por Mitógeno
MCR	Metabolic Clearance Rate - Tasa de eliminación metabólica
MDA	Malondialdehído
mER	Receptor de estrógenos de membrana

MLC	Cadena Ligera de Miosina
MMP	Metaloproteasas de la Matriz Celular
MNAR	Co-represor transcripcional del receptor nuclear
NAC	N-Acetil Cisteína
NADPH	Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
NHS	Nurses' Health Study
nNOS	Neural Nitric Oxide Syntase - Óxido Nítrico Sintasa Neuronal
NO	Nitric Oxide - Óxido Nítrico
NOS	Nitric Oxide Syntase - Óxido Nítrico Sintasa
NO_x	Metabolitos del NO (Nitritos y Nitratos)
NP / NPS	Nitroprusiato Sódico
NTG	Nitroglicerina
PA	Presión Arterial
PAM	Presión Arterial Media
PE	Fenilefrina
PgF2α	Prostagladina F2 α
Pgl₂	Prostaciclina
PI₃K	Fosfatidilinositol 3-kinasa
PKA	Protein Kinasa A (dependiente de AMPc)
PKC	Protein Kinasa C
PKG	Protein Kinasa G (dependiente de GMPc)
PLC	Fosfolipasa C
PRA	Actividad de Renina Plasmática
Rho-K	Rho-Kinasa
ROS	Especies reactivas de oxígenos - radicales libres de oxígeno
RPT	Resistencias Periféricas Totales
RR	Riesgo Relativo
SAT	Status Antioxidante Total
SD	Ratas Sprague-Dawley
SERM	Modulador Selectivo del Receptor de Estrógenos
SH-	Grupo tiol o sulfhidrilo
SHBG	Sex Hormone-Binding Globulin - Globulina de unión a las hormonas sexuales
SHR	Ratas Espontáneamente Hipertensas
SOD	Superóxido Dismutasa
SRA	Sistema Renina-Angiotensina
StAR	Proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda
STRN	Estriatina
Sub P	Sustancia P
TAF	Función de Activación de la Transcripción
TAS	Status Antioxidante Total
TF	Factor de transcripción

Abreviaturas

TGF-α	Transforming Growth Factor α - Factor transformador del crecimiento α
THS	Terapia Hormonal Sustitutiva
TXA₂	Tromboxano A ₂
VCGR	Volumen Constante de Glóbulos Rojos
VSM	Musculatura lisa vascular
WHI	Women's Health Initiative





I

CONSIDERACIONES GENERALES

A. Historia

Desde finales del siglo XIX se conoce el efecto beneficioso de la administración oral de extracto ovárico en el tratamiento de alteraciones de la menstruación y de la menopausia artificial; (Goldzieher and Rudel 1974) pero no es hasta el año 1929 cuando se consigue aislar el primer estrógeno. (Butenandt and Ziegner 1930)

En ese año, Butenandt y Doisy comunicaron por separado el aislamiento de la Estrona a partir de orina de mujeres embarazadas. Unos años después, en 1936, Doisy consiguió aislar el Estradiol a partir de folículos de cerda. (McCorquodale, 1936) Ya en el año 1943 se comercializaron por primera vez los Estrógenos Conjugados Equinos (Goldzieher, J. W. 1974) y, desde entonces, se ha desarrollado y comercializado multitud de fármacos a base de estrógenos, tanto naturales como sintéticos.

Paralelamente al conocimiento de la química de los estrógenos se descubrieron los receptores estrogénicos, gracias a los avances tecnológicos que permitieron el marcaje radiactivo de esteroides. (Couse, 1999) Así, Jensen pudo determinar la existencia de un componente proteico intracelular que se unía específicamente al Estradiol marcado con tritio, al que denominó receptor de estrógenos (ER). (Cano and Hermenegildo 2000)

Tras estos pasos iniciales, el conocimiento de la acción de los estrógenos ha avanzado enormemente, al igual que el de otras hormonas esteroideas. Desde el descubrimiento de la interacción con los receptores nucleares se ha pasado a la descripción de cambios en la transcripción de diversos genes y de varios subtipos de receptores.

Asimismo, el descubrimiento de acciones rápidas, no genómicas, de las hormonas esteroideas ha llevado consigo el estudio y descripción de complejas vías de señalización intracelular involucradas en las mismas.

De igual manera, la investigación de las acciones de las hormonas femeninas sobre tejidos reproductores se ha ampliado a la de sus efectos sobre diversos tejidos no reproductores, entre ellos el sistema cardiovascular, tema del que será objeto de esta tesis doctoral.

A continuación se describirán brevemente unos conceptos generales sobre los estrógenos naturales y sus mecanismos de acción para centrarse posteriormente en las acciones vasculares de los estrógenos.

B. Síntesis de los estrógenos

Los estrógenos naturales β -Estradiol (E_2), Estrona (E_1) y Estriol (E_3) son esteroides con 18 átomos de carbono derivados del colesterol.

Tras la unión a receptores de lipoproteínas, el colesterol es captado por las células de la esteroidogénesis, para ser posteriormente almacenado y transportado para su intervención en la síntesis de esteroides. Este movimiento intracelular es facilitado por el citoesqueleto y proteínas de transporte intracelular.

Se han identificado varias proteínas postuladas como reguladoras de la transferencia intracelular aguda de colesterol, pero la más estudiada y la que se describe como la principal es la proteína reguladora de la esteroidogénesis aguda (Steroidogenic Acute Regulator, StAR). (Lin, Sugawara et al. 1995)

Durante el proceso de la esteroidogénesis, debido a la reducción del número de átomos de carbono de 27 a 18 se van a sintetizar distintos esteroides, los Progestágenos y Corticoides con 21 átomos de carbono, los Andrógenos con 19 y los Estrógenos con 18. (Fig. 1)

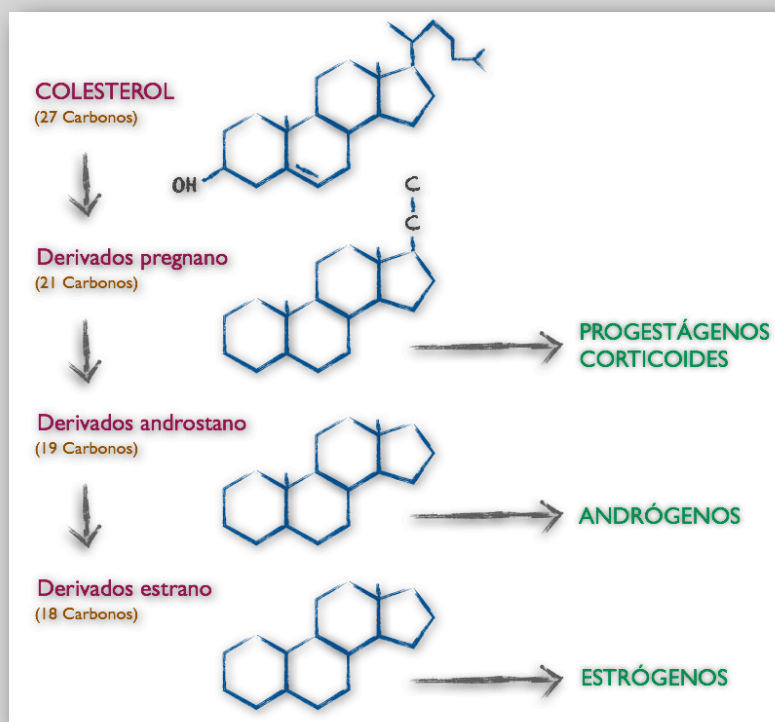


Fig 1.

Producción de las distintas hormonas esteroideas a partir de la molécula de colesterol

Todas las hormonas esteroideas tienen una estructura básica, con mínimas diferencias que dan lugar a acciones bioquímicas diferentes.

Los esteroides sexuales se dividen en 3 grandes grupos en función del número de átomos de carbono que poseen. Así, los corticoides y gestágenos presentan 21 átomos de carbono (21C), siendo la estructura básica el pregnano. Las series con 19C incluyen a los andrógenos, basados en un núcleo androstano, y los estrógenos, basados en un núcleo estrano, presentan 18C.

Modificado de Fritz, M.A. (2011)

Es importante señalar que una vez que se forma **pregnenolona**, la síntesis ulterior de esteroides en el ovario puede seguir 2 caminos, la vía de los Δ^5 -3 β -hidroxiesteroides o la vía de la Δ^4 -3-cetona. La primera (Δ^5) es a través de la **pregnenolona** y la **dehidroepiandrosterona (DHA)** y la segunda (Δ^4) a través de **progesterona** y **17 α -hidroxiprogesterona**.

Estas vías de la esteroidogénesis se producen gracias a las enzimas del citocromo p450, que catalizan las cadenas laterales de las distintas moléculas.

La aromatización es el último paso en el proceso de formación de estrógenos. Esta reacción es catalizada básicamente por el complejo enzimático **P450 aromatasa**, presente en el retículo endoplasmático liso.

Así, a partir de 3 reacciones consecutivas de hidroxilación, la **Estrona** y el **Estradiol** se forman a partir de sus precursores **Androstendiona** y **Testosterona**, respectivamente. (**Fig. 2**)

El paso final de hidroxilación en la aromatización no requiere acción enzimática.

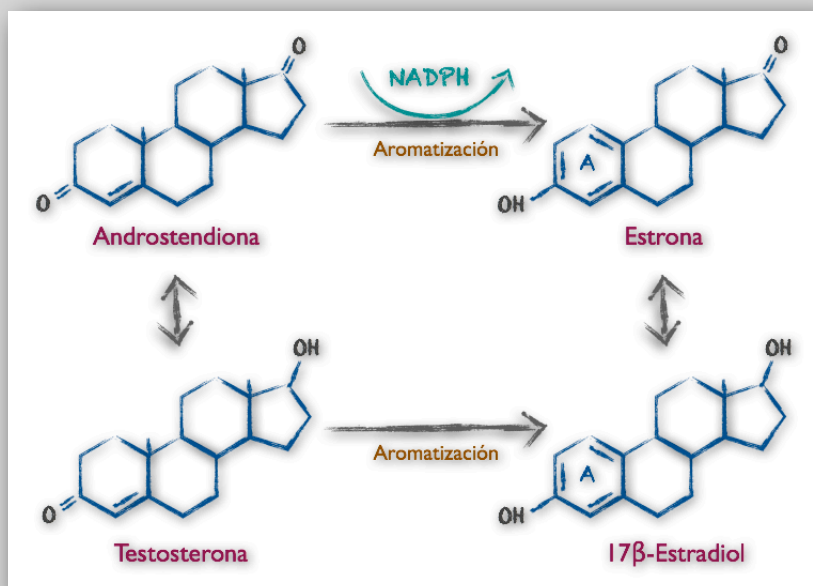
Se han desarrollado inhibidores sumamente específicos de **P450arom** que permiten el bloqueo intenso de la producción de estrógenos, con aplicaciones clínicas que incluyen el tratamiento del cáncer de mama (e.g., **anastrozol**) y la hemorragia intrauterina disfuncional. El complejo **aromatasa** también incluye **NADPH-citocromo P450 reductasa**, una flavoproteína ubicua para la transferencia de equivalentes reductores.

Las reacciones de la **17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa** y la **5 α -reductasa** se producen por acción de enzimas no-P450. La **17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa** se une al retículo endoplasmático y la **5 α -reductasa** a la membrana nuclear. La **17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa** convierte **Estrona** en **Estradiol**, **Androstendiona** en **Testosterona**, **DHA** en **Androstendiol**, y viceversa.

Fig 2.
Estructura y producción de estrógenos endógenos.

La **Androstendiona** y **Testosterona** son precursores obligados de los estrógenos. El complejo enzimático de la **P450 aromatasa** cataliza su conversión a estrógenos. En este proceso en 3 pasos, se utilizan 3 moléculas de oxígeno y 3 equivalentes reducidos de **NADPH**.

Modificado de Fritz, M.A. (2011)



C. Fuentes endógenas de estrógenos

Las principales fuentes de E₂ en la mujer son las células de la teca y de la granulosa del ovario, y los derivados luteinizados de dichas células. De acuerdo con la teoría de las “dos células” para explicar la síntesis de estrógenos, las células de la teca secretan andrógenos, que difunden hacia las células de la granulosa, para ser aromatizados a estrógenos (Hillier, Whitelaw et al. 1994). Hay evidencia, sin embargo, que ambos tipos de células pueden formar tanto andrógenos como estrógenos (Lieberman 1996). La E₁ y el E₃ se sintetizan primariamente en el hígado, a partir del E₂.

La actividad de aromatización se ha podido detectar, asimismo, en el músculo, grasa, tejido nervioso y células de Leydig testiculares.

Durante la gestación, el E₃ se sintetiza en el sincitiotrofoblasto mediante la aromatización de la 16 α -hidroxiandrosterona. Este último deriva del sulfato de 16 α -dehidroepiandrosterona, producido por el hígado fetal y desulfatado en la placenta. 16 α -dehidroepiandrosterona, a su vez, se deriva del sulfato de dehidroepiandrosterona producido en las glándulas suprarrenales fetales.

La combinación de la glándula suprarrenal y el hígado fetal con la placenta se ha llamado la “unidad feto-placentaria de biosíntesis de esteroides”. (Gruber, Tschugguel et al. 2002)

Los distintos niveles séricos de estas hormonas establecen, asimismo, distintas fases en la vida de la mujer.

- * La **pubertad** en las niñas se inicia tras la producción de gonadotropinas mediante pulsos nocturnos de baja amplitud, que incrementan la concentración sérica de E₂ desde 15 a 35 pg/mL.
- * En la **vida fértil** de la mujer, establecidos los ciclos menstruales, la producción de estradiol varía cíclicamente, alcanzando los niveles séricos mayores en fase periovulatoria. La producción y las concentraciones de E₂ disminuyen al máximo previamente a la menstruación.
- * Durante la **perimenopausia**, la depleción de folículos ováricos lleva a un firme descenso en la producción ovárica de estradiol, aunque las concentraciones de E₂ en suero varían considerablemente.
- * En la mujer **postmenopáusica**, los niveles de E₂ sérico a menudo son menores de 20 pg/mL, procediendo en la mayoría de los casos de la conversión periférica de testosterona. La E₁ es el estrógeno predominante en estas mujeres. La síntesis de estrógenos en tejidos no gonadales se incrementa en función de la edad y el índice de masa corporal.

Se conoce poco acerca de los factores que regulan la producción de estrógenos en la mujer postmenopáusica, pero algo más en la edad fértil, ya que interviene la producción de gonadotropinas.

Hay genes sensibles a FSH que gobiernan la expresión de enzimas esteroidogénicas. (Richards 1994) Este control trófico se modifica gracias a factores paracrinos.

El IGF (Adashi, Resnick et al. 1991), por ejemplo, facilita la acción de la FSH en el desarrollo folicular, y los factores de crecimiento derivados de la teca o los andrógenos influyen, de forma recíproca, en la acción de la FSH sobre las células de la granulosa.

El ARN mensajero del receptor androgénico de las células de la granulosa tiene una “down regulation” por la FSH. Esta relación inversa es parte del mecanismo que determina qué folículo será el dominante en la secreción de estrógeno en cualquier ciclo menstrual. (Kol and Adashi 1995)

En tejidos periféricos, la producción de diferentes estrógenos y su interconversión dependerá de la expresión y de la actividad local de la aromatasa, 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa y sulfatasas de estrona. Polimorfismos en los genes que codifican enzimas esteroidogénicas influyen en la producción de estrógenos.

La evaluación de dichos polimorfismos respecto al riesgo de padecer cáncer o la necesidad de terapia estrogénica posibilitarán en el futuro un manejo terapéutico individualizado en la mujer postmenopáusica. (Gruber, Tschugguel et al. 2002)

D. Transporte y metabolismo de los estrógenos

Este apartado desarrolla el esquema expuesto en la Fig 3, en el que nos ceñiremos al transporte y metabolismo del E₂, hormona en estudio en esta Tesis Doctoral.

Los principales esteroides sexuales, Estradiol y Testosterona, en su mayor parte circulan por la sangre unidos a una proteína transportadora producida en el hígado, la SHBG (Sex Hormone-Binding Globulin). Otro 30% de ellos se une laxamente a la albúmina, lo que deja aproximadamente un 1% de esteroides sin unión, que circulan libres. Un pequeñísimo porcentaje también se une a la globulina ligadora de corticoesteroides.

El hipertiroidismo, el embarazo y la administración de estrógenos aumentan los niveles de SHBG, mientras que los corticoides, los andrógenos, los progestágenos, la hormona de crecimiento, la insulina y el IGF-I los reducen. (Fritz and Spe-roff 2011)

Existe una relación inversa entre niveles circulantes de SHBG y peso corporal, por lo que un aumento significativo de peso puede disminuir los niveles SHBG y provocar cambios importantes en los niveles de esteroides sexuales libres.

Otro mecanismo importante que disminuye la SHBG circulante es la resistencia a la insulina y la hiperinsulinemia (sin relación con la edad ni con el peso corporal). (Preziosi, Barrett-Connor et al. 1993) En consecuencia, el aumento de los

I. Consideraciones generales

niveles circulantes de insulina disminuye los de SHBG y tal vez este sea el principal mecanismo que media el impacto del aumento de peso sobre la SHBG. La distribución de la grasa corporal influye significativamente sobre los niveles de SHBG. La grasa central o androide está

localizada en la pared abdominal y en el mesenterio visceral. Esta distribución se asocia con hiperinsulinemia, hiperandrogenismo y bajos niveles de SHBG. (Peiris, Sothmann et al. 1989) Probablemente, el mecanismo común para estos cambios sea la hiperinsulinemia.

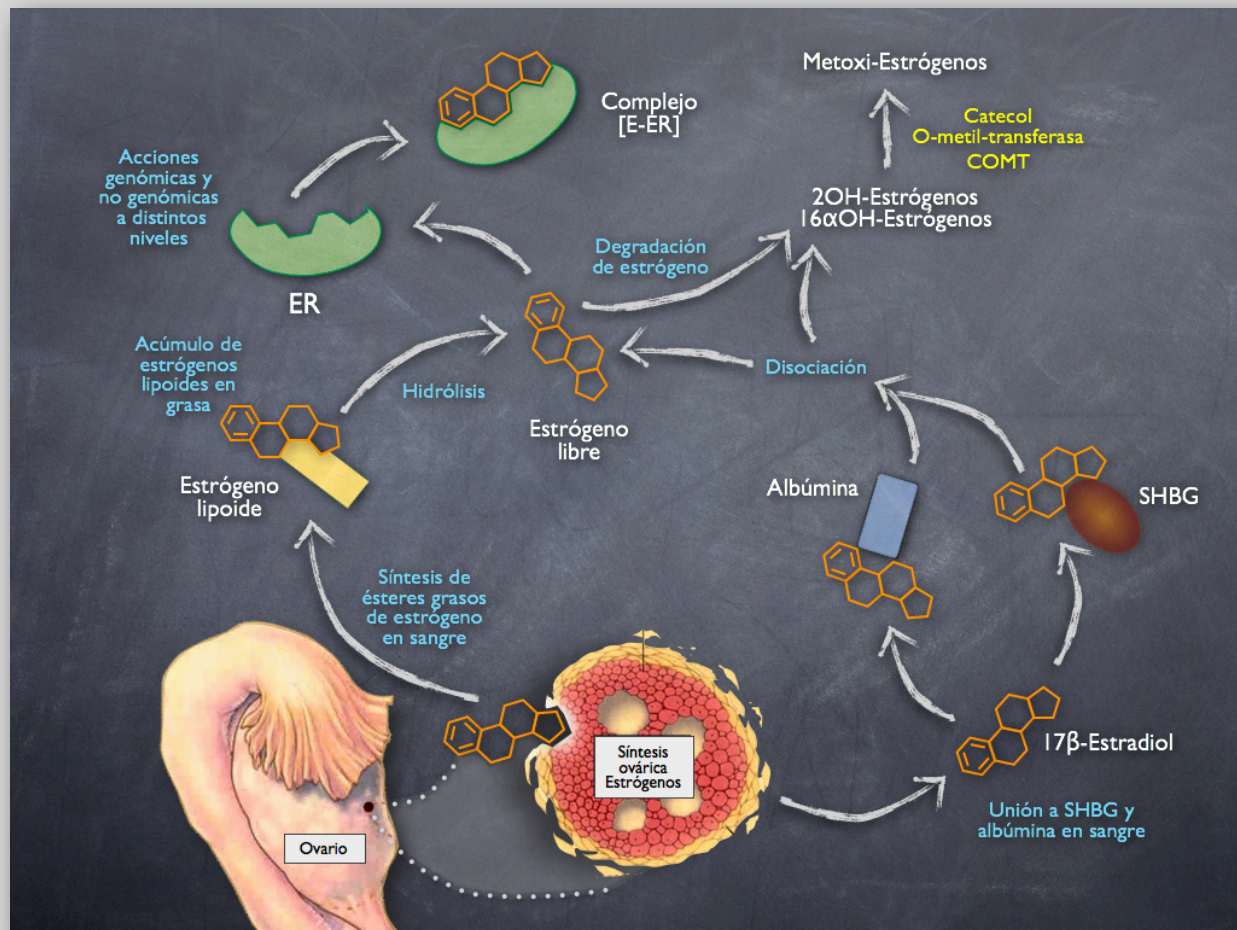


Fig 3. Síntesis ovárica, transporte y metabolismo de los Estrógenos.

Tras la síntesis de estrógenos, principalmente en ovario, el E2 se secreta al torrente circulatorio, donde se une a la SHBG y la Albúmina. El Estradiol libre difunde dentro de los tejidos diana, donde realiza sus efectos genómicos y no genómicos. Los estrógenos lipoides se sintetizan en la sangre y probablemente en otros tejidos, acumulándose predominantemente en la grasa. El catabolismo de los estrógenos da lugar a los hidroxi-estrógenos y metoxi-estrógenos.

Modificado de Gruber, GJ. (2002)

La porción libre de los esteroides sexuales, llamada **hormona libre**, determina en gran medida sus efectos biológicos. En otras palabras, la hormona activa está libre, mientras que la hormona ligada

permanece relativamente inactiva. Este concepto suscita controversia.

El complejo hormona-proteína puede intervenir en un proceso activo de captación en la membrana plasmática de una

célula dada. La fracción de los esteroides unida a la albúmina también puede estar disponible para la acción celular, porque esta unión tiene escasa afinidad. Como la concentración de albúmina en el plasma es varias veces mayor que la de SHBG, la contribución de la fracción unida a albúmina es significativa. (Fritz and Speroff 2011)

Los andrógenos son los precursores comunes de los estrógenos. La 17β -hidroxiesteroide deshidrogenasa convierte Androstendiona en Testosterona, que no constituye un producto importante de la secreción del ovario normal. Rápidamente, la Testosterona es desmetilada en el C-19 y aromatizada para formar Estradiol, el principal estrógeno que secreta el ovario humano. También, gran parte del Estradiol proviene de la Androstendiona vía Estrona, y la Estrona misma es secretada diariamente en cantidades significativas. El Estriol es el metabolito periférico de la Estrona y el Estradiol, y no un producto de la secreción del ovario. La formación de Estriol es característica de la "detoxificación" metabólica general, la conversión de material biológicamente activo en formas menos activas.

La conversión de esteroides en los tejidos periféricos no siempre es una forma de inactivación. Los andrógenos libres se convierten periféricamente en estrógenos libres, por ejemplo, en la piel y las células adiposas. La ubicación de las células adiposas influye sobre su actividad. Las mujeres con obesidad central (región abdominal) producen más andrógenos. (Peiris, Sothmann et al. 1989) El trabajo del grupo de Siiteri (Grodin, Siiteri et al. 1973) de-

mostró que se pueden producir suficientes estrógenos a partir de los andrógenos circulantes para provocar hemorragia en las mujeres posmenopáusicas. En las mujeres, las glándulas suprarrenales siguen siendo la mayor fuente de andrógenos circulantes, en especial de Androstendiona. En los hombres, casi todo el estrógeno circulante es generado por conversión periférica de andrógenos.

En las mujeres el patrón de los esteroides circulantes se ve afectado por varios procesos que ocurren fuera del ovario. A causa de la contribución periférica a los niveles de esteroides, el término tasa de secreción se reserva para la secreción directa del órgano, mientras que el término tasa de producción se refiere a la secreción por parte del órgano más la contribución periférica por conversión de precursores.

La tasa de eliminación metabólica (metabolic clearance rate, MCR) es igual al volumen de hormona eliminado de la sangre por unidad de tiempo. La tasa de producción sanguínea (blood production rate, BPR), entonces, es igual a la tasa de eliminación metabólica multiplicada por la concentración de la hormona en la sangre.

En la mujer joven no embarazada, la tasa de producción de Estradiol es de 100-300 $\mu\text{g}/\text{día}$; la de Androstendiona, de alrededor de 3 $\text{mg}/\text{día}$, y la conversión periférica (aproximadamente el 1%) de Androstendiona en Estrona representa aproximadamente el 20-30% de la Estrona producida diariamente.

Como la Androstendiona es secretada en miligramos, aun un pequeño porcentaje de conversión en estrógenos representa una contribución significativa, porque los estrógenos existen y actúan en microgramos.

Por lo tanto, en las mujeres los estrógenos circulantes constituyen la suma de la secreción ovárica directa de Estradiol y Estrona, más la conversión periférica de precursores C-19.

Los estrógenos se metabolizan por sulfatación o glucuronidación, y los conjugados son excretados por medio de la bilis o la orina. La hidrólisis de dichos conjugados por medio de la flora intestinal, y la subsiguiente reabsorción del estrógeno se da en el contexto de la circulación enterohepática.

Los estrógenos son también metabolizados por hidroxilación y posterior metilación a las formas catecol y metoxi estradiol.

La hidroxilación de los estrógenos produce 2-OH-estrógenos, 4-OH-estrógenos y 16-alfa-hidroxiestrógenos (catecolestrógenos), entre los cuales 4-OH-estrona y 16 α OH-estradiol se consideran carcinógenos.

La metilación de los 2 y 4-OH estrógenos por la Catecol O-metil-transferasa (COMT) produce metabolitos metoxilados de estradiol (Gruber and Huber 2001). Los catecolestrógenos se unen a los receptores estrogénicos y tienen una acción estrogénica débil en animales, pu-

diendo inhibir la COMT en las hendiduras sinápticas de las neuronas.

Por otra parte, los catecolestrógenos pueden producir continuos ciclos metabólicos redox, produciendo intermediarios de la quinona como metabolitos. Debido a la producción de radicales libres en este proceso y la unión covalente de estos intermediarios con ADN, se ha propuesto que los estrógenos pudieran tener actividad genotóxica. (Liehr 2000)

Los estrógenos lipoides son ésteres grasos de estrógenos que comprenden una clase distinta de hormonas esteroideas. Aunque se producen en varios tejidos *in vitro*, se encuentran predominantemente en tejido adiposo. Se sintetizan en la sangre, donde circulan y se unen a lipoproteínas. En total, menos del 10% del Estradiol sérico se asocia con lipoproteínas, principalmente, las lipoproteínas de alta densidad (Hochberg 1998), pero el Estradiol sérico puede ser transferido a lipoproteínas de baja densidad por un mecanismo transportador aún desconocido.

Los esteroides lipoides son más resistentes al catabolismo que los estrógenos libres, y son de igual manera aclarados más lentamente. Después de la captación mediada por receptor de lipoproteínas por parte de las células y su hidrólisis local, pueden servir como una potencial reserva de esteroides. Pueden también disminuir la concentración del Estradiol necesario para inhibir la oxidación en las lipoproteínas de baja densidad *in vitro*. (Shwaery, Vita et al. 1997)

II

MECANISMOS DE ACCIÓN DE LOS ESTRÓGENOS

El conocimiento acerca del efecto de los estrógenos sobre la vasculatura ha evolucionado enormemente en las 2 últimas décadas, sobre todo, con el desarrollo de la investigación acerca de las vías de señalización estrogénica sobre las distintas células y tejidos del organismo.

Tradicionalmente, se ha considerado que la respuesta celular a los estrógenos y sus derivados estaba mediada por los dos receptores clásicos nucleares α (ER α) y β (ER β), con su conocida intervención en la acción "genómica" de los estrógenos. Esta acción "genómica", también llamada "clásica", implica dos posibles mecanismos:

- * La unión de la hormona a cualquiera de las dos variantes de receptor estrogénico hace que éstos actúen como factores de transcripción activados por ligando. Dichos receptores están localizados inicialmente en el citosol, y una vez formado este complejo ligando-receptor (ER+E) se translocan al interior del núcleo, donde forman complejos homo/heterodímeros, e interactúan con los elementos de respuesta a los estrógenos (ERE), en la región promotora de los genes diana. (Nilsson et al 2001).
- * Los complejos nucleares ER+E también modulan la función de otros tipos de factores de transcripción a través de interacciones proteína-proteína, regulando la expresión del gen

incluso sin la unión directa al ADN (O'Lone et al 2004).

En ambos escenarios, el reclutamiento específico en cada célula de coactivadores o el desplazamiento de correpresores a los sitios de unión del ADN aumenta o reprime la activación de genes y por lo tanto modula la función celular. (Levin, 2005)

Pero se han evidenciado una importante variedad de respuestas celulares ante concentraciones fisiológicas de estrógenos, que pueden producirse rápidamente en cuestión de segundos a minutos, hecho que nos hace pensar que pueden no estar mediadas por fenómenos de transcripción y síntesis proteica. (Pietras y Szego, 1977; Haynes et al, 2002; Simoncini et al, 2004; Levin, 2005; Meyer et al, 2006).

En los últimos años se ha sugerido que estos efectos rápidos mediados por estrógenos se realizan mediante activación de vías enzimáticas y de canales de iones a través de la activación de un receptor estrogénico de membrana (mER). A estos efectos se les conoce como "no genómicos" (Aronica, 1994; Haynes, 2002; Simoncini, 2004; Levin, 2005; Meyer, 2006; Moriarty, 2006; Boonyaratanakornkit y Edwards, 2007; Cheskis, 2007).

Con el conocimiento actual, cabe señalar que la distinción entre los efectos transcripcionales o genómicos y no genómicos

es totalmente arbitraria, ya que algunas de las vías de señalización intracelular convergen y activan los factores de transcripción nuclear (Bjornstrom y Sjoberg, 2005). Como consecuencia, la combinación de estas acciones con elementos de respuesta múltiple, permiten la regulación precisa de la transcripción génica dependiente de los estrógenos (Fig II.A.4). (Bjornstrom y Sjoberg, 2005)

Además, el ER nuclear también representa una diana para la fosforilación de la proteinkinasa activada por mitógeno (MAPK) (Kato, 1995), y su función puede verse afectada por la acción cruzada de ER α y ER β (Matthews y Gustafsson, 2003; Traupe, 2007).

De esta manera, ya que la respuesta celular a los estrógenos viene dada por una interacción compleja de eventos transcripcionales y no transcripcionales, nos permitimos organizar la exposición diferenciando entre respuestas o señales estrogénicas vía receptores intracelulares y receptores de membrana, resumiento este complejo esquema en la **Fig 4.** (Meyer, Prossnitz et al.)

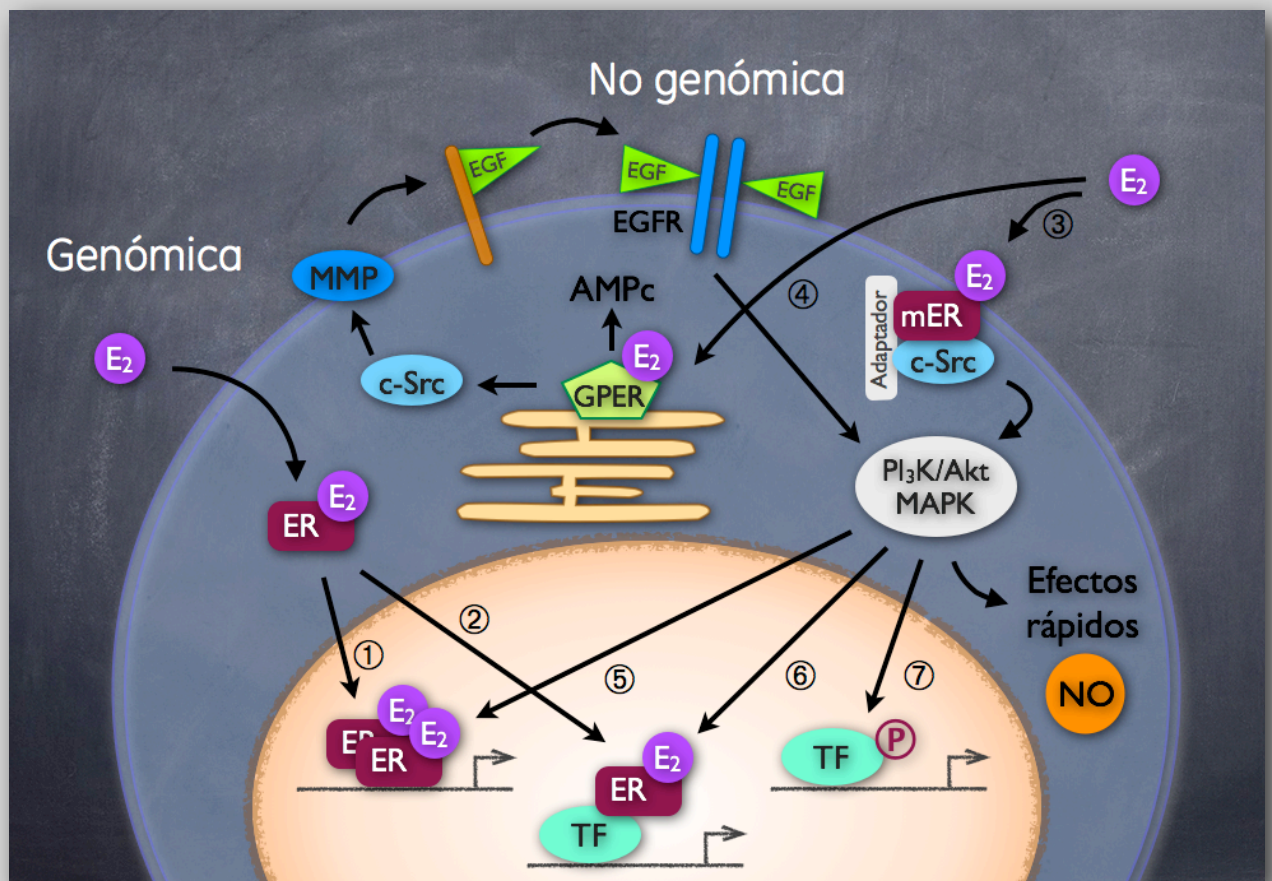


Fig 4. Esquema-resumen de las vías de señalización no genómicas y genómicas a través del receptor estrogénico (ER) en las células vasculares.

Clásicamente, se ha descrito que el E_2 activa el ER nuclear, induciendo la translocación del ER al núcleo, la dimerización del ER y la unión a dímeros del ER en la región promotora de los genes diana ①. Por otra parte, el ER activado, modula la función de otros tipos de factores de transcripción (TF) a través de interacciones proteína-proteína ②. [Apartado I] Posteriormente, se ha descrito que los estrógenos pueden activar una subpoblación de ER en la membrana plasmática (mER), que interactúan con proteínas adaptadoras y moléculas de señalización como c-Src ③, crítica para la vía de señalización rápida a través de las vías PI3K/ Akt y MAPK. [Apartado II.A] El E_2 también puede unirse al receptor estrogénico GPER, unido la proteína G, localizado principalmente en el retículo endoplásmico ④. GPER activa una corriente de efectores, tales como Adenilato Ciclasa (incrementando AMPc) y c-Src. [Apartado II.B] Por otra parte, c-Src puede activar metaloproteasas de la matriz celular (MMP), que rompe la unión del Epidermal Growth Factor (EGF) con pro heparina, liberando el EGF que puede entonces transactivar los receptores de EGF (EGFR). Esta activación da lugar a muchos eventos de señalización celular, incluyendo la activación de MAPK y PI3K. Una vez activadas, las cascadas de señalización MAPK y PI3K/ Akt pueden, a su vez, realizar efectos rápidos, tales como la liberación en la célula endotelial de NO inducida por E_2 , o en última instancia, regular la transcripción génica. La actividad transcripcional del ER puede ser potenciada también por vías de fosforilación ⑤, pero esta fosforilación puede activar otros factores de transcripción interactuando directamente con el ER ⑥ o sin necesidad de la interacción del ER ⑦ en la región promotora del gen diana.

Modificado de Meyer, MR. (2011)

A. Señales estrogénicas vía receptor clásico intracelular.

A.1. El receptor estrogénico clásico.

Hasta 1996 se creía en la existencia de un solo subtipo de receptor estrogénico (ER) que mediaba todas las acciones fisiológicas de estas hormonas. En esta fecha, se clonó un segundo ER a partir de ADN procedente de próstata de rata. Desde entonces, al primer subtipo conocido se le denomina ER α y al segundo ER β .(Cano, Dueñas et al. 2006)

Los receptores de estrógenos, ER α y ER β , son factores de transcripción activados por ligando pertenecientes a la familia de receptores nucleares de hormonas esteroideas. Los ER son parte de una superfamilia de receptores hormonales nucleares, con prácticamente 150 miembros reconocidos.

Estos receptores son capaces de reconocer y unirse a moléculas (como los esteroides en el caso de los ER) y a secuencias específicas de ADN (elementos de respuesta hormonal) presentes sólo en los genes objeto de su regulación. Además, también son capaces de interactuar con otras proteínas reguladoras de la transcripción génica.(Cano, Dueñas et al. 2006)

A muchos de ellos se les llama **receptores huérfanos**, porque no se han identificado los ligandos específicos para estas proteínas.

A.2. Estructura del receptor estrogénico clásico.

Clásicamente se han identificado dos receptores de estrógenos, designados como receptor de estrógenos α (ER α) y receptor de estrógenos β (ER β).

- ▶ El ER α fue descubierto alrededor de 1960 y la secuencia de aminoácidos, informada en 1986.(Greene, Gilna et al. 1986) El ER α es traducido de un ARNm de 6,8 kb que contiene ocho exones provenientes de un gen en el brazo largo del cromosoma 6. (Parker, Arbuckle et al. 1993) Su peso molecular es de aproximadamente 45-66 KDa, con 595 aminoácidos. La vida media de este receptor es de aproximadamente 4-7 horas; por lo tanto, es una proteína de recambio rápido.
- ▶ El ER β , descubierto más recientemente, (Kuiper, Enmark et al. 1996) (Mosselman, Polman et al. 1996) es codificado por un gen localizado en el cromosoma 14,q22-q24, muy próximo a los genes relacionados con la enfermedad de Alzheimer. (Enmark, Pelto-Huikko et al. 1997) Su peso molecular es de 53-59 KDa.

La molécula de receptor estrogénico es una cadena polipeptídica que presenta una estructura terciaria adecuada para realizar sus funciones, denominándose dominios moleculares a cada una de las

secuencias peptídicas de la molécula que puede realizar una de las funciones concretas del receptor. Están divididos en 6 regiones y 5 dominios, indicados por una letra, de la A a la F. (Fig 5)

El ER β es homólogo en un 97% del ER α respecto de las secuencias de aminoácidos en el dominio de unión al ADN y en un 59% en el dominio de la unión a la hormona. (Mosselman, Polman et al. 1996)

En la siguiente tabla se comparan todos los elementos de ambos receptores: (Enmark, Peltö-Huikko et al. 1997)

	Regiones del receptor	Homologías RE α y
A/B	Dominio regulatorio	17,5%
C	Dominio de unión al ADN	97,0%
D	Bisagra	30,0%
E	Dominio de unión a la hormona	59,1%
F	Región F	17,9%

La información que disponemos se ha obtenido del estudio del ER α , el más antiguo, pues las características relacionadas con la unión a la hormona son similares en ambos receptores, α y β , lo que indica que responden de manera similar a las mismas hormonas. (Kuiper, Carlsson et al. 1997)

Región A/B (Dominio regulador N-terminal).

Se trata del dominio regulatorio, en el que el extremo amino-terminal es el elemento más variable en la superfamilia de receptores, y su tamaño oscila entre 20 aminoácidos en el receptor de la vitamina D y 600 aminoácidos en el receptor de los mineralcorticoides.

En el caso del ER α , contiene varios sitios de fosforilación y la función de activación de la transcripción 1, llamada TAF-1. La TAF-1 puede estimular la transcripción cuando no existe unión a la hormona. Se considera que el dominio regulatorio es considerablemente distinto en los dos receptores, y en el ER β , TAF-1 está significativamente modificado o no está presente.

Región C (Dominio de unión a ADN, DBD)

La región o dominio central se une al ADN y está compuesta por 100 aminoácidos con nueve cisteínas en posiciones fijas, que son los dos dedos de zinc. Éstos se unen específicamente a una secuencia de ADN llamada elemento de respuesta a hormonas (en nuestro caso, Elemento de Respuesta a Estrógenos, ERE).

Esta región C o dominio de unión es esencial para la activación de la transcripción. La unión a la hormona induce un cambio en la conformación, que permite la unión con los elementos en el gen que responden a la hormona.

Región D (Bisagra).

La región que está entre el dominio de unión al ADN y el dominio de unión a la hormona contiene un área de señalización que tiene dos funciones específicas:

- ▶ Es importante para el movimiento del receptor hacia el núcleo, después de la síntesis en el citoplasma. Esta señal de transporte nuclear debe estar presente para que el receptor de estrógenos permanezca dentro del núcleo en ausencia de hormonas.
- ▶ Esta región también es un sitio de rotación (por eso se la llama bisagra) que permite el cambio conformacional.

Región E (Dominio de unión a ligando, LBD)

El extremo carboxilo del receptor α es el dominio de unión a la hormona (estrógenos y antiestrógenos). Está compuesto por 251 aminoácidos (residuos 302-553) y presenta diversas funciones:

- ▶ Además de la unión a la hormona, esta región controla la dimerización y contiene la función de activación de la transcripción, llamada TAF-2. A diferencia de la TAF-1, la TAF-2 depende de la unión a la hormona para su activación completa.
- ▶ Es también el sitio para la unión a las proteínas de respuesta al estrés (específicamente, la HSP 90). La unión a

estas proteínas impide la dimerización y la unión al ADN.

- ▶ El dominio de unión a la hormona de los receptores esteroides tiene una estructura característica, que contiene hélices que forman un "bolsillo" (también llamado plega-miento en sandwich). (Wurtz, Bourguet et al. 1996) Después de unirse a una hormona, este plegamiento cambia su conformación para crear nuevas superficies que pueden interactuar con proteínas coactivadoras y correpresoras.

Región F (Dominio C-terminal)

La región F del ER α es un segmento C-terminal de 42 aminoácidos. La región modula la transcripción del gen por los estrógenos y antiestrógenos. Su actividad afecta la eficacia de los antiestrógenos para suprimir la transcripción estimulada por estrógenos. La conformación del complejo receptor-ligando es diferente con los estrógenos y los antiestrógenos, y también con la región F o sin ella.

La región F no es necesaria para la respuesta de transcripción a los estrógenos, sin embargo, afecta la magnitud de la actividad del ligando unido al receptor.

Los dos subtipos de receptores estrogénicos conocidos se unen con similar afinidad al Estradiol y al ADN diana. Los dominios de activación de la transcripción presentan diferencias entre ambos subtipos, sugiriendo el desarrollo de una maquinaria de transcripción diferente. (Cano, Dueñas et al. 2006)

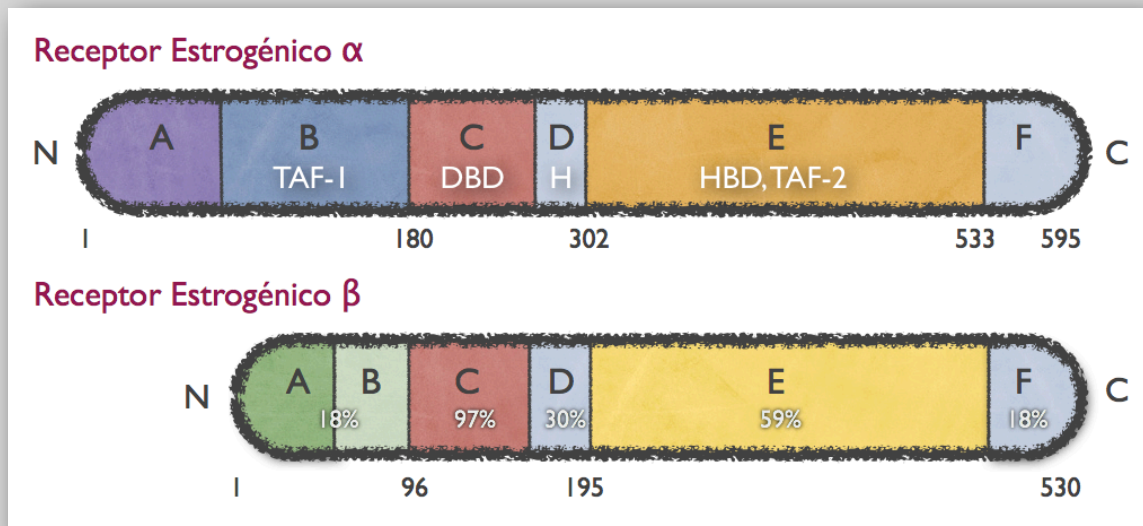


Fig 5. Estructura de los dos subtipos de receptor estrogénico (ER) clásico.

Bajo cada ER se establece el número de aminoácidos que los constituyen. Sobre las distintas regiones del ER α se establecen las funciones principales (en blanco). En el ER β se especifica el porcentaje de similitud de las distintas regiones entre ambos subtipos de ER (en blanco).

Modificado de Fritz, MA. (2011)

A.3. Distribución del receptor clásico.

La distribución tisular de ambos subtipos de receptores difiere, aunque a veces se solapan. El ER α se expresa de forma predominante en útero, placenta, testículo, riñón e hígado. El ER β , por su parte, predomina en ovario (células de la granulosa), próstata, epitelio, vejiga, parénquima pulmonar, mucosa gastrointestinal, bazo, timo, nódulos linfáticos, tejido adiposo y médula ósea. Ambos receptores se encuentran en riñón, mama, cerebro, hueso, glándulas adrenales, sistema cardiovascular y epidídimo. (Enmark, Pelto-Huikko et al. 1997)

La coexpresión en algunos tejidos puede indicar una interacción entre ambos subtipos.

En el sistema cardiovascular se presentan en células endoteliales, en fibras muscu-

lares lisas vasculares, fibroblastos y cardiomiocitos. Los dos subtipos de receptores están presentes en humanos en ambos géneros. (Shearman, Cupples et al. 2003)

La importancia relativa de ambos subtipos de receptores en la vasculatura es objetivo de varias líneas de investigación, existiendo datos contradictorios en la bibliografía. (Simoncini, Fornari et al. 2002)

Por un lado, se ha descrito una alteración de la función endotelial y la aparición de degeneración arteriosclerótica prematura asociada a la ausencia de ER α , lo que podría sugerir un efecto protector de los estrógenos mediado por este subtipo de receptor.

Por otro lado, el ER β se encuentra distribuido de manera más amplia en el organismo que el ER α y se expresa en mayor proporción en células vasculares musculares lisas. (Orshal and Khalil 2004) Inclu-

so se ha descrito que el daño vascular induce una sobreexpresión sólo del subtipo ER β . (Lindner, Kim et al. 1998)

Además, los ratones deficientes en uno de los dos subtipos de receptor están protegidos frente al daño vascular, sugiriendo que la presencia de sólo uno de los dos subtipos es suficiente para el efecto protector de los estrógenos. (Iafrati, Karas et al. 1997),(Karas, Hodgins et al. 1999).

Con todo esto, la importancia fisiológica y la implicación patológica de ambos subtipos de receptores en la sistema circulatorio es una cuestión en vías de ser esclarecida.

Además, la existencia (junto con los distintos subtipos de ER) de polimorfismos de los genes que los codifican añade un grado de complejidad adicional.

Los receptores estrogénicos pueden presentarse (según diversos autores) en el núcleo, citoplasma e incluso en la membrana plasmática. Los estudios de inmunohistoquímica con formas de estradiol que no atraviesan la membrana plasmática apoyan la existencia de receptores estrogénicos localizados en ésta que podrían mediar gran parte de los efectos no genómicos, que más adelante desarrollaremos.

A.4. Mecanismo de acción hormonal a través del receptor clásico.

Las hormonas esteroideas atraviesan la membrana celular rápidamente por mecanismos de difusión simple. No se conocen los factores responsables de esta transferencia, pero se piensa que la concentración de hormona libre (no ligada) en el torrente sanguíneo es un factor que influye de manera importante en la función celular. Una vez que se encuentran en el interior de la célula, las hormonas esteroideas se unen a sus receptores individuales, siguiendo la siguiente cadencia de acontecimientos: (King and Greene 1984) (Fig 6)

* Transformación o activación del receptor.

Consiste en el cambio de conformación del complejo hormona-receptor, que forma un sitio de unión necesario para que este complejo se una a la cromatina. En estado libre, el receptor se asocia con proteínas de respuesta al estrés (HSP 90) que lo estabilizan y protegen, y mantienen la región de unión al ADN en estado inactivo. La activación del receptor es estimulada por la unión de la hormona, que provoca una disociación del complejo receptor-proteína de respuesta al estrés.

* Unión a los Elementos de Respuesta a los Estrógenos

El complejo hormona-receptor se une a sitios específicos del ADN, los elementos de respuesta a estrógenos (ERE), que se localizan en dirección 5' del gen.

* Transcripción y traducción.

La unión específica del complejo [E-ER] con el ADN induce el comienzo de la transcripción por la ARN polimerasa. A la transcripción sigue la traducción, la síntesis de proteínas mediada por ARNm en los ribosomas.

* Procesamiento hormona-receptor.

Tras la activación del gen, el complejo [E-ER] inicia el procesamiento hormona-receptor. En el caso de los ER, el procesamiento comprende la conversión de los sitios receptores de alta afinidad en una forma que se disocia rápidamente y que provoca la pérdida de la capacidad de unión. Este proceso se completa en 6 horas, y este rápido cambio de los receptores de estrógenos tiene consecuencias clínicas. La presencia continua de estrógenos es un factor importante para que persista la respuesta.

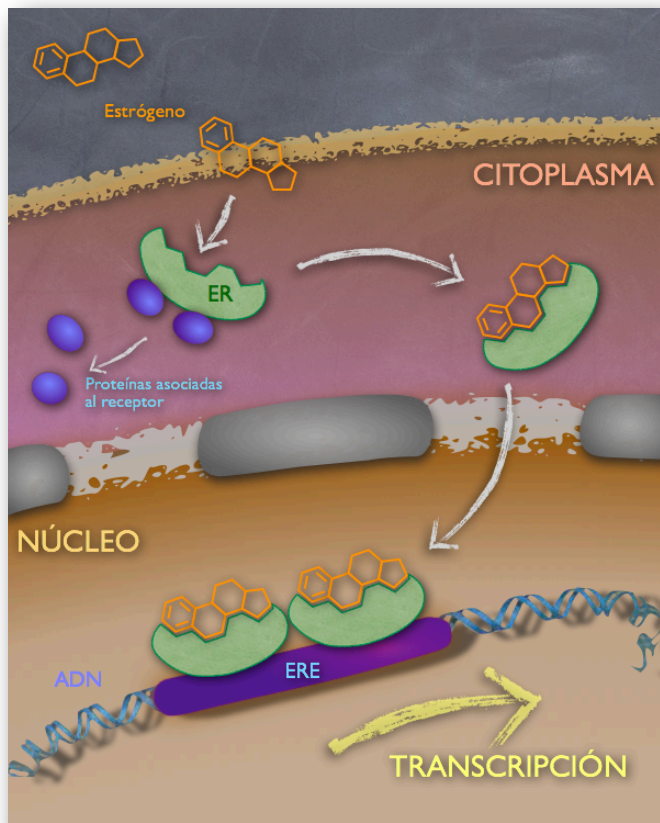


Fig 6.
Vía clásica de transducción estrogénica.

Modificado de Gruber, GJ. (2002)

A.5. Modulación de la acción hormonal

La actividad biológica mediada por el receptor clásico, aunque basada en el mecanismo de acción anteriormente expuesto, puede ser modulada de distintas maneras:

*Regulación del número de receptores.

Una importante acción de los estrógenos es la modificación de su actividad y de la de otras hormonas a través del cambio en el número de receptores.

Los estrógenos aumentan la respuesta de determinados tejidos a su acción y a la de los progestágenos y andrógenos mediante el incremento en la concentración de sus propios receptores y de los receptores intracelulares de progestágenos y andrógenos. A este proceso se le denomina **relleno**.

La Progesterona limita la respuesta tisular a los estrógenos bloqueando el mecanismo de relleno y, por lo tanto, disminuyendo en el tiempo las concentraciones de receptores de estrógenos. Los receptores de estrógenos y progestágenos salen continuamente del núcleo al citoplasma y son activamente transportados de regreso al núcleo. Esta difusión continua hacia el citoplasma es equilibrada por el transporte activo hacia el interior del núcleo.

La supresión de receptores de estrógenos en ciertos tejidos, por acción de agentes progestacionales, es la principal razón para agregar progestágenos a los pro-

gramas de tratamiento con estrógenos.

*Cooperatividad.

Otro de los aspectos de la activación de los receptores de estrógenos es un aumento de la afinidad por el ligando. Esta es una acción de los estrógenos, máxima con Estradiol y mínima con Estriol. La capacidad del Estradiol de unirse a un sitio para afectar a otro se llama cooperatividad.

- ▶ Se llama cooperatividad positiva al aumento de la afinidad. La ventaja biológica de esta cooperatividad positiva es que aumenta la capacidad del receptor para responder a pequeñas variaciones en las concentraciones hormonales. La duración relativamente prolongada de la acción del Estradiol se debe al estado de alta afinidad alcanzado por el receptor.
- ▶ La cooperatividad negativa, la inhibición del paso de un estado de baja afinidad a uno de alta afinidad, es una de las actividades antiestrogénicas del Clomifeno.

*Disociación de las proteínas de respuesta al stress.

Antes de la unión al ligando, los receptores de estrógenos son un complejo móvil inactivo en el citosol celular. Este complejo incluye diferentes proteínas, como las proteínas de respuesta al estrés. De éstas, parece que la más importante es la proteína de respuesta al stress 90 (Heat Shock Protein, HSP 90) y a ella se asocian otras más. Esta proteína no sólo es impor-

tante para mantener el estado inactivo, sino también para provocar el plegamiento adecuado para el transporte a través de las membranas. La disociación de la HSP 90 implica la "activación" o "transformación". (Parker, Arbuckle et al. 1993)

* Dimerización del receptor.

Los receptores de estrógenos, progesterona, andrógenos y glucocorticoides se unen a los elementos de respuesta correspondientes en forma de dímeros, una molécula de hormona para cada una de las dos unidades del dímero.

Los ER α pueden formar dímeros con otros receptores α (homodímeros) o con un ER β (heterodímeros). Lo mismo sucede con los ER β . (Pettersson, Grandien et al. 1997)

* Cambio en la conformación del receptor.

Después de unirse a una hormona, este pliegue cambia su conformación para crear nuevas superficies que puedan interactuar con proteínas coactivadoras y co-supresoras. La conformación no implica necesariamente el concepto simple de "abierto" o "cerrado", sino que se pueden dar formas intermedias que proveen un espectro de actividad agonista/antagonista. (Speroff, Glass et al. 1999)

* Unión a los elementos de respuesta a los estrógenos (ERE).

Los elementos de respuesta a las hormonas (ERH), y específicamente los elementos de respuesta a los estrógenos (ERE),

son una secuencia corta de ADN dispuesta en el promotor de un gen, a la cual puede unirse de forma específica un receptor de hormonas y así regular la transcripción.

La secuencia suele constar de un par de repeticiones invertidas separadas por tres nucleótidos, lo que indica que el receptor debe unirse en forma de dímero. (Beato and Sanchez-Pacheco 1996)

Por otro lado, los estrógenos también regulan la transcripción de genes que carecen de elementos de respuesta a estrógenos funcionales, modulando la actividad de otros factores de transcripción. (Webb, Lopez et al. 1995)

* Proteínas corre reguladoras.

Los receptores nucleares unidos al ERE reclutan un significativo número de proteínas adicionales (denominadas corre reguladores transcripcionales o adaptadores), que se intercalan entre el receptor activado y la maquinaria transcripcional, formando un complejo oligomérico que facilita o inhibe la transcripción de los genes diana.

Las funciones de estos corre reguladores son variadas e incluyen mecanismos que implican la activación o supresión de las áreas TAF del receptor, la remodelación de la cromatina (permitiendo una mayor o menor accesibilidad de la maquinaria transcripcional a los genes diana) o la estabilización de la unión de otras proteínas corre reguladoras.

Son de dos tipos:

* Coactivadores.

La unión de ligandos agonistas a los receptores nucleares induce un cambio conformacional del receptor que implica un incremento de la afinidad de unión por proteínas coactivadoras. Estas proteínas suelen poseer actividad histona acetiltransferasa (HAT), que debilita la asociación de las histonas al ADN, y de este modo, facilita la transcripción de los genes diana.

El coactivador del receptor de esteroides de 160-kD y la proteína P300 (Onate, Tsai et al. 1995) parecen tener la mayor capacidad de aumentar la actividad transcripcional de los receptores de estrógeno.

* Correpresores

Por el contrario, la unión de ligandos antagonistas a los receptores nucleares induce un cambio conformacional del receptor que implica un incremento de la afinidad de unión por proteínas correpresoras.

Estas proteínas reclutan enzimas con actividad histona deacetilasa (HDAC), que incrementa la afinidad de las histonas por el ADN, y de este modo, reprime la transcripción de los genes diana. (Montano, Ekena et al. 1999)

Pueden interactuar directamente con el receptor ocupado por el agonista (o antagonista) pero también competir con las proteínas coactivadoras del receptor de esteroides.

El equilibrio de correpresores y de coactivadores influye en la actividad transcripcional de los receptores estrogénicos activados. Por tanto, parece probable que una parte del antagonismo al receptor estrogénico sea resultado del reclutamiento de correpresores. (Takimoto, Graham et al. 1999)

La distinta concentración de coactivadores/correpresores puede afectar a la respuesta celular y podría justificar la respuesta a pequeñas cantidades de hormona. Con una pequeña cantidad de receptores, pero gran cantidad de coactivadores/correpresores, la respuesta celular puede ser significativa aunque la señal sea débil.

* Actividad moduladora de las TAF.

La TAF es la parte del receptor que activa la transcripción del gen después de la unión al ADN. La unión del ligando al receptor genera una conformación que permite actuar a la TAF.

- ▶ La **TAF-1** puede estimular la transcripción en ausencia de hormonas cuando se fusiona con el ADN, sin embargo, también promueve la unión al ADN en el receptor intacto.
- ▶ La **TAF-2** es afectada por la unión del ligando y los receptores de estrógenos dependen de la unión a éstos para activarse completamente. La TAF-2 se compone de un número de elementos dispersos que se reúnen después de la unión del estrógeno.

Las actividades de las TAF-1 y 2 varían de acuerdo con los promotores en las células diana. Estas áreas pueden actuar en forma individual o asociada a otras. (Hyder, Shipley et al. 1995)

* Fosforilación

La fosforilación de sitios específicos de los receptores es un importante método de regulación, al igual que la fosforilación de otros péptidos cuya acción afecta la transcripción de los genes.

La fosforilación puede ser regulada por receptores de la membrana celular y por la unión con los ligandos. De esta manera, se establece un medio para que los ligandos unidos a la membrana celular se comuniquen con los genes de los receptores de esteroides.

Las vías del AMPc y de la **proteinkinasa A (PKA)** aumentan la actividad transcripcional de los receptores de estrógenos por fosforilación. En algunos casos, la fosforilación modula la actividad de los receptores. En otros, regula la actividad de un péptido específico o coactivador/correpresor que, a su vez, modula al receptor.

Los integrantes de la superfamilia de receptores de esteroides son fosfoproteínas. La fosforilación ocurre después de la unión con el esteroide y tiene lugar en el citoplasma y en el núcleo. Se cree que aumenta la actividad del complejo receptor de esteroides.

La fosforilación del receptor aumenta la capacidad de la molécula de regular la transcripción. Los factores de crecimiento estimulan la fosforilación de la **proteinkinasa**, que puede ejercer una acción sinérgica sobre los genes o incluso generar actividad independiente de los ligandos.

El factor de crecimiento epidérmico (Epidermal Growth Factor, EGF), el factor de crecimiento insulínico I (Insulin Growth Factor I, IGF-I) y el factor transformador del crecimiento α (Transforming Growth Factor α , TGF- α) pueden activar los receptores de estrógenos aun cuando no haya estrógenos.

El mecanismo de la activación de los factores de crecimiento se desarrollará más adelante.

*** Ocupación del sitio nuclear por el complejo hormona-receptor.**

Es la que mantiene la actividad biológica hormonal clásica. La tasa de disociación de la hormona y su receptor, y también la vida media del complejo de unión a la cromatina nuclear, afectan la respuesta biológica porque los ERE son numerosos y, en condiciones normales, sólo está ocupada una pequeña parte. (Webb, Lopez et al. 1992)

De esto se desprende un importante principio clínico: el tiempo de la exposición a una hormona es tan importante como la dosis. Una razón por la que sólo es necesario que pequeñas cantidades de estrógenos estén presentes en la circulación es la larga vida media del complejo hormona-receptor de los estrógenos [E-ER].

En realidad, un importante factor en la diferencia que existe entre distintos estrógenos (Estradiol, Estrona, Estriol) respecto de la potencia es el tiempo durante el cual el complejo [E-ER] ocupa el núcleo.

La tasa más alta de disociación del estrógeno débil (Estriol) se puede compensar con la aplicación continua, para prolongar la unión al núcleo y la actividad. El Cortisol y la Progesterona deben circular en grandes concentraciones, porque la vida media de sus complejos receptores en el núcleo es breve.

B. Señales estrogénicas vía receptores de membrana.

El hecho probado de la acción rápida de los estrógenos (segundos o minutos) ha hecho pensar en la implicación de otros mecanismos de acción distintos a las vías clásicas de señalización que involucran al núcleo con la consiguiente síntesis proteica.

Estos efectos son el resultado de la acción estrogénica directa sobre receptores estrogénicos de membrana.

Ejemplos de los efectos mediados por esta vía alternativa son la vasodilatación a corto plazo de las arterias coronarias, (Kim, Lee et al. 1999), el rápido efecto insulínotrópico del Estradiol sobre las células beta pancreáticas, (Nadal, Rovira et al. 1998) y la activación rápida de las vías de señalización relacionadas con el factor de crecimiento en las neuronas. (Watters, Campbell et al. 1997).

B.1. Receptores estrogénicos plasmáticos asociados a membrana (mER) mER α y mER β .

El concepto de la activación rápida de las vías de señalización intracelular mediado por la unión de estrógenos a receptores estrogénicos de membrana (mER) toma fuerza al comienzo de la pasada década, (Haynes et al, 2002; Simoncini et al, 2004; Levin, 2005; Meyer et al, 2006; Moriarty et al, 2006; Boonyaratankornkit y Edwards, 2007; Cheskis et al, 2007) aunque previamente se habían identificado los sitios de unión al 17 β -Estradiol en la membrana de células endometriales (Pietras y Szego, 1977) y se había descrito un incremento de las concentraciones de AMPc uterino en escasos minutos (Szego y Davis, 1969). Más tarde se demostró el aumento de las concentraciones de AMPc vascular en respuesta a 17 β -Estradiol. (Kishi y Numan, 1982; Mügge et al, 1993)

Por otro lado, también se han detectado mER en células vasculares endoteliales en vena umbilical y en líneas celulares endoteliales humanas. (Russell et al., 2000) Se ha evidenciado que, tanto la forma nuclear de ER α y ER β como la asociada a la membrana plasmática, tienen similitud estructural. (Razandi et al., 1999)

También se han detectado ER α y ER β endógenos en membranas plasmáticas de células endoteliales vasculares humanas, pero no en las células endoteliales de ratones DERKO (*Double Estrogen Receptor Knock Out - doble Knock-out para ambos tipos de receptores ER α /ER β*). (Razandi et al., 2004)

Mediante el uso de 17 β -Estradiol-BSA (que no atraviesa membrana plasmática), se ha sugerido la posibilidad de que mER active señales MAPK y Akt en ciertas células vasculares endoteliales y de músculo liso y en líneas celulares de endotelio. (Haynes et al, 2000;. Russell et al, 2000;. Somjen et al, 2004 ; Chen et al, 2004)

Más recientemente, el trabajo del grupo de Levin ha propuesto que, en ciertas células cancerosas, immortalizadas por naturaleza, tanto las proteínas de membrana como las de unión nuclear a 17 β -Estradiol, podrían ser idénticas al "clásico" ER humano comparando el ER nuclear y el ER plasmático localizado en la membrana plasmática. (Pedram et al., 2006)

Lo que no queda claro es si una subpoblación de los ER clásicos α y β también se podría translocar desde el citosol a la membrana plasmática de las células vasculares, ni la forma en que lo podrían hacer.

Mecanismos de acción rápida de estrógenos mediada por mER α y mER β localizados y co-localizados en células vasculares.

Varios estudios recientes han identificado los posibles mecanismos de acción que derivan de la localización y co-localización de una subpoblación de ER en la membrana plasmática de células endoteliales y de otros tipos, así como de varias proteínas de sujeción o andamiaje (*scaffold proteins*). (Moriarty et al, 2006; Boonyaratanakornkit y Edwards, 2007; Cheskis et al, 2007) Estos mecanismos vienen descritos en un modelo integrativo en la **Fig 7**. (Moriarty, Kim et al. 2006)

La unidad funcional se encuentra en las **caveolas**, invaginaciones vesiculares de la membrana plasmática que representan orgánulos especializados de membrana, que son el lugar preferencial de ubicación de los complejos de señalización centrados en los mER de las células endoteliales. (Chambliss et al, 2000, 2002;. Razandi et al, 2002)

Una de las acciones no genómicas mejor estudiadas hasta el momento, es la activación de la eNOS en las células endoteliales vasculares, aunque algunos de los mecanismos implicados han sido descritos en otros tipos celulares.

Se ha descrito la existencia de ER α y ER β acoplados a proteína G, en algunos casos situados en la caveola. (Moriarty, Kim et al. 2006)

II. Mecanismos de acción de los Estrógenos

La unión de E2 a estos receptores de membrana puede activar distintas vías de señalización:

- ▶ Activación de la PLC (Fosfolipasa C), y formación de IP₃ (Inositol trifosfato), cascada de señalización que conduce a la liberación de Ca⁺² intracelular, que interviene en la activación final de la eNOS, al disociarse la Caveolina-1, proteína estructural que retiene la eNOS en la caveola. (Chambliss y otros, 2000;. Razandi et al, 2002.)
- ▶ Interacción con la proteína c-Src, modulador de la vasodilatación inducida por estrógenos, (Haynes et al., 2003) (Li et al., 2007) y activación de un modulador de la acción no genómica del ER (MNAR), que inicia la cascada de activación de la MAPK (Proteín Kinasa Activada por Mitógenos) o mediante la intervención de la subunidad reguladora p85 de la PI₃K (Fosfatidilinositol-3-Kinasa). (Moriarty et al, 2006; Boonyaratanakornkit y Edwards, 2007; Fu y Simoncini, 2007) Esta kinasa incrementa la producción de PIP₃ que activa la Akt (Proteína Kinasa B) que a su vez fosforila y activa la eNOS. (Cheskis et al, 2008;. Greger et al, 2007;. Vadlamudi y Kumar, 2007)

Estas vías están esquematizadas en la **Fig 7** en la que se representa la estructura funcional de la caveola.

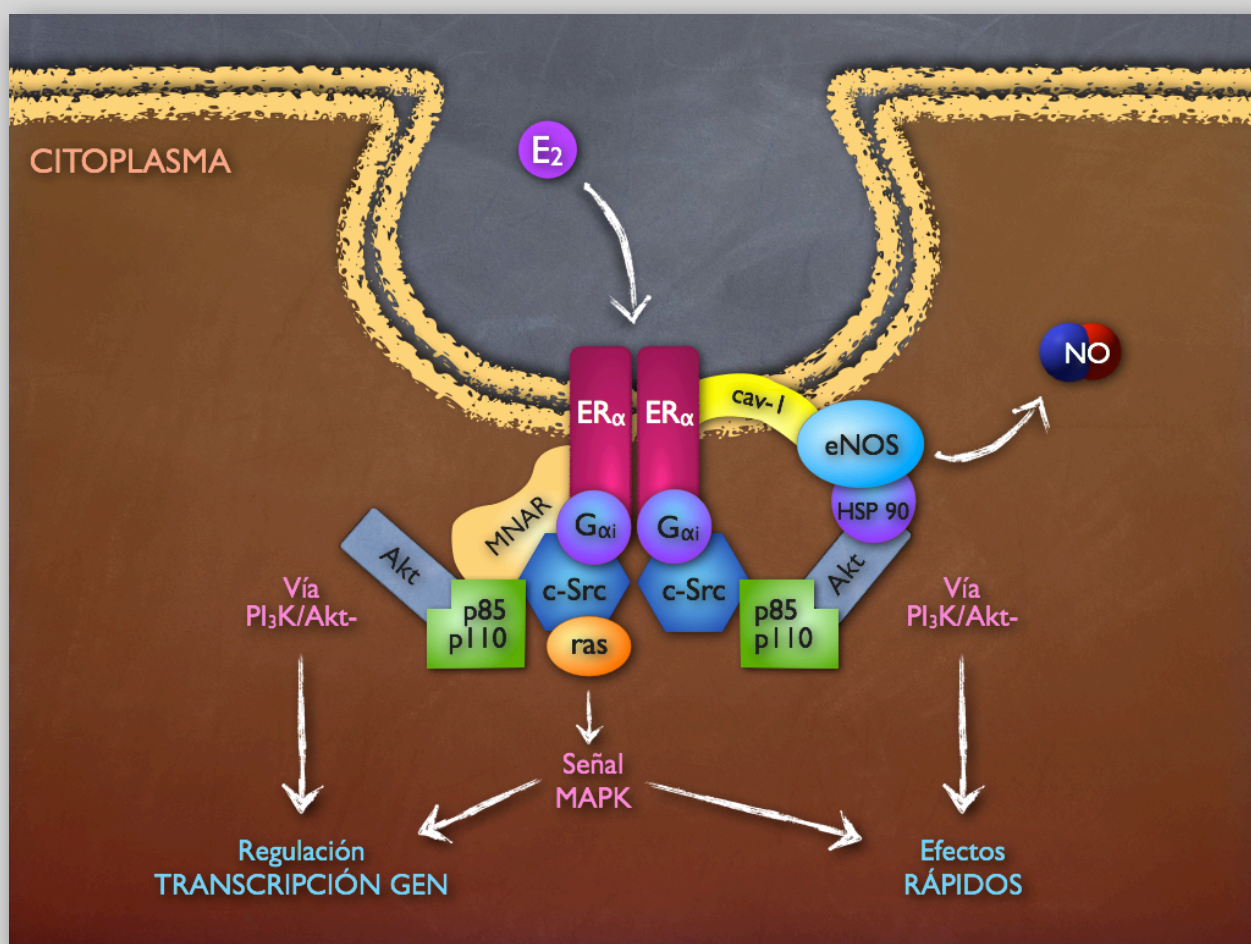


Fig 7. Modelo integrativo de los mecanismos descritos en la vía de señalización estrogénica no genómica basada en los mER en la caveola.

La caveola, invaginación de la membrana plasmática, constituye un centro de proceso de señalización hormonal, englobando un conjunto de moléculas implicadas en esta vía de señalización. El modulador de la actividad no genómica del ER (MNAR), una proteína de ensamblaje, promueve la formación de complejos que engloban $ER\alpha$, $c-Src$ y $p85$, subunidad reguladora de PI_3K (representado como subunidades $p85$ y $p110$), facilitando de esta manera, la activación de la vía de señalización PI_3K/Akt .

Por otra parte, $c-SRC$ activa la ATPasa monomérica $p21ras$ (ras), capaz de reclutar kinasas a lo largo de la vía de señalización $MAPK$. La interacción directa entre la proteína G ($G\alpha_i$) y el $ER\alpha$ es esencial para la activación de la $c-SRC$.

Una vez activadas, tanto la vía PI_3K/Akt como la $MAPK$ pueden modular la transcripción génica. Por otra parte, la activación de la vía PI_3K/Akt en las células endoteliales puede llevar a la fosforilación de la $eNOS$, situada en la caveola, interaccionando con la caveolina-1 ($cav-1$), proteína que la fija al $ER\alpha$. La proteína chaperona $HSP 90$ potencia la interacción con PI_3K/Akt . Una vez activada la $eNOS$, la liberación de NO induce efectos celulares rápidos.

Modificado de Moriarty, K. (2006)

B.2. El receptor intracelular transmembrana unido a la proteína G (GPER).

Este receptor, antes conocido como el receptor huérfano GPR30 asociado a la proteína G, es miembro de la familia de 7 receptores transmembrana asociados a la proteína G y se ha demostrado que activa diversas cascadas rápidas de acción tras la unión a estrógenos (**Fig. 9**) (Filardo et al., 2000; Thomas et al, 2005; Revankar et al, 2005; Prossnitz et al, 2008; Haas et al, 2009).

Aunque inicialmente se pensaba su localización en la membrana celular (Kanda y Watanabe, 2003; Thomas et al, 2005; Filardo et al, 2007), mediante la utilización de derivados fluorescentes de estrógenos y microscopía confocal, se describió que GPER realmente se localiza de forma primaria en el retículo endoplasmático, y este hallazgo se correlaciona con la expresión endógena de GPER (Revankar et al., 2005). Se ha localizado también en aparato de Golgi y membrana nuclear. (Filardo et al, 2007)

Aunque este receptor es distinto a los receptores clásicos ER α y ER β a nivel estructural, se une al E₂ con una alta afinidad y baja capacidad, siendo su peso molecular de 40 KDa. (Filardo et al, 2007)

Mecanismos de acción rápida de estrógenos mediada por GPER.

Tras la unión con el agonista, GPER activa proteínas G heterotriméricas que inician varios efectores, incluyendo la adenilato ciclasa y c-Src (Filardo et al, 2002; Thomas et al, 2005).

- ▶ AMPc.

Se incrementa rápidamente en tejidos vasculares y no vasculares tras la estimulación con 17 β -Estradiol (Mügge et al, 1993; Aronica et al, 1994; Revankar et al, 2005).

- ▶ Proteína c-Src.

Activa metaloproteasas de la matriz, que están involucradas en la transactivación de los receptores del EGF (Filardo et al., 2000).

Esto da lugar a múltiples eventos en cascada, incluyendo la activación de MAPK y PI₃K (Filardo et al, 2000; Revankar et al, 2005; Thomas et al, 2005). La activación de la kinasa, a su vez, puede activar las proteínas nucleares implicadas en la regulación transcripcional de los genes cuyos promotores no contienen necesariamente un ERE (Fig. 1) (Prossnitz et al, 2008).

Este es otro de los mecanismos en el que convergen las vías de señalización genómica y no genómica.

B.3. Señalización rápida de estrógenos a través del citoesqueleto de actina.

Los rápidos cambios en la forma y tamaño de las células confieren funciones fisiológicas basales en muchos tipos de células, incluyendo las neuronas y los podocitos, e implican cambios en la plasticidad morfológica del citoesqueleto de actina. (Faul et al, 2007;. Schubert y Dotti, 2007)

El reordenamiento del citoesqueleto de actina depende en general de la unión de estímulos externos a los receptores de membrana-asociados, y es mediada a través de la rápida acción posterior de diferentes fosfatasa y kinasa de proteínas. (Faul et al, 2007;. Schubert y Dotti, 2007)

En consecuencia, el movimiento, así como el crecimiento y la migración de las células vasculares se caracterizan por el remodelamiento dinámico del citoesqueleto de actina. Estos procesos se piensa son necesarios no solo para la señal intracelular, el crecimiento o la angiogénesis, sino también para la reparación de lesiones en territorios vasculares y el mantenimiento de la integridad funcional del endotelio. (Giretti y Simoncini, 2008)

Así, se han implicado en estos procesos rápidas cascadas de señal activadas por esteroides sexuales. (Fu y Simoncini, 2007; Giretti y Simoncini, 2008) Por ejemplo, las señales MAPK inducidas por 17 β -Estradiol contribuyen a la preservación de la forma de las células endoteliales

mediante la prevención de la disrupción del citoesqueleto de actina inducida por el estrés. (Razandi et al., 2000) Por otra parte, la exposición de las células endoteliales humanas aisladas a 17 β -Estradiol induce la remodelación rápida del citoesqueleto de actina, un proceso que requiere la interacción de ER α y la proteína G $_{\alpha 13}$. (Simoncini et al., 2006). En este contexto, las señales estrogénicas no genómicas pueden representar un mecanismo que permite a la célula la rápida adaptación a los estímulos circundantes.

III

ESTRÓGENOS

Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

La enfermedad cardiovascular es la mayor causa de mortalidad en mujeres en el mundo occidental. (Parrilla and Abad 2004) Su incidencia es pequeña antes del climaterio, (Barrett-Connor and Bush 1991) (Isles, Hole et al. 1992) para aumentar de forma importante tras la menopausia y aproximarse a la de los hombres (aunque con un retraso temporal de diez años con respecto a ellos). (Maxwell 1998) (Wenger 1997)

Diversos factores podrían explicar este hecho. Entre ellos, la deficiencia de estrógenos endógenos podría ser de especial importancia, tal y como apunta el hecho de que las mujeres sometidas a menopausia quirúrgica (sin mantener terapia hormonal sustitutiva) presentan el doble de riesgo de sufrir ECV que las mujeres premenopáusicas. (Colditz, Willett et al. 1987)

La razón de este hipotético mecanismo protector sobre el sistema cardiovascular no es conocida totalmente. La mejora del perfil lipídico asociada a los estrógenos (Chambliss and Shaul 2002) sólo puede explicar aproximadamente un tercio de los efectos protectores sobre el sistema vascular, (Bush, Barrett-Connor et al. 1987) por lo que podría tener mayor protagonismo el efecto directo de los estrógenos sobre la pared vascular.

Efecto de los estrógenos sobre la pared vascular

Cuando nos referimos a la pared vascular, nos referimos tanto al endotelio vascular como a la fibra muscular lisa del vaso. Esto hace que los efectos inducidos por los estrógenos varíen considerablemente dependiendo del lecho vascular. Por ejemplo, el tratamiento estrogénico potencia la respuesta vaso-dilatadora en extremidades inferiores, pero no en el lecho vascular carotídeo. (Convertino 1998)

Por otro lado, el mecanismo por el que provocan su efecto también puede ser distinto en función del tejido. Así podemos ver cómo la vasodilatación dependiente de endotelio inducida por E₂ está mediada principalmente por óxido nítrico (NO) en la aorta, mientras que en pequeñas arterias cerebrales están implicados tanto el NO como los metabolitos derivados de la acción de la ciclooxigenasa. (Tostes, Nigro et al. 2003)

A. Efecto de los estrógenos sobre el endotelio vascular.

A.1. Fisiología del endotelio vascular.

El endotelio es una estructura anatómica y funcional altamente especializada, que actúa metabólicamente como un órgano activo, que recubre el borde luminal de todos los vasos sanguíneos. Desempeña un papel integral en el mantenimiento de la homeostasis vascular, a través de una serie de factores derivados del propio endotelio.

Éste libera una serie de mediadores vasoactivos, que no sólo alteran el tono y el crecimiento del músculo liso subyacente, sino también regula la reactividad de los leucocitos circulantes, eritrocitos y plaquetas, y gobierna la permeabilidad vascular.

Así, parece que las alteraciones en la capacidad del endotelio para liberar estos mediadores pueden ser un factor desencadenante importante en muchos estadios de la enfermedad cardiovascular.

En lo que respecta a la regulación del tono vascular, va a depender del papel vasodilatador o vasoconstrictor de dichos mediadores. De los factores vasodilatadores que el endotelio puede liberar, los más significativos son la Prostaciclina (Pgl₂), (Moncada, Gryglewski et al. 1976) el Óxido Nítrico (NO), (Furchgott and Vanhoutte 1989) (Ignarro, Buga et al. 1987) (Palmer, Ferrige et al. 1987) y el fac-

tor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF). (Chen, Suzuki et al. 1988) Están expuestos en la Fig 8.

A.1.a. Prostaciclina - Pgl₂

Es sintetizada por isoenzimas de la ciclooxigenasa (COX), de las que se han identificado dos variantes.

- La COX-1 es un enzima constitutiva expresada en el endotelio vascular y se piensa que contribuye al mantenimiento de la homeostasis vascular (se ha descrito también una variante unida a COX-1, a veces llamada COX-3).
- La COX-2 es un isoenzima inducible que se cree se expresa en las células del sistema cardiovascular (e inmune) sólo durante episodios patológicos, aunque hay alguna evidencia que sugiere que esta isoforma está presente de forma constitutiva en las células endoteliales humanas. (Grosser, Fries et al. 2006)

La Pgl₂ provoca la relajación del músculo liso mediante la activación de receptores específicos de superficie (IP), que son proteínas G acopladas a adenilato ciclasa y por esta razón, eleva los niveles de AMPc. (Mitchell and Warner 2006)

A.1.b. Óxido Nítrico - NO

Se sintetiza a partir de L-arginina por la NO sintasa (NOS) y produce vasodilatación, por la activación de la guanilato ciclasa soluble, generando GMPc. (Moncada, Palmer et al. 1991)

En condiciones fisiológicas, dos formas "constitutivas" de NOS desempeñan un papel en la producción de NO, principalmente la NOS endotelial (eNOS) y en menor medida, la NOS neuronal (nNOS). (Semenza 2005) Una tercera isoforma, la NOS inducible (iNOS), se expresa en ciertos tipos de células inflamatorias y tiene un papel esencial en la inflamación vascular. (Hauser, Radermacher et al. 2004)

Las enzimas constitutivas producen un nivel bajo de NO, fundamental para el mantenimiento de la homeostasis vascular, mientras que la actividad de la iNOS produce una gran cantidad de NO, implicándose en la fisiopatología de la inflamación.

A.1.c. Factor hiperpolarizante derivado del endotelio - EDHF.

La identidad del EDHF sigue siendo incierta, aunque son varios los candidatos que han sido propuestos, como los iones K^+ , AMPc, los productos del citocromo P450 2C, H_2O_2 , la propagación de corrientes de electrones y, más recientemente, el péptido natriurético del tipo C (CNP). (Ahluwalia and Hobbs 2005)

Se acepta en general, que la liberación/transmisión de EDHF por las células endoteliales se produce tras la apertura de SK_{Ca} e IK_{Ca} endotelial. (Edwards, Dora et al. 1998) Por otra parte, la hiperpolarización de la musculatura lisa vascular asociada a la actividad del EDHF, en general, implica la activación de la Na^+/K^+ -ATPasa y Kir.

Sin embargo, como la identidad química de EDHF sigue siendo difícil de conocer, faltan antagonistas selectivos de EDHF y por lo tanto el verdadero papel fisiopatológico del EDHF sigue siendo una incógnita. Como consecuencia, la actividad del EDHF es definida habitualmente como la respuesta que persiste ante la inhibición combinada de la síntesis de NO y PgI_2 (es decir, mediante el bloqueo de NOS y COX, respectivamente).

Entre los factores vasoconstrictores producidos en el endotelio, destacan la Endotelina (ET) y el Tromboxano A2 (TXA_2).

A.1.d. Endotelina - ET.

Entre los factores contráctiles derivados del endotelio se encuentra uno de los vasoconstrictores más potentes que se conocen, la Endotelina (ET), un polipéptido de 21 aminoácidos.

Su síntesis se inicia por la transcripción de los genes de ET en las células endoteliales y la generación de los productos génicos preproET y big ET, los cuales son posteriormente cortados por enzimas es-

pecíficas convertidoras de ET (ECE) a las isoformas ET-1, ET2, ET-3 y ET-4.

Las isoformas de ET se unen con diferente afinidad a los receptores ET_A y ET_{B2} en el músculo liso vascular y estimulan varias Proteín Kinasas, además de otros mecanismos señalizadores de contracción del músculo liso, crecimiento y proliferación. ET también se une a los receptores ET_{B1} endoteliales, que median la liberación de sustancias vasodilatadoras como NO, PgI_2 y EDHF.

La acción resultante de la liberación endotelial de ET consiste, por tanto, en una vasodilatación inicial y transitoria por activación de receptores ET_{B1} , seguida de una contracción persistente y de inicio lento por activación de receptores ET_A y ET_{B2} .

La regulación del sistema ET ocurre principalmente al nivel de la síntesis, particularmente durante la transcripción. El ARNm de ET-1 se sobreexpresa y la síntesis de ET-1 se estimula durante un mayor estrés vascular y en respuesta a agentes vasoactivos como Angiotensina-II, Noradrenalina, Vasopresina y Trombina y citoquinas como $TNF\alpha$, Interleukinas y $TGF\beta$. (Hynynen and Khalil 2006)

Los niveles del ARNm de ET-1 aumentan por hipocapnia (disminución del gas carbónico) y aumentan por hipoxia. En células endoteliales los niveles de ARNm disminuyen en respuesta a NO, PgI_2 y Factor Natriurético Atrial. Se ha descrito la *down-regulation* que el E_2 ejerce sobre la síntesis de ET-1. (Tan, Wang et al. 2003)

A.1.e. Tromboxano A_2 - TXA_2 .

El endotelio también es capaz de liberar TXA_2 , un metabolito del Ácido Araquidónico, generado por la acción de la Tromboxano Sintetasa sobre endoperóxidos cíclicos de prostaglandina. Su principal función biológica es participar en la hemostasia. Debido a su función en la agregación plaquetaria, el endotelio también es capaz de liberar TXA_2 , que media la vasocontracción producida por Noradrenalina y Adenosín Trifosfato (ATP).

El aumento de la concentración de Ca^{+2} intracelular en las células endoteliales activa la Fosfolipasa A_2 (PLA_2) lo que conduce a la producción de Ácido Araquidónico, el cual es transformado por la (COX) en Prostaglandina H_2 (PGH_2) que posteriormente se transforma en TXA_2 que se unirá a sus receptores (TXR) en las células del músculo liso vascular, iniciando las cascadas de transducción de señales.

La activación de TXR induce la entrada de Ca^{+2} a través de canales de Ca^{+2} dependientes de voltaje y tipo ROC y en menor medida, por la contribución de la ruta de IP_3 . Esto provoca en última instancia la contracción de las células del músculo liso vascular. (Okon, Golbabaie et al. 2002)

Nos vamos a centrar en las sustancias vasodilatadoras y su relación entre ellas. (Fig. 8)

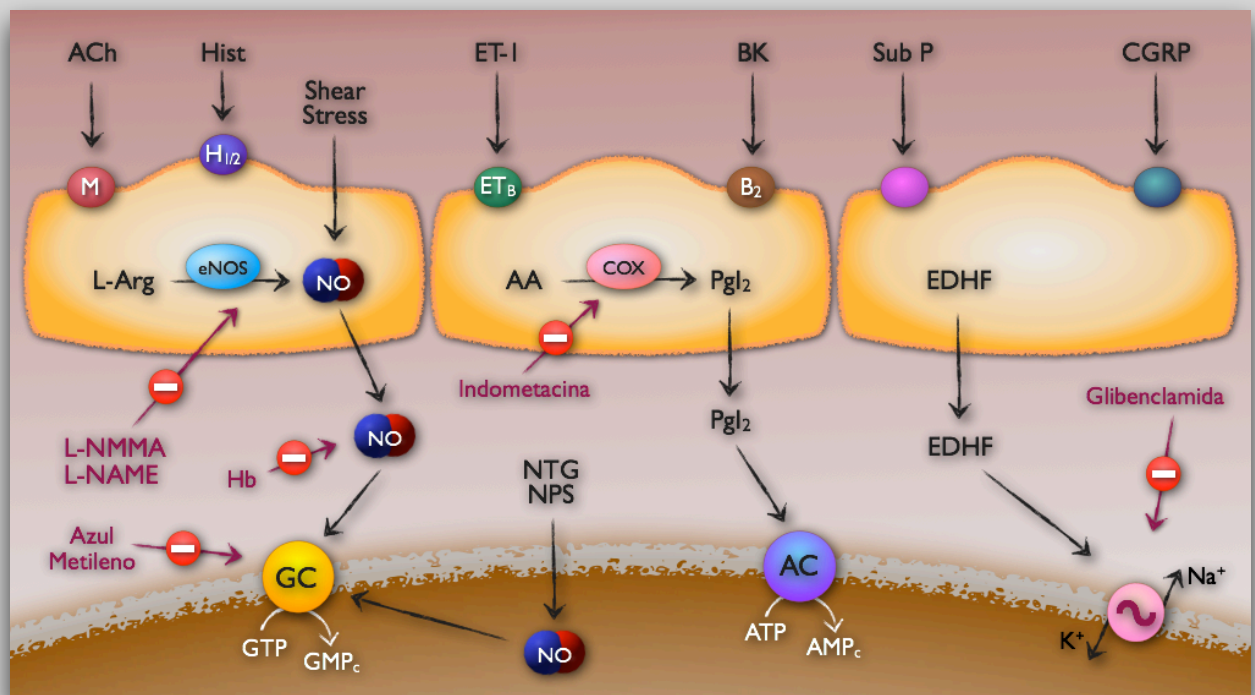


Fig 8. Mecanismos de relajación endotelio-dependiente que muestra la liberación de óxido nítrico (NO), prostaciclina (Pgi₂) y el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF) desde el endotelio, ejerciendo su acción sobre la musculatura lisa vascular.

Los agonistas de los receptores específicos actúan sobre las células endoteliales y pueden estimular la liberación de uno o todos los mediadores para inducir la relajación del músculo liso.

Abreviaturas: Acetilcolina (ACh), Histamina (Hist), Endotelina-1 (ET-1), Bradikina (BK), Sustancia P (Sub P), Péptido relacionado con gen de la calcitonina (CGRP), Óxido Nítrico sintasa endotelial (eNOS), Ácido Araquidónico (AA), L-N^G monometil arginina (L-NMMA), L-N^G nitroarginine metiléster (L-NAME), Hemoglobina (Hb), Nitroglicerina (NTG), Nitroprusiato Sódico (NPS), receptor muscarínico (M), receptor de histamina (H_{1/2}), receptor de Endotelina (ET_B), receptor de la Bradikina (B₂).

Modificado de Buckley, CH. (1997)

Hay una evidencia clara que apoya el concepto de que estas sustancias no sólo actúan como vasodilatadores, sino que juegan un papel múltiple en la homeostasis vascular, incluida la inhibición de la mitogénesis, la agregación plaquetaria y la extravasación de los leucocitos. (Ahluwalia and Hobbs 2005) (Moncada, Palmer et al. 1991)

Sin embargo, no hay evidencia clara de que estos tres mediadores endoteliales actúen sinérgicamente en el mantenimiento de la homeostasis vascular. En particular, parece ser que cada mediador

individual posee la capacidad para interactuar con los componentes de las vías de síntesis y activación de otros mediadores y con ello modificar su actividad. La regulación del tono vascular por parte del endotelio es muy compleja, y no puede explicarse completamente solo con la contribución de los tres principales vasodilatadores: NO, Pgi₂ y EDHF.

La relación entre estas moléculas ha sido bien caracterizada en lo que al mantenimiento del tono vascular se refiere.

Cuando nos referimos a la regulación fisiológica del diámetro vascular, aunque el NO es el vasodilatador endotelio-dependiente predominante en las arterias de más calibre, a medida que se descende en el árbol vascular, el papel de NO disminuye, mientras que la influencia del EDHF aumenta. (Shimokawa, Yasutake et al. 1996)

Los estudios que han investigado la relación entre el NO y EDHF indican que el NO basal inhibe de forma tónica la respuesta del EDHF. De hecho, en muchos vasos sanguíneos la respuesta del EDHF sólo es evidente una vez que la producción de NO se ha inhibido. (Nishikawa, Stepp et al. 2000)

De manera similar, la contribución de la Pgl_2 (y otros productos de la COX) en la relajación dependiente del endotelio es a menudo evidente sólo después de la inhibición de la NOS, y por ello se piensa que es debido a un efecto tónico inhibidor del NO. Hay pruebas que sugieren que el NO puede intensificar e inhibir la actividad de la COX y su expresión. Estos efectos dispares del NO es probable que reflejen la variante específica de NO involucrada y su concentración. (Mollace, Muscoli et al. 2005)

Por otra parte, hay varios trabajos que demuestran la regulación positiva de la Pgl_2 o el EDHF en un ambiente donde la producción de NO ha sido suprimida. (Villar, Francis et al. 2006) Por ejemplo, en

las arteriolas del músculo gracilis de ratones macho KO para eNOS, la dilatación endotelio-dependiente se mantiene a pesar de la ausencia de NO, pensándose que la compensación era Pgl_2 -dependiente, ya que la respuesta fue significativamente atenuada por Indometacina, inhibidor de la COX. (Beverelli, Bea et al. 1997)

La evidencia apoya la idea de que esta actuación de la Pgl_2 se origina en la regulación positiva de la expresión de la COX o su actividad. (Doni, Whittle et al. 1988) Sin embargo, la evidencia también apoya la tesis de que el EDHF tiene una regulación positiva aumentada en ratones KO para eNOS. (Scotland, Chauhan et al. 2001)

Del mismo modo, la inhibición crónica de la síntesis de NO provoca un cambio en los factores que median la relajación dependiente del endotelio. Varios estudios han demostrado un aumento compensatorio de la producción de Pgl_2 y regulación al alza de la expresión de la COX.

Esta regulación al alza compensatoria de Pgl_2 y/o EDHF que sigue a la supresión de la producción de NO se observa también en modelos de enfermedad cardiovascular y en humanos con enfermedad cardiovascular. (Henrion, Dechaux et al. 1997)

A.2. Acción de los estrógenos sobre los mediadores de función endotelial.

Los estrógenos tienen efectos sobre estos factores, a través de diferentes posibles mecanismos:

A.2.a Efecto de los estrógenos sobre la biodisponibilidad de NO y función endotelial.

A.2.a.1. Estrógenos y función endotelial.

Se han utilizado modelos animales de experimentación para valorar el papel de los estrógenos sobre la función endotelial y la biodisponibilidad de NO. En ellos, tanto la exposición breve como prolongada a los estrógenos produce un aumento de la respuesta vasodilatadora a la acetilcolina (ACh) en arterias arterioescleróticas de monas cynomologus. (Williams, Adams et al. 1990),(Williams, Adams et al. 1992) De modo similar, la exposición prolongada a estrógenos preserva la vasodilatación dependiente de endotelio en cerdas con hipercolesterolemia. (Keaney, Shwaery et al. 1994)

En ratas espontáneamente hipertensas (SHR), las arteriolas de músculo gracilis aisladas y presurizadas procedentes de hembras intactas presentan una mayor respuesta vasodilatadora frente al shear-stress que las procedentes de machos y hembras ovariectomizadas. Por otra parte, el tratamiento de las ratas ovariectomizadas con Estradiol previene esta menor respuesta. (Gimenez, Garcia et al. 2006)

El NO parece ser el responsable del diferente efecto vasodilatador del shear-stress en función del estado hormonal, como se desprende de la igualdad en la respuesta entre los diferentes grupos tras la inhibición de su síntesis.(Huang, Sun et al. 1998),(Huang, Sun et al. 2000)

El hecho de que las mujeres tengan mejor función endotelial, hace que intuitivamente, pensemos que esa mejoría pueda estar ligada a las hormonas del sexo femenino. Por ejemplo, la dilatación mediada por flujo (FMD) de la arteria braquial es mayor en mujeres que en hombres, una diferencia asociada temporalmente con el incremento de la concentración de estradiol sérico que se produce durante el ciclo menstrual. De hecho, la diferencia en la FMD desaparece durante la fase menstrual, en la que los niveles séricos de estrógenos y progesterona son similares a los de los varones. (Hashimoto, Akishita et al. 1995)

Otros estudios realizados, muestran que en mujeres jóvenes sanas, la vasodilatación dependiente de endotelio en arteria braquial cambia de forma paralela a los cambios de los niveles plasmáticos de estradiol, (English, Jacobs et al. 1998) y se correlaciona con los niveles séricos de metabolitos de NO (nitritos y nitratos) y el NO exhalado. (Kawano, Motoyama et al. 1996)

Asimismo, la respuesta vasodilatadora a la bradiquinina en vasos de resistencia es máxima hacia la mitad del ciclo ovárico coincidiendo con los máximos niveles de estradiol plasmático. (Chan, MacAllister et al. 2001)

A.2.a.2. Deprivación estrogénica y función endotelial.

Los estudios realizados en pacientes con deprivación de estrógenos, apuntan en el mismo sentido que en el apartado anterior. De esta forma, mujeres jóvenes con fallo ovárico prematuro que tienen alterada la función endotelial, directamente vinculada a la deficiencia de esteroides sexuales, al ser tratadas durante 6 meses con Estradiol, restauran dicha función endotelial. (Kalantaridou, Naka et al. 2004)

La ovariectomía también crea un estado de deficiencia de estrógenos y, en estos pacientes, la vasodilatación dependiente del endotelio en el antebrazo también se atenúa. (Pinto, Virdis et al. 1997) Paralelamente, la respuesta vaso-constrictora del antebrazo a la inhibición de la síntesis de NO es mayor en mujeres premenopáusicas que en postmenopáusicas, siendo la respuesta de éstas últimas similar a la de los hombres. (Chambliss and Shaul 2002), (Majmudar, Robson et al. 2000)

Vistos los dos apartados anteriores, estos resultados proporcionan una base para sostener la tesis que las hormonas sexuales endógenas, en particular los estrógenos, juegan un papel importante en el mantenimiento de la función endotelial en mujeres sanas, deduciéndose una fuerte asociación entre los niveles endógenos de estrógenos y la biodisponibilidad de NO en la mujer.

A.2.a.3. Mecanismos que posibilitan el aumento de biodisponibilidad de NO secundario a los estrógenos.

1. Aumento de la expresión de la eNOS.

La Óxido Nítrico Sintasa endotelial (eNOS) es una enzima Ca^{+2} dependiente, que unida a la calmodulina activada por Ca^{+2} , convierte la L-Arginina en L-Citrulina, con la liberación de NO. (Vagnoni, Shaw et al. 1998)

Varios autores apoyan este primer mecanismo de acción. (Chen 2004) La exposición a E_2 de células endoteliales de vena umbilical humana, es capaz de promover en 8 horas un aumento de la síntesis de NO y de la expresión de la eNOS. (Hishikawa, Nakaki et al. 1995) (Rahimian, Chan et al. 2004) A su vez, la exposición prolongada a estrógenos se ha asociado con un aumento de la expresión de la eNOS. (Chambliss and Shaul 2002)

En ratas, la deficiencia prolongada de estrógenos por la ovariectomía se acompaña de una pérdida de dilatación arteriolar dependiente de endotelio en vasos cerebrales y de una disminución de la expresión de la eNOS. (Pelligrino, Ye et al. 2000)

En ratas castradas esta situación se agrava aún más, con incremento de respuesta vasoconstrictora tras fenómenos de isquemia-reperfusión, por una alteración en la biodisponibilidad de NO, probablemente derivada de la alteración endotelial. (Bianchi, Gumz et al. 2006)

2. Aumento de la actividad de la eNOS inducido por los estrógenos a través de una acción no genómica en la que están involucrados ER de membrana y citosólicos.

El efecto vasodilatador directo de 17β -Estradiol en estudios previos sólo se produce en concentraciones supra-fisiológicas (> 1 mmol/L). (Teoh, Leung et al. 1999) En condiciones fisiológicas, la concentración plasmática de 17β -Estradiol en seres humanos rara vez supera el rango nanomolar (aproximadamente 0.2-0.5 nmol/L en las mujeres premenopáusicas y aproximadamente 4-100 nmol/L durante el embarazo).

Sin embargo, se ha demostrado una respuesta fisiológica de 17β -Estradiol en el tono vasomotor en estudios con ratas ovariectomizadas. El tono miogénico de la arteria coronaria aumentó tras la ovariectomía y ese tono aumentado volvió a normalizarse tras suplementar a las ratas ovariectomizadas con niveles fisiológicos de 17β -Estradiol. (Huang, Sun et al. 1997)

En este mismo sentido, se estudió in vitro la reactividad vascular en presencia y en ausencia de una concentración de 17β -Estradiol. A concentraciones fisiológicas relevantes, 17β -Estradiol (1 nmol/L) empeoró la respuesta a diversos agentes contráctiles en anillos de coronarias porcinas desnudos de endotelio. (Keung, Vanhoutte et al. 2005)

Por otra parte, la aorta y la arteria mesentérica de ratas macho se contraían

en mayor medida que las de las ratas hembra. Las diferencias en las respuestas vasculares entre ratas macho y hembra, desaparecieron tras la exposición a corto plazo de las arterias mesentéricas aisladas a una concentración fisiológica de 17β -Estradiol, (Keung, Vanhoutte et al. 2005) lo que confirma más aún que los estrógenos proporcionan protección vascular a través de acciones directas sobre los vasos sanguíneos.

Estas acciones fisiológicas de 17β -Estradiol sobre la vasculatura ocurren rápidamente, ya que sólo la exposición a corto plazo (~ 30 min) es suficiente para que las arterias aisladas respondan con una mayor relajación vascular y se reduzca la contracción, en respuesta a agentes vasodilatadores endotelio-dependientes y vasoconstrictores, respectivamente. (Teoh and Man 2000) (Keung, Vanhoutte et al. 2005)

Se sospechaba que debía existir un mecanismo de acción no genómico, por tanto, y el interés en esta posible vía no genómica aumentó sustancialmente en 1997, cuando Lantin-Hermoso (Lantin-Hermoso, Rosenfeld et al. 1997) y Caulin-Glaser (Caulin-Glaser, Garcia-Cardena et al. 1997) publicaron que antagonistas relativamente específicos de los receptores estrogénicos podían inhibir la liberación de NO de células endoteliales cultivadas, expuestas a concentraciones fisiológicas de estrógenos.

Lantin-Hermoso describió que la actividad de la eNOS se incrementaba de

forma dosis-dependiente en los 5 primeros minutos tras la exposición de células endoteliales pulmonares de oveja a 17β -Estradiol. En sus estudios, la eliminación por completo del calcio iónico inhibió la actividad de eNOS estimulada por 17β -Estradiol, apoyando la hipótesis que 17β -Estradiol estimula de forma aguda la eNOS mediante el incremento del influjo de Ca^{+2} .

El antagonista del ER (ICI-182,780) inhibió totalmente la actividad de la eNOS estimulada por 17β -Estradiol. Así, Caulin-Glaser demostró un rápido aumento en la liberación de NO a partir de las células endoteliales de la vena umbilical humana de mujer en respuesta a 17β -Estradiol. De manera similar, otro antagonista de ER (ICI-164,384) inhibía este aumento de la liberación de NO en respuesta al 17β -Estradiol. (Caulin-Glaser, Garcia-Cardenas et al. 1997)

Estas observaciones sorprendentes sugirieron por primera vez que los factores de transcripción activados por ligando podían tener una segunda función, completamente nueva: la activación de fenómenos de transducción de señal que podrían culminar en la activación rápida de la eNOS.

En 1999, Chen mostró que el $\text{ER}\alpha$ podía mediar los efectos a corto plazo del estrógeno sobre la actividad de eNOS, aunque esta en discusión que pudieran intervenir otros tipos de receptores. (Chen, Yuhanna et al. 1999)

Así, 17β -Estradiol puede interactuar con el ER, activando diversas vías de señalización, (**Fig. 9**) que terminan por activar rápidamente la eNOS:

Activación de la PLC (Fosfolipasa), que lleva a la producción de IP_3 y a la liberación de los depósitos de Ca^{+2} intracelular. (Sobrino, Mata et al. 2009)

Vía de la MAPK (Protein Kinasa activada por Mitógeno), que finaliza en la fosforilación de la eNOS. (Masood, Roach et al. 2011)

Vía de la PI_3K /Akt (Fosfatidilinositol 3-kinasa-Akt). Haynes demostró que la PI_3 -kinasa era capaz de activar la Akt (proteína kinasa B, una serina/treonina kinasa que actúa tras la PI_3 -kinasa), que a su vez podría fosforilar directamente y activar la eNOS. (Haynes, Sinha et al. 2000) (Simoncini, Hafezi-Moghadam et al. 2000) L

Las distintas vías de señalización implicadas suponen una rápida activación de la eNOS, mediada por el $\text{ER}\alpha$, pero funcionando éste a través de una vía no genómica.

Queda por establecer el papel real del GPER, cuyo mecanismo de acción es a través de mecanismos no genómicos. Se ha encontrado, utilizando ligandos selectivos del GPER, que este receptor puede controlar el tono vascular de forma directa e indirecta mediante la producción de vasodilatación y la inhibición del crecimiento celular. En consecuencia, la inyección de un agonista del GPER (G-1) en ratas normo-

tensas se asoció con una marcada reducción en la presión arterial. (Revankar et al., 2005) (Feletou y Vanhoutte, 2006)

La velocidad de los cambios en el calcio intracelular del músculo liso vascular depende del lugar de aplicación del agonista, ya que los niveles de calcio se incrementan más rápidamente cuando el G-1 se aplica a nivel intracelular que cuando se aplica extracelularmente. (Haas et al., 2009) Estos datos hacen pensar que GPER de hecho es un receptor intracelular acoplado a proteína G, de acuerdo con su localización en el retículo endoplásmico. (Prossnitz et al., 2008) La estimulación aguda de las células vasculares del músculo liso con el agonista G-1 no induce cambios en ER α y ER β , pero sí aumenta la fosforilación de MAPK. (Haas et al., 2009) Estos efectos vasculares no se dieron en animales con deficiencia de GPER. Todos estos hallazgos son posiblemente relevantes en lo que se refiere a los efectos vasculares protectores de los estrógenos en los seres humanos, así como a la terapia hormonal.

En resumen, las vías de acción no genómica de los estrógenos, con la inmediata y subsiguiente activación de la eNOS y la liberación de NO, induce una rápida vasodilatación, dependiente del endotelio., al mismo tiempo que la inhibición de la proliferación vascular de células musculares lisas, de la adhesión de leucocitos, y de la agregación plaquetaria (Simoncini et al., 2000).

3. Un tercer mecanismo podría estar relacionado con el efecto de los estrógenos sobre especies reactivas de oxígeno (ROS).

La biodisponibilidad de Óxido Nítrico no viene sólo determinada por su producción; sino que además, es importante su inactivación. Esta inactivación se lleva a cabo, en gran medida, a través del secuestro de éste por especies reactivas de oxígeno (ROS) como el anión superóxido. (Chambliss and Shaul 2002)

Las ROS son moléculas de corta vida generadas como subproductos del metabolismo, que reaccionan rápidamente con los componentes celulares, causando daños a los lípidos de membrana, las proteínas y el ADN. (Droge 2002)

Las células endoteliales y de musculatura lisa pueden generar ROS en la mitocondria, durante el proceso de fosforilación oxidativa, a partir de la acción de la xantina oxidasa, las peroxidasas, la lipooxigenasa, la ciclooxigenasa, las isoformas de NOS, y NADPH oxidasas. (Griendling and FitzGerald 2003)

En este sentido, Wassmann y Baumer observaron en ratas hipertensas ovariectomizadas una alteración en la respuesta vasodilatadora de anillos de aorta, asociada a un incremento de producción de anión superóxido y a la expresión del receptor AT₁, sin que evidenciaran diferencias en la liberación de NO. (Wassmann, Baumer et al. 2001)

Por otra parte, en ratas hipertensas ovariectomizadas, se ha observado una mayor generación in vivo de anión superóxido en arteriolas mesentéricas, secundario al incremento de actividad de la NADPH oxidasa. (Bonacasa, Sanchez et al. 2008)

Los estrógenos poseen una acción antioxidante, llevada a cabo en parte mediante una disminución de la actividad de la NADPH oxidasa. En este sentido, se ha observado en cultivos de células endoteliales humanas que el E₂ modula la expresión de las distintas subunidades de la NADPH oxidasa y reduce en torno a un 50% su capacidad de generación de anión superóxido. (Wagner, Schroeter et al. 2001)

También se ha postulado una acción protectora del E₂ sobre los mecanismos de defensa celular contra ROS inducida por lesión, que incluyen un incremento de la Superóxido Dismutasa (SOD), Catalasa y Glutation peroxidasa (GPX), y scavengers no enzimáticos como el Glutation (GSH), Ácido ascórbico y carotenos. (Wassmann, Wassmann et al. 2004)

Otra de las posibles vías de acción antioxidante del E₂ puede ser a través de la inducción de una serie de los genes que codifican enzimas/proteínas desintoxicantes y antioxidantes, mediante el denominado **elemento de respuesta antioxidante (ARE)** o elemento de respuesta a electrófilo (EpRE) en las regiones reguladoras de los genes diana, como GST, NQO1, γ -synthetase

glutamylcysteine (GCS), tioredoxina reductasa, y heme oxigenasa-1 (HO-1), activado por el factor de transcripción Nrf2/ECH (NF-E2-Related Factor 2). (Siow, Li et al. 2007)

En resumen, los estrógenos pueden incrementar la biodisponibilidad del NO, bien incrementando la expresión de la eNOS mediante una vía genómica, también a través de diversas vías rápidas de señalización no genómica, a través de receptores estrogénicos de membrana o GPER. Un tercer mecanismo sería el papel antioxidante de los estrógenos, disminuyendo la degradación del NO secundaria a la presencia de ROS.

A.2.b. Efecto de los estrógenos sobre otros factores endoteliales.

A.2.b.1. Estrógenos y Prostaglandinas.

Algunos de los efectos vasculares de los estrógenos han sido atribuidos a una modificación en la síntesis o producción de prostanoides, tanto de acción vasodilatadora como vasoconstrictora.

Prostaglandinas vasodilatadoras.

Con respecto al primer grupo, se piensa que la contribución de la PgI₂ a la relajación endotelio-dependiente puede ser modulada por el estado hormonal. Algunas publicaciones han documentado una mayor producción de PgI₂ en células endoteliales y vasos sanguíneos de varias especies, incluyendo seres humanos, tras el tratamiento con estrógenos. (Geary, Krause et al. 2000) (Ospina, Krause et al. 2002) Esta elevación en los niveles de PgI₂ puede tener varios orígenes:

► Incremento de la expresión de la COX.

Más concretamente, parece que esta mejora es el resultado de una regulación positiva de prostaglandinas dilatadoras y de una regulación negativa de la prostaglandinas constrictoras, habiéndose observado como el tratamiento con estrógenos aumenta la vasodilatación mediada por prostanoides en la arteria cerebral media aislada de ratas hembra castradas, mientras que en la ausencia de estrógeno, el ácido araquidónico se convierte de forma activa en un constrictor COX-1-dependiente. (Ospina, Krause et al. 2002)

► Incremento de la expresión de la PgI₂ sintasa.

En las arterias de oveja, se ha observado una elevación estrógeno-específica de la expresión de la PgI₂ sintasa. (Rupnow, Phernetton et al. 2002)

► Up-regulation de la síntesis de prostaglandinas en respuesta a una ausencia de bioactividad de NO.

Algunos estudios no dan ningún papel protagonista a la COX y las prostaglandinas en la mejora de la relajación dependiente del endotelio inducida por estrógenos, sino más bien proponen un incremento en la participación de Prostaglandinas vasodilatadoras en situaciones de deficiencia de NO. (Huang, Sun et al. 2004)

Este diálogo entre las vías de la NOS y las de la COX también se piensa que es modulado por los estrógenos. En arterias cerebrales de ratón de los animales tratados crónicamente con un inhibidor de la NOS o ratones transgénicos con disrupción del gen de la eNOS, el tratamiento in vivo con estrógenos aumenta los niveles de expresión vascular de COX-1 y la producción de PgI₂. (Li, Geary et al. 2004)

Otros estudios en ratas castradas muestran que la pérdida de estrógeno se asocia con una disminución en el componente de NO de la vasodilatación dependiente del endotelio y una up-regulation del componente de la COX. (Li, Geary et al. 2004) Estos resultados se apoyan también en el hecho que el tratamiento con estrógenos ha demostrado producir una aparente regulación

al alza del componente de NO de la relajación dependiente del endotelio y una depresión concomitante del componente del producto de la COX. (Case and Davison 1999)

Sin embargo, la influencia de otras hormonas sexuales sobre la bioactividad de las Pgl_2 es todavía algo confusa. Por ejemplo, la progesterona ejerce un efecto directo relajante sobre la aorta de rata, que implica la activación de la COX y aumento de producción de Pgl_2 . (Selles, Polini et al. 2002) Tanto la progesterona como el acetato de medroxiprogesterona incrementan la producción de Pgl_2 por medio de una vía dependiente de receptor mediante el aumento de la expresión y actividad de la COX-1 y COX-2 en células endoteliales de la vena umbilical humana (HUVEC). (Hermenegildo, Oviedo et al. 2005) Sin embargo, la administración concomitante de progesterona con el estrógeno previene los efectos estimuladores del estrógeno sobre la Pgl_2 en cultivos de HUVEC. (Mikkola, Viinikka et al. 2000)

Prostaglandinas vasoconstrictoras.

El E_2 también puede ejercer un papel regulador sobre prostaglandinas vasoconstrictoras. La ovariectomía aumenta la respuesta vascular a Noradrenalina (NA) y disminuye la vasodilatación debida a Acetilcolina (ACh). Estas respuestas alteradas mejoran tanto con E_2 como con la inhibición de COX y con el antagonismo de los receptores de Tromboxano A_2 , (Dantas, Scivoletto et al. 1999) lo que podría indicar la implicación de prostanoídes vasoconstrictores en la disfunción

vascular asociada a la deficiencia estrogénica. Sin embargo, recientemente Sobrino et al describen que el Estradiol potencia la vía de Prostaglandinas vasodiladoras en HUVEC, sin afectación de la producción de TXA_2 , a través del $\text{ER}\alpha$. (Sobrino, Oviedo et al. 2010)

A.2.b.2. Estrógenos y Monóxido de carbono (CO).

La producción endotelial de CO mediada por hemoxigenasa-2 también puede estar influenciada por los estrógenos. (Orshal and Khalil 2004) En este sentido se ha descrito que el E_2 induce un aumento en la producción intracelular de CO y de la expresión de hemoxigenasa-2 en células endoteliales de vena umbilical y arteria uterina humanas. (Tschugguel, Stonek et al. 2001)

A.2.b.3. Estrógenos y Factor Hiperpolarizante Derivado del Endotelio (EDHF).

La mayor respuesta vasodilatadora dependiente del endotelio observada en ratas hembras con respecto a los machos podría estar relacionada con una regulación por parte de los estrógenos sobre el EDHF. Así se ha demostrado una reducción en la relajación e hiperpolarización (que se previene con bloqueantes de canales de K^+) inducida por ACh en arterias mesentéricas de ratas ovariectomizadas que se mejora con el tratamiento con E_2 . (Liu, Hattori et al. 2001) (Sakuma, Liu et

al. 2002)

Un creciente cuerpo de evidencia apoya la tesis de que el EDHF tiene una up-regulation en las mujeres por encima de los varones. (Chataigneau and Schini-Kerth 2005)

El desarrollo de un ratón doble knock-out (dKO) para eNOS y COX-1 o "EDHF Mouse", (Scotland, Madhani et al. 2005) ha permitido estudiar las diferencias entre sexos, ya que se pudo objetivar que mientras los machos eran marcadamente hipertensos, las hembras no lo eran.

Por otra parte, el examen de las arterias de resistencia de estos animales demostró con claridad que, si bien el NO y la PGI₂ son los vasodilatadores endotelio-dependientes predominantes en las arterias aisladas de los machos, en los vasos de la hembra esta respuesta se debe principalmente a EDHF. (Scotland, Madhani et al. 2005)

El aumento del componente del EDHF de la respuesta vasodilatadora en hembras ante el estímulo endotelio-dependiente, incluyendo shear stress, ACh y bradikina se ha demostrado en varias arterias de distintas especies. (Perregaux, Chaudhuri et al. 1999) (Pak, Geary et al. 2002) (Scotland, Madhani et al. 2005)

Este efecto de sexo se cree que es debido a la actividad de los estrógenos. De hecho, la respuesta del EDHF se reduce durante el diestro, un período de niveles relativamente bajos de estrógeno, (Liu, Hattori et al. 2001) y es muy elevada durante el embarazo, cuando los niveles de

estrógenos son muy altos. (Gerber, Anwar et al. 1998) Además, las respuestas del EDHF inducidas por ACh, (Liu, Hattori et al. 2001) shear stress, (Huang, Wu et al. 2001) ADP e ionóforo del Ca⁺² (Liu, Hattori et al. 2002) son reducidas por la ovariectomía, un efecto que se invierte por el tratamiento con 17β-Estradiol. (Liu, Hattori et al. 2001) (Liu, Hattori et al. 2002)

Ya que EDHF juega un papel más importante en la relajación endotelio-dependiente de las arterias de resistencia que en las grandes arterias, (Nishikawa, Stepp et al. 2000) los resultados en los ratones dKO muestran que la regulación de EDHF inducida por el estrógeno puede ser crítica en la determinación de la resistencia periférica en las mujeres y por lo tanto, la presión arterial.

Por otra parte, algunos estudios han mostrado un efecto inhibitorio de los estrógenos en el EDHF, aunque esto parece ocurrir sobre todo dentro de las arterias cerebrales. La respuesta del EDHF en arteria cerebral media aislada de rata se reduce en hembras y en hembras ovariectomizadas tratadas con estrógeno, en comparación con las ratas macho y hembras ovariectomizadas tratadas con vehículo. (Golding and Kepler 2001) En los estudios in vivo de arteriolas de piamadre en ratas hembras, ratas ovariectomizadas y ratas ovariectomizadas con terapia sustitutiva con estrógenos, se llegó a la misma conclusión, que el estrógeno regulaba a la baja el EDHF. (Xu, Santizo et al. 2001)

El mecanismo que subyace a la up-regulation mediada por estrógeno de la bioactividad del EDHF requiere más estudios. Hay resultados que sugieren que el tratamiento de las ratas ovariectomizadas con 17 β -Estradiol aumenta la expresión de la proteínas conexina específicas (conexinas 40 y 43) que forman gap junctions mioendoteliales (Liu, Hattori et al. 2002) y se ha sugerido que desempeñan un papel clave en la hiperpolarización del músculo liso mediada por el EDHF. (Sandow and Hill 2000) Además, el estrógeno aumenta la transcripción del Péptido Natriurético tipo C (CNP) en el útero de ratón (Acuff, Huang et al. 1997) y la relajación ante CNP en la arteria coronaria porcina en hembras es mayor que en los machos. (Barber, Burnett et al. 1998)

Se ha sugerido que CNP actúa como EDHF en la circulación mesentérica y coronaria, (Chauhan, Nilsson et al. 2003) por lo que es posible que un aumento de la liberación o de la actividad de CNP pueda resultar en una mayor actividad de EDHF en las mujeres. Además, las respuestas mediadas por EDHF se asocian a la apertura de canales K_{Ca} y el tratamiento de perros con estrógenos mejora la vasodilatación coronaria mediada por la activación de dichos canales. (Node, Kitakaze et al. 1997)

A.2.b.4. Estrógenos y Endotelina-1.

Otro factor vasoactivo de origen endotelial sobre el que los estrógenos parecen desempeñar un papel importante en su regulación es la Endotelina-1 (ET-1). La ET-1 puede activar los receptores endoteliales ET_{B1}, que median la liberación de factores vasorrelajantes. Pero también puede activar los receptores ET_A y ET_{B2} en la célula de músculo liso vascular (VSM) causando vasoconstricción. (Smiley and Khalil 2009)

La ovariectomía en ratas hipertensas-DOCA hembras se ha asociado al incremento de ET-1 y RNAm para el receptor ET_{B2} en arterias mesentéricas, siendo estos efectos revertidos con tratamiento sustitutivo con E₂. (David, Carvalho et al. 2001)

Se ha descrito que E₂ disminuye la expresión de los receptores ET_B de Endotelina-1 y su acción vasoconstrictora. (Tostes, Nigro et al. 2003) Asimismo, el tratamiento con E₂ y acetato de noretisterona o con el SERM raloxifeno, produce una disminución de los niveles plasmáticos de ET-1 en mujeres postmenopáusicas. (Saitta, Altavilla et al. 2001)

En resumen, Estradiol modula la expresión y la liberación de ET-1 por parte de las células endoteliales. (Woodman and Boujaoude 2004)

B. Efecto de los estrógenos sobre las células musculares lisas vasculares (VSM).

Además del efecto indirecto de los estrógenos sobre el tono vascular a través de la modulación de factores vasoconstrictores/vasodilatadores, los estrógenos pueden actuar directamente sobre células vasculares musculares lisas y modular el tono de las mismas.

Se ha descrito que inducen la relajación en anillos vasculares desprovistos de endotelio, lo que sugiere un efecto directo sobre los mecanismos contráctiles de las células de musculatura lisa vascular (VSM). (Orshal and Khalil 2004)

También se han demostrado efectos de los estrógenos sobre la proliferación de células VSM tras lesiones vasculares, a través de ER α y ER β . Se ha sugerido que el metabolismo local de E₂ a 2- y 4-OH-E₂, con escasa afinidad por los ER pudiera mediar los efectos anti-mitogénicos del E₂ sobre las células VSM.

Hay mecanismos similares a los anteriormente estudiados en endotelio que parecen explicar el efecto relajante directo de los esteroides en el músculo liso vascular.

Estos mecanismos están resumidos en la Fig 9.

Fig 9. Modelo integrativo de los mecanismos descritos en la vía de señalización estrogénica no genómica sobre célula endotelial y célula de la musculatura lisa vascular.

Los estrógenos se unen a los distintos ER en la membrana citoplasmática y activan la Fosfolipasa C (PLC), que lleva a la producción de IP₃ y a la liberación de Ca⁺² de los depósitos intracelulares y activa inicialmente la eNOS, que se disocia de la caveolina-1.

También pueden los estrógenos iniciar la transformación del Fosfatidilinositol-4,5-bisfosfato (PIP₂) en Fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfato (PIP₃), que activa la AKT y secundariamente la fosforilación de la eNOS en el citosol, translocándose de nuevo a la membrana celular donde se somete a miristoilación y palmitoilación.

Esta fosforilación puede incrementarse mediante la activación de la Proteín Kinasa Activada por Mitógenos (MAPK) y la Proteín Kinasa dependiente de AMP_c (PKA).

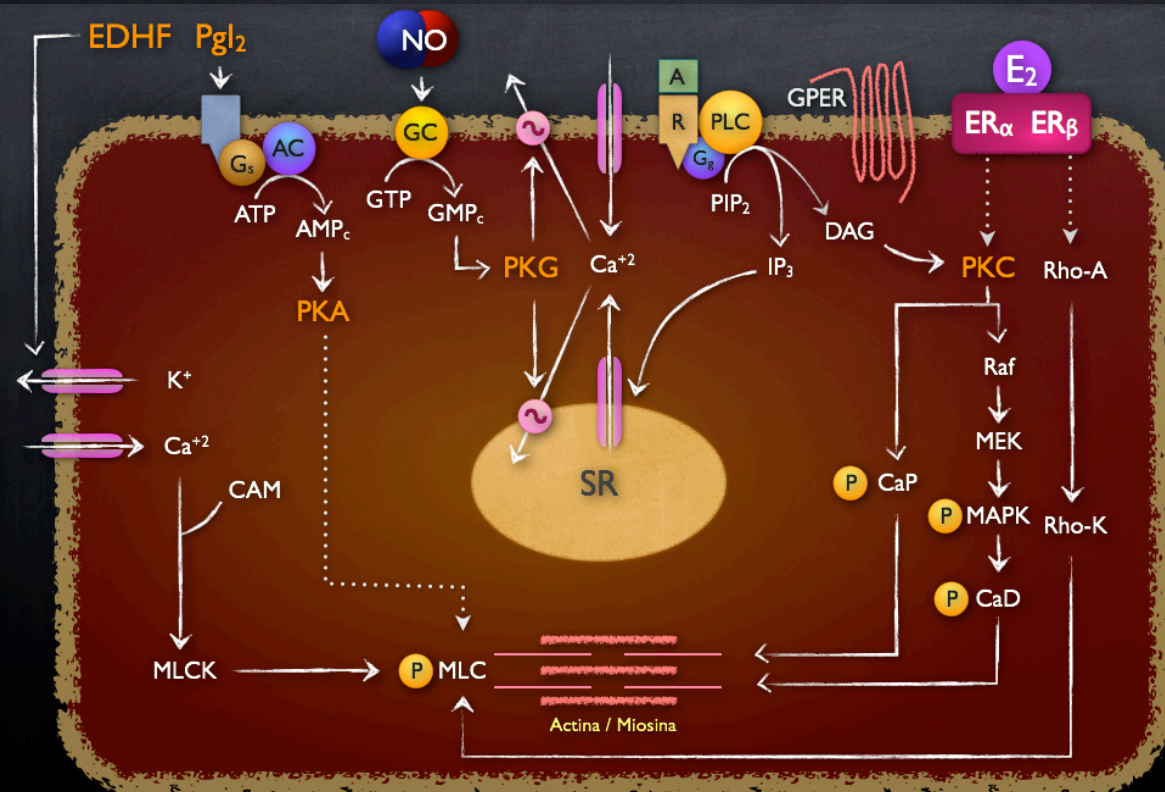
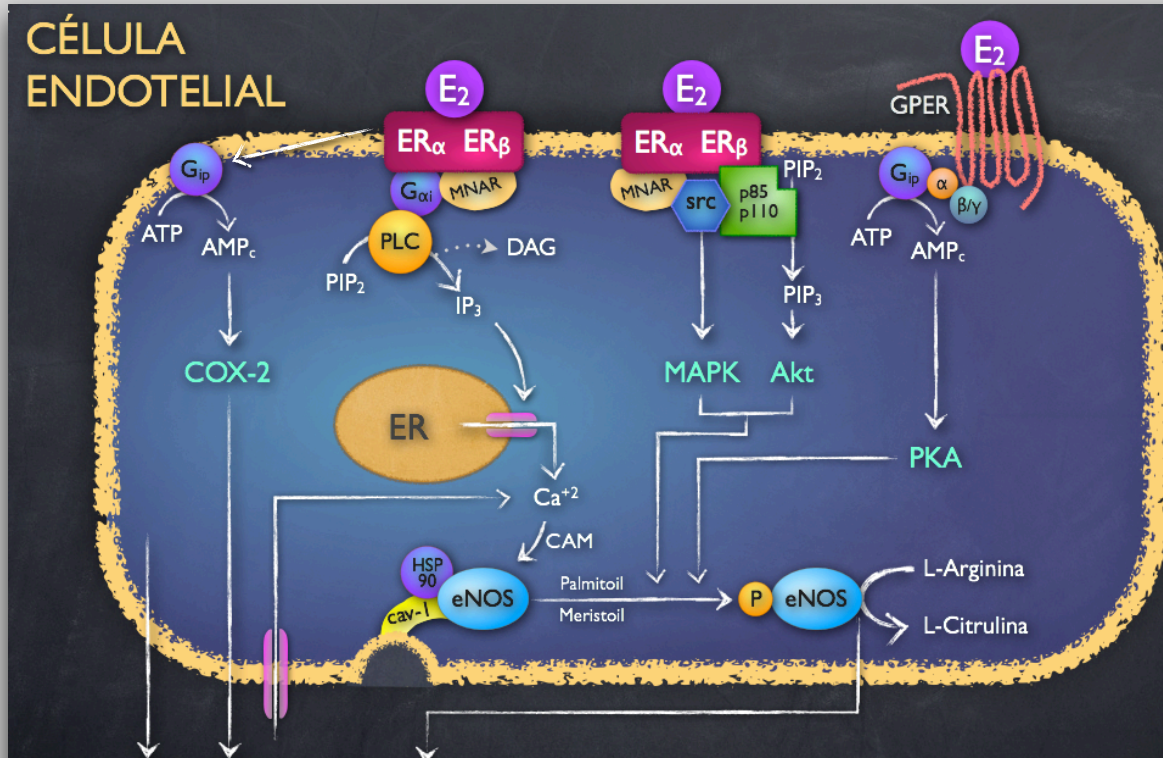
La eNOS activada transforma la L-Arginina en L-Citrulina, dando lugar a un aumento de la producción de NO.

La liberación de NO a partir del endotelio activa en la célula de la musculatura lisa vascular (VSM) la Proteín Kinasa dependiente de GMP_c (PKG) que a su vez disminuye la concentración de Ca⁺² intracelular, mediante la extrusión de Ca⁺² y la activación de bombas de Ca⁺².

Los estrógenos también activan la COX-2, con el consiguiente aumento de la PgI₂. La PgI₂ incrementa el AMP_c en VSM, causando una disminución en la concentración de Ca⁺² intracelular por mecanismos similares a los de GMP_c. De la misma manera, también aumenta la liberación de EDHF, lo que lleva a la hiperpolarización de la VSM y a la relajación de la misma.

También pueden inhibir la entrada de Ca⁺², la PKC, la Rho-kinasa, MAPK y otras vías de contracción de la VSM. Las flechas intermitentes indican inhibición.

Modificado de Masood, DE. (2011)

CÉLULA
ENDOTELIALCÉLULA
MÚSCULO LISO VASCULAR

B.1. Acción mediada por endotelio.

La liberación por parte del endotelio de los factores descritos previamente en el epígrafe A, inducirá diversas acciones en la célula de músculo liso vascular, a través del **incremento de los niveles de AMP_c y/o GMP_c**, estimulados por PGI₂ y NO, respectivamente, y actuando como segundos mensajeros sobre distintas Protein Kinases, según se puede apreciar en la **Fig 9**.

- ▶ PKA (Protein Kinase A). Estimulada básicamente por AMP_c resultante de la acción de la PGI₂ producida en endotelio. El efecto relajante del E₂ se correlaciona con los niveles de AMP_c vascular. (Farhat, Abi-Younes et al. 1996)
- ▶ PKG (Protein Kinase G). Actúa gracias al GMP_c producido por la acción del NO sobre la Guanilato Ciclasa (GC). Su mecanismo de acción está basado en la acción sobre los depósitos de Ca⁺² intracelular, disminuyéndolos mediante la activación de bombas de Ca⁺², que favorecen su extrusión o lo devuelven al retículo endoplásmico. Puede estar también activada por AMP_c, (Eckly-Michel, Martin et al. 1997) por lo que hay una interrelación entre ambas vías. (Keung, Vanhoutte et al. 2005)

Por otra parte, se postula que el incremento de AMP_c podría inhibir también la fosforilación de las cadenas ligeras de miosina (MLC). (Khalil 2011)

B.2. Acción directa sobre la VSM.

B.2.a. Efectos sobre los canales de iones.

Entre los efectos directos de los estrógenos sobre las fibras musculares lisas destaca la regulación del Ca⁺² intracelular, postulándose diversos mecanismos:

Uno de los mecanismos descritos es la **regulación del número y/o permeabilidad de los canales de Ca⁺² de la membrana plasmática**.

Las fibras musculares aisladas de aorta torácica de ratas ovariectomizadas presentan una longitud menor junto a una concentración de Ca⁺² intracelular mayor que las fibras musculares aisladas de ratas intactas. Sin embargo, estas diferencias no se observan entre las ratas intactas y las ratas ovariectomizadas suplementadas con E₂. (Murphy and Khalil 2000)

La despolarización de la membrana mediada por altas concentraciones de Cloruro Potásico (ClK) estimula el paso de Ca⁺² extracelular a través de canales operados por voltaje. La contracción de las células VSM inducida por ClK es menor en ratas hembras intactas que en machos o hembras castradas. El mismo efecto se da ante la administración de PE. Probablemente estos efectos de disminución de la vasoconstricción se deban a efectos a largo plazo de los estrógenos sobre la expresión y permeabilidad de los canales de Ca⁺² operados por voltaje. (Crews and Khalil 1999)

El E₂ induce relajación en vasos contraídos previamente con dosis elevadas de

CIK en arteria coronaria, e inhibe el paso de influjo de Ca^{+2} inducido por $\text{PgF}_{2\alpha}$ y CIK a dosis altas, lo que sugiere la inhibición de la contracción de las células VSM mediante la inhibición de la entrada de Ca^{+2} . (Crews and Khalil 1999)

Otro efecto que podrían mediar los estrógenos es el aumento de la salida de Ca^{+2} de la célula por medio de la **activación de una bomba de calcio de membrana**, si bien la importancia relativa de este mecanismo en la acción de los estrógenos sobre la concentración de calcio intracelular parece ser menos importante. (Prakash, Togaibayeva et al. 1999) (Orshal and Khalil 2004)

Los niveles de Ca^{+2} intracelular se encuentran disminuidos en mayor medida en células VSM de aorta de ratas espontáneamente hipertensas (SHR) castradas con tratamiento estrogénico frente a machos o a hembras castradas, lo que sugiere un mayor efecto protector de los estrógenos en estados de hipertensión. (Murphy and Khalil 2000)

Por otra parte, los estrógenos también pueden modificar la concentración extracelular de K^{+} mediante acciones directas sobre las fibras musculares lisas vasculares, **activando los canales de potasio dependientes de calcio**. Esta situación llevaría a una hiperpolarización de la membrana junto con una reducción de la entrada de Ca^{+2} por los canales regulados por voltaje. (White, Darkow et al. 1995) (Kleppisch and Nelson 1995)

La relajación arterial provocada por concentraciones suprafisiológicas de 17β -Es-

tradiol se asocia con la salida de iones de K^{+} y se ha revertido por los inhibidores de la activación de los canales de K^{+} en las células de músculo liso. (Tsang, Yao et al. 2003)

En cualquier caso, se ha observado una disminución del influjo de Ca^{+2} a la célula en ausencia de la activación de la salida de K^{+} , lo que sugiere una mayor importancia del efecto directo de los estrógenos sobre los canales de Ca^{+2} . (Salom, Burguete et al. 2001)

B.2.b. Acción sobre Protein Kinasa C (PKC).

La Proteín Kinasa C (PKC) agrupa una familia de isoformas dependientes e independientes del Ca^{+2} , que se expresa en una proporción variable sobre diferentes lechos vasculares. Durante la activación de las células VSM, ciertas isoformas de PKC se traslocan a la superficie celular, y activan una cascada de señalización que potencia la sensibilidad de los miofilamentos al Ca^{+2} y promueve la contracción de la musculatura lisa. (Salamanca and Khalil 2005)

Se ha propuesto que los estrógenos pueden tener un efecto potencial en la expresión o actividad de la PKC, puesto que su expresión está reducida en las células VSM de aorta de ratas hembras intactas frente a machos o ratas castradas sin THS. (Kanashiro and Khalil 2001)

B.2.c. Acción sobre Rho-Kinasas.

Se conoce la Rho-kinasa por su papel en la inhibición de la kinasa de las cadenas ligeras de miosina (MLC) y en la potenciación de la sensibilidad de los miofilamentos al Ca^{+2} intracelular, y su incremento le confiere un papel importante en la ECV, puesto que se encuentra incrementada tanto en la arterioesclerosis como en el fenómeno de vasoespasmo. (Hiroki, Fukumoto et al. 2004)

Los estrógenos pueden participar de la inhibición de su expresión o actividad. La expresión del ARNm de la Rho-kinasa está disminuida en cultivos de células VSM tratadas con E_2 . (Shimokawa and Takeshita 2005)

B.3. Remodelado vascular.

El crecimiento acelerado de las células musculares lisas vasculares puede explicar parte de la elevación de las resistencias periféricas totales característica de la hipertensión arterial.

Al proceso activo por el que se producen cambios en la proliferación, crecimiento, muerte y migración de las células de la pared vascular, así como alteraciones de la matriz extracelular se denomina **remodelado vascular**. (Gibbons and Dzau 1994)

Los estudios in vivo que utilizan varios modelos como la lesión vascular y la arteriosclerosis inducida por hipercolesterolemia, ponen de manifiesto el efecto

preventivo que ejerce el E_2 sobre el remodelado vascular. (Chambliss and Shaul 2002)

Sin embargo, este efecto es complejo, y así nuestro grupo ha descrito que el tratamiento con E_2 previene el remodelado vascular asociado a la ovariectomía en las ratas SHR sólo en estadios tempranos del desarrollo de la hipertensión, sin afectar al remodelado asociado a la ovariectomía en estadios más tardíos. (Garcia, Gimenez et al. 2005)

El E_2 puede prevenir el remodelado vascular al actuar sobre los componentes moleculares y celulares involucrados en el mismo. De este modo, protege frente al daño endotelial, bloquea la inflamación vascular, disminuye la expresión de moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1) en los sitios de lesión, inhibe la formación de neoíntima, previene el desarrollo de arteriosclerosis y la proliferación de fibras musculares lisas vasculares. (Tostes, Nigro et al. 2003) (Liu, Iwai et al. 2002) (Chambliss and Shaul 2002)

C. Interacción de los estrógenos sobre el Sistema Renina-Angiotensina (SRA)

Uno de los aspectos más interesantes en la acción estrogénica es aquel que se refiere a la compleja interacción con el Sistema Renina-Angiotensina (SRA), uno de los reguladores principales de la presión sanguínea y del balance hidrosalino. El aumento de la actividad del SRA contribuye a la retención de volumen y al aumento de la presión arterial. (Dvorkin and Cardinali 2003)

Los efectos de los estrógenos sobre el SRA se producen sobre varios de los componentes del mismo, destacando entre estos la Renina, el Angiotensinógeno, la Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA) y los receptores de Angiotensina II.

C.1. Estrógenos y Renina.

En relación al efecto de los estrógenos sobre los niveles y la Actividad Plasmática de Renina, en la bibliografía existen datos muy dispares. (Tostes, Nigro et al. 2003) (Brosnihan, Senanayake et al. 1999)

En ratas hipertensas tratadas con estrógenos se produce un aumento de la Actividad Plasmática de la Renina (Brosnihan, Senanayake et al. 1999) y la ovariectomía en ratas espontáneamente hipertensas, induce un descenso de los niveles de ARNm de Renina a nivel renal. (Chen, Naftilan et al. 1992) Sin embargo, otros autores defienden lo contrario. (Xu, Xiao et al. 2008)

Durante el ciclo ovárico, los niveles de Prorenina (precursor de la renina) aumentan de forma paralela a los niveles plasmáticos de Estradiol (durante la fase folicular); si bien la Actividad Plasmática de Renina no aumenta hasta que no lo hacen los niveles plasmáticos tanto de estrógenos como de progesterona (fase lútea). (Sealey, Cholest et al. 1987)

En las mujeres gestantes se produce un aumento de los niveles plasmáticos de Renina que se correlaciona con los niveles de estrógenos. (Brosnihan, Senanayake et al. 1999)

Por contra, otros autores han descrito un menor nivel circulante de Renina en las mujeres premenopáusicas con respecto a las postmenopáusicas, disminuyendo los niveles en éstas por la THS. (Tostes, Nigro et al. 2003)

C.2. Estrógenos y Angiotensinógeno.

Los resultados descritos en la bibliografía acerca del efecto de los estrógenos sobre los niveles de Angiotensinógeno son más uniformes.

El tratamiento con Estradiol induce un aumento de los niveles de Angiotensinógeno en las mujeres menopáusicas normo e hipertensas, pese a que no se acompañe de cambios paralelos en los niveles de Angiotensina II. (Jespersen, Arnung et al. 1983)

Los anticonceptivos orales producen un aumento de los niveles de Angiotensinógeno. (Oelkers 1996) Durante la gestación, los estrógenos estimulan la síntesis hepática de Angiotensinógeno, cuyos niveles plasmáticos aumentan paralelamente a los de estrógenos. (Oelkers 1996) A lo largo del ciclo ovárico, los niveles de Angiotensinógeno aumentan durante la fase folicular paralelamente al incremento de los niveles de estrógenos. (Sealey, Cholst et al. 1987)

C.3. Estrógenos y Enzima Convertidora de Angiotensina (ECA).

En modelos animales se ha estudiado la relación e interacción entre estrógenos y SRA, obteniendo interesantes resultados. Uno de los experimentos más completos en este sentido fue el realizado por Brosnihan y colaboradores en monas arterioscleróticas ovariectomizadas. (Brosnihan, Weddle et al. 1997) En éstas se produce un aumento de la Actividad Plasmática de Renina y de los niveles de Angiotensina I tras 30 meses de tratamiento con estrógenos conjugados equinos. Sin embargo, estos cambios no se reflejan en un incremento de la presión arterial. La explicación reside en la reducción de la actividad de la ECA tras el tratamiento con estrógenos. Además, este hecho permite explicar que los niveles de Angiotensina II se mantuviesen dentro de los límites normales, pese al aumento de la actividad de Renina. Otro apoyo experimental en favor de la regulación de la actividad de la ECA por los estrógenos es el realizado en ratas transgénicas (en las que se incorpora al genoma el gen *mRen-2*) que se caracterizan por presentar niveles

plasmáticos de Renina elevados. El tratamiento con Estradiol a estas ratas tras la ovariectomía, produce una disminución de la actividad plasmática de la ECA y de los niveles plasmáticos de Angiotensina II que se acompañan de una atenuación del desarrollo de la hipertensión. (Chappell, Gallagher et al. 2003)

Estos efectos de los estrógenos sobre la actividad de la ECA han sido corroborados en humanos tras la observación de que la terapia con estrógenos conjugados equinos se acompaña de una disminución de la actividad de la ECA correlacionada con el aumento de la respuesta vasodilatadora a la hiperemia reactiva. (Tostes, Nigro et al. 2003)

C.4. Estrógenos y receptores de Angiotensina II.

Conjuntamente al efecto sobre la ECA, los estrógenos pueden modular la acción de la Angiotensina II por medio de la regulación que ejercen sobre sus receptores.

En este sentido, la deficiencia estrogénica se acompaña de un aumento de la sensibilidad a la Angiotensina II, mayores niveles de ARN_m de AT_1 y mayor expresión de $AT-I$. Estos efectos se previnieron por la terapia sustitutiva con Estradiol. (Nickenig, Baumer et al. 1998) (Nickenig, Strehlow et al. 2000) (Tostes, Nigro et al. 2003)

También se ha descrito una reducción de la expresión de los receptores AT_2 en ratas ovariectomizadas que se previene igualmente con Estradiol, (Tostes, Nigro et al. 2003) (Armando, Jezova et al. 2002)

así como una mayor relación en la expresión de receptores AT_1/AT_2 en los machos que en las hembras. (Silva-Antonialli, Tostes et al. 2004)

En la siguiente figura (**Fig 10**) se resumen los principales efectos de los estrógenos sobre el SRA.

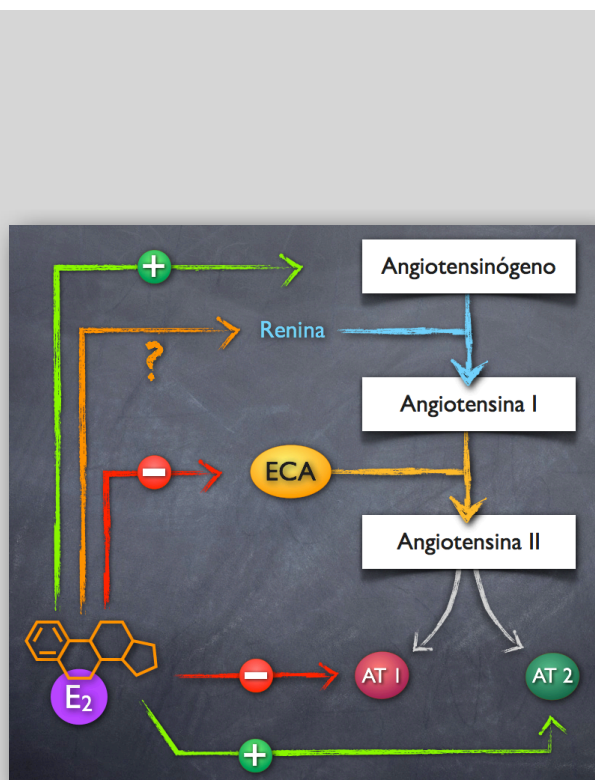


Fig 10. Efecto de los Estrógenos sobre el SRA.

C.5. Estrógenos y IECA - Antagonistas del receptor $AT_1/2$

A pesar del conocimiento alcanzado, todavía quedan cuestiones en esta compleja interacción entre estrógenos y el SRA. Diversos estudios muestran un mayor efecto de la inhibición de la ECA o del antagonismo de los receptores AT_1 sobre la presión arterial en las mujeres o en hembras con respecto a hombres o machos. En este sentido, se ha observado un mayor efecto hipotensor de una combinación de un inhibidor de la ECA y un diurético en las mujeres que en los hombres. (Safar, Myers et al. 2002) En otro estudio realizado en ratas SHR, la inhibición aguda o crónica de la ECA con Enalapril induce una disminución de los niveles de presión sanguínea hacia niveles normotensos en un 70% de las hembras, frente al 45% en el caso de los machos. (Nigro, Fortes et al. 1997) Del mismo modo, el antagonismo de los receptores AT_1 con Losartan produce un descenso de la presión arterial a niveles normotensos en un 100% de las hembras frente al 50% en el caso de los machos. (Silva-Antonialli, Fortes et al. 2000)

Además de la influencia del sexo en la respuesta a los inhibidores de la enzima convertidora de angiotensina (IECA) y antagonistas de receptores AT_1 , también se ha descrito una interacción entre la administración exógena de estrógenos y estos agentes.

En mujeres postmenopáusicas, una dosis de Enalapril que no presenta efecto hipotensor tras 14 días de tratamiento produce una reducción de presión en las muje-

res sometidas a THS con Estradiol y Drospirinona. (Preston, Alonso et al. 2002) Además, en ratas SHR, la administración de E₂ potencia el efecto hipotensor del Captopril de forma aguda y crónica. (Garcia, Gimenez et al. 2006)

En ratones, el Estradiol potencia el efecto protector del antagonista de receptores AT₁, Olmesartan, sobre la respuesta al daño vascular. (Liu, Iwai et al. 2002) Sin embargo, y en contraposición a estos resultados, también se ha descrito una incidencia nula de la THS o de la administración exógena de estrógenos sobre el efecto de los IECA, tanto en mujeres postmenopáusicas como en ratas SHR. (Blacher, Raison et al. 1998) (Grady, Herrington et al. 2002)

Otra de las posibilidades que podrían mediar parte de la acción de los antagonistas AT₁ sería un aumento de la acción de la Angiotensina II a través de sus receptores AT₂, promoviendo una cascada que involucra a la Bradiquinina, NO y GMP_c. (Carey, Wang et al. 2000) También se ha descrito que el antagonismo de los receptores AT₁ pone de manifiesto un efecto hipotensor de la Angiotensina II y un aumento de la vasodilatación mediados por receptores AT₂. (Li and Widdop 2004)

El papel que desempeñan tanto el NO como la Bradiquinina en la acción de los agentes terapéuticos que actúan sobre la ECA podría explicar los resultados que apuntan a una mayor efectividad de estos fármacos facilitada por los estrógenos.

Esta es una cuestión interesante, debido a que la Asociación Americana del Corazón (AHA) aconseja el tratamiento con IECA como fármaco de elección en mujeres con riesgo de ECV. (Mosca, Appel et al. 2004)

Cabe resaltar que los estrógenos, además de aumentar la biodisponibilidad de NO, (Chambliss and Shaul 2002) parecen favorecer la acción de la Bradiquinina. (Madeddu, Emanuelli et al. 1997) (Sumino, Ichikawa et al. 1999)

Esto podría explicar una modulación de la acción de los IECA y/o de los antagonistas de los receptores AT₁ por parte de los estrógenos.

IV

TERAPIA HORMONAL SUSTITUTIVA Y RIESGO DE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

Los primeros estudios experimentales y clínicos acerca del papel protector de los estrógenos, y por ende de la terapia hormonal sustitutiva (THS), abrían unas inmejorables expectativas acerca del efecto beneficioso que ejercían dichas hormonas sobre la salud cardiovascular de la mujer postmenopáusica, ya que existe un importante cuerpo de evidencia que demuestra los efectos beneficiosos de los estrógenos sobre la función endotelial y vascular.

El **Nurses' Health Study (NHS)** fue pionero en plantear el efecto beneficioso de la THS. Se trataba de un estudio observacional de más de 120.000 mujeres. Estas mujeres respondieron a cuestionarios desde 1976 a 1990 acerca del uso de hormonas, su historia médica y los factores de riesgo cardiovascular (altura, peso, tabaquismo, y otros). En el análisis de estos datos se encontró un importante efecto protector de la THS en mujeres que utilizaban estrógenos solos o en combinación con gestágenos. (Stampfer, Colditz et al. 1991) Sin embargo, como el NHS fue un estudio observacional, existía la preocupación de que los beneficios observados pudieran haber sido exagerados, en parte porque las mujeres que utilizaban THS pudieran tener mejor estado de salud basal que las mujeres que no lo usaban. Otros sesgos en la población de mujeres que participaron en el NHS limitaba la aplicabilidad de los resultados a toda

la población. En general, las asociaciones podían ser descubiertas a partir de estudios observacionales, pero la causalidad no podía ser establecida con una evidencia científica.

Diversos estudios básicos y traslacionales avalaron estos resultados, haciendo incapie en el efecto beneficioso de los estrógenos sobre la función endotelial. Así en mujeres postmenopáusicas y animales hembra ovariectomizados (Pinto, Virdis et al. 1997), (Lieberman, Gerhard et al. 1994) se ha demostrado que la administración de estrógenos mejora la vasodilatación dependiente del endotelio inducida por vasodilatadores o por flujo. (Hashimoto, Akishita et al. 1995) (Chan, MacAllister et al. 2001) (Kalantaridou, Naka et al. 2004)

Del mismo modo, la disfunción endotelial en mujeres que sufren menopausia en las primeras etapas de la vida, debido a una intervención quirúrgica, es mejorada considerablemente después del tratamiento con estrógenos. (Zegura, Keber et al. 2003)

Estos hallazgos dan a entender que el tratamiento con estrógenos en la postmenopausia no se limita a revertir la disfunción endotelial relacionada con la edad (Taddei, Virdis et al. 1996) sino más bien debida a una pérdida de hormonas sexuales femeninas.

Así, se piensa que los efectos vasodilatadores de los estrógenos juegan un papel importante para desarrollar un fenotipo hipotensor y anti-inflamatorio en las mujeres premenopáusicas, protegiendo frente al desarrollo de la aterosclerosis.

Curiosamente, la inclusión de progestágenos en la terapia hormonal sustitutiva podría bloquear el efecto de los estrógenos sobre la biodisponibilidad de NO, (Sorensen, Dorup et al. 1998) (Jokela, Das-tidar et al. 2003) pese a que otros autores sugieren un aumento de la biodisponibilidad de NO por efecto de la progesterona. (Orshal and Khalil 2004)

Las mujeres premenopáusicas que reciben tratamiento con estrógenos tras una menopausia quirúrgica también experimentan una mejora de la función endotelial. (Chambliss and Shaul 2002) Efectos similares se ha observado en mujeres jóvenes que toman contraceptivos orales. (John, Jacobi et al. 2000)

También en hombres se produce una mejora de la función endotelial mediada, al menos parcialmente por NO, tras la administración prolongada de estrógenos. (McCrohon, Walters et al. 1997), (New, Timmins et al. 1997)

Sin embargo, algunos estudios no reportan cambio alguno, o incluso una disminución en la bioactividad del NO tras ovariectomía y tratamiento crónico con 17 β -Estradiol. (Liu, Hattori et al. 2001) (Sakuma, Liu et al. 2002)

La explicación de estos resultados contradictorios es difícil, pero puede reflejar la heterogeneidad con respecto al papel del NO endógeno en la relajación dependiente de endotelio, según el lecho vascular estudiado.

Curiosamente, la literatura demuestra que la producción basal de NO parece estar elevada en grandes arterias y vasos de resistencia en respuesta a los estrógenos. Sin embargo, los casos en los que se produjo una respuesta mediada por aumento de NO, eran los de las arterias con mayor calibre, (Gonzales, Walker et al. 2001) mientras que en las arterias de resistencia, los cambios en la bioactividad de Óxido Nítrico no parecían desempeñar un papel en la respuesta vascular alterada. (Huang, Sun et al. 2001)

Los resultados de estudios clínicos son coincidentes con los numerosos estudios en animales y demuestran un nivel circulante aumentado de NO en mujeres premenopáusicas en comparación con los hombres, (Sudhir, Jennings et al. 1996) y en mujeres postmenopáusicas con THS. (Rosselli, Imthurn et al. 1995) Además, el tratamiento de las células endoteliales humanas cultivadas con 17 β -Estradiol aumenta la liberación de NO tanto basal y estimulado. (Yang, Bae et al. 2000)

Tomados en conjunto estos estudios, sugieren que los estrógenos elevan la producción de NO endotelial y que esta pudiera ser la razón de los elevados niveles de NO en la circulación, típico de las mujeres frente a los hombres.

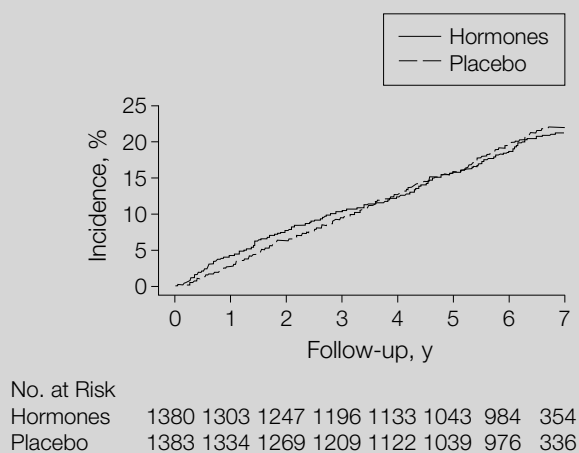
Pese tras estas evidencias iniciales, fueron apareciendo ensayos clínicos prospectivos que no demostraban un efecto beneficioso de los estrógenos sobre el sistema cardiovascular.

De entre estos ensayos destacan por su importancia el **Heart and Estrogen/Progestin Replacement Study (HERS)** (Hulley, Grady et al. 1998) (Grady, Herrington et al. 2002) en lo que se refiere a la prevención secundaria de la enfermedad cardiovascular (ECV) y el **Women's Health Initiative (WHI)** (Rossouw, Anderson et al. 2002) (Anderson, Limacher et al. 2004) en cuanto a la prevención primaria de ECV.

Por un lado, de los resultados obtenidos en el **HERS** (Hulley, Grady et al. 1998) no se podía concluir que la THS tuviera un efecto beneficioso sobre el riesgo de (ECV). Se trataba de un estudio ciego, aleatorizado, placebo-control, de prevención secundaria, realizado en 2763 mujeres postmenopáusicas con enfermedad cardiovascular establecida. La media de edad de las pacientes era de 66.7 años, y se establecieron 2 brazos de intervención [THS con estrógenos conjugados equinos (ECE) (0.625mg/día) y acetato de medroxiprogesterona (AMP) (2.5 mg/día) administrados por vía oral vs placebo] La duración del HERS fue de 4.1 años en los que la incidencia de fenómenos cardiovasculares adversos en las mujeres sometidas a THS aumentó durante el primer año, disminuyendo posteriormente a partir del tercer año. Este hecho llevó a continuar con el estudio, apareciendo el **HERS II**. (Grady, Herrington et al. 2002)

En este segundo estudio no se observó reducción del riesgo cardiovascular con la THS al prolongar el tiempo de la terapia 2.7 años más (**Fig 11**), lo que llevó a la American Heart Association a desaconsejar el uso de la THS para la prevención secundaria de enfermedades cardiovasculares.

Figure 3. Kaplan-Meier Estimates of the Cumulative Incidence of CHD Events



Coronary heart disease (CHD) events are death and nonfatal myocardial infarction. The curves are truncated at year 7 when less than half of the cohort remains in follow-up.

Fig 11. Incidencia acumulativa de eventos cardiovasculares en el estudio HERS II.

Gráfica Kaplan-Meier.

Gráfica original de Grady, D. (2002)

Por otro lado, en lo que se refiere a la prevención primaria de enfermedad vascular, el **WHI** (Rossouw, Anderson et al. 2002) estudió el efecto de la THS en mujeres postmenopáusicas sanas sin encontrar un efecto beneficioso de la THS sobre el riesgo de ECV. (Fig 12)

El WHI fue un estudio doble ciego, aleatorizado y controlado realizado en 16608 mujeres. Un brazo del ensayo evaluó la combinación de estrógenos y gestágenos, utilizando la misma THS que el HERS, en mujeres con útero e historia de la menopausia natural. El otro brazo evaluó terapia estrogénica sin oposición en mujeres histerectomizadas.

Los resultados primarios fueron el estudio riesgo-beneficio para la enfermedad cardíaca coronaria y el cáncer de mama. Los investigadores también consideraron otras patologías, como accidente cerebrovascular, embolia pulmonar, cáncer de endometrio, cáncer colorrectal, fractura de cadera, y la muerte debido a otras causas.

Otros grupos de investigación dentro de la WHI también examinaron los aspectos de la función cognitiva y demencia, así como otras enfermedades graves.

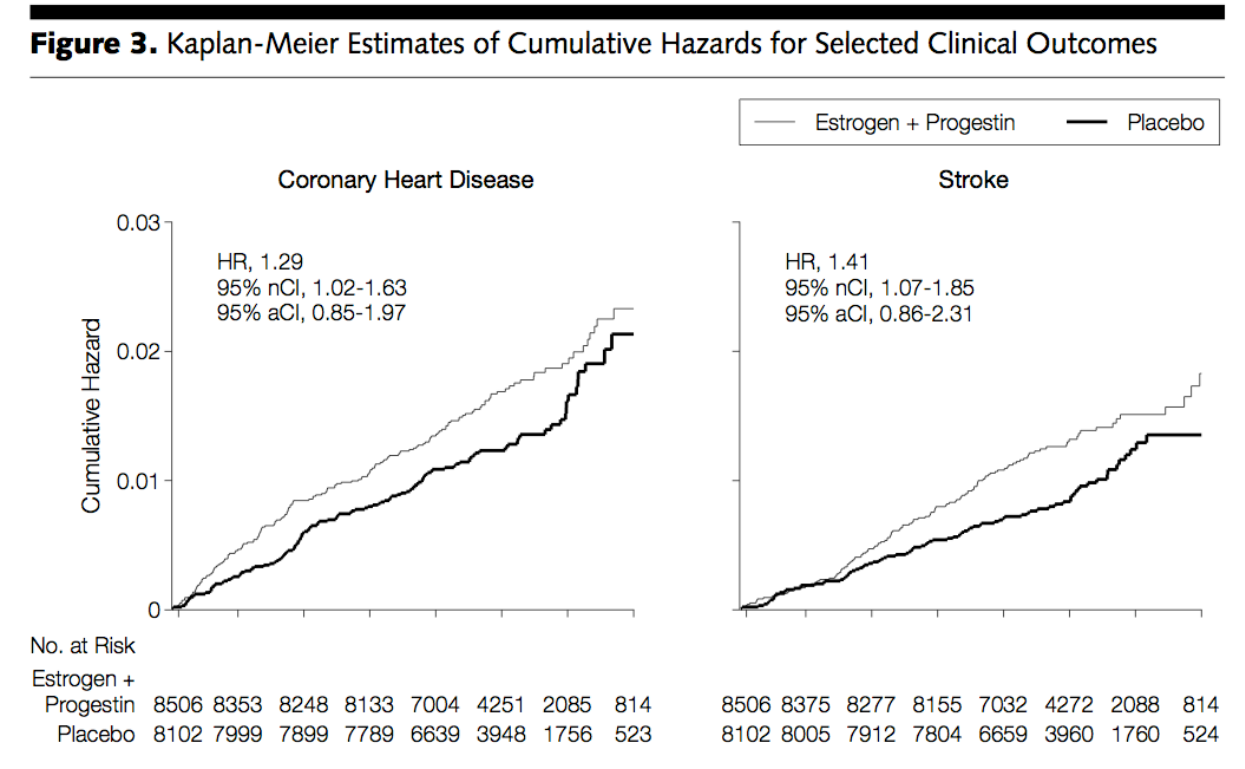


Fig 12. Incidencia acumulativa de eventos cardiovasculares en el estudio WHI. Gráfica Kaplan-Meier.

Como la THS empleada en el WHI fue la misma que en el estudio HERS (una combinación de ECE y AMP administrados por vía oral), los mismos autores del WHI describen como una limitación el uso de una única terapia e indican que los resultados no necesariamente deben ser iguales con el empleo de otras dosis, otras formulaciones administradas oralmente o con estrógenos y progestágenos aplicados por vía transdérmica.

Con el fin de discernir el posible efecto de la utilización de un gestágeno junto con los estrógenos se prosiguió el estudio WHI en mujeres que habían sido sometidas previamente a histerectomía, en las que la terapia empleada consistió únicamente en ECE y en las que, tras 5.2 años de THS, el balance entre riesgo y beneficio fue incierto.

Inesperadamente, en mayo de 2002, después de un seguimiento medio de 5,2 años, un brazo principal del ensayo clínico WHI se detuvo. Los datos intermedios obtenidos recomendaron concluir el brazo E+G del ensayo debido a que se sugería que el riesgo debido al incremento del cáncer de mama, junto con la evidencia de un aumento de enfermedad coronaria, accidente cerebrovascular y embolia pulmonar, sobrepasaban el beneficio sobre las fracturas y el posible beneficio sobre el cáncer de colon en las mujeres con THS.

El brazo de E sin gestágeno del estudio también se terminó poco después de 6,8 años de seguimiento, pero por razones diferentes. En este brazo, también había una falta de beneficios para el corazón, el

resultado primario del estudio, y un aumento del riesgo de accidente cerebrovascular, pero sin incremento del riesgo de cáncer de mama, a diferencia del brazo E+G. (Anderson, Limacher et al. 2004)

En un principio, todos estos resultados se interpretaron dogmáticamente, creándose una corriente de opinión contraria a la posibilidad de un efecto beneficioso de los estrógenos sobre el sistema cardiovascular. Sin embargo, los conocimientos adquiridos en el tiempo nos hacen valorar de forma prudente los resultados de estos estudios. (Palacios, Calaf et al. 2003)

Aunque los ensayos clínicos se consideran los estudios que ofrecen el mayor nivel de evidencia médica, tienen limitaciones que deben tenerse en cuenta. Se puede probar una sola intervención, lo que significa que diferentes dosis de hormonas o modos de administración (por ejemplo, aerosoles, implantes, e insertos vaginales) son normalmente no factibles y no se estudiaron en el WHI. Debido a que requieren una estrecha vigilancia, son limitados en tamaño en comparación con los ensayos observacionales. Por último, las mujeres que deciden participar en un ensayo clínico pueden no ser plenamente representativas de toda la población, a la que podrían aplicarse los resultados del estudio.

Como se ha comentado anteriormente, la terapia empleada (ECE), en la que el sulfato de estrona es el principal estrógeno presente en el preparado, no puede ser extrapolable al empleo de otras formulaciones como las que emplean 17β -Estra-

diol. (Parrilla and Abad 2004) (Coelingh Bennink 2004)

Además, la vía de administración es otro factor importante a tener en cuenta a la hora de evaluar la efectividad de la THS, puesto que el metabolismo hepático de los estrógenos puede variar el espectro de estrógenos circulantes e interferir con el metabolismo hepático de lípidos. (Coelingh Bennink 2004)

Por otro lado, factores asociados a la población también podrían incidir sobre los resultados obtenidos en los diferentes estudios. Así, la edad media de las mujeres empleadas en estos estudios supera en 10 años la aparición de la menopausia y esto podría explicar la diferencia en mortalidad cardiovascular con estudios previos. (Maas, van der Graaf et al. 2004)

Aunque teóricamente las mujeres que formaban parte del estudio WHI eran sanas, 2/3 de estas tenían un índice de masa corporal (IMC) correspondiente a valores de sobrepeso y más aún, de estas mujeres con sobrepeso, la mitad presentaban obesidad mórbida. Por tanto, este factor debe tenerse en cuenta ya que la obesidad constituye un importante factor de riesgo de ECV *per se* y puede dificultar la interpretación de los resultados. (Parrilla and Abad 2004)

El debate acerca de los resultados de este estudio, ha sido apasionante, y desde el primer trabajo publicado en 2002, multitud de estudios en paralelo se han realizado a partir de los resultados obtenidos, bien por el grupo que pilotó el WHI, bien por otros autores.

Hay muchas objeciones emitidas acerca del diseño del estudio. Cuando los resultados del WHI se publicaron por primera vez, los datos fueron agregados para proporcionar la máxima potencia estadística necesaria para hacer factible el estudio en el primer lugar. La ventaja de la agregación de los datos proporciona mejores intervalos de confianza con los que estimar los riesgos o beneficios.

Sin embargo, el coste fue que no todos los grupos de edad de las mujeres podrían ser considerados por separado, aunque considerar subgrupos de edad en el estudio hubiera alargado los tiempos y costes enormemente.

Por lo tanto, el estudio ha respondido a muchas preguntas, pero ha abierto muchos interrogantes a su vez.

Una de las críticas principales a la hora de los resultados del WHI (brazo E+G) siempre ha sido que las mujeres no fueron estratificadas por edad, y que los resultados globales del análisis de datos puede no ser relevante para las más jóvenes, las mujeres sintomáticas que están más cerca de la menopausia. Desde entonces, varios análisis de seguimiento han abordado esta cuestión.

Antes de la publicación del WHI, la creencia subyacente era que la THS tenía un efecto beneficioso sobre el corazón. A partir del WHI, el consenso pasó a ser que la THS plantea más riesgos que beneficios cuando se utiliza para la prevención de las enfermedades crónicas. Ahora que los resultados de los estudios de seguimiento se han combinado, con los resultados es-

tratificados por década de edad, hay controversia acerca de si el uso de THS para tratar el síndrome climatérico pudiera tener un beneficio para la prevención de enfermedad coronaria en mujeres entre 50 y 59 años de edad, aunque incurramos en un riesgo pequeño pero progresivo de cáncer de mama, cuando damos estrógenos combinados con gestágenos. (Rossouw, Prentice et al. 2007).

A medida que las mujeres envejecen aún más, las hormonas conllevan riesgos cada vez mayores para el sistema cardiovascular, ya que el propio envejecimiento aumenta el riesgo basal y las hormonas parecen aumentar el riesgo aún más. De hecho, se ha descrito que el riesgo de ECV en la mujer se iguala al del hombre entre 5 y 10 años después de la menopausia, significando el cese definitivo de la actividad ovárica. (Wenger 1997) (Maxwell 1998)

La posibilidad de que el estrógeno puede tener un efecto cardioprotector si se inicia en mujeres sintomáticas cercanas a la menopausia tiene una base en estudios de experimentación animal y algunos estudios limitados en humanos y se sigue evaluando en ensayos clínicos en curso.

Los hallazgos relacionados con los principales criterios de valoración de los dos ensayos del WHI para mujeres de todas las edades combinadas se resumen en la tabla siguiente (**Tabla 1**), donde se especifica la diferencia de número de casos cada 10000 personas en un año que padecen ciertas enfermedades estudiadas en el WHI.

Enfermedad	E+G	E solo
Enfermedad coronaria (mortal o no)	+6	-3
Accidente Cerebro Vascular	+8	+11
Cáncer de mama	+8	-6
Trombosis venosa - TEP	+18	+8
Cáncer colorrectal	-6	+1
Fractura de cadera	-5	-6

Tabla 1. Tabla resumen del WHI, señalando la diferencia en n° de casos cada 10000 pers /año de varias enfermedades utilizando THS comparada con mujeres que no usan THS.

Los resultados sombreados en amarillo: diferencias significativas.

Modificado de Rossouw, JE. (2002-2007)

El brazo E+G del estudio WHI evaluó el impacto del estrógeno y gestágeno en el desarrollo de enfermedades crónicas relacionadas con el envejecimiento en mujeres sanas postmenopáusicas con útero intacto. Los resultados de los primeros análisis sugirieron que los riesgos globales de la THS superaban a los beneficios cuando se usa para la prevención de enfermedades. Como se muestra en la **Tabla 1**, el estudio indica un exceso de riesgo absoluto de enfermedad cardíaca coronaria, accidente cerebrovascular, y trombosis venosa, y un exceso de beneficio absoluto de cáncer colorrectal y fractura de cadera en mujeres con THS. El exceso de los riesgos y beneficios absolutos son aquellos que se pueden atribuir a THS.

Con mucho, el resultado más sorprendente y preocupante del estudio WHI fue que en el primer año de iniciar la terapia combinada, las mujeres experimentaron un riesgo de enfermedad coronaria un 81% mayor (IC 1.09-3.01). Durante todo período de seguimiento, el riesgo se incrementó en un 24 % (IC 0.97-1.60). Esto se tradujo en 6 casos adicionales de enfermedad cardíaca cada 10.000 mujeres que usaban THS durante un año. El aumento en el riesgo de cardiopatía coronaria descrito para THS combinada no persiste tras el abandono de la THS.

Rossouw estratificó las mujeres tanto por edad como por años de menopausia, encontrando que las mujeres que comenzaron la menopausia menos de 10 años antes de iniciar la THS, tenían un riesgo relativo de enfermedad cardíaca coronaria de 0,76 (IC 0.50-1.16). Esto sugiere una ausencia de efectos cardiovasculares per-

judiciales para las mujeres cerca de la menopausia que utilizan terapia combinada. (Rossouw, Prentice et al. 2007)

Sin embargo, Prentice publica un reanálisis de los mismos datos, encontrando que las mujeres que habían iniciado THS combinada dentro de los 5 años de la menopausia no experimentaron un riesgo significativamente mayor de enfermedad cardíaca coronaria. (Prentice, Manson et al. 2009) Sólo en el grupo de mayor edad, aquellas con 20 o más años a partir de la menopausia, tuvieron un riesgo relativo incrementado significativamente a 1,66 (IC 1.14-2.41).

Un resultado similar se encontró cuando se estratificó a las mujeres por edad.

Edad (años)	RR	IC 95%
50-59	1.29	0.79-2.12
60-69	1.03	0.74-1.43
70-79	1.43	1.04-2.11

En el grupo de 70-79 se alcanzó significación estadística.

Así, la interpretación de estos resultados sugieren que la edad de la mujer cuando se inicia THS o los años que han pasado desde la menopausia, son factores importantes en la relación entre la enfermedad coronaria y la terapia hormonal. Se debe contraindicar la terapia hormonal para las mujeres con más de 70 años de edad, o con 20 o más años a partir de la menopausia, debido al riesgo aumentado de enfermedad coronaria. Sin embargo, en el

momento actual no se puede inferir beneficio ni daño cardiovascular para las mujeres más jóvenes y las más próximas a la menopausia, aunque los estudios en curso arrojarán más luz sobre esta cuestión.

Hay algunas diferencias en los datos resultantes de los estudios del WHI y de estudios observacionales como el Nurses' Health Study (NHS). En un estudio realizado por Grodstein, también se estratifican los datos del NHS por el tiempo transcurrido desde la menopausia y por edad.

Las mujeres con útero intacto que iniciaron THS antes de 4 años desde la menopausia tuvieron una reducción estadísticamente significativa de la enfermedad coronaria, en comparación con las mujeres de la misma edad que nunca habían utilizado la terapia hormonal, con un riesgo relativo de 0,72 (IC, 0.56-0.92). Para las mujeres que iniciaron la terapia hormonal combinada a partir de los 10 años de la menopausia, en comparación con las mujeres que nunca usaron terapia hormonal, el riesgo relativo fue de 0,90 (IC, 0.62-1.29). (Grodstein, Manson et al. 2006)

Algunas de las razones propuestas para explicar las diferencias en los resultados en enfermedad coronaria entre los estudios observacionales y el WHI (después de controlar la edad y el tiempo desde la menopausia) incluyen:

1. La posibilidad de que los estudios observacionales no pudieran controlar los factores de confusión adicionales.

2. La incapacidad de los estudios observacionales para capturar eventos clínicos que se producen poco después de iniciar la terapia hormonal. En particular, como los estudios de observación incluyen mujeres que continúan con el uso de THS, es poco probable que se incluyeran en el estudio las mujeres que desarrollaron enfermedad coronaria poco después de comenzar la terapia hormonal.

3. En los resultados del WHI, la falta de comparación entre las mujeres que usaban ya THS y las que nunca la habían utilizado, una comparación que el NHS contempla. Existe la posibilidad de que exista un impacto directo para la salud debido al cese y posterior reinicio de la terapia hormonal, hecho que se dio en los estudios del WHI. Tanto en el grupo THS como en el placebo en el WHI, las mujeres que se habían inscrito tomaban previamente hormonas. En contraste, el NHS comparó a las usuarias en curso de THS con las que nunca la habían utilizado.

4. Cuestiones relacionadas con el tratamiento que puede afectar a los datos. En un ensayo controlado aleatorizado, las mujeres deben ceñirse a la pauta que se les ha asignado. En el brazo de E+G del WHI, alrededor del 40% de las mujeres no se adhieren a sus píldoras asignadas. Muchas adivinaron su "grupo" o tenían efectos secundarios que requirieron conocimiento de la asignación de tratamiento para dar el tratamiento médico adecuado. Esto hizo que el estudio no fuera del todo ciego, por ejemplo, en mujeres con sangrados, ya que para tratarlas, había que saber qué fármaco tomaban y obrar en consecuencia. (Parrilla

and Abad 2004) Así, el WHI utilizó un análisis de "intención de tratar", por lo que todas las mujeres asignadas al grupo THS se consideró que fueron tratadas con terapia hormonal. Se hicieron ajustes desde entonces para la adhesión al tratamiento, ajustes que no han dado una explicación de la discrepancia entre el NHS y el WHI. En el NHS no hubo efecto de "intención de tratar", ya que se basaba en el uso de hormonas reportado por las mujeres. (Hernan, Alonso et al. 2008)

El brazo de E solos en mujeres histerec-tomizadas se detuvo a principios de 2004 después de 7,1 años a causa de su "inutilidad", la determinación de que el estudio, incluso si se lleva a la terminación, no sería capaz de determinar un beneficio significativo en la enfermedad coronaria del corazón, amen de un aumento de riesgo de ACV. (Anderson, Limacher et al. 2004)

A diferencia del régimen de E+G, las mujeres que tomaron E solos no tuvieron un mayor riesgo de enfermedad coronaria. Sin embargo, durante los 7 años de seguimiento, las usuarias de THS no tuvieron beneficio cardiovascular alguno.

Para las mujeres más jóvenes (de 50 a 59 años), hubo un beneficio sugerido, pero no alcanzó significación estadística, con un RR 0.63 (IC, 0.36-1.08) (Hsia, Langer et al. 2006) Algunos resultados finales compuestos (tales como infarto de miocardio, muerte coronaria, by-pass de la arteria coronaria, intervención coronaria percutánea y angina de pecho combinados) se redujeron significativamente en este gru-

po de edad más joven de las mujeres que tomaron estrógenos solos.

En otro análisis del WHI limitado a las mujeres de 50 a 59 años de edad, se estudió la calcificación de las arterias coronarias, con una puntuación menor (alrededor del 30%) entre las mujeres que recibieron ECE que las asignadas a placebo. (Manson, Allison et al. 2007) Esta puntuación es un factor predictivo de riesgo futuro de eventos cardiovasculares.

Si bien estos datos son indicativos de que la terapia hormonal después de la menopausia, si se inicia precozmente puede ser beneficiosa a largo plazo para la prevención de la enfermedad coronaria, el asunto está lejos de ser resuelto y los autores de este estudio advierten que la terapia con estrógenos no debería iniciarse o continuarse solo con el propósito expreso de prevenir la enfermedad cardiovascular en mujeres postmenopáusicas. (Manson, Allison et al. 2007)

Al igual que los resultados de la THS combinada, el hecho de que no hubiera ningún beneficio general sobre la salud cardiovascular en el grupo de mujeres que usaron solo estrógenos, fue una sorpresa.

Los resultados basados en las enfermeras que participaron en el NHS, sugerían que hubo una reducción estadísticamente significativa en la enfermedad coronaria entre las mujeres que tomaron estrógenos. En particular, las que comenzaron la terapia hormonal en los primeros 4 años de la menopausia tenían una reducción del 38% en la enfermedad coronaria, con

un RR 0.62 (IC, 0.52-0.76). Para las mujeres en el mismo grupo demográfico que los de los estudios del WHI, no hubo relación significativa entre la THS y la cardiopatía coronaria en aquellas que comenzaron THS al menos 10 años después de la menopausia, con un RR 0.87 (IC, 0.69-1.10). (Grodstein, Manson et al. 2006) Al igual que con en el estudio de mujeres con útero intacto, hay diferencias en estos ensayos que pueden explicar por qué los el WHI y el NHS obtuvieron resultados diferentes para la enfermedad cardíaca.

En primer lugar, la “intención de tratar” en el análisis del WHI (en el que el grupo de mujeres que están asignadas a THS se enfrenta al que se les asigna placebo, independientemente de su comportamiento real) no es superponible a la comparación de grupos del NHS, en el que se valora las que utilizaban THS en ese momento frente a las que nunca lo habían usado.

En particular, en el estudio con E solos, cerca del 50% de ambos brazos, placebo o E solos, había detenido el régimen de tratamiento asignado (menos adherencia incluso que en el estudio con THS combinada).

Desde la publicación de los primeros resultados del WHI en julio de 2002, se ha ido perfeccionado nuestro conocimiento sobre los riesgos y beneficios de la terapia hormonal en mujeres postmenopáusicas. Los resultados generales muestran que la THS parece llevar consigo un mínimo incremento de riesgos detectables cuando se usa durante cinco años o menos en mujeres sanas de 50 años, el grupo más

propenso a presentar sintomatología vasomotora y de atrofia vaginal.

Cuando se combinaron los datos, tanto para el estudio de E+G y de E solos, el riesgo relativo para mortalidad global fue de 1.02 (IC, 0.90-1.15), lo que sugiere que no hay un impacto claro sobre la mortalidad. Sin embargo, hubo una reducción en la mortalidad total en el grupo de edad de 50 a 59 años, con un RR de 0.70 (IC, 0.51-0.96) con una tendencia no significativa al incremento de riesgo en todos los grupos de edad ($p = 0.06$). (Rossouw, Prentice et al. 2007) Las mujeres entre 70 y 79 años experimentaron un incremento de mortalidad significativamente mayor atribuible a la THS en comparación con las mujeres de 50 a 59 años ($p = 0.03$).

Por lo tanto, hemos de prestar más atención a los riesgos relacionados con la edad, así como los beneficios de la terapia hormonal para la menopausia.

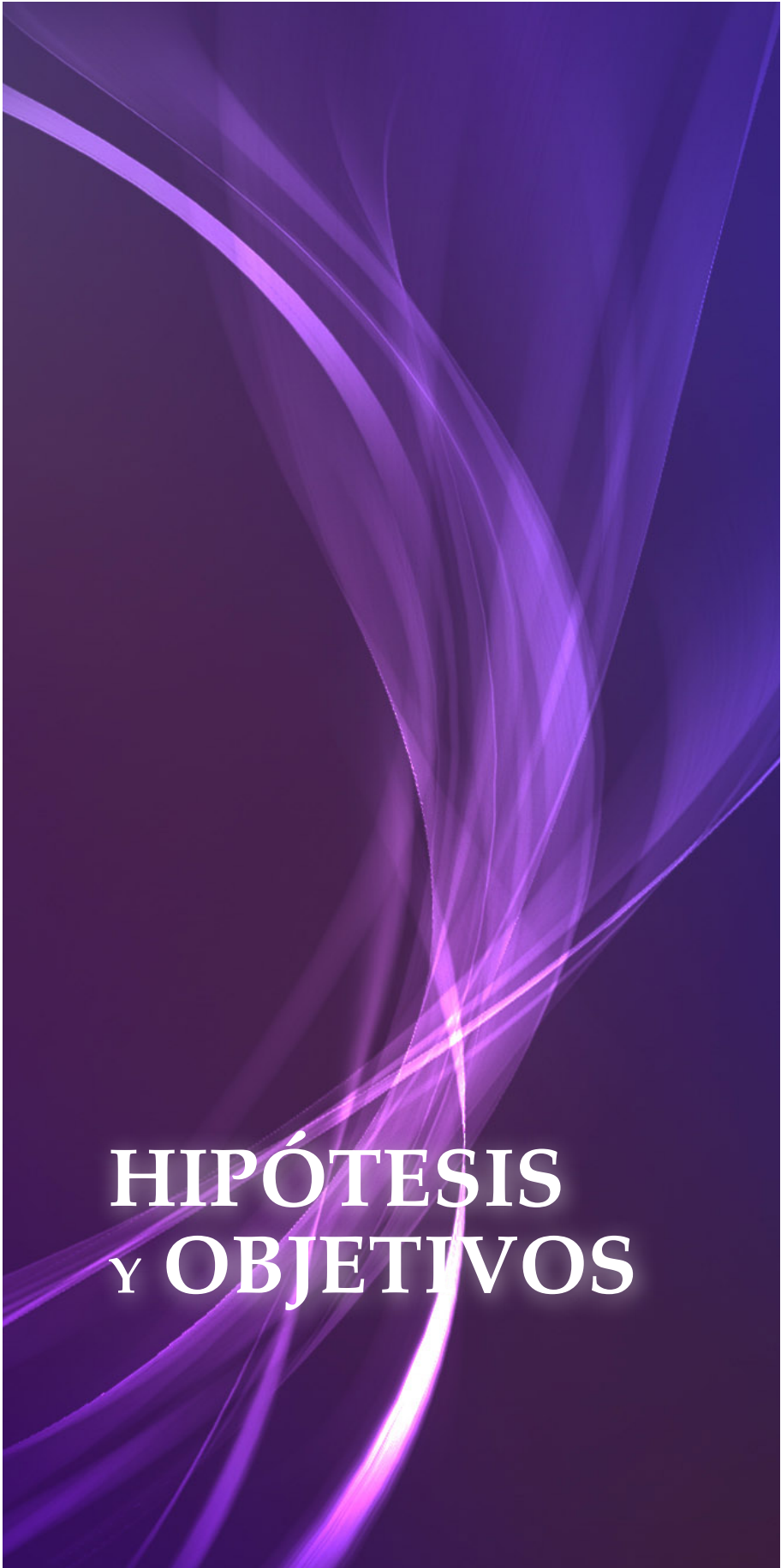
Mientras que por un lado, la terapia hormonal combinada previene fracturas y cáncer de colon, y los estrógenos solos reducen los eventos coronarios y los depósitos de calcio en las coronarias de mujeres de 50 años histerectomizadas, los riesgos concomitantes desaconsejan el uso de hormonas como una estrategia preventiva en este momento. Se hace necesaria una evaluación más profunda del tipo de estrógeno, con dosis más bajas que las descritas en el WHI y con diferentes pautas de tratamiento.

Mientras tanto, las mujeres que tienen que recurrir a los estrógenos para el alivio de la sintomatología climática pue-

den beneficiarse enormemente de la gran cantidad de información que el WHI ha proporcionado para ayudar a entender cómo deben ser monitorizados estos tratamientos hormonales, e implica un ejercicio de información a la mujer en relación al balance riesgo/beneficio, lo que debemos esperar cuando finalicemos la terapia hormonal.

Los avances en el conocimiento de los mecanismos de acción de los **estrógenos** han añadido otros condicionantes importantes sobre la respuesta a la THS, como por ejemplo, la existencia de polimorfismos del gen que codifica el subtipo de **receptor ER α** . Uno de estos polimorfismos está presente en un 20-30% de la población y duplica o triplica el riesgo de enfermedad coronaria, tanto en mujeres como hombres. (Shearman, Cupples et al. 2003) (Schuit, Oei et al. 2004)

En medio de esta polémica apasionante hemos desarrollado nuestra investigación, intentando profundizar en nuestro conocimiento sobre la acción estrogénica sobre el sistema cardiovascular, huyendo de actitudes dogmáticas y prejuicios que son los que secularmente ponen barreras al avance la Ciencia.



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

HIPÓTESIS

La pérdida de la función ovárica en ratas induce alteraciones de la función cardiovascular asociadas a disfunción del endotelio vascular y a un estado redox pro-oxidante, que se previenen con el tratamiento hormonal sustitutivo con Estrógenos.

OBJETIVOS

1

Evaluar si la deprivación crónica de Estrógenos tras ovariectomía induce cambios hemodinámicos en la rata hembra.

2

Determinar si los cambios hemodinámicos observados en ratas con deprivación crónica de Estrógenos, se acompañan de una disfunción del endotelio vascular.

3

Estudiar los posibles mecanismos fisiopatológicos de la disfunción endotelial presente en ratas hembras privadas crónicamente de Estrógenos.

3.a.

Evaluar si la ovariectomía da lugar a una disminución en la producción de NO.

3.b.

Valorar la participación del stress oxidativo en ratas ovariectomizadas.

4

Estudiar si las alteraciones hemodinámicas y de la función endotelial observadas en las ratas ovariectomizadas pueden deberse a la ausencia de Estradiol, y si la terapia de sustitución con Estrógenos previene las alteraciones hemodinámicas y la biodisponibilidad de NO en estas ratas sin función ovárica.

5

Estudiar la interacción entre NO y Angiotensina II en los efectos cardiovasculares de la administración aguda de Estradiol.

5.a.

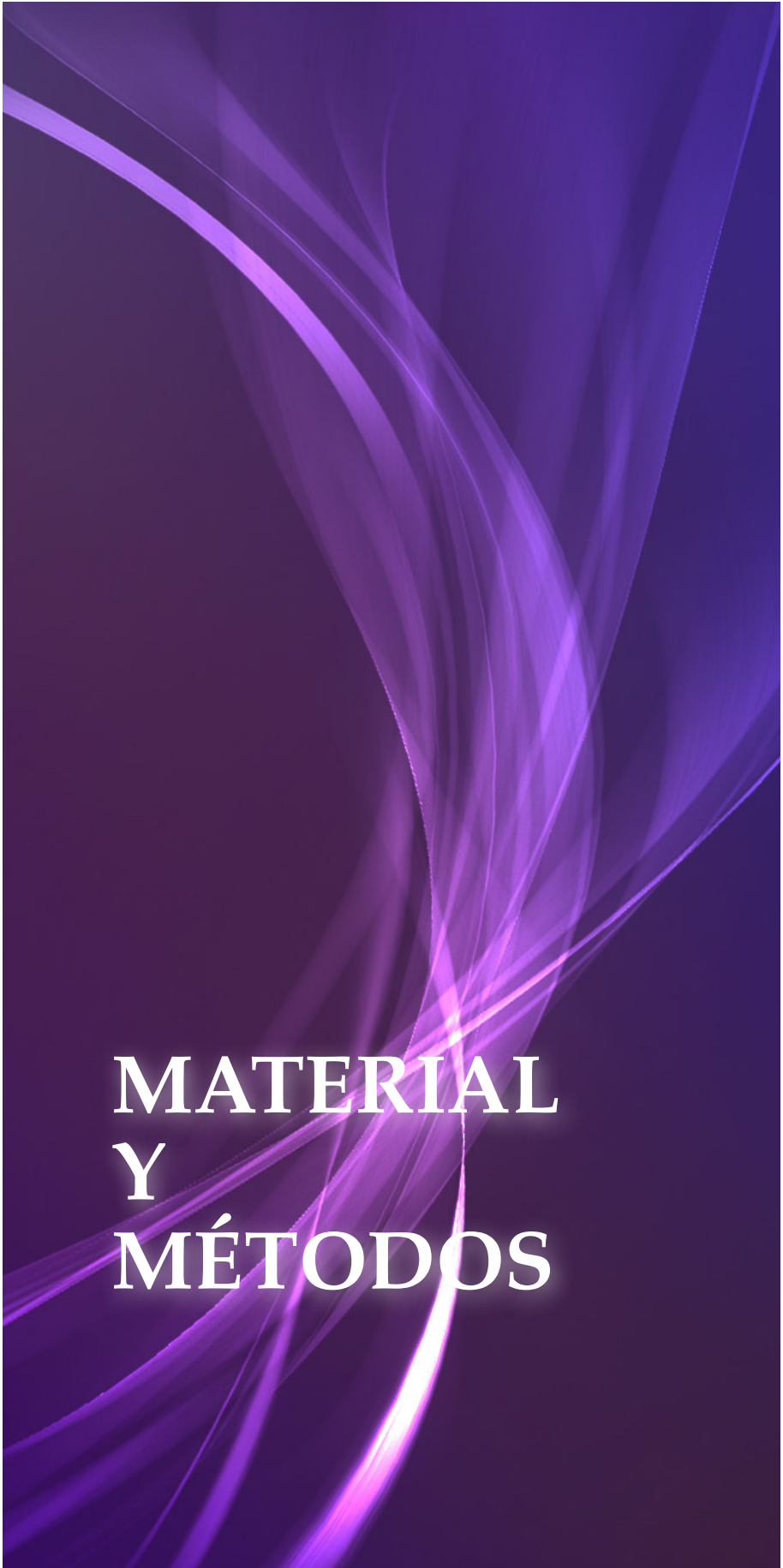
Evaluar el efecto hemodinámico de la administración aguda de 17β -Estradiol.

5.b.

Evaluar la participación del NO en los efectos hemodinámicos mediante la inhibición previa de la síntesis de NO, y comparar dicho efecto con el observado en presencia de otro vasoconstrictor.

5.c.

Valorar la participación de la Angiotensina II en estas acciones hemodinámicas.



MATERIAL Y MÉTODOS

I

MATERIAL: ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

Se utilizaron ratas hembras de dos cepas distintas, procedentes del Animalario de la Universidad de Murcia, situado en el Campus de Espinardo.

Raza Rata	Peso (g)	n
Wistar	200-220	26
Sprague-Dawley	200-220	89

Estos animales se dividieron en los siguientes grupos experimentales:

1. Ratas castradas.

A las 12 semanas de edad, tras ser anestesiadas con Thalamonal®, mezcla de 16 mg/kg de Fentanilo y 0,83 mg/kg de Droperidol (Syntex Latino, SA), se les realizó una pequeña incisión abdominal, en condiciones de asepsia, tras la cual se procedió a ovariectomía en 89 ratas.

Tras un postoperatorio satisfactorio, se mantuvieron en sus jaulas durante 8 semanas hasta el día del experimento.

Durante estas 8 semanas, se realizaron estudios citológicos periódicos para evaluar el estado hormonal de las ratas, y en el momento de la muerte del animal se volvió a valorar el estado de castración comprobando la ausencia de tejido ovárico y pesando el útero, para realizar el cálculo de la relación peso del útero (mg)/ peso de la rata (100 g).

2. Ratas controles (sham).

A 26 ratas, con el mismo protocolo anestésico, se les realizó una laparotomía sin ovariectomía, para su utilización como grupo control.

3. Ratas tratadas con estrógenos.

Del grupo de 89 ratas castradas, se seleccionaron 13 ratas a las que se les colocó después de un período de 4 días de convalecencia, un implante subcutáneo en forma de pellet (Innovative Research of América, Toledo, Oh), que contenía 17 β -Estradiol (1,5 mg / 8 semanas).

Los animales fueron atendidos de acuerdo con los principios establecidos en la Guía para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio. (Weihe 1987)

El peso corporal de los animales el día del experimento fue distinto en cada grupo en función de su status hormonal, como está representado en la tabla siguiente:

Grupo	Peso corporal rata (g)	SEM
Castradas	391	16
Controles	283	13
THS E ₂	280	7

Valoración hormonal de los animales

A. Métodos histopatológicos

La comprobación inicial del efecto de la ovariectomía se llevó a cabo mediante la realización de un frotis vaginal a un grupo de ratas elegidas al azar, a los 21 y 30 días de la intervención quirúrgica.

A tal efecto, los frotis vaginales se obtuvieron mediante lavado vaginal con suero fisiológico, extensión del material obtenido sobre portaobjetos y fijación inmediata de la muestra mediante nebulización con fijador citológico hidrosoluble (Labofix, Labonord, Francia; Spray Fix, Surgipath, EEUU; Cytology Fixative, Surgipath, EEUU).

Dichos frotis fueron teñidos según la técnica de Papanicolaou (Papanicolaou, Traut et al. 1943):

- Lavado en agua destilada 5 min
- Inmersión en hematoxilina de Harris 10 min
- Lavado en agua destilada 2 min
- Postlavado en alcohol 96° 2 min
- Inmersión en Orange G 10 min
- Lavado en agua destilada 2 min
- Postlavado en alcohol 96° 2 min
- Inmersión en EA36 10 min
- Lavado en agua destilada 2 min
- Postlavado en alcohol 96° 2 min
- Deshidratación y montaje

Tras la tinción, los frotis fueron examinados al microscopio, realizándose una valoración de cada una de las muestras en un doble sentido:

* Análisis de la calidad general de la muestra estudiada, catalogando cada una de las muestras como:

- ☒ Satisfactoria para su valoración, cuando se comprobaba la presencia de células vaginales.
- ☒ No satisfactoria o insatisfactoria para su valoración cuando existía escasez celular, mala conservación de la muestra o artefactos secundarios a la manipulación de la misma.

En este último caso se repetía el procedimiento de lavado vaginal hasta obtener una muestra satisfactoria.

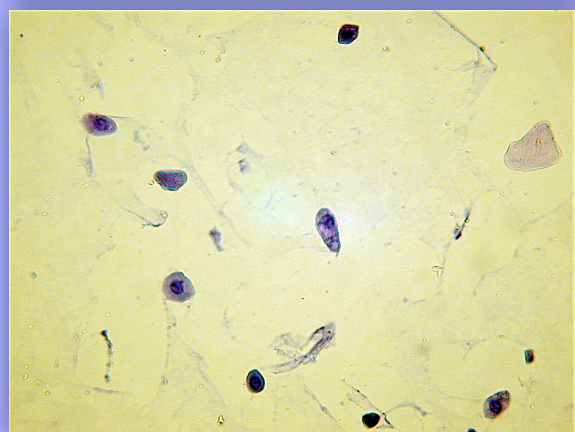
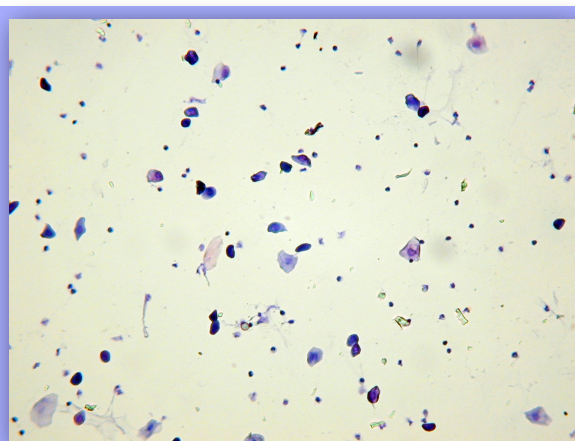
* Análisis cualitativo de la muestra, estableciendo el diagnóstico final de su trofismo global con arreglo a dos criterios estandarizados (Kronenberg and Clark 1985; Weihe 1987):

- ☒ Frotis atrófico.
Sugestivo de la fase “anestro” de la rata, con presencia predominante de células basales/parabasales sin presencia de células intermedias ni de células cornificadas o leucocitos polimorfonucleares neutrófilos.

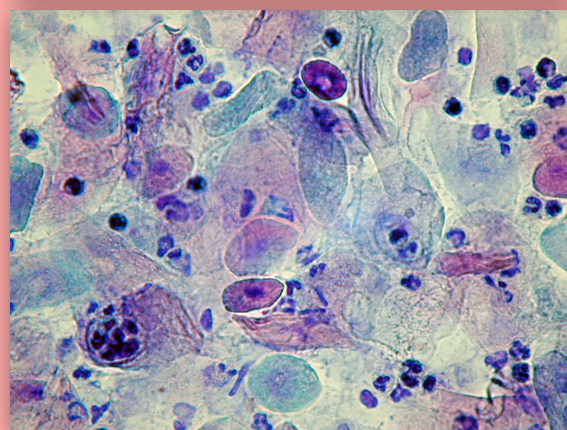
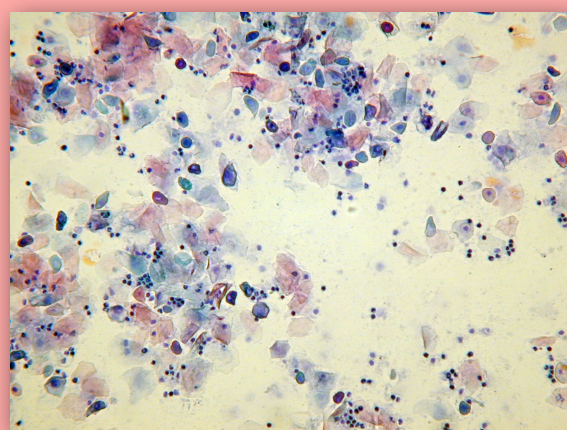
- ☑ Frotis con buen trofismo.
Sugestivo de la fase “estro”: ausencia de células basales/parabasales, con predominio de células intermedias y presencia de células cornificadas y leucocitos polimorfonucleares neutrófilos.

Por otra parte, se comprobó el peso del útero tras la muerte del animal, estableciendo el cociente peso uterino/peso corporal, expresado como la media $\pm$ SEM.

Grupo	Peso útero/rata (mg útero/100 gr peso rata)	SEM
Castradas	52,42	8,88
Controles	168,94	15,50



FROTIS ATRÓFICO
Fase “anestro”



FROTIS TRÓFICO
Fase “estro”

B. Métodos bioquímicos

Se determinó el nivel plasmático de Estradiol mediante enzimoimmunoensayo de micropartículas (IMx Estradiol assay; Abbott Laboratories, North Chicago, IL).

Así, la concentración plasmática de Estradiol era significativamente menor en el grupo de ratas castradas que en el grupo control.

Grupo	17 β -Estradiol (pg/mL)	SEM
Castradas	6,9	0,4
Controles	97,4	4,3
THS E ₂	164,6	4,2

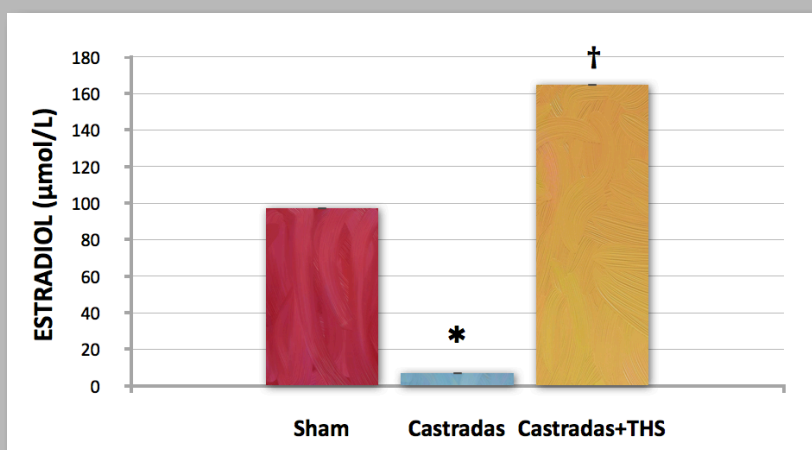


Fig 13. Medias $\pm$ ES de Estradiol plasmático (μ mol/L) en los 3 grupos experimentales, en el momento de la realización del protocolo.

Sham-control (n=6), Castradas (n=8) y Castradas con THS con E₂ (n=6)

* P<0.05 Castradas vs Sham

† P<0.05 Castradas +THS vs Castradas y Sham

II METODOLOGÍA

A. Estudio de la respuesta vascular de anillos de aorta in vitro

A.1 Obtención de anillos vasculares.

En el momento del estudio, se realizó la extracción de la aorta de la rata, después de proceder a su descerebramiento, con el fin de mantener la función cardíaca durante dicha extracción.

Para ello, mediante laparotomía, se extrajo la aorta en toda su longitud mediante disección in vivo.

En placa de Petri, con un baño de solución Krebs, y oxigenación del baño, se disecó finamente la aorta, eliminando todo tejido adiposo y conectivo, utilizando únicamente la aorta disecada y limpia.

Sobre esta aorta se realizaron cortes transversales con bisturí, consiguiendo anillos de 3 mm de longitud para realizar distintos experimentos.

A.2. Preparación de la cámara de órganos con los anillos vasculares.

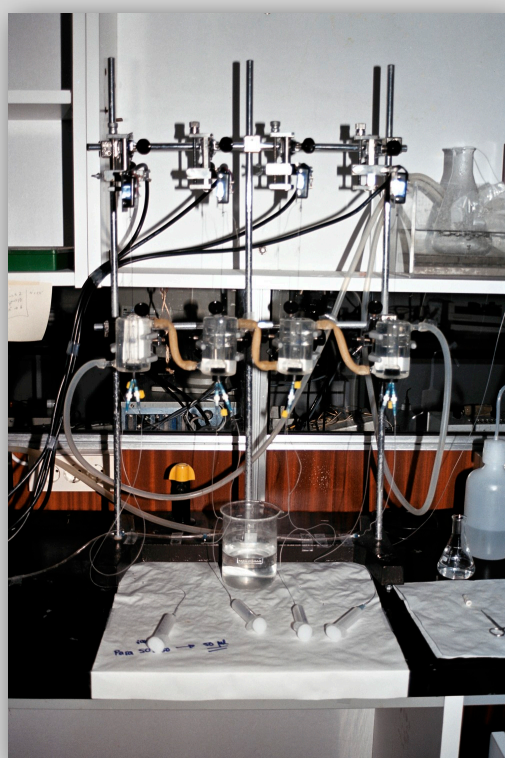
Los anillos fueron suspendidos en cámaras de órganos entre dos ganchos de acero inoxidable conectados a un transductor de fuerza isométrica, registrándose en un polígrafo Lectromed Multitrace (Modelo 4P). (Fig II.A.1)

La cámara de órganos estaba llena de solución Krebs, que se renovaba periódicamente [Composición en mM: NaCl 128, KCl 4.7, NaHCO_3 24.0, MgCl 1.2, KPO_4H_2 2.5, Glucosa 11.1, Na_2EDTA 0.01, con administración continua de gases O_2 al 95% y CO_2 al 5%].

Tras una curva inicial de precarga, aumentando gradualmente la tensión de reposo de 2 a 12 g, se encontró que a la tensión óptima de 8 g, la contracción de los anillos fue máxima tras la instilación de la solución de Fenilefrina (PE) 10^{-6} M o Cloruro Potásico (ClK) 122 mM.



A



B



C

Fig 14. Laboratorio de estudio vascular in vitro.

(A) Área de trabajo; (B) Sistemas de baños para anillos vasculares; (C) Detalle del sistema de baño con el anillo de aorta preparado para la realización del experimento.

A.3. Protocolo de estudio de respuesta vascular a diferentes sustancias.

Antes del experimento, los anillos fueron equilibrados durante 1 hora con una solución de Krebs, renovando la solución de la cámara cada 20 minutos.

Para evitar la síntesis de prostaglandinas vasculares, todos los experimentos fueron realizados en la presencia de Indometacina 10^{-5} M.

Sobre estas cámaras de órganos se pipetearon las distintas sustancias que utilizamos en los protocolos experimentales, a dosis crecientes, con el fin de obtener una curva acumulativa de dosis-respuesta. (Fig 15)

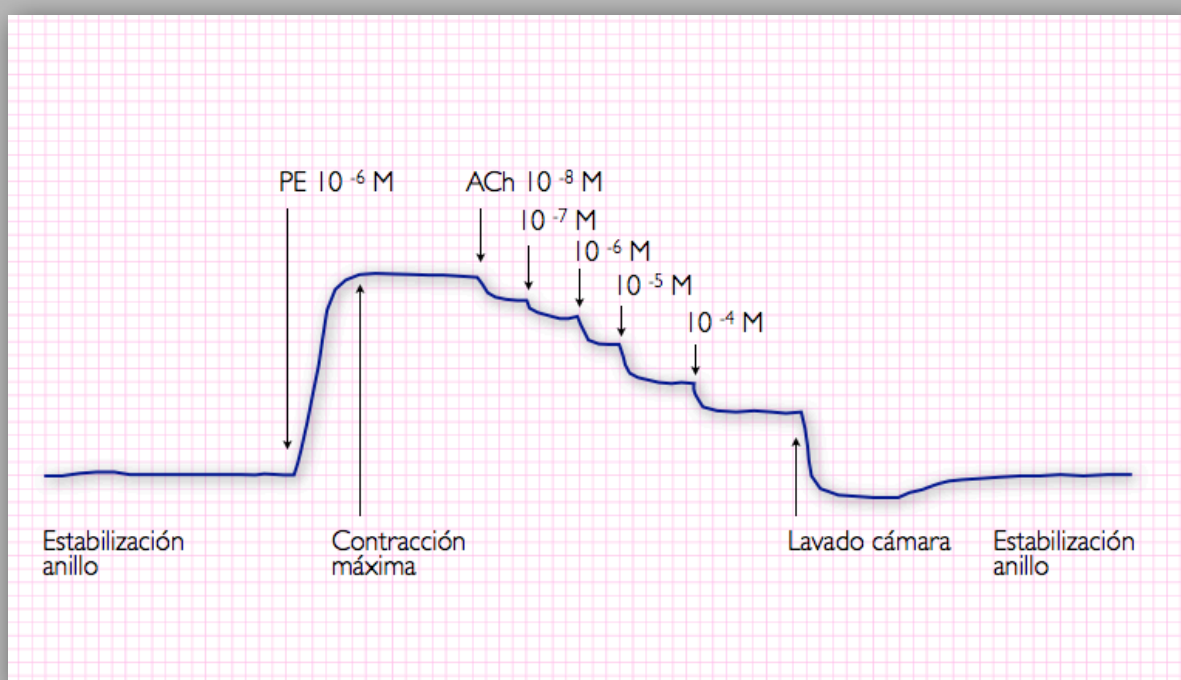


Fig 15. Gráfica de ejemplo de curva de relajación dosis-dependiente a Acetil Colina (ACh) tras contracción máxima con Fenilefrina (PE).

B. Estudio de función hemodinámica de la rata in vivo

B.1. Preparación quirúrgica previa del animal.

Tras rasurar la parte ventral y dorsal del cuello y la zona inguinal izquierda, se practicó una incisión en la zona inguinal izquierda con el objeto de canular la arteria femoral izquierda para la medida de la presión arterial media (PAM) y la frecuencia cardíaca (FC), y la vena femoral izquierda para la infusión de drogas.

Tras aislar esta arteria, se introdujo en ella 3.5-4 cm de un catéter de polietileno PE-50 de 0.5 mm de diámetro interno cuyo extremo estaba adelgazado por calentamiento y biselado con microtijera para su introducción.

Posteriormente se inmovilizó el catéter suturándolo a la arteria con lino de 4-0 y se exteriorizó por una incisión realizada entre ambas escápulas, tras pasar por un trayecto subcutáneo realizado con la ayuda de un trocar. La herida inguinal se suturó por planos con Dexon 2-0 y la piel externa con Seda 2-0.

Para la canulación de la vena yugular derecha y arteria carótida derecha se realizó una incisión longitudinal media en la cara anterior del cuello. Tras aislar la vena yugular se introdujeron unos 2.5 cm de un catéter de polietileno PE-50 con punta de silicona que se fijó a la vena con sutura de lino 4-0.

Tras aislar la arteria carótida se introdujeron 2.5 cm de un termopar (Columbus), de forma que su punta quedó situada en el cayado aórtico.

En este momento se obtuvieron tres curvas de termodilución de morfología típica para comprobar que el procedimiento quirúrgico era válido para la determinación de los parámetros hemodinámicos. En caso afirmativo, se suturó el termopar a la arteria con lino 4-0.

Se exteriorizaron estos catéteres entre las escápulas con ayuda de un trocar. Se suturó por planos la herida y se cerró la piel con seda 2-0.

Para evitar que la rata pudiese romper alguno de los catéteres, se les colocó en la parte dorsal del cuello, sobre la salida de los catéteres, un resorte hueco flexible ligero conectado a una pieza giratoria (swivel), a través del cual se puede acceder a cada catéter, permitiendo la libre movilidad de la rata consciente.

Las ratas fueron colocadas en jaulas de plástico con el swivel montado por encima, con el fin de permitir la libertad de movimientos y de acceso al pienso de la alimentación y la botella de agua.

Se dejaron 2 días tras la colocación de catéteres para la recuperación del animal. Todos los procedimientos quirúrgicos se realizaron bajo condiciones de asepsia.

B.2. Determinación de las variables hemodinámicas.

Se utilizó un sistema microinformatizado (Cardiomax II-R, Columbus Instruments, Ohio) para la obtención de los valores de las variables hemodinámicas en los animales estudiados.

Tras dos días de recuperación de la intervención quirúrgica necesaria para la colocación de catéteres, se conectó el catéter de la arteria femoral a un transductor de presión (Bell and Howell 4-327-I) conectado al Cardiomax II-R y se obtuvieron los valores de presión arterial y frecuencia cardíaca en el transcurso de los distintos protocolos experimentales.

El termopar se conectó a la interfase del Cardiomax II-R, lo que permitió obtener los valores de temperatura de la sangre a nivel del cayado aórtico. El sistema registró digitalmente los valores de presión arterial media, frecuencia cardíaca, temperatura del animal, así como la temperatura del líquido a inyectar.

A los animales que serían sometidos posteriormente a los distintos protocolos experimentales se les permitió un período de adaptación a las condiciones ambientales para conseguir un estado estable del animal.

Para la determinación de las variables hemodinámicas, se inyectó por la cánula yugular 200 μ l de solución estéril de cloruro sódico (0.9%) a temperatura ambiente (20°C), siempre inferior al menos 15°C a la temperatura del animal. Para ello se

utilizó una jeringa Hamilton (CR700-200), especialmente diseñada para inyectar volúmenes prefijados a una velocidad constante.

Tras la inyección de suero, se obtuvo una curva de termodilución en un registro (Lectromed) y se anotaron los valores de frecuencia cardíaca, presión arterial media, volumen sistólico, gasto cardíaco, resistencias periféricas totales y temperatura del animal. Los valores obtenidos fueron la media aritmética de un mínimo de tres medidas.

La determinación del gasto cardíaco por termodilución se basa en el principio de Fick de conservación de la masa. Así, al añadir un volumen conocido de líquido a una temperatura conocida a un recipiente, la nueva temperatura del líquido en el recipiente será proporcional al volumen de líquido que existía en dicho recipiente. En nuestro modelo experimental calculamos el gasto cardíaco mediante el cambio de temperatura registrado por el termopar en el tiempo tras la inyección de suero salino frío.

Esto fue posible gracias a que el sistema microinformatizado del Cardiomax II-R realiza una curva de termodilución/tiempo, siendo el gasto cardíaco el resultado de integrar el área de dicha curva.

II.. Metodología

La ecuación para el cálculo del gasto cardíaco es la siguiente:

$GC = [(T^a \text{ sangre} - T^a \text{ inyección}) \times \text{Vol inyectado}] / \int Tdt$	
GC	Gasto Cardíaco (ml/min)
T ^a sangre	Temperatura de la sangre del animal antes de la inyección (°C)
T ^a inyección	Temperatura de la solución inyectada (°C)
Vol	Volumen inyectado (ml)
$\int Tdt$	Integral sobre el tiempo del cambio en la T ^a sanguínea debido a la inyección (°C. min)

Sólo se utilizaron las curvas de morfología adecuada obtenidas de animales con normotermia.

A partir de estos datos se calcularon el Índice Cardíaco (IC) y el Índice de Resistencias Periféricas Totales (IRPT) o el Índice de Conductancia Vascular (ICV) mediante las siguientes fórmulas:

IC = GC / Peso	
IC	Indice Cardíaco (mL/min/100 g)
GC	Gasto Cardíaco (mL/min)
Peso	Peso del animal (g)

RPT = PAM / GC	
RPT	Resistencias Periféricas Totales (mmHg/min/mL)
PAM	Presión Arterial Media (mmHg)
GC	Gasto Cardíaco (ml/min)

CV = GC / PAM	
CV	Conductancia Vascular (mL/min/mmHg)
PAM	Presión Arterial Media (mmHg)
GC	Gasto Cardíaco (mL/min)

Estos resultados se expresaron como índices de la diferentes variables con el fin de evitar los errores atribuibles a la diferencia de peso entre los distintos animales.

C. Determinaciones bioquímicas

Se recogieron muestras de sangre en tandas de tres grupos diferentes de ratas (control-sham, ovariectomizadas y ovariectomizadas con tratamiento estrogénico) del catéter ubicado en arteria carótida izquierda, mientras que las ratas estaban bajo anestesia, y se colocaron en tubos que contienen EDTA/K3 como anticoagulante.

Las muestras fueron centrifugadas a 2.500 g durante 10 minutos a 4° C (Centrífuga Beckman modelo TJ-6 Beckman Instruments, Fullerton, CA).

El plasma se recogió inmediatamente para congelar a -80° C hasta su análisis posterior.

El almacenamiento se realizó en tubos sin elementos traza, evitando ciclos de congelación/descongelación, con el fin de optimizar la estabilidad de las muestras y para minimizar los procesos de peroxidación lipídica *in vitro*.

Los parámetros analizados en el plasma fueron los siguientes: el lipoperóxido malondialdehído y 4-hydroxialkenoles como indicadores de la peroxidación lipídica, el status antioxidante total (TAS), grupos tiol reducidos (-SH), y los productos finales estables de NO (NO_x).

Se utilizó un kit específico (Bioxytech LPO-586 Assay; Oxis Internacional, Portland, OR) para medir lipoperóxidos malondialdehído y (E)-4-OH-2-nonenal

mediante un método colorimétrico sobre la base de la reacción con 1-metil-2-fenilindol a 45° C, consiguiendo un cromóforo estable con absorbancia máxima a 586 nm de longitud de onda.

Las soluciones de calibración consistieron en 1,1,3,3-tetra-etoxipropano e hidroxinonenal como dietilacetil. El rango de determinación fue 0-20 µmol/L. El coeficiente de variación interensayo fue del 4,7%. La longitud de onda de luz y la temperatura baja de incubación utilizados para estas mediciones eliminaron interferencias y artefactos no deseados.

El TAS plasmático se midió con el uso de un kit suministrado por los Laboratorios Randox (Amtrim, UK). El principio de ensayo es la metamioglobina que reacciona con H₂O₂ para formar la especie radical ferrilmioglobina.

Se incubó un cromógeno ABTS [2,2-azino-bis (3-etilbenzotiazolina-sulfónico)] con la ferrilmioglobina para producir las especies catión radical ABTS.

Esta reacción tiene un color azul-verdoso relativamente estable, que es medido a 600 nm. Los antioxidantes en las muestras añadidas causan la supresión de este color a un grado que es proporcional a su concentración. El sistema fue estandarizado con el uso de Trolox, un análogo (+)-α -tocoferol, con una mayor solubilidad en agua. La unidad de actividad es la concentración (mM) de Trolox, que tiene

la capacidad antioxidante equivalente a una solución de 1,0 mM de la sustancia a estudio. El rango de ensayo fue 0-2.5 mM de Trolox. El coeficiente de variación interensayo fue del 5%.

Los grupos -SH presentes en muestras de plasma se determinaron por la reacción de Ellman con DTNB [5,5'-ditiobis -(2-ácido nitrobenzoico); Sigma]. La concentración de grupos -SH fue calculada sobre la base de una curva estándar de glutatión reducido (Sigma). El rango de ensayo fue 0-320 $\mu\text{mol/L}$. El coeficiente de variación interensayo fue del 4.9%.

Los NO_x se determinaron por el método de Griess. De forma breve, tras la precipitación de proteínas de las muestras y la reducción de nitrato a nitrito con NADPH reducido en presencia de nitrato reductasa (Boehringer Mannheim, Alemania), se cuantificó el nitrito colorimétricamente a 540 nm (Nitric Oxide Colorimetric Assay; Boehringer Mannheim). El coeficiente de variación interensayo fue del 4.8%.

El nivel plasmático de 17β -Estradiol fue medido por Inmunoensayo de micropartículas enzimáticas (IM_x Estradiol assay; Abbot Laboratories, North Chicago, IL).

La Actividad de Renina Plasmática (PRA) se determinó mediante el uso del kit de radioinmunoensayo para angiotensina I (RENCTC, P2721).

III

PROTOCOLOS EXPERIMENTALES

Los describimos en función de los objetivos propuestos:

1. Evaluar si la deprivación crónica de Estrógenos tras ovariectomía induce cambios hemodinámicos en la rata hembra.

Para ello se determinaron los parámetros hemodinámicos basales (PAM, FC, IC, ICV) en ratas conscientes de los grupos experimentales Castradas (n=8) y Control-sham (n=6), 8 semanas después de la ovariectomía o del simulacro de operación.

2. Determinar si estos cambios se acompañan de una disfunción del endotelio vascular.

2.1. Respuesta de relajación de anillos de aorta a la Acetilcolina (ACh) y Nitroprusiato Sódico (NP).

Se llevaron a cabo varios experimentos para dilucidar las diferencias entre las ratas ooforectomizadas y las controles, valorando la capacidad de respuesta a un vasodilatador endotelio-dependiente (ACh) y endotelio-independiente (NP).

Los anillos se precontrajeron con Fenilefrina (PE) 10^{-6} M.

Después de alcanzar una meseta de contracción estable, se determinó la relajación dosis-dependiente en respuesta a la administración de ACh (10^{-8} a 10^{-4} M).

Tras lavar cada anillo y tras un período de estabilización de 60 minutos, se procedió a realizar otra curva dosis-respuesta a NP (10^{-10} a 10^{-4} M).

En algunos experimentos, un número importante de anillos (n=12) fueron pretratados con L-NAME (10^{-5} M), y se repitió la curva acumulativa dosis-respuesta a la ACh, descartándose estos anillos para experimentos posteriores.

2.2. Respuesta de relajación de anillos de aorta a la Superóxido-Dismutasa (SOD).

El endotelio, además de NO, también produce anión superóxido, (Rosen and Freeman 1984) (Rubanyi and Vanhoutte 1986) y su generación tiene importantes implicaciones respecto a la acción del NO, ya que se sabe que este anión inactiva o destruye el NO. (Gryglewski, Palmer et al. 1986)

Así, al catalizar la ruptura del anión superóxido en oxígeno y peróxido de hidrógeno con SOD, se puede prolongar significativamente la vida media y la acción de NO. Es por esta razón por la que podemos realizar el estudio de la curva de vasorrelajación concentración-respuesta a la SOD, como test indirecto de la liberación tónica de NO en el endotelio vascular.

La liberación basal de NO se evaluó indirectamente en anillos de ratas controles y ovariectomizadas, tras la inducción inicial de un tono vascular moderado (35-50% de la respuesta contráctil a PE 10^{-6} M) con una baja concentración de PE (10^{-7} M a 2×10^{-7} M). Sobre la meseta de contracción con PE, se añadió al baño de los tejidos SOD a distintas concentraciones (0.1, 1, 10, 100 y 150 U/ml).

Después del lavado y recuperación durante 60 minutos, se realizó una segunda curva de concentración-respuesta para la SOD, 15 minutos después de la adición de L-NAME 10^{-5} M en un número de 12 anillos.

3. Estudiar los posibles mecanismos fisiopatológicos de la disfunción endotelial presente en ratas hembras privadas crónicamente de Estrógenos.

3.1. Evaluar si la ovariectomía da lugar a una disminución en la producción de NO.

3.1.1. Estudio bioquímico de los niveles de Nitritos y Nitratos en los grupos de ratas castradas y sham.

Nos hemos referido previamente en el apartado de determinaciones bioquímicas.

3.1.2. Estudio de la respuesta hemodinámica de la rata consciente ante la inhibición de la síntesis de NO con L-NAME.

Se evaluó la respuesta hemodinámica a inyecciones intravenosas del inhibidor de la NO sintasa, N- ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (3 mg/kg + 50 μ g/kg/min durante 30 min) en ratas conscientes de los grupos castradas y sham, 8 semanas después de la ovariectomía o de la operación simulada.

3.2. Valorar la participación del stress oxidativo en ratas ovariectomizadas.

3.2.1. Estudio bioquímico de marcadores de stress oxidativo.

Se determinaron, tal y como se describió anteriormente, los niveles de lipoperóxido malondialdehído (MDA) y 4-hydroxialkenoles (HNE) como indicadores de la peroxidación lipídica, el status antioxidante total (TAS), grupos tiol reducidos (-SH) en el plasma de los grupos de ratas castradas y sham-control.

3.2.2. Efecto de la N-Acetil-Cisteína (NAC) en la la relajación de anillos de aorta inducida por ACh.

En el estudio de respuesta vascular de anillos de aorta in vitro, después de alcanzar una meseta de contracción estable con Fenilefrina (PE), se instiló N-Acetil-Cisteína (NAC, 10^{-5} M), como *scavenger* de radicales libres, y se volvió a realizar una curva con dosis acumulativas de Acetilcolina.

4. Comprobar si la THS con Estradiol puede prevenir estos cambios.

4.1. Prevención de cambios en la hemodinámica basal.

Se evaluaron los parámetros hemodinámicos basales (PAM, FC, IC, ICV) en ratas conscientes del grupo de ratas castradas y tratadas posteriormente con Estradiol en pellets, 8 semanas después de la ovariectomía o la operación simulada.

4.2. Prevención de la disminución de la producción de NO.

4.2.1. Estudio bioquímico de los niveles de Nitritos y Nitratos.

Tal y como se describió en la metodología de estudio, se determinaron los niveles de metabolitos del NO en el grupo de ratas tratadas con Estradiol.

4.2.2. Estudio de la respuesta hemodinámica de la rata consciente a la inhibición de la síntesis de NO con L-NAME.

Se evaluó la respuesta hemodinámica a inyecciones intravenosas del inhibidor de

la NO sintasa, N- ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (3 mg/kg + 50 μ g/kg/min durante 30 min) en ratas conscientes del grupo de ratas tratadas con Estradiol, 8 semanas después de la ovariectomía.

4.2.3. Protocolo para estudiar el stress oxidativo, como causa de disminución en la biodisponibilidad del ON.

Estudio bioquímico de los niveles de lipoperóxido malonaldehído (MDA) y 4-hydroxialkenoles (HNE) como indicadores de la peroxidación lipídica, el status antioxidante total (SAT), grupos tiol reducidos (-SH) en el grupo de ratas tratadas con Estradiol.

5. Interacción entre NO y Angiotensina II en los efectos cardiovasculares de la administración aguda de Estradiol.

Se diseñaron cuatro protocolos para evaluar las interacciones en la hemodinámica sistémica entre estrogénos, NO, y la angiotensina II (fig. xx). Estos protocolos se realizaron sobre ratas castradas 8 semanas.

Protocolo 5.1

Diseñado para determinar la respuesta aguda cardiovascular a la administración exógena de Estradiol (E_2 , 100 mg 17 β -Estradiol/kg en 25 μ l de alcohol etílico absoluto) en el **Grupo I** (n=9). Se infundió únicamente el vehículo para el E_2 en otro grupo de ratas, el **Grupo II** (n=5).

Los parámetros hemodinámicos fueron medidos antes de la administración de 17 β -Estradiol o el vehículo (tiempo 0) y 1, 2, y 3 horas después de la administración de 17 β -Estradiol.

Protocolo 5.1



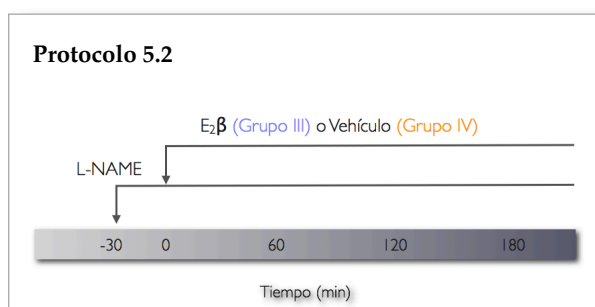
Protocolo 5.2

Diseñado para evaluar la forma en que el bloqueo en la síntesis de NO modifica la respuesta hemodinámica a 17β -Estradiol.

En el **Grupo III** (n=7), se realizó una infusión de L-NAME (bolo de $3 \mu\text{g} / \text{kg}$ junto con una infusión continua de $50 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$ en una solución de albúmina bovina al 0,5%), comenzando 30 minutos antes de la infusión de 17β -Estradiol.

En el **Grupo IV** (n=5), se administró la misma dosis de L-NAME y 30 minutos más tarde, se infundió el vehículo en lugar de 17β -Estradiol.

Se realizaron medidas hemodinámicas basales 30 minutos después de la administración de L-NAME (tiempo 0), y se volvieron a practicar determinaciones hemodinámicas a las 1, 2, y 3 h tras la administración de 17β -Estradiol o vehículo.



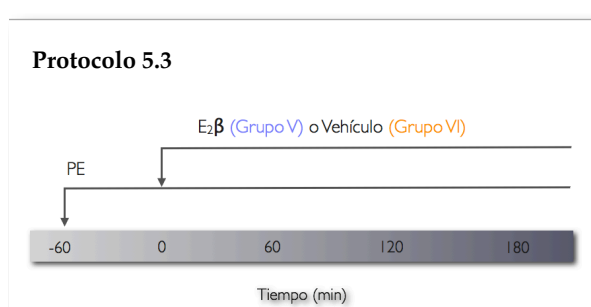
Protocolo 5.3

Diseñado para determinar los efectos hemodinámicos del Estradiol en presencia de un vasoconstrictor distinto de L-NAME, como la Fenilefrina (PE).

En el **Grupo V** (n=5), se infundió PE ($15 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{min}$) de forma continua, precisando 1 h para alcanzar un estado estable. Se administró 17β -Estradiol, tal y como se describe en los protocolos I y II.

En el **Grupo VI** (n=5), se dio la misma dosis de PE, administrándose el vehículo en lugar de Estradiol.

Se realizaron determinaciones hemodinámicas basales 60 minutos después de la administración de PE (tiempo 0), y se volvieron a practicar determinaciones hemodinámicas a las 1, 2, y 3 h tras la administración de 17β -Estradiol (**Grupo V**) o vehículo (**Grupo VI**).



Protocolo 5.4

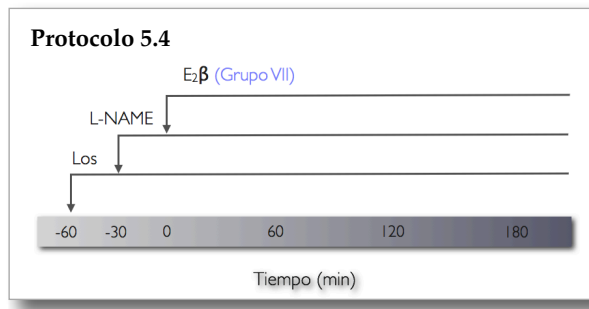
Diseñado para determinar el papel de la Angiotensina-II (AII) sobre los efectos cardiovasculares del 17 β -Estradiol en ratas a las que se les ha inhibido la producción de NO con L-NAME, que constituyen el **Grupo VII** (n=7).

En este Grupo, se administró Losartan, un antagonista de los receptores AT₁ de la Angiotensina-I (10 mg/kg) 30 minutos antes del inicio de la infusión de L-NAME.

Tras otro período de estabilización de 30 minutos, se tomaron determinaciones hemodinámicas antes de la administración de 17 β -Estradiol (tiempo 0) y 1, 2, y 3 h tras la infusión de 17 β -Estradiol.

Para investigar el papel de la A-II sobre los efectos hemodinámicos de 17 β -Estradiol en condiciones normales, se administró Losartan a otro Grupo de ratas, el **Grupo VIII** (n=5) 30 min antes de la infusión de Estradiol. El resto del protocolo fue el mismo que en el **Grupo VII**.

Se midió el Hematocrito en todos los protocolos antes de cualquier perfusión (tiempo control), tras L-NAME o Losartan + L-NAME (tiempo 0), y 3 horas después de 17 β -Estradiol o la administración de vehículo.



Para comprobar el grado de bloqueo de los receptores de la A-II en presencia de Losartan, se administró A-II (50 ng/kg, Sigma, St. Louis, MO) en forma de bolo, 10 minutos antes y 1 h después de la administración de Losartan y también al final del experimento, a los animales del protocolo 5.4.

La evidencia de la magnitud y la persistencia del bloqueo de los receptores se presenta en la **Tabla 2**.

	Respuesta presora a AT-II	
	mmHg	% inhibición
Antes de Losartan	37.3 $\pm$ 4.7	
Después de Losartan	4.3 $\pm$ 2.1	86 $\pm$ 7%
Final experimento	3.7 $\pm$ 1.5	88 $\pm$ 5%

Los valores son medias $\pm$ SE y representan el cambio en presión arterial media (MAP) tras angiotensina II (AT-II, 50 ng / kg); (n=4). El grado de inhibición se compara con las respuestas antes del bloqueo de los receptores.

Tabla 2. Efecto del Losartan sobre la respuesta presora a AT-II.

Al final del experimento se obtuvo 1 ml de sangre en cada animal de los **Grupos I y II** para determinar la Actividad de Renina Plasmática (PRA) y niveles de Estradiol.

IV ESTUDIO ESTADÍSTICO

IV.A. Estudio de la respuesta vascular de anillos de aorta in vitro.

Los datos se representan como medias $\pm$ error estándar de la media (SEM) de los parámetros medidos.

Se expresa la distinta respuesta a los vasodilatadores como el porcentaje de relajación del anillo vascular sobre la contracción máxima con Fenilefrina (PE). (Protocolos 2 - 3.2.2)

Estos resultados se analizaron mediante un análisis de varianza para muestras repetidas. Las medias se compararon con el test de rango múltiple de Duncan.

La concentración que produce la mitad del efecto máximo (EC_{50}) se calculó mediante regresión lineal con el paquete estadístico SigmaPlot 4.1, mostrándose los valores EC_{50} como $-\log(EC_{50})$, es decir, pEC_{50} .

El porcentaje de relajación conseguido con la dosis máxima de Acetil Colina (ACh), representado como E_{max} , y la EC_{50} fueron comparados mediante la prueba t de Student para muestras no pareadas.

Se consideraron diferencias significativas con $P < 0.05$.

IV.B. Estudio de función hemodinámica de la rata in vivo.

Todas las determinaciones hemodinámicas se muestran como la media $\pm$ error estándar de la media (SEM) de los parámetros medidos.

Se utilizó un análisis de varianza de una vía para medidas aleatorias, seguido de un test de rango múltiple de Duncan con el fin de comparar las diferencias en la hemodinámica basal entre los distintos grupos experimentales (Castradas, Sham y Castradas+THS) y ante la respuesta a L-NAME. (Protocolos 1 - 3.1.2 - 4.1 - 4.2.2)

También se aplicó un análisis de varianza para mediciones repetidas a fin de valorar los cambios en las variables hemodinámicas en el tiempo del experimento, las diferencias intragrupos y entre los distintos grupos experimentales. Posteriormente se aplicó el test de Bonferroni de rango múltiple para determinar las diferencias entre medias. (Protocolo 5)

Se consideraron diferencias significativas con $P < 0.05$.

IV.C. Determinaciones bioquímicas.

Los datos se representan como medias $\pm$ error estándar de la media (SEM) de los parámetros medidos.

Las diferencias entre ratas castradas, controles y tratadas con estrógenos se analizaron mediante un análisis de varianza de una vía para muestras aleatorias. Las medias se compararon con el test de rango múltiple de Duncan. (Protocolos 3.1 - 3.2.1 - 4.2.1 - 4.2.3)

Se consideraron diferencias significativas con $P < 0.05$.



RESULTADOS

Se describen a continuación en función de los objetivos propuestos anteriormente:

Objetivo 1

Evaluar si la deprivación crónica de Estrógenos tras ovariectomía induce cambios hemodinámicos en la rata hembra.

Nuestro objetivo inicial era la evaluación de ciertos parámetros hemodinámicos basales en ratas castradas y controles, para comprobar si la castración y por tanto, la deprivación estrogénica, inducía cambios en estas variables: Presión Arterial Media (PAM), Índice de Conductancia Vascular (ICV), Índice Cardíaco (IC) y Frecuencia Cardíaca (FC).

En laS **Fig 16 A,B,C,D** se muestran las medias para los valores de la hemodinámica sistémica basal en los grupos control-sham (n=6) y ovariectomizadas (n=8).

Fig. 16A. Medias $\pm$ ES de Presión Arterial Media (PAM) en condiciones basales en los grupos experimentales Sham-control (n=6) y Castradas (n=8).

* $P < 0.05$ vs Sham.

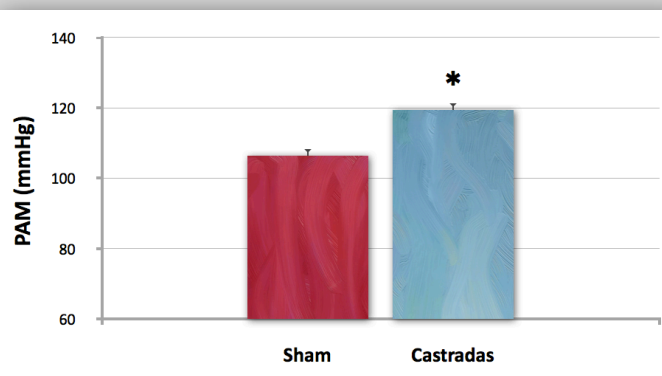
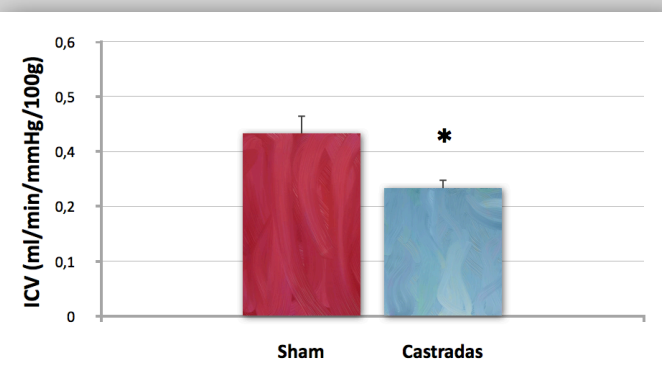


Fig. 16B. Medias $\pm$ ES de Índice de Conductancia Vascular (ICV) en condiciones basales en los grupos experimentales Sham-control (n=6) y Castradas (n=8).

* $P < 0.05$ vs Sham.



Objetivo 1

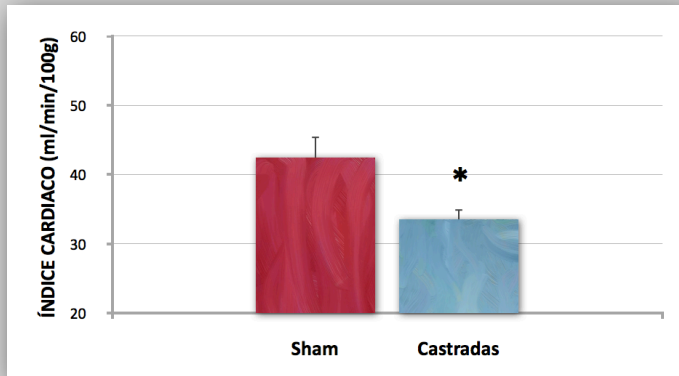


Fig. 16C. Medias $\pm$ ES de Índice Cardíaco (IC) en condiciones basales en los grupos experimentales **Sham-control** (n=6) y **Castradas** (n=8).

* $P < 0.05$ vs Sham.

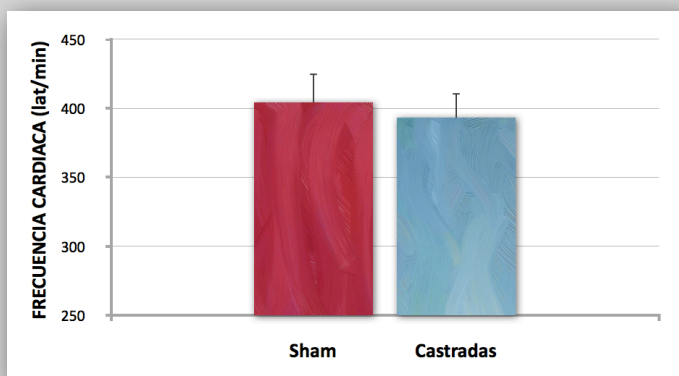


Fig. 16D. Medias $\pm$ ES de Frecuencia Cardíaca (FC) en condiciones basales en los grupos experimentales **Sham-control** (n=6) y **Castradas** (n=8).

En ratas ovariectomizadas, la PAM fue de 119 ± 3 frente a 109 ± 5 mmHg en ratas sham-control ($p < 0,05$). Esta mayor presión arterial se acompañó de una reducción del nivel de conductancia vascular sistémica ($0,28 \pm 0,02$ frente a $0,40 \pm 0,04$ mL/min/mmHg/100g).

El IC fue menor al compararse con el grupo control ($33,52 \pm 1,54$ frente a $42,41 \pm 3,10$ mL/min/100 g).

No hubo diferencia en la frecuencia cardíaca basal entre los dos grupos de ratas ($393,40 \pm 18,78$ frente a $404,29 \pm 21,62$ lat/min).

Podemos apreciar como la castración y por tanto, la deprivación estrogénica, altera el status hemodinámico en la rata hembra.

Objetivo 2

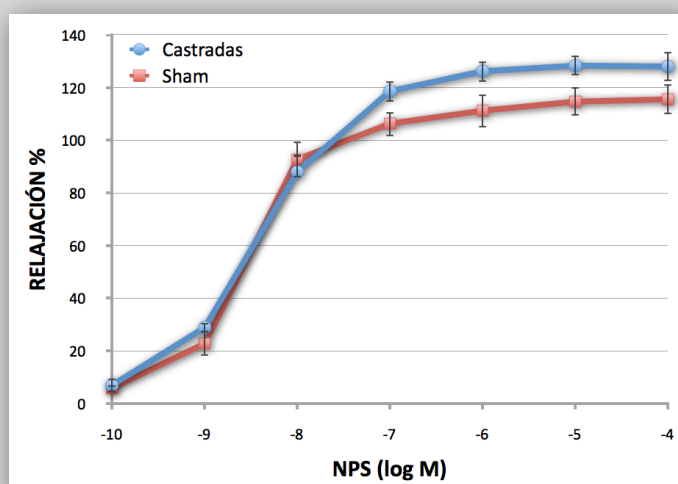
Determinar si estos cambios se acompañan de una disfunción del endotelio vascular.

2.1. Respuesta de relajación de anillos de aorta a la Acetilcolina (ACh) y Nitroprusiato Sódico (NP).

Se realizó el estudio de la función endotelial evaluando la respuesta ante diversos vasodilatadores endotelio dependientes e independientes, en anillos de aorta in vitro.

El Nitroprusiato Sódico (NPS), un vasodilatador independiente del endotelio, produjo una relajación dosis-dependiente en anillos pre-contraídos de aorta, sin diferencias significativas en la respuesta relajante a NPS, tanto en anillos de aorta de ratas intactas como de ooforectomizadas (Fig. 17).

Fig. 17. Medias $\pm$ ES del porcentaje de relajación inducido por dosis acumulativas de Nitroprusiato Sódico (NPS) durante la contracción vascular con Felilefrina (PE 10^{-6} M) en anillos de aorta de los grupos experimentales Sham-control (n=7) y Castradas (n=13).



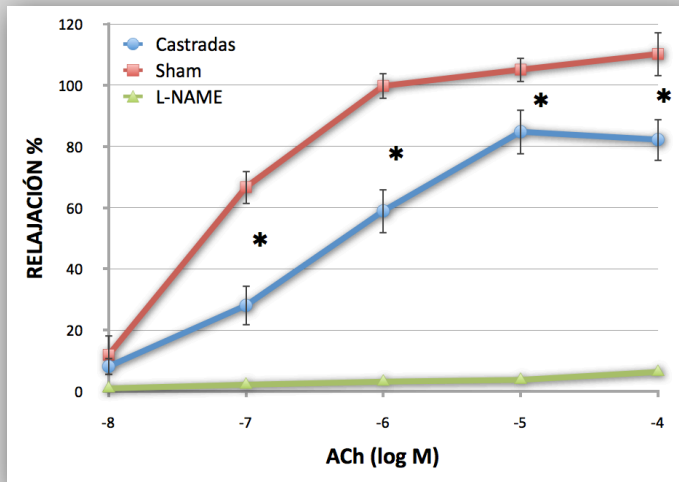


Fig. 18. Medias $\pm$ ES del porcentaje de relajación inducido por dosis acumulativas de **Acetil Colina (ACh)** durante la contracción vascular con Fenilefrina (PE 10^{-6} M) en anillos de aorta de los grupos experimentales **Sham-control** (n=11) y **Castradas** (n=12). Curva de relajación de ACh tras preincubación con **L-NAME** (n=12).

* $P < 0.05$ **Castradas** vs **Sham**.

Cuando utilizamos un vasodilatador dependiente del endotelio, la Acetilcolina (ACh), se produjo una relajación concentración-dependiente de anillos de aorta de rata precontraídos con Fenilefrina (PE).

La magnitud de la respuesta relajante a ACh de los anillos de aorta de ratas ooforectomizadas fue **significativamente** más baja que la de ratas con ovarios intactos a partir de la dosis de ACh 10^{-7} M, hasta su efecto máximo, a dosis de ACh 10^{-4} M. (**Fig. 18**)

El efecto de la ACh fue completamente abolido por la pre-incubación de los anillos de aorta con L-NAME (10^{-6} M).

Estos resultados sugieren que la **deprivación estrogénica** en este modelo experimental altera la vasodilatación mediada por endotelio, pero no modifica la vasodilatación por acción directa sobre el músculo liso vascular.

2.2. Respuesta de relajación de anillos de aorta a la Superóxido-Dismutasa (SOD).

Como se ha descrito previamente, la Superóxido Dismutasa (SOD) elimina el anión superóxido, que en condiciones normales inactiva o destruye el NO, por tanto, mediante la supresión de este anión sobre un vaso precontraído, se pondrá de manifiesto el efecto vascular del NO liberado basalmente, ya que el anión superóxido no tendría efecto alguno sobre el NO. (Langenstroer and Pieper 1992)

La administración al baño de SOD produjo una respuesta relajante dosis-dependiente, frente a la contracción con PE, como puede apreciarse en la **Fig. 19**.

La magnitud de la respuesta relajante a la SOD fue significativamente menor en los anillos de aorta de ratas castradas frente a la de ratas intactas a las dosis de 1, 10 y 100 UI/mL, lo que sugiere una menor li-

beración tónica de NO por parte del endotelio.

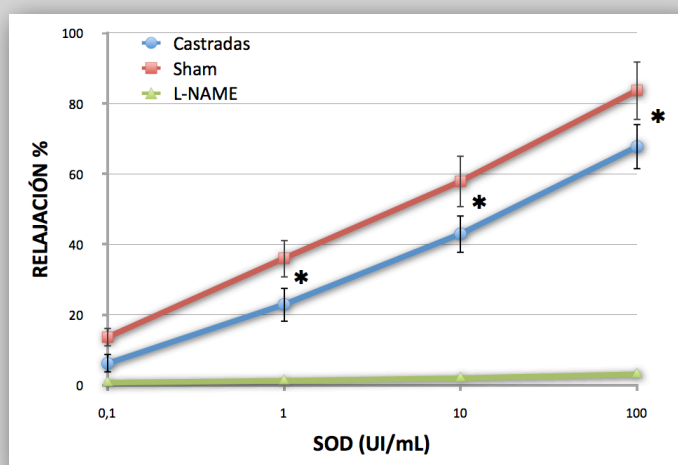
La pre-incubación con L-NAME (10^{-6} M) suprimió la relajación inducida por la SOD en ambos grupos de anillos de aorta, lo que confirma que dicha vasorelajación responde a la síntesis y liberación de NO.

Estos hallazgos sugieren que la deprivación estrogénica provoca una disminución de la liberación tónica de NO por parte del endotelio.

Fig. 19. Medias $\pm$ ES del porcentaje de relajación inducido por concentraciones diferentes de Superóxido Dismutasa (SOD). Los anillos de aorta fueron moderadamente contraídos (30-50% de la contracción producida con PE 10^{-6} M) con PE 10^{-7} M.

Sham-control (n=11) y Castradas (n=12). Curva de relajación de SOD tras preincubación con L-NAME (n=12).

* $P < 0.05$ Castradas vs Sham.



Objetivo 3

Estudiar los posibles mecanismos fisiopatológicos de la disfunción endotelial presente en ratas hembras privadas crónicamente de Estrógenos.

Hasta ahora hemos comprobado que la castración y por ende, la deprivación de estrógenos, implica una alteración hemodinámica en la rata, que parece ser mediada por una disfunción endotelial.

Para ello nos planteamos valorar la existencia de una disminución en la producción de NO, y de ser así, si esta disminución pudiera deberse en parte a un incremento del stress oxidativo.

Vamos a intentar ahondar en los mecanismos fisiopatológicos que pudieran mediar esta disfunción endotelial.

3.1. Evaluar si la ovariectomía da lugar a una disminución en la producción de NO.

3.1.1. Estudio bioquímico de los niveles de Nitritos y Nitratos en los grupos de ratas castradas y sham.

Según este estudio, los niveles plasmáticos de Nitritos y Nitratos fueron significativamente más bajos en el grupo de ratas Castradas (n=7) que en el Sham-control (n=7), disminuyendo alrededor de un 30%.

Estos resultados sugieren una disminución en la producción de NO en ratas con deprivación estrogénica.

Los resultados se muestran en la **Fig 20**.

Fig. 20. Medias $\pm$ ES de la concentración de Nitritos/Nitratos plasmáticos en los grupos experimentales Sham-control (n=7) y Castradas (n=7).

* $P < 0.05$ Castradas vs Sham.



3.1.2. Estudio de la respuesta hemodinámica de la rata consciente ante la inhibición de la síntesis de NO con L-NAME.

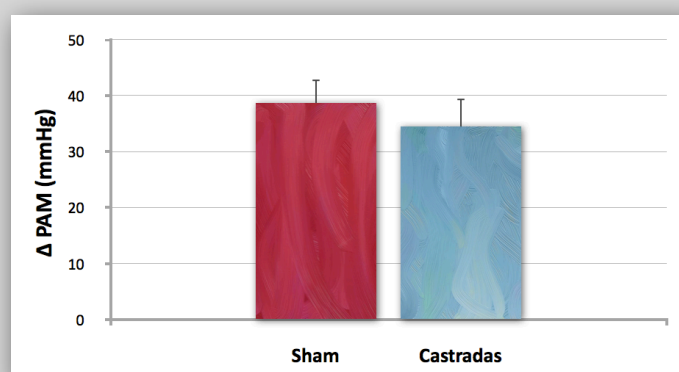
Por otra parte, nos planteamos utilizar un inhibidor de la NO sintasa, N- ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) con el fin de valorar si las diferencias hemodinámicas observadas en las ratas castradas se deben a una menor participación del NO en el control del tono vascular basal.

Para ello evaluamos la respuesta hemodinámica a inyecciones intravenosas de L-NAME (3 mg/kg + 50 µg/kg/min du-

rante 30 min) en ratas conscientes de los grupos castradas y sham, 8 semanas después de la ovariectomía o la operación simulada.

La administración de L-NAME en el grupo sham-control y en el de ratas ovariectomizadas provocó un aumento similar en la PAM hasta 145 ± 6 y 153 ± 11 mmHg, respectivamente, a los 30 minutos de su administración intravenosa. (**Fig. 21A**).

Fig. 21A. Respuesta hemodinámica presora a la administración de N- ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 3 mg/kg + 50 µg/kg/min durante 30 min) en los grupos experimentales Sham-control (n=6) y Castradas (n=8). Expresada en incrementos de Presión Arterial Media (Δ PAM)



Objetivo 3

Esta respuesta presora al L-NAME se acompañó por una disminución de la Frecuencia Cardíaca, Índice Cardíaco y de Conductancia Vascular en los grupos estudiados (Fig. 21 B,C,D).

El descenso de la FC fue significativamente mayor en el grupo de ratas ovariectomizadas en comparación con el de sham-control.

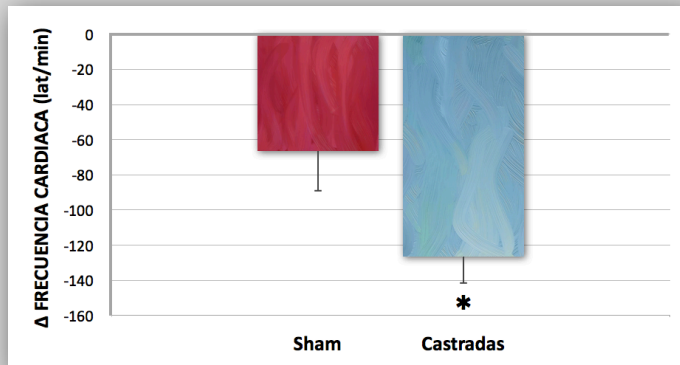


Fig. 21B. Respuesta de la Frecuencia Cardíaca (FC) a la administración de N- ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 3 mg/kg + 50 μ g/kg/min durante 30 min) en los grupos experimentales Sham-control (n=6) y Castradas (n=8).

* $P < 0.05$ Castradas vs Sham.

Expresada en incrementos de Frecuencia Cardíaca (Δ FC)



Fig. 21C. Valoración del Índice Cardíaco (IC) como respuesta a la administración de N- ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 3 mg/kg + 50 μ g/kg/min durante 30 min) en los grupos experimentales Sham-control (n=6) y Castradas (n=8).

Expresado en incrementos de Índice Cardíaco (Δ IC)



Fig. 21D. Valoración del Índice de Conductancia Vascular (ICV) como respuesta a la administración de N- ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 3 mg/kg + 50 μ g/kg/min durante 30 min) en los grupos experimentales Sham-control (n=6) y Castradas (n=8).

* $P < 0.05$ Castradas vs Sham.

Expresado en incrementos de Índice de Conductancia Vascular (Δ ICV)

No encontramos diferencias significativas al valorar el descenso del IC tras la administración de L-NAME, aunque fue ligeramente menor en el grupo sham-control ($-16,6 \pm 3,5$ mL/min/100 gr) que en el de ratas castradas ($-12,3 \pm 1,5$ mL/min/100 gr). (Fig. 21C).

Sin embargo, encontramos una disminución del Índice de Conductancia Vascular (ICV) significativamente menor en el grupo de animales con deprivación estrogénica ($-0,14 \pm 0,01$ vs $-0,22 \pm 0,03$ mL/

min/mmHg/100 g), como respuesta a la administración de L-NAME, a pesar de la similitud en el incremento de PAM descrito anteriormente. (Fig. 21D)

La inhibición de la síntesis de NO con L-NAME provoca un menor cambio en el ICV en ratas castradas frente a las sham.

3.2. Valorar la participación del stress oxidativo en ratas ovariectomizadas.

La disfunción endotelial puede deberse, además de a la disminución de producción de NO, al incremento de su elimina-

ción por parte de los radicales libres producidos por stress oxidativo, de forma que nos dispusimos a estudiar dicha posibilidad de diversas maneras.

3.2.1. Estudio bioquímico de marcadores de stress oxidativo.

Determinando los marcadores de stress oxidativo, podemos conocer si éste se encuentra incrementado en las ratas sometidas a deprivación estrogénica.

Por tanto, la deprivación estrogénica incrementa los marcadores de stress oxidativo.

En comparación con el grupo de ratas con operación simulada ($n=7$), la ovariectomía ($n=7$) indujo un incremento significativo en lipoperóxidos plasmáticos, acompañado de un menor tatus Antioxidante Total (SAT) y una disminución en los niveles plasmáticos de grupos sulfhidrilo (-SH). (Fig 22 A,B,C).

Objetivo 3

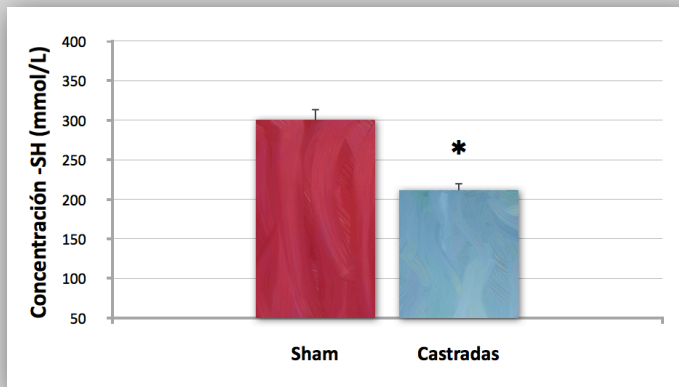


Fig. 22A. Medias $\pm$ ES de la **concentración de grupos tiol reducidos (Grupos -SH)** en plasma de los grupos experimentales **Sham-control** (n=7) y **Castradas** (n=7).
* $P < 0.05$ **Castradas** vs **Sham**.



Fig. 22B. Medias $\pm$ ES del **Status Antioxidante Total (SAT)** en plasma de los grupos experimentales **Sham-control** (n=7) y **Castradas** (n=7).
* $P < 0.05$ **Castradas** vs **Sham**.

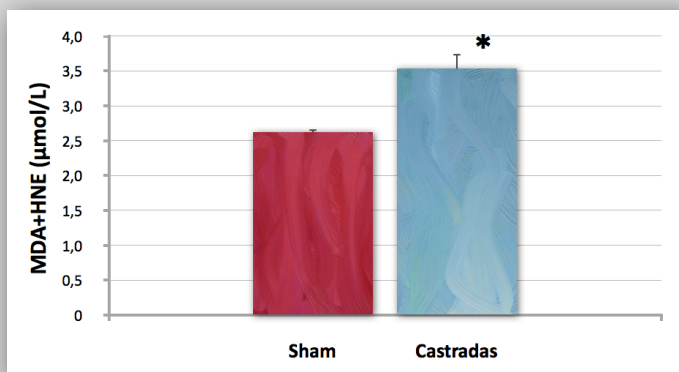


Fig. 22C. Medias $\pm$ ES de la concentración de **lipoperóxidos plasmáticos** en plasma de los grupos experimentales **Sham-control** (n=7) y **Castradas** (n=7).
MDA: Malonaldehído; HNE: (E)-4-OH-2-nonenal.
* $P < 0.05$ **Castradas** vs **Sham**.

3.2.2. Efecto de la NAC en la relajación de anillos de aorta inducida por ACh.

A partir del resultado anterior, nos planteamos entonces si la alteración de la función del endotelio vascular secundaria a la falta de estrógenos fuera debida al incremento de radicales libres circulantes, y si la disminución o eliminación de éstos podría mejorar la función endotelial.

Para ello decidimos utilizar N-ACetil Cisteína (NAC) como *scavenger* en el estudio de respuesta vascular de anillos de aorta in vitro, después de alcanzar una meseta de contracción estable con Fenilefrina (PE).

Tabla 3. La Tabla muestra los valores pEC_{50} y E_{max} (%) derivados del análisis de los datos de dosis-respuesta para la relajación inducida por ACh en presencia o ausencia de N-Acetil-Cisteína (NAC 10^{-5} M).

* $P < 0.05$ comparado con el respectivo grupo de castradas

† $P < 0.05$ comparado con el grupo sham

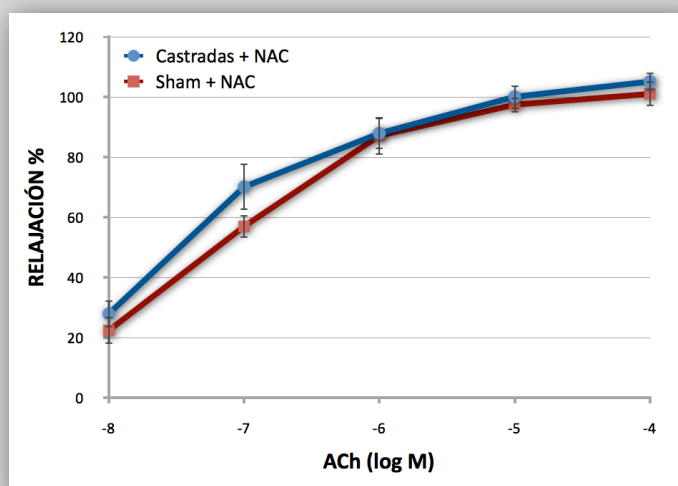
Grupos	n	pEC_{50}	E_{max} (%)
Sham	11	6.97 ± 0.09	109.91 ± 7.08
Castradas	12	6.54 ± 0.16 †	80.94 ± 7.22 †
Sham + NAC	11	7.23 ± 0.14	98.82 ± 3.31
Castradas + NAC	9	7.56 ± 0.23 *	101.78 ± 3.77 *

Añadimos al baño la N-Acetil-Cisteína (NAC, 10^{-5} M), realizando posteriormente una nueva curva dosis-respuesta con dosis acumulativas de ACh, en presencia de NAC, y observamos que en los anillos de aorta de ratas con ovarios intactos, la adición de NAC (10^{-5} M) no alteró la respuesta relajante concentración-dependiente inducida por ACh, como puede apreciarse en la **Tabla 3**.

En contraste, en los anillos de aorta de animales ooforectomizados, la potencia de la relajación vascular inducida por ACh fue significativamente mayor después de la adición de NAC (10^{-5} M).

Después de la preincubación con NAC, no hubo diferencias significativas en la respuesta relajante a la ACh entre los anillos de aorta de ovario de ratas intactas y ooforectomizadas (**Fig. 23**).

Fig. 23. Medias $\pm$ ES del porcentaje de relajación inducido por dosis acumulativas de Acetil Colina (ACh), en presencia de NAC (10^{-5} M), durante la contracción vascular con Felilefrina (PE 10^{-6} M) en anillos de aorta de los grupos experimentales Sham-control (n=11) y Castradas (n=9).



Objetivo 4

Comprobar si la THS con Estradiol puede prevenir estos cambios.

Hasta ahora hemos descrito que la castración conlleva una deprivación estrogénica en la rata que altera su función cardiovascular de forma secundaria a una alteración endotelial.

Esta alteración parece ser debida en parte a una disminución en la producción de NO y a un incremento del stress oxidativo.

Nos planteamos a partir de aquí si la terapia sustitutiva con Estradiol pudiera prevenir estos cambios anteriormente descritos, y para ello realizamos los mismos experimentos descritos previamente en un grupo de ratas castradas a las que le administramos un sistema de liberación prolongada de Estradiol.

4.1. Prevención de cambios en la hemodinámica basal.

Volvimos a evaluar los parámetros hemodinámicos basales (PAM, FC, IC, ICV) en ratas conscientes del grupo de ratas castradas y tratadas posteriormente con Estradiol en pellets, 8 semanas después de la ovariectomía o la operación simulada.

La PAM (**Fig. 24A**) fue 13 mmHg más baja en las ratas ovariectomizadas con tratamiento sustitutivo con estrógenos en comparación con la de las ratas castradas sin tratamiento estrogénico (119 ± 3 en ratas ovariectomizadas a 106 ± 3 mmHg en ratas ovariectomizadas tratadas) ($p < 0,05$).

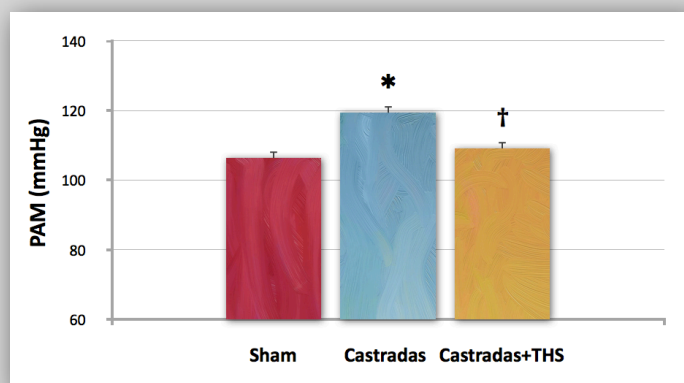


Fig. 24A. Medias $\pm$ ES de Presión Arterial Media (PAM) en condiciones basales en los grupos experimentales Sham-control (n=6), Castradas (n=8) y Castradas con THS con estrógenos (n=6).

* $P < 0.05$ Castradas vs Sham

† $P < 0.05$ Castradas+THS vs Castradas

Esta menor presión arterial se acompañó de una conductancia vascular (ICV) significativamente más alta ($p<0,05$) en un 66% ($0,47\pm0,02$ vs $0,28\pm0,02$ mL/min/mmHg/100g) (Fig. 24B) y un Índice

Cardíaco (IC) superior en un 52% ($p<0,05$) en comparación con el de las ratas ovariectomizadas no tratadas ($50,98\pm2,46$ vs $33,52\pm1,54$ mL/min/100g). (Fig. 24C)

Fig. 24B. Medias $\pm$ ES de **Índice de Conductancia Vascular (ICV)** en condiciones basales en los grupos experimentales Sham-control (n=6), Castradas (n=8) y Castradas con THS con estrógenos (n=6).

* $P<0.05$ Castradas vs Sham

† $P<0.05$ Castradas+THS vs Castradas

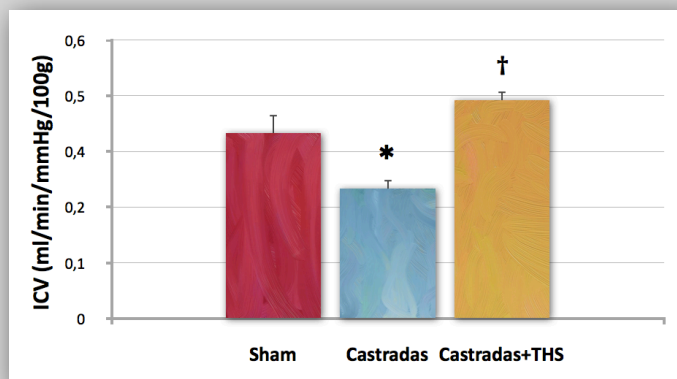


Fig. 24C. Medias $\pm$ ES de **Índice Cardíaco (IC)** en condiciones basales en los grupos experimentales Sham-control (n=6), Castradas (n=8) y Castradas con THS con estrógenos (n=6).

* $P<0.05$ Castradas vs Sham

† $P<0.05$ Castradas+THS vs Castradas

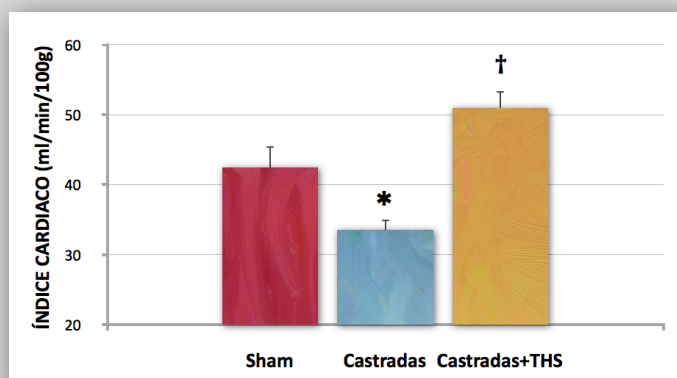
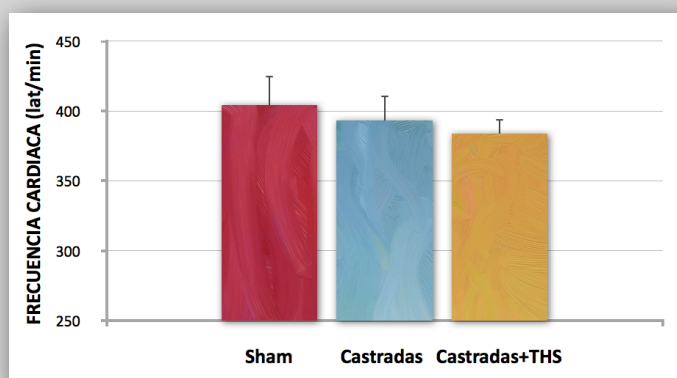


Fig. 24D. Medias $\pm$ ES de **Frecuencia Cardíaca (FC)** en condiciones basales en los grupos experimentales Sham-control (n=6), Castradas (n=8) y Castradas con THS con estrógenos (n=6).



No hubo diferencia en la frecuencia cardiaca basal entre los tres grupos de ratas. (Fig. 24D)

Como se indica en todas las figuras anteriores, los animales ovariectomizados con el tratamiento sustitutivo con estrógenos muestran valores hemodinámicos similares al grupo sham-control.

En resumen, puede apreciarse a tenor de estos resultados, que el tratamiento sustitutivo con estrógenos previene los cambios hemodinámicos observados tras la ovariectomía, siendo dichos parámetros similares a los de las ratas controles.

4.2. Prevención de la disminución de la producción de NO.

4.2.1. Estudio bioquímico de los niveles de Nitritos y Nitratos.

Tal y como se describió en la metodología de estudio, se determinaron los niveles de metabolitos del NO en el grupo de ratas tratadas con Estradiol. (Fig. 25)

Al realizar la determinación bioquímica de los niveles de metabolitos plasmáticos

del NO (NOx) se encontró que, una vez más, la terapia sustitutiva con estrógenos incrementó de manera significativa ($p < 0,05$) los niveles plasmáticos de NOx a un nivel similar al observado en el grupo sham-control (Sham $30,26 \pm 2,1$ Castradas $21,26 \pm 2,7$ Castradas +THS $30,04 \pm 0,74$ $\mu\text{mol/L}$)

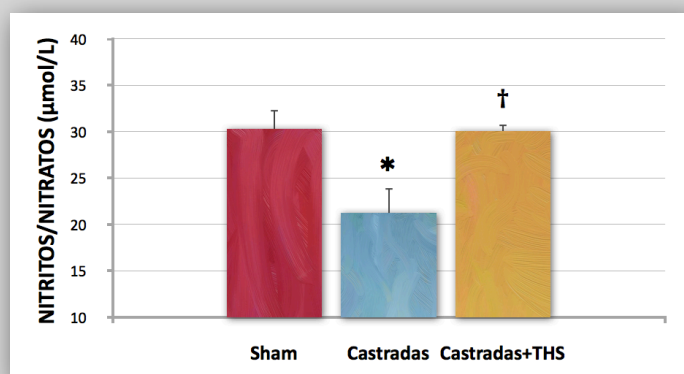


Fig 25. Medias $\pm$ ES de la concentración de Nitritos/Nitratos plasmáticos en los grupos experimentales Sham-control (n=7), Castradas (n=7) y Castradas con THS con estrógenos (n=7).

* $P < 0.05$ Castradas vs Sham.

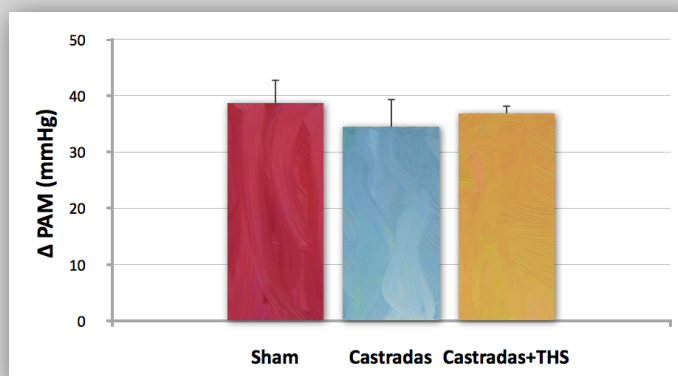
† $P < 0.05$ Castradas + THS vs Castradas

4.2.2. Estudio de la respuesta hemodinámica de la rata consciente a la inhibición de la síntesis de NO con L-NAME.

Se evaluó la respuesta hemodinámica a la administración intravenosa del inhibidor de la NO sintasa, N- ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME) (3 mg/kg + 50 μ g/kg/min durante 30 min) en ratas conscientes del grupo de ratas tratadas con Estradiol, 8 semanas después de la ovariectomía o la operación simulada.

Cuando estudiamos la respuesta presora ante la inhibición de la NO sintasa, no encontramos cambios en dicha respuesta en el grupo de terapia sustitutiva con estrógenos sobre el grupo de ratas castradas ($36,87 \pm 1,56$ en grupo THS frente a $34,43 \pm 5,02$ mmHg en castradas, referidos a incrementos de PAM). (**Fig. 26A**)

Fig. 26A. Respuesta hemodinámica presora a la administración de N- ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 3 mg/kg + 50 μ g/kg/min durante 30 min) en los grupos experimentales Sham-control (n=6), Castradas (n=8) y Castradas con THS con estrógenos (n=6). Expresada en incrementos de Presión Arterial Media (Δ PAM)



Ya se describió anteriormente que la disminución del IC producido por L-NAME en ratas ovariectomizadas, fue menor que la producida en ratas sham-control ($-16,6 \pm 3,5$ mL/min/100 gr), sin ser dicha diferencia estadísticamente significativa.

Sin embargo, este descenso en el IC fue más pronunciado en el grupo de ratas

castradas con terapia estrogénica en comparación con el de las ratas ovariectomizadas, alcanzando una significación estadística ($p < 0,05$) ($-21,29 \pm 2,15$ en grupo castradas+THS vs $-12,33 \pm 1,56$ mL/min/100g en grupo castradas). (**Fig. 26D**)



Fig. 26B. Respuesta de la **Frecuencia Cardíaca (FC)** a la administración de N- ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 3 mg/kg + 50 μ g/kg/min durante 30 min) en los grupos experimentales **Sham-control** (n=6), **Castradas** (n=8) y **Castradas con THS** con estrógenos (n=6).

Expresada en **incrementos de Frecuencia Cardíaca (Δ FC)**

* P<0.05 **Castradas** vs **Sham**



Fig. 26C. Valoración del **Índice de Conductancia Vascular (ICV)** como respuesta a la administración de N- ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 3 mg/kg + 50 μ g/kg/min durante 30 min) en los grupos experimentales **Sham-control** (n=6), **Castradas** (n=8) y **Castradas con THS** con estrógenos (n=6).

Expresado en **incrementos de Índice Cardíaco (Δ ICV)**

* P<0.05 **Castradas** vs **Sham**.

† P<0.05 **Castradas+THS** vs **Castradas**

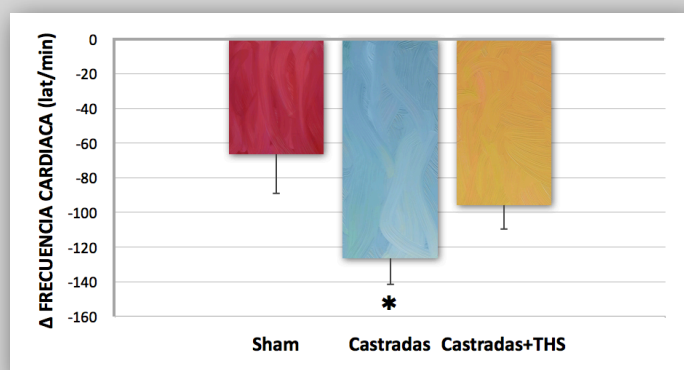


Fig. 26D. Valoración del **Índice Cardíaco (IC)** como respuesta a la administración de N- ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 3 mg/kg + 50 μ g/kg/min durante 30 min) en los grupos experimentales **Sham-control** (n=6), **Castradas** (n=8) y **Castradas con THS** con estrógenos (n=6).

Expresado en **incrementos de Índice Cardíaco (Δ IC)**

† P<0.05 **Castradas+THS** vs **Castradas**

La terapia sustitutiva con estrógenos restauró la respuesta de la conductancia vascular (ICV) producida por inhibición de la NOS con L-NAME, consiguiendo una mayor disminución, estadísticamente significativa, en ratas castradas tratadas con estrógenos en comparación con las ovariectomizadas sin tratamiento sustitutivo ($-0,26 \pm 0,01$ en grupo Castradas+THS vs $-0,14 \pm 0,02$ mL/min/mmHg/100g). (Fig. 26C)

La disminución ligeramente inferior de la FC en el grupo de ratas castradas tratadas con THS frente a las castradas no alcanza significación estadística. (Fig. 26B)

En resumen, el tratamiento crónico sustitutivo con estrógenos restauró en las ratas ovariectomizadas la respuesta hemodinámica alterada tras la administración de L-NAME, con respecto a los animales controles.

4.2.3. Estudio del stress oxidativo, como causa de disminución en la biodisponibilidad del NO.

Realizamos un estudio bioquímico de los niveles de lipoperóxido malonaldehído (MDA) y 4-hydroxialkenoles (HNE) como indicadores de la peroxidación lipídica, el status antioxidante total (SAT), grupos tiol reducidos (-SH) en el grupo de ratas tratadas con Estradiol.

La terapia sustitutiva con estrógenos indujo un significativo incremento en el TAS plasmático en ratas con THS ($1,25 \pm 0,02$ mmol/L en Castradas+THS vs $0,96 \pm 0,02$ mmol/L en Castradas) y en los grupos -SH ($331,86 \pm 19,0$ mmol/L en Castradas+THS vs $211,71 \pm 9,6$ mmol/L en Castradas), asociado a un descenso en la concentración de lipoperóxidos plasmáticos ($2,85 \pm 0,06$ μ mol/L en Castradas+THS vs $3,54 \pm 0,21$ μ mol/L en Castradas).

Fig 27A. Medias $\pm$ ES del Status Antioxidante Total (SAT) en plasma de los grupos experimentales Sham-control (n=7), Castradas (n=7) y Castradas con THS con estrógenos (n=7).

* $P < 0.05$ Castradas vs Sham

† $P < 0.05$ Castradas+THS vs Castradas

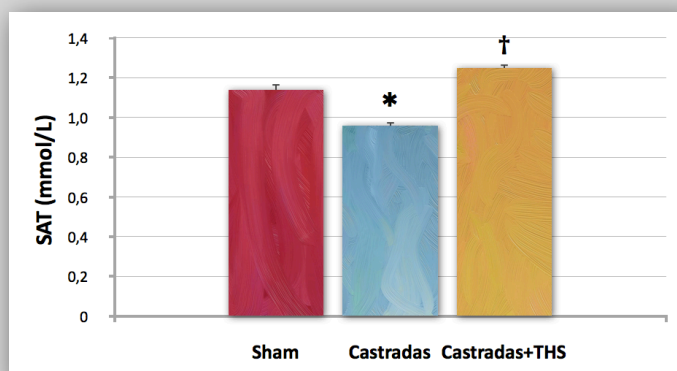
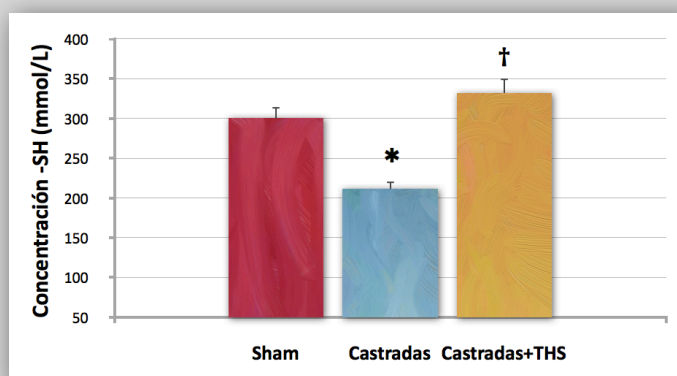


Fig. 27B. Medias $\pm$ ES de la concentración de grupos tiol reducidos (Grupos -SH) en plasma de los grupos experimentales Sham-control (n=7), Castradas (n=7) y Castradas con THS con estrógenos (n=7).

* $P < 0.05$ Castradas vs Sham

† $P < 0.05$ Castradas+THS vs Castradas



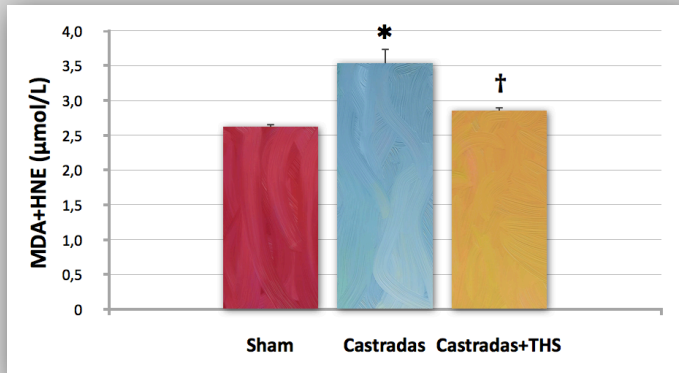


Fig. 27C. Medias $\pm$ ES de la **concentración de lipoperóxidos plasmáticos** en plasma de los grupos experimentales **Sham-control** (n=7), **Castradas** (n=7) y **Castradas con THS** con estrógenos (n=7).

MDA: Malonaldehído; HNE: (E)-4-OH-2-nonenal.

* $P < 0.05$ **Castradas** vs **Sham**

† $P < 0.05$ **Castradas+THS** vs **Castradas**

Estos parámetros presentaron valores similares a los de los animales sham-control. (Fig. 27 A,B,C)

Estos resultados muestran como el tratamiento crónico sustitutivo con estrógenos en ratas castradas equipara los marcadores bioquímicos de stress oxidativo a las ratas con actividad ovárica conservada.

Objetivo 5

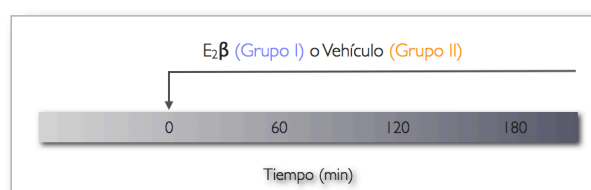
Interacción entre NO y Angiotensina II en los efectos cardiovasculares de la administración aguda de Estradiol.

Los resultados se presentan estructurados sobre los cuatro protocolos experimentales diseñados para la evaluación de las interacciones en la hemodinámica sistémica

entre estrógenos, NO, y Angiotensina II.

Estos protocolos se realizaron sobre ratas castradas 8 semanas.

Protocolo 5.1.



Diseñado para determinar la respuesta aguda cardiovascular al E₂ (100 mg 17β-Estradiol/kg en 25 µl de alcohol etílico absoluto) en el **Grupo I** (n=9). El vehículo para el estrógeno fue infundido en otro Grupo de ratas, el **Grupo II** (n=5).

res a los informados anteriormente en nuestro laboratorio. (Hernandez, Ingles et al. 1991) (Hernandez, Quesada et al. 1995)

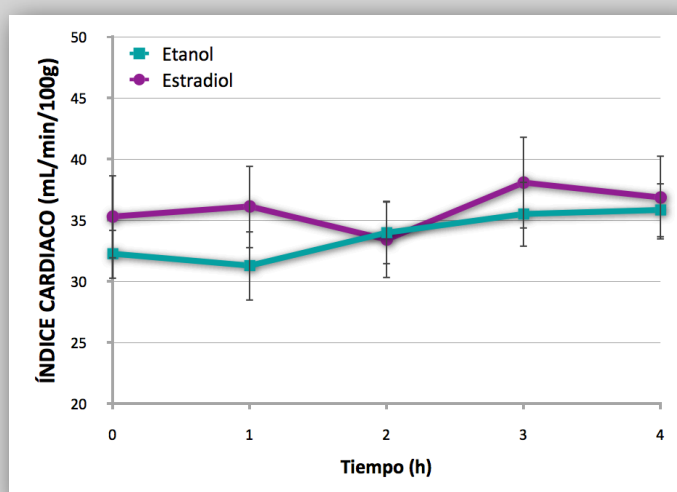
Los valores basales en el tiempo 0 para todos los parámetros cardiovasculares no difieren entre los dos grupos tratados con 17β-Estradiol o vehículo y fueron simila-

En el **Grupo I**, la administración de **Estradiol** no tuvo un efecto significativo sobre los parámetros hemodinámicos estudiados: PAM, IC, el Índice de Volumen Sistólico (IVS), y las RPT.

Fig. 28A. Medias ± ES de Índice Cardíaco (IC) tras la administración de 17β-Estradiol sistémico y vehículo (Etanol) en ratas Castradas conscientes.

Grupo I. 17β-Estradiol (n=9)

Grupo II. Etanol (n=5)



Objetivo 5

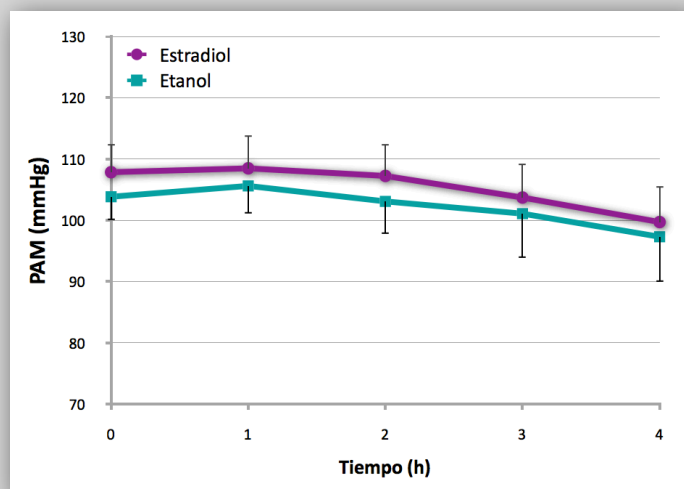


Fig. 28B. Medias $\pm$ ES de **Presión Arterial Media (PAM)** tras la administración de 17β -Estradiol sistémico y vehículo (Etanol) en ratas Castradas conscientes.

Grupo I. 17β -Estradiol (n=9)

Grupo II. Etanol (n=5)

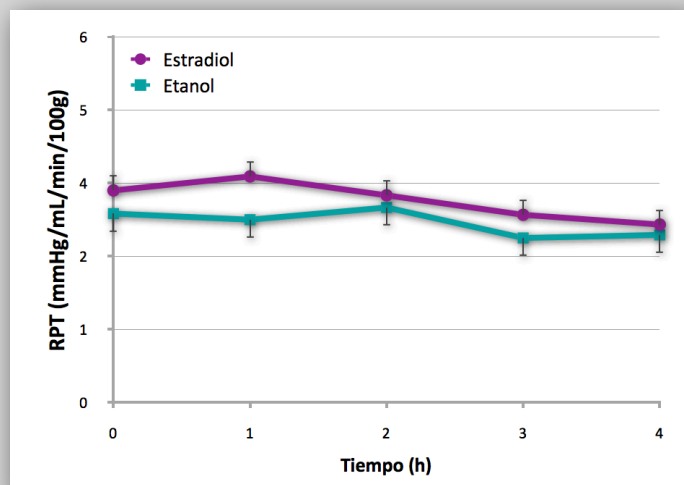


Fig. 28C. Medias $\pm$ ES de **Resistencias Periféricas Totales (RPT)** tras la administración de 17β -Estradiol sistémico y vehículo (Etanol) en ratas Castradas conscientes.

Grupo I. 17β -Estradiol (n=9)

Grupo II. Etanol (n=5)

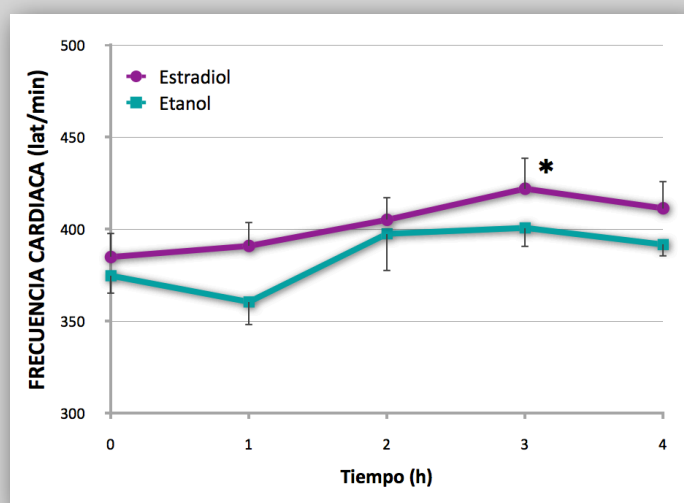


Fig. 28D. Medias $\pm$ ES de **Frecuencia Cardiaca (FC)** tras la administración de 17β -Estradiol sistémico y vehículo (Etanol) en ratas Castradas conscientes.

Grupo I. 17β -Estradiol (n=9)

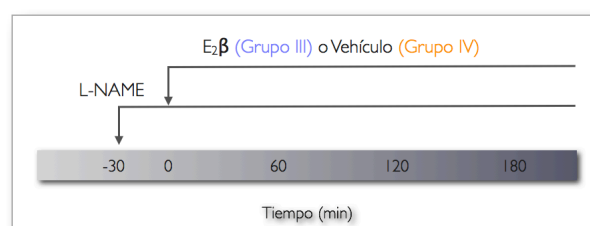
Grupo II. Etanol (n=5)

* $P < 0.05$ vs tiempo 0

La frecuencia cardiaca (FC) sufrió un ascenso significativo ($10 \pm 5\%$) en la tercera hora de la administración de Estradiol.

Se obtuvieron resultados similares en el **Grupo II**, en el que se administró **vehículo** en lugar de 17β -Estradiol, aunque la FC se mantuvo inalterada en estos animales.

Protocolo 5.2



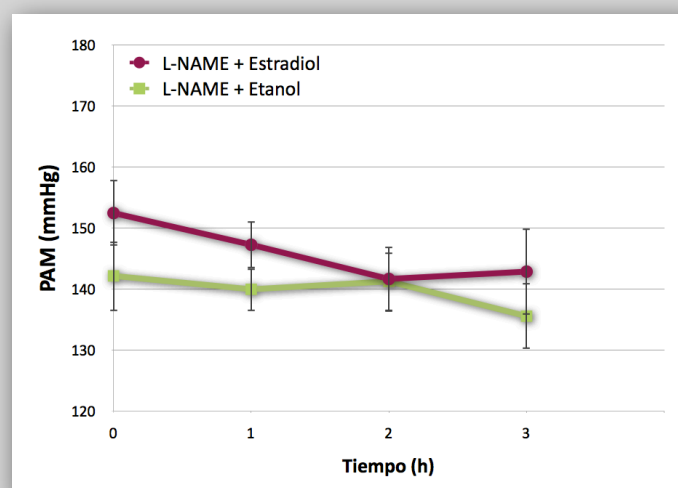
Los datos obtenidos en el Protocolo 5.2 se muestran en las **Fig 29 A,B,C,D**, en el que se comparan las respuestas sistémicas a 17β -Estradiol o vehículo en presencia de L-NAME (**Grupo III - Estradiol+NAME** y **Grupo IV -Etanol+NAME**).

Cuando evaluamos la respuesta al 17β -Estradiol tras la inhibición de la síntesis de NO, encontramos que la PAM disminuyó progresivamente a lo largo del experimento, aunque no alcanzó valores significativos.

La administración de vehículo en presencia de L-NAME no produjo ningún efecto hemodinámico a lo largo de las 4 horas del estudio.

Fig. 29A. Medias $\pm$ ES de **Presión Arterial Media (PAM)** tras la administración de 17β -Estradiol sistémico y vehículo (Etanol) en presencia de N- ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 3 mg/kg + 50 μ g/kg/min) en ratas Castradas conscientes.

Grupo III. 17β -Estradiol+NAME (n=7);
Grupo IV. Etanol+NAME (n=5)



Sin embargo, una hora después de la administración sistémica de Estradiol, el IC disminuyó significativamente en un $27 \pm 4,9\%$ y las RPT aumentaron en un $37,3 \pm 11,7\%$ ($p < 0,01$), y estos cambios se mantuvieron durante las 3 h del experimento ($p < 0,01$).

Esta disminución del IC y el aumento de las RPT fueron también significativamente diferentes de la administración de vehículo en presencia de L-NAME. (Fig. 29 B,C).

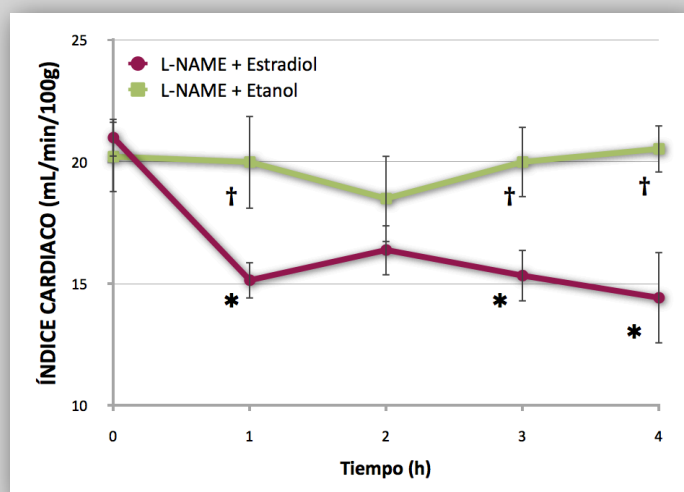


Fig. 29B. Medias $\pm$ ES de Índice Cardíaco (IC) tras la administración de 17β -Estradiol sistémico y vehículo (Etanol) en presencia de N- ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 3 mg/kg + 50 μ g/kg/min) en ratas Castradas conscientes.

Grupo III. 17β -Estradiol+NAME (n=7)

Grupo IV. Etanol+NAME (n=5)

* $P < 0.05$ vs tiempo 0

† $P < 0.05$ L-NAME+ 17β -Estradiol vs L-NAME+Etanol

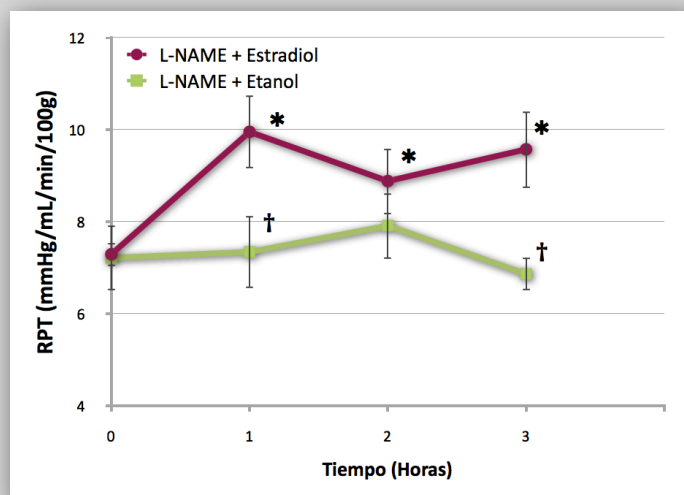


Fig. 29C. Medias $\pm$ ES de Resistencias Periféricas Totales (RPT) tras la administración de 17β -Estradiol sistémico y vehículo (Etanol) en presencia de N- ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 3 mg/kg + 50 μ g/kg/min) en ratas Castradas conscientes.

Grupo III. 17β -Estradiol+NAME (n=7)

Grupo IV. Etanol+NAME (n=5)

* $P < 0.05$ vs tiempo 0

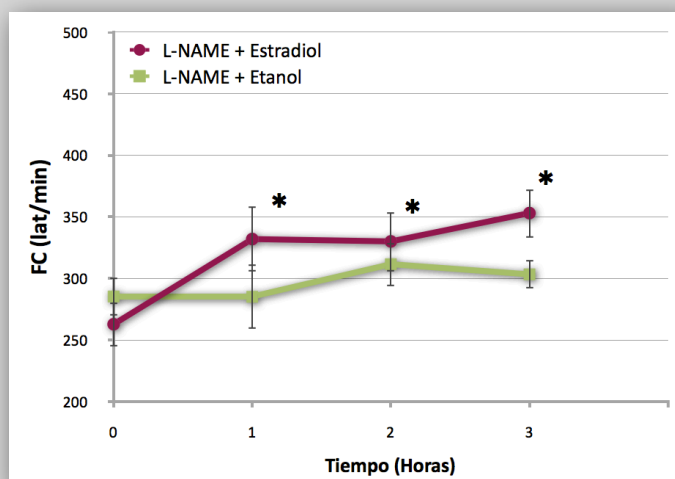
† $P < 0.05$ L-NAME+ 17β -Estradiol vs L-NAME+Etanol

Fig. 29D. Medias $\pm$ ES de Frecuencia Cardíaca (FC) tras la administración de 17β -Estradiol sistémico y vehículo (Etanol) en presencia de N- ω -nitro-L-arginina metil éster (L-NAME, 3 mg/kg + 50 μ g/kg/min) en ratas Castradas conscientes.

Grupo III. 17β -Estradiol+NAME (n=7)

Grupo IV. Etanol+NAME (n=5)

* $P < 0.05$ vs tiempo 0



Es de destacar que el aumento de las RPT por 17β -Estradiol en presencia de L-NAME se asoció con alteraciones de la FC durante todo el estudio. La FC aumentó tras 1 h de la administración sistémica de 17β -Estradiol y continuó aumentando, hasta alcanzar 353 ± 17 latidos/min a las 3 h ($p < 0,001$).

Además, el hematocrito aumentó de $42,5 \pm 0,7\%$ en el tiempo 0 después de L-NAME a $45,2 \pm 0,9\%$ después de 17β -Estradiol ($p < 0,05$).

En contraste, en el **grupo IV**, la administración de vehículo en la presencia de L-NAME no indujo cambios en el hematocrito ($40,4 \pm 1,4\%$ antes y $40,1 \pm 1,9\%$ 3 h después de la inyección de vehículo).

5.3. Protocolo III

Con objeto de descartar que las diferencias observadas frente a la administración de E_2 en presencia y en ausencia de L-NAME pudieran ser debidas a las distintas condiciones hemodinámicas, evaluamos los efectos del Estradiol en presencia de un vasoconstrictor como la Fenilefrina (PE).



Los datos obtenidos en este protocolo se muestran en las **Fig 30 A,B,C,D**.

Ni la administración de Estradiol ni vehículo durante la infusión de Fenilefrina indujo cambio significativo alguno en los parámetros hemodinámicos estudiados durante las 3 horas de protocolo experimental.

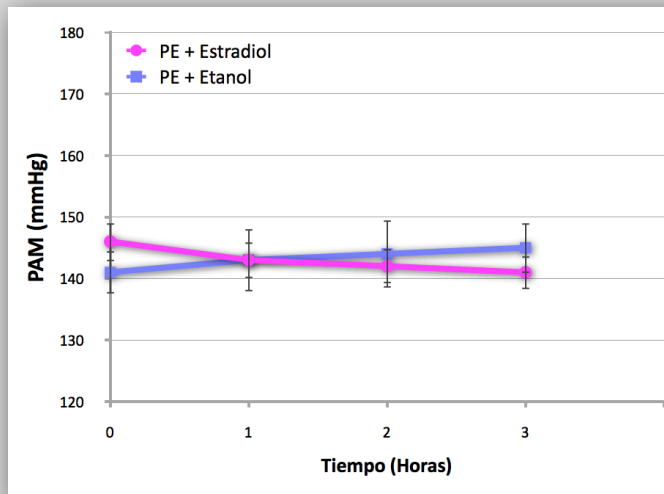


Fig. 30A. Medias $\pm$ ES de **Presión Arterial Media (PAM)** tras la administración de 17β -Estradiol sistémico y vehículo (Etanol) en presencia de Fenilefrina (PE, $20 \mu\text{g/kg/min}$) en ratas Castradas conscientes.
Grupo V. 17β -Estradiol+PE (n=5)
Grupo VI. Etanol+PE (n=5)

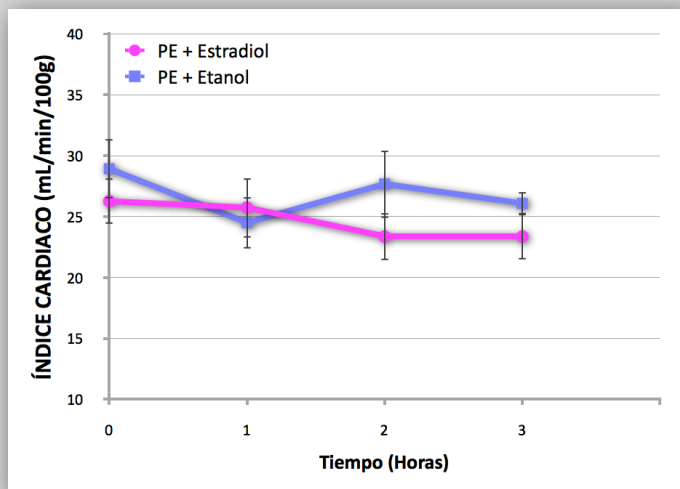


Fig. 30B. Medias $\pm$ ES de **Índice Cardíaco (IC)** tras la administración de 17β -Estradiol sistémico y vehículo (Etanol) en presencia de Fenilefrina (PE, $20 \mu\text{g/kg/min}$) en ratas Castradas conscientes.
Grupo V. 17β -Estradiol+PE (n=5)
Grupo VI. Etanol+PE (n=5)

Fig. 30C. Medias $\pm$ ES de **Resistencias Periféricas Totales (RPT)** tras la administración de 17β -Estradiol sistémico y vehículo (Etanol) en presencia de Fenilefrina (PE, 20 μ g/kg/min) en ratas Castradas conscientes.

Grupo V. 17β -Estradiol+PE (n=5)

Grupo VI. Etanol+PE (n=5)

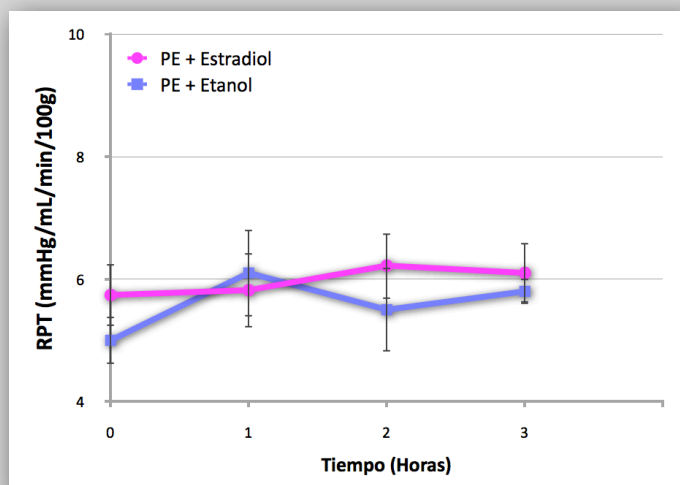
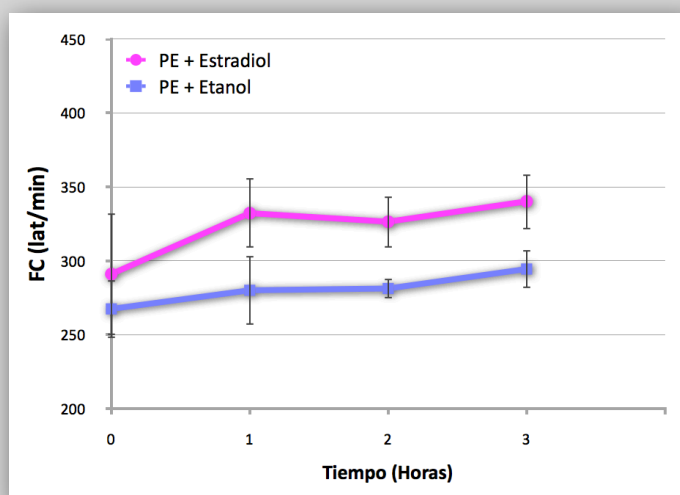


Fig. 30D. Medias $\pm$ ES de **Frecuencia Cardiaca (FC)** tras la administración de 17β -Estradiol sistémico y vehículo (Etanol) en presencia de Fenilefrina (PE, 20 μ g/kg/min) en ratas Castradas conscientes.

Grupo V. 17β -Estradiol+PE (n=5)

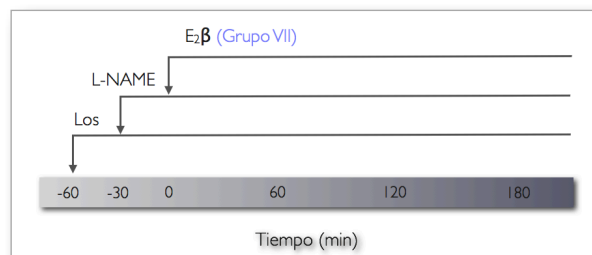
Grupo VI. Etanol+PE (n=5)



No se evidenciaron cambios en el Hematocrito a las 3 horas del experimento.

5.4. Protocolo IV

Para evaluar la implicación o no de la Angiotensina II en los efectos hemodinámicos agudos del 17β -Estradiol en presencia de un bloqueo de NO, estudiamos dicha respuesta hemodinámica tras la administración de un antagonista del receptor AT_1 (Losartan)



Como se muestra en la **Fig 31B**, en el **Grupo VII (Losartan + L-NAME + Estradiol)**, Losartan previno, de forma marcada, la disminución del IC observado tras la administración de 17β -Estradiol en presencia L-NAME (**Grupo III**). De igual manera, las RPT permanecieron inalteradas en el **Grupo VII** con Losartan frente al **Grupo III**, sin Losartan. (**Fig. 31C**).

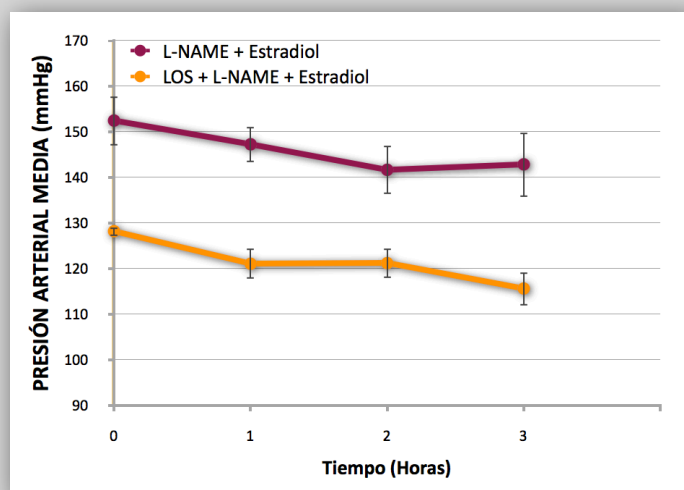


Fig. 31A. Medias $\pm$ ES de Presión Arterial Media (PAM) tras la administración de 17β -estradiol sistémico ($100 \mu\text{g/kg}$) en presencia de L-NAME, ($3 \text{ mg/kg} + 50 \mu\text{g/kg/min}$) y en presencia de Losartan (Los, 10 mg/kg) en ratas Castradas conscientes.

Grupo III. 17β -estradiol+L-NAME ($n=7$)

Grupo VII. 17β -estradiol+L-NAME+Los ($n=7$)

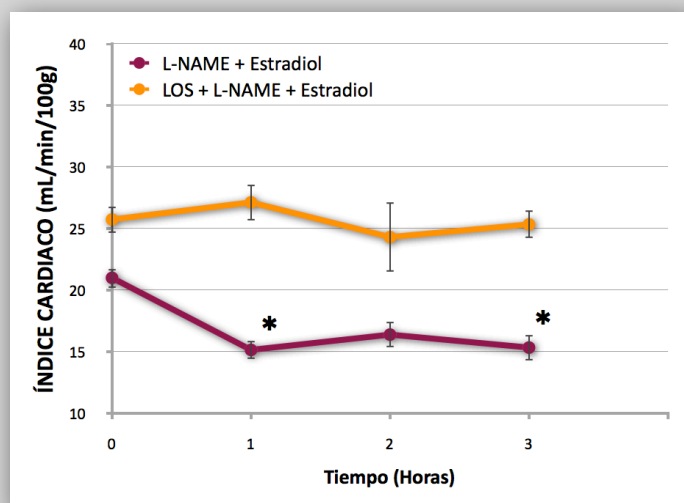


Fig. 31B. Medias $\pm$ ES de Índice Cardíaco (IC) tras la administración de 17β -estradiol sistémico ($100 \mu\text{g/kg}$) en presencia de L-NAME, ($3 \text{ mg/kg} + 50 \mu\text{g/kg/min}$) y en presencia de Losartan (Los, 10 mg/kg) en ratas Castradas conscientes.

Grupo III. 17β -estradiol+L-NAME ($n=7$)

Grupo VII. 17β -estradiol+L-NAME+Los ($n=7$)

* $P < 0.05$ vs tiempo 0

Fig. 31C. Medias $\pm$ ES de **Resistencia Periférica Totales (RPT)** tras la administración de 17β -estradiol sistémico (100 μ g/kg) en presencia de L-NAME, (3 mg/kg + 50 μ g/kg/min) y en presencia de Losartan (Los, 10 mg/kg) en ratas Castradas conscientes.

Grupo III. 17β -estradiol+L-NAME (n=7)

Grupo VII. 17β -estradiol+L-NAME+Los (n=7)

* $P < 0.05$ vs tiempo 0

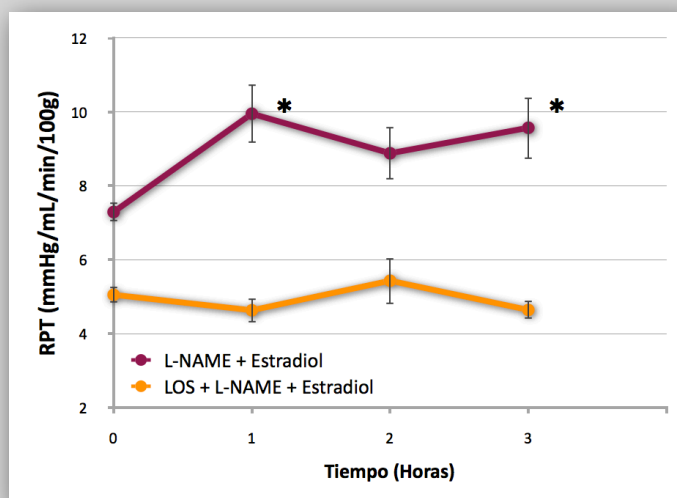
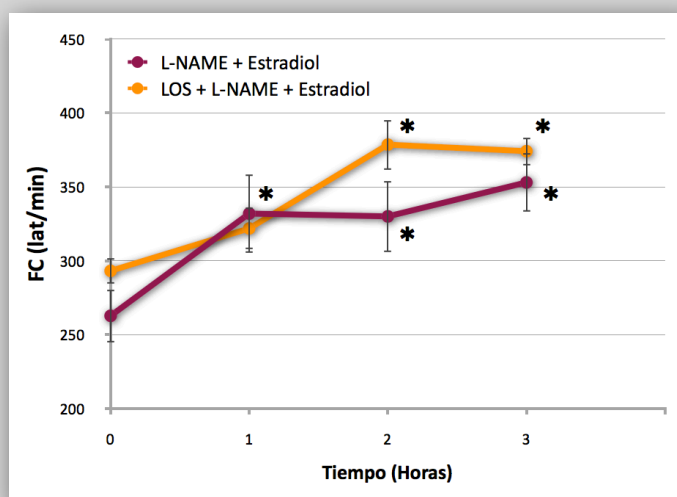


Fig. 31D. Medias $\pm$ ES de **Frecuencia Cardíaca (FC)** tras la administración de 17β -estradiol sistémico (100 μ g/kg) en presencia de L-NAME, (3 mg/kg + 50 μ g/kg/min) y en presencia de Losartan (Los, 10 mg/kg) en ratas Castradas conscientes.

Grupo III. 17β -estradiol+L-NAME (n=7)

Grupo VII. 17β -estradiol+L-NAME+Los (n=7)

* $P < 0.05$ vs tiempo 0



Sin embargo, el tratamiento previo con Losartan no impidió el aumento de FC observada en el **Grupo III (L-NAME+Estradiol)** (**Fig. 31D**)

Por otra parte, el tratamiento previo con Losartan evitó la hemoconcentración inducida por la administración de Estradiol en presencia de L-NAME (Hematocrito fue de $42,5 \pm 1,1$ y $42,4 \pm 1,1\%$ en animales que recibieron Losartan + L-NAME antes y después de la administración de Estradiol, respectivamente).

Las respuestas hemodinámicas a la administración de 17β -Estradiol en presencia de Losartán (**Grupo VIII**) no difieren de las apreciadas con 17β -Estradiol solo (**Grupo I**). Tras la administración de Losartan, los cambios en la PAM no fueron significativos: de un valor basal de 87 ± 2 a 87 ± 3 , 86 ± 3 y 82 ± 5 mmHg tras 1, 2 y 3 horas de la administración de Estradiol, respectivamente. Del mismo modo, los cambios en la FC tampoco fueron significativos: de 386 ± 22 latidos/min a 381 ± 17 , 409 ± 20 y 400 ± 23 latidos/min después de 1, 2, y 3 h de la infusión de Estradiol, res-

pectivamente. El IC tras Losartan fue de $30,8 \pm 1,5$ ml/min/100 g y de $29,9 \pm 1,7$; $31,1 \pm 1,3$ y $33 \pm 1,9$ ml/min/100 g tras 1, 2 y 3 horas de la administración de Estradiol, respectivamente. Después de Losartan, los valores de las RPT fueron de $2,9 \pm 0,2$; $2,9 \pm 0,2$ y $2,8 \pm 0,2$ mmHg mL/min/100 g a las 1, 2 y 3 horas de la administración de Estradiol, respectivamente.

En presencia de Losartan, una vez más, la administración de Estradiol no modificó el Hematocrito ($41,6 \pm 0,8$ y $40,7 \pm 0,9\%$ antes y después de Estradiol, respectivamente).

Como se esperaba, PRA no varió tras la administración de Estradiol (PRA fue $1,34 \pm 0,28$ ng AT-I/mL/h en el grupo tratado con Estradiol y $1,84 \pm 0,43$ ng AT-I/mL/h en el grupo tratado con vehículo).

Estos datos están de acuerdo con los datos del **Grupo VIII**, en que Losartán no desenmascara la acción vasodilatadora del Estradiol.

La concentración plasmática de Estradiol 3 horas después de la administración intravenosa ($100 \mu\text{g/kg}$) fue de $103,3 \pm 21,6$ pg/ml.



Pretendemos desarrollar la Discusión en dos niveles: un **primer nivel** donde expondremos la secuencia temporal de desarrollo de nuestro proyecto de investigación, analizando los resultados obtenidos y relacionándolos con la bibliografía existente, y un **segundo nivel**, en el que contextualizamos dichos resultados en el debate de la sociedad científica acerca del efecto beneficioso o perjudicial de la THS sobre la salud cardiovascular.

La enfermedad cardiovascular (ECV), y en particular la enfermedad coronaria (EC), es la causa principal de muerte de las mujeres en los países desarrollados. El riesgo aumenta después de la menopausia, y desde hace años se ha postulado que la terapia hormonal sustitutiva con estrógenos (THS) podría contribuir a la disminución de dicho riesgo. (Mendelsohn and Karas 2005)

La actitud de la comunidad científica al respecto ha oscilado en los últimos años desde el apoyo más radical al uso de la THS como prevención de la ECV a la oposición más beligerante. (Parrilla and Abad 2004)

En este contexto de debate desarrollamos la investigación que constituye esta Tesis Doctoral. Nuestro grupo de investigación tiene una amplia experiencia en el estudio del sistema cardiovascular y renal, y especialmente en lo que a la función endotelial concierne.

A partir de una línea de investigación en ratas preñadas, estudiando el papel del Factor Relajante Derivado del Endotelio (EDRF), más tarde conocido como Óxido Nítrico (NO), sobre el estado hiperdinámico en la gestación, (Fiol, Machado et al. 1998) nos cuestionamos el papel de los estrógenos en la función endotelial, planteándonos estudiar ésta en un modelo de privación hormonal, como es la menopausia.

Animados por los resultados del **Nurses' Health Study (NHS)**, pionero en proponer el efecto beneficioso de la THS, y tras valorar ciertas evidencias experimentales que reforzaban los resultados del *Estudio de las Enfermeras*, (Weiner, Thompson et al. 1992) desarrollamos este proyecto de investigación.

Intentamos demostrar una hipótesis en animales que refrendara las evidencias iniciales descritas al inicio de la década de los 90, la época de máximo florecimiento de la THS.

Esta hipótesis sostiene que la privación estrogénica podía afectar a la función cardiovascular de ratas de experimentación, al igual que lo hacía en la mujer menopáusica, y a partir de este modelo animal, investigar el papel del endotelio y sus factores mediadores en la fisiopatología de la ECV. Por otra parte, sería interesante valorar el efecto de la THS con estrógenos sobre estas posibles alteraciones, de igual manera que estaba descrito en estudios clínicos de la literatura científica.

Los efectos de la privación estrogénica en el sistema cardiovascular ...

De cara a la comparación con la mujer postmenopáusica, intentamos reproducir los cambios hemodinámicos descritos en estas mujeres, sobre ratas hembras que habíamos ovariectomizado previamente.

Nuestro trabajo muestra el importante papel que juega la función ovárica en la modulación de la presión arterial de las ratas hembra. Los resultados descritos previamente muestran un deterioro de los parámetros hemodinámicos tras 8 semanas de castración. Estos datos concuerdan con la creciente evidencia acerca de la relación entre el incremento de prevalencia de hipertensión arterial (HTA) y la postmenopausia en la mujer, ya descrita por Sitruk-Ware en 1989. (Sitruk-Ware and Ibarra de Palacios 1989)

Por otra parte, este estudio fue uno de los primeros que mostraron una elevación de la presión arterial (PA) en ratas normotensas después de la ovariectomía. (Hernandez, Delgado et al. 2000)

Previamente, Milsted había descrito un aumento en la PA sistólica en ratas hembras Wistar-Kyoto después de 7 semanas después de la ovariectomía. (Milsted, Marcelo et al. 1998) Sin embargo, otros estudios no lo habían conseguido. (Nickenig, Baumer et al. 1998) Estas discrepancias pueden explicarse por los diferentes tiempos de evolución tras la ovariectomía. Nickenig describe que las ratas se sacrificaron 5 semanas después de la ovariectomía, en lugar de las 8 semanas que establecimos nosotros para realizar nuestros experimentos.

Esta Tesis Doctoral demuestra que la ovariectomía reduce significativamente los valores de Índice Cardíaco y Conductancia Vascular en ratas hembras, coincidiendo estos resultados con los de Huang et al que describe una reducción del tono basal de las arteriolas de ratas hembra tras la ovariectomía. (Huang, Sun et al. 1997)

La posible disfunción del endotelio vascular como causa de las alteraciones detectadas ...

A partir de aquí, nos planteamos investigar acerca de la implicación del endotelio vascular en estas alteraciones cardiovasculares descritas tras la ovariectomía.

Basándonos en los trabajos con anillos vasculares de Weiner, se diseñó un protocolo de estudio de respuesta vascular ante vasodilatadores endotelio-dependientes y endotelio-independientes. (Weiner, Thompson et al. 1992)

El objetivo fue estudiar la liberación relativa de NO a partir de anillos aórticos con integridad del endotelio, comparando ratas hembras intactas y ovariectomizadas en estado basal y tras estimulación del anillo vascular con Acetilcolina (ACh), la cual induce una relajación endotelio-dependiente de la pared vascular, a través de un receptor muscarínico; y con Nitroprusiato Sódico (NPS), ya que este compuesto libera NO en el músculo liso vascular y no precisa del endotelio para ejercer su acción. (Ignarro, Lipton et al. 1981) De esta manera, podíamos valorar las diferencias entre la respuesta vascular a sustancias vasorrelajantes cuya

acción está mediada por endotelio, frente a las que no precisan de endotelio, en ratas intactas y castradas.

La respuesta relajante a ACh fue significativamente menor en anillos aórticos de ratas ovariectomizadas comparada con los de las ratas intactas. Por contra, la vasodilatación independiente del endotelio al NPS, fue máxima y de igual magnitud en ambos grupos de ratas, lo que sugiere que la menor respuesta a la ACh en las ratas ovariectomizadas se debe a una función anormal del endotelio y no a una sensibilidad disminuida del músculo liso vascular al NO.

Todos los experimentos se llevaron a cabo en presencia de Indometacina, un inhibidor de la COX, por lo que la relajación inducida por ACh no podía ser atribuida al efecto de la liberación de prostaglandinas. Por otra parte, la adición de L-NAME a una concentración inhibidora de la Óxido Nítrico Sintasa (NOS) (10^{-5} M) bloqueó totalmente la respuesta del endotelio a la ACh en los anillos aórticos tanto de ratas ovariectomizadas como intactas. Otros autores están de acuerdo con nuestros resultados, con protocolos similares. (Ceylan-Isik, Erdogan-Tulmac et al. 2009)

En resumen, nuestros resultados muestran una relajación endotelio-dependiente disminuida en ratas castradas frente a las ratas con ovarios intactos, lo que sugiere que los estrógenos ováricos pueden jugar un papel importante en la preservación de una función endotelial normal.

El estudio de los mecanismos de la disfunción endotelial ...

Esta alteración de la función endotelial podría deberse a una **disminución en la producción de NO** o a un **incremento en su destrucción**, por lo que nos propusimos estudiar estos mecanismos.

Con objeto de comprobar la existencia o no de una menor liberación de NO desde el endotelio vascular, determinamos un índice de esta liberación midiendo los **niveles plasmáticos de Nitritos y Nitratos**, encontrando una reducción significativa de éstos en el grupo de ratas ovariectomizadas respecto a las ratas intactas. Estos datos están de acuerdo con los estudios de otros autores, que reportan descenso de niveles de NOx séricos en ratas castradas. (Grundt, Grundt et al. 2010)

En el mismo contexto, con el fin de valorar la implicación de la síntesis de NO en el mantenimiento del tono y la hemodinámica cardiovascular en la rata hembra, diseñamos otro experimento estudiando la **respuesta hemodinámica ante la administración de L-NAME** en ambos grupos experimentales, observando que la inhibición de la síntesis de NO provocó un incremento de PA similar en ambos grupos, aunque la disminución en la Conductancia Vascular fue significativamente menor en los animales ooforectomizados. Este dato sugiere una menor dependencia al NO de la Conductancia Vascular en este grupo.

Dado que una de las hipótesis acerca de la disfunción endotelial observada en las

ratas castradas podía ser la eliminación del NO por especies reactivas de oxígeno (ROS), nos propusimos ahondar en este posible mecanismo fisiopatológico.

Una justificación podría ser que el árbol vascular de la rata ovariectomizada pudiera liberar significativamente más ROS que las ratas intactas, lo que implicaría una mayor influencia inhibidora sobre la acción del NO liberado. Esta posibilidad concuerda con un fenómeno común en la ECV, el exceso de generación de ROS, que pueden modular el tono vascular del músculo liso por mecanismos indirectos, como la inactivación de NO. (Rubanyi and Vanhoutte 1986) (Hennig and Chow 1988)

Por tanto, basándonos en experimentos previos, en los que la administración de la Superóxido Dismutasa (SOD) incrementa la vida media de NO en sistemas de bioensayo in vitro, (Langenstroer and Pieper 1992) diseñamos un protocolo experimental en anillos de aorta para tal fin. Así, **valoramos la liberación tónica del NO en ambos grupos experimentales, añadiendo SOD** a dosis crecientes en el baño de los anillos vasculares, y comprobamos que en este caso, los anillos de aorta de ratas ovariectomizadas presentaban una menor respuesta relajante que los anillos de ratas intactas.

La interpretación más plausible es que la SOD, enzima que reduce los niveles del anión superóxido endógeno o generado en el baño tisular, mejoró el efecto relajante del NO basal liberado.

La preincubación de los anillos vasculares con un inhibidor de la NO sintasa (L-NAME) abolió la relajación vascular inducida por SOD en ambos grupos de ratas, lo que sugiere que: (1) SOD podría mediar la relajación vascular gracias a la inhibición de la destrucción de NO por el anión superóxido, (2) la relajación vascular se debía a una liberación espontánea de NO y (3) la disminución de la relajación de los anillos aórticos de ratas ovariectomizadas tras administrar SOD podía deberse a la disminución de la biodisponibilidad de NO.

Con objeto de comprobar la existencia de un mayor grado de actividad pro-oxidante en la situación de deprivación estrogénica, nos propusimos **determinar distintos marcadores de estrés oxidativo** en el plasma de las ratas intactas y ovariectomizadas.

En nuestro estudio experimental pudimos objetivar que la ovariectomía inducía alteraciones en el estado redox, caracterizadas por un menor Status Antioxidante Total (SAT), una disminución de los niveles plasmáticos de grupos sulfhidrilo (-SH) y un incremento en lipoperóxidos. Estos datos analíticos plasmáticos pueden reflejar un desequilibrio en el estado redox, desviando el balance hacia un incremento en el proceso oxidativo, que podría ser responsable de la disminución en la actividad de NO. Por otra parte, varios estudios informan que la bioactividad del NO está estrechamente relacionada con la formación de compuestos S-nitrosotiol que parecen ser relajantes del músculo liso vascular más potentes que el NO por sí mismo, lo que requiere nive-

les adecuados de compuestos donantes de grupos sulfhidrilo. (Ignarro, Lippton et al. 1981) (Stamler, Jaraki et al. 1992)

Se piensa que diversos trastornos vasculares relacionados, como la enfermedad coronaria, el ictus, la HTA y el shock están mediados, al menos en parte, por cambios en el estado general redox y el contenido de tioles en el tejido vascular. De hecho, existe evidencia de la existencia de **estrés oxidativo** en pacientes jóvenes con HTA esencial y en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), (Parik, Allikmets et al. 1996) (Suzuki, Swei et al. 1995) además de presentarse de forma conjunta la HTA y la disfunción endotelial. (Linder, Kiowski et al. 1990) (Luscher, Dohi et al. 1992) Se ha postulado el uso de compuestos que contienen tiol, en combinación con NO, con el fin de producir compuestos **nitrosotiol** más estables, que de por sí son potentes relajantes de la musculatura lisa vascular. (Henry, Drummer et al. 1989) Además, se ha descrito que este tipo de compuestos con tiol, tales como la NAC, podrían interactuar también con ROS, ahorrando NO y potenciando su acción al eliminar el efecto de los radicales libres. (Knight, MacPhadyen et al. 1991)

En este sentido, nuestro grupo ha publicado que la N-acetil-L-cisteína (NAC), un *scavenger* de radicales libres, donante de grupos tiol, aumenta la respuesta antihipertensiva a captopril y enalapril en SHR por un mecanismo dependiente de NO, (Ruiz, Salom et al. 1994) lo que sugiere que existe un equilibrio entre el NO y S-nitrosotiol en un sistema biológico que puede estar influido por el estado redox.

De acuerdo con estos resultados la incubación previa de los anillos de aorta con NAC produjo una mejoría de la función endotelial valorada como respuesta vasorrelajante a la ACh, en animales ovariectomizados.

Sin embargo, la ausencia de efecto de la NAC sobre la curva de concentración-respuesta vasorrelajante a la ACh en los anillos aórticos de las ratas intactas fue sorprendente de modo similar a los hallazgos de Sunman et al, que no mostraron mejoría alguna de la relajación endotelio-dependiente de la aorta de rata inducida por NAC. (Sunman, Hughes et al. 1993)

Una explicación a este hecho podría ser que este tipo de agentes, *scavenger* de radicales libres, serían eficaces sólo cuando se diera un importante grado de agotamiento de los grupos tiol intracelulares, un incremento de ROS, o ambas situaciones simultáneas. (Gilligan, Quyyumi et al. 1994) (Reis, Gloth et al. 1994)

La terapia con Estrógenos, ¿posible solución a estas alteraciones? ...

Una vez comprobado que nuestro modelo experimental con ratas castradas remedaba los efectos cardiovasculares de la deprivación estrogénica en la mujer postmenopáusica, quedaba por dilucidar si la terapia sustitutiva con estrógenos podría disminuir estas alteraciones, o incluso revertirlas, tal y como los estudios clínicos de la década de los 90 dejaban entrever. (Stampfer, Colditz et al. 1991)

Para ello, repetimos los protocolos experimentales en un grupo de animales que se habían sometido a castración, y aplicado a los 4 días de la intervención un implante subcutáneo de liberación de 17- β Estradiol de forma crónica, a modo de THS durante 8 semanas.

Efecto del 17- β Estradiol sobre la función hemodinámica basal en ratas ovariectomizadas ...

Así, cuando valoramos la situación hemodinámica basal en este grupo de ratas, comprobamos que la terapia sustitutiva con Estradiol previno el trastorno hemodinámico observado en el grupo de ratas ovariectomizadas. Otros autores han reportado los mismos resultados en ratas castradas, evidenciando la mejoría de la respuesta presora al stress, mejorando la biodisponibilidad del NO tras THS. (Morimoto, Uji et al. 2008)

Estos datos están de acuerdo con un estudio realizado en mujeres postmenopáusicas en el que se demuestra que el tratamiento con E₂ transdérmico incrementa significativamente el Gasto Cardíaco y el Volumen Sistólico, disminuyendo la presión arterial. (Alfie, Lugones et al. 1997) Por otra parte, otros estudios muestran que los estrógenos transdérmicos ejercen efectos beneficiosos, tanto para disminuir la PA como en el mantenimiento de un control de la PA uniforme durante 24 horas. (Mercuro, Zoncu et al. 1997) Además, Brosnihan et al demostró que tanto en ratas Sprague-Dawley normotensas como en ratas hipertensas transgénicas (Gen Ren-2), el tratamiento con estrógenos durante 4 semanas dismi-

nuyó los niveles de PA con respecto a los animales no tratados, (Brosnihan, Moriguchi et al. 1994) resultados que concuerdan con otros de Huang et al, mostrando que la terapia de sustitución estrogénica restaura el tono basal de las arteriolas de ratas hembra, reducido tras la castración, disminuyendo el tono miogénico de éstas hasta un nivel idéntico al de ratas hembra normales. (Huang, Sun et al. 1997)

Estos efectos hemodinámicos del tratamiento sustitutivo con Estradiol se asocian a un incremento de los niveles plasmáticos de Nitritos y Nitratos hasta niveles similares a las ratas intactas, resultado que concuerda con estudios previos en mujeres postmenopáusicas con THS. (Rosselli, Imthurn et al. 1995)

Dichos resultados muestran indirectamente un incremento de los niveles de NO en ratas ovariectomizadas con THS, coincidiendo con otros estudios in vitro que describen el incremento de la Óxido Nítrico Sintasa (NOS) en respuesta a 17- β Estradiol en células endoteliales de aorta bovina, (Hayashi, Yamada et al. 1995) y en células endoteliales de arteria pulmonar fetal ovina. (MacRitchie, Jun et al. 1997)

Por lo tanto, es lógico suponer que una mayor disponibilidad de NO, favorecida por la presencia de estrógeno, pudiera ser responsable de la diferencia en el Índice de Conductancia Vascular basal, de menor magnitud en las ratas ovariectomizadas que en las ratas sham y las tratadas con estrógenos.

Por otra parte, la terapia sustitutiva con estrógenos restauró la respuesta de la conductancia vascular (ICV) producida por inhibición de la NOS con L-NAME en ratas Sprague-Dawley. Además, aunque no hubo diferencias en la magnitud de la respuesta presora provocada por L-NAME entre los tres grupos, la disminución de la conductancia vascular fue significativamente mayor en ratas sham y en las tratadas con E₂, con respecto a las ovariectomizadas.

Los resultados descritos hasta ahora sugieren una mayor contribución del NO en la regulación de la Conductancia Vascular en presencia de niveles adecuados de estrógenos, que puede ser responsable de la PA más baja presente en los animales con estrógenos en nuestro estudio. De hecho, estudios anteriores mostraron que los estrógenos incrementan la contribución del NO en la regulación de la PA en ratas hipertensas transgénicas que expresan el Gen Ren-2 genes (Brosnihan, Moriguchi et al. 1994) y que los estrógenos atenúan el desarrollo de la HTA en ratas espontáneamente hipertensas. (Williams, Shackelford et al. 1988)

A pesar de que los cambios en la PA en respuesta a la infusión de L-NAME no fueron diferentes entre los tres grupos de ratas, en el grupo de ratas castradas se apreció una mayor respuesta de la Frecuencia Cardíaca (FC). Esta respuesta de FC tras L-NAME es de difícil explicación. Podríamos justificarlos suponiendo una diferencia en la sensibilidad barorrefleja entre ratas ovariectomizadas y los otros dos grupos que tienen estrógenos. Hay trabajos que describen una menor tole-

rancia a la presión negativa en el hemicuerpo inferior en las mujeres que se asociaba a una respuesta reducida de FC ante la estimulación de los barorreceptores carotídeos en comparación con los hombres. (Convertino 1998)

El tratamiento crónico con Estradiol mejora el estado redox ...

Del mismo modo que con los protocolos anteriores, también estudiamos el estado redox en el grupo de ratas ovariectomizadas tratadas con Estradiol, encontrando que la THS con Estradiol indujo un aumento significativo en el SAT plasmático y los grupos -SH, asociado a una disminución en la concentración plasmática de lipoperóxidos, siendo estos parámetros de similares a los obtenidos en los animales con operación simulada. Estos datos concuerdan con otros similares en la literatura, postulando la disminución de Malondialdehído en tejido aórtico de ratas castradas con THS. (El-Seweidy, Mohamed et al. 2012)

Una posible explicación podría basarse en la acción antioxidante atribuida al 17-βEstradiol, preservando así la función endotelial. Por un lado, varios estudios han demostrado que el 17 β-Estradiol reduce la peroxidación lipídica en plasma y en membrana plaquetaria en mujeres postmenopáusicas. (Tranquilli, Mazzanti et al. 1995) (Tang, Abplanalp et al. 1996)

Otros estudios apoyan esta posibilidad defendiendo que estas acciones pueden estar detrás del efecto protector del 17-βEstradiol en el proceso de isquemia-reperfusion miocárdica. La administración de

17- β Estradiol en animales mejoró la función endotelial de arteriolas miocárdicas con respecto a los animales no tratados. Este efecto se asoció con un incremento de la concentración sérica de NOx y una menor generación de anión superóxido en segmentos arteriales tras la hipoxia/reperfusión. (Kim, Chen et al. 1996)

Todos estos resultados nos llevan a sugerir que el efecto beneficioso del tratamiento con 17- β Estradiol sobre la función hemodinámica y vascular en las ratas ovariectomizadas parece deberse a un incremento de la biodisponibilidad de NO. Pero no podemos descartar que paralelamente pueda deberse a un incremento en la expresión de la NOS, y por tanto, aumento en la síntesis de NO, tal como sugiere el hecho de que el 17- β Estradiol aumenta la NOS y ARNm. (MacRitchie, Jun et al. 1997) (Grundt, Grundt et al. 2010)

Papel de la Angiotensina II en la acción vascular directa del Estradiol ...

Otro de los aspectos ampliamente estudiado sobre los efectos de estrógenos en el sistema cardiovascular ha sido su interacción con el Sistema Renina Angiotensina (SRA), sistema de regulación a medio plazo de la presión arterial y balance hidrosalino. Los efectos de los estrógenos sobre el SRA se producen sobre varios componentes del mismo, destacando entre estos un incremento en la secreción de Renina, (Brosnihan, Senanayake et al. 1999), en la síntesis de Angiotensinógeno, (Oelkers 1996) una reducción en la actividad de la Enzima Convertidora de Angiotensina (Tostes, Nigro et al. 2003) y

una reducción de los receptores de Angiotensina II (Armando, Jezova et al. 2002). Por otra parte, en situaciones con niveles aumentados de estrógenos como la gestación normal, la sensibilidad vascular a la Angiotensina II está disminuida, mientras que se produce una hipereactividad en gestaciones con preeclampsia, en la que se postula una alteración en la función endotelial. (Gilbert, Ryan et al. 2008) Estos datos sugieren una estrecha interacción entre los sistemas reguladores del tono vascular como el SRA y NO endotelial y la presencia de estrógenos.

En vista de estos datos nos planteamos evaluar el **papel del NO y la Angiotensina II sobre las acciones hemodinámicas del E₂ en ratas hembra ovariectomizadas.**

Encontramos que aunque la administración aguda de 17 β -Estradiol (100 mg/kg) no provocó cambios hemodinámicos significativos, cuando esa misma dosis se administró a ratas tratadas con L-NAME dio lugar a una importante vasoconstricción sistémica, como lo demuestra el incremento en las Resistencias Periféricas Totales (RPT) y una disminución del Índice Cardíaco (IC). Estos resultados difieren de otros estudios realizados en ovejas ovariectomizadas en los que la administración de estrógenos aumentó el Gasto Cardíaco (GC), disminuyendo las RPT, con pequeñas modificaciones de la PAM. (Magness and Rosenfeld 1989)

Las discrepancias observadas entre estos estudios podrían deberse a diferencias entre especies. En nuestro estudio, el lige-

ro efecto vasodilatador del E₂ podría haber sido modulado por otros sistemas compensatorios, como el aumento de la activación del sistema nervioso autónomo. En vista de ello, en el futuro, sería interesante investigar si el tratamiento previo con un bloqueante ganglionar o un antagonista del receptor α podría desenmascarar una acción vasodilatadora del 17 β -Estradiol.

Sin embargo, **el hallazgo más importante de nuestro estudio, aunque inesperado, fue que la administración de 17 β -Estradiol a ratas pretratadas con L-NAME indujo un aumento de RPT con una disminución del GC, sin cambios en la PAM.** Estos efectos hemodinámicos se deben claramente a la administración del 17 β -Estradiol, ya que la administración de vehículo (etanol) en presencia de L-NAME no provocó modificación alguna sobre las variables hemodinámicas estudiadas.

Este efecto del Estradiol sobre las RPT en condiciones de inhibición de la síntesis de NO, parece ser independiente del incremento previo de las RPT y presión arterial debido la presencia de L-NAME, ya que la administración de 17 β -Estradiol durante la infusión continua de Fenilefrina (PE), que incrementó las RPT a niveles similares a los de L-NAME no tuvo efecto hemodinámico añadido.

Conjuntamente al efecto hemodinámico (aumento de RPT y disminución de IC) observamos un incremento significativo del hematocrito que puede contribuir a estos cambios hemodinámicos debidos a la ausencia de NO. Se acepta que ante un

volumen constante de glóbulos rojos (VCGR), un incremento en el Hto significa una disminución del volumen plasmático. Van Beaumont, con una fórmula matemática basada en datos teóricos y reales, ilustra la relación entre la hematocrito y el volumen de plasma en un nomograma. (Van Beaumont 1972) Debido a que el Hto es en realidad la relación entre el VCGR y el volumen de sangre total (VCGR+volumen plasmático), el cambio en el volumen plasmático siempre debe ser mayor que el cambio reflejado por el Hto. Así, a partir del nomograma de Van Beaumont, un incremento de 2,7 puntos en el Hto representa un descenso del 11% en el volumen plasmático, y dicha caída podría ser responsable, al menos en parte, del descenso en el Índice Cardíaco tras la administración de 17 β -Estradiol en presencia de L-NAME.

Los efectos hemodinámicos directos del Estradiol descritos hasta el momento en este último protocolo experimental estaban en desacuerdo con la hipótesis de una acción protectora de los estrógenos sobre el sistema vascular. Sin embargo, tal y como hemos mencionado anteriormente, el hecho del cambio en la reactividad vascular a la Angiotensina II (disminuida) en la gestación normal con respecto a la preeclampsia (aumentada), donde se ha descrito la existencia de disfunción endotelial vascular, plantea la posibilidad de la implicación de la Angiotensina II en dicho efecto hemodinámico del Estradiol en ausencia de NO. (Gilbert, Ryan et al. 2008)

Así pues, **el bloqueo de los receptores AT₁ de la Angiotensina II con Losartan suprimió el incremento de las RPT provocado por el 17 β -Estradiol en presencia de L-NAME**. Además, la administración de Losartan inhibió el aumento en el Hto, observado tras administrar L-NAME+17 β -Estradiol, lo que sugiere que la A-II puede contribuir al incremento de las RPT y la disminución en el IC.

Sin embargo, en nuestro estudio los datos de actividad de renina plasmática (ARP) no muestran ningún incremento tras la administración del Estradiol por lo que no es plausible un mayor nivel de Angiotensina II circulante.

Por otro lado, tal y como sugieren los datos de Schricker et al, la inhibición de la síntesis de NO conduce a una atenuación de la secreción de renina basal y a un aumento en la PA. Por lo tanto, ya que la administración de L-NAME aumentó la PA en este estudio, podríamos esperar una disminución o ningún cambio en la ARP. (Schricker, Hamann et al. 1994) Teniendo en cuenta estos datos, los efectos hemodinámicos de 17 β -Estradiol en ausencia de NO se deberían más probablemente a una potenciación de la AT-II que a un aumento en la secreción de renina. Estos datos están de acuerdo con otros estudios que respaldan el papel de la AT-II en la patogénesis de la lesión vascular y la permeabilidad vascular a través de mecanismos que son independientes de su actividad presora. (Reddy, Campbell et al. 1993) (Williams, Baker et al. 1995)

El ascenso de la FC fue un hecho común en todos los grupos a los que se adminis-

tró E₂, independientemente de los cambios en otras variables hemodinámicas. La taquicardia observada en las ratas tratadas con E₂ probablemente refleje tan solo una taquicardia mediada por barorreceptores, porque la PAM tiende a caer. Otra posibilidad es que el estrógeno puede tener un efecto directo en el **nodo sinoauricular**, como otros autores han defendido. Se ha comprobado que el E₂ se puede acumular en los núcleos de los miocitos auriculares, (McGill and Sheridan 1981) causando cronotropismo positivo en el corazón aislado y perfundido de conejo, (Baksi and Hughes 1983) por lo que se piensa que los estrógenos pueden tener un efecto directo en el **nodo sinoauricular**.

A partir de los datos discutidos anteriormente, podemos sugerir una interacción entre los estrógenos, la Angiotensina, y el NO. Por un lado, se conoce la posible regulación de la NOS endotelial por las hormonas sexuales. En este sentido, se había demostrado que el embarazo y el tratamiento crónico con estrógenos incrementa la actividad de la NOS calcio-dependiente en corazón, riñón y músculo esquelético en conejos de indias. (Weiner, Lizasoain et al. 1994) Por otra parte, los niveles séricos de Nitritos y Nitratos están incrementados en la mujer después de la THS con estrógenos. (Rosselli, Imthurn et al. 1995) Más recientemente nuestro grupo ha publicado un efecto directo del Estradiol sobre la liberación de NO en endotelio de rata. (Fenoy, Hernandez et al.) Por otro lado, estos resultados están en consonancia con la disminución de la reactividad vascular ante AT-II descrita en el embarazo nor-

mal, en el que se atenúa la respuesta presora tras la infusión de AT-II, (Conrad, Morganelli et al. 1989) (Magness, Cox et al. 1994) probablemente debido a un incremento en la actividad de NO.

En resumen, la administración de 17 β -Estradiol a ratas ovariectomizadas indujo un efecto vasoconstrictor, representado por un aumento de RPT, cuando la síntesis de NO fue inhibida por L-NAME. Además, estos cambios hemodinámicos pueden ser mediados por la Angiotensina II, ya que este efecto se previno al bloquear el receptor AT₁ con Losartan. A partir de estos resultados, no podemos descartar la posibilidad de que un aumento en la producción de NO tras la administración de 17 β -Estradiol podría modular el efecto vasoconstrictor de la AT-II, y por tanto, la administración de L-NAME permitiría una potenciación de la vasoconstricción inducida por la AT-II.

De estos resultados podríamos concluir que la administración de 17 β -Estradiol requiere una función endotelial que permita niveles adecuados de NO, para mantener un estado hemodinámico normal. Además, la inhibición de la síntesis de NO puede provocar un efecto vasoconstrictor del 17 β -Estradiol debido a la potenciación de la Angiotensina II.

Llegado este momento, intentaremos contextualizar estos resultados descritos durante esta primera parte de la discusión, en medio del apasionante debate sobre la THS y la enfermedad cardiovascular.

Evidencias iniciales del efecto beneficioso de los estrógenos ...

De la lectura de nuestros resultados, parece claro el efecto protector de los estrógenos endógenos y la THS con Estradiol sobre la función endotelial y hemodinámica vascular, en concordancia con múltiples estudios experimentales realizados en animales y humanos descritos anteriormente. Hay autores que defienden la acción indirecta sobre el metabolismo de las lipoproteínas, (Bush, Barrett-Connor et al. 1987) (Farhat, Lavigne et al. 1996) y otros proponen una acción directa gracias a un efecto sobre la pared del vaso sanguíneo por sí misma. (Gruchow, Anderson et al. 1988) (Gilligan, Quyyumi et al. 1994) Este efecto parece estar mediado por la mejora de la función endotelial, como se indica en varios estudios en los que niveles fisiológicos de estrógenos incrementaron la relajación vascular endotelio-dependiente en la circulación coronaria de mujeres postmenopáusicas. (Gilligan, Quyyumi et al. 1994) También se ha demostrado que la suplementación con estrógenos aumenta la actividad de la NOS endotelial y el ARNm para isoenzimas de NOS en arteria uterina, corazón y músculo esquelético en cobayas hembra. (Weiner, Lizasoain et al. 1994)

Con todas estas evidencias, parecía claro que prolongar la función hormonal en la postmenopausia, aun cuando se utilizaran dosis estrogénicas más bajas, llevaría consigo un beneficio para la salud de la mujer. Era clara la mejoría de la sintomatología climatérica en mujeres usuarias de THS y cada vez se presentaba con mayor evidencia el efecto positivo en la prevención de la osteoporosis y las fracturas óseas. ¿Por qué no utilizar la THS con estrógenos en la prevención o en el tratamiento de la ECV en esta etapa de la vida de la mujer?

Esta pregunta suscitó gran cantidad de estudios observacionales en la población, con gran difusión e impacto, apoyados por las evidencias científicas descritas anteriormente. (Stampfer, Colditz et al. 1991)

Aunque la THS no tenía licencia para su utilización en la prevención de enfermedades cardiovasculares, se consideraba éste un beneficio adicional cuando se prescribía para el alivio de los síntomas postmenopáusicos o para la prevención de la osteoporosis.

El tsunami del WHI en medio de este debate ...

Con la generalización de su uso, y para tratar de definir los riesgos y beneficios de las estrategias que podrían prevenir la enfermedad coronaria en las mujeres postmenopáusicas, el Instituto Nacional de Salud de Estados Unidos estableció una serie de ensayos clínicos conocidos como Iniciativa de Salud para las Mujeres (Women's Health Initiative, WHI), que

incluía los brazos de THS con estrógenos más progestágeno o estrógeno sin oposición en mujeres histerectomizadas., tal como se describe en la introducción de esta Tesis. (Rossouw, Anderson et al. 2002)

Los resultados preliminares en 2002 mostraron que la THS con estrógenos y gestágenos causó un incremento en los eventos coronarios y accidente cerebrovascular, tromboembolismo venoso, así como cáncer de mama, y la conclusión fue que la THS era demasiado peligrosa para ser usado como prevención de enfermedad alguna, y solo debería limitarse al uso a corto plazo para el alivio de los síntomas climatéricos. De repente, a modo de péndulo, la comunidad científica, especialmente otros especialistas, como Cardiólogos, Oncólogos y Reumatólogos, menos relacionados específicamente con la salud global de la mujer que los Ginecólogos, estigmatizaron la THS condenándola en multitud de publicaciones científicas y en los medios de comunicación, generando una desconfianza creciente en la mujer postmenopáusica ante cualquier medicación hormonal.

¿Qué había ocurrido entonces?, ¿donde quedaban los resultados positivos de los estrógenos sobre el sistema cardiovascular?

Estos resultados nefastos de la terapia estrógena en el estudio WHI se asemejaban de alguna manera a nuestros resultados de los efectos hemodinámicos adversos de la administración de 17β -Estradiol en situación de bloqueo de la síntesis de NO. Todo lo bueno que había resultado el

tratamiento estrogénico en los estudios de los protocolos de función endotelial en anillos de aorta, hemodinámica basal y estado redox llevados a cabo en esta Tesis Doctoral entraban en contradicción con los nuevos estudios.

El hecho de que la administración directa del 17 β -Estradiol no modificara los parámetros hemodinámicos (PA; ICV), podía explicarse por distintos mecanismos fisiológicos que tamponarían los efectos directos del 17 β -Estradiol. Sin embargo cuando paralelamente nos propusimos discriminar la acción vasorrelajante del 17 β -Estradiol directa o mediada por NO, bloqueando la síntesis de este último, nos encontramos con el efecto contrario al que esperábamos. De los resultados obtenidos con el bloqueo de los receptores AT₁ dedujimos, que la alteración de la función endotelial (mediante el bloqueo de la síntesis de NO con L-NAME) puede ser responsable de la potenciación por parte del 17 β -Estradiol de los efectos vasculares de la Angiotensina II.

Sin saberlo, estábamos anticipando los resultados al WHI, publicación que nos abrió los ojos a la verdadera razón de estos resultados.

¿Porqué se dieron estos resultados entonces?

En el WHI se criticó la edad y el tipo de estratificación de las edades de las participantes, puesto que se agregaron por grupos amplios de edad para obtener diferencias significativas pronto. La edad media de las mujeres que participaron superaba en más de 10 años la aparición

de la menopausia, y más de 2/3 de ellas eran mayores de 60 años.

La edad por sí sola no podía justificar nuestros resultados, puesto que la edad de las ratas y el tiempo desde la ovariectomía era la misma para todos los estudios experimentales de esta Tesis, y solo observamos un efecto perjudicial sobre la hemodinámica cuando administramos L-NAME.

El tipo de estrógeno tampoco podía ser el causante. Es cierto que una de las críticas principales del WHI fue la utilización de una THS con Estrógenos Conjugados Equinos, con ciertos efectos sobre el metabolismo hepático, y por tanto, lipídico. Ya en la década de los 90, en Europa se utilizaba el estrógeno más natural, el 17 β -Estradiol, normalmente en parche transcutáneo. (Parrilla and Abad 2004) Tampoco el gestágeno utilizado en el WHI, el Acetato de Medroxiprogesterona era el más adecuado, por sus efectos negativos sobre el perfil lipídico de la mujer. (PEPI 1995) De esta manera, los resultados del WHI no podían extrapolarse a la totalidad de la THS.

En nuestro trabajo utilizamos el 17 β -Estradiol, sin influencia del gestágeno, para poder inferir únicamente los efectos de los estrógenos aislados sobre el sistema cardiovascular.

¿Qué podía ser común en el diseño de nuestro estudio y el WHI, para que se dieran resultados sorprendentemente análogos?

La respuesta es: la alteración de la función endotelial

Cuando infundimos a la rata L-NAME previamente a administrar 17 β -Estradiol, realmente estamos anulando la función endotelial, y todo el efecto de homeostasis vascular que implica la función de un endotelio intacto. Fuimos uno de los primeros grupos de investigación que objetivamos que, en ausencia de un endotelio con adecuado funcionamiento, el Estradiol ejerce una acción hemodinámica negativa, pero si el endotelio está intacto, el efecto de la THS con estrógenos es beneficioso sobre la respuesta vasorrelajante vascular y sobre el estado redox de la rata.

Las mujeres que participaron en el WHI tenían probablemente una función endotelial anómala, debido al deterioro del perfil lipídico secundario a la edad avanzada y al hipoestronismo prolongado, con posible desarrollo de arterioesclerosis, favorecedora de los eventos cardiovasculares adversos. Todo ello sin contar el sobrepeso, la incidencia alta de diabetes y el hábito tabáquico. Es por esta razón por la que el subgrupo de mayor edad en el WHI presentó más eventos cardiovasculares. (Parrilla and Abad 2004)

Por ello, parece crítico iniciar la THS lo más precozmente posible porque, a partir de nuestros resultados, ejercería un efecto beneficioso ya que disminuiría la acción de los ROS, mejoraría la respuesta relajante vascular y la biodisponibilidad de NO, disminuyendo el riesgo de forma-

ción de placas de ateroma en la pared del vaso.

En esta línea, nuestro grupo de investigación estudió posteriormente la incidencia de la THS con 17 β -Estradiol en ratas espontáneamente hipertensas (SHR), a las que se sometió a ovariectomía a las 10 semanas de vida, cuando aún la HTA no había inducido fenómenos de remodelado vascular y a las 25 semanas, cuando estos fenómenos ya se habían establecido. En los animales en los que la THS se inició antes del inicio del remodelado vascular, el 17 β -Estradiol previno tanto el incremento de la PAM como el remodelado en las arterias coronarias, disminuyendo la PAM de estos animales hipertensos. Sin embargo, no tuvo el mismo efecto beneficioso y protector en las ratas SHR que habían sido castradas y tratadas con 17 β -Estradiol a las 25 semanas de vida. De esta manera, se comprobó que el inicio temprano del tratamiento con 17 β -Estradiol podía atenuar la HTA y proteger el sistema cardiovascular de los efectos perjudiciales de la HTA. Sin embargo, los estrógenos no tuvieron efecto alguno cuando la alteración vascular ya estaba establecida, (Garcia, Gimenez et al. 2005) lo cual volvía a estar de acuerdo con la anterior interpretación de los resultados del WHI estratificados por tiempo de comienzo de la menopausia y edad de las mujeres.

Con posterioridad a estos estudios experimentales, se publicó un estudio *post hoc* del WHI valorando un score de calcificación coronaria en el subgrupo de mujeres menores de 60 años que participaron en el WHI mostraron una disminución sig-

nificativa en las calcificaciones coronarias en el brazo asignado a Estrógenos, frente a las asignadas a placebo. (Manson, Allison et al. 2007)

Sorprendentemente, tras una reevaluación del WHI realizada por sus propios autores, en los que unieron los 2 subgrupos de THS, publicaron que la edad de inicio de la THS en la postmenopausia tenía un importante efecto en los resultados cardiovasculares de la THS, al contrario de lo que sostenían en las primeras publicaciones del WHI. Así, las mujeres más jóvenes, que iniciaban THS temprano, tenían una disminución significativa de los eventos cardiovasculares. (Rossouw, Prentice et al. 2007)

Así pues, parece que la THS podría conferir beneficios en la prevención primaria de la enfermedad coronaria cuando se inicia por debajo de los 60 años o tras menos de 10 años desde la menopausia. Por ello, la Conferencia Consenso de la British Menopause Society llegó a esta conclusión en 2008, (Rees and Stevenson 2008) y posteriormente, la International Menopause Society (IMS) se alineó con este criterio. (Pines, Sturdee et al. 2008) Estos planteamientos vuelven a coincidir con los estudios observacionales y en primates de los años 90, estableciendo en una situación de reposo este péndulo que ha significado el manejo de la THS y la salud cardiovascular de la mujer. (Stevenson, Hodis et al. 2009)

Hay otros factores que plantea el WHI que todavía lastran la THS, como los posibles efectos deletéreos sobre otros órganos y sistemas. Aunque las publicaciones

posteriores al WHI no mostraron mayor riesgo de cáncer de mama con estrógenos y gestágenos al realizar el ajuste adecuado por variables de confusión, (Anderson, Chlebowski et al. 2006) y además mostraron una disminución significativa en la incidencia de cáncer de mama en las mujeres que solo utilizaban estrógenos frente a placebo. (Stefanick, Anderson et al. 2006)

De esta forma, los resultados de los grandes estudios clínicos no apoyan un mayor riesgo de cáncer de mama con el uso de THS. Aún así, el riesgo de cáncer de mama sigue sin resolver, aunque cualquier aumento en el riesgo propuesto para la THS es similar o incluso inferior al riesgo estimado para ciertos estilos de vida o al uso de muchos fármacos comunes. (Stevenson, Hodis et al. 2009)

Relataba Jonathan Swift en el periódico The Examiner:

"Falsehood flies, and truth comes limping after it, so that when men come to be undeceived, it is too late; the jest is over, and the tale hath had its effect."

(9 de Noviembre de 1710)

("La mentira vuela, y la verdad viene cojeando tras ella, de modo que cuando los hombres llegan a desengañarse de ella, es demasiado tarde; la broma ha terminado, y el cuento ha surgido efecto.")

Así, muchos Médicos Generalistas o Cardiólogos ya no consideran la THS como estrategia de prevención de enfermedad coronaria en mujeres. Es más, la contraindican habitualmente en nuestro medio,

aunque no se haya prescrito para tal fin , sino para tratar el síndrome climatérico.

Sabemos que la modificación de los hábitos de vida tales como una dieta adecuada, el ejercicio físico y el abandono del tabaquismo reduce la incidencia de enfermedad coronaria en hombres y mujeres. (Yusuf, Hawken et al. 2004) También son importantes medidas preventivas en control de la PA y la diabetes. Sin embargo, algunas terapias que han mostrado eficacia en el varón, no lo han hecho en la mujer. Por ejemplo, el uso de dosis bajas de Aspirina no ha sido eficaz en la prevención de eventos cardiovasculares en mujeres. (Berger, Roncaglioni et al. 2006) Tampoco las estatinas han sido eficaces en la reducción de eventos cardiovasculares en la mujer, a diferencia del varón. (Walsh and Pignone 2004) Por otra parte, el incremento del riesgo de cáncer de mama observado en mujeres que toman estatinas es de una magnitud similar a la reportada con la THS, (Hodis and Mack 2007) y no por ello se recomienda a las mujeres a la mínima dosis y sólo por un corto período de tiempo, como ocurre con los Estrógenos. A la luz de nuestros resultados y de la bibliografía actual, la THS puede ser más eficaz y tan segura como cualquier otra opción terapéutica para la prevención primaria de la enfermedad coronaria en mujeres postmenopáusicas, siempre que el tratamiento se inicie en un tiempo adecuado y a una dosis adecuada.

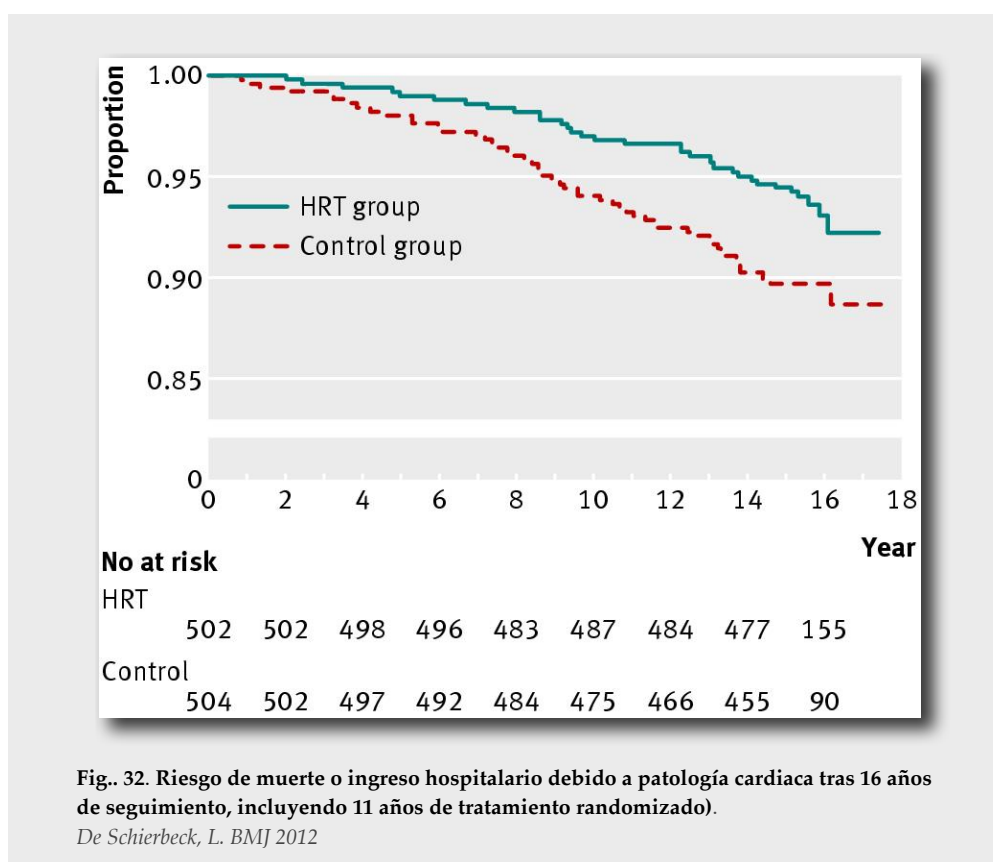
Aunque actualmente no puede justificarse la prescripción de la THS a las mujeres como prevención primaria de enfermedad cardiovascular, podemos utilizar el

conocimiento acerca de los riesgos y beneficios cardiovasculares de la THS en un sentido positivo a la hora de asesorar a la mujer menopáusica, al contrario que hasta hace muy poco tiempo.

La aplicación práctica de lo defendido en esta Tesis podemos apreciarla en un ensayo clínico randomizado publicado en este último mes, en el que 1006 mujeres entre 45 y 58 años, con menopausia reciente, fueron distribuidas aleatoriamente en dos brazos: THS con un preparado hormonal trifásico con 17β -Estradiol+Acetato de Noretisterona oral frente a no tratamiento. Las mujeres histerectomizadas recibieron 17β -Estradiol solo (2 mg/día). El objetivo primario fue valorar mortalidad, ingresos por angor e infarto de miocardio. (Schierbeck, Rejnmark et al.)

Tras 10 años de tratamiento randomizado, las mujeres que recibieron THS a dosis bajas con inicio temprano tras la menopausia, tuvieron una disminución significativa del riesgo de mortalidad, fallo cardíaco o infarto de miocardio, sin un aparente incremento en el riesgo de cáncer de mama, tromboembolismo venoso o accidente cerebro-vascular, respecto al grupo de mujeres que no recibió tratamiento hormonal alguno. (Figura 32)

Queda pendiente dilucidar si una mujer utiliza THS hasta los 60 años, si debemos interrumpirla por motivos de salud cardiovascular. Harán falta nuevos estudios para establecer un criterio fiable al respecto.



Esperamos que la continuación de proyectos de investigación como éste contribuyan a mejorar el conocimiento de la mujer en esta etapa de su vida, desmontando falsos dogmas y creencias no basadas en la evidencia científica, y que tanto daño han causado a la mujer menopáusica, frenando su bienestar y mejora en la calidad de vida.

Parafraseando a Jonathan Swift, es mucho más difícil demostrar una hipótesis con rigor que lanzar mentiras al aire so pretexto de una mediocre base científica.

Juan Luis Delgado Marín
Murcia, Enero 2013



CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

1

La ovariectomía induce un incremento de la Presión Arterial y disminución del Índice Cardíaco que se acompañan de una alteración en la respuesta vasodilatadora arterial debida a una disfunción del endotelio vascular.

2

La alteración de la vasorrelajación endotelio-dependiente inducida por la castración parece deberse a una disminución en la liberación de Óxido Nítrico y/o a un incremento en su inactivación, posiblemente derivada de la alteración del estado redox, consistente en mayor actividad pro-oxidante.

3

La terapia de sustitución con 17- β Estradiol previene los cambios hemodinámicos observados tras la ovariectomía, y restaura los índices de función de Óxido Nítrico y el estado redox.

4

En una situación de alteración de la función endotelial por bloqueo de la síntesis de Óxido Nítrico, la administración directa de 17- β Estradiol provoca un incremento agudo en las resistencias vasculares sistémicas.

5

Este deterioro hemodinámico está mediado en parte por una potenciación endógena de la acción de la Angiotensina II a través de sus receptores AT₁.

6

La administración precoz de 17- β Estradiol como tratamiento sustitutivo tras ovariectomía tiene un efecto beneficioso sobre el sistema cardiovascular, mientras que en situaciones de un mayor deterioro de la función endotelial, el 17- β Estradiol empeora la función cardiovascular.



Objetivo 1

Evaluar si la deprivación crónica de Estrógenos tras ovariectomía induce cambios hemodinámicos en la rata hembra.

HEMODINÁMICA BASAL		Sham (n=6)	Castradas (n=8)
PAM (mmHg)	Media	106,42	119,35 *
	SEM	3,54	3,02
ICV (ml/min/mmHg/100g)	Media	0,4	0,28 *
	SEM	0,04	0,02
RPT (mmHg/ml/min/100g)	Media	2,59	3,66 *
	SEM	0,27	0,27
IC (ml/min/100g)	Media	42,42	33,52 *
	SEM	3,1	1,54
FC (lat/min)	Media	404,29	393,4
	SEM	21,62	18,78

* P<0.05 Castradas vs Sham

Objetivo 2

Determinar si estos cambios se acompañan de una disfunción del endotelio vascular.

2.1. Respuesta de relajación de anillos de aorta a NPS y ACh.

[NPS] (logM)		-10	-9	-8	-7	-6	-5	-4
Sham (n=7)	Media	5,77	22,77	92,68	106,3	111,21	114,66	115,52
	SEM	1,34	4,78	6,87	4,7	6,4	5,44	5,78
Castradas (n=13)	Media	6,91	28,88	87,9	118,6	126,2	128,3	128
	SEM	2,68	1,91	-5,92	4	4	3,8	5,7

[ACh] (logM)		-8	-7	-6	-5	-4
Sham (n=11)	Media	11,94	66,71	99,77	105,1	110,21
	SEM	6,57	5,58	4,35	4,07	7,3
Castradas (n=12)	Media	8,16	28,07 *	58,95 *	84,8 *	82,23 *
	SEM	2,98	6,58	7,36	7,41	6,94
L-NAME (n=6)	Media	0,99	2,18 ‡	3,18 ‡	3,77 ‡	6,36 ‡
	SEM	0	0	0	0	0

* P<0.05 Castradas vs Sham

‡ P<0.05 L-NAME vs Castradas y Sham

2.2. Respuesta de relajación de anillos de aorta a la Superóxido-Dismutasa (SOD).

[SOD] (U/mL)		0,1	1	10	100
Sham (n= 13)	Media	13,64	36,03	57,88	83,70
	SEM	2,73	5,46	7,46	8,40
Castradas (n= 12)	Media	6,17	22,92 *	42,95 *	67,70 *
	SEM	2,70	4,92	5,46	6,50
L-NAME (n= 12)	Media	0,72	1,26 ‡	1,99 ‡	3,09 ‡
	SEM	0	0	0	0

* P<0.05 Castradas vs Sham

‡ P<0.05 L-NAME vs Castradas y Sham

Objetivo 3

Estudiar los posibles mecanismos fisiopatológicos de la disfunción endotelial presente en ratas hembras privadas crónicamente de Estrógenos.

3.1. Evaluar si la ovariectomía da lugar a una disminución en la producción de NO.

3.1.1. Estudio bioquímico de los niveles de Nitritos y Nitratos.

ESTUDIOS BIOQUÍMICOS		Sham (n=7)	Castradas (n=7)
NITRITOS /NITRATOS (μmol/L)	Media	30,26	21,26 *
	SEM	2,1	2,7

* P<0.05 Castradas vs Sham

3.1.2. Estudio de la respuesta hemodinámica ante inhibición de NO con L-NAME.

HEMODINÁMICA + L-NAME		Sham (n=6)	Castradas (n=8)
Δ PAM (mmHg)	Media	38,65	34,43
	SEM	4,3	5,02
Δ ICV (ml/min/mmHg/100g)	Media	-0,23	-0,14 *
	SEM	0,04	0,02
Δ RPT (mmHg/ml/min/100g)	Media	3,52	3,65
	SEM	0,78	0,31
Δ IC (ml/min/100g)	Media	-16,57	-12,33
	SEM	3,54	1,56
Δ FC (lat/min)	Media	-66,54	-126,63 *
	SEM	23,04	15,56

* P<0.05 Castradas vs Sham

3.2. Valorar la participación del stress oxidativo en ratas ovariectomizadas.

3.2.1. Estudio bioquímico de marcadores de stress oxidativo.

ESTUDIOS BIOQUÍMICOS		Sham (n=7)	Castradas (n=7)
-SH (mmol/L)	Media	300,14	211,71 *
	SEM	15	9,6
SAT (mmol/L)	Media	1,14	0,96 *
	SEM	0,03	0,02
MDA + HNE (μmol/L)	Media	2,62	3,54 *
	SEM	0,05	0,21

* P<0.05 Castradas vs Sham

3.2.2. Efecto de la NAC en la relajación de anillos de aorta inducida por ACh.

[ACh] (logM)		-8	-7	-6	-5	-4
Sham + NAC (n=11)	Media	22,38	56,95	87,13	97,42	101,02
	SEM	4,59	3,82	6,31	2,58	4,19
Castradas + NAC (n=9)	Media	27,92	70,13	87,9	100,07	105,12
	SEM	4,59	7,83	5,35	4,03	3,05

Objetivo 4

Comprobar si la THS con Estradiol puede prevenir estos cambios.

4.1. Prevención de cambios en la hemodinámica basal.

HEMODINÁMICA BASAL		Sham (n=6)	Castradas (n=8)	Castradas + THS (n=6)
PAM (mmHg)	Media	106,42	119,35 *	109 †
	SEM	3,54	3,02	2,15
ICV (ml/min/mmHg/100g)	Media	0,4	0,28 *	0,47 †
	SEM	0,04	0,02	0,02
RPT (mmHg/ml/min/100g)	Media	2,59	3,66 *	2,16 †
	SEM	0,27	0,27	0,11
IC (ml/min/100g)	Media	42,42	33,52 *	50,98 †
	SEM	3,1	1,54	2,46
FC (lat/min)	Media	404,29	393,4	383,86
	SEM	21,62	18,78	11,31

* P<0.05 Castradas vs Sham

† P<0.05 Castradas+THS vs Castradas

4.2. Prevención de la disminución de la producción de NO.

4.2.1. Estudio bioquímico de los niveles de Nitritos y Nitratos.

ESTUDIOS BIOQUÍMICOS		Sham (n=7)	Castradas (n=7)	Castradas + THS (n=7)
NITRITOS /NITRATOS ($\mu\text{mol/L}$)	Media	30,26	21,26 *	30,04 †
	SEM	2,1	2,7	0,74

* P<0.05 Castradas vs Sham

† P<0.05 Castradas+THS vs Castradas

4.2.2. Estudio de la respuesta hemodinámica ante inhibición de NO con L-NAME.

HEMODINÁMICA + L-NAME		Sham (n=6)	Castradas (n=8)	Castradas + THS (n=6)
Δ PAM (mmHg)	Media	38,65	34,43	36,87
	SEM	4,3	5,02	1,56
Δ ICV (ml/min/mmHg/100g)	Media	-0,23	-0,14 *	-0,26 †
	SEM	0,04	0,02	0,01
Δ RPT (mmHg/ml/min/100g)	Media	3,52	3,65	3,07
	SEM	0,78	0,31	0,47
Δ IC (ml/min/100g)	Media	-16,57	-12,33	-21,29 †
	SEM	3,54	1,56	2,15
Δ FC (lat/min)	Media	-66,54	-126,63 *	-95,87
	SEM	23,04	15,56	14,26

* P<0.05 Castradas vs Sham

† P<0.05 Castradas+THS vs Castradas

4.2.3. Estudio bioquímico de marcadores de stress oxidativo.

ESTUDIOS BIOQUÍMICOS		Sham (n=7)	Castradas (n=7)	Castradas + THS (n=7)
-SH (mmol/L)	Media	300,14	211,71 *	331,86 †
	SEM	15	9,6	19
SAT (mmol/L)	Media	1,14	0,96 *	1,25 †
	SEM	0,03	0,02	0,02
MDA + HNE ($\mu\text{mol/L}$)	Media	2,62	3,54 *	2,85 †
	SEM	0,05	0,21	0,06

* P<0.05 Castradas vs Sham

† P<0.05 Castradas+THS vs Castradas

Objetivo 5

Valorar la interacción entre NO y Angiotensina II en los efectos cardiovasculares de la administración aguda de Estradiol.

HEMODINÁMICA 17 β -ESTRADIOL DIRECTO			Tiempo (h)				
			0	1	2	3	4
PAM (mmHg)	Grupo I 17- β E2 (n=9)	Media	107,84	108,47	107,23	103,70	99,70
		SEM	4,74	5,46	5,28	5,65	6,01
	Grupo II Etanol (n=5)	Media	103,83	105,60	103,07	101,07	97,30
		SEM	3,88	4,50	5,32	7,23	7,35
	Grupo III 17- β E2 + NAME (n=7)	Media	152,40	147,20	141,60	142,80	-
		SEM	5,42	3,90	5,38	7,09	-
	Grupo IV Etanol + NAME (n=5)	Media	142,10	139,90	141,20	135,50	-
		SEM	5,74	3,56	4,85	5,43	-
	Grupo V PE + 17- β E2 (n=5)	Media	146,80	143,20	142,40	141,20	-
		SEM	3,16	2,98	2,85	2,74	-
	Grupo VI PE + Etanol (n=5)	Media	141,00	143,60	144,60	145,60	-
		SEM	3,46	5,08	5,52	4,09	-
	Grupo VII Los + NAME + 17- β E2 (n=7)	Media	128,14	121,00	121,14	115,57	-
		SEM	1,03	3,35	3,30	3,68	-

‡ P<0.05 L-NAME+17 β -Estradiol vs LOS+L-NAME+17 β -Estradiol

HEMODINÁMICA 17 β -ESTRADIOL DIRECTO			Tiempo (h)				
			0	1	2	3	4
IC (ml/min/100g)	Grupo I 17- β E2 (n=9)	Media	32,27	31,30	33,99	35,52	35,85
		SEM	2,05	2,87	2,60	2,68	2,26
	Grupo II Etanol (n=5)	Media	35,31	36,14	33,43	38,09	36,87
		SEM	3,45	3,42	3,19	3,79	3,46
	Grupo III 17- β E2 + NAME (n=7)	Media	20,99	15,14*	16,38	15,33*	14,42*
		SEM	0,80	0,77	1,05	1,07	1,89
	Grupo IV Etanol + NAME (n=5)	Media	20,21	19,99†	18,49	19,99†	20,53†
		SEM	1,46	1,92	1,79	1,46	0,99
	Grupo V PE + 17- β E2 (n=5)	Media	26,26	25,74	23,36	23,36	-
		SEM	1,88	2,46	1,95	1,88	-
	Grupo VI PE + Etanol (n=5)	Media	28,92	24,50	27,68	26,08	-
		SEM	2,45	2,12	2,79	0,93	-
	Grupo VII Los + NAME + 17- β E2 (n=7)	Media	25,73	27,12	24,30	25,33	-
		SEM	1,09	1,47	2,83	1,14	-

* P<0.05 vs tiempo 0 † P<0.05 L-NAME+17 β -Estradiol vs L-NAME+Etanol

‡ P<0.05 L-NAME+17 β -Estradiol vs LOS+L-NAME+17 β -Estradiol

HEMODINÁMICA 17 β -ESTRADIOL DIRECTO			Tiempo (h)				
			0	1	2	3	4
RPT (mmHg/ml/ min/100g)	Grupo I 17- β E2 (n=9)	Media	3,48	3,71	3,40	3,08	2,92
		SEM	0,32	0,38	0,42	0,30	0,26
	Grupo II Etanol (n=5)	Media	3,10	3,00	3,20	2,70	-
		SEM	0,30	0,30	0,30	0,20	-
	Grupo III 17- β E2 + NAME (n=7)	Media	7,29	9,95 *	8,88 *	9,57 *	-
		SEM	0,26	0,80	0,72	0,84	-
	Grupo IV Etanol + NAME (n=5)	Media	7,21	7,34 †	7,91	6,86 †	-
		SEM	0,71	0,79	0,72	0,36	-
	Grupo V PE + 17- β E2 (n=5)	Media	5,74	5,82	6,22	6,10	-
		SEM	0,51	0,61	0,54	0,49	-
	Grupo VI PE + Etanol (n=5)	Media	5,00	6,10	5,50	5,80	-
		SEM	0,39	0,71	0,69	0,21	-
	Grupo VII Los + NAME + 17- β E2 (n=7)	Media	5,05 ‡	4,63 ‡	5,43 ‡	4,64 ‡	-
		SEM	0,22	0,33	0,63	0,25	-

* P<0.05 vs tiempo 0

† P<0.05 L-NAME+17 β -Estradiol vs L-NAME+Etanol

‡ P<0.05 L-NAME+17 β -Estradiol vs LOS+L-NAME+17 β -Estradiol

HEMODINÁMICA 17 β -ESTRADIOL DIRECTO			Tiempo (h)				
			0	1	2	3	4
FC (lat/min)	Grupo I 17- β E2 (n=9)	Media	384,90	390,93	405,12	422,00 *	411,37
		SEM	13,29	13,44	12,58	17,39	15,20
	Grupo II Etanol (n=5)	Media	374,73	360,50	397,53	400,73	391,67
		SEM	9,86	12,73	20,34	10,55	6,66
	Grupo III 17- β E2 + NAME (n=7)	Media	262,74	331,94 *	330,02 *	353,01 *	-
		SEM	18,01	26,63	24,29	19,94	-
	Grupo IV Etanol + NAME (n=5)	Media	285,25	285,00	311,50	303,25	-
		SEM	15,53	26,28	17,78	11,70	-
	Grupo V PE + 17- β E2 (n=5)	Media	291,00	332,20	326,40	340,20	-
		SEM	41,43	23,64	17,53	18,85	-
	Grupo VI PE + Etanol (n=5)	Media	267,40	280,00	281,20	294,40	-
		SEM	19,71	23,49	6,83	13,05	-
	Grupo VII Los + NAME + 17- β E2 (n=7)	Media	293,14 ‡	321,86 ‡	378,57 ‡	374,14 ‡	-
		SEM	8,75	14,27	17,14	9,59	-

* P<0.05 vs tiempo 0

‡ P<0.05 L-NAME+17 β -Estradiol vs LOS+L-NAME+17 β -Estradiol



BIBLIOGRAFÍA

Bibliografía

- Acuff, C. G., H. Huang, et al. (1997). "Estradiol induces C-type natriuretic peptide gene expression in mouse uterus." *Am J Physiol* **273**(6 Pt 2): H2672-7.
- Adashi, E. Y., C. E. Resnick, et al. (1991). "Insulin-like growth factors: the ovarian connection." *Hum Reprod* **6**(9): 1213-9.
- Ahluwalia, A. and A. J. Hobbs (2005). "Endothelium-derived C-type natriuretic peptide: more than just a hyperpolarizing factor." *Trends Pharmacol Sci* **26**(3): 162-7.
- Alfie, J., L. Lugones, et al. (1997). "Hemodynamic effects of transdermal estradiol alone and combined with norethisterone acetate." *Maturitas* **27**(2): 163-9.
- Anderson, G. L., R. T. Chlebowski, et al. (2006). "Prior hormone therapy and breast cancer risk in the Women's Health Initiative randomized trial of estrogen plus progestin." *Maturitas* **55**(2): 103-15.
- Anderson, G. L., M. Limacher, et al. (2004). "Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial." *JAMA* **291**(14): 1701-12.
- Armando, I., M. Jezova, et al. (2002). "Estrogen upregulates renal angiotensin II AT(2) receptors." *Am J Physiol Renal Physiol* **283**(5): F934-43.
- Baksi, S. N. and M. J. Hughes (1983). "Modulation by estradiol of rabbit atrial chronotropic response to histamine." *Basic Res Cardiol* **78**(5): 505-9.
- Barber, D. A., J. C. Burnett, Jr., et al. (1998). "Gender and relaxation to C-type natriuretic peptide in porcine coronary arteries." *J Cardiovasc Pharmacol* **32**(1): 5-11.
- Barrett-Connor, E. and T. L. Bush (1991). "Estrogen and coronary heart disease in women." *JAMA* **265**(14): 1861-7.
- Beato, M. and A. Sanchez-Pacheco (1996). "Interaction of steroid hormone receptors with the transcription initiation complex." *Endocr Rev* **17**(6): 587-609.
- Berger, J. S., M. C. Roncaglioni, et al. (2006). "Aspirin for the primary prevention of cardiovascular events in women and men: a sex-specific meta-analysis of randomized controlled trials." *JAMA* **295**(3): 306-13.
- Beverelli, F., M. L. Bea, et al. (1997). "Chronic inhibition of NO synthase enhances the production of prostacyclin in coronary arteries through upregulation of the cyclooxygenase type 1 isoform." *Fundam Clin Pharmacol* **11**(3): 252-9.
- Bianchi, P. R., B. P. Gumz, et al. (2006). "Myocardial infarction increases reactivity to phenylephrine in isolated aortic rings of ovariectomized rats." *Life Sci* **78**(8): 875-81.
- Blacher, J., J. Raison, et al. (1998). "Increased arterial distensibility in postmenopausal hypertensive women with and without hormone replacement therapy after acute administration of the ACE inhibitor moexipril." *Cardiovasc Drugs Ther* **12**(4): 409-14.
- Bonacasa, B., M. L. Sanchez, et al. (2008). "2-Methoxyestradiol attenuates hypertension and coronary vascular remodeling in spontaneously hypertensive rats." *Maturitas* **61**(4): 310-6.
- Brosnihan, K. B., A. Moriguchi, et al. (1994). "Estrogen augments the contribution of nitric oxide to blood pressure regulation in transgenic hypertensive rats expressing the mouse Ren-2 gene." *Am J Hypertens* **7**(7 Pt 1): 576-82.
- Brosnihan, K. B., P. S. Senanayake, et al. (1999). "Bi-directional actions of estrogen on the renin-angiotensin system." *Braz J Med Biol Res* **32**(4): 373-81.
- Brosnihan, K. B., D. Weddle, et al. (1997). "Effects of chronic hormone replacement on the renin-angiotensin system in cynomolgus monkeys." *J Hypertens* **15**(7): 719-26.
- Bush, T. L., E. Barrett-Connor, et al. (1987). "Cardiovascular mortality and noncontraceptive use of estrogen in women: results from the Lipid Research Clinics Program Follow-up Study." *Circulation* **75**(6): 1102-9.
- Butenandt, A. and E. Ziegner (1930). "On the physiological effectiveness of crystallized female sex hormones in the Allen-Doisy test. Studies on the female sex hormone." *J Phys Chem* **188**: 1-10.
- Cano, A., J. L. Dueñas, et al. (2006). *Selective Estrogen Receptor Modulators : A New Brand of Multitarget Drugs*, Springer.
- Cano, A. and C. Hermenegildo (2000). "Modulation of the oestrogen receptor: a process with distinct susceptible steps." *Hum Reprod Update* **6**(3): 207-11.
- Carey, R. M., Z. Q. Wang, et al. (2000). "Role of the angiotensin type 2 receptor in the regulation of

- blood pressure and renal function." *Hypertension* **35**(1 Pt 2): 155-63.
- Case, J. and C. A. Davison (1999). "Estrogen alters relative contributions of nitric oxide and cyclooxygenase products to endothelium-dependent vasodilation." *J Pharmacol Exp Ther* **291**(2): 524-30.
- Caulin-Glaser, T., G. Garcia-Cardena, et al. (1997). "17 beta-estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca²⁺ mobilization." *Circ Res* **81**(5): 885-92.
- Ceylan-Isik, A. F., O. B. Erdogan-Tulmac, et al. (2009). "Effect of 17beta-oestradiol replacement on vascular responsiveness in ovariectomized diabetic rats." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **36**(11): e65-71.
- Chambliss, K. L. and P. W. Shaul (2002). "Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase." *Endocr Rev* **23**(5): 665-86.
- Chan, N. N., R. J. MacAllister, et al. (2001). "Changes in endothelium-dependent vasodilatation and alpha-adrenergic responses in resistance vessels during the menstrual cycle in healthy women." *J Clin Endocrinol Metab* **86**(6): 2499-504.
- Chappell, M. C., P. E. Gallagher, et al. (2003). "Estrogen or the AT1 antagonist olmesartan reverses the development of profound hypertension in the congenic mRen2. Lewis rat." *Hypertension* **42**(4): 781-6.
- Chataigneau, T. and V. B. Schini-Kerth (2005). "Vascular effects of ovariectomy and chronic oestrogen treatment in rats: controversy or experimental protocol diversity?" *Br J Pharmacol* **144**(2): 161-3.
- Chauhan, S. D., H. Nilsson, et al. (2003). "Release of C-type natriuretic peptide accounts for the biological activity of endothelium-derived hyperpolarizing factor." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(3): 1426-31.
- Chen, G., H. Suzuki, et al. (1988). "Acetylcholine releases endothelium-derived hyperpolarizing factor and EDRF from rat blood vessels." *Br J Pharmacol* **95**(4): 1165-74.
- Chen, Y. F., A. J. Naftilan, et al. (1992). "Androgen-dependent angiotensinogen and renin messenger RNA expression in hypertensive rats." *Hypertension* **19**(5): 456-63.
- Chen, Z., I. S. Yuhanna, et al. (1999). "Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen." *J Clin Invest* **103**(3): 401-6.
- Coelingh Bennink, H. J. (2004). "Are all estrogens the same?" *Maturitas* **47**(4): 269-75.
- Colditz, G. A., W. C. Willett, et al. (1987). "Menopause and the risk of coronary heart disease in women." *N Engl J Med* **316**(18): 1105-10.
- Conrad, K. P., P. M. Morganelli, et al. (1989). "The renin-angiotensin system during pregnancy in chronically instrumented, conscious rats." *Am J Obstet Gynecol* **161**(4): 1065-72.
- Convertino, V. A. (1998). "Gender differences in autonomic functions associated with blood pressure regulation." *Am J Physiol* **275**(6 Pt 2): R1909-20.
- Crews, J. K. and R. A. Khalil (1999). "Antagonistic effects of 17 beta-estradiol, progesterone, and testosterone on Ca²⁺ entry mechanisms of coronary vasoconstriction." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **19**(4): 1034-40.
- Crews, J. K. and R. A. Khalil (1999). "Gender-specific inhibition of Ca²⁺ entry mechanisms of arterial vasoconstriction by sex hormones." *Clin Exp Pharmacol Physiol* **26**(9): 707-15.
- Dantas, A. P., R. Scivoletto, et al. (1999). "Influence of female sex hormones on endothelium-derived vasoconstrictor prostanoid generation in microvessels of spontaneously hypertensive rats." *Hypertension* **34**(4 Pt 2): 914-9.
- David, F. L., M. H. Carvalho, et al. (2001). "Ovarian hormones modulate endothelin-1 vascular reactivity and mRNA expression in DOCA-salt hypertensive rats." *Hypertension* **38**(3 Pt 2): 692-6.
- Doni, M. G., B. J. Whittle, et al. (1988). "Actions of nitric oxide on the release of prostacyclin from bovine endothelial cells in culture." *Eur J Pharmacol* **151**(1): 19-25.
- Droge, W. (2002). "Free radicals in the physiological control of cell function." *Physiol Rev* **82**(1): 47-95.
- Dvorkin, M. A. and D. P. Cardinali (2003). *Bases Fisiológicas de la Práctica Médica. Endocrinología de la Reproducción*. Buenos Aires, Editorial Médica Panamericana.
- Eckly-Michel, A., V. Martin, et al. (1997). "Involvement of cyclic nucleotide-dependent protein kinases in cyclic AMP-mediated vasorelaxation." *Br J Pharmacol* **122**(1): 158-64.
- Edwards, G., K. A. Dora, et al. (1998). "K⁺ is an endothelium-derived hyperpolarizing factor in rat arteries." *Nature* **396**(6708): 269-72.
- El-Seweid, M. M., H. E. Mohamed, et al. (2012). "Nicotine and vascular endothelial dysfunction in

- female ovariectomized rats: role of estrogen replacement therapy." *J Pharm Pharmacol* **64**(1): 108-19.
- English, J. L., L. O. Jacobs, et al. (1998). "Effect of the menstrual cycle on endothelium-dependent vasodilation of the brachial artery in normal young women." *Am J Cardiol* **82**(2): 256-8.
- Enmark, E., M. Peltö-Huikko, et al. (1997). "Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern." *J Clin Endocrinol Metab* **82**(12): 4258-65.
- Farhat, M. Y., S. Abi-Younes, et al. (1996). "Estradiol increases cyclic adenosine monophosphate in rat pulmonary vascular smooth muscle cells by a nongenomic mechanism." *J Pharmacol Exp Ther* **276**(2): 652-7.
- Farhat, M. Y., M. C. Lavigne, et al. (1996). "The vascular protective effects of estrogen." *FASEB J* **10**(5): 615-24.
- Fenoy, F. J., M. E. Hernandez, et al. "Acute effects of 2-methoxyestradiol on endothelial aortic NO release in male and ovariectomized female rats." *Nitric Oxide* **23**(1): 12-9.
- Fiol, G., F. Machado, et al. (1998). "Role of nitric oxide on the central hemodynamic response to acute volume expansion in the pregnant rat." *Am J Obstet Gynecol* **178**(4): 823-9.
- Fritz, M. A. and L. Speroff (2011). *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*, Lippincott, Williams & Wilkins.
- Furchgott, R. F. and P. M. Vanhoutte (1989). "Endothelium-derived relaxing and contracting factors." *FASEB J* **3**(9): 2007-18.
- Garcia, M. P., J. Gimenez, et al. (2006). "Effect of estrogen and angiotensin-converting enzyme inhibitor on vascular remodeling in ovariectomized spontaneously hypertensive rats." *Menopause* **13**(3): 397-403.
- Garcia, P. M., J. Gimenez, et al. (2005). "17beta-estradiol exerts a beneficial effect on coronary vascular remodeling in the early stages of hypertension in spontaneously hypertensive rats." *Menopause* **12**(4): 453-9.
- Geary, G. G., D. N. Krause, et al. (2000). "Estrogen reduces mouse cerebral artery tone through endothelial NOS- and cyclooxygenase-dependent mechanisms." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **279**(2): H511-9.
- Gerber, R. T., M. A. Anwar, et al. (1998). "Enhanced acetylcholine induced relaxation in small mesenteric arteries from pregnant rats: an important role for endothelium-derived hyperpolarizing factor (EDHF)." *Br J Pharmacol* **125**(3): 455-60.
- Gibbons, G. H. and V. J. Dzau (1994). "The emerging concept of vascular remodeling." *N Engl J Med* **330**(20): 1431-8.
- Gilbert, J. S., M. J. Ryan, et al. (2008). "Pathophysiology of hypertension during pre-eclampsia: linking placental ischemia with endothelial dysfunction." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **294**(2): H541-50.
- Gilligan, D. M., A. A. Quyyumi, et al. (1994). "Effects of physiological levels of estrogen on coronary vasomotor function in postmenopausal women." *Circulation* **89**(6): 2545-51.
- Gimenez, J., M. P. Garcia, et al. (2006). "17Beta-estradiol enhances the acute hypotensive effect of captopril in female ovariectomized spontaneously hypertensive rats." *Exp Physiol* **91**(4): 715-22.
- Golding, E. M. and T. E. Kepler (2001). "Role of estrogen in modulating EDHF-mediated dilations in the female rat middle cerebral artery." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**(6): H2417-23.
- Goldzieher, J. W. and H. W. Rudel (1974). "How the oral contraceptives came to be developed." *JAMA* **230**(3): 421-5.
- Gonzales, R. J., B. R. Walker, et al. (2001). "17beta-estradiol increases nitric oxide-dependent dilation in rat pulmonary arteries and thoracic aorta." *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* **280**(3): L555-64.
- Grady, D., D. Herrington, et al. (2002). "Cardiovascular disease outcomes during 6.8 years of hormone therapy: Heart and Estrogen/progestin Replacement Study follow-up (HERS II)." *JAMA* **288**(1): 49-57.
- Greene, G. L., P. Gilna, et al. (1986). "Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA." *Science* **231**(4742): 1150-4.
- Griendling, K. K. and G. A. FitzGerald (2003). "Oxidative stress and cardiovascular injury: Part I: basic mechanisms and in vivo monitoring of ROS." *Circulation* **108**(16): 1912-6.
- Grodin, J. M., P. K. Siiteri, et al. (1973). "Source of estrogen production in postmenopausal women." *J Clin Endocrinol Metab* **36**(2): 207-14.
- Grodstein, F., J. E. Manson, et al. (2006). "Hormone therapy and coronary heart disease: the role of time since menopause and age at hormone initiation." *J Womens Health (Larchmt)* **15**(1): 35-44.
- Grosser, T., S. Fries, et al. (2006). "Biological basis for the cardiovascular consequences of COX-2

- inhibition: therapeutic challenges and opportunities." *J Clin Invest* **116**(1): 4-15.
- Gruber, C. J., W. Tschugguel, et al. (2002). "Production and actions of estrogens." *N Engl J Med* **346**(5): 340-52.
- Gruber, D. M. and J. C. Huber (2001). "Tissue specificity: the clinical importance of steroid metabolites in hormone replacement therapy." *Maturitas* **37**(3): 151-7.
- Gruchow, H. W., A. J. Anderson, et al. (1988). "Postmenopausal use of estrogen and occlusion of coronary arteries." *Am Heart J* **115**(5): 954-63.
- Grundt, A., C. Grundt, et al. (2010). "Rhythmic supplementation of 17beta-estradiol according to the physiological estrous cycle: effect on blood pressure in female ovariectomized rats." *Horm Metab Res* **42**(2): 130-6.
- Gryglewski, R. J., R. M. Palmer, et al. (1986). "Superoxide anion is involved in the breakdown of endothelium-derived vascular relaxing factor." *Nature* **320**(6061): 454-6.
- Hashimoto, M., M. Akishita, et al. (1995). "Modulation of endothelium-dependent flow-mediated dilatation of the brachial artery by sex and menstrual cycle." *Circulation* **92**(12): 3431-5.
- Hauser, B., P. Radermacher, et al. (2004). "Nitric oxide, bacteria, and host defense in sepsis: who needs what?" *Shock* **22**(6): 588-90.
- Hayashi, T., K. Yamada, et al. (1995). "Estrogen increases endothelial nitric oxide by a receptor-mediated system." *Biochem Biophys Res Commun* **214**(3): 847-55.
- Haynes, M. P., D. Sinha, et al. (2000). "Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells." *Circ Res* **87**(8): 677-82.
- Hennig, B. and C. K. Chow (1988). "Lipid peroxidation and endothelial cell injury: implications in atherosclerosis." *Free Radic Biol Med* **4**(2): 99-106.
- Henrion, D., E. Dechaux, et al. (1997). "Alteration of flow-induced dilatation in mesenteric resistance arteries of L-NAME treated rats and its partial association with induction of cyclo-oxygenase-2." *Br J Pharmacol* **121**(1): 83-90.
- Henry, P. J., O. H. Drummer, et al. (1989). "S-nitrosothiols as vasodilators: implications regarding tolerance to nitric oxide-containing vasodilators." *Br J Pharmacol* **98**(3): 757-66.
- Hermenegildo, C., P. J. Oviedo, et al. (2005). "Progestogens stimulate prostacyclin production by human endothelial cells." *Hum Reprod* **20**(6): 1554-61.
- Hernan, M. A., A. Alonso, et al. (2008). "Observational studies analyzed like randomized experiments: an application to postmenopausal hormone therapy and coronary heart disease." *Epidemiology* **19**(6): 766-79.
- Hernandez, I., J. L. Delgado, et al. (2000). "17beta-estradiol prevents oxidative stress and decreases blood pressure in ovariectomized rats." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* **279**(5): R1599-605.
- Hernandez, I., A. C. Ingles, et al. (1991). "Cardio-circulatory responses to AII and AVP in conscious rats." *J Cardiovasc Pharmacol* **17**(6): 916-22.
- Hernandez, I., T. Quesada, et al. (1995). "Effect of N omega-nitro-L-arginine methyl ester on cardiac haemodynamic responses to adenosine infusion in conscious rats." *Gen Pharmacol* **26**(1): 143-8.
- Hillier, S. G., P. F. Whitelaw, et al. (1994). "Follicular oestrogen synthesis: the 'two-cell, two-gonadotrophin' model revisited." *Mol Cell Endocrinol* **100**(1-2): 51-4.
- Hiroki, J., Y. Fukumoto, et al. (2004). "[Inhibition of Rho-kinase by fasudil preventing anginal attacks associated with spastic angina: a case report]." *J Cardiol* **44**(4): 161-4.
- Hishikawa, K., T. Nakaki, et al. (1995). "Up-regulation of nitric oxide synthase by estradiol in human aortic endothelial cells." *FEBS Lett* **360**(3): 291-3.
- Hochberg, R. B. (1998). "Biological esterification of steroids." *Endocr Rev* **19**(3): 331-48.
- Hodis, H. N. and W. J. Mack (2007). "Postmenopausal hormone therapy in clinical perspective." *Menopause* **14**(5): 944-57.
- Hsia, J., R. D. Langer, et al. (2006). "Conjugated equine estrogens and coronary heart disease: the Women's Health Initiative." *Arch Intern Med* **166**(3): 357-65.
- Huang, A., D. Sun, et al. (2001). "EDHF mediates flow-induced dilation in skeletal muscle arterioles of female eNOS-KO mice." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **280**(6): H2462-9.
- Huang, A., D. Sun, et al. (1998). "Estrogen preserves regulation of shear stress by nitric oxide in arterioles of female hypertensive rats." *Hypertension* **31**(1 Pt 2): 309-14.
- Huang, A., D. Sun, et al. (1997). "Gender difference in myogenic tone of rat arterioles is due to es-

- trogen-induced, enhanced release of NO." Am J Physiol **272**(4 Pt 2): H1804-9.
- Huang, A., D. Sun, et al. (2000). "17beta-estradiol restores endothelial nitric oxide release to shear stress in arterioles of male hypertensive rats." Circulation **101**(1): 94-100.
- Huang, A., D. Sun, et al. (2004). "Estrogen elicits cytochrome P450-mediated flow-induced dilation of arterioles in NO deficiency: role of PI3K-Akt phosphorylation in genomic regulation." Circ Res **94**(2): 245-52.
- Huang, A., Y. Wu, et al. (2001). "Effect of estrogen on flow-induced dilation in NO deficiency: role of prostaglandins and EDHF." J Appl Physiol **91**(6): 2561-6.
- Hulley, S., D. Grady, et al. (1998). "Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group." JAMA **280**(7): 605-13.
- Hyder, S. M., G. L. Shipley, et al. (1995). "Estrogen action in target cells: selective requirements for activation of different hormone response elements." Mol Cell Endocrinol **112**(1): 35-43.
- Hynynen, M. M. and R. A. Khalil (2006). "The vascular endothelin system in hypertension-recent patents and discoveries." Recent Pat Cardiovasc Drug Discov **1**(1): 95-108.
- Iafrati, M. D., R. H. Karas, et al. (1997). "Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor alpha-deficient mice." Nat Med **3**(5): 545-8.
- Ignarro, L. J., G. M. Buga, et al. (1987). "Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide." Proc Natl Acad Sci U S A **84**(24): 9265-9.
- Ignarro, L. J., H. Lippton, et al. (1981). "Mechanism of vascular smooth muscle relaxation by organic nitrates, nitrites, nitroprusside and nitric oxide: evidence for the involvement of S-nitrosothiols as active intermediates." J Pharmacol Exp Ther **218**(3): 739-49.
- Isles, C. G., D. J. Hole, et al. (1992). "Relation between coronary risk and coronary mortality in women of the Renfrew and Paisley survey: comparison with men." Lancet **339**(8795): 702-6.
- Jespersen, C. M., K. Arnung, et al. (1983). "Effects of natural oestrogen therapy on blood pressure and renin-angiotensin system in normotensive and hypertensive menopausal women." J Hypertens **1**(4): 361-4.
- John, S., J. Jacobi, et al. (2000). "Effects of oral contraceptives on vascular endothelium in premenopausal women." Am J Obstet Gynecol **183**(1): 28-33.
- Jokela, H., P. Dastidar, et al. (2003). "Effects of long-term estrogen replacement therapy versus combined hormone replacement therapy on nitric oxide-dependent vasomotor function." J Clin Endocrinol Metab **88**(9): 4348-54.
- Kalantaridou, S. N., K. K. Naka, et al. (2004). "Impaired endothelial function in young women with premature ovarian failure: normalization with hormone therapy." J Clin Endocrinol Metab **89**(8): 3907-13.
- Kanashiro, C. A. and R. A. Khalil (2001). "Gender-related distinctions in protein kinase C activity in rat vascular smooth muscle." Am J Physiol Cell Physiol **280**(1): C34-45.
- Karas, R. H., J. B. Hodgins, et al. (1999). "Estrogen inhibits the vascular injury response in estrogen receptor beta-deficient female mice." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(26): 15133-6.
- Kawano, H., T. Motoyama, et al. (1996). "Menstrual cyclic variation of endothelium-dependent vasodilation of the brachial artery: possible role of estrogen and nitric oxide." Proc Assoc Am Physicians **108**(6): 473-80.
- Keaney, J. F., Jr., G. T. Shwaery, et al. (1994). "17 beta-estradiol preserves endothelial vasodilator function and limits low-density lipoprotein oxidation in hypercholesterolemic swine." Circulation **89**(5): 2251-9.
- Keung, W., P. M. Vanhoutte, et al. (2005). "Acute impairment of contractile responses by 17beta-estradiol is cAMP and protein kinase G dependent in vascular smooth muscle cells of the porcine coronary arteries." Br J Pharmacol **144**(1): 71-9.
- Keung, W., P. M. Vanhoutte, et al. (2005). "Nongenomic responses to 17beta-estradiol in male rat mesenteric arteries abolish intrinsic gender differences in vascular responses." Br J Pharmacol **146**(8): 1148-55.
- Khalil, R. A. (2011). "Potential approaches to enhance the effects of estrogen on senescent blood vessels and postmenopausal cardiovascular disease." Cardiovasc Hematol Agents Med Chem **8**(1): 29-46.
- Kim, H. P., J. Y. Lee, et al. (1999). "Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor alpha localized in caveolae." Biochem Biophys Res Commun **263**(1): 257-62.

- Kim, Y. D., B. Chen, et al. (1996). "17 beta-Estradiol prevents dysfunction of canine coronary endothelium and myocardium and reperfusion arrhythmias after brief ischemia/reperfusion." *Circulation* **94**(11): 2901-8.
- King, W. J. and G. L. Greene (1984). "Monoclonal antibodies localize oestrogen receptor in the nuclei of target cells." *Nature* **307**(5953): 745-7.
- Kleppisch, T. and M. T. Nelson (1995). "ATP-sensitive K⁺ currents in cerebral arterial smooth muscle: pharmacological and hormonal modulation." *Am J Physiol* **269**(5 Pt 2): H1634-40.
- Knight, K. R., K. MacPhadyen, et al. (1991). "Enhancement of ischaemic rabbit skin flap survival with the antioxidant and free-radical scavenger N-acetylcysteine." *Clin Sci (Lond)* **81**(1): 31-6.
- Kol, S. and E. Y. Adashi (1995). "Intraovarian factors regulating ovarian function." *Curr Opin Obstet Gynecol* **7**(3): 209-13.
- Kronenberg, M. S. and J. H. Clark (1985). "Changes in keratin expression during the estrogen-mediated differentiation of rat vaginal epithelium." *Endocrinology* **117**(4): 1480-9.
- Kuiper, G. G., B. Carlsson, et al. (1997). "Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta." *Endocrinology* **138**(3): 863-70.
- Kuiper, G. G., E. Enmark, et al. (1996). "Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary." *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(12): 5925-30.
- Langenstroer, P. and G. M. Pieper (1992). "Regulation of spontaneous EDRF release in diabetic rat aorta by oxygen free radicals." *Am J Physiol* **263**(1 Pt 2): H257-65.
- Lantin-Hermoso, R. L., C. R. Rosenfeld, et al. (1997). "Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium." *Am J Physiol* **273**(1 Pt 1): L119-26.
- Li, X., G. G. Geary, et al. (2004). "Effect of estrogen on cerebrovascular prostaglandins is amplified in mice with dysfunctional NOS." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **287**(2): H588-94.
- Li, X. C. and R. E. Widdop (2004). "AT₂ receptor-mediated vasodilatation is unmasked by AT₁ receptor blockade in conscious SHR." *Br J Pharmacol* **142**(5): 821-30.
- Lieberman, E. H., M. D. Gerhard, et al. (1994). "Estrogen improves endothelium-dependent, flow-mediated vasodilation in postmenopausal women." *Ann Intern Med* **121**(12): 936-41.
- Lieberman, S. (1996). "Are estradiol-producing cells incompletely endowed? A chronicle of the emergence of certitude from conjecture." *Gynecol Obstet Invest* **41**(3): 147-72.
- Liehr, J. G. (2000). "Is estradiol a genotoxic mutagenic carcinogen?" *Endocr Rev* **21**(1): 40-54.
- Lin, D., T. Sugawara, et al. (1995). "Role of steroidogenic acute regulatory protein in adrenal and gonadal steroidogenesis." *Science* **267**(5205): 1828-31.
- Linder, L., W. Kiowski, et al. (1990). "Indirect evidence for release of endothelium-derived relaxing factor in human forearm circulation in vivo. Blunted response in essential hypertension." *Circulation* **81**(6): 1762-7.
- Lindner, V., S. K. Kim, et al. (1998). "Increased expression of estrogen receptor-beta mRNA in male blood vessels after vascular injury." *Circ Res* **83**(2): 224-9.
- Liu, H. W., M. Iwai, et al. (2002). "Effect of estrogen and AT₁ receptor blocker on neointima formation." *Hypertension* **40**(4): 451-7; discussion 448-50.
- Liu, M. Y., Y. Hattori, et al. (2001). "Alterations in EDHF-mediated hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries of female rats in long-term deficiency of oestrogen and during oestrus cycle." *Br J Pharmacol* **132**(5): 1035-46.
- Liu, M. Y., Y. Hattori, et al. (2002). "Ovariectomy attenuates hyperpolarization and relaxation mediated by endothelium-derived hyperpolarizing factor in female rat mesenteric artery: a concomitant decrease in connexin-43 expression." *J Cardiovasc Pharmacol* **40**(6): 938-48.
- Luscher, T. F., Y. Dohi, et al. (1992). "Endothelium-dependent regulation of resistance arteries: alterations with aging and hypertension." *J Cardiovasc Pharmacol* **19** Suppl 5: S34-42.
- Maas, A. H., Y. van der Graaf, et al. (2004). "HRT and heart disease: problems and prospects." *Matritas* **47**(4): 255-8.
- MacRitchie, A. N., S. S. Jun, et al. (1997). "Estrogen upregulates endothelial nitric oxide synthase gene expression in fetal pulmonary artery endothelium." *Circ Res* **81**(3): 355-62.
- Madeddu, P., C. Emanuelli, et al. (1997). "Regulation of bradykinin B₂-receptor expression by oestrogen." *Br J Pharmacol* **121**(8): 1763-9.
- Magness, R. R., K. Cox, et al. (1994). "Angiotensin II metabolic clearance rate and pressor responses in nonpregnant and pregnant women." *Am J Obstet Gynecol* **171**(3): 668-79.

- Magness, R. R. and C. R. Rosenfeld (1989). "Local and systemic estradiol-17 beta: effects on uterine and systemic vasodilation." *Am J Physiol* **256**(4 Pt 1): E536-42.
- Majmudar, N. G., S. C. Robson, et al. (2000). "Effects of the menopause, gender, and estrogen replacement therapy on vascular nitric oxide activity." *J Clin Endocrinol Metab* **85**(4): 1577-83.
- Manson, J. E., M. A. Allison, et al. (2007). "Estrogen therapy and coronary-artery calcification." *N Engl J Med* **356**(25): 2591-602.
- Masood, D. E., E. C. Roach, et al. (2011). "Impact of sex hormone metabolism on the vascular effects of menopausal hormone therapy in cardiovascular disease." *Curr Drug Metab* **11**(8): 693-714.
- Maxwell, S. R. (1998). "Women and heart disease." *Basic Res Cardiol* **93** Suppl 2: 79-84.
- McCrohon, J. A., W. A. Walters, et al. (1997). "Arterial reactivity is enhanced in genetic males taking high dose estrogens." *J Am Coll Cardiol* **29**(7): 1432-6.
- McGill, H. C., Jr. and P. J. Sheridan (1981). "Nuclear uptake of sex steroid hormones in the cardiovascular system of the baboon." *Circ Res* **48**(2): 238-44.
- Mendelsohn, M. E. and R. H. Karas (2005). "Molecular and cellular basis of cardiovascular gender differences." *Science* **308**(5728): 1583-7.
- Mercuro, G., S. Zoncu, et al. (1997). "Effects of acute administration of transdermal estrogen on postmenopausal women with systemic hypertension." *Am J Cardiol* **80**(5): 652-5.
- Meyer, M. R., E. R. Prossnitz, et al. "The G protein-coupled estrogen receptor GPER/GPR30 as a regulator of cardiovascular function." *Vascul Pharmacol* **55**(1-3): 17-25.
- Mikkola, T., L. Viinikka, et al. (2000). "Administration of transdermal estrogen without progestin increases the capacity of plasma and serum to stimulate prostacyclin production in human vascular endothelial cells." *Fertil Steril* **73**(1): 72-4.
- Milsted, A., M. C. Marcelo, et al. (1998). "Female Wistar-Kyoto and SHR/y rats have the same genotype but different patterns of expression of renin and angiotensinogen genes." *J Hypertens* **16**(6): 823-8.
- Mitchell, J. A. and T. D. Warner (2006). "COX isoforms in the cardiovascular system: understanding the activities of non-steroidal anti-inflammatory drugs." *Nat Rev Drug Discov* **5**(1): 75-86.
- Mollace, V., C. Muscoli, et al. (2005). "Modulation of prostaglandin biosynthesis by nitric oxide and nitric oxide donors." *Pharmacol Rev* **57**(2): 217-52.
- Moncada, S., R. Gryglewski, et al. (1976). "An enzyme isolated from arteries transforms prostaglandin endoperoxides to an unstable substance that inhibits platelet aggregation." *Nature* **263**(5579): 663-5.
- Moncada, S., R. M. Palmer, et al. (1991). "Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology." *Pharmacol Rev* **43**(2): 109-42.
- Montano, M. M., K. Ekena, et al. (1999). "An estrogen receptor-selective coregulator that potentiates the effectiveness of antiestrogens and represses the activity of estrogens." *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(12): 6947-52.
- Moriarty, K., K. H. Kim, et al. (2006). "Minireview: estrogen receptor-mediated rapid signaling." *Endocrinology* **147**(12): 5557-63.
- Morimoto, K., M. Uji, et al. (2008). "Estrogen replacement suppresses pressor response and oxidative stress induced by cage-switch stress in ovariectomized rats." *Ann N Y Acad Sci* **1148**: 213-8.
- Mosca, L., L. J. Appel, et al. (2004). "Evidence-based guidelines for cardiovascular disease prevention in women." *Circulation* **109**(5): 672-93.
- Mosselman, S., J. Polman, et al. (1996). "ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor." *FEBS Lett* **392**(1): 49-53.
- Murphy, J. G. and R. A. Khalil (2000). "Gender-specific reduction in contractility and [Ca(2+)](i) in vascular smooth muscle cells of female rat." *Am J Physiol Cell Physiol* **278**(4): C834-44.
- Nadal, A., J. M. Rovira, et al. (1998). "Rapid insulinotropic effect of 17beta-estradiol via a plasma membrane receptor." *FASEB J* **12**(13): 1341-8.
- New, G., K. L. Timmins, et al. (1997). "Long-term estrogen therapy improves vascular function in male to female transsexuals." *J Am Coll Cardiol* **29**(7): 1437-44.
- Nickenig, G., A. T. Baumer, et al. (1998). "Estrogen modulates AT1 receptor gene expression in vitro and in vivo." *Circulation* **97**(22): 2197-201.
- Nickenig, G., K. Strehlow, et al. (2000). "Differential effects of estrogen and progesterone on AT(1) receptor gene expression in vascular smooth muscle cells." *Circulation* **102**(15): 1828-33.
- Nigro, D., Z. B. Fortes, et al. (1997). "Sex-related differences in the response of spontaneously

- hypertensive rats to angiotensin-converting enzyme inhibitor." *Endothelium* 5(1): 63-71.
- Nishikawa, Y., D. W. Stepp, et al. (2000). "Nitric oxide exerts feedback inhibition on EDHF-induced coronary arteriolar dilation in vivo." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279(2): H459-65.
- Node, K., M. Kitakaze, et al. (1997). "Roles of NO and Ca²⁺-activated K⁺ channels in coronary vasodilation induced by 17beta-estradiol in ischemic heart failure." *FASEB J* 11(10): 793-9.
- Oelkers, W. K. (1996). "Effects of estrogens and progestogens on the renin-aldosterone system and blood pressure." *Steroids* 61(4): 166-71.
- Okon, E. B., A. Golbabaie, et al. (2002). "In the presence of L-NAME SERCA blockade induces endothelium-dependent contraction of mouse aorta through activation of smooth muscle prostaglandin H₂/thromboxane A₂ receptors." *Br J Pharmacol* 137(4): 545-53.
- Onate, S. A., S. Y. Tsai, et al. (1995). "Sequence and characterization of a coactivator for the steroid hormone receptor superfamily." *Science* 270(5240): 1354-7.
- Orshal, J. M. and R. A. Khalil (2004). "Gender, sex hormones, and vascular tone." *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 286(2): R233-49.
- Ospina, J. A., D. N. Krause, et al. (2002). "17beta-estradiol increases rat cerebrovascular prostacyclin synthesis by elevating cyclooxygenase-1 and prostacyclin synthase." *Stroke* 33(2): 600-5.
- Pak, K. J., G. G. Geary, et al. (2002). "Male-female differences in the relative contribution of endothelial vasodilators released by rat tail artery." *Life Sci* 71(14): 1633-42.
- Palacios, S., J. Calaf, et al. (2003). "Relevancia de los resultados del estudio WHI para la atención de las mujeres postmenopáusicas en España." *Med Clin (Barc)* 120(4): 146-147.
- Palmer, R. M., A. G. Ferrige, et al. (1987). "Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor." *Nature* 327(6122): 524-6.
- Papanicolaou, G., H. Traut, et al. (1943). *Diagnosis of uterine cancer by the vaginal smear*. New York, New York, Commonwealth Fund.
- Parik, T., K. Allikmets, et al. (1996). "Oxidative stress and hyperinsulinaemia in essential hypertension: different facets of increased risk." *J Hypertens* 14(3): 407-10.
- Parker, M. G., N. Arbuckle, et al. (1993). "Structure and function of the estrogen receptor." *Ann N Y Acad Sci* 684: 119-26.
- Parrilla, J. J. and L. Abad (2004). "Reflexiones y consideraciones actuales sobre la terapia hormonal sustitutiva." *Rev Esp Obs Gin* 3: 40-52.
- Parrilla, J. J. and L. Abad (2004). "Reflexiones y consideraciones actuales sobre la terapia hormonal sustitutiva." *Rev Esp Obs Gin* 3: 42-57.
- Peiris, A. N., M. S. Sothmann, et al. (1989). "The relationship of insulin to sex hormone-binding globulin: role of adiposity." *Fertil Steril* 52(1): 69-72.
- Pelligrino, D. A., S. Ye, et al. (2000). "Nitric-oxide-dependent pial arteriolar dilation in the female rat: effects of chronic estrogen depletion and repletion." *Biochem Biophys Res Commun* 269(1): 165-71.
- PEPI (1995). "Effects of estrogen or estrogen/progestin regimens on heart disease risk factors in postmenopausal women. The Postmenopausal Estrogen/Progestin Interventions (PEPI) Trial. The Writing Group for the PEPI Trial." *JAMA* 273(3): 199-208.
- Perregaux, D., A. Chaudhuri, et al. (1999). "Effect of gender differences and estrogen replacement therapy on vascular reactivity." *Metabolism* 48(2): 227-32.
- Pettersson, K., K. Grandien, et al. (1997). "Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha." *Mol Endocrinol* 11(10): 1486-96.
- Pines, A., D. W. Sturdee, et al. (2008). "HRT in the early menopause: scientific evidence and common perceptions." *Climacteric* 11(4): 267-72.
- Pinto, S., A. Viridis, et al. (1997). "Endogenous estrogen and acetylcholine-induced vasodilation in normotensive women." *Hypertension* 29(1 Pt 2): 268-73.
- Prakash, Y. S., A. A. Togaiyeva, et al. (1999). "Estrogen increases Ca²⁺ efflux from female porcine coronary arterial smooth muscle." *Am J Physiol* 276(3 Pt 2): H926-34.
- Prentice, R. L., J. E. Manson, et al. (2009). "Benefits and risks of postmenopausal hormone therapy when it is initiated soon after menopause." *Am J Epidemiol* 170(1): 12-23.
- Preston, R. A., A. Alonso, et al. (2002). "Additive effect of drospirenone/17-beta-estradiol in hypertensive postmenopausal women receiving enalapril." *Am J Hypertens* 15(9): 816-22.

- Preziosi, P., E. Barrett-Connor, et al. (1993). "Interrelation between plasma sex hormone-binding globulin and plasma insulin in healthy adult women: the telecom study." *J Clin Endocrinol Metab* **76**(2): 283-7.
- Rahimian, R., L. Chan, et al. (2004). "Estrogen modulation of endothelium-derived relaxing factors by human endothelial cells." *Biochem Biophys Res Commun* **322**(2): 373-9.
- Reddy, H. K., S. E. Campbell, et al. (1993). "Coronary microvascular fluid flux and permeability: influence of angiotensin II, aldosterone, and acute arterial hypertension." *J Lab Clin Med* **121**(3): 510-21.
- Rees, M. and J. Stevenson (2008). "Primary prevention of coronary heart disease in women." *Menopause Int* **14**(1): 40-5.
- Reis, S. E., S. T. Gloth, et al. (1994). "Ethinyl estradiol acutely attenuates abnormal coronary vasomotor responses to acetylcholine in postmenopausal women." *Circulation* **89**(1): 52-60.
- Richards, J. S. (1994). "Hormonal control of gene expression in the ovary." *Endocr Rev* **15**(6): 725-51.
- Rosen, G. M. and B. A. Freeman (1984). "Detection of superoxide generated by endothelial cells." *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**(23): 7269-73.
- Rosselli, M., B. Imthurn, et al. (1995). "Circulating nitric oxide (nitrite/nitrate) levels in postmenopausal women substituted with 17 beta-estradiol and norethisterone acetate. A two-year follow-up study." *Hypertension* **25**(4 Pt 2): 848-53.
- Rossouw, J. E., G. L. Anderson, et al. (2002). "Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial." *JAMA* **288**(3): 321-33.
- Rossouw, J. E., R. L. Prentice, et al. (2007). "Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause." *JAMA* **297**(13): 1465-77.
- Rubanyi, G. M. and P. M. Vanhoutte (1986). "Superoxide anions and hyperoxia inactivate endothelium-derived relaxing factor." *Am J Physiol* **250**(5 Pt 2): H822-7.
- Ruiz, F. J., M. G. Salom, et al. (1994). "N-acetyl-L-cysteine potentiates depressor response to captopril and enalaprilat in SHR." *Am J Physiol* **267**(3 Pt 2): R767-72.
- Rupnow, H. L., T. M. Phernetton, et al. (2002). "Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. VIII. Estrogen and progesterone effects on cPLA2, COX-1, and PGIS protein expression." *Biol Reprod* **66**(2): 468-74.
- Safar, M. E., M. G. Myers, et al. (2002). "Gender influence on the dose-ranging of a low-dose perindopril-indapamide combination in hypertension: effect on systolic and pulse pressure." *J Hypertens* **20**(8): 1653-61.
- Saitta, A., D. Altavilla, et al. (2001). "Randomized, double-blind, placebo-controlled study on effects of raloxifene and hormone replacement therapy on plasma concentrations, endothelin-1 levels, and endothelium-dependent vasodilation in postmenopausal women." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **21**(9): 1512-9.
- Sakuma, I., M. Y. Liu, et al. (2002). "Endothelium-dependent hyperpolarization and relaxation in mesenteric arteries of middle-aged rats: influence of oestrogen." *Br J Pharmacol* **135**(1): 48-54.
- Salamanca, D. A. and R. A. Khalil (2005). "Protein kinase C isoforms as specific targets for modulation of vascular smooth muscle function in hypertension." *Biochem Pharmacol* **70**(11): 1537-47.
- Salom, J. B., M. C. Burguete, et al. (2001). "Relaxant effects of 17-beta-estradiol in cerebral arteries through Ca(2+) entry inhibition." *J Cereb Blood Flow Metab* **21**(4): 422-9.
- Sandow, S. L. and C. E. Hill (2000). "Incidence of myoendothelial gap junctions in the proximal and distal mesenteric arteries of the rat is suggestive of a role in endothelium-derived hyperpolarizing factor-mediated responses." *Circ Res* **86**(3): 341-6.
- Schierbeck, L. L., L. Rejnmark, et al. "Effect of hormone replacement therapy on cardiovascular events in recently postmenopausal women: randomised trial." *BMJ* **345**: e6409.
- Schricker, K., M. Hamann, et al. (1994). "Renal autacoids are involved in the stimulation of renin gene expression by low perfusion pressure." *Kidney Int* **46**(5): 1330-6.
- Schuit, S. C., H. H. Oei, et al. (2004). "Estrogen receptor alpha gene polymorphisms and risk of myocardial infarction." *JAMA* **291**(24): 2969-77.
- Scotland, R. S., S. Chauhan, et al. (2001). "An endothelium-derived hyperpolarizing factor-like factor moderates myogenic constriction of mesenteric resistance arteries in the absence of endothelial nitric oxide synthase-derived nitric oxide." *Hypertension* **38**(4): 833-9.
- Scotland, R. S., M. Madhani, et al. (2005). "Investigation of vascular responses in endothelial nitric oxide synthase/cyclooxygenase-1 double-knockout mice: key role for endothelium-derived

- hyperpolarizing factor in the regulation of blood pressure in vivo." *Circulation* **111**(6): 796-803.
- Sealey, J. E., I. Cholest, et al. (1987). "Sequential changes in plasma luteinizing hormone and plasma prorenin during the menstrual cycle." *J Clin Endocrinol Metab* **65**(1): 1-5.
- Selles, J., N. Polini, et al. (2002). "Nongenomic action of progesterone in rat aorta: role of nitric oxide and prostaglandins." *Cell Signal* **14**(5): 431-6.
- Semenza, G. L. (2005). "New insights into nNOS regulation of vascular homeostasis." *J Clin Invest* **115**(11): 2976-8.
- Shearman, A. M., L. A. Cupples, et al. (2003). "Association between estrogen receptor alpha gene variation and cardiovascular disease." *JAMA* **290**(17): 2263-70.
- Shimokawa, H. and A. Takeshita (2005). "Rho-kinase is an important therapeutic target in cardiovascular medicine." *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**(9): 1767-75.
- Shimokawa, H., H. Yasutake, et al. (1996). "The importance of the hyperpolarizing mechanism increases as the vessel size decreases in endothelium-dependent relaxations in rat mesenteric circulation." *J Cardiovasc Pharmacol* **28**(5): 703-11.
- Shwaery, G. T., J. A. Vita, et al. (1997). "Antioxidant protection of LDL by physiological concentrations of 17 beta-estradiol. Requirement for estradiol modification." *Circulation* **95**(6): 1378-85.
- Silva-Antonialli, M. M., Z. B. Fortes, et al. (2000). "Sexual dimorphism in the response of thoracic aorta from SHR to losartan." *Gen Pharmacol* **34**(5): 329-35.
- Silva-Antonialli, M. M., R. C. Tostes, et al. (2004). "A lower ratio of AT1/AT2 receptors of angiotensin II is found in female than in male spontaneously hypertensive rats." *Cardiovasc Res* **62**(3): 587-93.
- Simoncini, T., L. Fornari, et al. (2002). "Novel non-transcriptional mechanisms for estrogen receptor signaling in the cardiovascular system. Interaction of estrogen receptor alpha with phosphatidylinositol 3-OH kinase." *Steroids* **67**(12): 935-9.
- Simoncini, T., A. Hafezi-Moghadam, et al. (2000). "Interaction of oestrogen receptor with the regulatory subunit of phosphatidylinositol-3-OH kinase." *Nature* **407**(6803): 538-41.
- Siow, R. C., F. Y. Li, et al. (2007). "Cardiovascular targets for estrogens and phytoestrogens: transcriptional regulation of nitric oxide synthase and antioxidant defense genes." *Free Radic Biol Med* **42**(7): 909-25.
- Sitruk-Ware, R. and P. Ibarra de Palacios (1989). "Oestrogen replacement therapy and cardiovascular disease in post-menopausal women. A review." *Maturitas* **11**(4): 259-74.
- Smiley, D. A. and R. A. Khalil (2009). "Estrogenic compounds, estrogen receptors and vascular cell signaling in the aging blood vessels." *Curr Med Chem* **16**(15): 1863-87.
- Sobrinho, A., M. Mata, et al. (2009). "Estradiol stimulates vasodilatory and metabolic pathways in cultured human endothelial cells." *PLoS One* **4**(12): e8242.
- Sobrinho, A., P. J. Oviedo, et al. (2010). "Estradiol selectively stimulates endothelial prostacyclin production through estrogen receptor- α ." *J Mol Endocrinol* **44**(4): 237-46.
- Sorensen, K. E., I. Dorup, et al. (1998). "Combined hormone replacement therapy does not protect women against the age-related decline in endothelium-dependent vasomotor function." *Circulation* **97**(13): 1234-8.
- Speroff, L., R. H. Glass, et al. (1999). *Clinical Gynecologic Endocrinology and Infertility*, Lippincott, Williams & Wilkins.
- Stamler, J. S., O. Jaraki, et al. (1992). "Nitric oxide circulates in mammalian plasma primarily as an S-nitroso adduct of serum albumin." *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(16): 7674-7.
- Stampfer, M. J., G. A. Colditz, et al. (1991). "Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the nurses' health study." *N Engl J Med* **325**(11): 756-62.
- Stefanick, M. L., G. L. Anderson, et al. (2006). "Effects of conjugated equine estrogens on breast cancer and mammography screening in postmenopausal women with hysterectomy." *JAMA* **295**(14): 1647-57.
- Stevenson, J. C., H. N. Hodis, et al. (2009). "Coronary heart disease and menopause management: the swinging pendulum of HRT." *Atherosclerosis* **207**(2): 336-40.
- Sudhir, K., G. L. Jennings, et al. (1996). "Estrogen enhances basal nitric oxide release in the forearm vasculature in perimenopausal women." *Hypertension* **28**(3): 330-4.
- Sumino, H., S. Ichikawa, et al. (1999). "Hormone replacement therapy in postmenopausal women with essential hypertension increases circulating plasma levels of bradykinin." *Am J Hypertens* **12**(10 Pt 1): 1044-7.
- Sunman, W., A. D. Hughes, et al. (1993). "Free-radical scavengers, thiol-containing reagents and

- endothelium-dependent relaxation in isolated rat and human resistance arteries." *Clin Sci (Lond)* **84**(3): 287-95.
- Suzuki, H., A. Swee, et al. (1995). "In vivo evidence for microvascular oxidative stress in spontaneously hypertensive rats. Hydroethidine microfluorography." *Hypertension* **25**(5): 1083-9.
- Taddei, S., A. Virdis, et al. (1996). "Menopause is associated with endothelial dysfunction in women." *Hypertension* **28**(4): 576-82.
- Takimoto, G. S., J. D. Graham, et al. (1999). "Tamoxifen resistant breast cancer: coregulators determine the direction of transcription by antagonist-occupied steroid receptors." *J Steroid Biochem Mol Biol* **69**(1-6): 45-50.
- Tan, Z., T. H. Wang, et al. (2003). "Mechanisms of 17beta-estradiol on the production of ET-1 in ovariectomized rats." *Life Sci* **73**(21): 2665-74.
- Tang, M., W. Abplanalp, et al. (1996). "Superior and distinct antioxidant effects of selected estrogen metabolites on lipid peroxidation." *Metabolism* **45**(4): 411-4.
- Teoh, H., S. W. Leung, et al. (1999). "Short-term exposure to physiological levels of 17 beta-estradiol enhances endothelium-independent relaxation in porcine coronary artery." *Cardiovasc Res* **42**(1): 224-31.
- Teoh, H. and R. Y. Man (2000). "Enhanced relaxation of porcine coronary arteries after acute exposure to a physiological level of 17beta-estradiol involves non-genomic mechanisms and the cyclic AMP cascade." *Br J Pharmacol* **129**(8): 1739-47.
- Tostes, R. C., D. Nigro, et al. (2003). "Effects of estrogen on the vascular system." *Braz J Med Biol Res* **36**(9): 1143-58.
- Tranquilli, A. L., L. Mazzanti, et al. (1995). "Transdermal estradiol and medroxyprogesterone acetate in hormone replacement therapy are both antioxidants." *Gynecol Endocrinol* **9**(2): 137-41.
- Tsang, S. Y., X. Yao, et al. (2003). "Contribution of K⁺ channels to relaxation induced by 17beta-estradiol but not by progesterone in isolated rat mesenteric artery rings." *J Cardiovasc Pharmacol* **41**(1): 4-13.
- Tschugguel, W., F. Stonek, et al. (2001). "Estrogen increases endothelial carbon monoxide, heme oxygenase 2, and carbon monoxide-derived cGMP by a receptor-mediated system." *J Clin Endocrinol Metab* **86**(8): 3833-9.
- Vagnoni, K. E., C. E. Shaw, et al. (1998). "Endothelial vasodilator production by uterine and systemic arteries. III. Ovarian and estrogen effects on NO synthase." *Am J Physiol* **275**(5 Pt 2): H1845-56.
- Van Beaumont, W. (1972). "Evaluation of hemoglobin concentration from hematocrit measurements." *J Appl Physiol* **32**(5): 712-3.
- Villar, I. C., S. Francis, et al. (2006). "Novel aspects of endothelium-dependent regulation of vascular tone." *Kidney Int* **70**(5): 840-53.
- Wagner, A. H., M. R. Schroeter, et al. (2001). "17beta-estradiol inhibition of NADPH oxidase expression in human endothelial cells." *FASEB J* **15**(12): 2121-30.
- Walsh, J. M. and M. Pignone (2004). "Drug treatment of hyperlipidemia in women." *JAMA* **291**(18): 2243-52.
- Wassmann, S., A. T. Baumer, et al. (2001). "Endothelial dysfunction and oxidative stress during estrogen deficiency in spontaneously hypertensive rats." *Circulation* **103**(3): 435-41.
- Wassmann, S., K. Wassmann, et al. (2004). "Modulation of oxidant and antioxidant enzyme expression and function in vascular cells." *Hypertension* **44**(4): 381-6.
- Watters, J. J., J. S. Campbell, et al. (1997). "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* **138**(9): 4030-3.
- Webb, P., G. N. Lopez, et al. (1992). "The limits of the cellular capacity to mediate an estrogen response." *Mol Endocrinol* **6**(2): 157-67.
- Webb, P., G. N. Lopez, et al. (1995). "Tamoxifen activation of the estrogen receptor/AP-1 pathway: potential origin for the cell-specific estrogen-like effects of antiestrogens." *Mol Endocrinol* **9**(4): 443-56.
- Weihe, W. H. (1987). *The Laboratory Rat. The UFAW Handbook on the Care and Management of Laboratory and Other Research Animals*. T. B. Poole. Essex, Longman Scientific & Technical: 309.
- Weiner, C. P., I. Lizasoain, et al. (1994). "Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones." *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(11): 5212-6.
- Weiner, C. P., L. P. Thompson, et al. (1992). "Endothelium-derived relaxing factor and indomethacin-sensitive contracting factor alter arterial contractile responses to thromboxane during pregnancy." *Am J Obstet Gynecol* **166**(4): 1171-8; discussion 1179-81.

Wenger, N. K. (1997). "Coronary heart disease: an older woman's major health risk." *BMJ* **315**(7115): 1085-90.

White, R. E., D. J. Darkow, et al. (1995). "Estrogen relaxes coronary arteries by opening BKCa channels through a cGMP-dependent mechanism." *Circ Res* **77**(5): 936-42.

Williams, B., A. Q. Baker, et al. (1995). "Angiotensin II increases vascular permeability factor gene expression by human vascular smooth muscle cells." *Hypertension* **25**(5): 913-7.

Williams, J. K., M. R. Adams, et al. (1992). "Short-term administration of estrogen and vascular responses of atherosclerotic coronary arteries." *J Am Coll Cardiol* **20**(2): 452-7.

Williams, J. K., M. R. Adams, et al. (1990). "Estrogen modulates responses of atherosclerotic coronary arteries." *Circulation* **81**(5): 1680-7.

Williams, S. P., D. P. Shackelford, et al. (1988). "Endothelium-dependent relaxation in estrogen-treated spontaneously hypertensive rats." *Eur J Pharmacol* **145**(2): 205-7.

Woodman, O. L. and M. Boujaoude (2004). "Chronic treatment of male rats with daidzein and 17 beta-oestradiol induces the contribution of EDHF to endothelium-dependent relaxation." *Br J Pharmacol* **141**(2): 322-8.

Wurtz, J. M., W. Bourguet, et al. (1996). "A canonical structure for the ligand-binding domain of nuclear receptors." *Nat Struct Biol* **3**(2): 206.

Xu, H. L., R. A. Santizo, et al. (2001). "Chronic estrogen depletion alters adenosine diphosphate-induced pial arteriolar dilation in female rats." *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **281**(5): H2105-12.

Xu, X., J. C. Xiao, et al. (2008). "Effects of ovariectomy and 17beta-estradiol treatment on the renin-angiotensin system, blood pressure, and endothelial ultrastructure." *Int J Cardiol* **130**(2): 196-204.

Yang, S., L. Bae, et al. (2000). "Estrogen increases eNOS and NOx release in human coronary artery endothelium." *J Cardiovasc Pharmacol* **36**(2): 242-7.

Yusuf, S., S. Hawken, et al. (2004). "Effect of potentially modifiable risk factors associated with myocardial infarction in 52 countries (the INTERHEART study): case-control study." *Lancet* **364**(9438): 937-52.

Zegura, B., I. Keber, et al. (2003). "Orally and transdermally replaced estradiol improves endothelial function equally in middle-aged women after surgical menopause." *Am J Obstet Gynecol* **188**(5): 1291-6.