

El estradiol potencia la vasodilatación dependiente del endotelio a través del óxido nítrico

Marta Sitges, Mercè Roqué, Núria Solanes, Montserrat Rigol, Magda Heras, Eulàlia Roig, José Luis Pomar, Wladimiro Jiménez^a y Ginés Sanz

Instituto de Enfermedades Cardiovasculares y ^aLaboratorio de Hormonal. Hospital Clínic. Institut d'Investigacions Biomèdiques August Pi i Sunyer (IDIBAPS). Facultat de Medicina. Universidad de Barcelona.

Introducción y objetivo. El mecanismo por el cual el estradiol lleva a cabo su efecto vasodilatador sobre la pared arterial es todavía controvertido. El objetivo de este estudio fue evaluar si el estradiol potencia la vasodilatación dependiente del endotelio en un modelo experimental humano *in vitro* y si este efecto se halla mediado por el óxido nítrico.

Métodos. Estudiamos 18 anillos arteriales procedentes de arterias mamarias internas de pacientes sometidos a cirugía de revascularización miocárdica utilizando una cámara de baño de órganos. Se evaluó la respuesta a la acetilcolina en situación basal y tras la adición de 10^{-6} mol/l de estradiol al medio, en presencia o no de un inhibidor de la óxido nítrico sintetasa (L-NNA, 10^{-4} mol/l).

Resultados. El estradiol potenció de manera significativa la relajación de los anillos arteriales en respuesta a la acetilcolina ($52 \pm 20\%$ con estradiol frente a $42 \pm 22\%$ en situación basal; $n = 10$; $p = 0,02$). Esta mejoría en la relajación dependiente del endotelio mediada por acetilcolina tras la adición de estradiol al medio no se demostró en presencia de L-NNA ($47 \pm 25\%$ con estradiol frente a $38 \pm 22\%$ sin estradiol; $n = 8$; $p = \text{NS}$).

Conclusiones. El estradiol produce *in vitro* un aumento de la vasodilatación dependiente del endotelio en los anillos arteriales de la arteria mamaria interna humana, efecto que disminuye al añadir al medio un inhibidor de la síntesis de óxido nítrico. Por tanto, el efecto vasodilatador del estradiol a las dosis utilizadas está mediado por la liberación de óxido nítrico.

Palabras clave: Endotelio. Estradiol. Óxido nítrico. Acetilcolina.

(Rev Esp Cardiol 2001; 54: 990-996)

Estradiol Enhances Endothelium-Dependent Vasodilation via a Nitric Oxide Pathway

Background and aim. The mechanisms by which estradiol dilates arterial vessels are still unclear. Our aim was to study if estradiol enhances endothelium-dependent vasodilation in an experimental model of human arteries *in vitro*, and if this effect is nitric oxide mediated.

Methods. Using organ bath chambers, we studied 18 arterial rings obtained from left internal mammary arteries during coronary artery bypass grafting surgery. Response to acetylcholine was evaluated at baseline and after the addition of estradiol 10^{-6} mol/l to the medium, both in the presence or absence of a nitric oxide synthase inhibitor (L-NNA 10^{-4} mol/l).

Results. Estradiol significantly enhanced the relaxation of the arterial rings in response to acetylcholine ($52 \pm 20\%$ after estradiol versus $42 \pm 22\%$ at baseline; $n = 10$; $p = 0,02$). However, endothelium-dependent vasodilation relaxation after estradiol addition was not enhanced in the presence of L-NNA ($47 \pm 25\%$ after estradiol versus $38 \pm 22\%$ at baseline; $n = 8$; $p = \text{NS}$).

Conclusions. Estradiol *in vitro* enhances endothelium-dependent vasodilation of internal human mammary artery rings; this effect is blunted after the addition to the medium of a nitric oxide inhibitor. Therefore, the vasodilator properties of estradiol at the studied dosage depend on the nitric oxide pathway.

Key words: Endothelium. Estradiol. Nitric oxide. Acetylcholine.

(Rev Esp Cardiol 2001; 54: 990-996)

Estudio realizado con la ayuda de una beca del Ministerio de Sanidad y Consumo (DGYCIT 96/0025).

Correspondencia: Dra. M. Heras.
IMCV. Hospital Clínic.
Villarroel, 170. 08036 Barcelona.
Correo electrónico: mheras@clinic.ub.es

Recibido el 19 de septiembre del 2000.
Aceptado para su publicación el 23 de febrero del 2001.

INTRODUCCIÓN

La baja incidencia de cardiopatía isquémica en la población de sexo femenino durante su edad fértil, junto con el progresivo aumento en la incidencia de enfermedad cardiovascular a partir de la menopausia, hizo sospechar que las hormonas femeninas ejercían un efecto beneficioso y protector¹. Si bien los estróge-

ABREVIATURAS

L-NNA: N(Ω)-nitro-L-arginina.

L-NAME: (Nw)-l nitro-arginina metil éster.

nos no han demostrado hasta ahora un efecto beneficioso sobre la prevención secundaria de las enfermedades cardiovasculares², estudios observacionales amplios sí han demostrado un claro beneficio sobre la prevención primaria de las mismas³. Los mecanismos específicos que conducen a este beneficio están todavía poco aclarados, pero probablemente sean multifactoriales^{4,5}. Se ha demostrado que los estrógenos tienen un efecto favorable sobre el perfil lipídico que, sin embargo, parece ser responsable sólo del 30% de la reducción del riesgo cardiovascular por parte del tratamiento estrogénico⁶. Además, los estrógenos tienen una acción directa sobre el endotelio y la pared arterial produciendo vasodilatación y, en consecuencia, una disminución de las resistencias vasculares^{4,6}.

El mecanismo exacto por el cual los estrógenos producen este efecto vasodilatador es aún desconocido. Estudios previos han demostrado un efecto agudo de los estrógenos sobre la producción del óxido nítrico, en concreto estimulando la actividad de la óxido nítrico sintetasa⁷ y otro efecto crónico, estimulando la expresión de la misma enzima⁸, encargada de generar el óxido nítrico en el endotelio. Por otro lado, otros autores han demostrado que el efecto vasodilatador observado tras la administración aguda de estradiol está mediado por un mecanismo antagonista del calcio y, por tanto, dependiente del endotelio. Nuestro objetivo fue estudiar si la administración aguda de estradiol potencia la vasodilatación dependiente del endotelio en un modelo experimental humano *in vitro*, y si este efecto se halla mediado por el óxido nítrico.

MÉTODOS

Muestras arteriales

Se obtuvo un segmento distal de la arteria mamaria interna utilizada durante la cirugía de revascularización de pacientes con enfermedad coronaria. Esta arteria constituye un espécimen que se puede obtener de enfermos sometidos a cirugía de revascularización miocárdica sin que suponga un riesgo añadido para ellos y, además, suele tener poca afección aterosclerótica. Durante el acto quirúrgico, la arteria mamaria interna izquierda fue disecada meticulosamente obteniéndose un segmento de 10 mm de su extremo más distal.

Una vez extraído, el segmento arterial fue introducido en un recipiente estéril con solución tampón de

Krebs-Henseleit modificada (composición en mmol/l: NaCl 118; glucosa 11; NaHCO₃ 25; KCl 4,7; MgSO₄ 1,2; KH₂PO₄ 1,2; CaCl₂ 1,2 y EDTA 0,03) a una temperatura de 37 °C para pasar a su inmediato procesamiento en cámara de baño de órganos.

Reactivos

El 17- β estradiol fue preparado en una dilución con solvente de etanol al 1/1.000. La noradrenalina se diluyó en una disolución de HCL al 1% y posteriormente en agua destilada hasta obtener la dilución requerida para obtener una concentración final en baño de 10⁻⁶ mol/l. El inhibidor del óxido nítrico L-NNA y la acetilcolina se disolvieron asimismo en agua destilada. Los reactivos fueron preparados a diario y se añadieron al baño de órganos en volúmenes de 100 μ l. Las respectivas concentraciones se expresan como concentraciones molares finales en el baño de órganos. Todos los reactivos se obtuvieron en Sigma Química (Alcobendas, España).

Baño de órganos

Preparación de tejidos

Los segmentos arteriales fueron disecados cuidadosamente para retirar el tejido adiposo y conectivo circundantes, obteniéndose anillos arteriales de 3-5 mm de longitud. Se tuvo especial cuidado en preservar la capa endotelial. Cada anillo arterial fue colocado en una cámara de baño de órganos con 10 ml de solución tampón de Krebs-Henseleit modificada. Se mantuvo un aporte constante de gas a la solución tampón que consistió en una mezcla de 95% de O₂ y de 5% de CO₂; así mismo, a través de un sistema de bomba de calor se mantuvo una temperatura constante de 37 °C. Cada anillo fue conectado a un transductor capaz de detectar cambios de tensión, que se registraron en un polígrafo multicanal (Letica S.A., L'Hospitalet, España).

Se dejó que los anillos se equilibraran durante unos 40 min hasta que se obtuvo una tensión basal de 1,5 g. En experimentos previos hemos observado que una tensión basal o en reposo de 1,5 g es la óptima para que se produzca una respuesta contráctil correcta en anillos de arteria mamaria interna humana (observaciones no publicadas).

Tras alcanzar el equilibrio, los anillos fueron contraídos con 10⁻⁶ mol/l de noradrenalina. Esta primera contracción fue, de hecho, considerada como una pre-contracción, pues tras la misma no se añadió acetilcolina y sólo se usó a modo de preconditionamiento para optimizar la reactividad de la muestra arterial. Posteriormente, tras un período de lavado y una vez estabilizado el anillo arterial en la línea basal de nuevo, se inició el estudio experimental propiamente dicho.

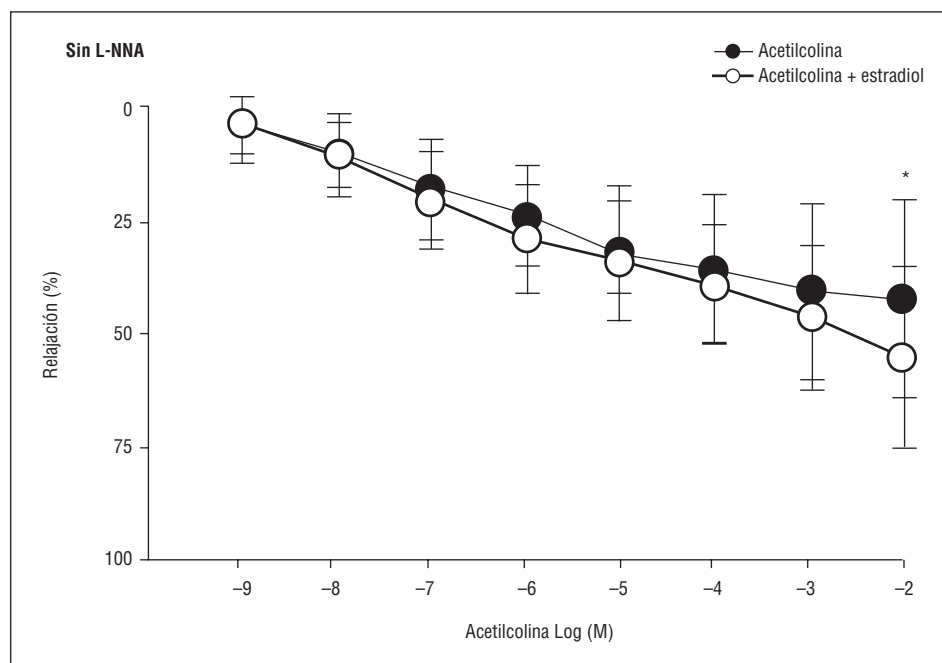


Fig. 1. Curvas de relajación en respuesta a la acetilcolina en ausencia de L-NNA.

Curva de relajación en respuesta a dosis progresivas de acetilcolina en ausencia (círculos negros) y presencia de estradiol (círculos blancos) en los anillos arteriales incubados sin el inhibidor de la óxido nítrico sintetasa, L-NNA. * $p = 0,02$ acetilcolina frente acetilcolina + estradiol.

Protocolo de reactividad vascular in vitro

Los anillos arteriales fueron de nuevo contraídos con 10^{-6} mol/l de noradrenalina. Únicamente se consideraron para el análisis final de resultados aquellos anillos con contracciones basales en respuesta a la adición de noradrenalina iguales o superiores a 1 g, considerando que éstos son los que presentan una curva de relajación valorable. Una vez alcanzada una fase estable o de meseta se añadió al medio acetilcolina en concentraciones crecientes (desde 10^{-9} hasta 10^{-2} mol/l) para evaluar la relajación o vasodilatación dependiente del endotelio. Tras un período de lavado con solución tampón de 30 min se añadieron al medio 10^{-6} mol/l de 17β -estradiol. Esta dosis, aunque alcanza concentraciones superiores a las fisiológicas en el plasma, es similar a la utilizada en experimentos previamente descritos de similar metodología al presente⁹⁻¹¹. Después de 15 min los anillos volvieron a ser contraídos con 10^{-6} mol/l de noradrenalina, hasta obtener una tensión estable. Entonces, nuevamente se volvieron a añadir concentraciones crecientes de acetilcolina (10^{-9} a 10^{-2} mol/l) para valorar la respuesta relajante en presencia de estradiol en el medio.

De manera simultánea, algunos anillos estudiados fueron tratados con anterioridad con un inhibidor de la óxido nítrico sintetasa, N(Ω)-nitro-L-arginina (L-NNA), para evaluar el efecto de esta inhibición sobre la acción vasodilatadora del estradiol. De este modo, se añadieron 10^{-4} mol/l de L-NNA al medio en situación basal, antes de añadir al medio noradrenalina, y nuevamente antes de la segunda contracción, tras haber enriquecido el medio con estradiol.

Para cada anillo se determinó la máxima tensión o contracción desarrollada tras la adición de noradrenalina al medio, así como la mínima tensión o máxima relajación alcanzada tras la adición de acetilcolina. El porcentaje de cambio entre ambas tensiones se utilizó para expresar la actividad relajante de la acetilcolina. Estas determinaciones se realizaron del mismo modo antes y después de la adición de estradiol al medio, en los anillos con y sin L-NNA.

Análisis estadístico

Todos los valores se expresan como media $\pm$ desviación estándar. Se utilizó la prueba de la t de Student para comparar medias apareadas. Se consideró significativo un valor de $p < 0,05$. Los valores de n se refieren al número de anillos arteriales analizados.

RESULTADOS

Se estudiaron un total de 59 anillos procedentes de 19 muestras de arteria mamaria interna humana (10 varones y 9 mujeres, edad media 67 ± 11 años) obtenidos durante la cirugía de revascularización coronaria. Todos los pacientes tenían enfermedad coronaria de grado severo, con indicación clínica y angiográfica de tratamiento quirúrgico. Además, todos ellos recibieron tratamiento vasodilatador con nitratos, bloqueadores betaadrenérgicos y/o antagonistas del calcio. Dicho tratamiento fue suspendido en las 8-10 h previas a la cirugía, sin que existieran diferencias de medicación entre los grupos estudiados. De los 59 anillos arteriales estudiados, en 18 se observó una con-

TABLA 1. Respuestas contráctiles y relajantes de los anillos analizados

Anillo	Contracción NE (mg)	Relajación acetilcolina (%)	Contracción noradrenalina + estradiol (mg)	Relajación acetilcolina + estradiol (%)
Anillos sin L-NNA				
1 (varón)	3.050	10	3.200	25
2 (varón)	1.150	21	1.050	38
3 (mujer)	2.300	32	2.600	25
4 (varón)	1.900	23	1.400	35
5 (varón)	1.000	65	1.500	70
6 (mujer)	1.400	32	1.750	68
7 (varón)	1.150	69	1.100	77
8 (mujer)	2.450	69	2.750	69
9 (mujer)	1.000	37	1.050	52
10 (mujer)	2.950	62	3.050	64
Media	1.835	42	1.945	52*
DE	805	22	864	20
Anillos con L-NNA				
11 (mujer)	1.800	8	1.500	20
12 (mujer)	3.050	31	3.100	34
13 (mujer)	1.550	51	1.600	84
14 (varón)	1.550	74	1.450	65
15 (mujer)	2.000	10	2.350	27
16 (varón)	2.300	48	2.300	67
17 (mujer)	1.850	29	1.950	18
18 (mujer)	1.850	51	2.550	61
Media	1.993	38	2.100	47
DE	490	22	580	25,2

*p = 0,02 frente a relajación. DE: desviación estándar.

tracción igual o superior a 1 g tras la adición de 10^{-6} mol/l de noradrenalina al baño de órganos, y son los estudiados.

En la tabla 1 se expone la respuesta contráctil inducida por la adición de 10^{-6} mol/l de noradrenalina al baño, así como la posterior relajación máxima obtenida en respuesta a la acetilcolina, en los 18 anillos arteriales finalmente analizados, tanto en situación basal como en presencia de estradiol. En los anillos procesados sin L-NNA, la adición de estradiol al medio potenció la relajación en respuesta a la acetilcolina ($52 \pm 20\%$ con estradiol frente $42 \pm 22\%$ en situación basal; $n = 10$; $p = 0,02$) (fig. 1), sin cambiar la contracción máxima obtenida (1.945 ± 864 g frente a 1.835 ± 805 g, respectivamente; $p = \text{NS}$). Sin embargo, en los anillos procesados con L-NNA, la vasodilatación dependiente del endotelio no aumentó de manera significativa tras la adición de estradiol al medio ($47 \pm 25\%$ con estradiol frente a $38 \pm 22\%$ sin estradiol; $n = 8$; $p = \text{NS}$) (figs. 2 y 3). La respuesta contráctil a la noradrenalina tampoco varió significativamente en los anillos procesados con L-NNA antes y después de la adición de estradiol al medio: 1.993 ± 490 frente a 2.100 ± 580 g; $p = \text{NS}$).

De los anillos procesados sin L-NNA, cinco procedían de pacientes de sexo masculino y cinco de pacientes de sexo femenino. La relajación inducida por la acetilcolina aumentó significativamente tras la adición de estradiol, sin que se detectaran diferen-

cias significativas entre los anillos procedentes de varones y de mujeres (incremento del $34 \pm 24\%$ frente a un incremento del $22 \pm 20\%$, respectivamente; $p = \text{NS}$).

DISCUSIÓN

En este estudio, la presencia de estradiol potenció de manera significativa la vasodilatación dependiente del endotelio inducida por acetilcolina en anillos de arteria mamaria interna humana; este efecto se redujo cuando se añadió al medio un inhibidor de la óxido nítrico sintetasa (L-NNA), sugiriendo que el efecto está mediado por un aumento en la liberación de óxido nítrico.

Nuestros resultados concuerdan con los descritos por Gisclard et al¹², que demostraron que la acetilcolina producía una relajación dependiente del endotelio significativamente mayor en anillos de conejos hembra ooforectomizadas que habían seguido tratamiento sustitutivo con estrógenos que en anillos procedentes de conejos hembra ooforectomizadas que no habían recibido terapia hormonal. Del mismo modo, cuando los anillos arteriales de conejos hembra que habían recibido estrógenos eran desendotelizados, la acetilcolina no producía relajación alguna.

Además de actuar potenciando la vasodilatación dependiente del endotelio, los estrógenos han demostrado tener capacidad vasodilatadora directa. Así, el es-

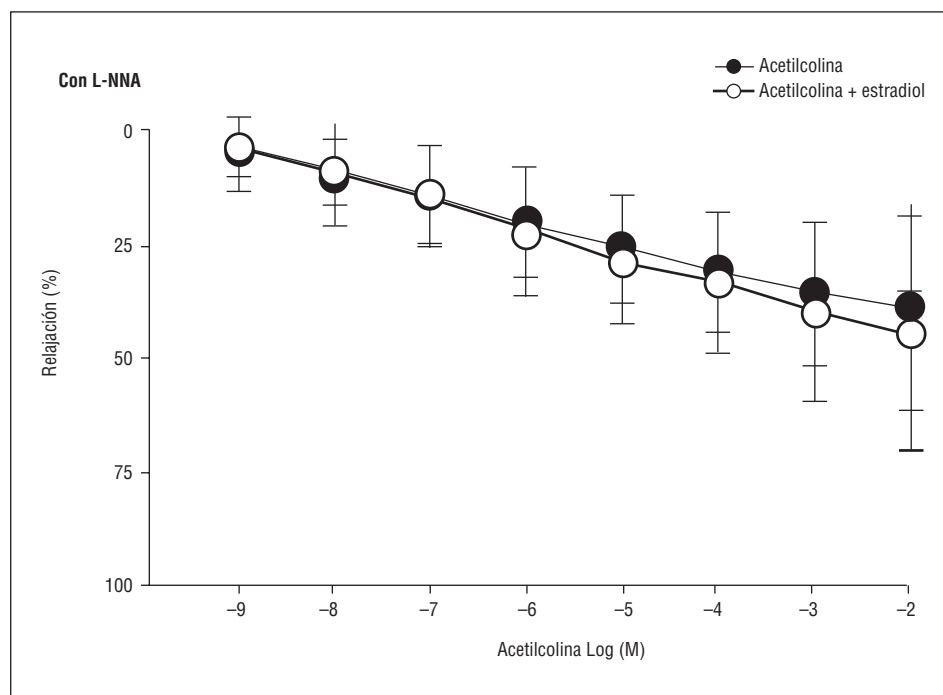


Fig. 2. Curvas de relajación en respuesta a la acetilcolina en presencia de L-NNA.

Curva de relajación en respuesta a dosis progresivas de acetilcolina en ausencia (círculos negros) y presencia de estradiol (círculos blancos) en los anillos arteriales incubados con el inhibidor de la óxido nítrico sintetasa, L-NNA. No se observaron diferencias significativas en la relajación dependiente del endotelio en los anillos incubados con o sin estradiol.

tradiol es capaz de relajar anillos arteriales de conejos contraídos previamente con endotelina, con independencia de si hay o no endotelio, y de la adición de un inhibidor de la óxido nítrico sintetasa, L-NAME⁹. En arterias procedentes de humanos, usando también cámaras de baño de órganos, Mügge et al han demostrado que el estradiol relaja los anillos de arteria coronaria obtenida a partir de corazones explantados y precontraídos con la prostaglandina PGF2 α ¹⁰ de un modo dependiente de la dosis e independiente de la existencia o no de endotelio. Chester et al, también utilizando arterias coronarias humanas obtenidas a partir de corazones explantados, han observado este mismo efecto relajante del estradiol sobre anillos precontraídos con un análogo del tromboxano A₂; del mismo modo, dicho efecto se ha observado con independencia de la presencia o no de endotelio o de la adición de L-NAME al medio¹³. Finalmente, se ha demostrado que el estradiol disminuye la contracción inducida por un agonista de los canales del calcio, lo que sugiere que los estrógenos pueden tener un cierto efecto antagonista del calcio y, por tanto, vasodilatador¹⁴.

Así pues, y de acuerdo con estos estudios previos, el estradiol potenciaría, por un lado, la vasodilatación dependiente del endotelio, y por otro, actuaría como un vasodilatador arterial directo, por un mecanismo independiente del endotelio. El hecho diferencial entre estos diversos estudios y que podría justificar la discrepancia de los resultados fue la dosis empleada de estradiol. A este respecto, estudios posteriores realizados en baño de órganos utilizando anillos arteriales

procedentes de conejos hembra han aclarado que la adición de L-NNA al medio es capaz de inhibir de manera significativa la relajación inducida por concentraciones bajas de estradiol (10^{-9} a 10^{-6} mol/l), pero no la inducida por concentraciones mayores de estradiol (10^{-5} a 10^{-4} mol/l)¹¹.

En el presente estudio utilizamos dosis bajas, aunque suprafisiológicas, de estradiol (10^{-6} mol/l), observando que se potencia significativamente la vasodilatación dependiente del endotelio mediada por acetilcolina, y que este efecto se reduce al añadir el inhibidor de la óxido nítrico sintetasa, L-NNA. En este sentido, nuestro estudio difiere de los previos realizados con arterias humanas en los que se evaluó la capacidad vasodilatadora de diferentes dosis de estradiol sobre anillos precontraídos con distintas sustancias, es decir, se evaluó el efecto vasodilatador directo del estradiol. Por otro lado, nuestros resultados coinciden con los de Collins et al, que demostraron que el estradiol, a la concentración de 10^{-6} mol/l, potenciaba la vasodilatación dependiente del endotelio en anillos de arterias de conejo¹¹. Finalmente, este efecto se ha observado también *in vivo*, en arterias coronarias de pacientes menopáusicas, en las que la infusión intracoronaria de estradiol a dosis similares a las fisiológicas aumentó la respuesta vasodilatadora a la acetilcolina; este efecto se inhibió al infundir L-NAME intracoronario¹⁵. Nuestros resultados utilizando un modelo *in vitro* con anillos de arterias humanas confirman los hallazgos previos obtenidos en estos modelos animales *in vitro* y los obtenidos *in vivo* en pacientes.

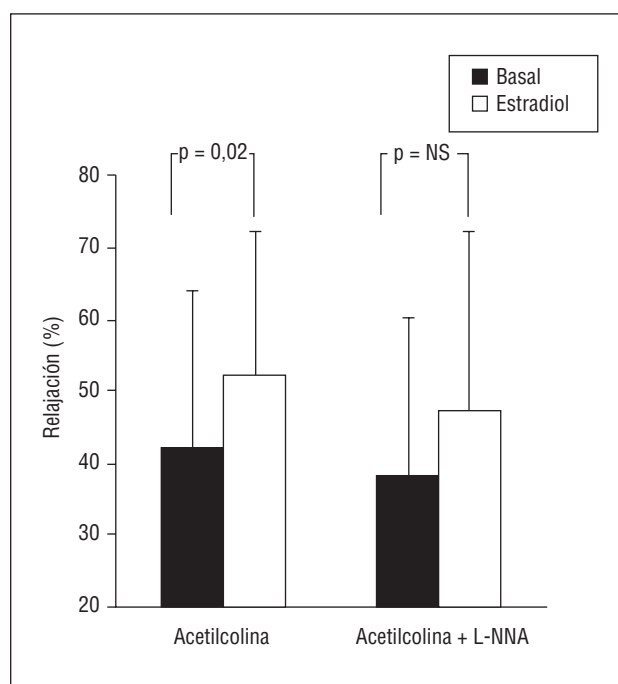


Fig. 3. Respuesta vasodilatadora a la acetilcolina en presencia o no de L-NNA.

La adición de estradiol al medio indujo un aumento significativo en la relajación dependiente del endotelio en respuesta a la acetilcolina. Sin embargo, en presencia de un inhibidor del óxido nítrico (L-NNA), la adición de estradiol al medio indujo un aumento, pero no significativo, en la relajación dependiente del endotelio en respuesta a la acetilcolina.

Por tanto, el estradiol a dosis bajas, similares o ligeramente superiores a las fisiológicas, actuaría potenciando la vasodilatación dependiente del endotelio a través de un mecanismo mediado por el óxido nítrico, hecho demostrado por la menor relajación observada en presencia de L-NNA en nuestro estudio. Además, a concentraciones mayores, el estradiol podría tener un efecto vasodilatador directo, probablemente mediado por un antagonismo de los canales del calcio; este último hecho justificaría que en nuestro estudio se observara una cierta tendencia a una mayor relajación tras la adición de estradiol a pesar de la presencia concomitante de L-NNA.

Limitaciones del estudio

No hemos conseguido demostrar una diferencia significativa en el grado de relajación observada tras la adición de estradiol entre anillos arteriales procedentes de varones y de mujeres. Este hecho ha sido demostrado con anterioridad en otros estudios y probablemente esté en relación con la distinta distribución de receptores estrogénicos en ambos sexos^{16,17}. Creemos que el reducido tamaño de la muestra analizada puede justificar que no hayamos encontrado esta diferencia. En este sentido, la baja rentabilidad de los estudios efectuados en baño de órganos que

utilizan especímenes procedentes de humanos ha sido ya descrita con anterioridad. Así, se sabe que la vasorreactividad de las arterias humanas estudiada en el baño de órganos no tiene tan buenos resultados como los obtenidos al estudiar arterias de animales¹⁸. En nuestro caso, la rentabilidad ha sido del 30%. Además, la recogida de la muestra en nuestro caso se vio sometida a una inevitable variabilidad por las diferentes calidades y calibres de cada arteria mamaria interna, de la que utilizamos su segmento más distal, que habitualmente mide unos 2 mm de diámetro o menos, sobre todo en mujeres. La manipulación de anillos arteriales tan pequeños puede conllevar un cierto daño endotelial, lo que ha podido repercutir, a su vez, en una menor relajación dependiente del endotelio. Finalmente, hemos trabajado con arterias procedentes de pacientes con factores de riesgo y arteriosclerosis demostrada, y en el caso de las muestras de pacientes de sexo femenino, menopáusicas. Todos ellos son factores ampliamente relacionados con disfunción endotelial¹⁹, lo que justifica también la pequeña vasodilatación observada en respuesta a la adición de acetilcolina en la presente investigación. El corto período de lavado del tratamiento vasodilatador, por otro lado inevitable en pacientes con enfermedad coronaria sintomática como los evaluados, ha podido, además, influir en este resultado. A pesar de todo ello, el porcentaje de relajación dependiente del endotelio observado en nuestro estudio no difiere en gran medida del descrito previamente para arterias mamarias internas humanas, que fue del $56 \pm 9\%$ ²⁰.

CONCLUSIONES

Este estudio demuestra que el estradiol produce *in vitro* un aumento en la vasodilatación dependiente del endotelio en anillos arteriales de arteria mamaria interna humana, efecto que disminuye al añadir al medio un inhibidor de la síntesis de óxido nítrico (L-NNA). Por tanto, el efecto vasodilatador del estradiol dependería en parte de una mayor disponibilidad de óxido nítrico, bien porque su producción es mayor, bien porque su degradación es menor²¹. Sin embargo, el efecto vasodilatador del estradiol no depende únicamente del óxido nítrico, puesto que incluso al estar éste inhibido persiste un cierto efecto potenciador de la vasodilatación mediada por acetilcolina por parte del estradiol.

AGRADECIMIENTO

Deseamos expresar nuestro profundo agradecimiento a los cirujanos, anestesiólogos diplomados de enfermería y a todo el personal de los quirófanos de cirugía cardíaca del Hospital Clínic de Barcelona por su ayuda, que fue esencial para el desarrollo de este estudio.

BIBLIOGRAFÍA

1. Eaker DE, Chesebro JH, Sacks FM, Wenger NK, Whisnant JP, Winston M. Cardiovascular disease in women. *Circulation* 1993; 88: 1999-2006.
2. Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B et al, for the HERS Research Group. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. *JAMA* 1998; 280: 605-613.
3. Grady D, Rubin SM, Petitti DB, Fox CS, Black D, Ettinger B et al. Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. *Ann Intern Med* 1992; 117: 1016-1103.
4. Skafar DF, Xu R, Morales J, Ram J, Sowers JR. Female sex hormones and cardiovascular disease in women. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 3913-3918.
5. Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *N Engl J Med* 1999; 340: 1801-1811.
6. Samaan S, Crawford MH. Estrogen and cardiovascular function after menopause. *J Am Coll Cardiol* 1995; 26: 1403-1410.
7. Lantin-Hermoso RL, Rosenfeld CR, Yuhanna IS, German Z, Chen Z, Shaul PW. Estrogen acutely stimulates nitric oxide synthase activity in fetal pulmonary artery endothelium. *Am J Physiol* 1997; 273: L119-L126.
8. 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: 5212-5216.
9. Jiang C, Sarrel PM, Poole-Wilson PA, Collins P. Acute effect of 17 beta-estradiol on rabbit coronary artery contractile responses to endothelin-1. *Am J Physiol* 1992; 263: H271-H275.
10. Mügge A, Riedel M, Barton M, Kuhn M, Lichtlen PR. Endothelium independent relaxation of human coronary arteries by 17 beta-estradiol *in vitro*. *Cardiovasc Res* 1993; 27: 1939-1942.
11. 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: 1964-1968.
12. Gisclard V, Miller, Vanhoutte PM. Effect of 17 beta-estradiol on endothelium-dependent responses in the rabbit. *J Pharmacol Exp Ther* 1988; 244: 19-22.
13. Chester AH, Jing C, Borland JA, Yacoub MH, Collins P. Oestrogen relaxes human epicardial coronary arteries through non-endothelium-dependent mechanisms. *Cor Art Dis* 1995; 6: 417-422.
14. Collins P, Rosano GMC, Jiang C, Lindsay D, Sarrel PM, Poole-Wilson PA. Cardiovascular protection by oestrogen- a calcium antagonist effect? *Lancet* 1993; 341: 1264-1265.
15. Guetta V, Quyyumi AA, Prasad A, Panza JA, Wacławski M, Cannon RO. The role of nitric oxide in coronary vascular effects of estrogen in postmenopausal women. *Circulation* 1997; 96: 2795-2801.
16. Collins P, Rosano GMC, Sarrel PM, Ulrich L, Adamopoulos S, Beale CM et al. 17 beta-estradiol attenuates acetylcholine-induced coronary arterial constriction in women but not men with coronary artery disease. *Circulation* 1995; 92: 24-30.
17. Kawano H, Motoyama T, Kugiyama K, Hirashima O, Ohgushi M, Fujii H et al. Gender difference in improvement of endothelium-dependent vasodilation after estrogen supplementation. *J Am Coll Cardiol* 1997; 30: 914-919.
18. Thom S, Hughes A, Martin G, Sever PS. Endothelium-dependent relaxation in isolated human arteries and veins. *Clin Sci* 1987; 73: 547-552.
19. Celermajer DS. Endothelial dysfunction: does it matter? Is it reversible? *J Am Coll Cardiol* 1997; 30: 325-333.
20. Shapira OM, Xu A, Aldea GS, Vita JA, Shemin RJ, Keaney JF. Enhanced nitric-oxide-mediated vascular relaxation in radial artery compared with internal mammary artery or saphenous vein. *Circulation* 1999; 100 (Supl 2): 322-327.
21. Virdis A, Ghiadoni L, Pinto S, Lombardo M, Petraglia F, Genazzani A et al. Mechanisms responsible for endothelial dysfunction associated with acute estrogen deprivation in normotensive women. *Circulation* 2000; 101: 2258-2263.