



Factores responsables de la p erdida de los efectos beneficiosos de los estr ogenos en el sistema cardiovascular

Laura Novensà Casas

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d' s: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tdx.cat) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi   obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptaci  de las siguientes condiciones de uso: La difusió de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tdx.cat) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigació y docència. No se autoriza su reproducció con finalidades de lucro ni su difusió y puesta a disposici  desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentaci  de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentaci  de la tesis como a sus contenidos. En la utilizaciã o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tdx.cat) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

FACTORES RESPONSABLES DE LA PÉRDIDA DE LOS EFECTOS BENEFICIOSOS DE LOS ESTRÓGENOS EN EL SISTEMA CARDIOVASCULAR

Tesis presentada por:

Laura Novensà Casas

Para optar al grado de Doctora en Medicina

Trabajo realizado en el laboratorio de Cardiología Experimental de l'Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS)

Directoras

Dra. Ana Paula Villela Dantas y Dra. Mercè Roqué Moreno

Tesis inscrita en el programa de doctorado de medicina, en la línea de investigación de Biopatología respiratoria, vascular y renal

Facultad de Medicina
Universidad de Barcelona

Barcelona, Octubre de 2011

“Hay una fuerza motriz más poderosa que la electricidad, el vapor y la energía atómica: la voluntad.”

Albert Einstein

“El experimentador que no sabe lo que está buscando no comprenderá lo que encuentra.”

Claude Bernard

A todos mis seres queridos.

AGRADECIMIENTOS

Hace unos años empecé una aventura que finaliza hoy aquí, dando como resultado esta tesis doctoral. Durante el camino me he encontrado con tramos rectos y muy fáciles de recorrer y otros en los que todo ha sido cuesta arriba, pero de todos y cada uno de ellos he aprendido mucho y todos me han servido para mejorar como profesional, enriquecerme más como persona y hacerme más fuerte.

Quiero agradecer en primer lugar a mis directoras de tesis, las doctoras Ana Paula Dantas y Mercè Roqué su confianza en mí desde el primer día, así como su apoyo y su dedicación en mi trabajo.

A la Dra. Dantas, gracias por todo el tiempo y el entusiasmo invertidos en mi formación, gracias por poner las piedras que me han ayudado a cruzar el río pero sin llevarme cogida de la mano en el momento de hacerlo. Así he podido desarrollarme mejor científicamente y descubrir los errores por mí misma. Gracias por enseñarme a tener capacidad crítica, a buscar el por qué de las cosas y a conocer los secretos del apasionante mundo de la biología molecular y de los cultivos celulares.

A la Dra. Roqué quiero agradecerle el haber compartido sus conocimientos conmigo durante todos estos años. Y me gustaría darle especialmente las gracias por su comprensión, su paciencia y su confianza en mí desde que llegué al laboratorio.

Entre mis compañeras de laboratorio, debo agradecer de forma muy especial a Nadia el haberse convertido en mi mano derecha desde que llegó y haber estado siempre a mi lado en los buenos y en los malos momentos. Juntas hemos compartido grandes experiencias en la poyata que recordaremos siempre, incluso aquéllas en las que inicialmente todo se ha convertido en un verdadero caos y aún así hemos conseguido salir victoriosas. Pero sobretodo, muchas gracias por no haberme fallado nunca y por haberse convertido en una gran amiga.

A Cira y a Maria Josep quiero agradecerles su apoyo en los momentos difíciles, su paciencia durante mis crisis nerviosas los días antes de depositar la tesis y todos los buenos momentos que hemos vivido, porque a pesar de llevar poco tiempo juntas, hemos compartido grandes experiencias, algunas de ellas muy intensas.

A Montse y Núria, que han estado conmigo en el laboratorio desde que llegué, quiero agradecerles su ayuda y confianza desde el principio. Nunca olvidaré los grandes momentos vividos en quirófano y los innumerables desayunos y comidas que hemos compartido en los lugares más insospechados.

A Montserrat, gracias por abrirme las puertas del laboratorio, por enseñarme todo el funcionamiento del laboratorio y por su paciencia conmigo durante los experimentos que hemos realizado juntas. Gracias por hacerme sentir como en casa convirtiéndose en una gran compañera.

A mi familia, con la que siempre he podido y podré confiar, gracias por estar siempre a mi lado, gracias por vuestro amor incondicional y vuestra paciencia infinita. Porque si bien es cierto que a una hija se le perdona todo, habéis sido capaces de soportar lo insoportable. Infinitas gracias a mi madre, a mi hermano y a mis abuelos por quererme tanto, por darme una buena educación, por cuidarme, por aportarme unos grandes valores y por brindarme todo tipo de oportunidades que me han permitido que actualmente sea como soy. Sabéis que sois imprescindibles en mi vida. Y millones de gracias también a mis tíos, Toni y Trini, y a mi primo Adrià, por estar siempre conmigo, por apoyarme y por quererme tanto. Gracias también por convertir las comidas de los sábados en intensos debates científicos y de estrategia de los que han salido grandes ideas para ayudar a realizar esta tesis.

A mis amigas y amigos, otro de mis puntales de apoyo sin el que mi vida y mi manera de ser serían completamente diferentes. Gracias por estar allí cuando he necesitado salir de fiesta para relajarme, gracias por los miles de cafés, cañas y mojitos que hemos compartido y por todas las comidas y cenas en las que nos hemos desahogado juntos. Pero sobretodo, gracias por soportar mis llamadas a altas horas de la noche, por venir a visitarme a mi casa cuando he estado triste y hacerme sentir tan acompañada y querida. Muchas gracias también por enfadaros conmigo y reñirme cuando lo he necesitado para ponerme las pilas. Por más que me esfuerce nunca podría llegarme a imaginarme unos amigos mejores que vosotros.

A Gandalf y a Frodo, muchas gracias por vuestro amor incondicional y vuestra compañía infinita. Siempre estaréis presentes en mis pensamientos.

Gracias a los compañeros que han colaborado en mis artículos, el equipo del Dr. Carlos Hermenegildo de la Universidad de Valencia, la Dra. Jana Sallent y

el Dr. Manel Pastor del IMIM. A todos ellos muchas gracias por aportar sus conocimientos científicos y enseñarme técnicas nuevas. Entre todos me habéis ayudado a ser más grande.

Gracias a la Dra. Mercè Pallás de la facultad de Farmacia de la UB por regalarnos las hembras SAMR y SAMP con las que hemos realizado la gran mayoría de nuestros experimentos.

A la Dra. Magda Heras, la jefa de nuestro grupo de investigación, gracias por estar allí coordinándonos a todas y esforzándose para que todo funcione.

A la Red Cardiovascular Heracles, muchas gracias por su financiación. Gracias a ella ha sido posible el desarrollo de esta tesis y mi formación como científica.

A la Facultad de Medicina y de Farmacia, gracias por cedernos espacio en sus estabularios para nuestros animales.

A los responsables de los estabularios por encargarse de nuestras colonias, velar siempre por el bienestar de nuestros animales y estar siempre dispuestos a ayudarnos cuando lo hemos necesitado.

A los verdaderos protagonistas de este trabajo, los ratones. Gracias a ellos la realización de esta tesis ha sido posible. Sin su participación, ninguno de nuestros experimentos hubiese podido realizarse.

A Vimongraf, muchas gracias por una excelente impresión y encuadernación de la tesis.

Y a todos los que han colaborado de alguna manera en la edición y la realización de esta tesis porque sin la inestimable ayuda de todos ellos mi aventura nunca hubiera llegado a su fin.

¡¡Muchísimas gracias!!

Laura

ÍNDICE

1. Introducción	1
2. Hipótesis y Objetivos	17
3. Estudio 1	21
3.1. Objetivos	23
3.2. Métodos	23
3.3. Resultados	25
3.4. Artículo	29
4. Estudio 2	45
4.1. Objetivos	47
4.2. Métodos	47
4.3. Resultados	49
4.4. Artículo	53
5. Discusión	65
6. Conclusiones	82
7. Bibliografía	85
8. Anexo I: Otros estudios relacionados con la tesis	99
9. Anexo II: Otros estudios publicados	113

ABREVIACIONES

17α-E₂	17alpha estradiol
17α-Eq	17alpha equilina
17α-Eqn	17alpha equilenina
17β-E₂	17beta estradiol
17β-Eq	17beta equilina
17β-Eqn	17beta equilenina
AngII	Angiotensina II
CEE	Estrógenos conjugados equinos
CO	Monóxido de carbono
DAF-2	<i>4,5-Diaminofluorescein Diacetate</i>
E₁	Estrona
E₂	Estradiol
ECV	Enfermedades cardiovasculares
EDCF	Factores contráctiles derivados del endotelio
EDHF	Factor hiperpolarizante derivado del endotelio
EDRF	Factores relajantes derivados del endotelio
eNOS/NOS III	Isoforma endotelial de la NOS
Eq	Equilina
Eqn	Equilenina
ER	Receptores de estrógenos
ERα	Receptor de estrógenos alfa
ERβ	Receptor de estrógenos beta
ET-1	Endotelina 1
HAEC	Células endoteliales humanas de aorta
ICAM	Inter-cellular adhesion molecule
IL-1	Interleukina-1
NO	Óxido nítrico
NO₂ / NO₃	Nitrato/Nitrito
NOS	Óxido nítrico sintasa
O₂⁻	Anión superóxido
OVX	Hembras ovariectomizadas
OVX+E2	Hembras ovariectomizadas tratadas con estrógenos
PG2	Prostaglandina
PGI₂	Prostaciclina
PR	Receptor intracelular de progesterona
ROS	Especies reactivas de oxígeno
SAMP	Ratones sensibles al envejecimiento prematuro (Senescence Accelerated Mice Prone)
SAMR	Ratones resistentes al envejecimiento prematuro (Senescence Accelerated Mice Resistant)
SERM	Moduladores Selectivos de los Receptores de Estrógenos
SMC	Células musculares lisas
TNF	Factor de necrosis tumoral
TH	Terapia hormonal
TXA2	Tromboxano A2
VCAM	Vascular cell adhesion molecule

INTRODUCCIÓN

La incidencia de la enfermedad cardiovascular (ECV) en las mujeres adultas jóvenes es menor que en los hombres de la misma edad (1), pero aumenta notablemente, llegando a niveles similares e incluso superiores a los de los hombres, después de la menopausia (2). Aunque existen amplias evidencias científicas al respecto, todavía no se han elucidado los mecanismos responsables de la protección cardiovascular en las mujeres. El de mayor aceptación se relaciona con la acción del estrógeno en la modulación del tono vascular. Por estas razones, la terapia hormonal (TH) con estrógenos ha sido propuesta e investigada como una medida de prevención primaria y secundaria para la aparición y la progresión de ECV (3,4,5).

Estudios clínicos observacionales y de investigación básica han señalado que los estrógenos actúan como protectores de la pared vascular. Esta protección está principalmente asociada a sus efectos antihipertensivos e inhibidores de la formación de la placa aterosclerótica. Estos efectos se relacionan parcialmente con acciones directas del estrógeno sobre la pared del vaso regulando la resistencia vascular periférica (6), la inflamación vascular (6) y la colesterolemia (7). Estos factores son importantes en la regulación de la presión sanguínea (6) así como también se les relaciona con la inhibición de la formación y la progresión de las placas de ateroma (7,8).

A pesar de que los múltiples efectos del estrógeno afectan a varios sistemas de control de la función cardiovascular, los mecanismos relacionados con la protección vascular por parte de los estrógenos están principalmente asociados a su acción en el endotelio (6). El endotelio es la capa más interna de los vasos y, lejos de actuar como una simple barrera, es un órgano complejo que responde a diferentes estímulos, tanto físicos (shear stress) como bioquímicos (neurotransmisores, hormonas, mediadores de la inflamación), para regular la función vascular (9). La célula endotelial actúa liberando diferentes sustancias vasoactivas que pueden modular tanto la vasodilatación como la vasoconstricción. Entre los vasodilatadores se encuentran las sustancias conocidas como factores relajantes derivados del endotelio (EDRF), un grupo formado por el óxido nítrico (NO), las prostaciclina (PGI₂), el factor hiperpolarizante derivado del endotelio (EDHF), el monóxido de carbono (CO) y el sulfuro de hidrógeno (H₂S) (9). Los EDRF, además de actuar como relajantes del vaso, también pueden impedir la adhesión de plaquetas y de células inflamatorias e inhibir la proliferación de las

células musculares, controlando así el desarrollo de la inflamación vascular y la formación de la placa de aterosclerosis (10). Por otro lado, las sustancias vasoconstrictoras se conocen como factores contráctiles derivados del endotelio (EDCF) y entre ellas se encuentran los prostanoïdes, como la prostaglandina H2 (PGH2) y el tromboxano A2 (TXA2), el anión superóxido (O_2^-), la angiotensina II (AngII) y la endotelina (ET-1) (10). Muchas de estas sustancias son activadas por los mediadores de la inflamación o a través de estímulos físicos como un shear stress bajo (11), y están asociadas al aumento de la resistencia vascular y al desarrollo de la aterosclerosis (12).

El correcto equilibrio entre los EDRF y los EDCF da lugar al buen funcionamiento de la pared vascular para el control de la homeostasis (11). Cuando el equilibrio entre EDCF y EDRF se rompe se habla de disfunción endotelial. La disfunción endotelial implica un aumento en el tono vascular, en la proliferación de la capa muscular lisa y en el proceso de inflamación vascular. El aumento del tono vascular (vasoconstricción) se debe principalmente al aumento de la liberación de EDCFs, aunque algunos cambios estructurales y de señalización en la capa muscular también juegan un papel fundamental en la contracción y en la estructura vascular (13). Con respecto a la inflamación vascular, la disfunción endotelial conduce a un aumento en la producción de las moléculas de adherencia en la superficie endotelial (como las VCAM-1, ICAM-1), así como diferentes selectinas que favorecen la adhesión y la migración de células sanguíneas hacia el espacio subendotelial. Cuando esto ocurre, células como los monocitos se internalizan en el espacio subintimal de la arteria e inician un complejo proceso de inflamación vascular que termina con la formación de la placa aterosclerótica. Del mismo modo, el colesterol-LDL puede penetrar en el espacio subendotelial, allí sufre una transformación oxidativa debida a los radicales libres generados por el estrés oxidativo que produce la misma disfunción endotelial. Las LDL oxidadas estimulan la producción de factores pro inflamatorios y mitógenos por parte de los macrófagos entre los cuales se encuentran citoquinas, proteasas, interleukina-1 (IL-1), factor de necrosis tumoral (TNF) y factor de crecimiento fibroblástico, entre otros. Todo este proceso de activación celular genera una intensa respuesta inflamatoria que culmina con la formación de la placa aterosclerótica (13). Debido a todos estos cambios en la pared vascular, se considera que la disfunción endotelial es el paso inicial en numerosas ECV

como la arteriosclerosis, la hipertensión arterial, la sepsis, la trombosis, la vasculitis o las hemorragias (13).

Una de las principales sustancias vasoactivas liberadas por el endotelio es el óxido nítrico (NO). El NO es un gas sintetizado por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS) y como tal difunde fácilmente hacia el espacio intracelular e intercelular modulando distintas vías de señalización en las células. En el endotelio, el NO está producido principalmente por la isoforma endotelial de la NOS (eNOS o NOS3) y, bajo un estímulo agonista o mecánico, difunde rápidamente hacia la luz y hacia la capa muscular del vaso relajando así a las células musculares lisas (SMC). El mecanismo de relajación muscular ocurre a través de la disminución del calcio intracelular por un aumento de producción de GMPc a través de la activación de la enzima guanilato ciclasa por el NO (10). Este hecho resulta en una vasodilatación y por tanto en una disminución de la presión arterial. Además de sus efectos vasodilatadores, el NO también inhibe la adhesión de las plaquetas y de los leucocitos a la pared del vaso, así como la proliferación de las SMC a través de mecanismos complejos que implican la regulación de la expresión génica (14,15). Mediante estos mecanismos, el NO evita la formación de la placa aterosclerótica y la vasoconstricción que pueden conducir a la arteriosclerosis y a la hipertensión arterial.

En presencia de la disfunción endotelial, hay una disminución de la biodisponibilidad de NO. En ciertas condiciones fisiopatológicas existe una reducción de la producción de NO debido a una disminución de la expresión de la eNOS (16). Por otro lado, varios estudios han demostrado reducción en la biodisponibilidad del NO a pesar de encontrar una expresión normal de eNOS o incluso aumentada (17,18). Está bien establecido que el NO sintetizado se transforma en peroxinitrito en presencia del anión superóxido. Esta reacción se produce rápidamente antes de su liberación a los tejidos y por tanto, el NO producido por el endotelio se encuentra menos disponible en el espacio subendotelial y en la capa muscular (19). Como resultado de todo este complejo proceso, hay un aumento en la resistencia y en la permeabilidad vascular así como un incremento en la adhesión y en la migración de las células inflamatorias hacia el espacio subendotelial. Además, también aparece un incremento en la proliferación de las células musculares lisas que migran hacia la íntima y aumentan la producción de matriz extracelular (20). Todos estos cambios

secundarios a la disminución de la biodisponibilidad del NO favorecen el inicio de la formación de la placa de aterosclerosis, así como una mayor resistencia al paso del flujo sanguíneo, factores que conducen hacia la hipertensión arterial (21).

Estudios experimentales y clínicos han reportado que los estrógenos pueden ejercer protección cardiovascular a través de la modulación de la función endotelial. Se ha observado una disminución de la relajación dependiente de endotelio tanto en mujeres menopáusicas (22,23) como en modelos animales de hembras ovariectomizadas (24), mientras que el tratamiento con estrógenos mejoraba la relajación dependiente de endotelio (24,25,26). Roqué et al (27) observaron que la administración transdérmica de estrógenos durante 24 horas aumentaba la relajación dependiente de endotelio en mujeres postmenopáusicas sanas y con ECV diagnosticada.

Uno de los mecanismos de acción más ampliamente descritos por el que los estrógenos realizan sus efectos beneficiosos en el sistema cardiovascular es mediante el aumento de la biodisponibilidad de NO. Darblade B, et al. (28) observaron un incremento en la producción de NO en ratones ovariectomizados tratados con estrógenos en comparación con aquéllos tratados con placebo, y por tanto se asoció a los estrógenos con la mediación de los efectos positivos sobre la producción de NO basal. Se ha descrito que el estrógeno puede aumentar la producción de NO mediante la regulación positiva de la expresión y la actividad de la eNOS. Es conocido que los estrógenos son los responsables del aumento de la transcripción del gen de la eNOS en distintos lechos vasculares (29,30). Este efecto está asociado a la unión del estrógeno a sus receptores intracelulares ($ER\alpha$ y $ER\beta$), ya que es inhibido por el antagonista inespecífico de los receptores de estrógeno ICI 182780 (31). Sumi e Ignarro (32) demostraron, en un estudio con células transfectadas con los subtipos de ER, que el estrógeno aumentaba significativamente la expresión de la eNOS a través de su interacción con el receptor $ER\alpha$. Además se ha visto, que el estrógeno induce un aumento rápido de la actividad de la eNOS y la liberación de NO mediante la activación de la fosforilación de la enzima por la acción directa del receptor de estrógeno (ER) en la vía de la PI3 quinasa / Akt (33). Por otro lado, el estrógeno puede incrementar la disponibilidad de NO al interferir en su degradación. De hecho, estudios experimentales han demostrado que los distintos estrógenos son capaces de reducir la oxidación del colesterol LDL y por lo tanto el desarrollo de la

aterosclerosis (34,35). Además, el estrógeno puede atenuar el daño vascular causado por el aumento en la generación de radicales libres después de un proceso de isquemia-reperfusión (36). En estudios anteriores, Dantas et al. (24,25) demostraron que la supresión de la producción de estrógeno por ovariectomía dio lugar a una mayor concentración del O_2^- en las arteriolas mesentéricas aisladas de ratas hipertensas (SHR).

Además de su modulación sobre el NO, otros estudios experimentales como el de Xing et al. (37) demostraron que los estrógenos actúan como agentes antiinflamatorios en el sistema cardiovascular. Los autores estudiaron los efectos de los estrógenos en un modelo de lesión carotídea de rata. En este modelo, la administración de niveles fisiológicos de estrógenos disminuyó significativamente la formación de neointima en los animales ovariectomizados en comparación con los animales que no recibieron tratamiento. Los estrógenos también inhibieron la expresión de mediadores de la inflamación y la infiltración de leucocitos en la zona lesionada en las carótidas de las ratas (37). Más estudios experimentales han demostrado que el pretratamiento con estrógenos causaría una disminución de la infiltración por neutrófilos en situaciones de isquemia-reperfusión miocárdica, así como una disminución en la expresión de la proteína C reactiva encargada de activar los mediadores de la inflamación. Barton et al. (38) también demostraron en su estudio que el 17β -estradiol es un potente inhibidor de la proliferación y la migración de las células musculares lisas de los vasos, hecho muy importante en el proceso de remodelación y en la formación de placas aterosclerosas.

A pesar de los diferentes mecanismos de acción descritos a través de los cuales los estrógenos actuarían como protectores de la función vascular, los estudios clínicos han generado una gran controversia que pone en duda la efectividad de la TH con estrógenos sobre la prevención frente a las ECV.

Confirmando los resultados de investigación básica, el principal estudio observacional sobre los efectos de la administración externa de hormonas en la función cardiovascular en mujeres que cabe destacar es el Nurses' Health Study (39), un estudio de cohortes, multicéntrico, sin randomización del tratamiento, en el que se evaluó a un elevado grupo de enfermeras cuya media de edad se encontraba alrededor de los 55 años. A estas mujeres se les realizó un seguimiento de entre 20 y 25 años y se comparó a las que seguían TH con estrógenos con las que no tomaban nada. Se observó que en el grupo de

mujeres tratadas con TH disminuía la hipertensión arterial y el riesgo de ECV. Los datos obtenidos en estos estudios fueron de gran interés ya que por primera vez se relacionaron clínicamente los efectos de los estrógenos con la protección de la ECV en mujeres. Así fue como se pensó que la TH con estrógenos podría llegar a ser utilizada para esta finalidad. Debido a los resultados del Nurses' Health Study y de estudios experimentales realizados anteriormente, surgió la necesidad de diseñar estudios clínicos para verificar si realmente los estrógenos tenían efectos beneficiosos sobre el sistema cardiovascular.

El primer ensayo clínico controlado que se realizó para evaluar los efectos cardioprotectores de la TH fue el estudio para prevención secundaria por los estrógenos, el "Heart and Estrogen/progestin Replacement Study" (HERS) (40). Este estudio clínico, prospectivo, randomizado de doble ciego y con grupo placebo, se desarrolló en mujeres postmenopáusicas con enfermedad coronaria diagnosticada. Los autores quisieron determinar si la administración de estrógenos alteraba el riesgo de padecer de enfermedad coronaria comparando los resultados con un grupo de mujeres a las que se les administró placebo. Considerando un seguimiento promedio de 4,1 años, en general, no se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre ambos grupos de mujeres, tanto para los resultados primarios (incidencia de infarto de miocardio no fatal o muerte por enfermedad coronaria) como los secundarios (la revascularización coronaria, la angina inestable, la insuficiencia cardíaca congestiva, el paro cardíaco resucitado, el ACV o ataque isquémico transitorio y la enfermedad arterial periférica). A pesar de este efecto general nulo, sí se hallaron diferencias estadísticamente significativas a lo largo del tiempo entre los grupos, correspondiéndose con una mayor cantidad de eventos de enfermedad coronaria y eventos tromboembólicos venosos en el grupo de tratamiento en comparación con el grupo control. En este sentido, se concluyó que durante el tiempo de seguimiento, la TH no sólo no redujo el índice general de incidencia de eventos de enfermedad coronaria, sino que incrementó la ocurrencia de eventos tromboembólicos y de enfermedad vascular. Por la ausencia de beneficios cardiovasculares y el aumento de los riesgos en los eventos de enfermedad coronaria, se decidió no recomendar la TH para la prevención secundaria de la enfermedad coronaria en mujeres postmenopáusicas.

Después de los resultados negativos y las conclusiones del HERS respecto a mujeres con enfermedad coronaria diagnosticada, se diseñó un nuevo estudio clínico en mujeres sin enfermedad cardiovascular, partiendo del reconocimiento que a pesar de la gran cantidad de evidencia científico-observacional, todavía permanecía incierto el balance entre los riesgos y los beneficios de la TH con estrógenos en este grupo de mujeres. Así se realizó el ensayo para la prevención primaria de la enfermedad cardiovascular, el “Women’s Health Initiative” (WHI). En este estudio clínico y prospectivo, Rossouw et al. (41) recogieron los principales resultados sobre la administración de TH en mujeres postmenopáusicas sanas. Sin embargo, a los 5 años el estudio tuvo que ser interrumpido debido a los efectos adversos asociados, principalmente por una mayor aparición de cáncer de mama invasivo junto con el aumento de los casos de tromboembolismo venoso en las mujeres a las que se les administraba la TH. A partir de los resultados obtenidos, los autores concluyeron que los estrógenos no solo no tenían efectos beneficiosos para prevenir el desarrollo de ECV sino que incluso podían tener efectos negativos para la salud de las mujeres postmenopáusicas. Como el riesgo-beneficio no se correspondía con los requerimientos esperados, se decidió que la TH no era una buena opción terapéutica para la prevención primaria ni secundaria de las ECV.

Después de la publicación de los resultados negativos del HERS y del WHI, la US Food and Drug Administration (FDA) recomendó a los médicos la abstención en la prescripción de TH para la prevención de problemas cardiovasculares y recomendó el uso de la misma sólo para tratar problemas derivados de la menopausia en mujeres sanas, utilizando las dosis más bajas posibles y ante una necesidad absoluta (42). Austin, et al. (43) indicaron una reducción del 32% en la prescripción de la TH en Ontario, cuando compararon el último cuatrimestre de 2002 con el último cuatrimestre de 2001. En Europa, los estudios WHI y HERS no causaron tanto impacto como en Estados Unidos y Canadá, ni tampoco estuvieron acompañados de una disminución tan drástica en la prescripción de TH. Pero en 2003, se publicó el Million Women Study (MWS) (44), con el objetivo principal de evaluar el riesgo de padecer cáncer de mama en mujeres menopáusicas de más de 50 años de media tratadas con TH combinada de estrógenos y progestágenos. Este estudio prospectivo concluyó que el tratamiento combinado con estrógenos y progesterona incrementaba

significativamente el riesgo de sufrir cáncer de mama, de endometrio y de ovario, especialmente entre los grupos de mujeres de edad más avanzada. Aunque este estudio no establece una correlación entre la TH y el riesgo cardiovascular, su publicación promovió un descenso significativo en la prescripción de la TH en las mujeres postmenopáusicas que seguían teniendo la percepción que las hormonas eran muy útiles para la prevención de la osteoporosis y otros síntomas de la menopausia, ya que empezaron a asociar la TH más fácilmente con un mayor riesgo de cáncer de mama. Así, a mediados del 2000, los ginecólogos, influenciados por los resultados de los estudios clínicos dejaron de recomendar la TH, especialmente a largo plazo, en casos de riesgo cardiovascular y/o con antecedentes familiares de cáncer de mama (45).

A pesar de la repercusión negativa de sus resultados en el medio científico, en los estudios HERS y WHI se reconocen varias limitaciones. En el estudio HERS, la falta de análisis de los efectos de la TH con estrógenos en mujeres sin enfermedad coronaria previa o sanas, la utilización de un régimen medicamentoso único, o el reducido seguimiento en el grupo de tratamiento son las principales críticas descritas. El estudio WHI intenta corregir alguna de esas limitaciones y por ello estudia a mujeres sanas sin enfermedad cardiovascular previa pero tiene como limitación común el régimen medicamentoso único, tanto en relación con los compuestos como con su dosificación, el uso combinado de los estrógenos conjugados equinos (CEE) y progestágenos, los elevados índices de discontinuidad en los tratamientos del estudio por parte de las pacientes o la imprecisión en las estimaciones de los efectos a largo plazo dada la temprana interrupción del estudio. Muraca y Evans (46) también hicieron mención a las limitaciones sobre las medidas de parámetros subjetivos, tales como los síntomas y secuelas de la menopausia y el desarrollo de estos 10 años después de empezar la menopausia, principales razones del inicio de la TH con estrógenos. En este sentido, estudios recientes intentan clarificar los resultados del WHI buscando explicaciones a los datos negativos del estudio que contradicen la abundante evidencia bioquímica y observacional con respecto a la efectividad de la TH con estrógenos ante la protección de ECV.

El primer punto crítico citado hace referencia al régimen de TH utilizado en los estudios. Tanto el WHI como el HERS utilizaron en primera instancia una combinación de CEE con progesterona. La progesterona ejerce principalmente su

acción a través de su receptor intracelular (PR) que está ampliamente distribuido por todo el organismo (47). A ella se le atribuyen una serie de efectos fisiológicos que son amplificadas por la presencia de estrógenos. La progesterona actúa como regulador de la coagulación sanguínea y el tono vascular (48). La adición de progestágenos puede, por lo tanto, afectar las funciones vasculares e influenciar negativamente el efecto cardioprotector de la terapia estrogénica.

En base a los diferentes estudios existentes y a las críticas recibidas a los estudios clínicos por el hecho de combinar estrógenos con progesterona, en 2004 los autores del estudio WHI publicaron los resultados de la parte “solo estrógeno” del WHI, en la que se pretendía comparar los efectos de los CEE sin progestágenos en comparación con la administración de placebo en un grupo de mujeres sanas sin enfermedad cardiovascular previa (49). En este estudio, no se encontraron diferencias significativas en la incidencia de enfermedad coronaria, en cáncer de mama ni en el incremento de la mortalidad en comparación con el grupo placebo. Por tanto, se concluyó que el uso de CEE sin progesterona no aportaba ningún beneficio extra al uso combinado de CEE más progesterona. Debido a estos resultados no se ha considerado suficientemente relevante abordar la cuestión de la utilización de la progesterona en la función vascular en esta tesis.

El segundo punto a analizar con detenimiento se basa en el tipo de estrógeno utilizado en los ensayos clínicos de TH, ya que en la mayoría de los estudios se utilizan los CEE, es decir una mezcla de estrógenos equinos, mientras que en muchos estudios experimentales y observacionales se usa el 17β -estradiol (17β -E₂), el estrógeno más abundante en el plasma de las mujeres (50). Las críticas generadas son debidas a la idea de que el tipo de hormona más adecuada para el tratamiento en mujeres sería el estrógeno natural en lugar de los CEE por el hecho de ser especie-específico y por tanto tener una mayor efectividad. Actualmente, diversos estudios han demostrado mejores efectos cardiovasculares entre los que se encuentran una mayor vasodilatación dependiente de endotelio, un aumento en la producción de NO y una disminución de la presión sanguínea en mujeres postmenopáusicas con la administración de los estrógenos que se producen naturalmente en la mujer, como el 17β -E₂ (51,52). Conjuntamente, en un metaanálisis, Holtorf (53) partió del reconocimiento que, de acuerdo a las observaciones de la FDA, todavía no existe evidencia científica determinante sobre si las hormonas consideradas como bioidénticas o naturales son más

seguras o más efectivas respecto de aquellas no bioidénticas o sintéticas, todas ellas habitualmente utilizadas en las TH. El autor propuso evaluar la evidencia existente para comparar las hormonas bioidénticas con las no bioidénticas comúnmente utilizadas, en cuanto a la eficacia clínica, las acciones fisiológicas sobre diferentes tejidos y las ECV. A partir de los resultados obtenidos se concluyó que las hormonas naturales mejoraban la función cardiovascular en comparación con las no bioidénticas (los CEE y los progestágenos sintéticos).

Además de los estrógenos, tanto los naturales como los sintéticos, muchas mujeres utilizan los Moduladores Selectivos de los Receptores de Estrógenos (SERM) para el tratamiento de los diferentes síntomas de la menopausia (sequedad vaginal, sofocos, osteoporosis). Los SERM son moléculas sintéticas que modulan selectivamente la actividad de los receptores de estrógenos (ER) pudiendo actuar como agonistas completos, agonistas parciales o antagonistas en función del tejido en el que actúen. Esta característica es muy interesante ya que puede garantizar la posibilidad de estimular y/o inhibir selectivamente la acción del estrógeno según el efecto deseado. Debido a esta característica se empezó a estudiar la posibilidad de utilizar a los SERM en mujeres menopáusicas para la prevención de enfermedades cardiovasculares. De acuerdo con varios estudios experimentales, el SERM raloxifeno tiene efectos beneficiosos sobre el sistema vascular. De manera similar a los estrógenos, el raloxifeno puede estimular la generación de NO endotelial tanto por una vía genómica, como por una no genómica. El raloxifeno aumenta la expresión de eNOS en una gran variedad de lechos vasculares (54) y también promueve una rápida activación de la eNOS a través de la vía de señalización de la PI3-quinasa (55). En base a estos datos se diseñó el estudio Raloxifene Use for The Heart (RUTH) (56). En este estudio clínico se comparó el uso del SERM raloxifeno (muy utilizado para el tratamiento de la osteoporosis y del cáncer de mama) con el uso de placebo en mujeres postmenopáusicas con una media de edad de 65 años y con enfermedad cardiovascular demostrada o bien con un elevado riesgo de padecerla. El objetivo del estudio fue demostrar que sustituyendo el estrógeno por un SERM se lograrían eliminar los efectos negativos observados en estudios clínicos anteriores y por los que se había llegado a la conclusión de que la TH estaba contraindicada en mujeres postmenopáusicas. Sin embargo, los resultados obtenidos no mostraron ninguna diferencia significativa, entre el grupo de mujeres tratadas y el grupo

placebo, en la aparición de eventos coronarios. Sin embargo, en el grupo tratado con raloxifeno incrementó la incidencia de tromboembolismo venoso y la de accidentes cerebrovasculares fatales. Por lo tanto se concluyó que con el uso de SERM tampoco se obtenía ningún beneficio adicional para el sistema cardiovascular. Corroborando estos resultados se encuentra el recientemente publicado ensayo MERCED (57), un estudio clínico, prospectivo y aleatorizado en el que se ha analizado, de forma seriada, la función endotelial y los parámetros biológicos relacionados con las vías de la coagulación. El MERCED ha demostrado que el tratamiento a medio plazo (3 meses) con raloxifeno en mujeres con enfermedad coronaria no afecta a la función endotelial a pesar de disminuir la actividad trombótica y fibrinolítica en estas mujeres.

Todos los resultados anteriores generaron un tercer punto crítico: la edad media de las participantes en los estudios WHI (63 años), HERS (66 años), RUTH (65 años) y MERCED (60 años). Empezar la TH a estas edades implica una ausencia de estrógenos en el organismo de aproximadamente diez años durante la cual, las participantes podrían haber sufrido ya un daño vascular asintomático significativo que no podría revertirse con la TH. En base a este punto surge la hipótesis conocida como *The Timing Hypothesis* que sugiere que los efectos beneficiosos de los estrógenos para prevenir la ECV solo se observan cuando son administrados antes de que los efectos negativos del envejecimiento o la presencia de ECV asintomática se hayan establecido en la vasculatura (58). Un análisis detallado de los datos del WHI indica que el inicio de la TH con estrógenos a una edad temprana produce mejores resultados que los obtenidos en el promedio de edad para el inicio del tratamiento realizado en el estudio WHI en general (59).

El envejecimiento *per se* se ha descrito como un factor de riesgo de las patologías vasculares, por las alteraciones estructurales y funcionales que provoca en el sistema vascular típicas de la disfunción endotelial (endotelio adherente, protrombótico y procoagulante), rigidez y remodelación arterial, angiogénesis alterada, reparación vascular defectuosa e incremento de la prevalencia de aterosclerosis (60,61). Por estas razones se ha considerado que la disfunción endotelial producida por el envejecimiento es similar a la producida por los factores de riesgo cardiovascular. Uno de los mecanismos por los cuales el envejecimiento produce disfunción endotelial es a través del aumento del estrés

oxidativo y consecuentemente por la inactivación del NO (62,63). Igualmente, el envejecimiento arterial promueve la activación de vías inflamatorias o proteolíticas que dan lugar a un incremento en la formación de colágeno y en la degradación de la elastina, además de una reducción en el número de SMC asociada a una disminución del lumen arterial. Aunque se considere al envejecimiento como un factor de riesgo cardiovascular importante, todavía se desconoce cómo este factor afecta a la función vascular en mujeres y como los cambios debidos al envejecimiento modulan los efectos protectores de los estrógenos (58).

En un estudio con ratas de diferentes edades: jóvenes, de mediana edad y viejas. Intactas, ovariectomizadas (Ovx) y ovariectomizadas tratadas con estrógenos (Ovx+E₂), LeBlanc, et al. (64) observaron una disminución de la vasodilatación en todos los grupos de animales Ovx, aunque este efecto ha sido más marcado en las ratas viejas. La TH con estrógenos mejoró significativamente la vasodilatación en hembras jóvenes pero no tanto en las ratas de mediana edad y las viejas. Con estos resultados, los autores concluyeron que la clara pérdida de hormonas en relación con la edad afecta de manera muy negativa a la vasodilatación en animales de edad avanzada así como la disminución de la efectividad de la TH con la edad (64,65). En otro estudio, Xing et al. (37) demostraron que una prolongada hipoestrogenicidad suprimía los efectos antiinflamatorios en un modelo de rata ovariectomizada e hipertensa y el 17β-E₂ estimulaba las respuestas al daño vascular en los animales viejos contrariamente a los efectos protectores en los animales jóvenes. Estos resultados demostraron que, después de largos periodos sin hormonas, los efectos de los estrógenos resultan negativos para los vasos. Los autores concluyeron que los efectos vasoprotectores y antiinflamatorios de los estrógenos pasan a ser tóxicos y proinflamatorios en hembras/mujeres de edad avanzada o en aquéllas que han estado largos periodos de tiempo sin hormonas circulantes (37).

En mujeres, Sherwood et al. (66) demostraron, en un ensayo de doble ciego en el que se estudiaron los efectos de TH con estradiol (E₂) mediante parches transdérmicos a mujeres menopáusicas de entre 50 y 80 años, que los beneficios en la función vascular con el uso de este estrógeno natural, es decir disminución de la presión arterial, disminución del riesgo de la placa de aterosclerosis, disminución de la inflamación, mayor elasticidad del vaso y aumento de NO, dependen de la edad a la que se tuvo la menopausia. Además el

estudio reveló que la mejora en la función vascular sólo es evidente durante los primeros años de la menopausia (66). En la misma línea que los anteriores estudios, Manson et al. (67) determinaron la relación entre la terapia con estrógenos y la calcificación de las arterias coronarias en mujeres menopáusicas de mediana edad, (entre 50 y 59 años) ya que la calcificación es una alteración muy común durante el envejecimiento y es un factor de riesgo para sufrir eventos cardiovasculares. Los resultados mostraron una disminución significativa en la calcificación de las coronarias en mujeres tratadas con estrógenos en comparación con las tratadas con placebo. Los autores concluyeron que la TH con estrógenos en mujeres recién entradas en la menopausia puede disminuir la aparición de los factores de riesgo responsables de las ECV (67).

En base a las controversias generadas por los estudios clínicos y de investigación básica, los artículos de elaboración propia que se presentan a continuación y que forman el cuerpo de esta tesis doctoral se asocian a dos de los puntos más críticos del estudio WHI enunciados anteriormente, es decir el tipo de estrógeno usado en la TH y el efecto de la edad en la respuesta al estrógeno. De esta manera, se pretenden aportar nuevas evidencias a la controversia generada en la TH y poder avanzar en las medidas para la prevención y el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares.

HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

La hipótesis principal de esta tesis es que el tipo de estrógeno y el envejecimiento condicionan los efectos protectores de los estrógenos sobre la función cardiovascular. Para poder verificar nuestra hipótesis se han planteado los siguientes objetivos específicos que se asocian a dos de los puntos críticos del estudio WHI enunciados anteriormente:

1. Comparar los efectos de los estrógenos conjugados equinos (CEE) y los estrógenos naturales de la mujer (estradiol y estrona) en la modulación de la producción de óxido nítrico (NO).
2. Determinar los mecanismos responsables de la diferente modulación del NO por los distintos tipos de estrógenos.
3. Estudiar las implicaciones del envejecimiento en los efectos beneficiosos de los estrógenos en la producción de NO y en la función vascular.
4. Determinar los posibles mecanismos involucrados en los cambios de los efectos de los estrógenos asociados al envejecimiento.

ESTUDIO 1

Equine estrogens impair
nitric oxide production and
endothelial nitric oxide
synthase transcription in
human cells compared with
the natural 17β -estradiol

Objetivos

El objetivo principal del presente estudio es comparar la capacidad de los estrógenos conjugados equinos (CEE) y de los estrógenos que se producen naturalmente en la mujer (estradiol y estrona) para modular la producción de óxido nítrico (NO). Las diferencias en la producción de NO por los diferentes tipos de estrógenos podrían indicarnos las diferencias observadas en los efectos cardiovasculares obtenidos en las diferentes terapias hormonales con estrógenos.

Métodos

Para la realización de los estudios se utilizaron los principales tipos de estrógenos comercialmente disponibles que forman parte de la composición de los combinados equinos (CEE): la equilina (Eq), la equilenina (Eqn) y sus metabolitos (la 17α -equilina (17α -eq), la 17α -equilenina (17α -eqn), la 17β -equilina (17β -eq) y la 17β -equilenina (17β -eqn)). Así como los estrógenos naturales: el 17β -estradiol (17β -E₂), la estrona (E₁) y el 17α -estradiol (17α -E₂).

Los efectos de ambas clases de estrógenos se evaluaron *in vitro* en células endoteliales de aorta humanas (HAEC) American Type Culture Collection (ATCC) y Clonetics (Lonza) obtenidas de 3 donantes distintas (mujeres de 55 años de media). Para la realización de los experimentos de la actividad transcripcional se usaron células COS-7 de ATCC. Se optó por este tipo celular debido a que no expresan ERs por lo que se hace más fácil transfectarlas con el ERs deseado. Tanto las HAEC como las COS-7 fueron tratadas durante 24 horas con dosis crecientes de estrógenos (10nM a 1 μ M) o vehículo (etanol 0.1%).

Se decidieron estudiar los efectos de los distintos estrógenos en la producción de NO debido a que el NO es un importante regulador de la función cardiovascular. Además, los mecanismos por los cuales el estrógeno modula su biodisponibilidad han sido muy bien descritos y por lo tanto se han podido diseñar con mayor precisión los protocolos específicos para determinar los cambios en la eficacia de estas hormonas. La valoración de la producción de NO se realizó por dos métodos distintos debido a su corta vida media. Así, se utilizó el método de la

nitrosilación intracelular del fluorocromo DAF2-DA sensible al NO y la determinación de la concentración de los metabolitos de NO (NO_2/NO_3) en el medio de cultivo celular.

La enzima óxido nítrico sintasa endotelial (eNOS o NOS3) es la principal productora de NO en el tejido vascular. El principal mecanismo por el que los estrógenos promueven una mayor producción del NO es por un aumento en la transcripción de la eNOS. Debido a este hecho se estudió la expresión de mRNA de eNOS mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) en tiempo real. Además de la expresión, también se estudió la actividad de la enzima mediante el método de conversión de la L-arginina marcada en L-citrulina.

Los estrógenos regulan la transcripción génica mediante la activación de su receptor α o β ($\text{ER}\alpha$ o $\text{ER}\beta$). En este sentido, se estudió la actividad transcripcional de los estrógenos equinos y naturales en el gen de la eNOS por los subtipos de ER ($\text{ER}\alpha$ o $\text{ER}\beta$) utilizando la técnica de “reporter gene”. Para ello células COS-7 fueron cotransfectadas con un plásmido que contenía la secuencia de la región promotora de eNOS unida a la luciferasa (eNOS-Luciferasa) y vectores que contenían la secuencia que codifica el $\text{ER}\alpha$ o el $\text{ER}\beta$. Como control interno de la transfección, las COS-7 fueron cotransfectadas con un plásmido que codifica la secuencia de la β -Galactosidasa. 24h después de la transfección, las células fueron tratadas con los distintos estrógenos ($1\mu\text{M}$) y en las 24 horas siguientes se valoró la actividad de las enzimas luciferasa (que determina la capacidad transcripcional en el gene de la eNOS) y β -Galactosidasa en los extractos celulares con kits comerciales de Promega.

Debido al hecho que moléculas con estructuras muy similares producen efectos tan diferentes en la transcripción de eNOS y en la producción de NO, se realizó un análisis molecular por ordenador mediante la utilización de la estructura cristalográfica por rayos X del $\text{ER}\alpha$, así como un estudio de sus cambios conformacionales tras la unión con los distintos estrógenos.

Resultados

Los resultados con el método DAF-2 indicaron un importante aumento en la producción de NO por parte del E₂, incrementando en 2,5 veces los resultados obtenidos en las células sin tratamiento. La E₁ también logró un importante incremento dosis-dependiente de la producción de NO, aunque ligeramente inferior al de 17β-E₂ (sin diferencias significativas). Sin embargo, el 17α-E₂ y los estrógenos equinos se mostraron claramente menos efectivos en aumentar la producción de NO. El mismo patrón fue observado en los resultados de las medidas de los metabolitos del NO, nitrito y nitrato, en el medio de cultivo celular.

Debido a las diferencias encontradas en la producción de NO, el siguiente paso fue estudiar como los diferentes estrógenos afectan a la actividad y a la expresión de la óxido nítrico sintasa (eNOS), para buscar diferencias que justificaran los cambios observados en la producción de NO. Se sabe que el principal mecanismo involucrado en el aumento de la biodisponibilidad del NO inducido por estrógenos es a través de la estimulación transcripcional del gen que expresa la eNOS. Para determinar en qué medida los diferentes tipos de estrógenos regulan la expresión de mRNA de eNOS se realizó la PCR en tiempo real. Estos resultados mostraron que el tratamiento con 17β-E₂ en las HAEC incrementó significativamente los niveles de mRNA de la eNOS (2,5 veces en comparación con las muestras sin tratamiento con estrógenos). Además, se hallaron datos similares con el tratamiento con E₁ mientras que el 17α-E₂ y todas las moléculas de los CEE demostraron un efecto considerablemente menor.

Puesto que la transcripción no es el único parámetro para garantizar el correcto funcionamiento de la enzima, se analizó también la actividad de la eNOS. En los resultados se hallaron correlaciones entre los efectos sobre la activación de la eNOS inducida por estrógenos y el tipo de compuesto estrogénico en sí. Se observó un patrón dosis-dependiente en todos los casos, pero mayor en 17β-E₂, ligeramente menor en E₁ y considerablemente inferior en los CEE y el 17α-E₂. Estos datos sugieren que los cambios observados en la transcripción de la eNOS son los principales responsables de la diferencia en los niveles de NO observados con los distintos tratamientos con estrógenos.

Por esa razón se decidió estudiar el papel de los distintos estrógenos en la actividad transcripcional de los ER α y ER β en el gen que codifica la eNOS. Así, mediante el método de “reporter gene” hemos observado que el ER α es el principal subtipo de ER responsable de la acción del estrógeno en el promotor del gen de eNOS y consecuentemente de la modulación de su transcripción. Todos los estrógenos fueron capaces de incrementar la actividad del promotor de eNOS con su unión a ambos ERs, ER α y ER β , pero la activación por ER α inducida por 17 β -E₂ y E₁ fue el doble o el triple que la promovida por el 17 α -E₂ y los estrógenos equinos. Por otro lado, no se detectaron diferencias en la actividad transcripcional de ER β por los distintos estrógenos estudiados.

Mediante análisis computacional se determinaron los cambios conformacionales adquiridos por el complejo formado entre los diferentes tipos de estrógenos y el ER α (principal responsable por las respuestas observadas). Se observó como la presencia del grupo hidroxil (OH) en el carbono número 17 (la única diferencia estructural entre el 17 β -E₂, la E₁ y 17 α -E₂) confería al complejo ER-estrógeno una mayor estabilidad debido a su mejor unión a la Histidina 524 (His-524). Esta mayor estabilidad del complejo permitiría una unión mejor y más estable con la región promotora del gen de eNOS, debido a una menor probabilidad de que ocurran cambios conformacionales. Estos datos permitieron establecer el siguiente gradiente de potencial asociado ellas: 17 β -E₂ > E₁ > 17 α -E₂.

Como segunda parte del estudio computacional, se determinaron las diferencias entre el 17 β -E₂, la 17 β -eq y la 17 β -eqn, ya que a pesar de que las 3 hormonas tienen en su estructura un grupo OH en el carbono 17, se observaron diferencias significativas en la activación de la transcripción de eNOS. En esta parte del estudio se determinó que la saturación del anillo B (la única diferencia estructural entre estas tres moléculas) confería al complejo ER-estradiol mayor flexibilidad e hidrofobicidad. Una mayor flexibilidad facilitaría la unión del complejo con la región promotora del gen. Por otro lado, una mayor hidrofobicidad iría asociada con una disminución en la acidez de la hormona, hecho que facilitaría una unión más estable entre la hormona y el ácido glutámico 353 (Glu-353) del ER α . En este caso el orden sería el siguiente: 17 β -E₂ > 17 β -Eq > 17 β -Eqn.

Los datos obtenidos demuestran que los estrógenos equinos en la composición de CEEs, los estrógenos más utilizados en las TH en EE.UU, son menos efectivos que los estrógenos naturales a la mujer (el E₂ y la E₁) para aumentar la producción de NO debido a su menor capacidad para modular la transcripción de la eNOS. Nuestros resultados permiten conocer con mayor profundidad los mecanismos a través de los cuales los diferentes tipos de estrógenos regulan la función vascular y por tanto podrían ayudar a mejorar las actuales TH en las mujeres menopáusicas.

ESTUDIO 2

Aging negatively affects
estrogens-mediated effects
on nitric oxide
bioavailability by shifting
 ER_{α}/ER_{β} balance in
female mice

Objetivo

Determinar el papel de la edad sobre los efectos beneficiosos de los estrógenos en la producción de óxido nítrico en un modelo murino de envejecimiento precoz.

Métodos

Todos los experimentos fueron realizados con un modelo murino de senescencia acelerada (SAM). Se trabajó con ratones hembras propensos al proceso de senescencia (SAMP) y con los ratones hembras controles resistentes al envejecimiento (SAMR). Los ratones se obtuvieron del stock de cría del Parc Científic de Barcelona y luego fueron alojados de acuerdo a los requerimientos institucionales. A los 7 meses de edad, los ratones fueron separados aleatoriamente en dos grupos: ovariectomizados (Ovx) y ovariectomizados tratados crónicamente con estradiol (Ovx + E₂).

En el momento de la intervención quirúrgica, los ratones que conformaban el grupo Ovx+ E₂ fueron tratados con 17β-estradiol (17β-E₂) (5µg/kg) disuelto en aceite mineral mediante inyección subcutánea cada tres días para simular el ciclo estral. Los ratones Ovx no tratados con estrógeno recibieron sólo el vehículo. La eficacia de la ovariectomía y del tratamiento hormonal se evaluó mediante el peso del útero. Cuatro semanas post intervención quirúrgica se midió el peso corporal de los ratones y los animales fueron eutanasiados. Se extrajeron el plasma y las aortas de todos los animales.

La biodisponibilidad del óxido nítrico (NO) es fundamental para una función vascular óptima, por eso es imprescindible realizar experimentos que midan la producción de NO. Los cambios en la producción NO se determinaron mediante dos técnicas distintas: la nitrosilación intracelular de fluorocromo DAF2-DA sensible al NO en anillos de aorta de 4µm de grosor y a través de la concentración de los metabolitos de NO (NO₂/NO₃) en el plasma de los animales.

Debido a que los cambios observados en la biodisponibilidad del NO pueden estar causador por una disminución en su producción o bien por un aumento en su degradación, se decidió estudiar los efectos del envejecimiento, tanto en la expresión de eNOS (responsable de la producción de NO), como en la

generación de anión superóxido (O_2^- , responsable de la degradación de NO). La expresión de eNOS se determinó en aorta, tanto a nivel proteico, mediante inmunofluorescencia y Western Blot, como a nivel de mRNA, con PCR a tiempo real. Por otro lado, el aumento de la producción de O_2^- se determinó mediante el estudio de la actividad de la enzima NADPH-oxidasa, una de las principales responsables de la producción de O_2^- , y de la expresión de sus diferentes subunidades NOX1, p47 y p22 a través de PCR a tiempo real.

Los cambios en los receptores de estrógeno ($ER\alpha$ y $ER\beta$) pueden modificar la expresión de eNOS y la biodisponibilidad del NO. Además, el envejecimiento y la falta de hormonas pueden afectar a los ERs. Para estudiar estas posibles alteraciones se analizó la expresión de los ERs en aorta mediante inmunofluorescencia y PCR a tiempo real.

La metilación del DNA es uno de los mecanismos presentes en los cambios de expresión genética asociados al envejecimiento. Para comprobar si en nuestro estudio estos cambios podrían estar afectando a los cambios de expresión observados en los ERs se estudió, en un primer paso, la metilación global del DNA genómico mediante el ensayo de extensión de la citosina en las aortas de los ratones SAMR y SAMP. Después de observar diferencias en la metilación global entre las hembras jóvenes y viejas, se procedió a realizar los experimentos de metilación específica en el gen que codifica el $ER\alpha$, ya que se observó una disminución en su expresión en las hembras viejas. Además, el $ER\alpha$ es el principal ER responsable de la transcripción de la eNOS y los beneficios cardiovasculares, por este motivo los cambios en su expresión podrían justificar las diferencias observadas en la expresión de eNOS.

Resultados

La producción de NO, tanto con el método de DAF-2 como con la producción de metabolitos del NO (NO₂/NO₃), no mostró cambios debidos al envejecimiento en ausencia del estrógeno. Sin embargo, el tratamiento con estradiol (E₂) fue capaz de incrementar significativamente la producción de NO en comparación con el grupo OVX en las hembras jóvenes (SAMR) pero no en las viejas (SAMP).

El siguiente paso fue estudiar la expresión de la isoforma endotelial de la enzima oxido nítrico sintasa (eNOS), para determinar si el envejecimiento afecta a los efectos del estrógeno en la biodisponibilidad de NO a través de una disminución en la expresión de eNOS. Los resultados de las inmunofluorescencias y Western Blot no mostraron ningún cambio en la expresión de la proteína en el grupo SAMP en comparación con el SAMR. En la misma línea que la producción de NO, el tratamiento con E₂ logró incrementar la expresión de la enzima en los ratones jóvenes mientras que los animales viejos no mostraron diferencias con la terapia de reemplazo hormonal. Al mirar la expresión génica de eNOS, se obtuvieron los mismos resultados que con la expresión proteica, sugiriendo que el envejecimiento estaría afectando a la actividad transcripcional de los estrógenos.

Cuando se analizó el posible aumento del estrés oxidativo mediante un aumento de la actividad de la enzima NADPH-oxidasa, la principal productora de O₂⁻, los resultados mostraron que el tratamiento con E₂ disminuyó significativamente la actividad de la NADPH-oxidasa en el grupo SAMR. Curiosamente, el tratamiento con E₂ incrementó notablemente la actividad de esta enzima en los animales viejos (SAMP). El estudio de expresión de las diferentes subunidades de la NADPH-oxidasa mostró, en el caso de la subunidad NOX-1, los mismos resultados que los observados en los estudios de actividad de la enzima. Mientras que, en el grupo SAMR, el tratamiento con estrógenos fue capaz de disminuir la expresión de NOX1 en comparación con los SAMR-OVX, en los ratones SAMP, se observó un claro aumento de la NOX1 debido al tratamiento con estrógenos. En cambio, las subunidades p47phox y p22phox no mostraron ninguna diferencia entre los grupos SAMR y SAMP.

Nuestro siguiente paso fue estudiar la expresión de los receptores de estrógeno alfa y beta (ER α y ER β). Se sabe que después de su unión al E₂, los ERs actúan como factores de transcripción uniéndose a la región promotora de distintos genes y modulando su expresión. Los resultados, tanto a nivel proteico como de mRNA, mostraron una disminución significativa de la expresión de ER α con la edad y con el tratamiento con estrógenos, tanto en la capa muscular como en la endotelial de la aorta. En cambio, la expresión de ER β se incrementó ligeramente con el envejecimiento en la capa endotelial, mientras que, en la capa muscular, el aumento de expresión de ER β fue claramente significativo. El tratamiento con E₂ no produjo cambios significativos en la expresión de ER β , ni en los animales SAMR ni en los SAMP, en ninguna de las capas del vaso. La ratio ER β /ER α mostró un aumento significativo de la isoforma β y una disminución de α con la edad y, principalmente, después del tratamiento estrogénico en las hembras SAMP. Si se relaciona el aumento de la ratio con los cambios observados en los niveles de NO y la expresión de eNOS y NOX-1 mediante una correlación con el coeficiente de Pierce, se observa una relación directa entre el aumento de la ratio y el aumento de expresión de la subunidad NOX1 de la NADPH-oxidasa, tanto en la capa endotelial como en la capa muscular del vaso. Este resultado sugiere que el aumento de ER β y la disminución de ER α ocurridos durante el envejecimiento tienen un efecto prooxidante en los vasos.

Los resultados de metilación global del DNA genómico mostraron un incremento significativo del porcentaje de metilación en los ratones SAMP en comparación con los SAMR. El tratamiento con E₂ incrementó significativamente la metilación global en los ratones jóvenes pero no provocó cambios en los animales viejos.

Teniendo en cuenta que la metilación en el DNA está involucrada en alteraciones en la expresión génica, se pensó que el aumento de metilación podría ser el responsable de una disminución en la expresión génica y proteica de ER α . Para comprobarlo, se procedió a estudiar la metilación específica del gen de ER α ya que se ha asociado a este ER como el responsable de la modulación de la transcripción de eNOS. Los datos mostraron un aumento de la metilación en la región específica del gen que codifica para el ER α en los grupos SAMR y SAMP tratados con estrógenos en comparación con los animales ovariectomizados. Debido a no encontrar diferencias entre los animales jóvenes y viejos podemos

decir que la metilación en el gen de ER α no es la responsable de la disminución de la expresión del receptor observada durante el envejecimiento.

DISCUSIÓN

La hipótesis central de esta tesis sugiere que el tipo de estrógeno y el envejecimiento condicionan los efectos protectores de los estrógenos sobre la función vascular. Debido a la gran cantidad de controversia generada entre los diferentes estudios que encontramos en la literatura, nuestros trabajos aportan nuevos datos para ayudar a clarificarla basados en dos de los principales puntos críticos de los estudios WHI y HERS citados anteriormente (el tipo de estrógeno utilizado y la edad de las participantes al iniciar el estudio). Para desarrollar y comprobar nuestra hipótesis hemos diseñado dos estudios. El primer estudio demuestra que los estrógenos presentes en la mezcla de estrógenos conjugados equinos (CEE) son menos eficaces que los estrógenos naturales de la mujer (estradiol y estrona) en modular la producción del óxido nítrico (NO) de las células endoteliales. El segundo trabajo describe como el envejecimiento afecta negativamente a la protección de los estrógenos en la función cardiovascular, principalmente mediante alteraciones en la producción de NO y en el estrés oxidativo.

En el primer estudio presentado, titulado **“Equine estrogens impair nitric oxide production and endothelial nitric oxide synthase transcription in human endothelial cells compared with the natural 17 β -estradiol”**, se comparó la eficacia de los estrógenos presentes en la mezcla de CEE y los estrógenos naturales de la mujer para modular la producción de NO y la transcripción de la eNOS. Los resultados demostraron que los CEE aisladamente no incrementan la producción de NO tan efectivamente como los estrógenos que se producen naturalmente en la mujer (el estradiol (E₂) y la estrona (E₁)). Aunque varios estudios hayan descrito la modulación de NO por estradiol, poco se conoce sobre el papel de otras moléculas estrogénicas en la modulación de la producción de NO. De acuerdo con nuestros datos, Jiménez et al. (68) demostraron como el tratamiento con E₂ produce un incremento notable en la producción de NO en células endoteliales humanas en cultivo, sugiriendo así un efecto cardioprotector por parte de los estrógenos. Del mismo modo, Sitges et al. (69) demostraron que la vasodilatación dependiente de endotelio observada en los anillos de arteria mamaria tratados con E₂ era debida a un incremento en la producción de NO mediada por la hormona y Collins et al. (70) describieron que el E₂ aumentaba la

vasodilatación dependiente de endotelio debido a un aumento de la biodisponibilidad del NO en anillos de arterias de conejos hembras.

Con respecto a otros tipos de estrógenos, pocos estudios han abordado los efectos de la estrona (E_1) en la función vascular y en la producción de NO. Confirmando nuestros resultados, estos estudios han descrito que la estrona aumenta la producción de NO por mecanismos genómicos y no genómicos muy similares a los descritos por el E_2 (71,72,73). Por otro lado, los efectos específicos de los CEE sobre la función vascular no están bien establecidos y son bastante controvertidos. Algunos estudios han descrito similitudes en los efectos beneficiosos generados por el E_2 y la mezcla de CEE en la función cardiovascular (74). Por el contrario, otros han descrito diferencias entre el E_2 y la mezcla de CEE en los mecanismos de modulación de la producción de NO en células endoteliales y en plaquetas porcinas (75). En total contraposición con nuestros datos, Wingrove et al. (76) compararon los efectos de los CEE y los estrógenos naturales en células humanas y los resultados obtenidos los estrógenos equinos incrementaron entre 1,5 a 2 veces más que el 17β - E_2 la expresión proteica de la eNOS en cultivos de células endoteliales coronarias humanas. Estos resultados tan dispares entre el estudio de Wingrove y el nuestro podrían ser debidos al uso de líneas celulares diferentes. Mientras que nuestros estudios han sido realizados con células de aorta, ellos han trabajado con células coronarias. Este hecho nos explica la gran complejidad de la señalización molecular de las hormonas estrogénicas, que no se basa simplemente en la unión del receptor y la hormona, sino que muchas otras circunstancias como el lecho vascular, la presencia o la falta de cofactores pueden influir en gran medida sobre los efectos observados.

La isoforma endotelial de la enzima óxido nítrico sintasa (eNOS o NOS3) es la principal productora de NO en el endotelio. Ha sido bien descrito que los estrógenos desempeñan un importante papel en su transcripción mediante la unión a sus receptores (ER) (28,29,31). Juntos, el estrógeno y los subtipos de ERs, forman un complejo que actúa como factor de transcripción al unirse a la región promotora del gen de eNOS. Cambios en la expresión o en la actividad de eNOS pueden alterar la producción de NO, y por tanto, es muy importante realizar experimentos de expresión y actividad para comprobarlo. En la misma línea que los resultados en la producción de NO, nuestros experimentos demuestran una disminución tanto en la expresión como en la actividad de eNOS por parte de los

CEE en comparación con los estrógenos naturales. Varios estudios *in vitro* han demostrado una correlación directa entre la activación de la eNOS y el tratamiento con E₂ (77,78,79). Además, Weiner et al. (80) demostraron un aumento en la biodisponibilidad del NO secundaria a la activación de eNOS en células endoteliales humanas tratadas con estrógenos.

La disminución en la expresión y en la actividad de la eNOS se asoció con una menor capacidad de los estrógenos equinos para activar la transcripción de la enzima. La transcripción del gen de eNOS va asociada a la unión del receptor de estrógeno (ER), que después de formar complejo con la hormona, se une a la región promotora del gen de eNOS y activa la transcripción. Sitges et al. (29) evaluaron el efecto a corto plazo del tratamiento con estradiol sobre la expresión génica de la eNOS y los ER en muestras de arterias mamarias internas en pacientes sometidas a cirugía de revascularización coronaria. Los autores encontraron una asociación significativa entre la eNOS y el ER α la cuál sugería que el ER α mediatiza la activación de la eNOS inducida por estrógenos tal y como muchos estudios *in vitro* han sugerido (81,82,83). Darblade et al. (28) estudiaron los efectos del E₂ en la producción de NO en aortas torácicas de ratones hembras ovariectomizadas. Los autores observaron que el E₂ producía un incremento significativo en la producción de NO comparado con el grupo placebo. Para estudiar la implicación de los ERs en la producción de NO, los autores trabajaron con ratones knockout (KO) para ER α y ER β . Los resultados mostraron que los ratones KO para ER β tratados con E₂ no experimentaban cambios en la producción de NO mientras que los KO para ER α disminuían significativamente los niveles de NO. Por tanto se asoció al ER α con la mediación de los efectos positivos del E₂ sobre la producción de NO basal. Del mismo modo, el estudio de Sumi e Ignarro (32) demostraron que la expresión del gen de eNOS está directamente regulada por el ER α .

Los estudios anteriores concuerdan con nuestros experimentos de “*reporter gene*”, los cuales miden la capacidad de transcripción en un determinado gen. Usando células COS7 transfectadas con el plásmido de eNOS/reporter gene y los plásmidos de ER α o ER β , hemos demostrado como los diferentes estrógenos poseen distinta eficacia en la transcripción de la eNOS. Inicialmente los resultados obtenidos confirman que el ER α tiene mayor capacidad que el ER β (de 2 o 3 veces mayor) para activar la transcripción de eNOS cuando se une al E₂ y a

la E₁. Además, hemos observado que las isoformas β de las distintas moléculas estrogénicas son más eficientes que las isoformas α en la activación de la transcripción génica. En la misma línea de nuestros resultados, Bahvnani et al. (84) demostraron que el 17β-E₂, seguido por las isoformas β de los CEE, equilina y equilenina, son más eficaces en aumentar la actividad transcripcional de los ERs (ERα y ERβ). Los autores también observaron como el ERα conseguía una mayor actividad transcripcional en comparación con ERβ, el cual podía incluso llegar a inhibir a ERα si aumentaba mucho su expresión.

Finalmente, quisimos investigar el curioso hecho que moléculas con estructuras tan parecidas puedan poseer eficacias tan distintas en la producción de NO. Para ello desarrollamos un estudio de simulación computacional para determinar los posibles cambios estructurales en el complejo ERα-estrógeno que podrían asociarse a las diferencias en la actividad transcripcional del receptor. Así descubrimos que la presencia de un grupo hidroxil (OH) en el carbono 17 (la única diferencia entre el 17β-E₂, la E₁ y el 17α-E₂) facilita la unión del estrógeno al receptor y aporta más estabilidad al complejo ER-hormona. De acuerdo con lo que podemos encontrar en la literatura, una mayor estabilidad en el complejo ER-hormona facilitaría su unión a la región promotora del DNA (85), que a su vez facilitaría el aumento en la transcripción de la eNOS. Pero, debido a que el grupo hidroxil está presente tanto en el 17β-E₂ como en las isoformas β de los estrógenos equinos pero no exhibe la misma eficacia transcripcional en los últimos, era necesario buscar otras diferencias en su estructura molecular que explicaran los diferentes efectos observados. Así encontramos que el grado de saturación del anillo B (la única diferencia entre el 17β-E₂, la 17β-eq y la 17β-eqn) puede estar involucrado en la actividad transcripcional de los ER. Un aumento en el grado de saturación en el anillo B aporta al complejo ER-hormona mayor hidrofobicidad y mayor flexibilidad que se traduce en un incremento de la transcripción. Al respecto, Hsieh et al (86) ya indicaron que los cambios en el grado de saturación del anillo B de las moléculas estrogénicas podrían afectar principalmente al grado de flexibilidad e hidrofobicidad de los ligandos. Estas características favorecerían al 17β-E₂ en comparación con la 17β-eq y la 17β-eqn. A diferencia de nuestro trabajo, su estudio se centra en la elasticidad de las diferentes hormonas como responsable de la afinidad con la que se unen al ER purificado. Nosotros, además, hemos estudiado cómo los cambios en el anillo B

de las moléculas afectan al grado de acidez del grupo fenol del anillo A de la molécula estrogénica. Un aumento en la acidez de la molécula cambia la conformación de la misma y no permite una unión óptima entre el estrógeno y el Glu353 del ER α . Se ha descrito que cambios en la configuración del ER en este sitio se traducen en una peor unión del complejo ER-hormona con diferentes moléculas correguladoras de la transcripción (86,87) y por tanto se podría esperar una disminución en la actividad transcripcional en el gen de la eNOS.

Los resultados de nuestro estudio dan soporte al metaanálisis desarrollado por Holtorf (53), en el que se describe una mayor efectividad sobre la función vasculoprotectora de las hormonas naturales o bioidénticas (aquéllas con la misma estructura que las hormonas naturales de la mujer) en comparación con los CEE. Holtorf observó que las hormonas bioidénticas poseían efectos fisiológicos diferentes en comparación con sus homólogas sintéticas. El estudio concluyó que las hormonas bioidénticas son el método más recomendable para las TH, ya que se asocian con menores riesgos de cáncer de mama y ECV en comparación con sus homólogas de origen sintético o animal (53).

En la misma línea de nuestro estudio, Dubey et al. (88) observaron que los CEE no son capaces de reproducir los mismos efectos que el E₂. En varios aspectos los CEE difieren de los efectos generados por los estrógenos naturales, por ejemplo: a nivel de selectividad hacia el ER o con la afinidad de unión del complejo a la región promotora del gen de eNOS. Basados en los estudios realizados en animales (88), los autores concluyeron que para observar los efectos vasoprotectores producidos por los estrógenos con la TH en mujeres postmenopáusicas se debe utilizar estradiol y no los CEE. De hecho, la hormona que disminuye durante la menopausia, el E₂, es el único estrógeno que no está presente en las TRH con CEE.

Nuestro estudio es el primero en demostrar que las moléculas estrogénicas de origen natural (las que se generan naturalmente en la mujer) poseen una mayor efectividad sobre la función cardioprotectora, en comparación con otras moléculas de origen animal o sintético. A pesar de que nuestros resultados demuestran que los CEE son menos eficaces en la producción de eNOS, aún no podemos sugerir totalmente que este hecho sea el responsable de los efectos negativos observados en los estudios clínicos WHI y HERS. Es importante reconocer las limitaciones del estudio realizado en cuanto a la necesidad de

determinar si la reducción observada en la actividad transcripcional de la eNOS por varios de los componentes de los CEE aislados tiene el mismo efecto que la suma de los efectos combinados de estos estrógenos, como ocurre en la mezcla de CEE. Creemos que a pesar de demostrar la baja eficacia de los CEE aisladamente en relación con los estrógenos naturales, las condiciones de nuestros experimentos no reflejan la realidad del WHI, ya que hemos estudiado el comportamiento de cada hormona por separado, mientras que el fármaco Premarin®, utilizado en el WHI, contiene una mezcla de CEE y de estrógenos naturales como el E₁ y el 17α-E₂. Por tanto, aunque nuestros resultados pueden darnos una idea de la menor eficacia de los CEE en comparación con los estrógenos naturales, no podemos extrapolarlos completamente a los efectos del Premarin® en mujeres menopáusicas. Para poder hacerlo será necesario realizar más estudios que comprueben los efectos de estos estrógenos combinados. Sería importante estudiar también como la combinación de los CEE afecta a la producción de NO. Principalmente se debería determinar cómo los estrógenos, equinos, que poseen menor eficacia, alteran la actividad de la estrona (un estrógeno con actividad de agonista total). Además, sería interesante estudiar como estos estrógenos interactúan con otras hormonas no estrogénicas (progestágenos y andrógenos) también presentes en el Premarin®, ya que éste ha sido otro de los puntos críticos importantes del estudio WHI.

En el segundo estudio presentado, titulado “**Aging negatively affects estrogens-mediated effects on nitric oxide bioavailability by shifting ERα/ERβ balance in female mice**”, demostramos como el envejecimiento afecta negativamente a los efectos protectores de los estrógenos en el sistema cardiovascular, particularmente a nivel de la producción de NO. Para conseguir nuestro objetivo hemos trabajado con un modelo murino de envejecimiento precoz, previamente caracterizado por nuestro grupo, que refleja lo más aproximadamente posible el proceso de menopausia en la mujer (89). En nuestros experimentos hemos comparado ratones sensibles al envejecimiento prematuro (Senescence Accelerated Mice Prone, SAMP) con sus controles resistentes al envejecimiento (Senescence Accelerated Mice Resistant, SAMR).

Sin embargo, el declive de la función ovárica en roedores se produce muy tarde, cuando estos animales son muy senescentes y están llegando al final de su vida (90) y por tanto no refleja el perfil fisiopatológico de la mujer menopáusica, cuya disminución en la producción de estrógenos ocurre a mediana edad. Por este motivo, los efectos cardiovasculares de los estrógenos en nuestro modelo murino se han determinado en hembras de mediana edad (6-7 meses) ovariectomizadas. Los resultados obtenidos demostraron que el envejecimiento juega un papel claramente negativo en el efecto protector de los estrógenos y tiene una relación directa con el aumento del riesgo cardiovascular.

Cuando analizamos la producción de NO obtenida con nuestros experimentos, observamos resultados similares entre los ratones ovariectomizados jóvenes (SAMR) y los viejos (SAMP), tanto con el método de la nitrosilación intracelular del fluorocromo sensible al NO (DAF2-DA) como con la cuantificación de los metabolitos de NO en el plasma (NO₂/NO₃). Sin embargo, ambos experimentos demuestran que el tratamiento con estradiol (E₂) incrementa significativamente la producción de NO entre los ratones jóvenes tratados en comparación con los OVX, mientras que no provoca ningún efecto entre los animales SAMP. Estos resultados sugieren que el envejecimiento altera los efectos de los estrógenos y por tanto afecta negativamente a la salud vascular de las mujeres, ya que la disminución en la producción de NO se ha descrito como uno de los puntos clave para el inicio de la disfunción endotelial (10). Anteriores resultados de nuestro grupo, en los que estudiamos el efecto del envejecimiento en la producción de NO comparando hembras SAMR y SAMP intactas, demuestran que el envejecimiento, *per se*, sin la ovariectomía, disminuye la biodisponibilidad del NO en hembras SAMP en comparación con las SAMR (90). En la misma línea que nuestros resultados, estudios anteriores realizados en ratas y ratones de edad avanzada mostraron un descenso marcado de la producción de NO (91,92,93). Estudios funcionales realizados por nuestro grupo en ratones SAMR y SAMP concluyeron que el tratamiento con estrógenos conseguía restaurar la producción de NO, en ratones ovariectomizados, a niveles similares a los de los ratones intactos en el grupo SAMR. En cambio, en el grupo SAMP, no se observaba ninguna mejora en la función vascular con la TH con estrógenos (94).

Los cambios en la expresión en la isoforma endotelial de la enzima óxido nítrico sintasa (eNOS), podrían justificar alteraciones en la producción de NO. Por este motivo hemos estudiado la expresión de eNOS a nivel proteico, mediante inmunofluorescencia (IF) y a nivel de mRNA, con PCR a tiempo real. Así se pueden detectar alteraciones en dos momentos diferentes, el mRNA mostrará los resultados de la transcripción del gen de eNOS, mientras que la inmunofluorescencia será el resultado de la traducción del mRNA a proteína. Similares a los resultados de producción de NO, la expresión de eNOS, tanto a nivel de proteína como de mRNA, no presentó diferencias entre las hembras jóvenes y viejas ovariectomizadas. Sin embargo, la terapia con E₂ consiguió incrementar la expresión en los ratones jóvenes en comparación con los OVX, mientras que, en el grupo SAMP, no se observaron diferencias entre hembras ovariectomizadas no tratadas y hembras tratadas con E₂. De nuevo observamos como el E₂ no produce ningún efecto en animales viejos mientras que claramente aumenta la expresión de eNOS en la aorta de los animales jóvenes. Varios estudios han demostrado anteriormente, que los estrógenos incrementan los niveles de mRNA de eNOS en el endotelio, tanto en células endoteliales en cultivo (95,96) como en muestras de tejido de hembras tratadas con estrógenos (97). De acuerdo con nuestros resultados, varios estudios mostraron que la falta de hormonas durante el envejecimiento disminuía la producción de NO y la expresión de eNOS (98,99,100). Sin embargo, poco se conoce sobre el modo en el que el envejecimiento altera los efectos del estrógeno sobre la eNOS.

Las diferencias observadas en la expresión de eNOS concuerdan con el aumento de producción de NO en los ratones SAMR tratados con hormonas y la falta de respuesta a la terapia estrogénica de las SAMP. Pero el envejecimiento es un proceso complejo y otros factores relacionados con él podrían estar afectando la biodisponibilidad final de NO observada en las hembras viejas. Se sabe que con la edad aumenta el estrés oxidativo y, consecuentemente, la producción de las especies reactivas del oxígeno (ROS). Una de las ROS más importantes que está aumentada en el envejecimiento es el anión superóxido (O₂⁻) producido en gran medida por la enzima NADPH-oxidasa. El O₂⁻ interacciona rápidamente con el NO y lo degrada dando lugar al peróxido de nitrito (ONOO⁻). El aumento de ONOO⁻ en detrimento de NO resulta en un aumento de la disfunción endotelial y del riesgo cardiovascular (101,102). Para estudiar los efectos del envejecimiento y del

estrógeno en los cambios del estrés oxidativo en hembras, decidimos evaluar la actividad y la expresión de la enzima NADPH-oxidasa. De acuerdo con nuestra hipótesis sobre el efecto protector de los estrógenos en animales jóvenes, observamos como el tratamiento con E₂ tiene un papel antioxidante ya que disminuyó significativamente la actividad de la NADPH-oxidasa en el grupo SAMR-OVX+ E₂ en comparación con los SAMR-OVX. Curiosamente, el E₂ ejerció un efecto claramente negativo en los animales viejos, no solo no demostró ningún efecto protector en las hembras viejas (SAMP), sino que el tratamiento con E₂ incrementó significativamente la actividad de la enzima en comparación con los SAMP-OVX, adoptando un papel claramente prooxidante. Estos datos sugieren que el E₂ podría ser perjudicial en mujeres de edad avanzada. Diferentes estudios en ratas han demostrado anteriormente que el tratamiento con E₂ en animales de edad avanzada empeora la función vascular (103,104,105). En estos estudios, el tratamiento con E₂ en los animales ovariectomizados no produjo ningún beneficio en la función cardiovascular ni consiguió revertir los efectos de la ovariectomía. Otro estudio muestra como la producción de O₂⁻ disminuyó en aortas de ratas ovariectomizadas jóvenes tratadas con estrógenos en comparación con las no tratadas (106).

Al observar cambios en la actividad de la enzima, decidimos estudiar la expresión de mRNA de las diferentes subunidades de la NADPH-oxidasa (NOX1, p47phox y p22phox) para detectar posibles alteraciones en la transcripción que justificaran los cambios en la actividad. Los resultados de expresión de la subunidad NOX1 se correlacionan con la actividad de la enzima. Es decir, el tratamiento con estrógenos fue capaz de disminuir la expresión de NOX1 en los animales SAMR en comparación con los SAMR-OVX, mientras que en los ratones SAMP se observó un aumento significativo de la NOX1 con el tratamiento estrogénico. En cambio, las subunidades p47phox y p22phox no mostraron ninguna diferencia entre los grupos SAMR y SAMP ovariectomizados así como tampoco presentaron diferencias con el tratamiento con estrógenos. Muller et al. (107) demostraron que la actividad de la NADPH-oxidasa y la expresión de sus subunidades catalíticas (NOX1 y NOX2) incrementaban notablemente en aortas de ratas de edad avanzada espontáneamente hipertensas. Los autores del estudio concluyeron que las isoformas NOX son las responsables de cambios en la actividad de la NADPH-oxidasa que afectan a la función vascular (107). En otro

estudio con ratas ovariectomizadas, la falta de estrógenos también incrementó la actividad de la enzima a través de las subunidades NOX1 y NOX2 (108).

Como se ha comentado en el primer artículo discutido, los receptores de estrógenos alfa y beta ($ER\alpha$ y $ER\beta$) están involucrados en uno de los mecanismos mejor descritos por el que los estrógenos modulan la producción de NO. El complejo ER-hormona actúa como un factor de transcripción uniéndose a la región promotora del gen de eNOS (32). Estudiar la expresión de los ER nos permite encontrar posibles cambios que justifiquen las diferencias observadas en la expresión de eNOS y NADPH-oxidasa entre grupos.

Nuestros datos muestran que la expresión de $ER\alpha$ es mayor en los animales jóvenes que en los viejos, tanto a nivel de endotelio como en la capa muscular. El tratamiento con E_2 disminuyó significativamente la expresión de $ER\alpha$ en SAMR y SAMP en todas las capas vasculares. En cambio, $ER\beta$ mostró un ligero incremento en las hembras viejas ovariectomizadas en la capa endotelial, mientras que en la capa muscular el aumento de expresión fue claramente significativo en los SAMP. El tratamiento con E_2 aumentó significativamente la expresión de $ER\beta$ en las hembras SAMP en comparación con las SAMR en el endotelio y en la capa muscular. La ratio $ER\beta/ER\alpha$ mostró un aumento significativo con la edad, pero sobretodo con el tratamiento estrogénico, que demuestra una correlación directa con el aumento observado en la expresión de la subunidad NOX1, según el análisis con coeficientes de Pierce. Estos resultados sugieren una clara tendencia prooxidante de los estrógenos durante el envejecimiento que se asocia al aumento de la expresión de $ER\beta$. El estudio muestra como el envejecimiento provoca un descenso en la actividad $ER\alpha$ que se asocia con un aumento en la disfunción endotelial (109). Bhavnani et al. (84) ya demostraron que el aumento de concentración de $ER\beta$ podía traducirse con una disminución de la actividad transcripcional de $ER\alpha$ en general ya que podía llegar a inhibir su expresión. Para complementar nuestros resultados de expresión, serían recomendables estudios de actividad de los ER para relacionar las implicaciones de la disminución de la expresión de $ER\alpha$ y el aumento de $ER\beta$ en las vías del NO/ O_2^- . Los estudios publicados hasta la fecha solo muestran datos de como una menor o nula actividad del $ER\beta$ no afecta a la función cardiovascular (110), pero no hay estudios sobre las implicaciones de un aumento de su

expresión en los vasos. Son necesarios más estudios para conocer los efectos producidos por los cambios en la expresión de ER α y ER β así como su importancia en la protección de la función cardiovascular.

Uno de los mecanismos por los que el envejecimiento puede jugar un papel negativo en la salud vascular y además puede provocar las alteraciones observadas en los efectos de los estrógenos es la metilación del DNA (111), un proceso epigenético que participa en la regulación de la expresión génica de dos maneras: directamente, al impedir la unión de factores de transcripción e indirectamente propiciando la estructura "cerrada" de la cromatina. El DNA presenta regiones de 1000-1500 pares de bases ricas en dinucleótidos CpG ("islas CpG"), que son reconocidas por las enzimas DNA-metiltransferasas, las cuáles, durante la replicación del DNA metilan el carbono 5 de las citosinas de la cadena recién sintetizada, manteniéndose así la metilación en las siguientes replications. En general, se considera que la metilación es un proceso unidireccional, es decir, cuando una secuencia CpG adquiere metilación *de novo*, esta modificación se hace estable y es heredada como un patrón de metilación clonal (112). Recientes estudios han demostrado que la metilación va asociada al envejecimiento y que sus efectos conllevan terribles consecuencias para diferentes funciones del organismo (112,113). La metilación, por tanto, puede ser la responsable de algunos de los cambios observados en la expresión de eNOS, en la expresión de los ER y en la de la NADPH-oxidasa. Nuestros experimentos de metilación global revelaron que las hembras viejas tienen un mayor porcentaje de DNA metilado en sus células. Pero solo con estos resultados no podemos asociar la metilación del DNA con la pérdida de efectos beneficiosos del estrógeno durante el envejecimiento.

Por esto, después de observar cambios importantes en los experimentos de metilación global, decidimos estudiar la metilación específica en el gen que codifica al ER α para determinar si los cambios observados a nivel global influenciaban a la transcripción de este gen y contribuían en el cambio de la ratio ER β /ER α . Estudios en humanos han demostrado que durante el envejecimiento, el aumento de la metilación va asociado a la inactivación del gen ER α y se traduce en un aumento de la aterosclerosis y la disfunción vascular (113). En células de aorta humanas en cultivo se ha observado como la metilación en

general y la del gen ER α en particular, asociadas con la edad, aumentan la proliferación de las SMCs incrementando el riesgo de aparición de enfermedad vascular e inhibiendo el efecto regulador de los estrógenos (114). Otro estudio citado anteriormente también relacionó la metilación en el gen de ER α con una inactivación del mismo dando lugar a un aumento de la disfunción endotelial (1). Sin embargo, los datos de metilación específica en el gen de ER α no mostraron diferencias debidas al envejecimiento, las hembras SAMR y SAMP presentaron porcentajes similares de metilación. En cambio, el tratamiento con estrógenos provocó un incremento muy marcado de la metilación específica tanto en animales jóvenes como en viejos en comparación con el grupo OVX. Con estos resultados podemos decir que los cambios observados justifican la disminución de la expresión del ER α debida al tratamiento con estrógenos, pero no explican los cambios de expresión debidos a la edad. Otros mecanismos, además de la metilación, podrían estar involucrados en la expresión alterada de ER α y ER β durante el envejecimiento. Por ejemplo, hay datos en la literatura que muestran como un aumento en el estrés oxidativo presente en las células endoteliales envejecidas disminuye la expresión de ER α mediante el aumento de la proliferación y la migración de las SMC (115).

En conjunto, los resultados presentados sugieren que el envejecimiento juega un papel claramente negativo en la salud cardiovascular y en los efectos protectores de los estrógenos. Nuestros datos demuestran que los estrógenos son claramente beneficiosos para la salud cardiovascular en los animales jóvenes, especialmente a través del aumento de producción de NO. En cambio, los animales de edad avanzada no muestran ningún beneficio después de someterse a la terapia estrogénica. En la misma línea que la *Timing Hypothesis*, que sugiere que los beneficios en el sistema cardiovascular mediados por los estrógenos sólo se observan si el tratamiento es anterior al establecimiento de los efectos negativos del envejecimiento o de la enfermedad cardiovascular en los vasos (58), nuestros datos han demostrado que, en animales viejos, la terapia hormonal con estrógenos, lejos de aportar ningún beneficio puede llegar a ser perjudicial. Es de remarcar el hecho que tales afectaciones negativas del envejecimiento sobre la función vascular se reconocieron en mayor medida en cepas de ratas o ratones viejos que habían sido ovariectomizados y tratados con estrógenos. Esto se ha

identificado, tanto en nuestro estudio, como en los mencionados anteriormente (103,104,105,106).

Viendo el efecto de los estrógenos en las hembras de edad avanzada, podemos sugerir que el envejecimiento altera el efecto de los estrógenos y para optimizar las TH, éstas deberían instaurarse cuando las mujeres se encuentren al inicio de la menopausia, todavía no presenten daño cardiovascular severo y su organismo no lleve mucho tiempo sin la presencia de hormonas. A pesar de que nuestros resultados sugirieran que la TH tiene efectos negativos para la función vascular en mujeres postmenopáusicas, sería necesario realizar más estudios para determinar exactamente los mecanismos por los que los estrógenos pierden sus efectos protectores con el envejecimiento y estudiar diferentes grupos de edad para conocer en qué momento exacto la protección comienza a perderse en las mujeres. De este modo podrían investigarse mejores estrategias terapéuticas para potenciar la salud en el sistema cardiovascular de las mujeres en la menopausia.

Mencionábamos al inicio de esta discusión que los dos artículos que forman el cuerpo de esta tesis doctoral pretenden aclarar la gran controversia creada por los grandes estudios clínicos WHI y HERS. Podemos decir que el primer trabajo hace referencia al primero de los puntos críticos de los estudios clínicos (el tipo de estrógeno utilizado), en todos los casos se hallaron efectos positivos de la TH sobre la función vascular de mujeres postmenopáusicas, extrapolando los resultados en aquellos análisis referidos a animales. Si comparamos la efectividad de las hormonas naturales de la mujer con las derivadas de animales o las sintéticas, tanto desde nuestro estudio como desde los anteriores estudios comentados (46,51,53), corroboramos una mayor efectividad de los compuestos bioidénticos, es decir, las hormonas que pueden hallarse naturalmente en circulación en la mujer. De esta manera, nuestros resultados se contraponen a los de los estudios WHI y HERS. De todas formas, no podemos asegurar que el tipo de estrógeno sea el único responsable de todas las diferencias aparecidas en los estudios discutidos ni de los resultados negativos de los estudios WHI y HERS. Por tanto, podemos sugerir que las diferencias en los resultados pueden asociarse a una combinación de todos los puntos críticos analizados del WHI y del HERS.

Por esta razón era importante estudiar otro de los puntos críticos clave de los estudios clínicos, la edad de las mujeres al iniciar el tratamiento, y es lo que

hemos hecho con el segundo trabajo de esta tesis: en todos los estudios se hallaron efectos significativos del envejecimiento sobre la función vascular. Hemos comprobado que estos hallazgos pudieron asociarse a la respuesta al tratamiento con estrógenos en los animales viejos. Si consideramos las diversas funciones fisiológicas valoradas, el resultado siempre fue el mismo, disfunción vascular en hembras de edad avanzada con pérdida de estrógeno ovárico. Una disfunción que se mostró reversible ante la administración de hormonas en los animales jóvenes pero no en los viejos.

Interpretando nuestros datos, podemos asociar fácilmente la edad de las pacientes como una de las causas de los resultados controvertidos entre los estudios clínicos y experimentales debido a los ineludibles y significativos cambios en la función vascular que el envejecimiento conlleva en las mujeres postmenopáusicas. Por tanto, podemos concluir que nuestros resultados determinan que la edad y el tipo de estrógeno utilizado son variables muy importantes a tener en cuenta cuando se instaure TH en mujeres menopáusicas. Pero a pesar de nuestras interpretaciones, todavía es necesaria la realización de muchos más estudios para conseguir prescribir una TH exitosa.

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en los estudios presentados en esta tesis nos permiten formular las siguientes conclusiones:

1. Los estrógenos equinos (CEE) no modulan la producción de NO tan efectivamente como los estrógenos naturales de la mujer, por presentar menor capacidad para activar la transcripción y la actividad de eNOS.
2. La presencia de un grupo hidroxil en el carbono 17 y el grado de saturación del anillo B de la molécula estrogénica aportan más estabilidad al complejo receptor-hormona, además de provocar cambios en la hidrofobicidad y en la acidez del complejo receptor-hormona, hecho que facilitaría su unión al DNA y/o a los diferentes cofactores necesarios para la transcripción.
3. El envejecimiento contribuye a la pérdida de los efectos beneficiosos de los estrógenos en la pared vascular. Por un lado disminuye el efecto de "*up-regulation*" de los estrógenos en la producción de NO y en la expresión de eNOS. Por otro lado, modifica el mecanismo de modulación del estrés oxidativo transformando los estrógenos en sustancias prooxidantes.
4. El envejecimiento aumenta la ratio ER β /ER α después del tratamiento con estrógenos. Este aumento está directamente relacionado con un incremento de los efectos prooxidantes en el vaso que podrían justificar la pérdida de los efectos beneficiosos de los estrógenos.
5. El envejecimiento aumenta significativamente el porcentaje de metilación global pero no afecta a la metilación específica del gen ER α . Por tanto, no podemos asociar los cambios en la metilación del DNA con la disminución observada en la expresión del gen ER α con el envejecimiento.

BIBLIOGRAFÍA

- (1). Lerner DJ, Kannel WB. Patterns of coronary heart disease morbidity and mortality in the sexes: a 26-year follow-up of the Framingham population. *Am Heart J.* 1986; 111(2): 383-90.
- (2). Staessen J, Bulpitt CJ, Fagard R, Lijnen P, Amery A. The influence of menopause on blood pressure. *J Hum Hypertens.* 1989; 3 (6): 427-33.
- (3). Argimon JM, Jiménez J. *Métodos de Investigación Clínica y Epidemiológica.* 3ª edición. Madrid: Elsevier. 2004; 278-88.
- (4). Dantas AP, Scivoletto R, Fortes ZB, Nigro D, Carvalho MH. Influence of female sex hormones on endothelium-derived vasoconstrictor prostanoid generation in microvessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1999; 34(4 Pt 2): 914-9.
- (5). Taddei S, Virdis A, Ghiadoni L, Mattei P, Sudano I, Bernini G, et al. Menopause is associated with endothelial dysfunction in women. *Hypertension.* 1996; 28 (4): 576-82.
- (6). Tostes RC, Nigro D, Fortes ZB, Carvalho MH. Effects of estrogen on the vascular system. *Braz J Med Biol Res.* 2003; 36 (9): 1143-58.
- (7). Virdis A, Ghiadoni L, Pinto S, Lombardo M, Petraglia F, Gennazzani A, et al. Mechanisms responsible for endothelial dysfunction associated with acute estrogen deprivation in normotensive women. *Circulation.* 2000; 101 (19): 2258-63.
- (8). Sulistiyani, Adelman SJ, Chandrasekaran A, Jayo J, St Clair RW. Effect of 17 alpha-dihydroequilin sulfates, a conjugated equine estrogen, and ethynylestradiol on atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1995; 15 (7): 837-46.
- (9). Yetik-Anacak G, Catravas JD. Nitric oxide and the endothelium: History and impact on cardiovascular disease. *Vascular Pharmacology.* 2006; 45: 268-276.
- (10). Schwartz, BD, Economides C, Mayeda GS, Burstein S and Kloner RA. The endothelial cell in health and disease: its function, dysfunction, measurement and therapy. *International Journal of Impotence Research.* 2010; 22: 77-90.
- (11). Mendelsohn, M.E. Estrogen actions in the cardiovascular system. *Climacteric.* 2009; 12(Suppl 1): 18-21.
- (12). Sobrino, A, Oviedo, P.J, Novella, S, Laguna-Fernandez, A, Bueno, C, García-Pérez, M.A, Tarin, J.J, Cano, A, Hermenegildo, C. Estradiol Selectively stimulates endothelial prostacyclin production through estrogen receptor- α . *J. Mol. Endocrinol.* 2010; 44: 237-246.

- (13). Endemann DH, Schiffrin EL. Endothelial Dysfunction. *Journal of American Society of Nephrology*. 2004; 15: 1983-1992.
- (14). Chambliss KL, Shaul PW. Estrogen modulation of endothelial nitric oxide synthase. *Endocr Rev*. 2002; 23(5): 665-86. Review.
- (15). Kline ER, Kleinhenz DJ, Liang B, Dikalov S, Guidot DM, Hart CM, Jones DP, Sutliff RL. Vascular oxidative stress and nitric oxide depletion in HIV-1 transgenic rats are reversed by glutathione restoration. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2008; 294(6): H2792-804.
- (16). Bulhak AA, Jung C, Ostenson CG, Lundberg JO, Sjöquist PO, Pernow J. PPAR-alpha activation protects the type 2 diabetic myocardium against ischemia-reperfusion injury: involvement of the PI3-Kinase/Akt and NO pathway. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2009; 296(3): H719-27.
- (17). Nakazono K, Watanabe N, Matsuno K, Sasaki J, Sato T, Inoue M. Does superoxide underlie the pathogenesis of hypertension? *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991; 15; 88(22):10045-8.
- (18). Ohara Y, Peterson TE, Harrison DG. Hypercholesterolemia increases endothelial superoxide anion production. *J Clin Invest*. 1993; 91(6):2546-51.
- (19). Panza JA. Endothelial dysfunction in essential hypertension. *Clin Cardiol*. 1997; 20(11 Suppl 2): II-26-33. Review.
- (20). Meyer MR, Haas E, Barton M. Need for research on estrogen receptor function: Importance for postmenopausal hormone therapy and atherosclerosis. *Gender Medicine*. 2008; 5, Suppl.A: S19-S31.
- (21). Murano T, Izumi S, Kika G, Haque SF, Okuwaki S, Mori A, et al. Impact of menopause on lipid and bone metabolism and effect of hormone replacement therapy. *Tokai J Exp Clin Med*. 2003; 28(3): 109-19.
- (22). Taddei S, Salvetti A. Pathogenetic factors in hypertension. Endothelial factors. *Clin Exp Hypertens*. 1996; 18(3-4): 323-35. Review.
- (23). Sitges M, Heras M, Roig E, Durán M, Masotti M, Zurbano MJ, Roqué M, Sanz G. Acute and mid-term combined hormone replacement therapy improves endothelial function in post-menopausal women with angina and angiographically normal coronary arteries. *Eur Heart J*. 2001; 22(22): 2116-24.
- (24). Dantas AP, Scivoletto R, Fortes ZB, Nigro D, Carvalho MH. Influence of female sex hormones on endothelium-derived vasoconstrictor prostanoid generation

in microvessels of spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 1999; 34(4 Pt 2): 914-9.

(25). Dantas AP, Tostes RC, Fortes ZB, Costa SG, Nigro D, Carvalho MH. In vivo evidence for antioxidant potential of estrogen in microvessels of female spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2002; 39(2 Pt 2): 405-11.

(26). Viridis A, Ghiadoni L, Sudano I, Buralli S, Salvetti G, Taddei S, Salvetti A. Endothelial function in hypertension: role of gender. *J Hypertens Suppl*. 2002; 20(2): S11-6.

(27). Roqué M, Heras M, Roig E, Masotti M, Rigol M, Betriu A, Balasch J, Sanz G. Short-term effects of transdermal estrogen replacement therapy on coronary vascular reactivity in postmenopausal women with angina pectoris and normal results on coronary angiograms. *J Am Coll Cardiol*. 1998; 31(1): 139-43.

(28). Darblade B, Pendaries C, Krust A, Dupont S, Fouque MJ, Rami J, et al. Estradiol alters nitric oxide production in the mouse aorta through the alpha, but not beta-estrogen receptor. *Circ Res*. 2002; 90(4): 413-9.

(29). Sitges M, Leivas A, Heras M, Ferrer E, Roqué M, Viles D, Roig E, Rivera F, Sanz G. Short-term transdermal estradiol enhances nitric oxide synthase III and estrogen receptor mRNA expression in arteries of women with coronary artery disease. *Int J Cardiol*. 2005; 105(1): 74-9.

(30). Huang A, Sun D, Kaley G, Koller A. Estrogen maintains nitric oxide synthesis in arterioles of female hypertensive rats. *Hypertension*. 1997; 29(6): 1351-6.

(31). Fitts JM, Klein RM, Powers CA. Tamoxifen Regulation of Bone Growth and Endocrine Function in the Ovariectomized Rat: Discrimination of Responses Involving Estrogen Receptor α /Estrogen Receptor β , G Protein-Coupled Estrogen Receptor, or Estrogen-Related Receptor δ Using Fulvestrant (ICI 182780). *J Pharmacol Exp Ther*. 2011; 338(1): 246-54.

(32). Sumi D, Ignarro LJ. Estrogen-related receptor alpha 1 up-regulates endothelial nitric oxide synthase expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100: 14451-14456.

(33). Mendelsohn ME, Karas RH. Rapid progress of non-nuclear estrogen receptor signaling. *The Journal of Clinical Investigation*. 2010; 120 (7): 2277-2281.

(34). Anderson HV. Estrogen therapy, atherosclerosis, and clinical cardiovascular events. *Circulation*. 1996; 94(8): 1809-11.

- (35). Shwaery GT, Vita JA, Keaney JF Jr. Antioxidant protection of LDL by physiological concentrations of 17 beta-estradiol. Requirement for estradiol modification. *Circulation*. 1997; 95(6): 1378-85.
- (36). Kim YD, Chen B, Beauregard J, Kouretas P, Thomas G, Farhat MY, Myers AK, Lees DE. 17 beta-Estradiol prevents dysfunction of canine coronary endothelium and myocardium and reperfusion arrhythmias after brief ischemia/reperfusion. *Circulation*. 1996; 94(11): 2901-8.
- (37). Xing D, Nozell S, Chen YF, Hage F, Oparil S. Estrogen and mechanisms of vascular protection. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2009; 29 (3): 289-95.
- (38). Barton M, Meyer MR, Haas E. Hormone replacement therapy and atherosclerosis in postmenopausal women: does aging limit therapeutic benefits? *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27(8): 1669-72.
- (39). Grodstein F, Manson JE, Stampfer MJ. Postmenopausal hormone use and secondary prevention of coronary events in the nurses' health study. A prospective, observational study. *Ann Intern Med*. 2001; 135 (1): 1-8.
- (40). Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, et al. 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*. 1998; 280(7): 605-13
- (41). Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al.; Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2002; 288(3): 321-33.
- (42). Stefanik, M.L. Postmenopausal hormone therapy and cardiovascular disease in women. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*. 2010; 20(6): 451-8.
- (43). Austin PC, Mamdani MM, Tu K, Jaakkimainen L. Prescriptions for estrogen replacement therapy in Ontario before and after publication of the Women's Health Initiative Study. *JAMA*. 2003; 289(24): 3241-2.
- (44). Banks E, Reeves G, Beral V, Bull D, Crossley B, Simmonds M, Hilton E, Bailey S, Barrett N, Briers P, English R, Jackson A, Kutt E, Lavelle J, Rockall L, Wallis MG, Wilson M, Patnick J. Impact of use of hormone replacement therapy on false positive recall in the NHS breast screening programme: results from the Million Women Study. *BMJ*. 2004; 328(7451): 1291-2.

- (45). Faber A, Bouvy, ML, Loskamp L, van de Berg, PB, Egberts, T.C.G, de Jong-van den Berg L.T.W. Dramatic change in prescribing of hormone replacement therapy in the Netherlands alters publication of the Million Women Study: a follow-up study. *British Journal of Clinical Pharmacology*. 2005; 60 (6): 641-647.
- (46). Muraca ME, Evans MF. Hormone replacement therapy: the final frontier. *Can Fam Physician*. 2003; 49:157-9.
- (47). Aupperlee, M.D., Smith, K.T., Kariagina, A. and Haslam, S.Z. Differential hormonal regulation and function of progesterone receptors isoforms in normal adult mouse mammary gland. *Endocrinology*. 2005; 146: 3577-48.
- (48). Scarpin, K.M, Graham, J.D., Mote, P, Clarke, C.L. Progesterone action in human tissues: regulation by progesterone receptor (PR) isoform expression, nuclear positioning and coregulator expression. *Nuclear Receptor Signaling*. 2009; 7: 1-13.
- (49). Anderson GL, Limacher M, Assaf AR, Bassford T, Beresford SA, Black H, Bonds D, Brunner R, Brzyski R, Caan B, Chlebowski R, Curb D, Gass M, Hays J, Heiss G, Hendrix S, Howard BV, Hsia J, Hubbell A, Jackson R, Johnson KC, Judd H, Kotchen JM, Kuller L, LaCroix AZ, Lane D, Langer RD, Lasser N, Lewis CE, Manson J, Margolis K, Ockene J, O'Sullivan MJ, Phillips L, Prentice RL, Ritenbaugh C, Robbins J, Rossouw JE, Sarto G, Stefanick ML, Van Horn L, Wactawski-Wende J, Wallace R, Wassertheil-Smoller S; Women's Health Initiative Steering Committee. Effects of conjugated equine estrogen in postmenopausal women with hysterectomy: the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 2004; 291(14): 1701-12.
- (50). Tolbert T, Oparil S. Cardiovascular effects of estrogen. *Am J Hypertens*. 2001; 14(6 Pt 2): 186S-193S
- (51). Haynes MP, Russell KS, Bender JR. Molecular mechanisms of estrogen actions on the vasculature. *J Nucl Cardiol*. 2000; 7(5): 500-8.
- (52). Hermenegildo C, Oviedo PJ, Cano A. Cyclooxygenases regulation by estradiol on endothelium. *Curr Pharm Des*. 2006;12(2): 205-15.
- (53). Holtorf K. The bioidentical hormone debate: are bioidentical hormones (estradiol, estriol, and progesterone) safer or more efficacious than commonly used synthetic versions in hormone replacement therapy? *Postgrad Med*. 2009; 121(1): 73-85.

- (54). Wassmann S, Laufs U, Stamenkovic D, Linz W, Stasch JP, Ahlbory K, Rösen R, Böhm M, Nickenig G. Raloxifene improves endothelial dysfunction in hypertension by reduced oxidative stress and enhanced nitric oxide production. *Circulation*. 2002; 105(17): 2083-91.
- (55). Simoncini T, Genazzani AR, Liao JK. Nongenomic mechanisms of endothelial nitric oxide synthase activation by the selective estrogen receptor modulator raloxifene. *Circulation*. 2002; 105(11): 1368-73.
- (56). Barrett-Connor E, Mosca L, Collins P, Geiger MJ, Grady D, Kornitzer M, et al.; Raloxifene Use for The Heart (RUTH) Trial Investigators. Effects of raloxifene on cardiovascular events and breast cancer in postmenopausal women. *N Engl J Med*. 2006; 355(2): 125-37.
- (57). Roqué M, Sitges M, Sala J, Delgado V, Morales M, Marrugat J, Vila J, Subirana I, Tàssies D, Reverter JC, Castro M, Duran M. Effects of raloxifene on endothelial function and hemostasis in women with ischemic heart disease. *Rev Esp Cardiol*. 2011; 64(7): 572-8.
- (58). Harman SM. Estrogen replacement in menopausal women: recent and current prospective studies, the WHI and the KEEPERS. *Gend Med*. 2006; 3(4): 254-69.
- (59). Rossouw JE, Prentice RL, Manson JE, Wu L, Barad D, Barnabei VM, Ko M, LaCroix AZ, Margolis KL, Stefanick ML. Postmenopausal hormone therapy and risk of cardiovascular disease by age and years since menopause. *JAMA*. 2007; 297(13): 1465-77.
- (60). Erusalimsky JD. Vascular endothelial senescence: from mechanisms to pathophysiology. *J Appl Physiol*. 2009; 106(1): 326-32.
- (61). Cano, A, Hermenegildo, C, Oviedo, P, Tarin, J.J. The risk for cardiovascular disease in women: from estrogens to selective estrogen receptor modulators. *Front. Biosci*. 2007; 12: 49–68.
- (62). Dantas, A.P, Sandberg, K. Does 2-methoxyestradiol represent the new and improved hormone replacement therapy for atherosclerosis? *Circ. Res*. 2006. 99: 234–237.
- (63). Hongo K, Nakagomi T, Kassell NF, Sasaki T, Lehman M, Vollmer DG, et al. Effects of aging and hypertension on endothelium-dependent vascular relaxation in rat carotid artery. *Stroke*. 1988; 19(7): 892-7.

- (64). LeBlanc AJ, Reyes R, Kang LS, Dailey RA, Stallone JN, Moningka NC, et al. Estrogen replacement restores flow-induced vasodilation in coronary arterioles of aged and ovariectomized rats. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2009; 297(6): R1713-23.
- (65). Ferrari AU, Radaelli A, Centola M. Invited review: aging and the cardiovascular system. *J Appl Physiol*. 2003; 95(6): 2591-7.
- (66). Sherwood A, Bower JK, McFetridge-Durdle J, Blumenthal JA, Newby LK, Hinderliter AL. Age moderates the short-term effects of transdermal 17beta-estradiol on endothelium-dependent vascular function in postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2007; 27(8): 1782-7.
- (67). Manson JE, Allison MA, Rossouw JE, Carr JJ, Langer RD, Hsia J, Kuller LH, Cochrane BB, Hunt JR, Ludlam SE, Pettinger MB, Gass M, Margolis KL, Nathan L, Ockene JK, Prentice RL, Robbins J, Stefanick ML; WHI and WHI-CACS Investigators. Estrogen Therapy and Coronary-Artery Calcification. *The New England Journal of Medicine*. 2007; 356(25): 2591-602.
- (68). Jiménez GM, Ceja Ochoa I, Hernández Pérez A, Escalante Acosta B. 17-beta estradiol induces type III nitric oxide synthase expression in cultured endothelial cells. *Arch Cardiol Mex*. 2001; 71(2): 114-20.
- (69). Sitges M, Roqué M, Solanes N, Rigol M, Heras M, Roig E, Pomar JL, Jiménez W, Sanz G. El estradiol potencia la vasodilatación dependiente del endotelio a través del óxido nítrico. *Rev. Esp Cardiol*. 2001; 54: 990-996.
- (70). Collins P, Shay J, Jiang C, Moss J. Nitric oxide accounts for dose-dependent estrogen-mediated coronary relaxation after acute estrogen withdrawal. *Circulation*. 1994; 90: 1964-8.
- (71). Selles J, Polini N, Alvarez C, Massheimer V. Novel action of estrone on vascular tissue: regulation of NOS and COX activity. *Steroids*. 2005; 70(4): 251-6.
- (72). Rauschemberger MB, Sellés J, Massheimer V. The direct action of estrone on vascular tissue involves genomic and non-genomic actions. *Life Sci*. 2008; 82(1-2): 115-23.
- (73). Massheimer V, Polini N, Alvarez C, Benozzi S, Rauschemberger MB, Sellés J. Signal transduction pathways involved in non-genomic action of estrone on vascular tissue. *Steroids*. 2006; 71(10): 857-64.
- (74). Okano H, Jayachandran M, Yoshikawa A, Miller VM. Differential effects of chronic treatment with estrogen receptor ligands on regulation of nitric oxide

synthase in porcine aortic endothelial cells. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2006; 47(4): 621-8.

(75). Clark KE, Baker RS, Lang U. Premarin-induced increases in coronary and uterine blood flow in nonpregnant sheep. *Am J Obstet Gynecol.* 2000; 183(1): 12-7.

(76). Wingrove CS, Garr E, Pickar JH, Dey M, Stevenson JC. Effects of equine oestrogens on markers of vasoactive function in human coronary artery endothelial cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1999; 150(1-2): 33-7.

(77). Hishikawa K, Nakaki T, Marumo T, Suzuki H, Kato R, Saruta T. Up-regulation of nitric oxide synthase by estradiol in human aortic endothelial cells. *FEBS Lett.* 1995; 360: 291-3.

(78). Caulin-Glaser T, Garcia-Cardena G, Sarrel P, Sessa WC, Bender JR. 17-beta-estradiol regulation of human endothelial cell basal nitric oxide release, independent of cytosolic Ca²⁺ mobilization. *Circ Res.* 1997; 81: 885-92.

(79). Yang S, Bae L, Zhang L. Estrogen increases eNOS and NOx release in human coronary artery endothelium. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2000; 36: 242-7.

(80). Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S. Induction of calcium-dependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91: 5212-6.

(81). Chen Z, Yuhanna IS, Galcheva-Garzova Z, Karas RH, Mendelsohn ME, Shaul PW. Estrogen receptor alpha mediates the nongenomic activation of endothelial nitric oxide synthase by estrogen. *J Clin Invest* 1999; 103: 401-6.

(82). Chambliss KL, Wu Q, Oltmann S, Konanah ES, Umetani M, Korach KS, Thomas GD, Mineo C, Yuhanna IS, Kim SH, Madak-Erdogan Z, Maggi A, Dineen SP, Roland CL, Hui DY, Brekken RA, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS, Shaul PW. Non-nuclear estrogen receptor alpha signaling promotes cardiovascular protection but not uterine or breast cancer growth in mice. *J Clin Invest.* 2010; 120(7): 2319-30.

(83). Toutain CE, Filipe C, Billon A, Fontaine C, Brouchet L, Guéry JC, Gourdy P, Arnal JF, Lenfant F. Estrogen receptor alpha expression in both endothelium and hematopoietic cells is required for the accelerative effect of estradiol on reendothelialization. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2009; 29(10): 1543-50.

(84). Bhavnani BR, Tam S-P, Lu X. Structure activity relationships and differential interactions and functional activity of various equine estrogens mediated via estrogen receptors (ERs) ER α and ER β . *Endocrinology.* 2008; 149: 4857–4870.

- (85). Aliau S, Mattras H, Richard E, Bonnafous J-C, Borgna J-L. Differential Interactions of Estrogens and Antiestrogens at the 17beta-Hydroxyl or Counterpart Hydroxyl with Histidine 524 of the Human Estrogen Receptor Alpha. *Biochemistry*. 2002; 41: 7979-7988.
- (86). Hsieh RW, Rajan SS, Sharma SK, Greene GL. Molecular characterization of a B-ring unsaturated estrogen: implications for conjugated equine estrogen components of premarin. *Steroids*. 2008; 73(1): 59-68.
- (87). Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G, Hartman J, Tujague M, Strom A, Treuter E, Warner M, Gustafsson J-A. Estrogen Receptors: How Do They Signal and What Are Their Targets. *Physiol. Rev.* 2007; 87: 905-931.
- (88). Dubey RK, Jackson EK. Estrogen-induced cardiorenal protection: potential cellular, biochemical, and molecular mechanisms. *Am. J. Physiol, Renal Physiol*. 2001; 280: F365-388.
- (89). Novella, S, Dantas, AP, Segarra, G, Novensà, L, Bueno, C, Heras, M, Hermenegildo, C, Medina, P. Gathering of aging and estrogen withdrawal in vascular dysfunction of senescent accelerated mice. *Exp Gerontol*. 2010; 45(11): 868-74.
- (90). Holloszy JO. Mortality rate and longevity of food-restricted exercising male rats: a reevaluation. *J Appl Physiol*. 1997; 82(2): 399-403.
- (91). Lloréns S, Salazar FJ, Nava E. Assessment of the nitric oxide system in the heart, aorta and kidney of aged Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 2005; 23(8): 1507-14.
- (92). Felicio, L.S, Nelson, J.F, Finch, C.E. Longitudinal studies of estrous cyclicity in aging C57BL/6J mice: II. Cessation of cyclicity and the duration of persistent vaginal cornification. *Biol. Reprod*. 1984; 31: 446-453.
- (93). Lu, K.H, Hopper, B.R, Vargo, T.M, Yen, S.S. Chronological changes in sex steroid, gonadotropin and prolactin secretions in aging female rats displaying different reproductive states. *Biol. Reprod*. 1979; 21: 193-203.
- (94). Onetti, Y, Jiménez-Altayó, F, Vila, E, Dantas, AP. Aortic Changes in senescence-accelerated female mice. Abstracts From the 15th Annual Meeting of the European Council for Cardiovascular Research (ECCR), Hypertension. 2010; 56:1160-1180
- (95). Kleinert, H, Wallerath, T, Euchenhofer, C, Ihrig-Beidert, I, Li, H, Forstermann, U. Estrogens increase transcription of the human endothelial NO

synthase gene; analysis of the transcription factors involved. *Hypertension*. 1998; 31: 582 – 588.

(96). Stirone C, Chu Y, Sunday L, Duckles SP, Krause DN. 17 Beta-estradiol increases endothelial nitric oxide synthase mRNA copy number in cerebral blood vessels: quantification by real-time polymerase chain reaction. *Eur J Pharmacol*. 2003; 478(1): 35-8.

(97). Moien-Afshari, F, Kenyon, E, Choy, J.C, Battistini, B, McManus, B.M, Laher, I. Long-term effects of ovariectomy and estrogen replacement treatment on endothelial function in mature rats. *Maturitas*. 2003; 45: 213–223.

(98). Haynes, M. P, Sinha, D, Russell, K. S, Collinge, M, Fulton, D, Morales-Ruiz, M. Membrane estrogen receptor engagement activates endothelial nitric oxide synthase via the PI3-kinase-Akt pathway in human endothelial cells. *Circ Res*. 2000; 87: 677–682.

(99). Florian, M, Lu, Y, Angle, M, & Magder, S. Estrogen induced changes in Akt-dependent activation of endothelial nitric oxide synthase and vasodilation. *Steroids*. 2004; 69: 637–645.

(100). Hoffmann, J, Haendeler, J, Aicher, A, Rossing, L, Vasa, M, Zeiher, A. M. Aging enhances the sensitivity of endothelial cells toward apoptotic stimuli: important role of nitric oxide. *Circ Res*. 2001; 89: 709–715.

(101). Forstermann U, Mugge A, Alheid U, Haverich A, Frolich JC. Selective attenuation of endothelium-mediated vasodilation in atherosclerotic human coronary arteries. *Circ Res*. 1988; 62: 185 – 190.

(102). Kelm M. The L-arginine-nitric oxide pathway in hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2003; 5: 80 -86.

(103). Berezan D.J, Xu Y, Falck J.R, Kundu A.P, Davidge S.T. Ovariectomy, but not estrogen deficiency, increases CYP4A modulation of alpha (1)-adrenergic vasoconstriction in aging female rats. *Am. J. Hypertension*. 2008; 21: 685-690.

(104). Fortepiani L.A, Zhang H, Racusen L, Roberts L.J, Reckelhoff J.F. Characterization of an animal model of postmenopausal hypertension in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2003; 41: 640-645.

(105). Wynne F.L, Payne J.A, Cain A.E, Reckelhoff J.F, Khalil R.A. Age-related reduction in estrogen receptor-mediated mechanisms of vascular relaxation in female spontaneously hypertensive rats. *Hypertension*. 2004; 43: 405-412.

- (106). Vera R, Sánchez M, Galisteo M, Villar IC, Jimenez R, Zarzuelo A, Pérez-Vizcaíno F, Duarte J. Chronic administration of genistein improves endothelial dysfunction in spontaneously hypertensive rats: involvement of eNOS, caveolin and calmodulin expression and NADPH oxidase activity. *Clin Sci (Lond)*. 2007; 112 (3): 183-91.
- (107). Muller G, Morawietz H. NADPH-oxidase and endothelial dysfunction. *Horm Metab Res*. 2009; 41(2): 152 - 8.
- (108). Miller AA, Drummond GR, Mast AE, Schmidt HH, Sobey CG. Effect of gender on NADPH-oxidase activity, expression, and function in the cerebral circulation: role of estrogen. *Stroke*. 2007; 38(7): 2142-9.
- (109). Tamir S, Izrael S, Vaya J. The effect of oxidative stress on ERalpha and ERbeta expression. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2002; 81(4-5): 327-32.
- (110). Post WS, Goldschmidt-Clermont PJ, Wilhide CC, Heldman AW, Sussman MS, Ouyang P, Milliken EE, Issa JP. Methylation of the estrogen receptor gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*. 1999; 43(4): 985-91.
- (111). Cornejo Viviana Matilde, Barros Núñez Patricio, Medina Lozano Claudia. Metilación del ADN: marcador diagnóstico y pronóstico de cáncer. *Gac Méd Méx*. 2006; 142(1): 81-82.
- (112). Marques SC, Oliveira CR, Outeiro TF, Pereira CM. Alzheimer's disease: the quest to understand complexity. *J.Alzheimers Dis*. 2010; 21 (2): 373-83.
- (113). Thompson RF, Atzmon G, Georghe C, Liang HQ, Grellly JM, Barzilal N. Tissue-specific dysregulation of DNA methylation in aging. *Aging Cell*. 2010; 9(4): 506-18.
- (114). Post WS, Goldschmidt-Clermont PJ, Wilhide CC, Heldman AW, Sussman MS, Ouyang P, Milliken EE, Issa JP. Methylation of the estrogen receptor gene is associated with aging and atherosclerosis in the cardiovascular system. *Cardiovasc Res*. 1999; 43(4): 985-91.
- (115). Ying AK, Hassanain HH, Roos CM, Smiraglia DJ, Issa JJ, Michler RE, Caligiuri M, Plass C, Goldschmidt-Clermont PJ. Methylation of the estrogen receptor-alpha gene promoter is selectively increased in proliferating human aortic smooth muscle cells. *Cardiovasc Res*. 2000; 46(1): 172-9.

ANEXO I:

**OTROS ESTUDIOS
RELACIONADOS CON LA
TESIS**

ANEXO II:

**OTROS ESTUDIOS
PUBLICADOS**

