

**ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA  
ATEROSCLEROSIS. IMPACTO DE DISTINTOS  
TRATAMIENTOS HORMONALES EN EL  
MODELO EXPERIMENTAL DE LA CONEJA  
OOFORECTOMIZADA.**

**Tesi Doctoral**

**Alex Sanjuán Pérez.**

**Universitat de Barcelona**

**Divisió de Ciències de la Salut**

**Facultat de Medicina**

**Departament d'Obstetrícia i Ginecologia, Pediatria,**

**Radiologia i Medicina Física.**

**Area d'Obstetrícia i Ginecologia.**

**ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA ATEROSCLEROSIS.**

**IMPACTO DE DISTINTOS TRATAMIENTOS HORMONALES EN**

**EL MODELO EXPERIMENTAL DE LA CONEJA**

**OOFORECTOMIZADA.**

**Memoria presentada per Alex Sanjuán Pérez per optar al grau de Doctor en Medicina i Cirurgia per la Universitat de Barcelona, sota la direcció del Dr. Camil Castelo-Branco, Professor Associat d'Obstetrícia i Ginecologia de la Universitat de Barcelona, i Consultor d'Obstetrícia i Ginecologia de l'Hospital Clínic, Universitat de Barcelona.**

**Barcelona, Juny del 2001.**

**En Camil Castelo-Branco Flores, Professor Associat d'Obstetrícia i Ginecologia de la Universitat de Barcelona, i Consultor d'Obstetrícia i Ginecologia de l'Hospital Clínic, Universitat de Barcelona,**

**CERTIFICA:**

**Que en Alex Sanjuán Pérez ha realitzat sota la meva direcció la Tesi per aspirar al grau de Doctor en Medicina titulada “ESTUDIO EXPERIMENTAL DE LA ATEROSCLEROSIS. IMPACTO DE DISTINTOS TRATAMIENTOS HORMONALES EN EL MODELO EXPERIMENTAL DE LA CONEJA OOFORECTOMIZADA” i que aquesta Tesi està en condicions de ser llegida a partir del dia de la data.**

**El que faig constar a efectes opurtuns a 30 de Juny del dos mil ú.**

**Dr. Camil Castelo-Branco Flores.**

**A la meva família. Gràcies a ells el meu desig d'infantesa es va poder fer realitat.**

**A l'Esther i a la seva família. Ells van ser qui més em van empènyer a escollir l'Hospital Clínic per a la meva formació com a ginecòleg.**

## **AGRAÏMENTS.**

Al Dr. Camil Castelo-Branco, el meu mestre. Ell em va iniciar en aquest món de la menopausa i de la seva mà he pogut arribar fins aquí. El seu esperit innovador i les seves ganes de treballar junt a un ampli coneixement de la matèria fan difícil no aprendre al seu costat.

A la Dra. Elena Casals. El seu entusiasme a la vida i una disposició a ajudar en qualsevol moment han fet possible la realització d'aquesta tesi.

A la Imma Mercadé. Les estones passades amb la seva companyia al laboratori de Bioquímica han fet molt més fàcil la tasca realitzada conjuntament.

A tot el personal del laboratori de Bioquímica, i molt especialment a la Maria per la seva tasca en les determinacions de lipoproteïnes.

Al Dr. Jaume Ordi. A ell i a la seva paciència amb mi dec els coneixements informàtics necessaris per poder realitzar les meves medicions, així com unes nocions d'Anatomia Patològica.

A tot el personal d'Anatomia Patològica que en un moment o altre m'han ajudat, i molt especialment a la Montse Tortosa, per la seva col.laboració incondicional amb el maneig de les mostres.

Al Carles Ascaso pel seu treball estadístic i sobretot a la Georgia Escaramís qui ha portat el gruix de la feina d'una forma extraordinària.

A l'Amèrica Jiménez que m'ha donat tota mena de facilitats d'accés a l'Estabulari.

A la Carme Cleries per les seves lliçons amb el maneig dels animals i la seva cura per evitar el patiment innecessari.

A tot el personal de l'Estabulari i sobretot a la Blanca, la Carmen i al Sergi per la seva desinteressada col.laboració en moments determinats.

Al Dr. Francesc Carmona. A ell dec les primeres nocions de cirurgia en conilles. La seva experiència i disposició va permetre que jo pogués iniciar el meu treball experimental.

Al Juanjo Vicente i a la Marta Colodrón. Ells han permès que jo pogués descansar els caps de setmana acudint a l'estabulari quan feia falta.

Finalment vull donar les gràcies a tot el personal de Sala de Parts i de Quiròfan, i a totes aquelles persones que en un moment donat m'han ajudat de forma directa o indirecta a que aquesta tesi tirés endavant i es pogués finalitzar.

## **INDICE.**



---

<b>1. Motivación de la tesis.</b>	<b>9</b>
<b>2. Introducción. Perspectivas actuales de la menopausia y la enfermedad cardiovascular.</b>	
<b>2.1. Enfermedad cardiovascular y aterosclerosis.</b>	<b>15</b>
<b>2.2. Menopausia y enfermedad cardiovascular.</b>	<b>27</b>
<b>2.3. Terapia hormonal sustitutiva y enfermedad cardiovascular.</b>	<b>37</b>
<b>2.3.1. Estudios clínicos sobre marcadores de riesgo de patología cardiovascular.</b>	<b>37</b>
<b>2.3.1.1. Estudios no randomizados.</b>	<b>37</b>
<b>2.3.1.2. Estudios randomizados.</b>	<b>39</b>
<b>2.3.2. Estudios epidemiológicos sobre morbimortalidad cardiovascular.</b>	<b>47</b>
<b>2.3.2.1. Estudios no randomizados.</b>	<b>47</b>
<b>2.3.2.2. Estudios randomizados.</b>	<b>52</b>
<b>2.4. Terapia hormonal sustitutiva, aterosclerosis y experimentación animal.</b>	<b>59</b>
<b>3. Hipótesis del estudio.</b>	<b>67</b>
<b>4. Objetivos del estudio.</b>	<b>71</b>
<b>5. Material y métodos:</b>	
<b>5.1. Diseño del estudio.</b>	<b>75</b>
<b>5.2. Animales de experimentación.</b>	<b>77</b>
<b>5.3. Técnica anestésica.</b>	<b>80</b>
<b>5.4. Técnica quirúrgica.</b>	<b>81</b>

---

<b>5.5. Esquemas de tratamiento.</b>	<b>85</b>
<b>5.6. Técnica de sacrificio.</b>	<b>88</b>
<b>5.7. Cuantificación de la placa de ateroma.</b>	<b>89</b>
<b>5.8. Estudio anatomopatológico de la placa de ateroma.</b>	<b>92</b>
<b>5.9. Cuantificación del colesterol total de la aorta.</b>	<b>93</b>
<b>5.10. Análisis de lípidos plasmáticos.</b>	<b>94</b>
<b>5.11. Análisis estadístico.</b>	<b>95</b>
<b>6. Resultados:</b>	
<b>6.1. Descripción de la muestra.</b>	<b>99</b>
<b>6.2. Cuantificación de la placa de ateroma.</b>	<b>103</b>
<b>6.3. Cuantificación del colesterol total de la aorta.</b>	<b>109</b>
<b>6.4. Cuantificación de los lípidos plasmáticos:</b>	<b>114</b>
<b>6.4.1. Lípidos basales.</b>	<b>114</b>
<b>6.4.2. Lípidos finales.</b>	<b>117</b>
<b>6.4.3. Lípidos expresados como área bajo la curva.</b>	<b>120</b>
<b>6.4.4. Relación colesterol/triglicéridos.</b>	<b>123</b>
<b>6.5. Estudio histológico de las placas de ateroma.</b>	<b>125</b>
<b>6.6. Estudio de útero, hígado y corazón.</b>	<b>134</b>
<b>7. Discusión.</b>	
<b>7.1. Cuantificación de la placa de ateroma.</b>	<b>143</b>
<b>7.2. Cuantificación del colesterol total de la aorta.</b>	<b>153</b>
<b>7.3. Cuantificación de los lípidos plasmáticos.</b>	<b>163</b>
<b>7.3.1. Lípidos basales.</b>	<b>164</b>
<b>7.3.2. Lípidos finales.</b>	<b>164</b>

7.3.3. Lípidos expresados como área bajo la curva.	166
7.3.4. Relación colesterol/triglicéridos.	167
7.4. Estudio histológico de las placas de ateroma.	168
7.5. Estudio de útero, hígado y corazón.	170
7.6. Visión global de cada tratamiento y posibilidades futuras.	178
<b>8. Conclusiones.</b>	<b>183</b>
<b>9. Índice de figuras.</b>	<b>187</b>
<b>10. Índice de tablas.</b>	<b>191</b>
<b>11. Bibliografía.</b>	<b>195</b>

## **1. MOTIVACIÓN DE LA TESIS.**

Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en la mujer en los países desarrollados. En España en 1997, último año del que se dispone de datos publicados por el Instituto Nacional de Estadística, hubo 71.253 defunciones en mujeres por dicha causa suponiendo un 43.5 % de todas las muertes en el sexo femenino, básicamente debido a las enfermedades arterioscleróticas, o sea, la enfermedad cerebrovascular (22.309 casos) y la cardiopatía isquémica (16.631 casos), que constituían el 23.7 % del total de muertes (Boix R, 2001). Asimismo la morbilidad hospitalaria debido a enfermedades del aparato circulatorio también es elevada siendo de 881 por 100.000 mujeres (Instituto Nacional de Estadística, 1996).

La mortalidad de causa cardiovascular ha ido descendiendo paulatinamente en los últimos 20 años probablemente reflejando una mejor atención médica. Por el contrario la morbilidad ha aumentado debido tanto a un aumento de la supervivencia como por una mayor prevalencia de la enfermedad cardiovascular causada por un envejecimiento paulatino de la población (Brotons, 1998). Debido a esta alta tasa de morbimortalidad de la enfermedad cardiovascular cualquier intento con resultados positivos de prevención primaria o secundaria frente a esta patología tendrá un impacto sociosanitario de grandes dimensiones, por lo que las líneas de investigación son abundantes.

La aterosclerosis no es una enfermedad como tal sino el principal proceso que contribuye a la patogenia de los infartos cerebrales y de miocardio, así como a la gangrena y pérdida de extremidades cuando afecta a la circulación periférica (Ross, 1995). El aumento de incidencia de la aterosclerosis en las mujeres y por lo tanto de las enfermedades cardiovasculares se ha relacionado con el cese de la función ovárica (Castelli, 1984; 1988), si bien este hecho no es aceptado unánimemente (Tunstall-Pedoe, 1998).

Nosotros los ginecólogos tenemos relación con la patología cardiovascular a partir de la menopausia y su tratamiento hormonal, al ser éste capaz de contrarrestar los efectos del hipoestrogenismo que se produce en las mujeres tras el cese de la función reproductiva. Este tratamiento puede convertirse en un tratamiento global de las mujeres menopáusicas para la mejoría de su calidad de vida inicialmente, y más a largo plazo para la mejora de las funciones cardiovasculares entre otros efectos. Recientemente se han incorporado además al tratamiento hormonal sustitutivo nuevos fármacos de los cuales disponemos todavía de poca información respecto a la patología cardiovascular.

La enfermedad cardiovascular evoluciona en largos periodos de tiempo y esto hace que su estudio en humanos sea complejo, requiriendo además muchos años de seguimiento de un gran número de pacientes para llegar a conclusiones poco fidedignas en ocasiones, con lo que los resultados clínicos epidemiológicos no han aportado hasta el momento suficientes evidencias a favor o en contra del tratamiento hormonal sustitutivo sobre esta patología. Esto ha hecho desarrollar modelos animales experimentales con el objeto de estudiar en plazos más cortos de tiempo y de forma más homogénea su fisiopatología.

Por esta razón nuestro proyecto estará centrado en valorar cómo el tratamiento hormonal sustitutivo es capaz de contrarrestar una aterosclerosis inducida en el animal de experimentación, lo cual nos permitirá abordar esta patología desde el punto de vista experimental aportando más datos de este tratamiento en la prevención de la patología cardiovascular en la mujer postmenopáusica. Asimismo los nuevos tratamientos hormonales recientemente incorporados serán valorados y comparados con el tratamiento estrogénico habitual.

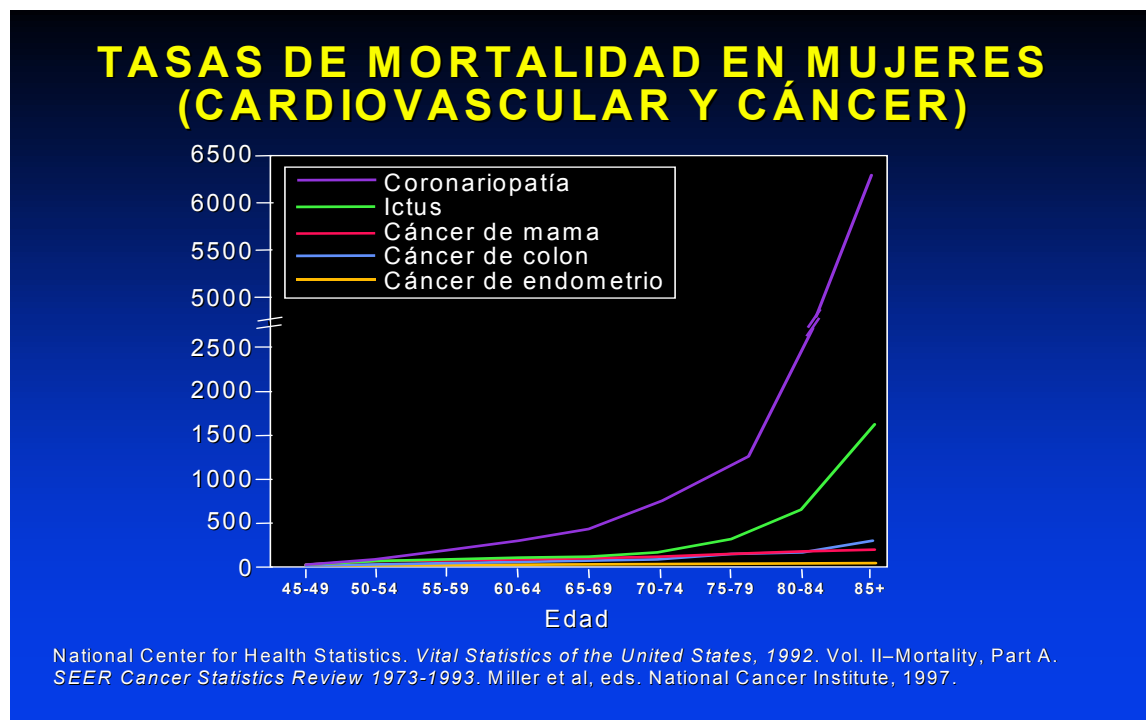
En definitiva con este trabajo de experimentación animal esperamos aportar un mayor conocimiento sobre los mecanismos por los cuales el tratamiento hormonal sustitutivo participa en la disminución de la morbimortalidad cardiovascular en las mujeres postmenopáusicas.

**2. INTRODUCCIÓN. PERSPECTIVAS ACTUALES  
DE LA MENOPAUSIA Y LA ENFERMEDAD  
CARDIOVASCULAR.**



## 2.1. ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR Y ATEROSCLEROSIS.

La enfermedad cardiovascular sigue siendo la principal causa de muerte en los países occidentales, Europa y Estados Unidos, y parte de Asia (Breslow JL, 1997; Braunwald E, 1997) y la aterosclerosis es la principal causa de infartos de miocardio y cerebrales, siendo responsable de la mayoría de estas muertes (Ross R, 1986; 1993; 1995; 1999), debido a que afecta básicamente a arterias de medio y gran calibre provocando isquemia en estos órganos. (Figura 1)



**Figura 1.** Se observan las grandes diferencias existentes en número de casos entre la mortalidad por enfermedad cardiovascular y las muertes por cáncer.

Las lesiones de aterosclerosis representan una serie de respuestas celulares y moleculares a determinadas noxas que en conjunto se comportan como una reacción

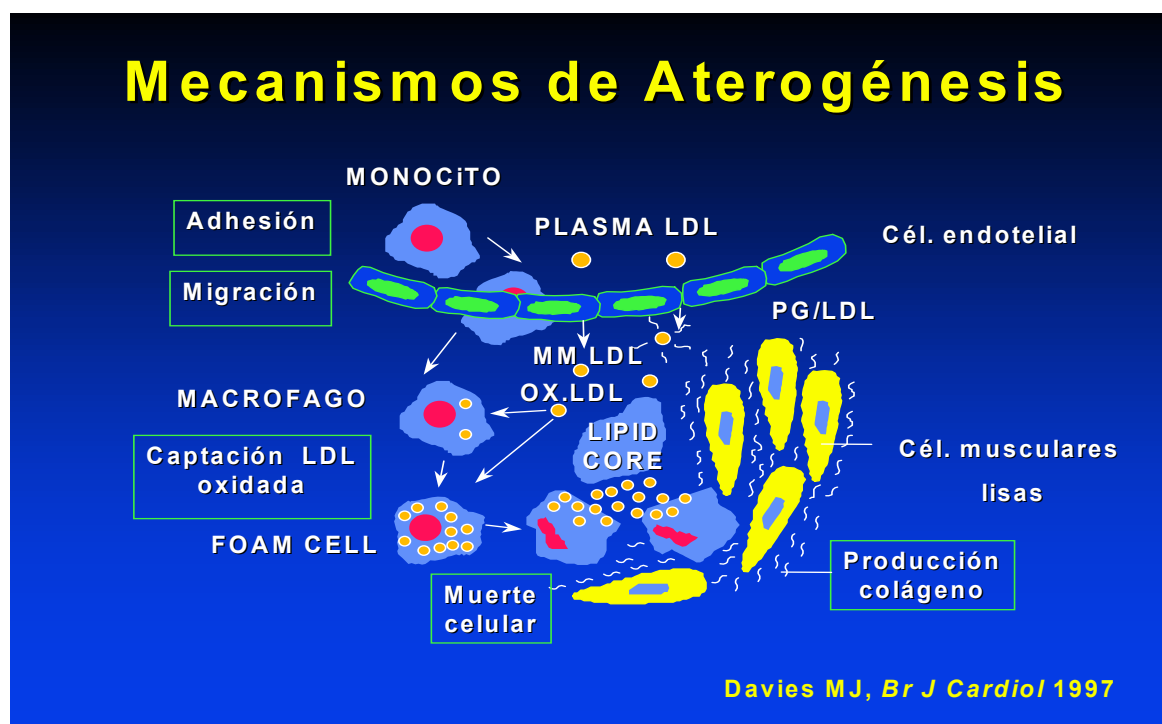
inflamatoria crónica (Ross R, 1986; 1993; 1995; 1999). Este proceso inflamatorio crónico, de origen multifactorial y de lenta evolución, viene definido por un elemento histopatológico sustancial que es la placa de ateroma (Millán J, 2000). De hecho la lesión más inicial de todas, la estría grasa, común en menores de 30 años, es una lesión inflamatoria pura constituida sólo por linfocitos T y macrófagos (Stary HC, 1994).

La disfunción endotelial sería el primer paso hacia la respuesta inflamatoria que en caso de ser excesiva nos llevaría a las lesiones avanzadas con sus complicaciones. Las causas de esta disfunción endotelial serían la hipercolesterolemia, básicamente la LDL y la Lp(a), la hipertensión arterial, los radicales libres causados por el tabaco, la obesidad central, la diabetes mellitus, los bajos niveles plasmáticos de HDL, alteraciones genéticas, niveles elevados de homocisteína, e incluso microorganismos como la *Clamidia pneumoniae* o el Herpes virus, aunque esto último no se ha podido demostrar como causa directa. Asimismo la edad, los antecedentes familiares, el sexo masculino y la menopausia también serían factores de riesgo.

El primer paso hacia la placa ateromatosa ocurre a nivel del endotelio, con un aumento de la permeabilidad del mismo a las lipoproteínas y otros constituyentes plasmáticos, con migración de leucocitos hacia la pared arterial. Esto dará paso a la formación de las células espumosas, macrófagos rellenos de lípidos, que junto a linfocitos T formarán la estría grasa. Posteriormente las células musculares lisas también migrarán hacia el endotelio y proliferarán, progresando a lesiones intermedias y avanzadas. Se formará una capa fibrosa externa por dentro de la cual quedarán los elementos celulares así como una zona necrótica en las lesiones de mayor tamaño, resultado de la apoptosis celular y de la acumulación de lípidos. La

rotura de esta capa fibrosa dará lugar a las complicaciones con aparición de hemorragias y trombosis subsiguientes, con oclusión de las arterias e infartos de los territorios irrigados. (Figura 2)

Por lo tanto lo que empezó siendo una respuesta inflamatoria protectora en forma de fibroproliferación acaba siendo excesiva y este exceso es el que produce las lesiones de ateromatosis (Ross, 1995) y sus consecuencias.

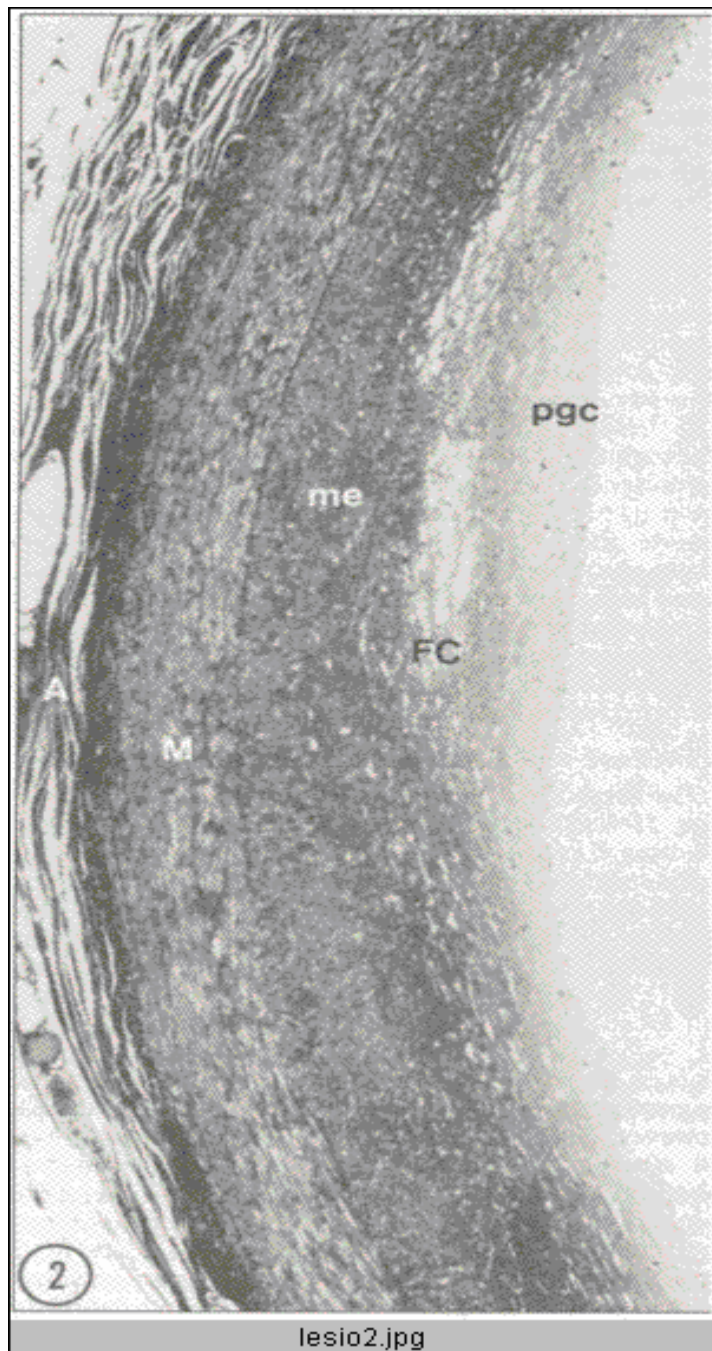


**Figura 2.** Se observan integrados todos los pasos hacia la producción de la placa de ateroma.

A partir de aquí podemos establecer la clasificación histológica de los distintos estadios de la aterosclerosis (Stary 1994, 1995):

1. Lesiones precoces:

- Tipo I: es la lesión más inicial, hallada ya en niños, y consiste tan sólo en microscópicos depósitos grasos en la íntima del vaso formando las células espumosas, de forma aislada. Estos cambios también son los hallados inicialmente en los animales de experimentación, bien sean ratas, conejos o monos.
- Tipo II: llamada estría grasa y en ocasiones ya visible a simple vista como una lesión amarillenta en la superficie de las arterias, que se tiñe con facilidad con Sudán IV, y que engrosa la íntima aunque menos de 1 mm. Aquí encontramos células espumosas en mayor cantidad dispuestas en hileras, y acompañadas ya por células musculares lisas también rellenas de lípidos, y linfocitos T en menor medida. Asimismo existen también depósitos lipídicos extracelulares aunque sólo visibles con microscopio electrónico. El 99% de los niños entre 2 y 15 años tienen estas lesiones a nivel aórtico. La mayoría de estas lesiones se encuentran situadas en los ostiums de salida de las distintas colaterales de la aorta. El ser una lesión visible a simple vista en la mayoría de los casos, ha hecho de ella la más estudiada en animales de experimentación. (Figura 3)

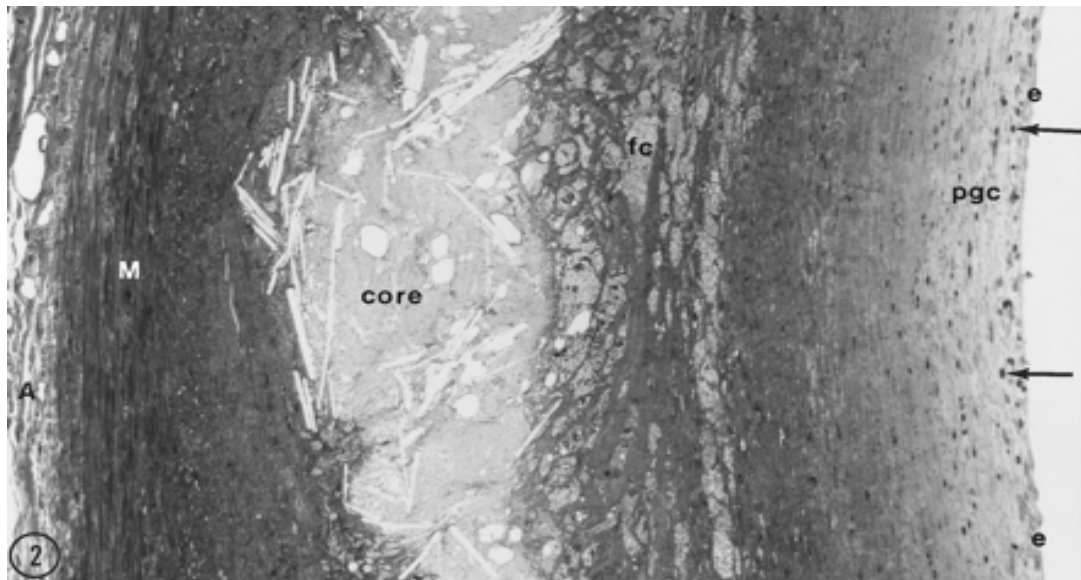


**Figura 3. Corte histológico de una arteria coronaria de una lesión tipo II. Las células espumosas se hallan por debajo de la capa de proteoglicanos de la íntima. Los lípidos que contienen las células musculares lisas no se ven a este aumento. A (adventicia). M (media). pgc (proteoglicanos). fc (foam cell, célula espumosa). Aumento X 110.**

- Tipo III: es la lesión intermedia o preateroma, caracterizada sobretodo por un mayor depósito de lípidos extracelulares visibles con microscopio convencional y que interrumpen la disposición ordenada de las células espumosas y desplazan las células musculares lisas de la íntima. Aún no existe pero un acúmulo masivo y bien delimitado de lípidos , núcleo lipídico, propio de la lesión avanzada, tipo IV o ateroma. La unión de los distintos acúmulos lipídicos de la lesión III dará lugar al núcleo lipídico .

2. Lesiones avanzadas: a partir de aquí las lesiones son potencialmente capaces de dar sintomatología y existe una desorganización estructural:

- Tipo IV: es llamada ateroma propiamente dicho y aparece a partir de la tercera década de la vida. La luz arterial puede empezar a disminuir. Existe un núcleo lipídico constituido por una acumulación bien delimitada de lípidos extracelulares a nivel de la íntima, causando una desorganización y un engrosamiento inicialmente excéntrico de la misma. Las células musculares lisas son desplazadas por este acúmulo lipídico y entre este núcleo y las células endoteliales existe la capa de proteoglicanos de la íntima infiltrada por macrófagos, linfocitos, y alguna célula muscular lisa. Cuando esta zona empieza a ser ocupada por tejido fibroso, básicamente colágeno, pasaremos a la lesión tipo V. La lesión tipo IV será susceptible de fisurarse y trombosarse por sus zonas más débiles (dando lugar a la lesión tipo VI) ,tanto en su superficie como en la periferia donde existe también un acúmulo de macrófagos, con poco colágeno. Existen además las primeras células espumosas y musculares lisas en apoptosis, y algunos capilares empiezan a rodear al núcleo lipídico. (Figura 4)



**Figura 4. Corte histológico de una arteria coronaria con una lesión tipo IV. El core corresponde al núcleo de depósitos lipídicos extracelulares. A (adventicia). M (media). e (endotelio). pgc (proteoglicanos). fc (foam cell, célula espumosa). Las flechas señalan macrófagos. Aumento X 220.**

- Tipo V: o fibroateroma. Llamada también Va. En ella encontramos una capa fibrosa bien conformada que cubre el núcleo lipídico, compuesta básicamente por colágeno sintetizado por las células musculares lisas como respuesta a la desorganización de la íntima, y que reemplaza a la matriz de proteoglicanos. Se produce a partir de la cuarta década de la vida habitualmente. Esta lesión es susceptible de fisurarse y trombosarse y además presenta una estenosis de la luz arterial en más o menos grado. El núcleo lipídico seguirá rodeándose de capilares favoreciendo las microhemorragias. A nivel de la media también se producen cambios con una disminución de las células musculares lisas y un aumento de los

macrófagos y linfocitos, y los depósitos lipídicos, lo que puede debilitar la pared arterial y facilitar la aparición de aneurismas.

- Tipo VI: son las lesiones complicadas por evolución de los tipos IV y V habitualmente, con fisuras (VIa), hemorragias (VIb), y trombosis (VIc). La morbimortalidad producida por la aterosclerosis es básicamente debida a estas lesiones. Las lesiones tipo IV y V son las más susceptibles a accidentarse debido al predominio en ellas de células espumosas, que las hacen más susceptibles de lesionarse, sobretodo a nivel de los márgenes. Las distintas lesiones y reparaciones (regresando al tipo V) que se irán produciendo con el tiempo provocarán una estenosis cada vez mayor de la luz arterial. Aunque las trombosis en general se verán favorecidas por la disrupción de las placas, en otros casos se producirán sin roturas previas favorecidas por factores predisponentes de cada individuo como un aumento del fibrinógeno, o niveles altos de la Lp(a) que inhibiría la fibrinólisis.
  
- Tipo VII: se produce cuando encontramos calcificación del núcleo lipídico o de otras partes de la lesión, predominando sobre el acúmulo lipídico. Llamada también tipo Vb.
  
- Tipo VIII: existe un predominio del tejido fibroso sobre el acúmulo lipídico, por aumento del primero y resorción del segundo. Llamada también tipo Vc.



Estos 2 últimos tipos pueden representar la fase final de la evolución de las lesiones histopatológicas de la aterosclerosis, reemplazando los depósitos lipídicos y las células muertas por colágeno o calcio o ambos. Estas lesiones también pueden reproducirse experimentalmente en animales cuando disminuimos bruscamente el aporte de colesterol.

La posibilidad de regresión de estas lesiones ha sido estudiada en experimentación animal y se ha visto que cuando los factores de riesgo son reducidos, las lesiones tipo I, II, y III pueden regresar completamente, la tipo IV de forma substancial, y los tipos V y VI pueden pasar a tipos VII y VIII (Stary, 1996).

### **Papel de los distintos elementos celulares en la placa de ateroma:**

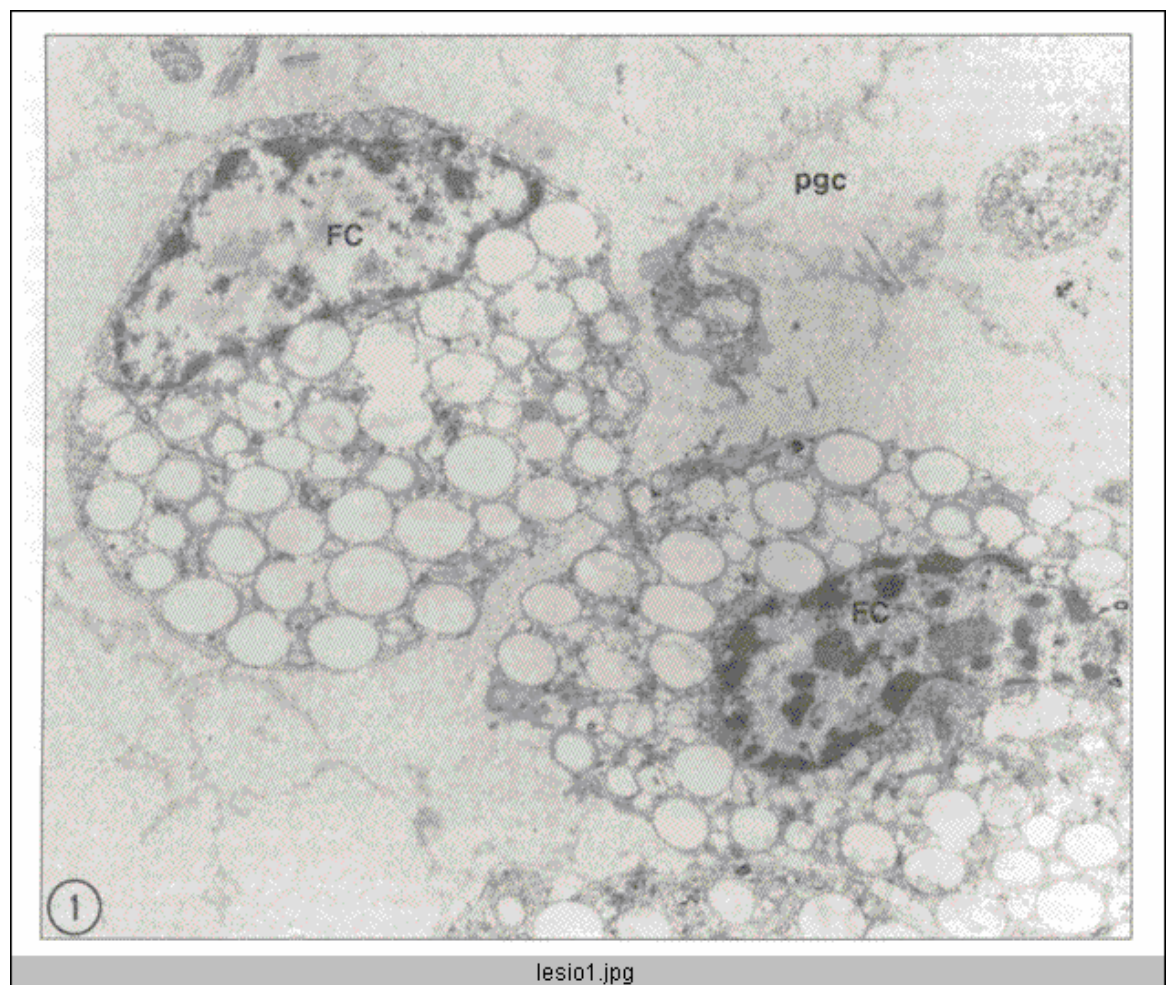
#### **1. Endotelio:**

Las células endoteliales tienen numerosas funciones además de actuar como barrera de los vasos sanguíneos (Ross R, 1995). Aportan una superficie no adherente para los leucocitos y plaquetas, actúan de barrera permeable a nutrientes, mantienen el tono vascular mediante la liberación de moléculas vasodilatadoras como el óxido nítrico y las prostaciclina, y sustancias vasoconstrictoras como la endotelina y la angiotensina II. También secretan factores reguladores del crecimiento como las citoquinas, y factores procoagulantes y anticoagulantes, así como colaboran en la formación del tejido conectivo subyacente y la membrana basal. Finalmente son capaces de oxidar o modificar las lipoproteínas y otras moléculas y transportarlas al interior de la pared arterial, que a su vez provocarán la secreción de factores quimiotácticos y factores de crecimiento para macrófagos y células musculares lisas. Si los factores reológicos

actúan de forma perenne sobre el endotelio finalmente éste perderá su capacidad de reparación quedando zonas que perderán su normal funcionamiento. Estas zonas permitirán que los leucocitos se adhieran más a la pared vascular iniciándose así el ciclo de la inflamación.

## **2. Monocitos y macrófagos:**

Los macrófagos son el principal mediador de la migración y proliferación celular en las lesiones de aterosclerosis (Ross R, 1986). Además son la principal fuente de células espumosas ya que fagocitan los lípidos y las LDL oxidadas a través de un receptor de membrana. Asimismo ellos pueden oxidar a su vez las LDL (Parthasarathy S, 1986), siendo esta forma de las LDL inductora de la aterogénesis. La replicación celular y proliferación de estas células serán muy importante para la progresión de las lesiones. También son capaces de secretar incontables factores de crecimiento, factores inhibidores del crecimiento y factores quimiotácticos, lo que los hace los principales elementos celulares de la respuesta inflamatoria. Controlar este componente sería esencial para modificar el proceso de la aterogénesis. (Figura 5)



**Figura 5. Foto de microscopia electrónica de una arteria coronaria mostrando dos células espumosas rellenas de vacuolas lipídicas. Correspondería a una lesión tipo I. pgc (proteoglicanos). FC (foam cell, célula espumosa). Aumento X 8200.**

### **3. Células musculares lisas:**

Las células musculares lisas localizadas en la capa media de la pared arterial constituyen el grueso de la misma estando encargadas de mantener el tono vascular. Con el paso de los años éstas van migrando hacia la íntima, que se encuentra situada entre el endotelio y la lámina elástica interna y que es prácticamente un espacio

virtual al nacer, ocupando dicho espacio que poco a poco va engrosando. En estas zonas es donde la placa de ateroma tendrá más tendencia a crecer. Varios estímulos determinarán una mayor o menor migración de estas células, como factores quimiotácticos y mitogénicos secretados por el endotelio y los macrófagos adyacentes. Asimismo estas células serán capaces de secretar otros factores de crecimiento como IGF-I, TGF-beta, factor estimulador de colonias monocíticas (M-CSF),...

#### **4. Linfocitos T:**

Los linfocitos T se han observado en las placas de ateroma lo que hace pensar que también deben formar parte de la respuesta inflamatoria producida (Hansson GK, 1989). Se han observado tanto CD4 como CD8, aunque todavía queda mucho por dilucidar en cuanto a este tipo celular en la placa de ateroma.

#### **5. Plaquetas:**

En todas las fases de la enfermedad se han encontrado pequeños trombos a nivel de las lesiones, sobretodo en las bifurcaciones arteriales (Davies MJ, 1988). En lesiones más avanzadas se observan ya los trombos masivos en caso de lesión endotelial, o ruptura de la placa de ateroma. Además después de un infarto parecen participar en la progresión de la lesión (Fuster V, 1990). Por lo tanto parece que las plaquetas juegan un papel permanente en las placas de ateroma que todavía está por dilucidar.

Las interacciones entre todas estas células son las que van a determinar que las lesiones progresen, regresen, o se mantengan (Ross R, 1986).

## **2.2. MENOPAUSIA Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR.**

La menopausia como tal es la última menstruación espontánea como consecuencia de la pérdida de la función ovárica, y el climaterio es el período que comprende el paso de la época reproductiva a la no reproductiva. Pese a estas definiciones el término menopausia se emplea habitualmente indistintamente del de climaterio y nosotros nos referiremos a la menopausia como el periodo posterior a la pérdida de la función ovárica. La edad de la menopausia se sitúa alrededor de los 51 años y se ha mantenido invariable a lo largo de las décadas siendo sólo afectada por el hecho de ser fumadora que la adelanta en 1-2 años (McKinley 1985). La pérdida de la función ovárica está asociada con la pérdida de la ovulación y la producción de estrógenos y andrógenos, con los síntomas y signos propios de esta época de la vida. Así nos encontramos con dos grandes grupos de síntomas : a corto plazo y a largo plazo.

Los síntomas a corto plazo vienen representados por los sangrados irregulares que se van a producir durante este periodo debido a ciclos anovulatorios básicamente hasta finalizar en la amenorrea definitiva. También aparecerán las clásicas sofocaciones, y la atrofia urogenital que favorecerá las infecciones y laceraciones, y al mismo tiempo dificultará las relaciones sexuales. Debido a todo esto nos encontraremos en ocasiones con pacientes afectas de cambios de ánimo, depresiones, y se ha relacionado incluso con pérdida de las funciones intelectuales.

En los efectos a largo plazo hallamos 2 problemas básicos. El primero de ellos es la osteoporosis y el segundo las enfermedades cardiovasculares motivo de esta tesis. La osteoporosis es la pérdida de masa ósea lo que conllevará a la larga un mayor riesgo

de fracturas óseas, básicamente vertebrales y de cadera las cuales tienen una importante morbimortalidad en pacientes ancianas.

La menopausia parece aumentar los factores de riesgo de patología cardiovascular y la prevalencia en las mujeres de la aterosclerosis. Por lo tanto, el cese de la función ovárica se ha relacionado históricamente con un incremento de las enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, en la actualidad existe controversia sobre este hecho. Los estudios descriptivos realizados hasta la fecha presentan dudas metodológicas que hacen pensar que este incremento observado esté más en relación con la edad que con la menopausia en sí (Dueñas JL, 1998).

El clásico estudio de Framingham mostró hace ya más de 20 años que la menopausia aumentaba en las mujeres el riesgo de desarrollar enfermedades cardiovasculares (Shurtleff, 1974; Gordon, 1978). La ooforectomía bilateral durante la edad reproductiva y en la premenopausia duplicaba el riesgo de enfermedad cardiovascular y las mujeres postmenopáusicas tenían un riesgo de sufrir enfermedades cardiovasculares más alto que aquellas de idéntica edad y que sin embargo aún conservaban el ciclo (Castelli, 1984; 1988). En este mismo estudio tan sólo 6 de 1600 mujeres premenopáusicas morían de enfermedad coronaria. Y una vez llegadas a la menopausia las tasas de infarto de miocardio rápidamente se acercaban a las de los hombres.

Por el contrario otro estudio ya clásico también, el de las enfermeras americanas (Colditz GA, 1987), nos venía a decir que sólo la menopausia quirúrgica aumentaba este riesgo y no así la menopausia espontánea. Esto podría venir explicado por el cese brusco de la producción hormonal en la menopausia quirúrgica, mientras en la menopausia espontánea quedaría un remanente de estrógenos que sería suficiente

para mantener el mismo riesgo cardiovascular sólo dependiente de la edad y no de la menopausia en sí.

Recientemente una revisión del tema nos aporta más datos a favor de que la menopausia por sí misma no incrementa el riesgo cardiovascular (Barrett- Connor E, 1997), sino que la patología vascular va aumentando su incidencia con el paso de los años sin cambios abruptos en la época de la menopausia.

Y ya un último artículo de 1998 hace una crítica feroz del mito de la menopausia y el incremento de riesgo cardiovascular aduciendo incluso intereses comerciales que promueven este mito y que buscan explicaciones a este supuesto aumento del riesgo cardiovascular cuando en realidad es mucho más fácil demostrar que este incremento no es real (Tunstall-Pedoe, 1998). Concluye este mismo autor, pero, aduciendo a la paradoja existente al encontrar una disminución de la mortalidad cardiovascular con el uso de la terapia de reemplazo hormonal sustitutiva en los estudios epidemiológicos realizados (Grodstein F, 1996), de difícil explicación según él ya que deberíamos encontrar una mayor incidencia de patología cardiovascular en las no tratadas si esta considerable disminución del riesgo cardiovascular en las usuarias de THS fuera cierta.

Debido a estos hechos que parecen refutar el incremento del riesgo de patología cardiovascular con la menopausia iremos ahora desglosando los distintos factores de riesgo de esta patología y viendo cómo los afecta la menopausia.

**Factores de riesgo de patología cardiovascular:**

1. La hipercolesterolemia aumenta el riesgo cardiovascular. Parece claro actualmente que a mayores niveles de colesterol mayor será la incidencia de coronariopatía. Por cada 1% de aumento del colesterol total se observará un aumento del 2% en la incidencia de coronariopatía (Lipid Research Clinics Program, 1984).

Esta hipercolesterolemia actuará básicamente a través de las LDL oxidadas (Navab M, 1996), las cuales son nocivas para el endotelio y las células musculares lisas subyacentes. La pérdida de función ovárica nos dará este aumento del colesterol a expensas básicamente de un aumento de las LDL (Castelo-Branco, 1993). La internalización de las LDL por los macrófagos llevará a cabo la formación de lípido-peróxidos facilitando la acumulación de ésteres de colesterol y la formación de células espumosas. Esto inicialmente será un mecanismo protector de los macrófagos en la respuesta inflamatoria frente a las LDL oxidadas que acabará desencadenando los procesos citados en la génesis de la placa de ateroma. A su vez pero las LDL son quimiotácticas para otros monocitos (Quinn MT, 1987) con lo cual se entrará en un círculo vicioso expandiendo la lesión inflamatoria.

Existe además una correlación negativa entre los niveles de HDL y la enfermedad cardiovascular. Estas partículas ejercen un papel importante en el transporte del colesterol desde los tejidos y las arterias hasta el hígado para su excreción posterior a la vía biliar con lo cual contribuirían a disminuir los niveles de colesterol.



Durante la menopausia se observa como la relación LDL/HDL aumenta lo cual incrementa este riesgo cardiovascular. Esto es debido a que después de la menopausia cesa la estimulación de la síntesis a nivel hepático de los receptores de las LDL con lo cual éstas aumentan su presencia en el plasma al no ser depuradas por el hígado. Pero además la lipasa hepática encargada de eliminar las HDL deja de estar inhibida por los estrógenos con lo cual aumenta el catabolismo de las mismas disminuyendo sus niveles. A su vez la apoproteína A<sub>1</sub> necesaria para la síntesis de HDL también verá disminuida su producción al dejar de estar estimulada por los estrógenos. Todo esto hace que se produzca un aumento claro de la relación LDL/HDL.

Deberíamos incluir aquí también la Lp(a), partícula lipoproteica muy similar a la LDL que contiene una glicoproteína específica, la apo(a), que se halla unida a otra apolipoproteína B<sub>100</sub> mediante puentes disulfuro. A pesar de su similar estructura a la LDL los niveles plasmáticos de una no se corresponden con los de la otra. Sus funciones aún no están definidas del todo aunque participa en el transporte del colesterol y debido también a una estructura similar al plasminógeno intervendría en la fibrinólisis. Así una misma molécula relacionaría dos de los pilares de la patología coronaria: la ateromatosis y la trombosis (Castelo-Branco C, 1996) siendo considerada como un factor de riesgo independiente de patología cardiovascular (Scanu, 1991; Danesh J, 2000). Esta lipoproteína además podría actuar directamente sobre las células endoteliales, macrófagos y células musculares lisas (Grainger, 1993). Diversos estudios epidemiológicos han mostrado como aumenta con la menopausia (Kim, 1996),

siendo otro factor de riesgo añadido incluso de mayor importancia que en hombres.

Todas estas modificaciones vendrían además determinadas por la alteración a nivel hepático de la síntesis de las apoproteínas debido al déficit estrogénico que alteraría la expresión genética de su síntesis a este nivel.

2. La hipertrigliceridemia también aumenta el riesgo cardiovascular, siendo un factor de riesgo independiente en mujeres (Castelli, 1986 ; Bass, 1993). La hipertrigliceridemia aumenta la resistencia a la insulina y la producción de LDL con lo que aumenta el riesgo ateroesclerótico. Los estrógenos favorecen la eliminación postprandial de los triglicéridos (Tollin, 1985) lo cual significa que una vez instaurada la menopausia estos verían incrementados sus niveles plasmáticos por falta de eliminación.
3. La hipertensión arterial. La mayoría de pacientes con hipertensión arterial presentan niveles elevados de angiotensina II la cual es un potente vasoconstrictor , pero que además es capaz de estimular el crecimiento de las células musculares lisas (Chobanian AV, 1996), así como la oxidación de las LDL lo que en conjunto favorece la aparición de aterosclerosis. La menopausia de todas formas no parece afectar la tensión arterial por sí misma sino tan sólo por el aumento de edad que comporta habitualmente (Tikkanen MJ, 1993).
4. La diabetes mellitus y resistencia a la insulina: la insulina en sí misma no es una sustancia aterógena , pero la resistencia a la misma y su aumento constituyen un factor de riesgo independiente de patología cardiovascular, ya que ello

predispone a un aumento de triglicéridos plasmáticos, con un aumento de LDL y una disminución de HDL, hipertensión arterial, hiperuricemia, y aumento del PAI-1 (inhibidor 1 de la activación del plasminógeno), conocido en conjunto como “síndrome metabólico”, aumentando la patología cardiovascular (Reaven, 1995). La insulina estimula la síntesis de VLDL en el hígado, lo que explica asimismo que la hipertrigliceridemia se haya relacionado con la resistencia a la insulina. Además esto se verá favorecido por la menor acción de la insulina sobre la lipoproteinlipasa lo cual eliminará menos VLDL, y a una mayor actividad de la lipasa hepática que dará lugar a una disminución de HDL. La insulina actúa también directamente sobre la pared vascular a través de los factores de crecimiento que estimula aumentando la proliferación de células musculares lisas, la unión de las LDL a sus receptores, y sobre el sistema hemostático aumentando el factor VII, el fibrinógeno y el PAI-1 (Skouby, 1998). La menopausia parece estar en relación, también independientemente de la edad, con este incremento de la resistencia a la insulina (Walton, 1993), y sería otro factor que incrementaría el riesgo de aterosclerosis.

5. La obesidad: el aumento y redistribución de la grasa corporal a nivel central puede contribuir a un incremento de la resistencia a la insulina (Ley, 1992) y por lo tanto a diabetes mellitus, así como a mayor hipertensión, aumento de las LDL y disminución de las HDL (Haarbo, 1989). De todas formas la obesidad parece ser que no estaría en relación con la menopausia sino con el incremento de edad (Wing, 1991), pasando de una distribución de la grasa corporal de tipo ginoide (de predominio en caderas) a una distribución androide (de predominio en tronco) con mayor riesgo cardiovascular.

6. Hábito tabáquico: es el factor de riesgo prevenible más importante para las enfermedades cardiovasculares en la mujer. Es responsable del 21% de todas las muertes de causa cardiovascular y del 50% de toda la morbilidad coronaria en mujeres menores de 55 años (Hammond, 1996). Además es dosis dependiente.
7. La homocisteína es un aminoácido derivado de la metionina que ingerimos a través de las proteínas animales y también se vería incrementada por la menopausia (Hankey, 1999). Esta sustancia es tóxica para el endotelio incrementando la producción de colágeno, siendo protrombótica y disminuyendo el óxido nítrico (Ross R, 1999), por lo que niveles elevados de la misma tienen mayor riesgo de aterosclerosis (Verhoef P, 1995).
8. La proteína C reactiva: es un reactante de fase aguda que se está relacionando recientemente con la aterosclerosis enlazando con la teoría inflamatoria de la placa de ateroma. Aunque no queda claro cómo actuaría, sí se ha identificado como un factor de riesgo independiente de enfermedades cardiovasculares (Lagrand, 1999). No hay datos que demuestren que sus concentraciones aumenten con la menopausia aunque curiosamente sí están apareciendo estudios en que esta proteína se vería incrementada con el uso del tratamiento hormonal sustitutivo (Ridker, 1999).
9. Infección por *Chlamidia pneumoniae*: numerosos estudios epidemiológicos han relacionado esta infección con las enfermedades cardiovasculares pero aún no queda probado que este microorganismo pueda ser causante de aterosclerosis o sea un hallazgo casual (Danesh, 1997). Recientes pequeños estudios muestran que el tratamiento con azitromizina reduciría la morbimortalidad cardiovascular

pero hasta el año 2003 no estarán finalizados 2 grandes ensayos randomizados que aportarán más luz sobre este tema (Grayston, 2000).

Todos estos factores de riesgo influyen en la patología cardiovascular, y algunos de ellos se modifican como hemos visto con la menopausia debido al déficit estrogénico. Hasta hace poco se creía que lo que determinaba básicamente el supuesto mayor riesgo en las mujeres postmenopáusicas eran las alteraciones del perfil lipídico, pero según los estudios epidemiológicos este hecho sólo era la causa de una tercera parte de los efectos beneficiosos de los estrógenos (Grady, 1992), por lo que se empezaron a estudiar los posibles efectos directos de los estrógenos sobre la pared vascular directamente (Mendelsohn, 1994).

Existen 2 tipos de receptores estrogénicos,  $\alpha$  y  $\beta$ , que forman parte de los receptores hormonales esteroideos. Estos dos receptores presentan gran homología y como todos los receptores esteroideos son factores de transcripción que alteran la expresión genética cuando son activados al unirse a ellos los estrógenos. Tanto las células endoteliales, como las células musculares lisas como las células miocárdicas presentan ambos tipos de receptores, y la relación entre ellos determinará una compleja regulación de la expresión genética en estas células, para proteger al vaso de las noxas capaces de producir la aterosclerosis (Mendelsohn ME, 1999). Además existen otras proteínas conocidas como coactivadores que también pueden modificar esta expresión genética (Shibata, 1997).

Así nos encontramos que el endotelio es capaz de liberar óxido nítrico en respuesta a determinados estímulos causando vasodilatación (Moncada, 1993), y que esta liberación de óxido nítrico puede venir determinada por el estímulo estrogénico

(Guetta, 1997). Además los estrógenos aumentan la expresión de genes para la síntesis de moléculas vasodilatadoras como la prostaciclina o el propio óxido nítrico (Weiner, 1994), y contribuirían a inhibir la proliferación y migración de las células musculares lisas del vaso, y a incrementar el crecimiento de las células endoteliales dañadas impidiendo la apoptosis celular (Mendelsohn, 1999). Todas estas acciones han sido estudiadas en animales de experimentación observando además como el tratamiento con estrógenos no afectaba o variaba muy poco las concentraciones de lípidos plasmáticos (Hanke, 1996) con lo cual se refuerza aun más la idea de que los estrógenos actúan de forma directa a nivel del vaso.

Los estrógenos actúan también sobre el equilibrio hemostático y su déficit favorecería un incremento de diversos factores de la coagulación dando lugar a un aumento del riesgo de morbimortalidad cardiovascular (Palacios, 1999). Ya el estudio de Framingham demostraba como los niveles de fibrinógeno eran predictores de enfermedad cardiovascular (Kannel, 1987) y estos se ven incrementados con la menopausia. El sistema hemostático es el encargado de proteger la integridad vascular en caso de una lesión del endotelio. Esto que en un principio es un mecanismo de defensa puede convertirse en nocivo en caso de ser excesivo como hemos visto en la clasificación de la aterosclerosis. En condiciones normales existe un equilibrio entre el sistema de la coagulación y el sistema de la fibrinólisis pero una vez alcanzada la menopausia parece que habría un estado de hipercoagulabilidad con un aumento de los factores VII y del fibrinógeno (Lee, 1993; Gilabert, 1995) así como del inhibidor 1 de la activación del plasminógeno (PAI-1) (Ridker, 1997) lo

cual podría contribuir también a esta mayor morbimortalidad cardiovascular (Meade, 1993).

### **2.3. TERAPIA HORMONAL SUSTITUTIVA Y ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR.**

Se han realizado gran cantidad de estudios para evaluar el efecto de la THS sobre la patología cardiovascular aunque pocos de ellos han sido suficientemente bien diseñados como para que se puedan obtener conclusiones con facilidad.

A continuación revisaremos los distintos estudios que se han llevado a cabo o se están llevando a cabo en la actualidad, en función de haber sido randomizados o no.

#### **2.3.1. Estudios clínicos sobre marcadores de riesgo de patología cardiovascular.**

##### **2.3.1.1. Estudios no randomizados.**

En el marco actual de la medicina basada en la evidencia son de peso inferior si los comparamos con los estudios randomizados que citaremos más adelante.

La mayoría de los estudios se han centrado en el perfil lipídico, factores referentes a la hemostasia, y metabolismo hidrocarbonado. Otros hacen referencia a cambios en la presión arterial, función cardíaca, o tono vascular. Más recientemente encontramos estudios sobre los nuevos marcadores de riesgo cardiovascular como la PCR, la homocisteína, y la lipoproteína (a). De todas formas sólo nos referiremos a aquellos que por sus características tengan especial importancia y de los cuales recientemente no disponíamos de estudios randomizados. Nos

referimos básicamente a los estudios que inciden sobre el funcionalismo arterial o cardíaco, o sobre la medición de la placa de ateroma bien sea desde un punto de vista ecográfico o por angiografía.

Entre los primeros podemos citar el estudio de McCrohon, que incluía 55 mujeres que habían realizado THS con estrógenos, bien sólo o combinados con gestágenos, durante 2 años. Se comparó con un grupo control y se midió el flujo vascular a nivel braquial observando una mejoría del mismo en las pacientes que habían usado THS (Mc Crohon, 1996). Asimismo en un grupo de 26 mujeres se midió el óxido nítrico, el cual se observó aumentado en las mujeres tratadas con estrógenos solos, y no al añadir un gestágeno (Imthum B, 1997). Este efecto vasodilatador también lo podemos observar a nivel de las arterias coronarias (Speroff, 1996).

Si nos centramos en pruebas de esfuerzo cardíacas encontramos tanto estudios a favor (Rosano, 1992) como en contra (Sbarouni, 1997; Lee M, 1997) del THS. Estos 2 últimos estudios sí eran randomizados aunque sólo contaban con 10 y 16 pacientes respectivamente. El estudio de Sbarouni trataba con estrógenos conjugados equinos o placebo durante 4 semanas a pacientes cardiopatas sin hallar diferencias en la prueba de esfuerzo. Lee hacía lo mismo pero en pacientes sanas sin hallar tampoco diferencias.

Si hacemos referencia a la medición de placas de ateroma encontramos varios estudios en los cuales mediante la medición de las placas de ateroma a nivel carotídeo con ecografía se veía su disminución con el uso de THS (Espeland, 1995; Jonas, 1996; Muscat Baron, 1997).



Otra forma de evaluar de forma directa las placas de ateroma es a través de la coronariografía. Encontramos hasta 4 estudios a favor del THS en cuanto a disminución del grosor de la placa de ateroma (Sullivan, 1988; Gruchow, 1988; McFarland, 1989; Hong, 1992). Se está realizando un estudio randomizado llamado WAVE (Women Atherosclerosis Vitamin E Trial) que aportará más datos sobre este aspecto y que combinará THS y vitamina E. Un estudio finalizado recientemente es el llamado ERA (Estrogen Replacement and Atherosclerosis) que comentaremos más adelante.

#### **2.3.1.2. Estudios randomizados.**

Estos estudios ofrecen una mejor evidencia científica pero no inciden tampoco en lo que realmente interesa que es la morbimortalidad cardiovascular aunque por su correcto diseño aportan una información más válida. Citaremos aquellos que por sus hallazgos, su número de casos incluidos, o por su novedad en el momento de la publicación puedan tener interés.

Entre ellos cabe destacar un estudio ya clásico, el estudio PEPI (The Postmenopausal, Estrogen/Progestogen Intervention Trial, 1995), probablemente el estudio randomizado de marcadores de riesgo cardiovascular más amplio realizado hasta la fecha. En este estudio se randomizaron 875 mujeres postmenopáusicas sanas en 5 grupos: 1) placebo; 2) estrógenos conjugados equinos (0.625 mg./día); 3) estrógenos conjugados equinos (0.625 mg./día) más acetato de medroxiprogesterona cíclica (10 mg./día durante los 12 primeros días de cada mes); 4) estrógenos conjugados equinos (0.625 mg./día) más acetato de medroxiprogesterona continuo (2.5 mg./día); y 5) estrógenos conjugados equinos

(0.625 mg./día) más progesterona micronizada cíclica (200 mg./día durante los 12 primeros días de cada mes). Las pacientes fueron seguidas durante un total de 3 años con el objetivo de cuantificar marcadores de riesgo cardiovascular. Todos los tratamientos aumentaron el colesterol-HDL y disminuyeron el colesterol-LDL, observándose también un aumento de los triglicéridos siempre respecto al placebo. Los niveles de fibrinógeno fueron mayores en el grupo placebo. No hubo variaciones significativas en cuanto a la presión arterial ni en las cifras de insulina. Es de destacar en este estudio el riesgo de hiperplasia endometrial asociada al tratamiento con estrógenos solos. En conjunto el perfil más favorable se obtenía con el grupo tratado con estrógenos conjugados equinos más progesterona micronizada cíclica.

Este estudio ha visto ampliado sus resultados con la publicación de los efectos sobre marcadores de inflamación como la proteína C reactiva, la selectina E, el factor de Von Willebrand y el factor de coagulación VIIIc (Cushman, 1999). Así vemos como aumenta la proteína C reactiva, disminuye la selectina E, y no modifica los otros 2 factores. Globalmente el aumento de la proteína C reactiva es mucho más marcado que la disminución de la selectina E y por su mayor importancia induce a pensar en un posible efecto deletéreo del tratamiento hormonal a este nivel. También se ha hecho un reanálisis para valorar los efectos sobre la homocisteína, sin hallar diferencias significativas a los 3 años respecto al placebo, aunque sí los primeros doce meses (Barnabei, 1999).

Otro estudio sobre marcadores de inflamación evaluó el ICAM-1 (molécula de adhesión intercelular tipo 1) la cual parece ser importante en las primeras fases de la aterosclerosis. Se randomizaron 37 mujeres tratadas con estrógenos orales o

transdérmicos cíclicos junto a progesterona micronizada durante 6 meses y se observó como el tratamiento oral era capaz de disminuir esta molécula aunque no así el tratamiento transdérmico (Scarabin, 1999).

Previamente al estudio PEPI otro grupo randomizaba 61 mujeres tratadas con tratamiento combinado cíclico, oral o transdérmico versus un grupo control de 29 mujeres y las seguía durante 6 meses, observando como el tratamiento transdérmico era capaz de disminuir los triglicéridos al contrario que el tratamiento oral (Crook, 1992).

Y anteriormente a este estudio un pequeño trabajo de 40 mujeres tratadas con estrógenos orales encontraba similares cambios en el perfil lipídico (Walsh, 1991), siendo probablemente uno de los primeros estudios randomizados publicados.

Castelo-Branco también estudió el perfil lipídico randomizando hasta 90 mujeres tratadas con estrógenos orales o transdérmicos junto a acetato de medroxiprogesterona observando incrementos del colesterol-HDL, y disminución de los triglicéridos sólo con el tratamiento transdérmico (Castelo-Branco, 1993; 1995).

Encontramos algún estudio de oxidación, en que tratando a las pacientes con estrógenos conjugados equinos, estrógenos transdérmicos, y tratamiento combinado durante un mes no se afectaba la oxidación de la LDL (Koh, 1997). La poca duración de este estudio pero le concede poco valor.

Dentro de los factores hemostáticos podemos encontrar 2 estudios que hacen referencia al factor VII, con un aumento de este factor con estrógenos aunque no con tratamiento combinado (Lobo, 1994; Medical Research Council's General

Practice Research Framework, 1996). Ambos estudios que carecían de un grupo placebo demostraron un aumento del C-HDL, una disminución del C-LDL, y un aumento de los triglicéridos que se contrarrestaba al añadir progesterona (a diferencia de lo que ocurría en el estudio PEPI).

También se han estudiado dentro del campo de la hemostasia otros marcadores en estudios randomizados aunque con escaso número de casos. Comparando 2 dosis de estrógenos conjugados equinos (0.625 mg. o 1.25 mg./día) con placebo se observaron aumentos de los fragmentos 1 y 2 de la protrombina, del fibrinopéptido A, y de la proteína C, con disminuciones de la antitrombina III y la proteína S (Caine, 1992), suponiendo en conjunto una activación de la coagulación. Posteriormente otro estudio comparando estrógenos conjugados equinos con estrógenos transdérmicos encontró similares efectos con disminución también del PAI-I (Kroon, 1994).

Recientemente un estudio de Alwers y col. (Alwers, 1999) randomiza 104 mujeres perimenopáusicas y postmenopáusicas tratadas con: 1) estrógenos conjugados equinos (0.625 mg./día durante 21 días) más acetato de medroxiprogesterona (5 mg./día del día 12 al 21) o 2) valerianato de estradiol (2 mg./día durante 21 días) más acetato de ciproterona (1 mg./día del día 12 al 21). En ellas cuantifica niveles de lípidos y las sigue durante 1 año, encontrando básicamente un aumento del colesterol-HDL y una disminución del colesterol-LDL respecto a los valores iniciales sin diferencias entre ambos grupos.

También recientemente se ha publicado el único estudio randomizado hasta la fecha sobre funcionalismo arterial (Westendorp, 2000). En él se estudian durante 2 años 99 mujeres perimenopáusicas randomizadas para recibir 17-beta-estradiol

+ desogestrel, estrógenos conjugados equinos + norgestrel, o placebo. Con ecografía a nivel carotídeo se evaluó la complianza y distensibilidad, no encontrando diferencias entre ninguno de los 3 grupos, hallazgo opuesto a la mayoría de estudios observacionales realizados anteriormente, aunque tampoco queda claro el valor real de este hallazgo en cuanto a morbimortalidad cardiovascular se refiere.

Previamente un pequeño estudio de 25 mujeres con síndrome X tratadas con estradiol transdérmico o placebo durante 8 semanas de forma alterna, encontró una disminución de los episodios de dolor torácico aunque no había diferencias en la tolerancia al ejercicio (Peters, 1994).

También se han realizado estudios (Sbarouni, 1998; Herrington, 1999) combinando THS y estatinas en un intento de sumar los beneficios de ambos tratamientos. Así encontramos 2 estudios de pequeño tamaño, con 24 y 16 mujeres, y de corta duración (3 meses) tratadas con simvastatina o lovastatina además del THS. Ambos tratamientos eran capaces de mejorar el perfil lipídico respecto a un grupo placebo, así como en el estudio de Herrington la vasodilatación a nivel braquial medida por ecografía.

Recientemente ha finalizado un estudio que utilizaba como punto final la medición por ecografía de las placas de ateroma a nivel carotídeo. Randomizaron 321 mujeres durante 1 año tratadas con estradiol y gestodeno sin encontrar diferencias en cuanto a la progresión de la placa de ateroma, con disminuciones del colesterol-LDL y del fibrinógeno (Angerer, 2001).

Otra molécula utilizada en THS, la tibolona, también cuenta con estudios randomizados.

Uno de ellos (Milner, 1996) estudia el perfil lipídico comparando 113 mujeres divididas en 3 grupos: 1) tibolona 2.5 mg./día; 2) estrógenos conjugados equinos (0.625 mg./día durante 28 días) más norgestrel (0.15 mg./día 12 días); y 3) placebo. Las mujeres fueron tratadas durante 2 años con los siguientes hallazgos más relevantes: el tratamiento con tibolona disminuye el colesterol total pero a expensas tanto del C-HDL como del C-LDL, y la lipoproteína (a) disminuye con ambos tratamientos.

Bjarnason agrupa 91 mujeres randomizadas en 3 grupos: 1) tibolona, 1.25 mg./día; 2) tibolona, 2.5 mg./día; y 3) placebo (Bjarnason, 1997). Las mujeres fueron seguidas durante 2 años con los siguientes hallazgos: la tibolona provocaba una disminución del C-HDL y de los triglicéridos sin cambios en el C-LDL ni la lipoproteína(a). Además disminuía el PAI-1, y el fibrinógeno, con un incremento del plasminógeno. En esta misma línea Parkin (Parkin, 1987) randomizó 91 pacientes con hallazgos similares, con un aumento global de la fibrinólisis sin afectar a la coagulación.

Un estudio (Al-Azzawi, 1999) más amplio aunque carece de grupo control agrupa a 235 mujeres tratadas con tibolona (2.5 mg./día) o con valerianato de estradiol (2mgr./dia) más noretisterona (0.7 mg./día) durante 1 año. Hallan una disminución del C-LDL con el tratamiento combinado, y una disminución del C-HDL con ambos tratamientos aunque más marcada con tibolona. No encuentran diferencias en cuanto al fibrinógeno.

Los últimos estudios datan del pasado año. Uno hace referencia también al sistema hemostático con similares hallazgos a Bjarnason. Incluyen 60 mujeres

tratadas con tibolona, 2.5 mg./día, tratamiento combinado continuo , o placebo durante 6 meses, y encuentran asimismo un perfil fibrinolítico (Winkler, 2000).

En otro estudio se randomizaron 29 mujeres postmenopáusicas hipertensas que fueron seguidas durante 6 meses sin hallarse cambios respecto a la presión arterial, y hallazgos ya anteriormente citados como la disminución del C-HDL, triglicéridos y fibrinógeno (Lloyd, 2000).

Finalmente nuestro grupo randomizó hasta 120 mujeres de las cuales 23 eran tratadas con tibolona seguidas durante 1 año, observando también la disminución del colesterol, a expensas tanto del C-LDL como del C-HDL, así como una disminución de los triglicéridos (Castelo-Branco, 2000).

Actualmente está a punto de finalizar un estudio de 3 años de duración, que incluye 756 mujeres divididas en tres grupos (placebo, tibolona y estrógenos conjugados equinos más acetato de medroxiprogesterona) que tiene como punto final la medición de la placa de ateroma a nivel carotídeo mediante ecografía (Crook, 2000). Un estudio randomizado (Doren, 2000) que incluía 100 mujeres no consiguió demostrar efectos beneficiosos de la tibolona en la vascularización pélvica aunque es difícil valorar si la respuesta de esta vascularización será igual a la coronaria. Está también iniciándose este año un estudio randomizado para valorar la función cardíaca.

Para finalizar nos detendremos en los estudios realizados con raloxifeno, del grupo de los SERM (Selective Estrogen Receptor Modulator). Por orden cronológico en el primer estudio realizado (Walsh, 1998) se estudiaron lípidos y factores de coagulación. Se randomizaron un total de 390 mujeres divididas en 4 grupos: 1) raloxifeno 60 mg./día; 2) raloxifeno 120 mg./día; 3) estrógenos

conjugados equinos (0.625 mg./día) más acetato de medroxiprogesterona (2.5 mg./día); y 4) placebo. Las pacientes fueron seguidas durante 6 meses con los siguientes hallazgos: el raloxifeno disminuía los niveles de C-LDL, lipoproteína(a), y fibrinógeno, sin alterar el C-HDL ni los triglicéridos, ni tampoco el PAI-1. El THS convencional disminuía el C-LDL y la lipoproteína(a), y aumentaba el C-HDL, los triglicéridos, y el PAI-1, sin afectar al fibrinógeno. Ninguno de los tratamientos modificó el fibrinopéptido A ni los fragmentos 1 y 2 de la protrombina.

Un estudio similar (Valk-de Roo, 1999) aunque con menos pacientes con 2 años de seguimiento, randomizaba 56 mujeres histerectomizadas en 4 grupos también: 1) raloxifeno 60 mg./día; 2) raloxifeno 150 mg./día; 3) estrógenos conjugados equinos (0.625 mg./día); y 4) placebo. En este caso ambos tratamientos disminuían el C-LDL y el fibrinógeno. Los estrógenos aumentaban el C-HDL y disminuían el PAI-1, pero también aumentaban la PCR, los triglicéridos, y los fragmentos 1 y 2 de la protrombina, a diferencia del raloxifeno que no los modificaba. Ninguno de los 2 tratamientos alteraba la presión arterial, ni los niveles de glucosa o insulina. Cabe resaltar de este estudio la falta de un progestágeno debido a que se estudiaron sólo mujeres histerectomizadas y aunque el tiempo de seguimiento era largo el número de casos por grupo era bastante escaso.

Finalmente se amplió el estudio de Walsh para estudiar PCR y homocisteína (Walsh, 2000). A los 6 meses se encontraron estos resultados: ambos tratamientos reducían la homocisteína, pero mientras el raloxifeno no afectaba la PCR, ésta se veía incrementada por el THS convencional.



Existen también otros SERMs que han sido evaluados en estudios randomizados de riesgo cardiovascular. Así el tamoxifeno (Cushman, 2001) disminuía el colesterol, el fibrinógeno y la PCR; y el droloxifeno (Herrington, 2000) reducía el colesterol-LDL, la Lp(a), y el fibrinógeno, con un aumento del flujo arterial braquial.

Con todos estos trabajos de marcadores de riesgo cardiovascular podemos observar como según el marcador estudiado y los tratamientos utilizados el perfil cardiovascular que nos ofrece el tratamiento hormonal sustitutivo puede ser muy diverso. En general podemos decir que existe una plausibilidad biológica que nos hace pensar en una disminución del riesgo cardiovascular tanto a nivel lipídico, como hemostático, así como de respuesta vascular, con dudas respecto a lo que puede significar la acción de los distintos preparados gestagénicos (Chae, 1997). Todo esto hace evidente la necesidad de trabajos que incidan en hechos clínicamente relevantes de morbimortalidad cardiovascular.

### **2.3.2. Estudios epidemiológicos sobre morbimortalidad cardiovascular.**

#### **2.3.2.1. Estudios no randomizados.**

Estos estudios son los que han marcado la pauta de prescripción de tratamiento hormonal para esta causa debido a que los estudios realizados inicialmente mostraban incluso una disminución de la morbimortalidad cardiovascular de hasta un 50% en las usuarias de este tratamiento. Como veremos estos estudios epidemiológicos y observacionales están marcados por una gran cantidad de sesgos por lo cual sus resultados son de una menor evidencia científica.

Los primeros grandes estudios los encontramos a finales de los años 80 y inicios de los 90. Así tenemos 4 estudios de cohortes :

1. Lipid Research Clinics Program Follow-up Study (Bush, 1987): se estudiaron 2270 mujeres durante 8.5 años encontrando un riesgo relativo (RR) de muerte por enfermedad cardiovascular de 0.33 (IC=0.12-0.81) en aquellas pacientes usuarias de estrógenos.
2. Hunt, 1987: se siguieron 4544 mujeres tratadas al menos durante 1 año con estrógenos encontrando un RR de 0.44 (IC=0.28-0.59).
3. Leisure World Study (Henderson, 1991): se estudió una cohorte de hasta 8881 mujeres de una comunidad de retiro de California durante 7.5 años, con un RR de 0.8 (IC=0.7-0.87), con una protección que aumentaba si las mujeres eran cardíopatas.
4. Nurses' Health Study (Stampfer, 1991): probablemente por su magnitud y sus resultados este estudio es el que más ha influido en todo lo que hace referencia a tratamiento hormonal sustitutivo y morbimortalidad cardiovascular. Además este estudio todavía está en vigor y van surgiendo nuevos resultados y publicaciones a partir de la misma cohorte. Este estudio se estableció en 1976 a partir de 121.700 enfermeras estadounidenses de entre 30 y 55 años. Se basaba en cuestionarios que las enfermeras debían rellenar cada 2 años sobre historia médica y hábitos de vida. En los primeros resultados se siguieron durante 10 años un total de 48.470 mujeres. Se encontró un RR de enfermedad coronaria grave de 0.56 (IC=0.4-0.8) , con un RR de mortalidad por enfermedad cardiovascular de 0.72 (IC=0.55-0.95), en las usuarias de estrógenos.

Finalmente llegamos a lo que es el primer gran metaanálisis de referencia (Stampfer, 1991) , en el cual se analizaron hasta 31 estudios de caso-control y cohortes, hallando un RR de 0.5 (IC=0.43-0.56) de padecer una enfermedad cardiovascular tanto coronaria como cerebrovascular en usuarias de THS. Este metaanálisis fue ampliado posteriormente por el mismo grupo con similares resultados (Grodstein, 1995). Entre los 2 metaanálisis apareció otro también con parecidos resultados (Grady, 1992). Cabe decir que estos metaanálisis están basados a su vez en estudios observacionales y que por lo tanto presentan todos los sesgos asociados a este tipo de estudios. Clásicamente se ha dicho que las pacientes usuarias de tratamiento hormonal serían aquellas pacientes más preocupadas por su salud, mejor controladas, y con una mayor calidad de vida que las no usuarias, y que esto de por sí ya podría determinar una disminución del riesgo cardiovascular, por un sesgo de selección. Así las usuarias de THS serían menos obesas, menos fumadoras , beberían algo de alcohol, y tendrían una mayor actividad física, visitando además de forma más regular a su médico (Taskinen, 1998). Incluso se ha hecho referencia a un sesgo de cumplimiento, en que las pacientes que hacen un tratamiento correctamente ven disminuir la patología que quieren tratar (Petitti, 1994). Además inicialmente la THS era prescrita tan sólo a pacientes sanas, es decir, sin hipertensión, diabetes u otras patologías.

En la última publicación realizada del Nurses' Health Study , (Hu, 2000) hay incluidas un total de 85941 mujeres sin patología cardiovascular previa seguidas durante 14 años. Las mujeres usuarias actuales de tratamiento hormonal sin patología previa tienen un RR de 0.73 (IC=0.6-0.88) de enfermedad coronaria

según los últimos resultados. Esta población al tratarse de enfermeras es poco extrapolable a la población general y esto ha hecho que el estudio haya sido muy criticado, aunque su poder estadístico debido al gran número de mujeres incluidas hace que sea de referencia siempre. Grodstein hace referencia a este posible sesgo de selección y aún así considera que el efecto protector hormonal existe realmente (Grodstein, 1996). Esta misma autora redonda en el beneficio de la THS en 2 publicaciones más (Grodstein, 1996; 1997), que amplían el número de pacientes y el tiempo de seguimiento hasta 16 años. Aquí incluso se menciona que las pacientes con algún factor de riesgo cardiovascular serían las más beneficiadas con el uso del THS. Y que la mortalidad global a partir de 10 años de uso se vería incrementada secundariamente a un aumento del cáncer de mama, con una disminución de los posibles efectos beneficiosos del THS.

Estos resultados contrastan con los datos del Kaiser Permanent Medical Care Program de California que no encuentran beneficios con el uso de estrógenos o estrógenos más progestágenos en cuanto a riesgo de infarto de miocardio (Sidney, 1997).

Otra de las críticas realizadas en estos estudios es que en general están basados en tratamiento únicamente con estrógenos y no hacen referencia al tratamiento más comúnmente utilizado que es el combinado estroprogestagénico. Encontramos 2 estudios que sí hacen referencia explícita del tratamiento combinado manteniéndose la protección con una disminución del riesgo de infarto de miocardio (Falkeborn, 1992; Psaty, 1994) . Destaca de la cohorte de Falkeborn, ubicada en Suecia, el número de mujeres estudiadas de hasta 23.000. El Nurses' Health Study también los analiza por separado encontrando también RR

protectores (Grodstein, 1996). Y en 1998 se publica otro metaanálisis que mantiene los efectos protectores tanto del THS sólo con estrógenos como combinado (Barrett-Connor, 1998).

Mención aparte merecen los estudios realizados por Sullivan en pacientes postmenopáusicas con estenosis severas medidas por coronarioangiografía o sometidas a by-pass coronario (Sullivan, 1990, 1994, 1997). En los 3 estudios se demuestra una reducción de la mortalidad asociada al uso de THS aunque son estudios observacionales y no carentes de sesgos. En esta misma línea está el ya mencionado anteriormente Leisure World Study (Henderson, 1991) basado también en estudios angiográficos.

Si nos referimos únicamente a accidente cerebrovascular encontramos menos trabajos con un número de casos suficientes para ser valorados. Uno de ellos es el propio Nurses' Health Study (Grodstein, 1996), que no halla beneficios, y más reciente otro que tampoco encuentra beneficios con el uso de preparados hormonales (Tonnes Pedersen, 1997). El metaanálisis de Grady (Grady, 1992) resume los estudios previos a 1990 y encuentra un RR de 0.96 (IC= 0.82-1.13), o sea, sin efecto protector. Posteriormente hay 2 estudios que sí encuentran una reducción de los accidentes cerebrovasculares (Falkeborn M, 1993; Finucane, 1993).

Como hemos visto, la mayoría de estos estudios apuntan en la dirección del efecto protector del tratamiento hormonal sobre la patología cardiovascular. Incluso se han referido resultados en cuanto a la mejora de la supervivencia global en las usuarias de THS durante menos de 10 años (Grodstein, 1997) lo que nos lleva otra vez a la discusión de si la causa de todo esto es que las usuarias son precisamente

las pacientes más sanas. Para intentar solucionar todas estas dudas se empezaron a realizar a finales de los años 90 los estudios randomizados que referiremos a continuación.

### **2.3.2.2. Estudios randomizados.**

Es notoria la escasez de estudios epidemiológicos randomizados de este tipo. La mayoría se han iniciado a finales de la década de los noventa y esto hace que todavía no dispongamos de muchos resultados. Vamos a revisar a continuación los más importantes, muchos de ellos aún sin finalizar.

Quizás el primer estudio de este tipo fue el desarrollado por Nachtigall en el cual se randomizaron 168 mujeres crónicamente hospitalizadas y tratadas con estrógenos y progesterona, o placebo durante 10 años. En este estudio se halló un efecto neutro del tratamiento hormonal sustitutivo sobre la patología cardiovascular, con una disminución del cáncer de mama y un aumento de litiasis biliar en el grupo tratado (Nachtigall, 1979).

Ya en la actualidad el Women's Health Initiative (The Women's Health Initiative Study Group, 1998) es un ambicioso proyecto que engloba a 161.000 mujeres de entre 50 y 79 años de edad. Está diseñado en 3 fases. La primera es un estudio randomizado de 68.000 mujeres para estudiar el efecto del THS sobre la prevención primaria de patología cardiovascular, así como una dieta pobre en grasas para la prevención del cáncer de mama y de colon, y la prevención de las fracturas osteoporóticas con calcio y vitamina D. El brazo que estudiará concretamente el THS y la patología cardiovascular de forma randomizada a doble ciego y con un grupo placebo incluye a 27.500 mujeres, que serán tratadas

bien con estrógenos conjugados equinos (0.625 mg./día) en mujeres sin útero, o con estrógenos conjugados equinos (0.625 mg./día) añadiendo acetato de medroxiprogesterona (2.5 mg./día) en mujeres con útero. La segunda fase incluye 93.000 mujeres con tal de identificar de forma observacional factores de riesgo de estas enfermedades. Y finalmente se estudiarán formas de desarrollar planes de salud a nivel poblacional. Los resultados finales se esperan para el 2005.

Una primera voz de alarma surgió el año pasado al conocerse los primeros resultados que parecían no ser favorables al THS (L'Enfant, 2000). Y rápidamente se respondió que se debían esperar los resultados definitivos en el 2005, con 9 años de seguimiento, para poder afirmar que la THS no era útil para la prevención primaria de enfermedades cardiovasculares (Editorial, Mayo Clin Proc, 2000). De todas formas esta filtración inicial ha puesto en peligro el buen desarrollo del estudio y ya hay quien dice que el estudio no tendrá validez ya que estos resultados han trascendido a la luz pública y alterarán la participación de las pacientes.

Existe otro estudio parecido con el reclutamiento de 34.000 mujeres desde 1998 (WISDOM, Women's International Study of Long-Duration Oestrogen after Menopause) cuyos resultados todavía serán posteriores, sobre el 2006, y que está dirigido por el British Medical Research Council (Wreng, 1998).

El Hearth and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) ha sido el primer estudio randomizado en publicar sus resultados (Hulley, 1998). Es un ensayo randomizado, doble ciego, de placebo versus tratamiento con estrógenos y progestágenos para observar el efecto sobre la cardiopatía isquémica. Es un estudio de prevención secundaria.

Se randomizaron 2763 pacientes postmenopáusicas menores de 80 años , con una media de 66.7 años (de 44 a 79), con coronariopatía, y con útero intacto. La coronariopatía se establecía si la paciente había tenido previamente uno de los siguientes eventos: infarto de miocardio, cirugía de by-pass coronario, revascularización coronaria percutánea, o oclusión angiográfica de >50% de una arteria coronaria mayor.

La medicación consistía en 1 comprimido diario de 0.625mgr. de estrógenos conjugados equinos + 2.5 mg. de acetato de medroxiprogesterona , o 1 comprimido placebo de idéntica apariencia. El seguimiento fue de 4.1 años con visitas de seguimiento cada 4 meses.

El primer objetivo era la cuantificación de infartos de miocardio no mortales (IAM) y de la mortalidad por coronariopatía (MC). Como procesos secundarios se incluían: cirugía de by-pass coronario, revascularización coronaria percutánea, hospitalización por angina inestable, parada cardíaca recuperada, fallo cardíaco congestivo, accidente cerebrovascular, y enfermedad arterial periférica. Otros objetivos eran: mortalidad total y por cáncer, cáncer de endometrio y mama, trombosis venosa profunda, tromboembolismo pulmonar, fracturas óseas, y litiasis biliar.

Los resultados obtenidos fueron:

- no había diferencias significativas en cuanto a IAM y MC.
- tampoco había diferencias significativas en todos los otros procesos secundarios estudiados (incluyendo el cáncer de mama) a excepción de un aumento de trombosis venosa profunda en el grupo tratado respecto al placebo (25 versus 8) y un muy discreto aumento de litiasis biliar también en el grupo



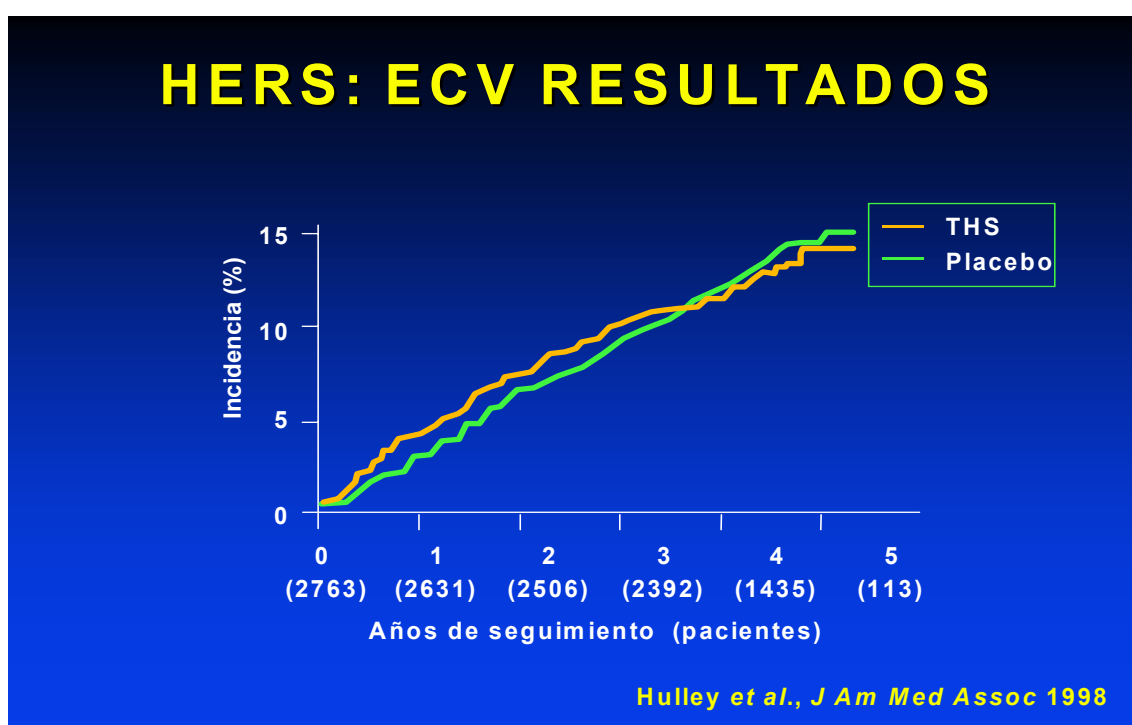
tratado (84 versus 62), lo cual estaría de acuerdo con estudios observacionales.

- había un aumento de HDL-colesterol, una disminución de LDL-colesterol, y un aumento de triglicéridos en el grupo tratado respecto al placebo estadísticamente significativo, sin que ello implicara un incremento de IAM o MC.

Estos resultados obtenidos contrastan con los procedentes de estudios observacionales. Ello puede ser debido como hemos dicho a sesgos de selección, así como a diferencias entre las poblaciones estudiadas. Los estudios observacionales se basan en población sana y relativamente joven lo que contrasta con la población de este estudio que es mayor y con cardiopatía de base. Además muchos de estos estudios no utilizan progestágenos y en éste se utiliza acetato de medroxiprogesterona de forma continuada el cual todavía puede contrarrestar más los efectos de los estrógenos e incluso de una forma mayor que otros gestágenos. Así queda por estudiar lo que pasaría con población sana o sin el uso de gestágenos o utilizando otros.

Cuando se analizan los resultados por años, se observa un incremento del riesgo para IAM y MC en el grupo tratado al inicio del tratamiento, que disminuye con los años sucesivos. Esto puede ser debido a que pasado el primer año se pierde la randomización real ya que los individuos que quedan en cada grupo ya no son comparables entre sí porque se han quedado en el camino aquellos que eran de alto riesgo para tener algún suceso muy al inicio del estudio. Otra explicación puede ser que exista una plausibilidad biológica con el tiempo y que inicialmente haya un incremento del riesgo debido a los efectos protrombóticos e inflamatorios

(aumento de la PCR) del tratamiento, y que después se pongan de manifiesto los efectos directos sobre la placa de ateroma. Esto vendría refrendado por los ensayos realizados con hipolipemiantes cuyo efecto beneficioso se empieza a notar a partir del primer año, lo que coincide con el HERS en que la tendencia a la disminución del riesgo cardiovascular ya empieza a observarse a partir del segundo año (Figura 6).



**Figura 6. Resultados del estudio HERS a lo largo del tiempo.**

Basándose en todo esto cambió la visión del THS como útil en la prevención cardiovascular y no parece recomendable actualmente iniciar un THS en mujeres menopáusicas con la indicación exclusiva de prevención secundaria de cardiopatía isquémica. Pero si la paciente ya está realizando el tratamiento será apropiado continuarlo en base a la tendencia a la mejoría que parece existir con el paso de

los años, y para que la paciente siga disfrutando de los otros beneficios que le aporta (mejoría de la sintomatología climatérica y de la masa ósea). Un seguimiento del HERS a mayor plazo, HERS II, tal vez aportará más información al respecto.

Este estudio que como hemos dicho fue el primer estudio randomizado publicado sobre morbilidad cardiovascular llevó a una gran decepción debido a las expectativas que había creado el THS con los estudios observacionales.

Recientemente se ha publicado basándose en el mismo diseño del estudio HERS un análisis de los resultados respecto a los accidentes cerebrovasculares, lo que constituye el primer estudio randomizado de THS y accidentes cerebrovasculares. En este caso no se observa ningún tipo de acción del THS respecto a esta patología, ni tampoco una tendencia en el tiempo, o sea, un efecto nulo (Simon, 2001).

Dos años después de la publicación de los resultados iniciales del HERS apareció otro estudio, ERA (Estrogen Replacement and Atherosclerosis), que aunque no tenía como punto final a estudio la morbilidad cardiovascular tampoco aportó datos a favor del THS (Herrington, 2000). Este estudio, también de prevención secundaria, randomizó 309 mujeres con lesiones coronarias demostradas por angiografía. Los tratamientos fueron: 0.625 mg./día de estrógenos conjugados equinos, o 0.625 mg./día de estrógenos conjugados equinos más 2.5 mg./día de acetato de medroxiprogesterona, o placebo. Las pacientes fueron seguidas una media de 3.2 años y al final no se hallaron diferencias en cuanto a la medición de las lesiones por coronariografía ni tampoco en la morbilidad cardiovascular, pero sí un aumento de las hiperplasias

endometriales en las pacientes tratadas sólo con estrógenos, con cierta tendencia a reducir fracturas y a aumentar las trombosis venosas en los 2 grupos tratados lo cual estaría de acuerdo con estudios previos. De todas formas este estudio debido al poco número de casos no tiene suficiente poder estadístico para hallar diferencias en cuanto a morbimortalidad cardiovascular. También ha sido criticado el valor que tiene cuantificar las lesiones ateromatosas por coronariografía como marcador de futuros eventos isquémicos (Editorial, NEJM, August 24, 2000), ya que se ha visto que mínimos cambios en el grosor de la placa de ateroma pueden ir acompañados de grandes reducciones de morbimortalidad cardiovascular debido a otros factores que no cuantificamos como pueden ser efectos vasodilatadores, y efectos estabilizadores y antiproliferativos de la placa.

Tanto en el estudio HERS como en el ERA se estudiaron mujeres con una media de edad de 65 años aproximadamente, lo cual también ha sido debatido ya que después de 15 años de menopausia es difícil pensar que el THS pueda revertir algún efecto en tan sólo 3 o 4 años en pacientes ya con cardiopatía isquémica.

Un estudio similar al ERA, el WAVE (Women Atherosclerosis Vitamin E Trial) combinará THS y vitamina E y aportará más datos sobre este aspecto.

Existe otro estudio, WELL-HART (Women Estrogen progestin Lipid Lowering Heart Atherosclerosis Regression Trial), donde se tratará simultáneamente a las mujeres con pravastatina para disminuir el colesterol, y además serán randomizadas en 3 grupos: 1) estradiol 1mgr./día; 2) estradiol 1mgr./día + acetato de medroxiprogesterona, 5 mg./día; y 3) placebo. Sus resultados aparecerán en breve.

El raloxifeno está actualmente siendo evaluado como agente cardioprotector en un amplio estudio randomizado llamado RUTH (Raloxifene Use for the Heart) de prevención secundaria (Barrett-Connor, 1998) que incluirá hasta 10.000 mujeres con riesgo de cardiopatía isquémica y que está diseñado para mostrar una reducción de hasta un 17.5% en eventos cardíacos, excluyendo pacientes con riesgo de trombosis venosa. Los resultados de este estudio se esperan para el 2005.

Como vemos debemos esperar todavía unos 4-5 años para poder concluir si el THS en sus distintas modalidades puede ser útil o no para la patología cardiovascular.

Como nota final cabe decir que existe un estudio en marcha sobre tibolona de 3 años de duración que valorará ecográficamente las placas de ateroma a nivel carotídeo aunque no está diseñado, al igual que el ERA, para estudiar morbimortalidad cardiovascular (Crook, 2000).

## **2.4. TERAPIA HORMONAL SUSTITUTIVA, ATEROSCLEROSIS Y EXPERIMENTACIÓN ANIMAL.**

La selección de un modelo animal apropiado cuyas características se asemejen a las humanas es difícil y no parece existir un modelo ideal. El perfil lipídico es lo primero que nos limita ya que su complejidad en las distintas especies animales nos crea numerosas dificultades de análisis al intentar extrapolar los resultados obtenidos a la especie humana. Lo mismo ocurre cuando hacemos un análisis de la placa ateromatosa. Esto hace que escoger un modelo animal apropiado sea todo un reto (Overturf, 1992).

Los modelos más estudiados han sido ratas, conejos, ratones, hámsters, cerdos y primates, pero también se han realizado estudios en perros, gatos, y pollos u otras aves.

Las especies de mamíferos estudiadas han sido divididas en mamíferos-LDL (la suma de VLDL, IDL, y LDL supone más del 50% de todas las lipoproteínas), o mamíferos-HDL (la HDL supone más del 50% de todas las lipoproteínas). Dentro de los primeros encontramos a los conejos y al mono cinomolgus, al igual que los humanos. En el otro grupo encontramos a ratas y ratones.

El conejo suplementado con una dieta rica en colesterol es el modelo clásico utilizado para el estudio de la aterosclerosis. Ya desde principios de siglo fue utilizado para reproducir las lesiones ateroscleróticas (Marchand, 1904; Anitschkow, 1913), y desde entonces no ha dejado de utilizarse. Su fácil manejo, bajo coste, su capacidad reproductiva y la facilidad con la que desarrollan placas de ateroma los convierte en una de las especies más utilizadas (Haarbo, 1996). La especie más empleada es la blanca neozelandesa. Este modelo ha sido criticado en ocasiones porque su lipoproteína mayoritaria es la VLDL al contrario que en humanos que es la LDL, debido a una anormal apoE que hace acumular la VLDL. Pese a ello las placas de ateroma son similares a la humanas y la distribución del colesterol en las distintas lipoproteínas no afectaría de forma distinta la placa de ateroma sino que sería la hipercolesterolemia en sí la que la determinaría (Rosenfeld, 1988). Este modelo ha sido utilizado también para probar los distintos agentes hipolipemiantes como los inhibidores de la hidroximetilglutaril coenzima A reductasa (HMG CoA) como las estatinas, y como veremos más adelante es junto a los primates el modelo más utilizado para el estudio de la aterosclerosis y

los tratamientos hormonales sustitutivos. Debido a su rapidez en desarrollar placas de ateroma es de gran utilidad para probar diferentes fármacos antes de pasar a un modelo experimental más costoso como serían los primates.

Existe un modelo natural de conejo hiperlipidémico, la especie Watanaba (WHHL, Watanabe-heritable-hiperlipidemic), con un déficit severo de receptores de LDL que hace que desarrolle una hipercolesterolemia acompañada de una hipertrigliceridemia con la formación de lesiones ateroscleróticas. La variabilidad existente entre miembros de esta misma especie hace difícil a veces el uso de este modelo (Donnelly, 1991).

Las ratas y ratones no son un buen modelo para el estudio de la placa ateromatosa (Armstrong, 1990). Actualmente están siendo utilizadas para estudios de determinados factores moleculares y proteínas concretas aprovechando la facilidad que ofrecen estas especies para crear transgénicos. De este modo se puede estudiar una vía concreta del metabolismo añadiendo o suprimiendo un enzima, un receptor o una proteína transportador de una especie, y viendo los efectos que esto produce.

Los primates serían el modelo ideal para estudiar la aterosclerosis, aunque no todos son LDL-mamíferos como los humanos. La especie más estudiada es la cinomolgus, *Macaca fascicularis*. Pese a su similitud con los humanos también presentan algunas diferencias como un bajo nivel de triglicéridos lo cual supone unas partículas de LDL mayores que las humanas, que son las responsables en este caso de la coronariopatía. Es de todas formas la única especie animal que nos permite estudiar la lipoproteína (a). Es conocido como el modelo periclínico ya que representan el paso intermedio entre lo que serían otros animales y los

humanos. Es un modelo preferido por este parecido a los humanos, su tamaño que facilita la toma de muestras incluso a nivel de coronarias, y su tiempo de vida que permite estudios a largo plazo. Pero su coste y su difícil manejo hacen de este animal un modelo restringido a pocos grupos científicos. En concreto existen 2 centros en los Estados Unidos que están autorizados, para estudios en los que no existe otro modelo animal igual de parecido al humano, y en los que los posibles beneficios a obtener son considerables (Armstrong, 1990).

Si nos centramos en el estudio del tratamiento hormonal sustitutivo y los animales de experimentación nos quedamos prácticamente con el estudio de 2 únicas especies animales: los conejos y los primates.

Dentro de los conejos, los primeros estudios en mostrar la influencia hormonal sobre la placa de ateroma datan de los años 60 (Constantinides, 1962), utilizando estriol y prednisolona. Posteriormente en los años 80 se continuaron haciendo estos mismos trabajos experimentales ya con estradiol y progesterona (Fisher, 1985), y fue con el inicio de los años 90 y la llegada del tratamiento hormonal sustitutivo cuando hubo la verdadera expansión de estos trabajos, probando los distintos preparados hormonales que iban apareciendo y sus efectos sobre la placa de ateroma. Así podemos encontrar estudios con diversos preparados y dosis de estrógenos (oral, transdérmico y intramuscular), así como con gestágenos y sus diversas formas. Y más recientemente estudios con raloxifeno y tibolona. Dada la estrecha relación de estos estudios con nuestro trabajo en la discusión se ampliarán estos aspectos.

El otro gran grupo de estudios se ha realizado con monos. Estos estudios se empezaron a realizar a principios de los años 90. El hecho de que presenten una



menarquia y una menopausia distinguibles, un ciclo menstrual de 28 días, y variaciones hormonales similares a las humanas, hace posible con una ooforectomía bilateral crear una menopausia quirúrgica, y usar a estos animales como modelos de menopausia (Clarkson, 1996). Esto ha hecho posible usar a estos animales no tan sólo para el estudio de la coronariopatía sino también para estudiar masa ósea, y incontinencia urinaria.

El principal grupo científico en usar este modelo se halla ubicado en el Comparative Medicine Clinical Research Center, en la Universidad de Wake Forest, en Carolina del Norte. El primer paso que dio este grupo fue comprobar como la castración junto a una dieta rica en colesterol implicaba una mayor aterogénesis coronaria en aquellas monas castradas comparadas con las no castradas (Adams, 1985). Posteriormente y a partir de la década de los noventa se han venido realizando distintos estudios para comprobar los efectos del tratamiento hormonal sustitutivo sobre la placa de ateroma y funcionalismo vascular que serán comentados en la discusión. En líneas generales podemos decir que se encuentran efectos beneficiosos de los estrógenos que se pierden al añadir gestágenos.

Asimismo los primates también han sido utilizados para estudiar otros marcadores de riesgo cardiovascular como pueden ser el peso corporal y la distribución de la grasa o la resistencia a la insulina, viendo otra vez un efecto positivo de los estrógenos contrarrestado por los gestágenos. Y también se han utilizado para estudiar los efectos de los llamados fitoestrógenos con efectos positivos de los mismos (Wagner, 2000).

Encontramos también un estudio realizado con primates y raloxifeno (Clarkson, 1998), que por sus resultados negativos fue de gran importancia en el momento de su publicación ya que hasta la fecha todos los marcadores estudiados con raloxifeno ofrecían un perfil favorable al mismo. Estos resultados serán ampliados en la discusión. Está pendiente de publicación un estudio realizado con primates y tibolona de similares características.

Como resumen de los estudios realizados con primates los estrógenos tienen un complejo papel en la inhibición de la ateromatosis coronaria, con efectos beneficiosos en la actividad vasomotora, en el metabolismo lipídico, así como en la resistencia a la insulina y la distribución de la grasa corporal. Asimismo mejoran la estabilidad de la placa. Además parece haber una clara tendencia del acetato de medroxiprogesterona a atenuar o impedir los efectos beneficiosos logrados con los estrógenos. Parece clara desde este punto de vista la necesidad de buscar otros gestágenos para acompañar a los estrógenos en el tratamiento hormonal sustitutivo. Sólo disponemos de un estudio con raloxifeno y carecemos de momento de algún estudio realizado con tibolona y primates.

### **3. HIPOTESIS DEL ESTUDIO.**

**El tratamiento hormonal sustitutivo y los nuevos fármacos alternativos pueden presentar un efecto protector sobre la génesis y crecimiento de la placa de ateroma aórtica en conejas castradas sometidas a dieta hipercolesterolémica.**

## **4.OBJETIVOS DEL ESTUDIO.**

**1 – Valorar si el modelo de la coneja ooforectomizada sometida a dieta hipercolesterolémica es útil para el estudio de la placa de ateroma.**

**2 – Aplicar distintas metodologías (cuantificación macroscópica y microscópica del tamaño de la placa de ateroma, y cuantificación del colesterol total de la aorta) para el estudio de la ateromatosis.**

**3 – Valorar si un análisis completo de las lipoproteínas plasmáticas es útil para el estudio de la aterogénesis.**

**4 – Demostrar que el tratamiento hormonal sustitutivo protege de una forma directa de la enfermedad cardiovascular mediante disminución significativa de la placa de ateroma.**

**5 – Demostrar que los nuevos fármacos alternativos al tratamiento hormonal sustitutivo convencional también pueden disminuir la placa de ateroma.**

## **5. MATERIAL Y METODOS.**

## **5.1. DISEÑO DEL ESTUDIO.**

Se utilizaron un total de 48 conejas blancas de raza neozelandesa cuyo peso oscilaba entre 2500 y 3500 gramos. Los animales se distribuyeron en 6 grupos de 8 cada uno: un grupo control (C), un grupo sham o simulado (S) y cuatro grupos que se trataron con tibolona (T), raloxifeno (R), estradiol (E), y estradiol más acetato de ciproterona (EC).

Todas las conejas fueron sometidas a un periodo de 2 semanas de aclimatación y al inicio de la tercera semana y previa anestesia con ketamina (30-40 mg./kg. i.m. ) y xilazina (5-8 mg./kg. i.m.) se procedió a la intervención quirúrgica que consistió en laparotomía + anexectomía bilateral para los grupos control, tibolona, raloxifeno, estradiol, y estradiol-ciproterona , y laparotomía sin más cirugía para el grupo sham. Antes de la anestesia se procedía a una sedación con clorpromazina (2 mg./kg. i.m. ) y también se administraba atropina (0.05 mg./kg. s.c. ) para evitar posibles bradicardias en los animales.

Durante la primera semana de aclimatación no se realizaba ningún acto con las conejas para comprobar su correcto estado y al inicio de la segunda semana se continuaba con la dieta estándar pero limitando su cantidad a 100 gr./día para habituarlas a la dosis que ingerirían durante el resto del estudio. Posteriormente a la intervención quirúrgica se dejaron 2 semanas de recuperación en las que la dieta siguió siendo la estándar a la misma dosis de 100 gr./día y al inicio de la quinta semana se inició la dieta hipercolesterolémica, y el tratamiento hormonal correspondiente en cada grupo tratado. Los grupos C y S sólo recibían la dieta



hipercolesterolémica. Estas dietas se prolongaron hasta la semana 16, estando un total de 12 semanas con esta dieta y el tratamiento si procedía.

La dieta hipercolesterolémica para inducir la aterosclerosis estaba basada en la dieta estándar a la cual se le añadían 0.5 gr. de colesterol por cada 100gr. de comida.

Todas las dietas estaban elaboradas por el laboratorio UAR (Francia) y su filial Panlab S.L.(Barcelona, España) especializados en dietas para animales de experimentación. Se calculó la dosis total de fármaco a administrar durante las 12 semanas de tratamiento y ésta le era facilitada al laboratorio el cual la mezclaba con la dieta de colesterol de forma homogénea.

La cantidad de 100 mg./día era empaquetada de forma periódica en bolsas expresas y administrada diariamente por nuestro equipo, asegurando así la ingesta homogénea en todas las conejas en cuanto a colesterol se refiere así como al fármaco administrado ya mezclado con la dieta.

Durante todo el estudio se procedió al peso semanal de las conejas y a la cuantificación del sobrante de la comida para poder así identificar cualquier diferencia entre los grupos en cuanto a ingesta se refiere.

Todas las conejas fueron sometidas a extracciones sanguíneas seriadas a lo largo del estudio para determinar niveles de lípidos plasmáticos. A lo largo del estudio se procedió a 6 extracciones sanguíneas en ayunas a partir de la vena marginal o de la arteria central de la oreja de las conejas : una previa a la intervención quirúrgica al inicio de la semana 3 (extracción 1), otra al inicio de la semana 5 previa a la instauración de la dieta hipercolesterolémica después de 2 semanas de la práctica de la anexectomía (extracción 2), y las 4 restantes se realizaron a

intervalos de 3 semanas hasta su sacrificio en que se realizaba la última extracción (extracciones 3, 4, 5, y 6). Por regla general se conseguía obtener de 10 a 20 cc. de sangre de cada coneja y extracción.

Al finalizar la semana 16 las conejas se sacrificaron con una inyección endovenosa de una solución de pentobarbital al 10 % (100 mg./kg), procediéndose a la extracción de la aorta en su totalidad para su estudio posterior. Además de modo complementario también se procedió a la extracción y estudio del corazón, hígado, y útero.

## **5.2. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN.**

Se escogieron conejas blancas neozelandesas basándonos en los múltiples estudios sobre aterosclerosis realizados con este tipo de animales (Overturf, 1992; Haarbo, 1996). Como se ha comentado anteriormente es una animal con el cual resulta cómodo trabajar al ser dócil y fácilmente manejable, siendo además su adquisición y mantenimiento de bajo coste.

Las conejas tienen un aparato genital dividido en tres secciones: los ovarios, las trompas y sus 2 hemiúteros, y la vagina y vulva. Basándonos en la Tesis Doctoral del Dr. Carmona (Carmona, 1991) haremos una descripción breve del mismo.

Los ovarios son de forma ovoidea alargada, unidos a la pared abdominal por el ligamento lumbo-ovárico, y al hemiútero correspondiente por el ligamento útero-ovárico. Por su cara interna reciben el pedículo vascular.

Las conejas, como todos los mamíferos a excepción de los primates, presentan un aparato genital en que no se han fusionado los conductos de Müller, dando lugar a un útero doble. Existen 2 cuellos, dispuestos en cañón de escopeta, que están

seguidos por los 2 hemiúteros de forma cilíndrica y que se alejan el uno del otro en un ángulo de 150 grados aproximadamente, hasta alcanzar una longitud de unos 6 cm. Histológicamente el útero presenta al igual que los humanos una mucosa o endometrio, una capa media muscular lisa, y una serosa externa. El endometrio está formado por un epitelio cilíndrico simple, con células ciliadas y secretoras, y un corion de tejido conjuntivo que alberga las invaginaciones glandulares.

Las trompas nacen donde finaliza cada hemiútero y tienen una longitud de 3 a 4 centímetros, hasta alcanzar el polo superointerno del ovario.

La coneja presenta un ciclo sexual continuo, sin interrupciones, con actividad sexual continua, sólo interrumpida por la gestación. Alcanza la pubertad a los tres meses de vida aproximadamente, iniciando entonces la capacidad de ovular que sólo es provocada en caso de coito con una descarga de LH. Si no existe el coito las conejas no tendrán ovulaciones y su secreción hormonal ovárica será mínima. Existirá una secreción hipofisaria de FSH, con un crecimiento folicular que en caso de no producirse la ovulación a los 12-16 días regresarán y serán reemplazados por otros.

Las conejas utilizadas en este estudio eran adultas de tres o cuatro meses de edad y su peso oscilaba entre 2500 y 3500 gramos. Procedían de la granja Riera de la Ametlla del Vallés la cual está dedicada exclusivamente a animales de laboratorio para fines experimentales. Eran traídas en grupos de 4 a 8 conejas para poder permitir así escalonar el trabajo experimental, y dejadas inicialmente durante una semana aisladas en una habitación aparte del resto de animales para comprobar su correcto estado y posteriormente iniciar la parte experimental con las mismas.

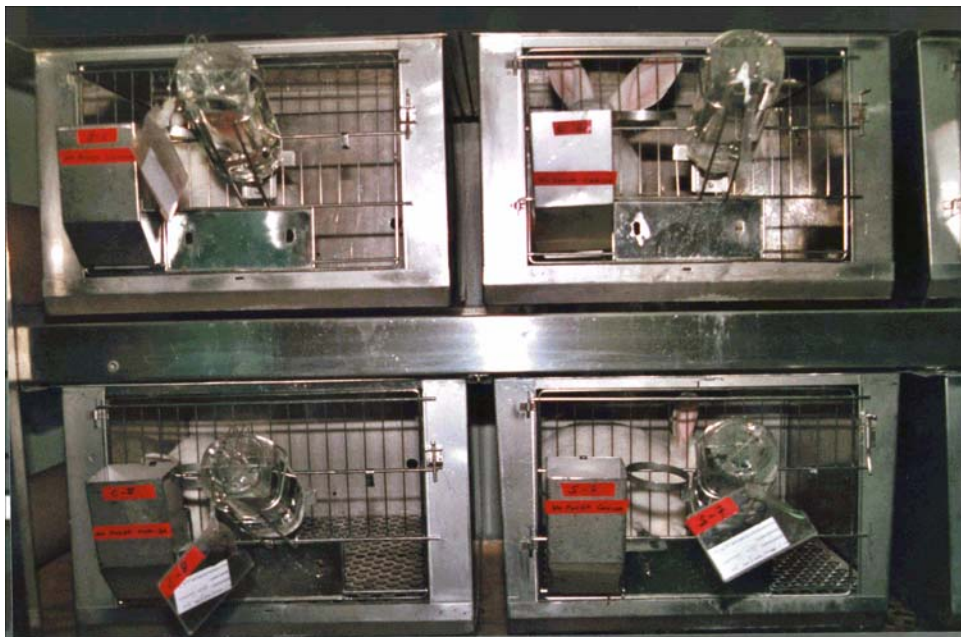
Ya trasladadas a la sala definitiva eran mantenidas en jaulas individuales en habitaciones con capacidad de hasta 16 animales evitando siempre el contacto de unos con otros. En esta sala los animales se mantenían con ciclos de luz de 12 horas y a una temperatura constante de entre 18 y 22 °C. La dieta era administrada diariamente en un receptáculo expreso, y el agua en botellas adaptadas a las jaulas a libre disposición de los animales.

El manejo de las conejas debe ser firme y cuidadoso. La mejor manera de asirlos, para poder así trasladarlos en los distintos exámenes realizados, es por el pliegue cutáneo dorsal, sobre las patas anteriores, mientras que la otra mano sostiene las patas posteriores y las ancas aguantando el peso del animal.

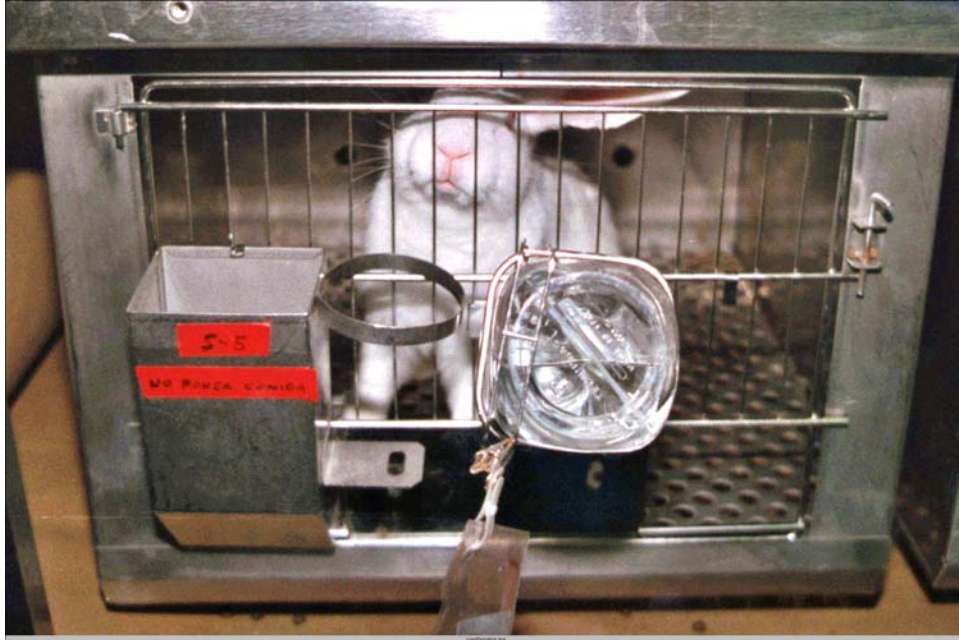
Los animales una vez trasladados a la sala definitiva eran rotulados para poder así ser identificados. Se rotulaba por una parte la jaula del animal y por otra la cara interna de la oreja de cada coneja, evitando así confusiones en los traslados de los animales.

**Figura 7. Disposición de las distintas jaulas en el estabulario.**

**Se observan 4 conejas del grupo sham.**



**Figura 8. Detalle de una de las jaulas. Se observa el receptáculo para la comida así como el bebedero.**



### **5.3. TÉCNICA ANESTÉSICA.**

La anestesia se realizó combinando tres tipos de fármacos para conseguir una buena relajación del animal con la mínima dosis posible de cada fármaco para así disminuir a lo mínimo los posibles efectos secundarios de la medicación.

Antes de la anestesia se procedía a una sedación con clorpromazina (2 mg./kg. i.m.) para disminuir la ansiedad de los animales unos 30 minutos antes de los otros fármacos, que después nos permitía un manejo mucho más fácil. También se administró atropina (0.05 mg./kg. s.c.) 20 minutos antes de la intervención para evitar posibles bradicardias en los animales.

La anestesia propiamente dicha se realizaba con ketamina (30-40 mg./kg. i.m.) y xilazina (5-8 mg./kg. i.m.), pudiendo iniciar la intervención a los 10 minutos.

La ketamina deprime el sistema tálamo-neocortical, produciendo amnesia y catalepsia con una analgesia somática profunda, aunque con un aumento del tono muscular esquelético.

La xylazina es un sedante, con gran potencia analgésica y relajante muscular. Debido a que puede producir disminución de la frecuencia respiratoria y bradicardia antes se debe administrar la atropina.

Con esta pauta se conseguía una posición de decúbito de los animales a los 10 minutos que nos permitía intervenir quirúrgicamente sin problemas.

#### **5.4. TÉCNICA QUIRÚRGICA.**

Una vez realizada la sedación y anestesia del animal se procedía a fijar al animal en un soporte quirúrgico expreso en posición de decúbito supino sujetando las cuatro extremidades con ligaduras laxas para así obtener una buena exposición del abdomen de la coneja y un buen campo quirúrgico. Se rasuraba la zona abdominal y se desinfectaba con povidona iodada previo al entallado estéril de la zona.

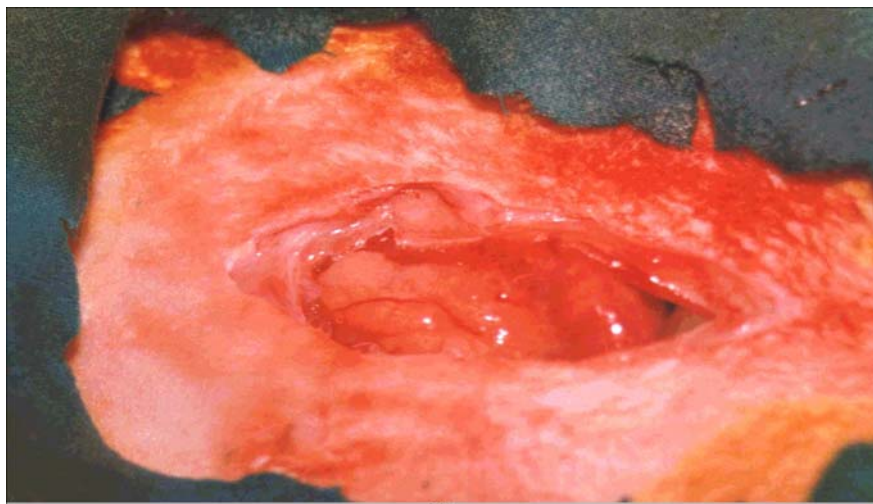


**Figura 9. La coneja ya anestesiada antes de iniciar la intervención.**

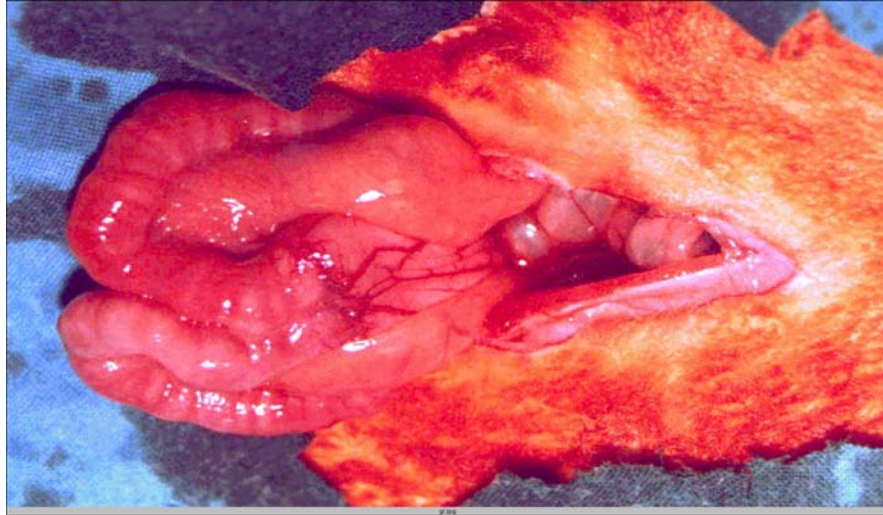


La técnica quirúrgica empleada consistía en una laparotomía media de unos 3-4 cm. de longitud mediante una incisión vertical y una disección por planos hasta llegar a la cavidad abdominal. Una vez en la cavidad abdominal se localizaban los genitales internos. Estos, como hemos comentado, están constituidos por dos hemiúteros al final de los cuales se localizan con facilidad las trompas uterinas y los ovarios. Con 2 pinzas tipo Mosquito y ligaduras de catgut 2/0 se procedía a la individualización del ovario de los pedículos vasculares y de los ligamentos lumbo-ovárico y útero-ovárico para así obtener de forma simple y exangüe el ovario. Una vez comprobada la hemostasia se procedía al cierre de la pared abdominal en 2 capas con Vicryl 2/0 con puntos simples. Una primera capa para peritoneo, músculo y fascia, y una segunda capa para la piel, con lo cual finalizaba la intervención.

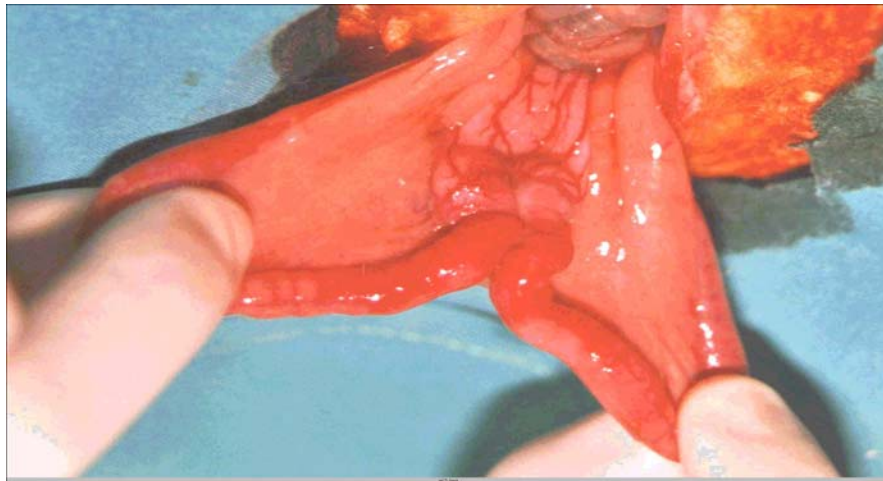
**Figura 10. Laparotomía ya realizada.**



**Figura 11. Visión de los genitales internos, con la vagina y los dos hemiúteros.**

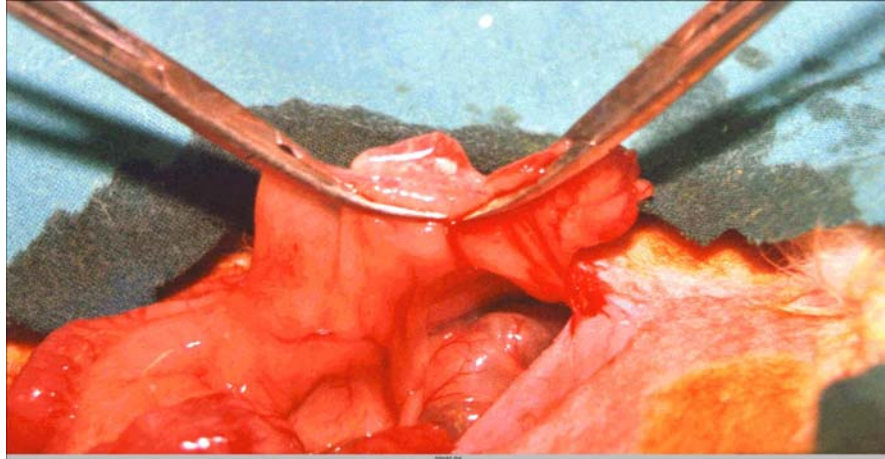


**Figura 12. Otra visión de los genitales internos.**

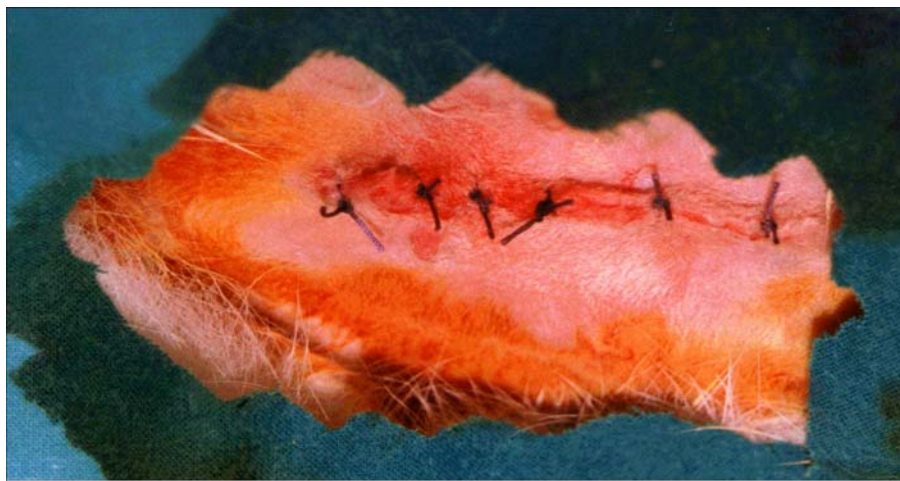




**Figura 13. Sección y sutura de los pedículos ováricos  
previo pinzamiento de los mismos con obtención del ovario.**



**Figura 14. Finalización de la intervención con la herida cerrada.**



## 5.5. ESQUEMAS DE TRATAMIENTO.

Después de la intervención quirúrgica los animales tuvieron 2 semanas para recuperarse de la misma durante las cuales siguieron una dieta normal de 100 gramos diarios.

Finalizadas estas 2 semanas se inició la dieta hipercolesterolémica más los distintos tratamientos hormonales.

Las pautas de tratamiento realizadas fueron:

1. Grupo control (C): dieta hipercolesterolémica, 100 gr./día.
2. Grupo sham (S): dieta hipercolesterolémica, 100 gr./día.
3. Grupo tibolona (T): dieta hipercolesterolémica, 100 gr./día + 6 mg./día de tibolona.
4. Grupo raloxifeno (R): dieta hipercolesterolémica, 100 gr./día + 35 mg./día de raloxifeno.
5. Grupo estradiol (E): dieta hipercolesterolémica, 100 gr./día + 3 mg./día de valerianato de estradiol.
6. Grupo estradiolciproterona (EC): dieta hipercolesterolémica, 100 gr./día + 3 mg./día de valerianato de estradiol y 0.5 mg./día de acetato de ciproterona.

La tibolona es un compuesto esteroideo relacionado con los derivados de la 19-nortestosterona, que presenta una triple actividad: estrogénica, progestagénica y androgénica. El efecto final de esta hormona dependerá del tejido sobre el que actúe, presentando lo que se ha llamado una actividad tejido-específica (Palacios, 2001).

Tras ser ingerida por vía oral la tibolona se metaboliza en tres moléculas distintas: los metabolitos  $3\alpha$ -OH y  $3\beta$ -OH y el isómero  $\Delta 4$ , las cuales se fijarán a los

receptores estrogénicos, progestagénicos y androgénicos con distinta afinidad según los tejidos dando lugar a acciones distintas. Así se obtienen efectos inhibidores a nivel del tejido endometrial (Genazani, 1991; Ginsburg, 1996) y mamario (Ginsburg, 1995) y estimuladores sobre el tejido óseo (Rymer, 1994; Bjarnason 1996), con un perfil lipídico diferente al clásico obtenido con los estrógenos (Castelo-Branco, 1999), y un aumento de la libido con una reducción del síndrome climatérico (De Aloysio, 1987).

El raloxifeno es una nueva molécula esteroideal clasificada dentro del grupo de los SERM (selective estrogen receptor modulator) capaz de actuar como agonista o antagonista según el receptor al cual se une. Esta molécula actuaría de forma inhibitoria en el útero (Boss, 1997) y en la mama (Cummings, 1999), y por el contrario aumentaría la masa ósea (Ettinger, 1999) y disminuiría los niveles de colesterol plasmático (Walsh, 1998) y de la homocisteína sin afectar la PCR (Walsh, 2000).

El acetato de ciproterona fue introducido en la terapia hormonal sustitutiva como un compuesto antiandrogénico útil para el síndrome climatérico, seguro para el endometrio, y con un perfil lipídico satisfactorio (Alwers, 1999), con una ausencia de efectos sobre el peso y la presión arterial (Quéreux, 1994). Se trata al igual que el acetato de medroxiprogesterona de un derivado de la 17- $\alpha$ -OH-progesterona.

La dosis de tibolona se eligió a partir del único trabajo publicado con un diseño semejante al nuestro (Zandberg, 1998) en el cual se utilizaban 3 dosis distintas del fármaco siendo la de 6 mg. con la que se obtenía unos niveles plasmáticos de tibolona similares a los humanos.

El grupo tratado con raloxifeno lo recibió a razón de 35 mg. /día. Esta dosis también estaba basada en un único artículo publicado hasta la fecha (Bjarnasson, 1997) con la cual también intentaban simular niveles plasmáticos similares a los humanos. Posteriormente apareció un segundo estudio aumentando la dosis hasta 210 mg./día (Bjarnasson, 2000), aduciendo que la primera dosis había sido excesivamente baja y que esta última dosis es la que mejor se correspondía con los valores hallados en humanos.

El grupo tratado con valerianato de estradiol lo recibió a razón de 3 mg./día para intentar conseguir así unos niveles plasmáticos también similares a los humanos. La mayoría de estudios realizados con estradiol utilizan tratamientos intramusculares (Bruck, 1997; Hanke, 1999) u otros tipos de preparados orales o incluso transdérmicos con 17-beta-estradiol (Haines, 1999). Los estudios de Bruck y Hanke usan valerianato de estradiol intramuscular a una dosis de 1 mg./kg./semana. Esta dosis intramuscular equivaldría a unos 6 mg./día vía oral para conejas. El estudio de Haines usa 0.1 mg./kg./día (unos 0.3 mg./día) de 17-beta-estradiol oral. Los estudios de Bjarnason y Haarbo (Haarbo, 1991; 1996; Bjarnason, 1997) utilizan 17-beta-estradiol oral pero a dosis de 4 mg./día. Debido a las grandes diferencias entre unos estudios y otros decidimos utilizar una dosis intermedia de 3 mg./día de valerianato de estradiol.

Por analogía a la dosis de valerianato de estradiol escogimos la dosis de acetato de ciproterona ya que en este caso no disponíamos de ningún estudio experimental para poder comparar. Calculamos la dosis total que se debería administrar en un mes teniendo en cuenta que lo íbamos a dar de forma continua y no cíclica como se da en humanos y asumimos la dosis de 0.5 mg./día.

## **5.6. TÉCNICA DE SACRIFICIO.**

Una vez finalizada la semana 16 se procedía al sacrificio de los animales. Inicialmente se procedía a una sedación con clorpromazina (5 mg./kg.) y una vez sedado se inyectaba la solución endovenosa de pentobarbital (100mg./kg.) lo cual producía la muerte del animal en pocos segundos.

A continuación se practicaba una laparotomía media en toda la extensión del animal continuando la misma con una esternotomía exponiendo todo el paquete visceral el cual se extraía en bloque. De este paquete visceral se localizaba la aorta desde la cara dorsal del mismo y a través de una pequeña incisión se abría longitudinalmente desde el cayado aórtico hasta la bifurcación ilíaca. Posteriormente se iba liberando de todo el tejido subyacente hasta obtenerla en su totalidad. A su vez se obtenían el útero desde los cérvix hasta las trompas uterinas, el hígado en su totalidad y el corazón, que eran pesados y incluidos en formaldehído al 4 % para su posterior estudio.

Las aortas, una vez extraídas en su totalidad, eran fijadas con alfileres sobre una placa de corcho con el objeto de evitar la retracción durante el proceso. El tejido se dejaba fijar en formaldehído al 4 % durante 24 horas para su tinción posterior en el laboratorio de Anatomía Patológica.

## **5.7. CUANTIFICACIÓN DE LA PLACA DE ATEROMA.**

Una vez fijadas las aortas se procedía al lavado de la aorta con alcohol al 70% y se sumergía en solución de Herxheimer durante 20 minutos. Esta solución de Herxheimer había sido preparada anteriormente y estaba constituida por 500 cc de alcohol al 70%, 500 cc de acetona y 5 gramos de Sudán IV que es un colorante con gran avidez por los lípidos. Esta tinción permite visualizar claramente las placas de ateroma al teñir los lípidos que éstas contienen en rojo. Tras la tinción se lavaba el exceso de colorante con alcohol al 80% durante 20 minutos y posteriormente con agua durante una hora, quedando las aortas ya teñidas y listas para su estudio.

A continuación, las aortas eran fotografiadas en el servicio de Anatomía Patológica. De cada aorta se tomaron 2 fotografías: una correspondiente a la aorta torácica y otra a la aorta abdominal separándolas a nivel del tronco celíaco. En cada fotografía se incluyó junto a la aorta una regla milimetrada para efectuar posteriormente la calibración. Las imágenes fueron digitalizadas y archivadas en formato JPEG para poder ser procesadas informáticamente mediante el programa de análisis de imagen Olympus Microimage 3.0. Una vez capturada la imagen y efectuada la calibración espacial con la regla milimetrada se seleccionaron en primer lugar manualmente 10 o 12 pixels con las características de coloración de las placas de ateroma (color rojo intenso). Tras esta selección manual, el programa selecciona automáticamente todos los pixels con las mismas características colorimétricas, con lo que quedan claramente las placas de ateroma identificadas. Tras comprobar visualmente la exactitud de la selección, el área seleccionada fue binarizada y medida automáticamente en  $\text{mm}^2$ . Posteriormente, y de la misma

forma, se cuantificaba la totalidad de la área de la aorta. Así se obtenía de forma exacta el porcentaje total de la aorta lesionada por las placas de ateroma, dividiendo el número de  $\text{mm}^2$  lesionados por el número total de  $\text{mm}^2$  de la aorta. Este proceso se repitió en todas y cada una de las fotografías obtenidas de las aortas, calculándose de este modo los porcentajes de área de ateroma de la aorta torácica y de la aorta abdominal. (Figura 15)

**Figura 15. Fotografías de las aortas correspondientes a una del grupo sham y a otra del grupo tratado con tibolona teñidas con Sudán IV, y la máscara realizada para cuantificar la aterosclerosis. Se muestran las aortas en su totalidad para obtener una mejor imagen aunque la medición se hacía por separado de aorta torácica y abdominal.**



**a) Aorta de una coneja del grupo sham teñida con Sudán IV. Se observa la regla milimetrada utilizada para calibrar.**



**b) Máscara realizada con el programa Olympus Microimage 3.0 de la aorta anterior del grupo sham.**



**c) Aorta de una coneja tratada con tibolona teñida con Sudán IV.**



**d) Máscara realizada con el programa Olympus Microimage 3.0 de la aorta anterior del grupo tratado con tibolona.**



## **5.8. ESTUDIO ANATOMOPATOLÓGICO DE LA PLACA DE ATEROMA.**

Una vez efectuadas las fotografías de las aortas se procedió de forma inmediata a la selección y obtención de las muestras para su procesamiento y estudio histológico. En cada aorta se incluyeron cinco secciones transversales de la pared (de 2 mm. cada una), tomadas de forma sistemática de : 1) aorta ascendente a dos cm. del inicio de los troncos supraaórticos, 2) aorta torácica descendente a tres cm. del tronco celíaco, 3) aorta abdominal a nivel del tronco celíaco, 4) aorta abdominal un cm. antes de la bifurcación ilíaca y 5) placa de ateroma de mayor tamaño.

Las cinco secciones aórticas referidas anteriormente fueron incluidas en parafina siguiendo los procedimientos estándar. Posteriormente se realizaron en cada bloque cortes histológicos de 4  $\mu$ m que se tiñeron, uno con hematoxilina-eosina, y los otros con técnicas de inmunohistoquímica utilizando anticuerpos primarios contra  $\alpha$ -actina (Dako Co, Carpinteria, CA, USA; dilución 1:1250, pretratamiento de recuperación antigénica con calor y citrato) para identificar las células musculares lisas, RAM 11 (Dako Co, Carpinteria, CA, USA; dilución 1:400) con el objeto de identificar histiocitos y macrófagos de conejo, BAX (Dako Co, Carpinteria, CA, USA; dilución 1:50 pretratamiento de recuperación antigénica con calor y EDTA) para determinar apoptosis y MIB1 (Immunotech, Marseille, France; dilución 1:400, pretratamiento de recuperación antigénica con calor y citrato) para determinar replicación celular. Para los estudios de inmunohistoquímica se partió del tejido fijado en parafina y se realizó mediante el

método EnVision® (Dako Co. Carpinteria, CA, USA). En resumen, las secciones de 4 µm fueron desparafinadas con xileno e hidratadas en gradiente de alcoholes. Se bloqueó la peroxidasa endógena durante 5 minutos con H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0.03% conteniendo hidróxido sódico. Los cortes eran incubados con el anticuerpo primario durante 40 minutos y lavados con TBS (Dako Co., Carpinteria, CA, USA). El polímero marcado con peroxidasa fue aplicado durante 40 minutos. Después de lavarlo con TBS, las preparaciones fueron incubadas con solución de sustrato cromógeno de diaminobencidina, lavadas en agua destilada, teñidas con hematoxilina, lavadas, deshidratadas y montadas.

Los cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina nos permitieron cuantificar de otro modo la placa de ateroma tanto en extensión como en altura de la misma, utilizando el mismo programa informático de análisis de imagen (Olympus Microimage 3.0).

Las diferentes tinciones de inmunohistoquímica nos permitieron observar la composición celular de la placa de ateroma (macrófagos y células musculares lisas) y determinar la presencia de apoptosis y replicación celular. Se hizo además una valoración semicuantitativa de las células en replicación, calculando en el campo visual de máxima replicación el porcentaje de células que se hallaban en replicación sobre el total de las mismas.

## **5.9. CUANTIFICACIÓN DEL COLESTEROL TOTAL DE LA AORTA.**

Una vez realizadas las fotografías y obtenidos los cortes histológicos referidos, la aorta restante fue remitida al laboratorio de Bioquímica para su estudio. Una vez

limpia, se separaba la media de la adventicia desechando esta última. La media y la íntima restantes se secaban para obtener el peso seco de la aorta, la cual se fragmentaba con un bisturí y se reconstituía con 10 mL de suero fisiológico para su posterior homogenización utilizando un Politron (Kinemática AG, Littau-Luzern, Switzerland). El colesterol se extraía mediante el método de Folch (Folch, 1957). Brevemente, se añaden al homogenizado 50 mL de una solución de cloroformo-metanol 2:1, se agita y se filtra. A continuación se añaden 6 mL de agua destilada para la mejor separación de ambas fases. La mezcla se agita durante 24 horas y se centrifuga posteriormente. Así quedan distribuidas las capas lipídica y proteica, las cuales se separan, filtran y evaporan hasta obtener un extracto completamente seco de cada una de ellas.

El extracto lipídico se reconstituye con 1 mL de 2-propanolol y la concentración de colesterol se determina mediante un método enzimático comercial (CHOD-PAP; Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY). El extracto proteico se reconstituye con 1 mL de suero fisiológico y las proteínas se determinan mediante el método de Lowry adaptado (Lowry, 1951).

### **5.10. ANÁLISIS DE LÍPIDOS PLASMÁTICOS.**

Las muestras sanguíneas obtenidas de las conejas durante las seis extracciones de todo el estudio eran remitidas al laboratorio de Bioquímica, donde una vez centrifugadas y separado el sobrenadante se procedía a la determinación de los niveles de colesterol y triglicéridos tanto en suero total como en las distintas fracciones lipoproteicas (VLDL, IDL, LDL, HDL). Las fracciones se separaban mediante dos ultracentrifugaciones. Una primera ultracentrifugación para separar

las VLDL con un rotor de ángulo fijo (18 horas, 45000 rpm, 15°C) y una segunda para separar el resto de las fracciones (IDL, LDL, HDL) con un rotor vasculante (22 horas, 45000 rpm, 15°C). En todas las fracciones se determinaron los niveles de colesterol (método CHOD-PAP; Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY) y triglicéridos (método TGO-PAP; Bayer Diagnostics, Tarrytown, NY).

### **5.11. ANÁLISIS ESTADÍSTICO.**

Para el análisis estadístico de este estudio se ha utilizado el software SPSS 9.0.

Las variables se han descrito con la media y la desviación típica. Las variables que no presentaban homogeneidad de varianzas se han transformado de forma logarítmica. Si la heterogeneidad no se ha podido corregir se han utilizado tests no paramétricos. Se han excluido aquellos datos muy anómalos, en concreto en el análisis del peso uterino se ha prescindido de una coneja del grupo sham, y en el análisis del peso cardíaco de una del grupo control.

Para comprobar homogeneidad en variables basales se ha realizado un análisis de la varianza con ANOVAS. Para ver el efecto de los tratamientos sobre las variables respuesta se ha realizado también un análisis de la varianza con ANOVAS y ANCOVAS. Se ha realizado asimismo un estudio de lípidos plasmáticos mediante cálculo del área bajo la curva dividido por la duración del estudio en semanas.

Las comparaciones múltiples se han realizado con la corrección de Student-Newman-Keuls.

Se han realizado rectas de regresión para determinar si las placas de ateroma y el colesterol aórtico presentaban algún tipo de relación lineal con los lípidos

plasmáticos expresados como el área bajo la curva del colesterol total. Y también se ha realizado una recta de regresión para estudiar la relación entre el peso cardíaco y el peso de los animales.

Todo se ha hecho utilizando una significación del 5%.

## **6. RESULTADOS.**

## **6.1. DESCRIPCIÓN DE LA MUESTRA.**

En la Tabla 1 se expone la distribución inicial de los animales en cada grupo, con el número de animales que se utilizaron para los análisis finales.

Recordemos los distintos seis grupos:

1. Grupo control (C).
2. Grupo sham (S).
3. Grupo tibolona (T).
4. Grupo raloxifeno (R).
5. Grupo estradiol (E).
6. Grupo estradiolciproterona (EC).

Todos los grupos fueron castrados a excepción del grupo sham que servía a su vez de grupo control de la ooforectomía.

Todas las conejas completaron el estudio a excepción de una coneja del grupo raloxifeno que hubo de ser sacrificada debido a una fractura vertebral, y dos conejas del grupo EC . La primera fue exitus a causa de una neumonia por *Pasteurella multocida* y la segunda debido a una diarrea incoercible.

Tabla 1. Distribución por grupos de los animales.

	Ooforectomizados	Tratamiento	Animales iniciales	Animales finales
<b>Control (C)</b>	Si	Ninguno	8	8
<b>Sham (S)</b>	No	Ninguno	8	8
<b>Tibolona (T)</b>	Si	Tibolona, 6 mg./dia	8	8
<b>Raloxifeno (R)</b>	Si	Raloxifeno, 35 mg./dia	8	7
<b>Estradiol (E)</b>	Si	Valerianato de estradiol, 3 mg./dia	8	8
<b>Estradiol- ciproterona (EC)</b>	Si	Valerianato de estradiol, 3 mg./dia + acetato de ciproterona 0.5 mg./dia	8	6



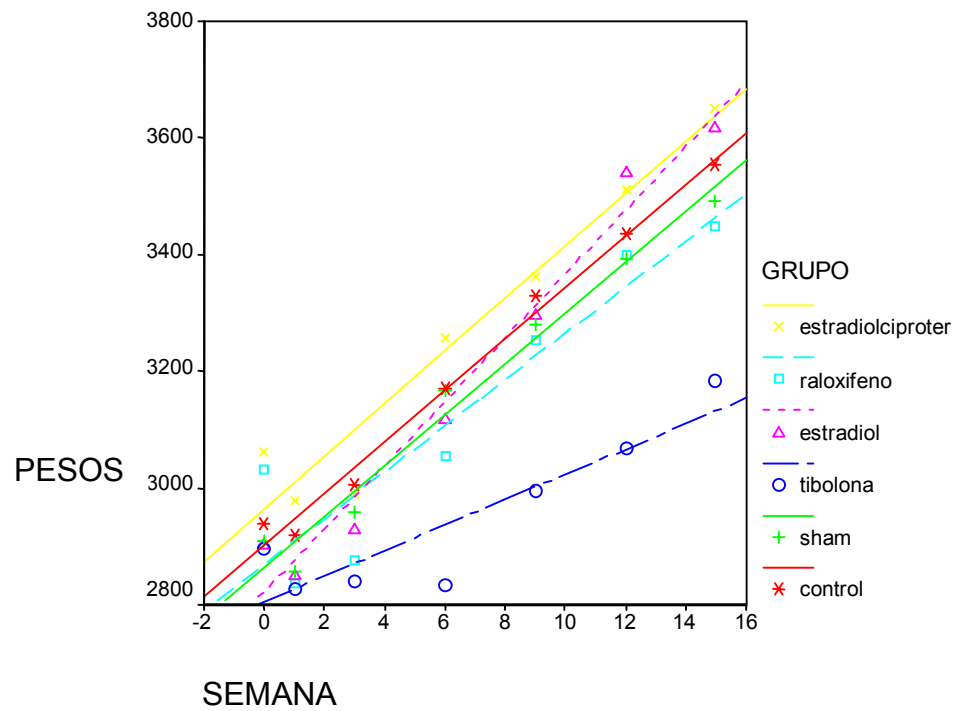
La ingesta por parte de las conejas a lo largo de todo el estudio ha sido prácticamente del 100% de la dieta administrada. Pese a ello y aunque no había diferencias en cuanto al peso inicial de las conejas en los seis grupos, al final se observó que el grupo tratado con tibolona presentaba unos pesos inferiores (Tabla 2 y Figura 16) respecto a los otros cinco.

**Tabla 2. Pesos de los animales.**

	<b>Pesos iniciales</b>	<b>Pesos finales</b>
Control (n=8)	2956.1±226.7	3566.5±230.3
Sham (n=8)	2917.0±178.2	3505.2±229.1
Tibolona (n=8)	2914.0±242.2	3206.3±292.3 <sup>#</sup>
Raloxifeno (n=7)	3040.63±166.67	3455.71±167.21
Estradiol (n=8)	2918.63±244.81	3624.25±156.54
Estradiol- ciproterona (n=6)	3065.63±109.58	3655.5±123.16

**Todos los pesos están en gramos expresados como medias ± desviación típica.**

<sup>#</sup> **p=0.003**

**Figura 16. Evolución del peso de los animales a lo largo del estudio.**

**La pendiente del grupo T es ligeramente inferior a los otros grupos, con el resultado final de un menor incremento de peso total.**

## **6.2. CUANTIFICACIÓN DE LA PLACA DE ATEROMA.**

Los porcentajes de placa de ateroma determinados por el método colorimétrico mostraron las siguientes diferencias. (Tabla 3 y Figura 17)

El grupo tratado con tibolona mostraba menor porcentaje de placas de ateroma ocupando la superficie aórtica tanto torácica como abdominal que los grupos raloxifeno y control.

En la aorta torácica el grupo T también mostraba menores valores que el grupo EC.

En la cuantificación total de la aorta el grupo T también mostraba valores menores que los grupos C, R y EC.

No había diferencias entre sham y control ni entre tibolona y estradiol , ni entre el grupo E y el EC. De todas formas el grupo E mostraba una franca tendencia a la disminución respecto a los grupos sham y control aunque no llegaba a ser significativa, al igual que sucedía con el grupo T respecto al S.

**Tabla 3. Porcentajes de ateroma aórtico.**

	<b>Aorta abdominal</b>	<b>Aorta torácica</b>	<b>Aorta total</b>
Control (n=8)	29.11±12.3	31.47±13.8	30.47±12.2
Sham (n=8)	26.55±15.5	23.59±16.8	24.51±16.1
Tibolona (n=8)	13.56±6.2*	9.00±7.6 <sup>#</sup>	10.21±6.8 <sup>+</sup>
Raloxifeno(n=7)	30.42±13.78	29.94±20.60	30.31±18.07
Estradiol (n=8)	16.41±9.73	19.36±10.87	17.91±10.19
Estradiol- ciproterona (n=6)	26.36±7.67	29.23±8.5	28.16±7.97

**Todos los valores están expresados como medias ± desviación típica.**

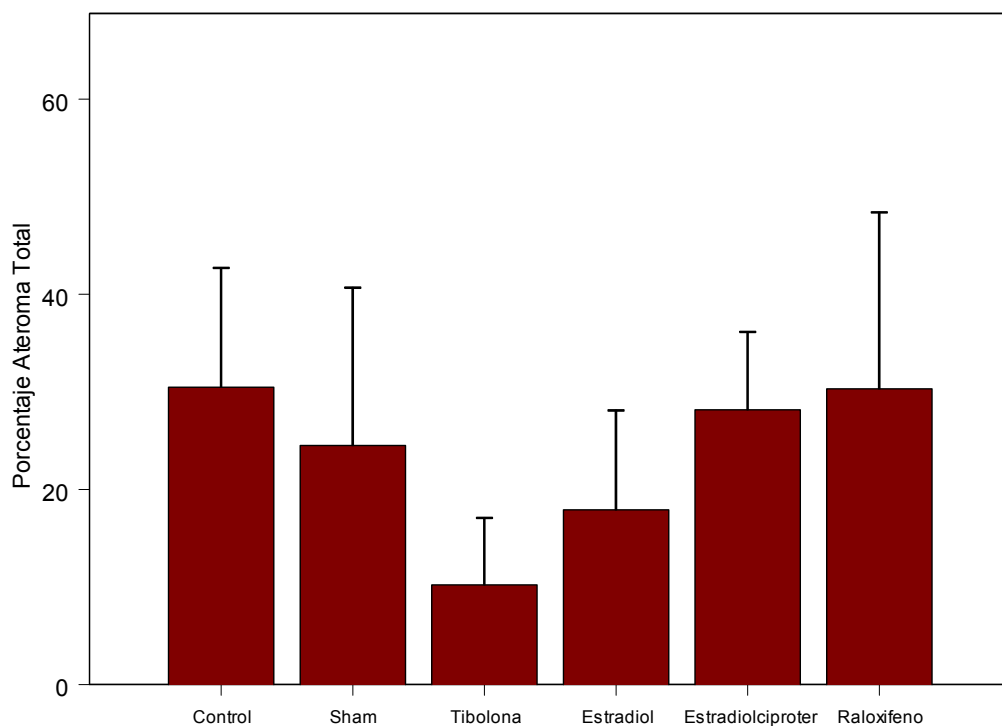
**\*p=0.03 (T vs. C y R)**

**<sup>#</sup>p=0.024 (T vs. C, R y EC)**

**<sup>+</sup>p=0.02 (T vs. C, R y EC)**

**Figura 17. Resultados de la cuantificación colorimétrica de la placa de ateroma de toda la aorta expresados como medias y desviación típica.**

**Se observa el efecto franco de la tibolona y algo menor del estradiol, con un efecto nulo del raloxifeno y del estradiolciproterona.**



Al estudiar los cortes histológicos y cuantificar la placa de ateroma de forma microscópica vemos como tanto en extensión de la placa como en altura de la placa el grupo tratado con tibolona es el que presenta valores estadísticamente significativos menores a los otros grupos (Tabla 4 y Figura 18).

**Tabla 4. Determinaciones de la extensión de la placa de ateroma medida microscópicamente.**

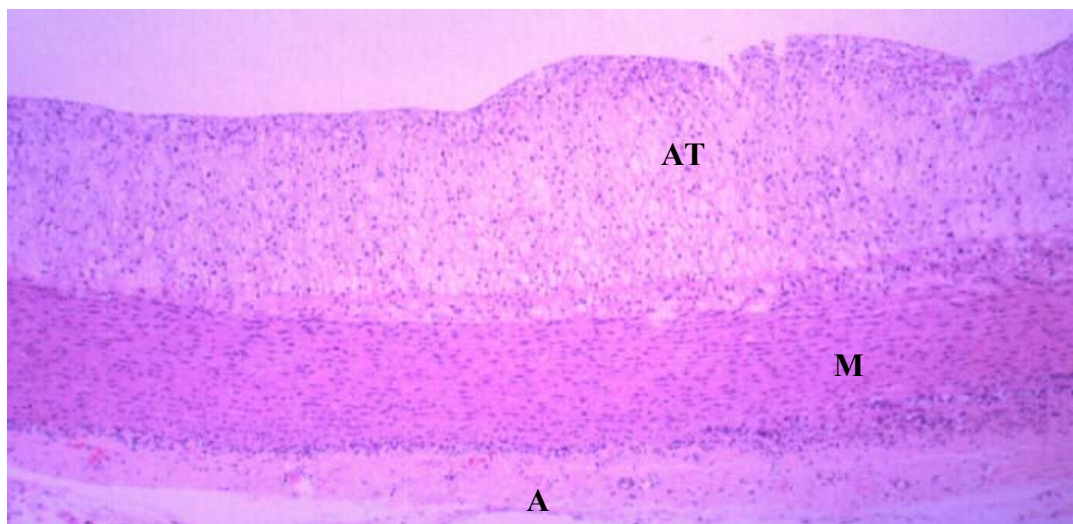
	<b>extensión microscópica de la placa de ateroma (mm<sup>2</sup>)</b>	<b>altura máxima de la placa de ateroma (mm.)</b>
Control (n=7)	3.31±2.25	0.51±0.24
Sham (n=6)	2.96±2.45	0.40±0.17
Tibolona(n=8)	0.27±0.23 <sup>α</sup>	0.12±0.06 <sup>α</sup>
Raloxifeno (n=7)	4.36±3.23	0.38±0.08
Estradiol (n=8)	2.26±1.73	0.31±0.11
Estradiol- ciproterona (n=6)	2.48±1.77	0.29±0.08 <sup>#</sup>

**Todos los valores están expresados como medias ± desviación típica.**

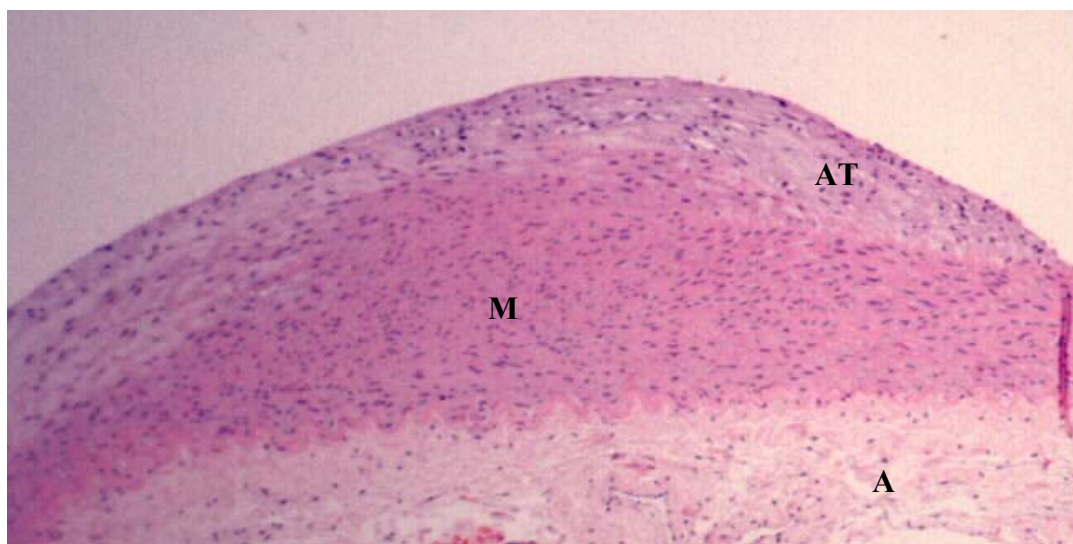
<sup>α</sup> **p<.000 (T vs. C, S, R, E y EC)**

<sup>#</sup> **p<.000 (EC vs. C)**

**Figura 18. Fotografías microscópicas de las placas de ateroma teñidas con hematoxilina-eosina correspondientes a una del grupo sham y a otra del grupo tratado con tibolona. AT (ateroma); M (media); A (adventicia).**



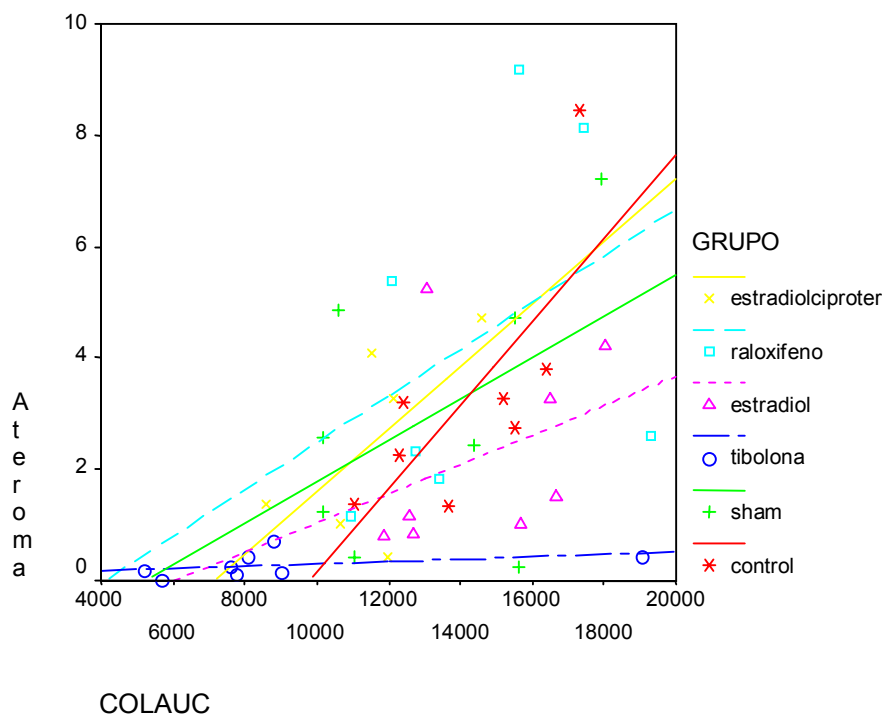
**a) Grupo sham. Se observa una gruesa placa de ateroma que prácticamente dobla el grosor de la capa media (40x).**



**b) Grupo tratado con tibolona. En la coneja tratada con tibolona la placa de ateroma es mucho menor (100x).**

Además las diferencias observadas no vienen determinadas por el colesterol plasmático expresado como área bajo la curva sino por el tratamiento con tibolona como se observa en la recta de regresión realizada (Figura 19).

**Figura 19. Relación entre el colesterol total plasmático expresado como área bajo la curva y las placas de ateroma cuantificadas microscópicamente expresadas en mm<sup>2</sup>.**



**El grupo tratado con tibolona presenta una recta más plana evidenciando que para este grupo la placa de ateroma es independiente del colesterol plasmático expresado como área bajo la curva.**



### **6.3. CUANTIFICACIÓN DEL COLESTEROL TOTAL DE LA AORTA.**

El análisis del colesterol aórtico tanto en función de las proteínas aórticas como del peso de la aorta muestra como los grupos tratados con tibolona y estradiol presentan valores menores al control y al sham. (Tabla 5 y Figuras 20 y 21 )

El grupo tratado con raloxifeno sólo muestra valores significativamente menores al control y al sham cuando lo analizamos en función del peso aórtico.

El grupo EC no muestra diferencias respecto al control y al sham en ningún caso.

Tampoco hay diferencias entre sham y control.

Las rectas de regresión realizadas muestran como la disminución del colesterol aórtico para los grupos tratados es independiente del colesterol plasmático expresado en función del área bajo la curva (Figura 22).

**Tabla 5. Determinaciones del colesterol aórtico en función del peso aórtico o de las proteínas aórticas.**

	<b>microgr. colesterol aórtico/ mgr. aorta</b>	<b>mgr. colesterol aórtico/ mgr. proteínas aórticas</b>
Control (n=7)	8.55±4.63	3.75±2.41
Sham (n=6)	11.97±11.33	7.31±9.35
Tibolona(n=8)	1.86±0.72*	0.90±0.37*
Raloxifeno (n=7)	3.82±2.14 <sup>+</sup>	2.15±1.66
Estradiol (n=8)	2.86±1.10 <sup>#</sup>	1.08±0.36 <sup>#</sup>
Estradiol- ciproterona (n=6)	5.24±0.91	2.25±0.4

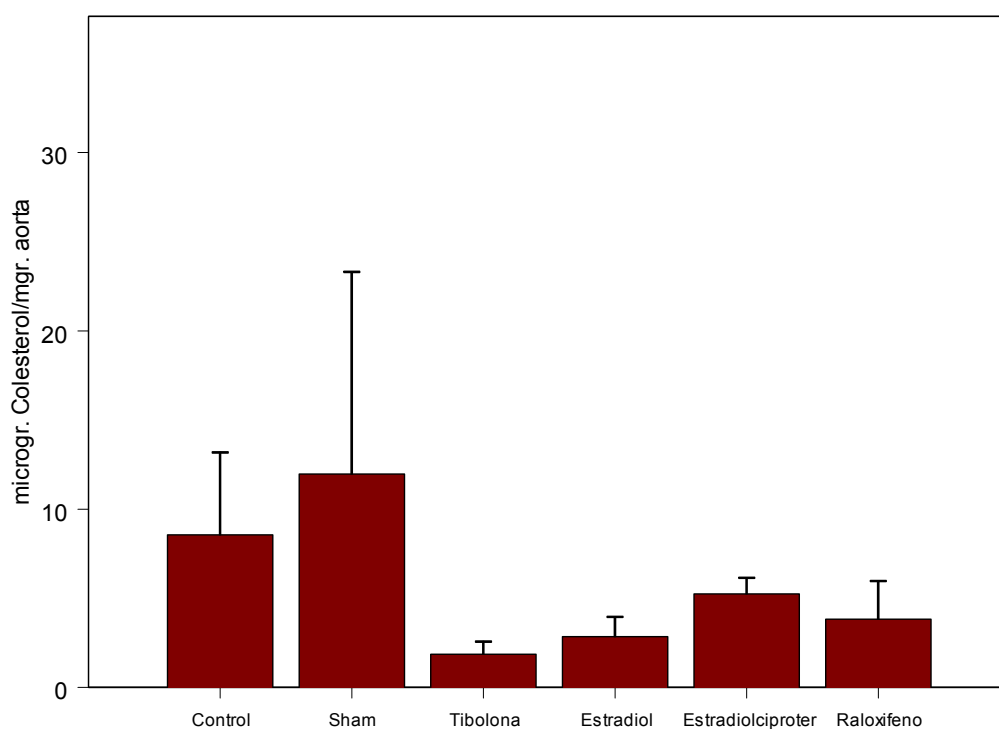
**Todos los valores están expresados como medias ± desviación típica.**

**\*p<.000 (T vs. EC, C y S)**

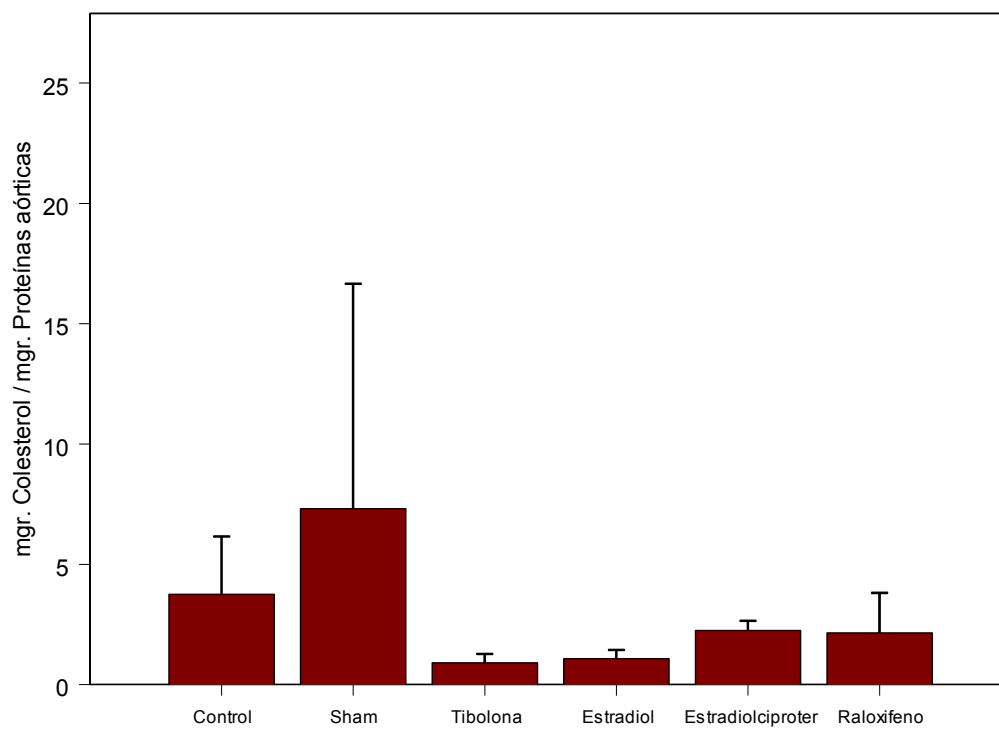
**<sup>#</sup>p<.000 (E vs. C y S)**

**<sup>+</sup>p<.000 (R vs. C y S)**

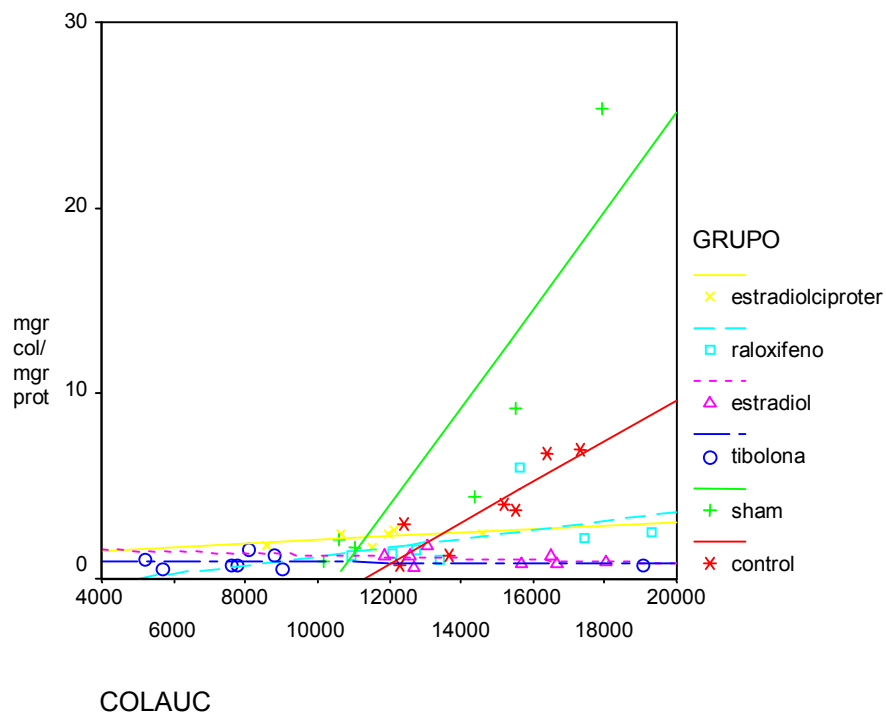
**Figura 20. Determinaciones del colesterol aórtico en función del peso aórtico.**  
Se observa una disminución en todos los grupos aunque sólo los grupos tratados con tibolona, raloxifeno y estradiol muestran diferencias significativas. Los valores están expresados como medias y desviación típica.



**Figura 21. Determinaciones del colesterol aórtico en función de las proteínas aórticas. Se observa una disminución en todos los grupos aunque sólo los grupos tratados con tibolona y estradiol muestran diferencias significativas. Los valores están expresados como medias y desviación típica.**



**Figura 22. Relación entre el colesterol total plasmático expresado como área bajo la curva y el colesterol aórtico en función de las proteínas aórticas.**



Existe una correlación lineal positiva significativa entre el colesterol expresado en forma de AUC y los mgr.col./ mgr.prot. aórticas en los grupos C y S. A medida que aumenta el colesterol, los mgr.col./ mgr.prot. también aumentan en los grupos control y sham. Por el contrario esta relación no existe para los otros grupos, y los mgr. colesterol aórtico siempre son bajos independientemente del colesterol plasmático.

## **6.4. CUANTIFICACIÓN DE LOS LÍPIDOS PLASMÁTICOS.**

Se han realizado 3 tipos de estudios con los lípidos: estudio basal y final; estudio global mediante el estudio del área bajo la curva (AUC), y relación entre el colesterol y los triglicéridos de las distintas fracciones lipoproteicas (VLDL, IDL, LDL, y HDL).

### **6.4.1. Lípidos basales:**

Los niveles de lípidos plasmáticos basales obtenidos mostraron que había diferencias estadísticamente significativas en algunas variables. (Tablas 6 y 7)

Así los grupos estradiol y tibolona tenían el colesterol y el colesterol-IDL menores a los otros grupos.

El grupo EC tenía los triglicéridos-VLDL más bajos que el grupo E.

La fracción HDL de los triglicéridos basales también mostraba diferencias. Así los grupos raloxifeno y EC presentaban valores menores a los grupos estradiol y control, y el grupo de la tibolona valores menores al grupo control.

**Tabla 6. Niveles de colesterol plasmático al inicio del estudio.**

	<b>COL</b>	<b>Col VLDL</b>	<b>Col IDL</b>	<b>Col LDL</b>	<b>Col HDL</b>
Control	122.63±27.74	7.25±2.76	55.95±24.27	22.31±6.98	27.68±5.55
Sham	111.25±34.82	7.38±6.95	43.81±22.66	18.39±8.33	26.49±5.64
Tibolona	78.5±8.54*	3.13±1.89	23.13±7.0 <sup>α</sup>	16.13±6.85	21.75±7.17
Raloxifeno	108.88±15.54	5.25±3.06	52.38±11.24	20.88±2.42	26.25±3.49
Estradiol	65.25±17.01*	3.75±3.01	20.75±10.25 <sup>α</sup>	14.25±5.68	24.75±6.14
Estradiol- ciproterona	106.75±19.65	3.38±2.39	43.25±16.15	16.38±2.67	22.88±6.9

**Todos los valores están en mgr/dL expresados como medias ± desviación típica.**

**\*p<0.001 (T y E vs. C, S, R y EC)**

**<sup>α</sup>p<0.001 (T y E vs. C, S, R y EC)**

**Tabla 7. Niveles de triglicéridos plasmáticos al inicio del estudio.**

	<b>TG</b>	<b>Tg VLDL</b>	<b>Tg IDL</b>	<b>Tg LDL</b>	<b>Tg HDL</b>
Control	67.13±12.71	14±7.86	18.44±7.63	9.49±2.15	23.1±16.04
Sham	54.25±20.47	12.88±10.72	11.03±9.08	6.7±5.9	16.35±6.38
Tibolona	49.88±14.18	14.25±4.03	7.5±3.7	6.88±3.64	12.13±3.0 <sup>α</sup>
Raloxifeno	53.0±18.75	18.63±5.71	11.0±5.83	5.38±2.67	9.13±3.4*
Estradiol	61.5±28.83	22.38±10.72 <sup>+</sup>	12.7±11.96	9.63±6.0	20.88±6.24
Estradiol- ciproterona	44.75±35.7	8.0±7.13	11.25±16.8	4.75±6.3	7.88±3.76*

**Todos los valores están en mgr/dL expresados como medias ± desviación típica.**

<sup>+</sup>**p=0.021 (E vs. EC)**

**\*p=0.001 (R y EC vs. C y E)**

<sup>α</sup>**p=0.001 (T vs. C)**

Esta heterogeneidad en algunos lípidos basales es un problema al analizar las variables respuesta al tratamiento (lípidos finales, lípidos AUC, placas de ateroma), ya que las diferencias entre grupos podrían no ser debidas simplemente al tratamiento, sino que también podrían ser debidas a esta heterogeneidad en los propios lípidos iniciales. Por lo tanto se ha comprobado si los lípidos basales que presentan diferencias entre grupos afectan a las variables respuesta al tratamiento



o si por el contrario son independientes. Esto se ha hecho mediante el análisis de ANCOVAS.

Se ha visto que en ningún caso los respectivos lípidos basales y las interacciones con las variables respuesta eran significativas ( $p > 0.05$ ) excepto cuando se ha corregido por el triglicérido-VLDL basal que mostraba diferencias entre los grupos E y EC afectando a las siguientes variables respuesta: % ateroma torácica, % ateroma total, microgr col /mgr proteínas, ateroma total y placa más alta (medidas microscópicamente) y TG-VLDL (AUC). Estos resultados serán comentados en la discusión de la tesis.

#### **6.4.2. Lípidos finales.**

Al final de la dieta aterogénica los niveles de lípidos plasmáticos aumentaron significativamente en los 6 grupos, con las siguientes diferencias. (Tablas 8 y 9)

El grupo estradiol mostraba un colesterol final más bajo que los grupos tibolona, EC y sham.

La tibolona presenta un colesterol-LDL más alto que los otros grupos.

El raloxifeno presenta unos triglicéridos-LDL menores al control y la tibolona, y el estradiol (sólo o unido a acetato de ciproterona) menores al grupo T.

El raloxifeno muestra asimismo unos niveles de colesterol-HDL más bajos que la tibolona, y unos triglicéridos-HDL menores a los grupos sham y tibolona, al igual que el grupo EC. Finalmente la tibolona presenta un colesterol-IDL más alto que los grupos estradiol y sham.

Y los grupos estradiol y EC unos triglicéridos-IDL menores a la tibolona.

**Tabla 8. Niveles de colesterol plasmático al final del estudio.**

	<b>COL</b>	<b>Col VLDL</b>	<b>Col IDL</b>	<b>Col LDL</b>	<b>Col HDL</b>
Control	1367.3±348.4	791.7±334.2	129.6±50.1	51.8±29.5	28.5±23.5
Sham	1112.2±364.2	616.6±174.3	97.5±50.4	40.1±17.9	18.3±12.8
Tibolona	1018.6±520.0	595.3±509.5	205.0±101.1 <sup>α</sup>	109.8±122.0 <sup>#</sup>	38.0±14.4
Raloxifeno	1407.86±397.7	666.7±124.05	131±72.5	42.71±24.68	14±7.66 <sup>+</sup>
Estradiol	1710.5±356.2*	734.38±108.8	95±44.8	35.13±13.92	24.38±7.69
Estradiol- ciproterona (n=6)	1050.1±252.0	576±128.9	126.17±56.25	50.5±43.07	29.67±12.8

**Todos los valores están en mgr/dL expresados como medias ± desviación típica.**

**\*p=0.008 (E vs. T, EC y S)**

**<sup>α</sup>p<0.024 (T vs. E y S)**

**<sup>#</sup>p=0.049 (T vs. S, C, R, E y EC)**

**<sup>+</sup>p=0.036 (R vs. T)**

**Tabla 9. Niveles de triglicéridos plasmáticos al final del estudio.**

	<b>TG</b>	<b>Tg VLDL</b>	<b>Tg IDL</b>	<b>Tg LDL</b>	<b>Tg HDL</b>
Control	367.3±407.6	253.7±433.5	18.2±10	14.0±8.7	13.8±11.4
Sham	248.1±291.1	171.6±285.6	17.7±14	11.7±0.7	18.2±3.8
Tibolona	377.5±369.5	309.5±362.4	28.1±6.1	17.3±10.9	21.2±7.9
Raloxifeno	309.57±121.3	196.86±70.83	12.5±21.0	3.7±1.98*	8.0±0.#
Estradiol	80.5±26.07	97.63±49.02	9.25±3.6 <sup>+</sup>	7.6±1.92 <sup>α</sup>	14.75±5.09
Estradiol- ciproterona (n=6)	246.17±136.1	78±44.86	9±5.1 <sup>+</sup>	6±3.58 <sup>α</sup>	8±5.4 <sup>#</sup>

**Todos los valores están en mgr/dL expresados como medias ± desviación típica.**

<sup>+</sup>**p=0.028 (E y EC vs. T)**

**\*p=0.001 (R vs. T y C)**

<sup>α</sup>**p=0.001 (E y EC vs. T)**

<sup>#</sup>**p=0.002 (R y EC vs. S y T)**

Es de destacar la diferente distribución de los niveles de colesterol y triglicéridos en las lipoproteínas plasmáticas al inicio y al final del estudio. En condiciones basales, el colesterol se encontró distribuido fundamentalmente en la fracción IDL (50%) mientras que la fracción VLDL sólo representaba el 6%.

Tras 12 semanas de tratamiento se invirtieron los porcentajes estando la mayor parte del colesterol en las VLDL, sobrepasando el 50% en algunos casos, mientras el colesterol de las IDL llegaba sólo alrededor del 10% como máximo.

#### **6.4.3. Lípidos expresados como área bajo la curva.**

Debido a las diferencias obtenidas en la última extracción se optó por realizar asimismo un análisis de los niveles de lípidos plasmáticos en forma de área bajo la curva para obtener de este modo una cuantificación más real de lo que había sucedido a lo largo del estudio. (Tablas 10 y 11)

El grupo tratado con tibolona presenta un colesterol total menor a los otros grupos a excepción del grupo EC, y un colesterol-VLDL menor al grupo control. Por el contrario presenta un colesterol-LDL mayor a los otros grupos. Y unos niveles de colesterol-IDL mayores al grupo tratado con estradiol.

El grupo tratado con raloxifeno presenta unos triglicéridos totales mayores a los grupos tratados con estradiol (con o sin acetato de ciproterona) y al grupo sham.

Los grupos raloxifeno, EC y E presentan unos triglicéridos-LDL mayores al control.

Los grupos R y EC tienen unos triglicéridos-HDL menores al grupo control y tibolona.

Y los grupos E y EC unos triglicéridos-IDL menores al grupo control.

**Tabla 10. Area bajo la curva de los niveles de colesterol plasmático a lo largo del estudio.**

	<b>COL</b>	<b>Col VLDL</b>	<b>Col IDL</b>	<b>Col LDL</b>	<b>Col HDL</b>
Control	14226.1±2210.0	7972.1±1691.7	2035.3±443.6	690.9±96.0	434.6±135.8
Sham	13180.1±3034.8	7524.8±2351.6	1640.3±575.8	603.7±267.2	403.9±181.1
Tibolona	8910.0±4335.2*	4456.3±3586.0 <sup>#</sup>	2291.1±465.2 <sup>+</sup>	889.0±189.1 <sup>&amp;</sup>	513.2±115.8
Raloxifeno	14501±3048.11	7221.2±1385.7	1869.0±706.47	537.7±106.1	357.5±54.27
Estradiol	14640.5±2338.4	7593.8±1854.6	1416.0±288.63	555.9±91.5	410.25±64.1
Estradiol- ciproterona (n=6)	11587.7±1977.9	5882±1192.9	1997.9±534.9	616.1±136.09	373±71.7

**Todos los valores están en mgr/dL expresados como medias ± desviación típica.**

**\*p<0.003 (T vs. C, S, R y E)**

**<sup>#</sup>p=0.027 (T vs. C )**

**<sup>+</sup>p=0.025 (T vs. E)**

**<sup>&</sup>p=0.001 (T vs. C, S, R, E y EC).**

**Tabla 11. Area bajo la curva de los niveles de triglicéridos plasmáticos a lo largo del estudio.**

	<b>TG</b>	<b>TG VLDL</b>	<b>TG IDL</b>	<b>TG LDL</b>	<b>TG HDL</b>
Control	3378.0±1104.3	1882.1±850.5	372.1±105.2 <sup>#</sup>	226.9±68.1 <sup>+</sup>	275.7±62.2 <sup>&amp;</sup>
Sham	2311.6±599.8	1353.9±668.3	245.8±112.2	169.6±63.1	218.9±65.3
Tibolona	2974.1±2986.6	2070.2±2821.6	301.5±143.9	163.8±28.1	241.4±103.4 <sup>&amp;</sup>
Raloxifeno	4634.5±852.8*	2376.4±532.4	301.2±202.8	92.5±13.3	148.6±19.6
Estradiol	1877.5±574.1	1073.1±257.9	143.1±35.1	113.2±22.5	215.5±24.3
Estradiol- ciproterona (n=6)	2271.1±898.6	1232.0±650.6	144.1±72.8	128.1±93.7	138.4±41.6

**Todos los valores están en mgr/dL expresados como medias ± desviación típica.**

**\*p=0.013 (R vs. S , E, y EC)**

**<sup>#</sup>p=0.004 (C vs. E y EC )**

**<sup>+</sup>p<0.001 (C vs. R, E, y EC )**

**<sup>&</sup>p=0.001 (C y T vs. R y EC).**

#### **6.4.4. Relación colesterol/triglicéridos.**

Se realizó asimismo una valoración de la relación colesterol/triglicéridos en las fracciones lipoproteicas como posible indicador del potencial aterogénico de las mismas, partiendo de los valores obtenidos a partir del área bajo la curva de cada lipoproteína (por ejemplo  $\text{Ratio VLDL} = \text{ColVLDL}/\text{TrigVLDL}$ ).

Se observaron diferencias en cuanto a las ratios de VLDL, IDL y LDL, y no para la ratio de HDL. (Tabla 12)

La ratio VLDL mostraba valores menores de la tibolona y el raloxifeno respecto a los grupos sham y estradiol.

La ratio IDL mostraba valores más bajos del control respecto al estradiol (con o sin acetato de ciproterona), y los grupos S, R, T, y E una ratio menor a la del grupo EC.

Y la ratio LDL mostraba valores más bajos para el control respecto a la tibolona, el raloxifeno, y el grupo EC. Mientras que el grupo S mostraba una ratio menor a la del grupo EC.

**Tabla 12. Ratios de colesterol y triglicéridos a partir de los valores obtenidos con el área bajo la curva de cada lipoproteína.**

	ColVLDL/TgVLDL	ColIDL/TgIDL	ColLDL/TgLDL	ColHDL/TgHDL
Control	5.1±2.9	5.6±1.3 <sup>#</sup>	3.2±0.7 <sup>+</sup>	1.6±0.6
Sham	6.3±2.3	7.5±3.2	3.6±0.8 <sup>β</sup>	1.8±0.5
Tibolona	3.3±1.8 *	8.5±2.7	5.6±1.8	2.5±1.6
Raloxifeno	3.1±0.8 *	7.9±3.4	5.8±0.6	2.4±0.4
Estradiol	7.1±1.2	10.1±1.5	4.9±0.8	1.9±0.3
Estradiol- ciproterona (n=6)	5.6±2.1	15.1±3.9 <sup>&amp;</sup>	6.6±3.4	2.8±0.8

**Todos los valores están expresados como medias ± desviación típica.**

**\*p=0.002 (T y R vs. S y E)**

**#p<0.001 (C vs. E y EC)**

**&p<0.001 (EC vs. S, R, T y E)**

**+p=0.001 (C vs. T, R y EC)**

**βp=0.001 (S vs. EC)**



## **6.5. ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LAS PLACAS DE ATEROMA.**

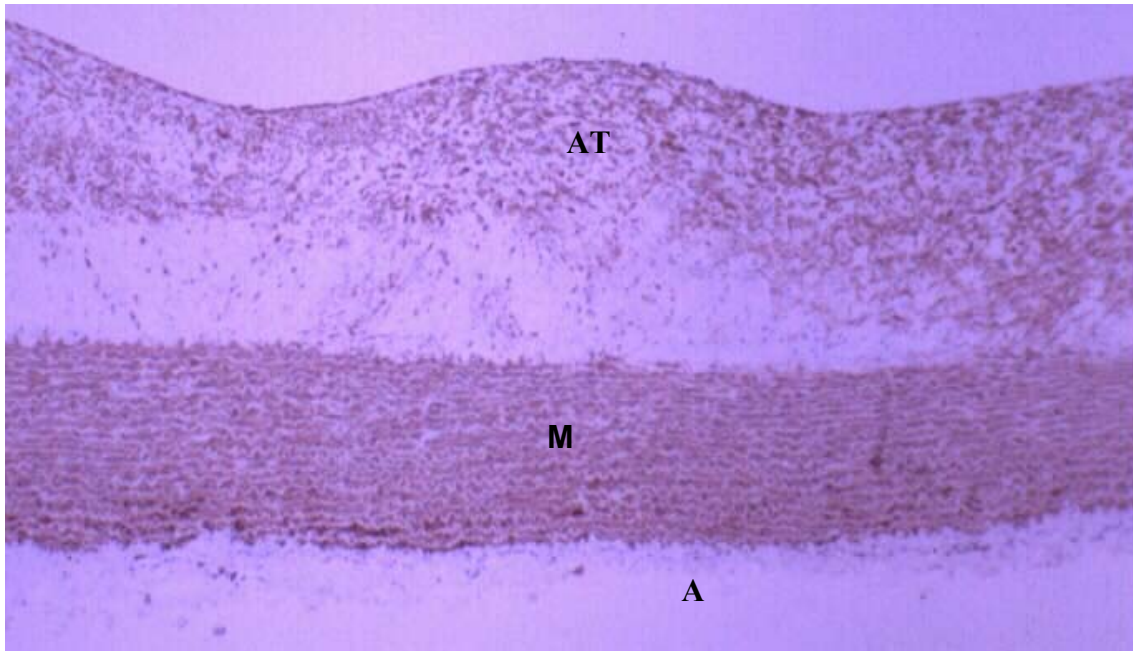
El estudio inmunohistoquímico demostró que las placas de ateroma estaban formadas básicamente por macrófagos y células musculares lisas. Además, existía una distribución característica en las placas de mayor tamaño en cuanto que las células musculares lisas predominaban en la superficie y en los bordes de las placas, y los macrófagos en la zona media de las mismas. Las células marcadas para apoptosis se encontraban predominantemente en las zonas más profundas de la placa, al contrario que las células en replicación que predominaban en la superficie y en los bordes.

El grupo tratado con tibolona presentaba placas más pequeñas que mostraban una distribución mucho más uniforme y escasa de los macrófagos y las células musculares lisas, sin observarse prácticamente apoptosis, y con un menor grado de replicación.

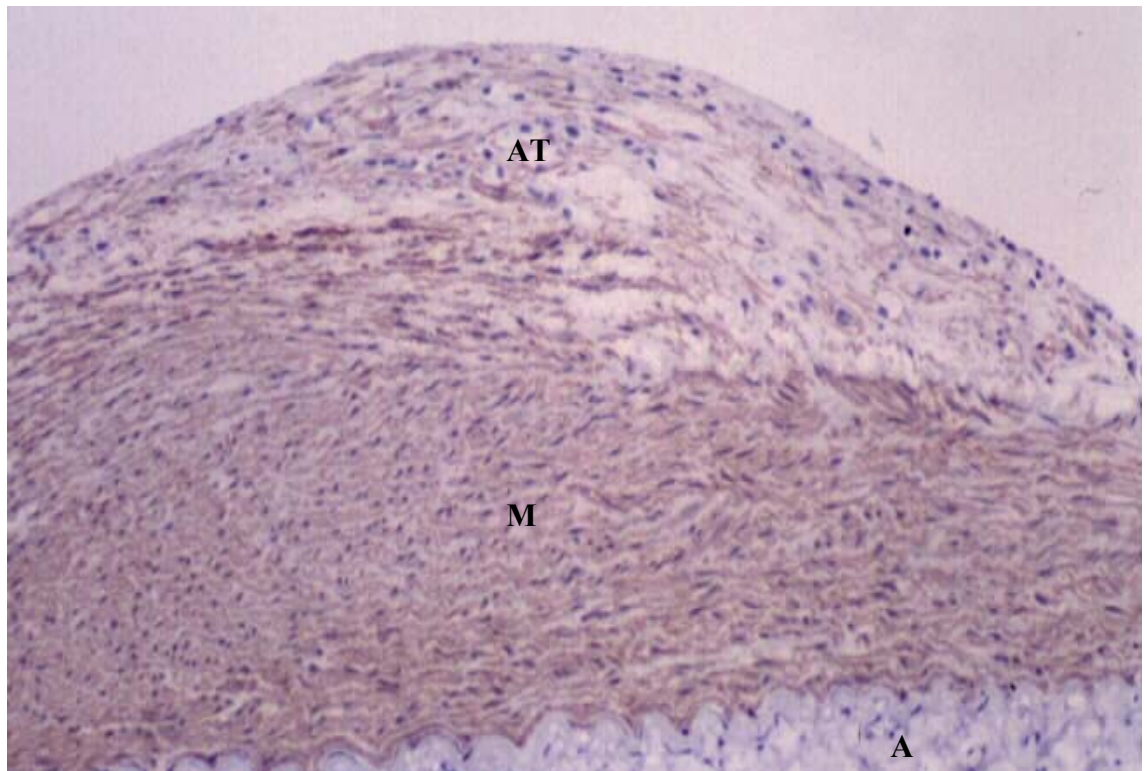
No parece existir ninguna diferencia evidente con los otros distintos tratamientos en el análisis cualitativo de las placas de ateroma, siendo el tamaño de la placa de ateroma el que determina la distribución de los distintos tipos celulares y la presencia de apoptosis y replicación celular.(Figuras 23, 24, 25 y 26).

En la valoración semicuantitativa de la replicación celular se obtuvieron porcentajes que oscilaban entre un 0% en las placas de menor tamaño hasta un 30-35% en las placas de mayor tamaño también independientemente del tratamiento utilizado sinó dependiendo del tamaño lesional.

**Figura 23. Fotografías microscópicas correspondientes a una tinción de inmunohistoquímica para células musculares lisas. Corresponden a una del grupo sham y a otra del grupo tratado con tibolona.**

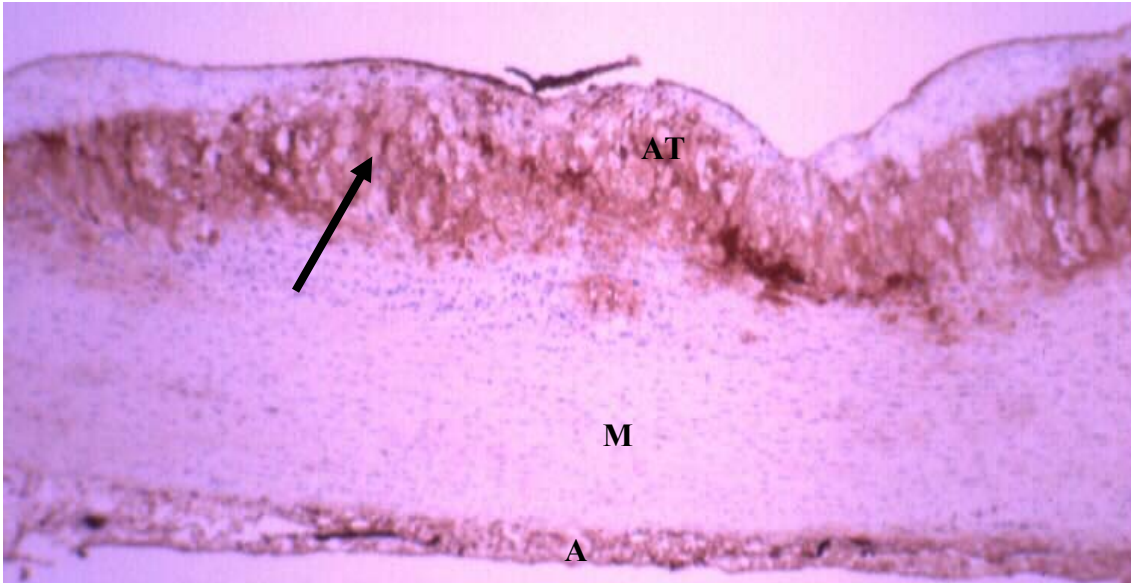


**a) Fotografía correspondiente al grupo sham (40X). Se observa la distribución preferente de las células musculares lisas en las zonas superficiales de la gruesa placa de ateroma. La capa media compuesta básicamente por células musculares lisas también aparece teñida. (AT: ateroma; M: media; A: adventicia)**

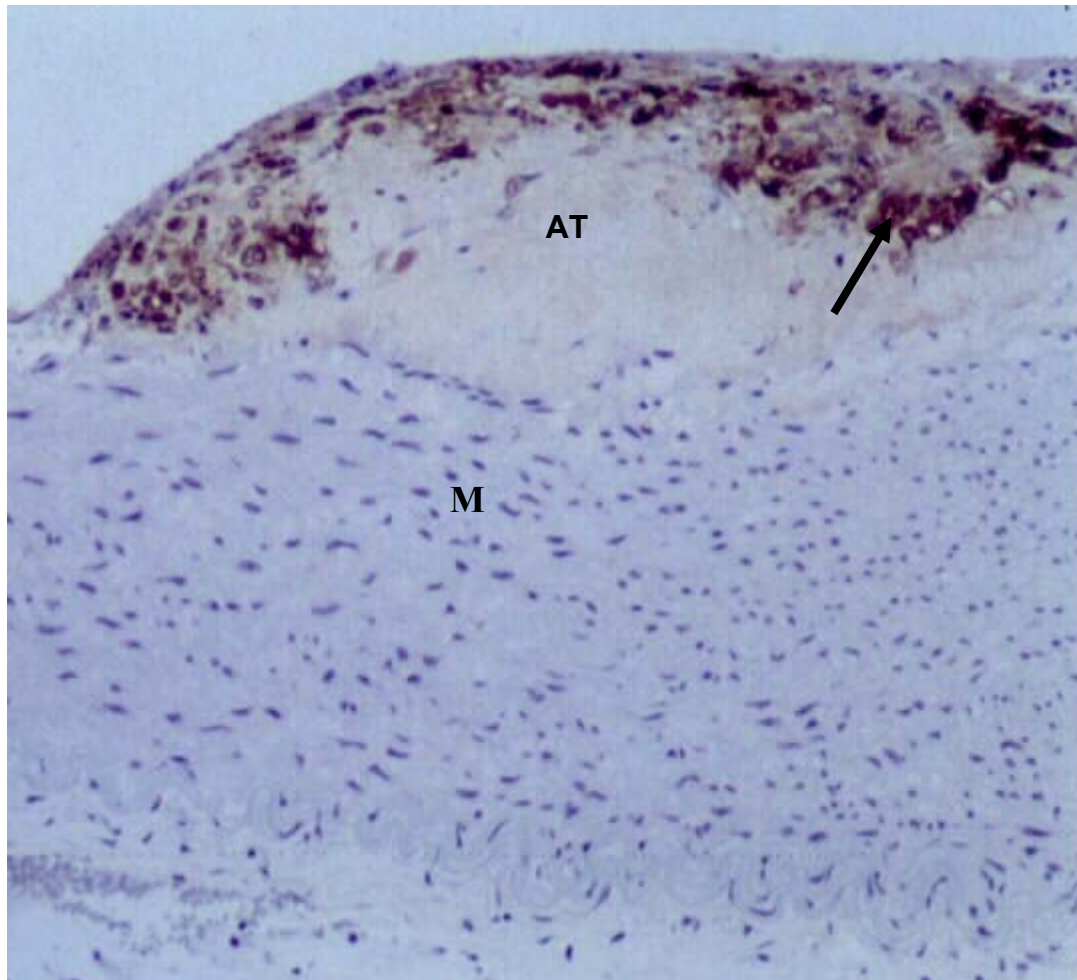


**b) En esta placa de pequeño tamaño correspondiente a un corte de una coneja tratada con tibolona (100x) vemos como la distribución de las células musculares lisas marcadas para actina es mucho más homogénea. (AT: ateroma; M: media; A: adventicia)**

**Figura 24. Fotografías microscópicas correspondientes a una tinción de inmunohistoquímica para macrófagos (RAM 11). Corresponden a una del grupo sham y a otra del grupo tratado con tibolona.**



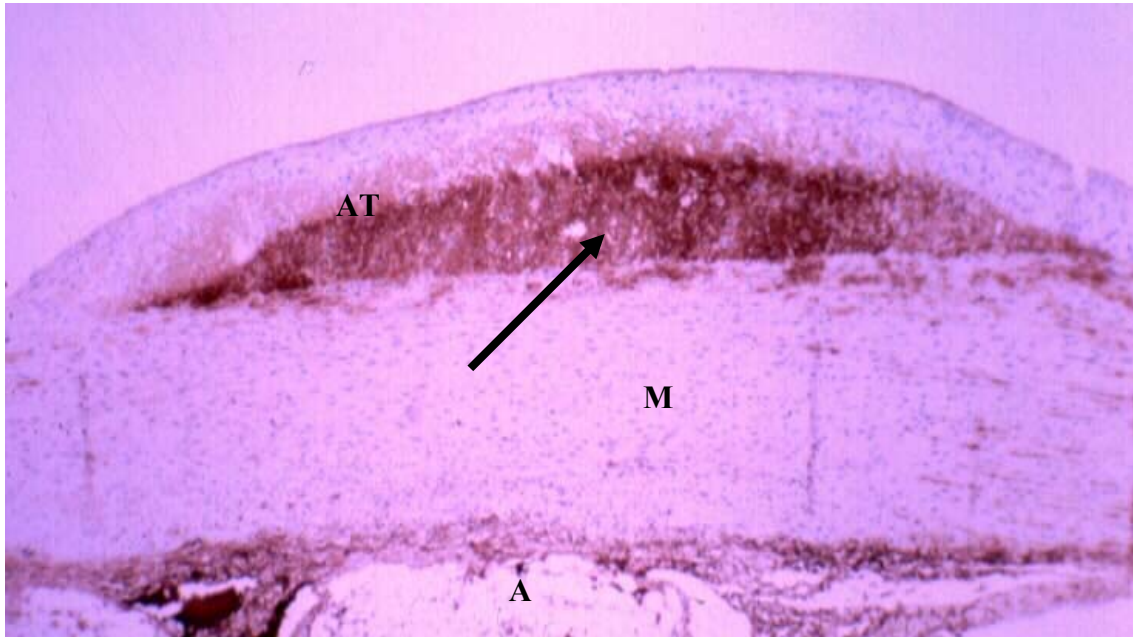
**a) Grupo sham. Se observa la distribución preferente de los macrófagos en las células de la zona media de la placa de ateroma (flecha). Fotografía realizada a 40 aumentos. (AT: ateroma; M: media; A: adventicia)**



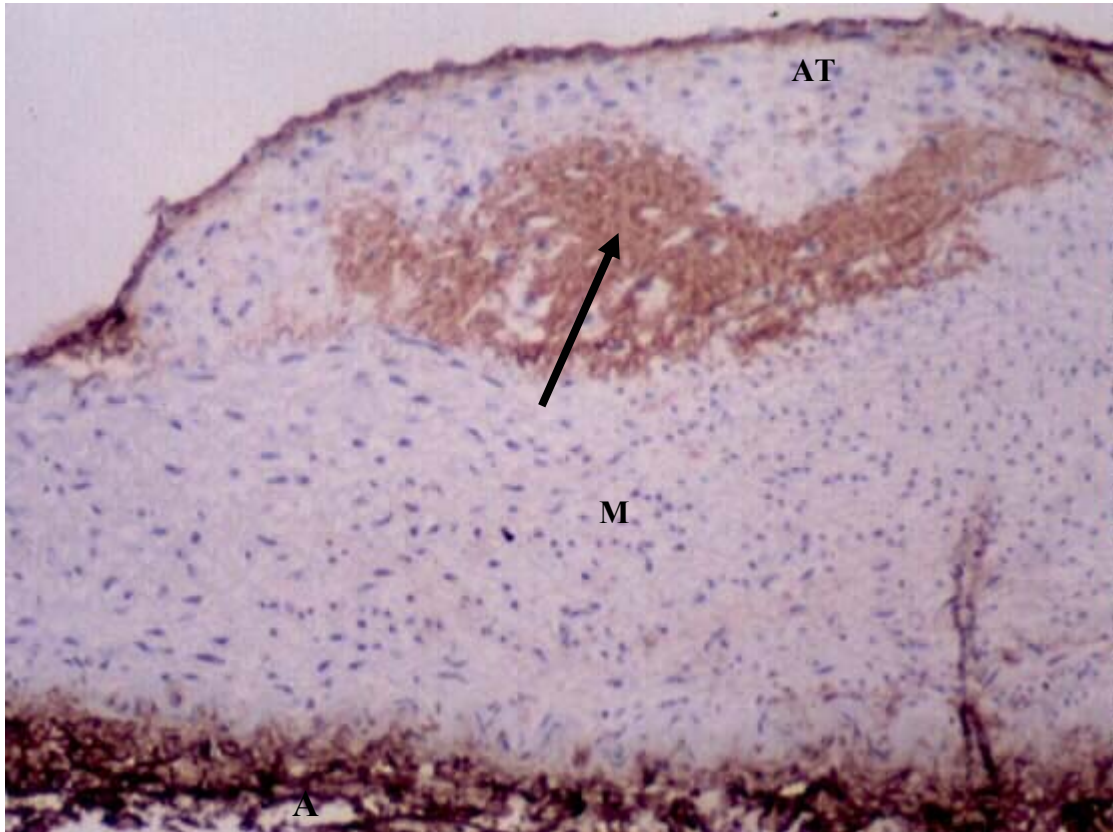
**b) Placa de ateroma correspondiente a un corte de una aorta de una coneja tratada con tibolona (200x). Los macrófagos marcados para RAM-11 (flecha) se distribuyen preferentemente en la zona superficial y media pero no en la profundidad de la placa. (AT: ateroma; M: media)**



**Figura 25. Fotografías microscópicas correspondientes a una tinción de inmunohistoquímica para BAX. Corresponden a una del grupo sham y a otra del grupo tratado con tibolona.**

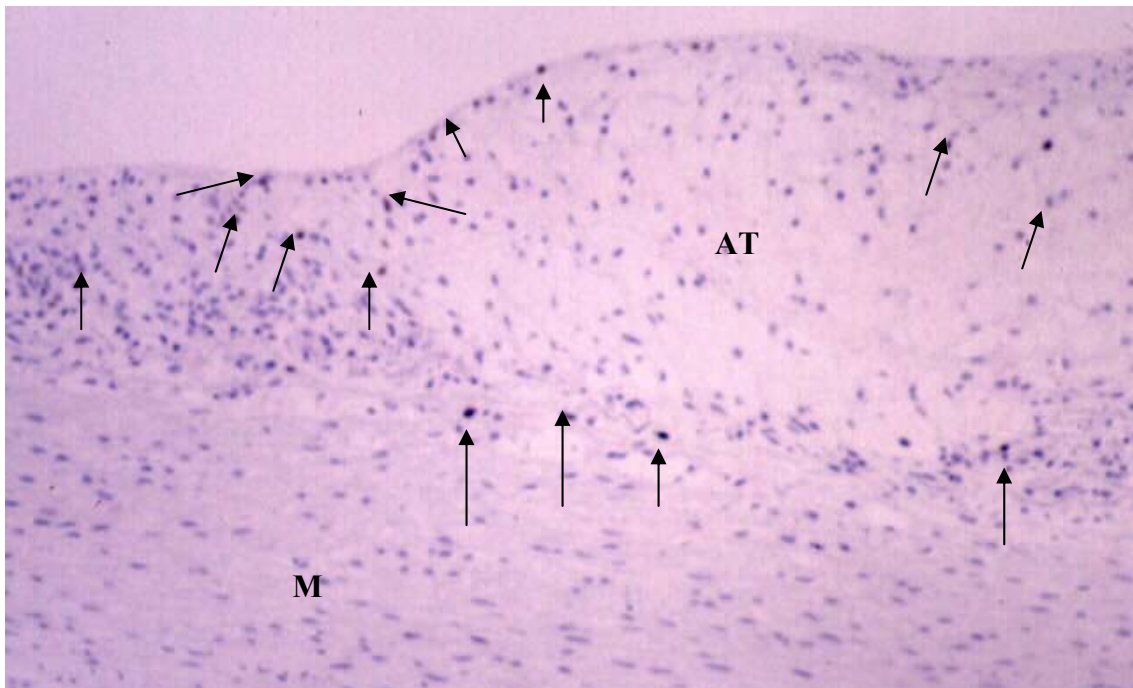


**a) Corte de una coneja del grupo sham (40x). Las células en apoptosis se distribuyen preferentemente en las capas profundas de la placa de ateroma. La flecha marca la zona de máxima apoptosis, quedando en la superficie el resto de la placa de ateroma. (AT: ateroma; M: media; A: adventicia)**



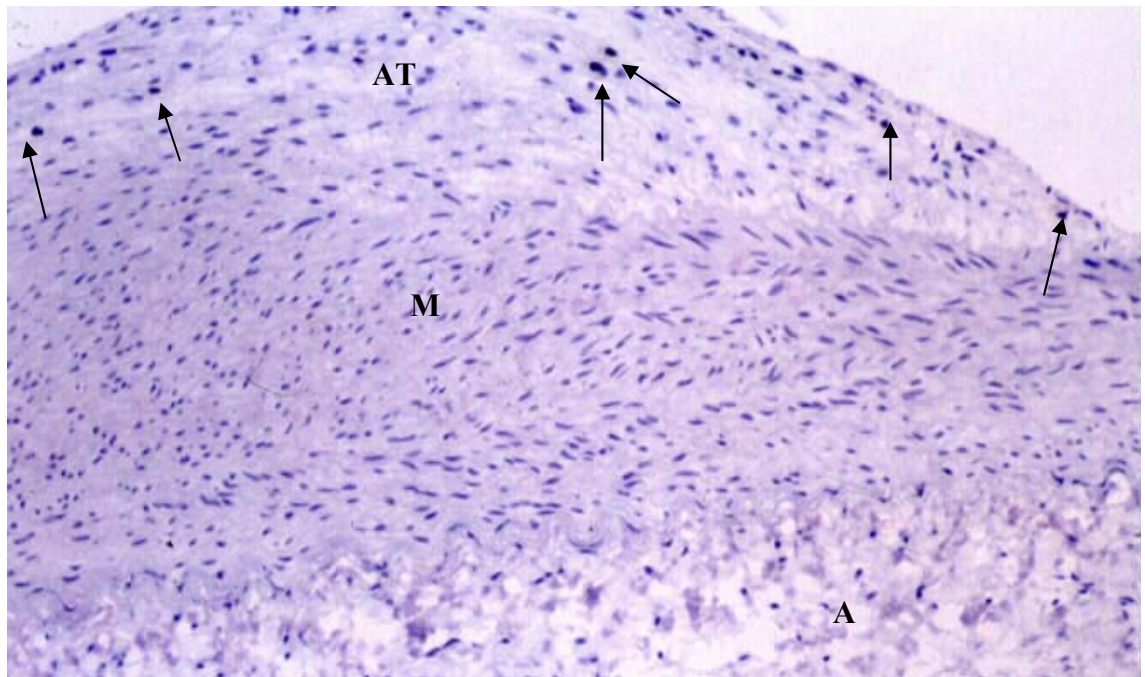
**b) Corte correspondiente a una coneja del grupo tratado con tibolona (100x). Existe apoptosis también en las zonas profundas de la placa de ateroma. (AT: ateroma; M: media; A: adventicia)**

**Figura 26. Fotografías microscópicas correspondientes a una tinción de inmunohistoquímica para el marcador de replicación celular MIB 1. Corresponden a una del grupo control y a otra del grupo tratado con tibolona.**



**a) Grupo control (200x). Se observan algunas células marcadas (flechas) que predominan en el margen de la placa de ateroma. (AT: ateroma; M: media)**





**b) La aorta de la coneja tratada con tibolona muestra un menor grado de replicación celular. (100x). Las flechas indican las células en replicación. (AT: ateroma; M: media; A: adventicia)**

## **6.6. ESTUDIO DE ÚTERO, HÍGADO Y CORAZÓN.**

El peso de los distintos órganos extraídos mostraba las siguientes diferencias. (Tabla 13)

Los úteros de los grupos control, sham y raloxifeno eran los de peso menor de forma significativa respecto a los demás. Y además los úteros de las conejas tratadas con estradiol eran significativamente mayores que los de la tibolona y los del grupo EC. Y estos eran menores a los tratados con tibolona y estradiol sólo. No había diferencias entre el grupo sham y control. (Figura 27)

Los pesos de los hígados de las conejas tratadas con tibolona eran significativamente más bajos que los de los otros grupos.

Los corazones de las conejas tratadas con tibolona presentaban unos pesos mayores de forma significativa que los otros grupos, incluso corrigiendo por el peso final de los animales (Figura 28).

**Tabla 13. Comparaciones entre los pesos de los distintos órganos extraídos.**

	<b>Peso uterino</b>	<b>Peso hepático</b>	<b>Peso cardíaco</b>
Control (n=8)	1.89±0.6 <sup>α</sup>	135.2±28.0	7.62±1.59
Sham (n=8)	2.23±1.2 <sup>α</sup>	143.5±26.4	7.12±1.12
Tibolona (n=8)	7.37±1.3*	87.7±14.7 <sup>#</sup>	8.25±1.83 <sup>+</sup>
Raloxifeno(n=7)	1.94±0.3 <sup>α</sup>	125.5±11.82	7.5±0.53
Estradiol (n=8)	9.92±1.86	130.13±18.47	7.38±0.52
Estradiol- ciproterona (n=6)	5.94±0.94 <sup>β</sup>	119.67±12.55	7.0±0.63

**Todos los pesos están en gramos expresados como medias ± desviación típica, y todos han sido corregidos por el peso final de las conejas.**

**Para el peso uterino se prescindió de una coneja del grupo sham y para el peso cardíaco de una del grupo control ya que los valores hallados se consideraron anómalos.**

**\*p<.000 (T vs E)**

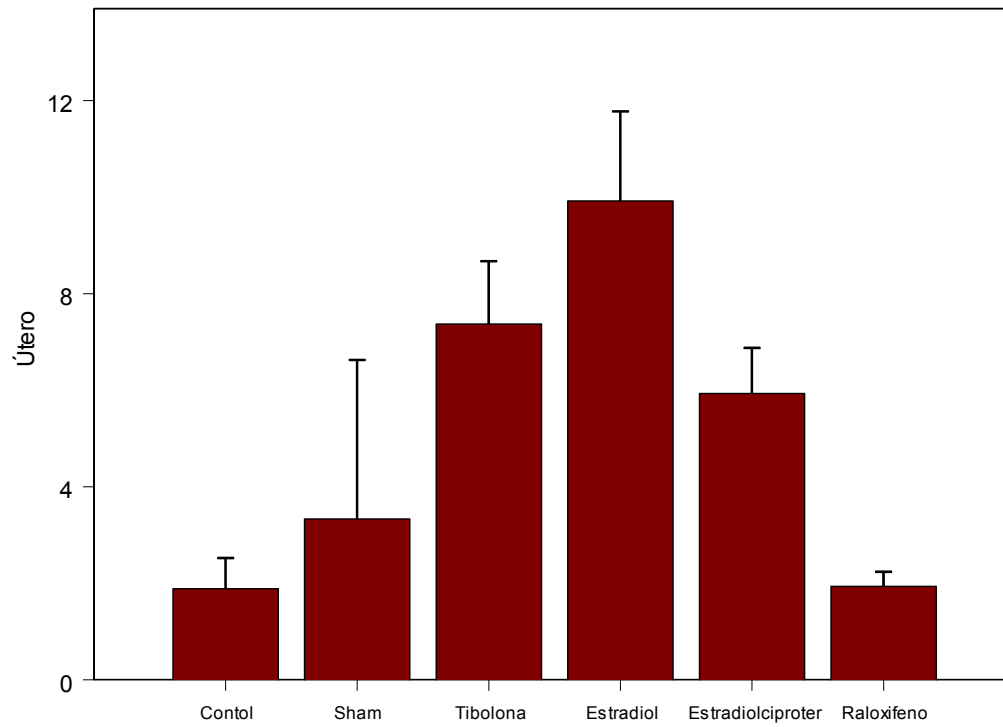
**<sup>β</sup>p<.000 (EC vs T y E)**

**<sup>α</sup>p<.000 (C, S, R vs T, E y EC)**

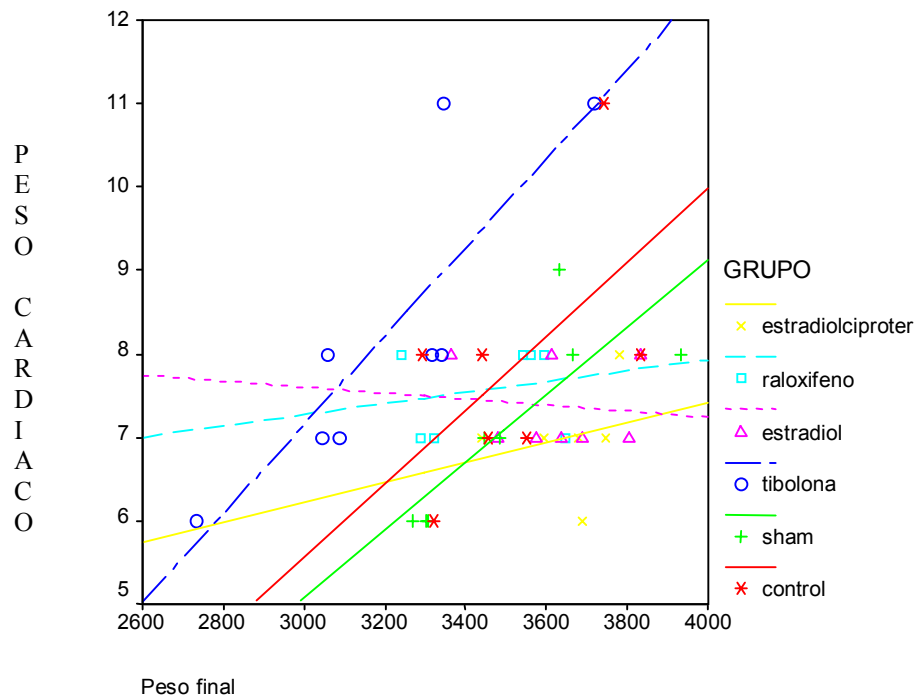
**<sup>#</sup>p<.000 (T vs S,C, R, E y EC)**

**<sup>+</sup>p<.000 (T vs S,C, R, E y EC)**

**Figura 27. Representación de los pesos uterinos. Todos los pesos están en gramos expresados como medias y desviación típica. Se observa el efecto de cada tratamiento sobre el útero.**



**Figura 28. Relación entre el peso corporal y cardíaco a lo largo del tiempo expresado en forma de rectas de regresión.**

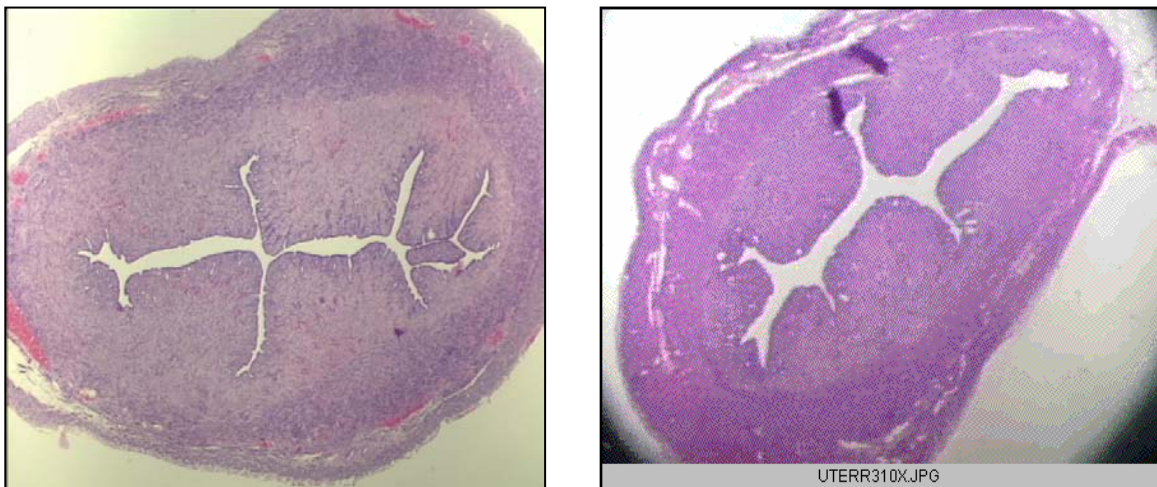


**A igualdad de pesos de las conejas el grupo T presenta un mayor tamaño cardíaco comparado con los otros grupos.**

Cuando realizamos el estudio histológico de los órganos extraídos destacaba en las conejas tratadas con tibolona y estradiol (sólo o con acetato de ciproterona), un útero que mostraba un importante incremento de la actividad proliferativa del endometrio (Figura 29).

Asimismo en los hígados de las conejas tratadas con tibolona se observaba una menor infiltración grasa que en los demás grupos (Figura 30).

**Figura 29. Fotos microscópicas de cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina de úteros correspondientes a una coneja no tratada, una tratada con raloxifeno, otra con estradiol, y otra con tibolona.**



**a) Cortes transversales de los úteros de una coneja del grupo sham (20x) y otra del grupo tratado con raloxifeno (10x) . El grosor del endometrio es escaso y se observan muy aisladas glándulas endometriales.**

b) Cortes transversales de los úteros de una coneja del grupo tratado con estradiol (10x) y otra del grupo tratado con tibolona (10x). Mientras en el útero del grupo sham el endometrio mostraba una sola capa atrófica, en estos úteros, tratados con estradiol y tibolona respectivamente el endometrio es mucho más grueso, observándose muchas más glándulas endometriales.



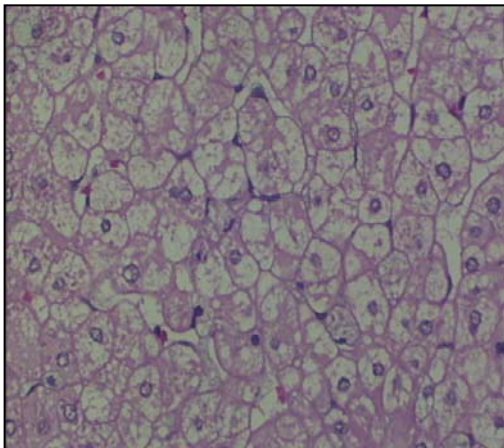
**Útero del grupo estradiol.**



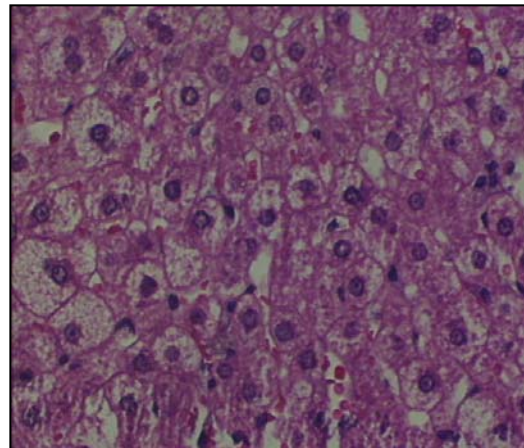
**Útero tratado con tibolona.**



**Figura 30. Fotos microscópicas correspondientes a cortes histológicos teñidos con hematoxilina-eosina (aumento 200x) de un hígado de una coneja del grupo control y a otro de una coneja tratada con tibolona. Los hepatocitos muestran en el grupo control una marcada vacuolización lipídica (microvacuolas) que contrasta con el hígado de las conejas tratadas con tibolona.**



**Hígado del grupo control.**



**Hígado tratado con tibolona.**



## **7. DISCUSSION.**

## **7.1. CUANTIFICACIÓN DE LA PLACA DE ATEROMA.**

El principal resultado de nuestro estudio es que el grupo tratado con tibolona es el que muestra una disminución de la placa de ateroma cuantificada por el método colorimétrico de forma significativa respecto a los grupos control, raloxifeno, y estradiolciproterona y con tendencia a la disminución respecto a los demás grupos. Cuando estos resultados los cuantificamos con el método microscópico estas diferencias todavía se hacen más patentes a favor de la tibolona, con lo que la tibolona no disminuye tan sólo la extensión de la placa sino también su grosor. Estos resultados estarían de acuerdo con los trabajos publicados hasta la fecha con tibolona y ateromatosis (Zandberg, 1998; 2001), de diseño similar al nuestro, que sugieren un papel importante de la tibolona frente a la prevención primaria de enfermedad cardiovascular, por una disminución de la placa de ateroma. En el primer estudio de Zandberg se utilizaron hasta un total de 140 conejas de las cuales 42 fueron tratadas con tibolona con 3 distintas dosis (2mg., 6mg. y 18 mg). Además se realizaron 2 grupos tratados con estradiol oral o subcutáneo, un grupo con estradiol y acetato de noretisterona (NETA), y un último grupo sólo con NETA. También se utilizaron grupos control y sham. Los grupos fueron tratados con una dieta rica en colesterol al 4% durante 20 semanas. Al final del estudio la tibolona conseguía disminuir la placa de ateroma en el arco aórtico, aorta torácica y aorta abdominal, mientras que de los otros tratamientos sólo el estradiol subcutáneo disminuía las placas en la aorta abdominal y torácica. Asimismo al

cuantificar microcópicamente la placa de ateroma en una arteria carótida previamente lesionada se hallaban similares resultados. Estos resultados concuerdan además perfectamente con un estudio recientemente publicado en nuestro país realizado en mujeres menopáusicas tratadas con tibolona. En este estudio se incluyeron 38 mujeres seguidas durante 1 año a las que se practicaba estudios ecográficos seriados para calcular tanto el índice de pulsatilidad como el grosor de la placa de ateroma carotídea. Pese a contar con un número escaso de casos y carecer de grupo control, los resultados son muy alentadores ya que se obtenía una disminución de las placas carotídeas tanto en grosor como en longitud, así como una disminución del índice de pulsatilidad indicando además un efecto vasodilatador (García-Fantini, 2001). Existe además un estudio reciente realizado con ovejas en que se utilizaban distintas dosis de tibolona endovenosa (Zoma, 2001). Hallaron una mejora del flujo coronario dosis-dependiente, así como un incremento del flujo uterino. Además utilizaron un inhibidor de la síntesis del óxido nítrico para comprobar que era un mecanismo dependiente del mismo, y un antagonista del receptor estrogénico para comprobar que era un mecanismo ejercido a través de este receptor. En el segundo estudio de Zandberg los hallazgos en cuanto a la disminución de la placa de ateroma utilizando distintas dosis de la misma son beneficiosos también (Zandberg, 2001). Sin embargo no todos los trabajos realizados con tibolona encuentran resultados positivos. En este sentido podemos citar un estudio en el que midieron la placa de ateroma a nivel carotídeo en 31 mujeres menopáusicas tratadas con tibolona durante 7 años sin encontrar diferencias respecto a un grupo control de 30 mujeres sin tratamiento (Morris, 1999).

En las conejas tratadas con raloxifeno no se observan diferencias significativas respecto a los grupos sham y control, ni tampoco una tendencia a la disminución, con lo que desde este punto de vista el raloxifeno no aportaría beneficios a la patología cardiovascular. Estos resultados coinciden totalmente con los realizados con primates en que tampoco se encontraba una disminución de las placas de ateroma a nivel coronario (Clarkson, 1998). En este estudio además utilizaban 2 dosis distintas de raloxifeno y observaban como a mayor dosis del mismo se conseguía menor efecto en cuanto a extensión de la placa de ateroma en las arterias coronarias. Por el contrario el tratamiento con estrógenos conjugados equinos sí conseguía una disminución franca de la ateromatosis que aumentaba a mayor dosis de estradiol plasmático determinado por RIA y dividiendo los animales por grupos según los niveles de estradiol. Nuestros resultados desde este punto de vista son comparables al estudio de Clarkson, e irían en contra de una protección cardiovascular.

Las conejas tratadas con estradiol muestran una franca tendencia a la disminución de la placa de ateroma en todas las formas de cuantificación utilizada aunque no se alcance la significancia estadística. Tal vez la falta de potencia debido al escaso número de casos hace que estos resultados no sean del todo favorables. De todas formas si nos centramos en la cuantificación de la placa de ateroma los resultados encontrados en la literatura son dispares y así Zandberg en sus estudios utiliza decanoato de estradiol subcutáneo y estradiol oral combinado o no con acetato de noretisterona (Zandberg, 1998; 2001). Así encuentra como el tratamiento subcutáneo sí consigue disminuir la extensión de la placa pero no así el estradiol oral que sólo muestra una tendencia a la disminución al igual que nosotros, sin verse afectado por

el gestágeno. Existe también algún estudio utilizando estrógenos transdérmicos que no consigue disminuir la placa de ateroma (Blümel, 2000) aunque otro estudio sí lo consigue (Haines, 1999). Pero en general podemos decir que los estudios realizados en conejos y sobretodo en primates e incluso en humanos con estrógenos sólo obtienen efectos beneficiosos bien sea a nivel de la placa de ateroma o a nivel de funcionalismo arterial. El problema aparece cuando a estos estrógenos debemos añadirle un gestágeno para contrarrestar en humanos la posible hiperplasia endometrial en mujeres con útero. Hasta el momento no parece haberse encontrado un gestágeno capaz de impedir el crecimiento endometrial a la vez de mantener los efectos beneficiosos cardiovasculares de los estrógenos, que haya demostrado utilidad en ensayos randomizados.

En esta línea podemos decir que añadir acetato de ciproterona al estradiol no aporta ninguna ventaja sino más bien al contrario ya que se pierde la tendencia que presentaba el estradiol a la disminución de la placa de ateroma. En este caso el gestágeno utilizado neutralizaría los efectos beneficiosos obtenidos con el estradiol, lo cual estaría de acuerdo con algunos trabajos previos (Hanke, 1996; Zhu, 2000) aunque no con todos (Haarbo, 1991; 1996; Alexandersen, 1998; Brehme, 1999).

Hanke en 2 distintos trabajos al añadir progesterona al tratamiento con estradiol observa que se inhibía tanto el efecto beneficioso a nivel de la ateromatosis de la íntima aórtica como en la proliferación celular. Zhu estudió hasta 4 tipos de gestágeno (progesterona, norgestimato, levonorgestrel y acetato de medroxiprogesterona) y todos ellos inhibían los efectos antioxidantes y citoprotectores de los estrógenos.

Al contrario encontramos diversos estudios a favor de los gestágenos. Haarbo encontró como tanto el levonorgestrel como la noretisterona no impedían el efecto beneficioso de la disminución del colesterol aórtico aportado por el estradiol. Alexandersen incluso encuentra un incremento del efecto beneficioso del estradiol al añadir acetato de noretindrona. Y Brehme al usar caproato de hidroxiprogesterona observa como este gestágeno no modifica la extensión de la placa de ateroma.

Desde un punto de vista funcional también encontramos estudios realizados con gestágenos no del todo favorables. Así Nickenig (Nickenig, 2000) estudió los receptores de angiotensina 1 en las células musculares lisas como marcador de riesgo cardiovascular, y encontró como estos disminuían con el tratamiento con estrógenos y aumentaban con progesterona. Y Gorodeski (Gorodeski, 1998) utilizó progesterona, megace, noretindrona y acetato de medroxiprogesterona para observar como la vasodilatación coronaria conseguida con estradiol se veía disminuída al añadir estos gestágenos.

Probablemente el tipo de gestágeno utilizado, las dosis del mismo, la vía de administración, y si éste se usa de forma secuencial o continua determinan la diversidad de resultados. En nuestro caso hemos utilizado una dosis de acetato de ciproterona equivalente a la dosis de estradiol utilizada (manteniendo las equivalencias en humanos) pero sí es cierto que de una forma continua y no secuencial como en humanos. Aún así los estudios realizados comparando tratamientos secuenciales y continuos no muestran diferencias (Brehme, 1999).

Además como hemos ido repasando, los mecanismos de acción por los cuales se evalúa una misma molécula hormonal son múltiples. Esto hace que al no haber un método estandarizado para cuantificar estas distintas acciones, los resultados

obtenidos sean difíciles de comparar para la obtención de conclusiones de forma simple respecto a los distintos gestágenos utilizados. Desde este punto de vista podemos señalar el propio artículo de Zandberg en el cual además de estudiar la tibolona también compara estradiol oral con o sin acetato de noretisterona mostrando una disparidad de resultados. En todos los análisis realizados se observa como al añadir NETA al estradiol se empeoran sus resultados a excepción del estudio de relajación vascular el cual mejora al añadir NETA, aunque con diferencias no significativas y sólo a modo de tendencia. En cambio la utilización de NETA aislada no aporta ningún tipo de beneficio y la tendencia es más bien hacia un empeoramiento de los resultados al compararlos con un grupo sin tratamiento (Zandberg, 1998).

De todas formas, este es el primer estudio realizado con acetato de ciproterona para la prevención de la aterosclerosis en conejas ooforectomizadas y a nuestro entender desde este punto de vista no parece haber ningún efecto beneficioso del mismo al añadirlo al estrógeno.

Añadiremos finalmente que los estudios realizados con primates generalmente tampoco parecen obtener beneficios con el uso de gestágenos concomitantes a los estrógenos. Así encontramos desde el inicio de la década de los noventa diversos estudios que han ido mostrando estas acciones.

Curiosamente el primer estudio realizado no encontró efectos perjudiciales de los gestágenos sobre los estrógenos. En este estudio, después de la castración de los primates se utilizó estradiol continuo, con o sin progesterona cíclica mediante implantes subcutáneos, y se vió como en los grupos tratados el grado de ateromatosis coronaria se reducía hasta un 50% a los 30 meses de tratamiento, sin

diferencias en este caso en cuanto al hecho de añadir o no progesterona (Adams, 1990). Además en este estudio la reducción de la placa de ateroma sólo se explicaba en un 20-25% por cambios en el perfil lipídico, mientras que el resto del efecto vendría determinado por mecanismos directos sobre la pared arterial, lo que está de acuerdo con los estudios realizados con conejos y con nuestros datos. Uno de los posibles mecanismos podría ser la captación aumentada de las partículas de LDL por parte del vaso en monas castradas que se vería contrarrestada al añadir este tratamiento hormonal subcutáneo, sin afectar los niveles plasmáticos de lípidos (Wagner, 1991). Este mismo trabajo se repitió después (Wagner, 1997) pero con estrógenos conjugados equinos y acetato de medroxiprogesterona orales durante 12 semanas, sin observarse en este caso diferencias en cuanto a la captación de las partículas de LDL, lo cual se atribuyó al escaso periodo de estudio o al tipo distinto de preparado hormonal empleado en esa ocasión. En ese mismo trabajo se encontró un aumento de la captación hepática de LDL con el tratamiento con estrógenos con una disminución del colesterol hepático, probablemente debido a un incremento de la secreción biliar por inducción enzimática de la conversión del colesterol en ácidos biliares (Colvin, 1998).

Otro estudio (Adams, 1997) similar al anterior se realizó utilizando estrógenos conjugados equinos a una dosis equivalente a la dosis de 0.625 mg./día, estrógenos conjugados equinos a la misma dosis equivalente más acetato de medroxiprogesterona a la dosis equivalente a 2.5 mg./día, y acetato de medroxiprogesterona solo. Se realizó también un grupo control y a los 30 meses se cuantificó la ateromatosis coronaria viendo como el grupo tratado sólo con estrógenos tenía hasta un 72% de reducción de la placa de ateroma respecto al



grupo control , mientras que al añadir la progesterona o al tratar sólo con progesterona se perdía este efecto beneficioso. Así este estudio contrastaba con el anterior demostrando que el tipo de gestágeno o la vía de administración podían ser determinantes en cuanto a los efectos conseguidos, ya que los implantes subcutáneos de progesterona no contrarrestaban los efectos de los estrógenos.

Se realizaron también estudios de funcionalismo arterial mediante coronariografía donde se veía que después de la infusión de acetilcolina en aquellas monas castradas tratadas sólo con dieta aterogénica se producía una vasoconstricción arterial sugiriendo un daño arterial, mientras que en las tratadas además con estrógenos subcutáneos se producía una vasodilatación (Williams, 1990). Esta reacción era independiente de la placa de ateroma e incluso si se realizaba una infusión de etinilestradiol en los animales control se producía ahora una vasodilatación (Williams, 1992). Si se realizaba lo mismo con estrógenos conjugados equinos también se obtenía una vasodilatación pero si a los estrógenos añadíamos acetato de medroxiprogesterona se reducía la vasodilatación en un 60% (Williams, 1994). Si el gestágeno utilizado era nomegestrol , menos androgénico, no se alteraba la respuesta conseguida con estrógenos sólo (Williams, 1998). Como vemos parece claro que el tipo de gestágeno es determinante en cuanto al resultado final del tratamiento hormonal sustitutivo.

Un modelo similar que comparó estrógenos más acetato de medroxiprogesterona o progesterona mediante implantes subcutáneos obtuvo resultados similares, es decir, al añadir progesterona se obtenía una vasodilatación y al añadir acetato de medroxiprogesterona se obtenía una vasoconstricción (Miyagawa, 1997).

Como vemos en prácticamente todos los estudios hay una coincidencia de un posible efecto deletéreo del acetato de medroxiprogesterona.

A esto además podemos añadir los resultados de los estudios realizados en humanos, el HERS y el estudio ERA. Ambos utilizaron acetato de medroxiprogesterona y los 2 fracasaron en demostrar una posible protección cardiovascular del tratamiento hormonal sustitutivo. Estos estudios, eran de prevención secundaria y no de prevención primaria que es lo que nos ocupa en esta tesis. Tendremos que esperar al estudio WHI para tener resultados sobre la acción del acetato de medroxiprogesterona en prevención primaria cardiovascular

No disponemos en la actualidad de ningún estudio con acetato de ciproterona realizado en primates que nos pueda dar una idea de lo que podría pasar en humanos desde el punto de vista cardiovascular. Lógicamente tampoco existe ningún estudio randomizado sobre prevención cardiovascular realizado con esta molécula.

Al comparar los cuatro tratamientos entre sí observamos como no hay diferencias entre los grupos de estradiol (con o sin acetato de ciproterona) y el de raloxifeno. Este resultado puede deberse a la falta de potencia estadística ligada al escaso número de casos, ya que si bien el grupo tratado con estradiol muestra una clara tendencia a la disminución de la placa de ateroma como hemos dicho anteriormente no sucede lo mismo en el grupo tratado con raloxifeno, ni en el grupo tratado con estradiol + acetato de ciproterona que muestran valores similares a los hallados en los grupos control y sham. Cabe decir que el grupo tratado con acetato de ciproterona en la cuantificación microscópica de la placa de ateroma sí muestra una tendencia a la disminución de la misma, e incluso una altura máxima de la placa menor al grupo tratado con estradiol. Esta sería la única duda que nos ofrece este gestágeno sobre

una posible acción protectora cardiovascular. El número de conejas que llegaron al final del estudio en este caso tal vez impida sacar unas conclusiones más precisas sobre el acetato de ciproterona tanto en un sentido como en otro.

La tibolona por el contrario sí mantiene las diferencias con raloxifeno y el grupo tratado con estradiol + acetato de ciproterona y en menor medida con el estradiol. Este hecho indicaría que el tratamiento con tibolona tendría un efecto similar al tratamiento con estradiol, mientras que el raloxifeno no mostraría ningún efecto en cuanto a la disminución de la placa de ateroma, y el acetato de ciproterona impediría globalmente los efectos beneficiosos del estradiol.

Otro hecho que queda patente en este estudio es que en este modelo experimental el hecho de la castración no implica un efecto sobre la placa de ateroma cosa por otra parte ya corroborada en anteriores estudios (Haarbo, 1991; Sulistayani, 1995) , y que puede venir determinado por los bajos niveles basales de estrógenos en las conejas adultas debido a que presentan un ciclo sexual continuo si no cohabitan con machos y no existe el estímulo del coito (Carmona, 1991), que no son suficientes para dar cambios valorables (Bjarnason, 1997). Este hecho podría permitir obviar en ulteriores estudios la realización de un grupo sham ya que no aporta ninguna ventaja adicional para el estudio de la ateromatosis, e incluso Zandberg en su estudio prescinde del análisis de este grupo al no hallar diferencias con el grupo ooforectomizado (Zandberg, 1998). Es más, en los últimos estudios publicados por Bjarnason (Bjarnason, 2001) sobre raloxifeno y prevención secundaria de ateromatosis, y por Zandberg sobre tibolona (Zandberg, 2001) ya se obvia el grupo sham.

Como conclusiones podemos decir que la tibolona parece ser un fármaco muy efectivo para la disminución del tamaño de la placa de ateroma y no así el raloxifeno. Y que el posible efecto beneficioso del estradiol se ve contrarrestado por el acetato de ciproterona.

## **7.2. CUANTIFICACIÓN DEL COLESTEROL TOTAL DE LA AORTA.**

En este caso la tibolona muestra diferencias respecto a los grupos control, sham y estradiolciproterona, tanto al valorar el colesterol aórtico en función de las proteínas aórticas como en función del peso aórtico. Hay pues una clara concordancia en este caso de las 2 formas de cuantificar la ateromatosis, y podemos decir que la tibolona disminuye tanto la extensión como el grosor de la placa, así como el depósito de colesterol aórtico. Así pues la tibolona en nuestro estudio muestra 2 mecanismos de acción: la disminución de la extensión y grosor de la placa, y la disminución de los depósitos de colesterol. Estos resultados están de acuerdo con los estudios de Zandberg que además comprueba como la tibolona es capaz de relajar un anillo aórtico precontraído con fenilefrina, y cómo en una arteria carótida previamente lesionada también disminuye el grosor de la placa de ateroma simulando lo que sería una lesión más avanzada, o lo que es lo mismo, lo que sería un estudio de prevención secundaria, inhibiendo la proliferación de las células musculares lisas (Zandberg, 1998). A esto le podemos sumar un estudio realizado por Simoncini (Simoncini, 2000) donde se comprueba como la tibolona y sus metabolitos son capaces de inhibir la expresión de moléculas de adhesión leucocitarias en la pared arterial actuando de este modo de forma antiaterogénica. De este modo tan sólo un perfil lipídico no del

todo favorable hallado en mujeres menopáusicas (Castelo-Branco, 1999) parece ser de momento el único factor contrario a la tibolona en cuanto a la protección cardiovascular se refiere, ya que todas las demás acciones estudiadas en animales y humanos parecen positivas.

En las conejas tratadas con raloxifeno se observa una disminución respecto a los grupos sham y control del colesterol aórtico expresado en función del peso aórtico (y una tendencia a la disminución si lo expresamos en función de las proteínas aórticas). Estos resultados coinciden con los estudios previos realizados por Bjarnason (Bjarnason, 1997; 2000; 2001). Esta autora utilizando la misma dosis de raloxifeno, 35 mg./día, conseguía disminuir la aterosclerosis (expresada sólo como colesterol aórtico en función de las proteínas aórticas) respecto a grupos sham y control, pero no frente a un grupo tratado con estradiol que conseguía disminuir el colesterol aórtico a la mitad respecto al grupo tratado con raloxifeno, que es similar a lo que encontramos nosotros. Cabe decir que en ese primer estudio la dosis de colesterol administrada era mucho menor, a razón de un 0.125-0.2 % (recordemos que nosotros utilizamos un 0.5%) lo que puede explicar en parte que nuestros resultados sean algo menos favorables que los hallados por Bjarnason tanto en el grupo tratado con estradiol como en el grupo tratado con raloxifeno. Además los autores en este primer artículo hacían referencia a una baja dosificación del raloxifeno aduciendo que las diferencias halladas con el grupo tratado con estradiol se debían a esta baja dosis administrada. Recientemente en un nuevo estudio de parecidas características esta autora utiliza distintas dosis de raloxifeno para hallar la que obtenga niveles plasmáticos iguales a los hallados en mujeres postmenopáusicas aumentando la dosis de raloxifeno a 70 mg./ día y 210

mg./día y consiguiendo en este caso resultados parecidos al estradiol. Esta última dosis de 210 mg./día ellos la refieren como la dosis que obtiene niveles plasmáticos de raloxifeno más parecidos a los humanos. Cabe resaltar que de todas formas no hallan diferencias a nivel del colesterol aórtico entre las 2 dosis de raloxifeno lo que hace pensar en un límite de acción de esta molécula en cuanto a prevención de aterosclerosis se refiere, ya que a nivel endometrial sí consiguen una mayor inhibición conforme se aumenta la dosis. De igual forma en el estudio de Clarkson realizado en primates un aumento de dosis obtiene peor resultado (Clarkson, 1998). En este estudio realizado en primates se compararon 2 dosis de raloxifeno con un grupo tratado con estrógenos conjugados equinos y un grupo control tan sólo ooforectomizado sin tratamiento. Se encontró una reducción de hasta un 70% de la placa de ateroma en el grupo tratado con estrógenos mientras que ninguna de las 2 dosis utilizadas de raloxifeno mostró ningún efecto, con niveles de ateromatosis similares al grupo control. Se utilizaron 2 dosis de raloxifeno, una equivalente a los 60 mg./día administrados a mujeres menopáusicas y otra 5 veces mayor. Curiosamente el grupo tratado con altas dosis de raloxifeno fue el que mayores placas de ateroma mostró. Hasta la fecha ningún otro estudio con raloxifeno y primates ha sido realizado.

Una primera interpretación de nuestros resultados dispares sería que el raloxifeno consigue disminuir el colesterol aórtico aunque no así el grosor y la extensión de la placa de ateroma, que es lo que puede determinar la isquemia, lo cual estaría de acuerdo con el estudio previo realizado con monos y en el cual el raloxifeno no consigue disminuir la aterosclerosis respecto a un grupo ooforectomizado cuando ésta se expresa en extensión de la placa (Clarkson, 1998). Según estos datos el

raloxifeno quizás no sería de elección para la prevención primaria de la aterosclerosis.

Finalmente comentar el más reciente trabajo del grupo de Bjarnason en que utilizan el raloxifeno para la prevención secundaria de aterosclerosis (Bjarnason, 2001). Se castraron hasta un total de 80 conejas las cuales fueron alimentadas con una dieta aterogénica durante 15 semanas. Al final de este periodo se sacrificó un primer grupo de 20 animales y los otros fueron divididos en 3 grupos tratados con estradiol (4 mg./dia), raloxifeno (210 mg./dia) y placebo. Aquí utilizaron la dosis más alta de 210 mg. de raloxifeno comentada anteriormente. Además prescindieron ya desde un inicio del grupo sham. A continuación continuaron con la dieta aterogénica durante 39 semanas más hasta el sacrificio de los animales. En este caso el raloxifeno consiguió resultados similares a los obtenidos con estradiol en cuanto a la reducción del colesterol aórtico expresado en función del área aórtica, ya que no obtenían significancias si lo expresaban en función de las proteínas aórticas. Como vemos siguen habiendo discordancias según los métodos utilizados para valorar el efecto de los distintos preparados hormonales sobre la ateromatosis, y además, no siempre los mismos tratamientos obtienen los mismos resultados incluso utilizando igual metodología.

Desde un punto de vista de prevención secundaria también se han realizado estudios en primates con THS convencional sin resultados favorables (Williams, 1995). En este estudio se castraron 88 monas a las cuales se dió una dieta aterogénica durante 2 años, para ser divididas en 4 grupos a continuación: 1) un grupo basal que se sacrificó; 2) un grupo tratado con una dieta pobre en grasas; 3) un grupo tratado con la dieta hipolipemiente más estrógenos conjugados equinos a

una dosis equivalente a la dosis de 0.625 mg./día ; y 4) un grupo tratado con la dieta hipolipemiente más estrógenos conjugados equinos a una dosis equivalente a la dosis de 0.625 mg./día y acetato de medroxiprogesterona a la dosis equivalente a 2.5 mg./día. Estos tratamientos se mantuvieron durante 30 meses. Los hallazgos finales fueron:

- no hubo cambios en el tamaño de la placa de ateroma en ningún grupo respecto al grupo 1.
- mejoró la razón placa de ateroma/luz arterial en los 3 grupos, pero sin mayores efectos en los grupos tratados con hormonas que en el grupo tratado sólo con dieta.
- hubo una vasodilatación en el grupo 2 en respuesta a la acetilcolina que no se vió incrementada al añadir el tratamiento hormonal.
- el grupo 3 mostró mejores flujos coronarios medidos por doppler, perdiéndose el beneficio al añadir acetato de medroxiprogesterona.

Recordemos que el estudio HERS realizado en humanos utilizaba este gestágeno y sus resultados tampoco fueron positivos para la prevención secundaria cardiovascular.

En resumen en este estudio realizado en primates el tratamiento hormonal no mostró mayores beneficios a nivel de la placa de ateroma que el tratamiento sólo con una dieta hipolipemiente, aunque sí una mejora en el flujo coronario en el grupo tratado sólo con estrógenos. Este mismo estudio se amplió posteriormente y se comprobó cómo la composición de la placa de ateroma ofrecía una mayor estabilidad en el grupo tratado con estrógenos sólo que en los demás grupos, aunque en términos de colesterol aórtico no había diferencias entre los grupos, y los 3 mostraban una



disminución del mismo respecto al grupo basal (Register, 1998). Es decir, el tratamiento hormonal en este caso no ofrecía ventajas sobre la dieta hipolipemiente. Sí había en el grupo tratado sólo con estrógenos una inhibición más marcada en cuanto a la acumulación de colágeno así como un incremento de elastina que eran antagonizados por el acetato de medroxiprogesterona. La acumulación de colágeno y la disminución de elastina alterarían el funcionalismo arterial dando una menor elasticidad arterial y por lo tanto sus modificaciones serían otro efecto beneficioso de los estrógenos contrarrestado por los gestágenos.

Desde este punto de vista de estabilidad de la placa de ateroma otra lectura de nuestros datos sería que la reducción del colesterol aórtico conseguida con el raloxifeno puede estabilizar la placa de ateroma aunque no reduzca su tamaño. La estabilidad de la placa de ateroma puede depender de diversas variables como la presencia y localización de las zonas ricas en lípidos, la presencia de las células responsables de la inflamación, y de áreas fibrosas o calcificadas. Una menor estabilidad será responsable de una mayor fragilidad con más posibilidades de ruptura de la misma. Este efecto estaría de acuerdo con estudios previos en humanos en que un mayor contenido en lípidos y macrófagos se corresponde con placas más frágiles predisponiendo a su ruptura con la consiguiente formación de trombos y de accidentes isquémicos (Felton, 1997). Asimismo en conejos también se ha desarrollado un modelo de ruptura de la placa de ateroma a través de un balón inflable colocado en el vaso arterial (Rekhter, 1998) donde se demuestra que la zona de ruptura se corresponde con una zona más rica en colesterol, y más pobre en células musculares lisas y colágeno (Rekhter, 2000). Esta acción estabilizadora puede ser determinante para prevenir infartos agudos de miocardio, angina inestable,

accidentes vasculares cerebrales, formación de aneurismas aórticos y enfermedades vasculares periféricas (Lee, 1997) y estaría de acuerdo con el efecto neutro del raloxifeno sobre la PCR como marcador de inflamación (Ridker, 1998; Walsh, 2000) y con un efecto positivo del raloxifeno sobre la reactividad vascular (Figtree, 1999). En este estudio de Figtree se utilizaron anillos de arterias coronarias de conejas y se vio como el raloxifeno era capaz de producir una relajación de estas coronarias a través de un mecanismo dependiente del endotelio actuando sobre los receptores estrogénicos y implicando al óxido nítrico, así como actuando también sobre las células musculares lisas. Además esta relajación vascular era superior a la conseguida con estrógenos. Los autores reconocen de todas formas que la dosis de raloxifeno utilizada era 50 veces superior a la habitual en humanos.

Así desde este punto de vista el raloxifeno tal vez tenga un papel en la prevención de enfermedades cardiovasculares no desde una disminución del tamaño de la placa de ateroma pero sí estabilizando la misma y actuando a nivel vascular por otros mecanismos.

Las conejas tratadas con estradiol muestran una disminución del colesterol aórtico respecto a los grupos sham y control tanto en función de las proteínas aórticas como del peso aórtico cosa que mantiene nuestra opinión de un efecto protector del estradiol y que sigue estando de acuerdo con la mayoría de estudios realizados, en cuanto a los efectos beneficiosos de los estrógenos sobre la patología cardiovascular. Así encontramos estudios realizados con conejas (Haarbo, 1991; Hanke, 1996; Bjarnason, 1997; Brehme, 1999), en que el tratamiento con estrógenos consigue disminuir el colesterol aórtico, y también estudios realizados con primates (Wagner, 2000) con idénticos resultados. Con estradiol también se han realizado estudios de

estabilidad de la placa y reactividad. Así en un estudio de Hayashi se utilizaron un total de 48 conejas divididas también en grupos de 8 a las cuales se les lesionaba la aorta torácica mediante un catéter y se las sometía a una dieta aterogénica con distintas dosis de colesterol y a tratamiento con estrógenos subcutáneos también a distintas dosis durante diez semanas (Hayashi, 2000). Se observó como los grupos tratados con estradiol tenían una menor infiltración por macrófagos lo cual implica una mayor estabilidad de las placas y que además los estrógenos actuaban aumentando la liberación de óxido nítrico por parte de las células endoteliales, lo que podía explicar un menor grado de aterosclerosis. En esta misma línea encontramos un estudio de Holm en el cual utilizaron una metodología similar también con estrógenos subcutáneos (Holm, 1997), pero en el cual no hallaban esta inhibición de la aterosclerosis en aortas previamente lesionadas, cuantificando en este caso sólo colesterol aórtico y no extensión de la placa. Sí demostraron en otro estudio que la disminución de la ateromatosis podía estar mediada por un mecanismo ligado al óxido nítrico, ya que al inhibir la sintetasa del óxido nítrico se perdía el efecto beneficioso de los estrógenos (Holm, 1997). Este mismo grupo debido a que los resultados iniciales no habían sido favorables al tratamiento con estradiol realizaron un último trabajo de gran envergadura que incluía hasta un total de 254 conejas (Holm, 1999). La metodología fue similar utilizando estrógenos subcutáneos y lesionando las aortas mediante un catéter. Después de la dieta aterogénica y el sacrificio de los animales se observó cómo los estrógenos eran incapaces de revertir la aterosclerosis en las zonas lesionadas pero que esto venía determinado por la lesión del endotelio ya que en las zonas que habían recuperado el endotelio existía un efecto neutro. En las zonas que permanecían sin endotelio la placa de ateroma era

todavía mayor. En este mismo estudio comprueban cómo existe una mayor liberación de óxido nítrico en las conejas tratadas con estrógenos, y que este aumento estaría en relación con una disminución de la agregación de los monocitos al endotelio, a través de una disminución del VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule-1). Esta inhibición de la molécula VCAM-1 ha sido demostrada asimismo en mujeres menopáusicas tratadas con estrógenos (Caulin-Glaser, 1998). En una parte del estudio realizado por Zandberg donde se analizaba una arteria carótida lesionada previamente se hallaba una disminución de las lesiones ateroscleróticas con el tratamiento con estradiol subcutáneo aunque no con el tratamiento oral (Zandberg, 1998).

A tenor de estos estudios parece razonable pensar que el tratamiento con estrógenos es capaz de revertir la aterosclerosis en sus fases iniciales, disminuyendo la agregación celular y aumentando el óxido nítrico, pero que en fases más avanzadas estos efectos ya no se conseguirían. Tal vez de este modo podamos explicar porque los estudios randomizados realizados en humanos hasta ahora, han fallado en demostrar un efecto positivo del THS al tratarse de estudios de prevención secundaria en que las lesiones ateromatosas ya están avanzadas.

El acetato de ciproterona en este caso no sólo no aporta ningún beneficio, sino que contrarresta el efecto beneficioso del estradiol, aunque mantiene cierta tendencia a la disminución del colesterol aórtico respecto a los grupos sham y control. Los datos sobre el efecto del acetato de ciproterona en humanos son motivo de controversia pues hay tanto estudios a favor (Mares, 2000) como en contra (Imthurn, 1997). Así Imthurn en un pequeño estudio de 26 mujeres seguidas durante un año mostró como el acetato de ciproterona disminuía los incrementos de óxido nítrico conseguidos

con estrógenos en mujeres menopáusicas, y al contrario Mares no vió un efecto deletéreo de esta molécula sobre la función endotelial, a través de la vasodilatación medida por ecografía obtenida con el tratamiento en 31 mujeres menopáusicas.

En este caso sí que existe en todos los grupos tratados, incluyendo el grupo tratado con acetato de ciproterona, una tendencia a la disminución del colesterol aórtico, y tal vez la falta de número de casos (el grupo tratado con ciproterona finalizó sólo con 6 conejas) hace que las diferencias no sean significativas. En cualquier caso los resultados obtenidos al añadir acetato de ciproterona son peores que al utilizar estradiol sólo. Recordemos que existen básicamente 3 categorías de gestágenos usados en THS: derivados naturales de la progesterona (progesterona micronizada y dihidroprogesterona); y 2 categorías de compuestos sintéticos: derivados de la 19-nortestosterona de tipo más androgénico (acetato de noretisterona o noretindrona, y levonorgestrel) y derivados de la 17- $\alpha$ -hidroxiprogesterona como el acetato de ciproterona y el acetato de medroxiprogesterona. Hasta el momento todos los estudios realizados con acetato de medroxiprogesterona tanto en primates (Williams, 1994; 1995; Adams, 1997; Miyagawa, 1997) como en humanos han sido poco favorables (Hulley, 1998) y a pesar de un posible perfil antiandrogénico que influiría favorablemente en los lípidos plasmáticos (Koninckx, 1997) el acetato de ciproterona tal vez por su similitud estructural a la medroxiprogesterona no pueda aportar muchos más beneficios.

Esta tendencia a la disminución en todos los grupos tratados se ve reflejada en la figura 4 de los Resultados en la cual vemos como existe una correlación lineal entre el colesterol plasmático y el colesterol aórtico para los grupos sham y control, y no para los otros grupos, mostrando como el tratamiento es capaz de disminuir el

colesterol aórtico en todos los grupos por un mecanismo distinto a la disminución del colesterol plasmático lo cual está de acuerdo con todos los estudios previos realizados con conejos, primates y humanos en que se acepta que existen mecanismos distintos de acción a la disminución de los lípidos plasmáticos de los distintos preparados hormonales para la prevención de la patología cardiovascular (Mendelsohn, 1994).

En este caso también se observa que utilizar un grupo sin castración no aporta ninguna información adicional al estudio realizado, sin existir diferencias entre los grupos control y sham.

Para concluir diremos que todos los tratamientos parecen tener un efecto beneficioso sobre el colesterol aórtico, con un predominio claro de la tibolona, y con un efecto deletéreo del acetato de ciproterona sobre el estradiol.

### **7.3. CUANTIFICACIÓN DE LOS LÍPIDOS PLASMÁTICOS.**

Los lípidos plasmáticos han sido estudiados de 3 formas distintas: niveles basales y finales, estudio global mediante el estudio del área bajo la curva, y relación entre el colesterol y los triglicéridos de las distintas fracciones lipoproteicas.

Diremos ya de antemano que las expectativas iniciales creadas con la determinación de los lípidos y sus distintas fracciones lipoproteicas se vieron algo mermadas al comprobar la poca homogeneidad de los resultados obtenidos y la imposible extrapolación de estos resultados a los obtenidos en humanos, tanto por la diferente distribución de las distintas fracciones lipoproteicas como por los altos niveles alcanzados de colesterol con la dieta aterogénica.

### **7.3.1. Lípidos basales.**

Pese a que los niveles basales mostraban alguna diferencia todos los estudios finales se han realizado mediante el análisis de ANCOVA para comprobar que ninguna de estas diferencias influía en el resultado final. Probablemente el poco número de casos realizado por grupo y la gran variabilidad que presentan estos animales ha hecho que los resultados no sean del todo homogéneos.

Tan sólo los niveles de triglicéridos-VLDL pueden tener cierta influencia en las variables finales cuantificadas. Las diferencias las encontrábamos entre los grupos estradiol y estradiol-ciproterona, en que este último grupo presentaba unos niveles menores de estos triglicéridos al inicio del estudio. Las diferencias en las variables respuesta encontradas al final del estudio en caso de verse influenciadas por estos valores basales serían incluso a favor del grupo tratado con estradiol, ya que la hipertrigliceridemia favorece la aterosclerosis y es el grupo EC el que parte de valores más bajos, y en cambio al final del estudio encontramos como en todas las variables cuantificadas el estradiol es superior al estradiol-ciproterona en cuanto a protección aterogénica se refiere.

Por lo demás no existe ninguna otra diferencia a nivel basal que nos inflencie los resultados finales.

### **7.3.2. Lípidos finales.**

Con las determinaciones finales confirmamos que la hiperlipidemia conseguida viene marcada básicamente por un incremento de las VLDL y las IDL con un incremento menos marcado de las LDL y las HDL lo que desde este punto de vista hace difícil la extrapolación a humanos e incluso en primates en que la lipoproteína LDL es la

principal incluso con valores menores de colesterol. De todas formas los procesos celulares que llevan a la formación de la estría grasa y a las placas de ateroma sí son comparables. El incremento de VLDL es el que comporta en este caso un incremento del colesterol aórtico, acumulándose en las células subendoteliales (Haarbo, 1991).

Las diferencias entre grupos que encontramos al final del estudio en la última extracción vienen marcadas por las halladas entre la tibolona y los demás grupos. La tibolona consigue unos niveles de colesterol plasmático menores a los otros grupos y a expensas básicamente de una disminución del colesterol-VLDL, y un incremento relativo de las otras fracciones lipoproteicas. Estos hallazgos son iguales a los encontrados por Zanberg en sus estudios (Zandberg, 1998; 2001). Cabe pensar que existe por parte de la tibolona un posible efecto inductor de la lipasa hepática. Es conocido que los conejos son deficitarios en lipasa hepática (Clay, 1989), y en apoE (Mahley, 1989) lo que hace que en condiciones de hipercolesterolemia manifiesten un incremento de VLDL por la imposibilidad de su paso a IDL. Si la actividad de esta lipasa hepática se viera incrementada nos podríamos explicar estos hallazgos del perfil lipídico, con un mayor paso de la VLDL a IDL. De esta forma encontramos en la tibolona otro posible efecto protector cardiovascular con una disminución de las VLDL y un aumento de las IDL.

En los resultados de los triglicéridos finales no creemos que las diferencias halladas en algunas de las fracciones lipoproteicas tengan ningún tipo de importancia clínica.

Además persiste la ausencia de diferencias entre el grupo ooforectomizado y el grupo sham.



### **7.3.3. Lípidos expresados como área bajo la curva.**

Estos resultados reflejan con mayor fiabilidad lo que ha sucedido durante las 12 semanas de dieta hipercolesterolémica y los niveles globales lipídicos que las conejas han tenido durante este periodo.

Es importante remarcar que en ningún caso las variaciones obtenidas en los niveles lipídicos nos explican los efectos derivados de los distintos tratamientos sobre la placa de ateroma, lo que está de acuerdo con los estudios previos ya comentados de Bjarnason, Hanke y Haarbo así como en los estudios en primates en que se observa un efecto independiente de los lípidos de las distintas hormonas sobre la placa de ateroma.

Destaca por encima de todo la disminución hallada del colesterol total y del colesterol-VLDL en el grupo tratado con tibolona, que se ve a su vez compensado con un incremento de las fracciones LDL y IDL. Estos hallazgos también coinciden con los resultados de los estudios de Zandberg (Zandberg, 1998; 2001) en que también encontraba una disminución del colesterol y del colesterol-VLDL, y asimismo los resultados en cuanto a disminución de la placa de ateroma eran independientes de esta disminución. De todas formas sí que es necesario comentar que esta marcada disminución del colesterol-VLDL hallada en el grupo tratado con tibolona aunque no determine en su totalidad la disminución de la placa de ateroma y del colesterol aórtico sí que puede influenciar en algo los resultados finales.

El raloxifeno y el estradiol no parecen afectar de forma global a los niveles de colesterol coincidiendo con los resultados de Bjarnason (Bjarnason, 1997; 2000),

mientras que cuando añadimos acetato de ciproterona al estradiol parecen disminuir los niveles de colesterol aunque no de forma significativa.

Si nos centramos en los triglicéridos aquí el tratamiento que destaca es el raloxifeno que aumenta los niveles de los mismos, siendo el grupo tratado con estradiol el que presenta una tendencia más marcada a la disminución. Estos resultados no coinciden con los de Bjarnason (Bjarnason, 1997) que encuentra una disminución tanto en el grupo tratado con estradiol como con raloxifeno de los triglicéridos. Es difícil encontrar una explicación de esta disparidad de resultados en cuanto al raloxifeno y los triglicéridos ya que además en todas las otras variables cuantificadas coinciden los 2 estudios. El grupo EC presenta una disminución de los triglicéridos que tampoco se ve reflejada en la placa de ateroma. Esto confirma que las diferencias halladas en los perfiles lipídicos no explican las halladas en la placa de ateroma.

Tampoco existen diferencias en ningún caso entre los grupos control y sham.

#### **7.3.4. Relación colesterol/triglicéridos.**

Si nos centramos en las 2 lipoproteínas cuantitativamente más importantes (VLDL, IDL) vemos dos resultados que llaman la atención y que pueden explicar en parte los resultados finales obtenidos.

El primero de ellos es un índice global menos aterogénico para la tibolona y el raloxifeno, que nos podría explicar la disminución del colesterol aórtico hallado, sobretudo para la tibolona y en menor medida para el raloxifeno.

El segundo es el perfil aterogénico que presenta el grupo tratado con acetato de ciproterona el cual es alto para todas las fracciones lipoproteicas, y que es una

posible explicación al efecto deletéreo que tiene este tratamiento sobre el estradiol, y un hallazgo más en contra de este gestágeno para la prevención cardiovascular.

Al igual que en los anteriores análisis sobre lípidos tampoco se hallan diferencias entre los grupos control y sham.

#### **7.4. ESTUDIO HISTOLÓGICO DE LAS PLACAS DE ATEROMA.**

Como hemos comentado anteriormente los estudios de inmunohistoquímica demuestran que las placas de ateroma están formadas básicamente por macrófagos y células musculares lisas, datos que están en concordancia con estudios previos (Hanke, 1996; Rekhter, 1998), y con lo que se observa en las placas ateromatosas que encontramos en humanos (Ross, 1986), lo que sigue haciendo válido este modelo animal para el estudio de la ateromatosis. Pese a que los perfiles lipídicos no son iguales a los humanos las placas de ateroma conseguidas mediante esta dieta sí se pueden extrapolar a las humanas, y nos permiten estudiar las diferencias ocasionadas por los distintos tratamientos hormonales.

Cuando nos centramos en las placas de mayor tamaño, independientemente del tratamiento, vemos como existe una distribución celular característica de estas células, con un predominio de células musculares lisas en la superficie y márgenes de la misma, y un depósito más central de macrófagos coincidiendo con los estudios de Hanke (Hanke, 1996). En las zonas más profundas observamos las células marcadas para apoptosis que probablemente reflejan la necrosis que se produce en las placas de ateroma más evolucionadas al igual que ocurre en humanos (Ross, 1999). Y además observamos como las placas de mayor tamaño son las que presentan un mayor índice de células en replicación y que estas se distribuyen por la superficie y bordes de la

placa por donde crece la misma lo cual también está en concordancia con estudios previos (Rekhter, 1998) sugiriendo que debido a la coincidencia de la distribución de las células marcadas para replicación celular con las células musculares lisas, estas células en replicación corresponderían a las células musculares lisas que serían las responsables del crecimiento de la placa de ateroma. Esta proliferación de las células musculares lisas es un mecanismo importante de crecimiento de la placa ateromatosa (Ross, 1986), y según Bruck esta proliferación se vería disminuida con el tratamiento con estrógenos, acompañado de una disminución del tamaño lesional (Bruck, 1997). En nuestro estudio no podemos saber si realmente las células en replicación corresponden a las células musculares lisas pero los estudios previos hacen pensar en esta coincidencia. Hanke cuantifica también esta proliferación de las células musculares lisas y encuentra que está disminuida con el tratamiento con estrógenos y que al añadir progesterona se pierde el efecto beneficioso de los mismos, tanto en tamaño de la placa como en número de células en proliferación (Hanke, 1996). Nosotros hemos encontrado unos índices de replicación de entre un 0% y un 35% en algunas zonas lo cual coincide aproximadamente con unos índices de replicación en los estudios comentados de un 10% de media, lo que nos permite decir que la metodología empleada ha sido correcta.

De la importancia de estas células musculares lisas podemos encontrar un reciente ejemplo donde utilizando cultivos celulares tratados con estrógenos o progestágenos se observa una disminución de los receptores de angiotensina 1 (importante mediador de vasoconstricción y crecimiento celular) en estas células, con el tratamiento estrogénico y un aumento con los progestágenos, lo cual puede explicar los posibles

efectos beneficiosos de los estrógenos y deletéreos de los gestágenos (Nickenig, 2000).

En el grupo tratado con tibolona estas placas son menores, tanto en grosor, como en extensión y superficie, mostrando una distribución más homogénea de macrófagos y células musculares lisas sin prácticamente verse apoptosis ni replicación celular, lo cual equivaldría a la fase más inicial de la ateromatosis descrita en humanos (Ross, 1999). Nuestros resultados están de acuerdo con el estudio de Zandberg, donde se halla un grosor de la placa de ateroma incluso menor que en un grupo sin dieta aterogénica sugiriendo una importante acción antiproliferativa de la tibolona (Zandberg, 1998).

En los otros grupos tratados la distribución celular sigue el mismo patrón que en los grupos sham y control, dependiendo más del tamaño de las placas que del tratamiento utilizado. Así en las mayores se observa la distribución celular anteriormente descrita, mientras que en las placas más pequeñas los distintos tipos celulares se distribuyen de forma más homogénea como sucede en el grupo tratado con tibolona, no habiendo por lo tanto un efecto directo del tratamiento hormonal sobre la distribución de estas células, sino sobre su crecimiento, determinando un mayor grado de replicación con un mayor crecimiento de la placa y mayores depósitos de colesterol.

#### **7.5. ESTUDIO DE ÚTERO, HÍGADO Y CORAZÓN .**

Un hallazgo no descrito hasta la realización de este estudio es el aumento del tamaño del corazón en el grupo tratado con tibolona, el cual puede venir determinado por un efecto anabólico de este fármaco que además estaría en concordancia con la

disminución de peso de estos animales. Un estudio previo realizado con conejas y estrógenos (Patterson, 1998) también hallaba este incremento de peso cardíaco en el ventrículo izquierdo y los músculos papilares del ventrículo derecho aunque con un funcionalismo global variable en función de los pruebas realizadas. En nuestro trabajo no hemos realizado ningún estudio de funcionalismo cardíaco y por lo tanto no podemos concluir que este incremento de peso sea del todo beneficioso. Un estudio realizado en humanos postula también un posible efecto inotrópico de la tibolona (Prelevic, 1997) que estaría de acuerdo con nuestros resultados. En este estudio 15 mujeres postmenopáusicas y diabéticas son tratadas con tibolona durante 1 año durante el cual se halla un aumento del gasto cardíaco y de la fracción de eyección. Encontramos otro estudio sobre tibolona y función cardíaca (Lloyd, 1998), aunque en este estudio tan sólo se toma un comprimido de tibolona para comprobar al día siguiente los cambios en una prueba de esfuerzo. Hallan una mejora en el tiempo de producción de isquemia miocárdica con el ejercicio, aunque sin ningún cambio en las variables hemodinámicas cuantificadas, especulando con un posible efecto vasodilatador coronario de la tibolona. Sea cual sea el mecanismo, parece ser que la tibolona afecta la función cardíaca y que según los resultados en animales y en humanos puede ser un efecto positivo.

La proliferación endometrial que se observa en el grupo tratado con tibolona, junto con un aumento franco del tamaño del útero presenta una mayor discordancia cuando se intentan extrapolar estos resultados a los hallados en humanos, a diferencia de los efectos en los grupos estradiol, estradiolciproterona y raloxifeno que sí son similares a los hallados en humanos (Cohen, 2000), o sea, proliferación para el grupo tratado con estrógenos y atrofia para el grupo tratado con raloxifeno, con una proliferación

intermedia en el grupo tratado con acetato de ciproterona. El hecho de añadir acetato de ciproterona al estradiol nos muestra un resultado similar al obtenido en humanos en que el gestágeno utilizado disminuye la proliferación endometrial producida por los estrógenos, aunque no llega a inhibir totalmente su acción como se observa también en otros estudios experimentales (Alexandersen, 1998).

La dosis utilizada de tibolona ha sido escogida partiendo de estudios previos (Zandberg, 1998) donde la dosis de 6 mgr./día era la que presentaba unos niveles plasmáticos más similares a los observados en humanos. Sin embargo, al contrario de lo que ocurre en humanos (Genazanni, 1991; Ginsburg, 1996) en que se hallan endometrios no proliferativos o atróficos nos encontramos con un endometrio proliferativo. Esto puede ser debido a que las conejas presentan a nivel endometrial una conversión de la tibolona a su componente estrogénico mayor que la que se produce en humanos donde se realiza principalmente a su componente progestagénico (Tang, 1993), o a que las dosis utilizadas del fármaco sean en realidad demasiado elevadas hasta el punto de llegar a estimular el endometrio. Sin embargo en el estudio de Zandberg utilizaron también dosis de 2 y 18 mgr. hallando aumentos del tamaño del útero mucho mayores con 18 mgr. pero similares con 2 mgr. lo que hace pensar que no sea un problema sólo de dosis, sino de conversión endometrial de la tibolona a su componente estrogénico de forma preponderante sobre su metabolito progestagénico. Si nos remitimos a los estudios iniciales realizados por De Visser (De Visser, 1984) vemos como al incrementar la dosis de tibolona utilizada en conejas inmaduras disminuye su acción progestagénica a nivel endometrial con un incremento de su actividad estrogénica. O sea, a altas dosis de tibolona predomina más su componente estrogénico que el gestagénico obteniéndose

un efecto proliferativo endometrial, aunque no haya diferencias entre las dosis de 2 y 6 mgr. Esta respuesta distinta en conejas que en humanos puede limitar algo la extrapolación de estos resultados, en cuanto a su validez sobre la placa de ateroma.

Un reciente estudio de Zandberg de diseño similar al anterior utiliza dosis de tibolona de 6 mg., 2 mg., 0.6 mg. y 0.15 mg. encontrando una disminución de las placas de ateroma y del colesterol aórtico dosis-dependiente, e independiente de los lípidos plasmáticos. Pero al estudiar los pesos uterinos vuelven a encontrar un efecto uterotrópico con las 3 dosis mayores muy similar, y un efecto algo menor con la dosis más baja de 0.15 mg. que es la que consigue unos efectos sobre la ateromatosis menores (Zandberg, 2001). Por lo tanto sigue siendo tema de controversia el efecto cardioprotector si lo intentamos extrapolar a humanos.

En un estudio no publicado de Zandberg de diseño similar (Zandberg, 1999), se utilizan los 3 distintos metabolitos de la tibolona para comprobar cuál de ellos es el que tiene el efecto antiaterogénico. Los metabolitos estrogénicos ( $3\alpha$ -OH y  $3\beta$ -OH) son los que estimulan el crecimiento uterino a la vez que realizan una acción ateroprotectora, mientras que el isómero  $\Delta 4$ , más gestagénico, estimula mucho menos el crecimiento uterino pero también pierde las propiedades cardioprotectoras, siendo el resultado global de la tibolona y sus metabolitos el ya comentado anteriormente, con un predominio tanto en útero como en la aorta de la acción de los componentes estrogénicos, lo cual sigue diferenciando del modelo humano. Tal vez la diferencia estriba en que la isomerasa localizada en el tejido endometrial en humanos encargada de convertir la tibolona en su isómero  $\Delta 4$  (Tang, 1993) no sea tan preponderante en el endometrio de las conejas, dando lugar a una incapacidad de esta isomerasa de metabolizar las altas dosis de tibolona administradas a su metabolito



$\Delta 4$ , quedando de forma predominante el metabolito  $3\beta$ -OH que daría un efecto más estrogénico. Quedaría por determinar por lo tanto si la metabolización de la tibolona en la placa de ateroma humana es a su componente estrogénico o no para poder así extrapolar estos resultados. (Figuras 31 y 32)

**Figura 31. Tibolona y sus distintos metabolitos. La tibolona una vez ingerida por vía oral sufrirá una primera metabolización a nivel hepático dando lugar a través de las deshidrogenasas correspondientes a 3 metabolitos activos: el 3- $\alpha$ -OH derivado, el 3- $\beta$ -OH derivado y el isómero  $\Delta^4$ . Los 2 primeros principalmente con actividad estrogénica y el último al igual que la propia tibolona con acción progestagénica y androgénica básicamente. Asimismo se producirán unos metabolitos sulfatados que serán inactivos.**

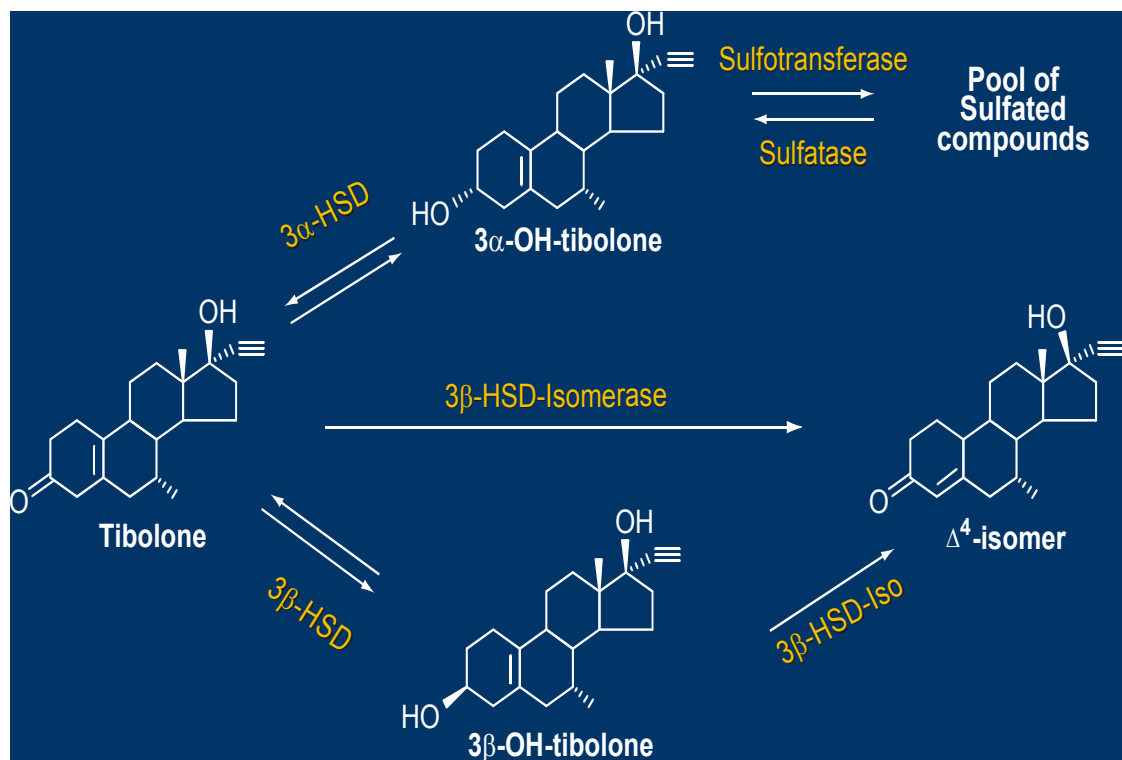
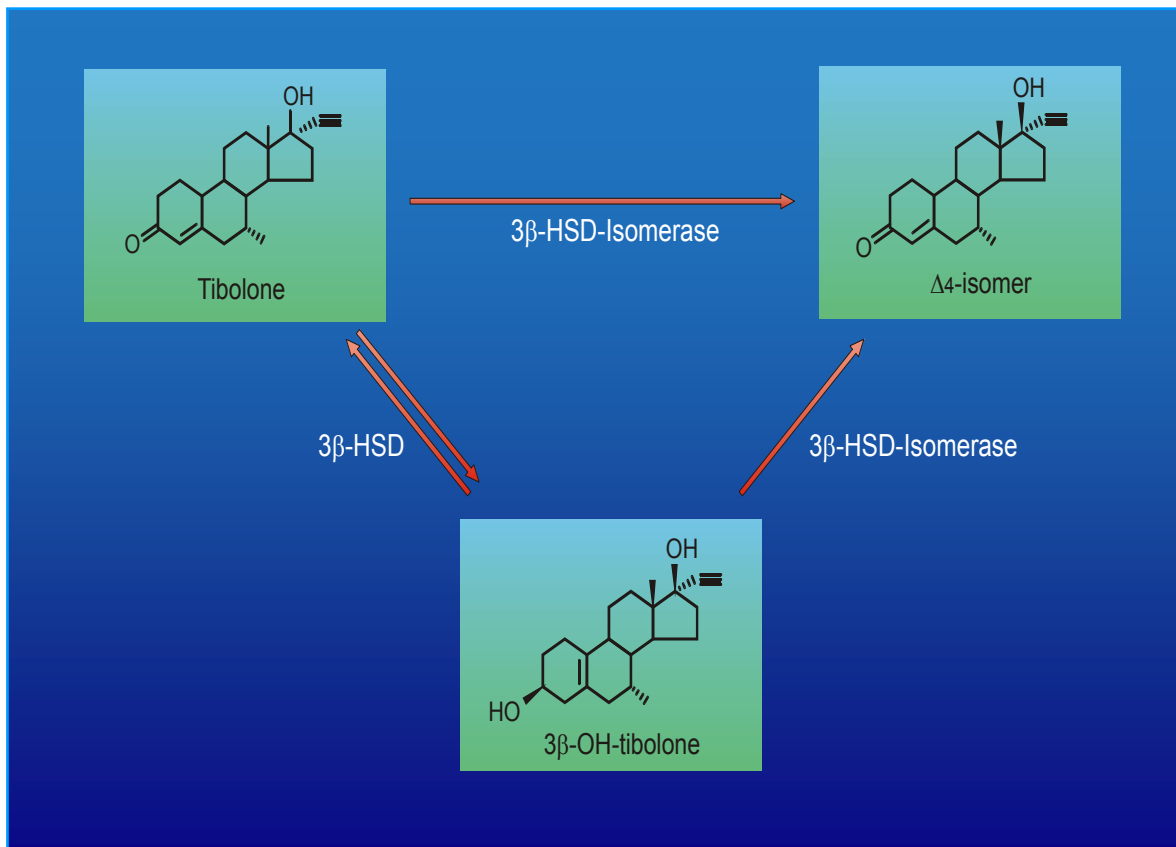


Figura 32. Conversión de la tibolona a nivel endometrial. A este nivel la conversión se realiza principalmente al metabolito  $\Delta 4$  debido a la presencia de la 3- $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa isomerasa que se encuentra en el tejido endometrial humano. En las conejas esta conversión no está tan clara que sea preferentemente a este metabolito  $\Delta 4$  cuando se utilizan altas dosis de tibolona.



El estudio del hígado en las conejas tratadas con tibolona muestra un menor tamaño del mismo a expensas de una disminución de los depósitos grasos, sin observar ningún efecto añadido en los otros grupos. El estudio realizado por Zandberg también mostraba esta disminución del peso hepático en las conejas tratadas con tibolona (Zanberg, 1998). Esto puede ser debido a la disminución de los niveles de colesterol total que observamos a expensas de una disminución de los niveles de VLDL básicamente. Como hemos comentado anteriormente los conejos son deficitarios en lipasa hepática y en apoE manifestando un incremento de VLDL por la imposibilidad de su paso a IDL en situación de hipercolesterolemia. El hecho de que encontremos una disminución de los depósitos grasos hepáticos acompañado de una disminución de los niveles de VLDL, hace pensar que la tibolona induce o estimula esta lipasa hepática lo cual favorecería la depuración de VLDL con su paso a IDL (que se encuentra aumentada respecto a shams y controles) con un menor depósito hepático (Barter, 1996), lo que comprobamos en los cortes histológicos hepáticos al observar una menor vacuolización lipídica. Datos procedentes de un estudio realizado en primates con estrógenos apoyan esta idea en que a pesar de un incremento de la captación hepática de LDL en los animales tratados, existía una disminución de los depósitos lipídicos hepáticos (Wagner, 1997), por un posible incremento de la excreción biliar de los mismos inducida por el tratamiento (Colvin, 1998). Este mismo mecanismo podría atribuirse también al tratamiento con tibolona.

## **7.6. VISIÓN GLOBAL DE CADA TRATAMIENTO Y POSIBILIDADES FUTURAS.**

Los grupos sham y control no muestran ninguna diferencia estadísticamente significativa en ninguno de los parámetros analizados lo que hace replantearnos la necesidad de seguir realizando un grupo sham en futuros estudios. Esta además parece ser la tendencia actual a la vista de los últimos artículos publicados.

La tibolona es la molécula que muestra mayores efectos sobre todos los órganos estudiados, con unos efectos sobre la placa de ateroma beneficiosos en todos los casos e independientes de los lípidos plasmáticos. Además parece existir un posible efecto beneficioso tanto a nivel cardíaco como hepático. Queda la duda de si la dosis utilizada ha sido demasiado alta debido a los efectos hallados en el útero, o si existe una posible conversión a nivel endometrial distinta a la que ocurre en humanos. En este caso deberíamos preguntarnos si esta conversión también puede ser distinta a nivel cardiovascular, y si sus efectos serían iguales en humanos. Futuros estudios deberían ir encaminados a encontrar una respuesta a esta duda. Recordemos que queda pendiente de publicación un estudio realizado en primates, y un ensayo que ha evaluado la placa de ateroma carotídea en humanos.

El raloxifeno nos ofrece dudas sobre sus efectos cardiovasculares debido a que no afecta el tamaño de la placa de ateroma aunque sí disminuye el colesterol aórtico lo que daría mayor estabilidad a la misma. Sus efectos a nivel hepático y cardíaco son nulos y los efectos a nivel endometrial equiparables a los humanos. En este

caso contamos con la ventaja de que el estudio RUTH nos dará una respuesta a los efectos cardiovasculares de esta molécula.

El estradiol muestra unos resultados homogéneos en cuanto a una tendencia favorable sobre la patología cardiovascular. Creemos que la falta de resultados más evidentes puede ser debida a una escasa potencia estadística debido al escaso número de casos ya que casi todos los estudios previos van en la misma línea de cardioprotección. Sus resultados a nivel endometrial nos hacen pensar en que la dosis utilizada ha sido la adecuada.

El tratamiento con acetato de ciproterona ofrece unos resultados desalentadores ya que en ningún caso aporta beneficios al estradiol, siempre empeorando sus resultados, y por esto creemos que desde el punto de vista cardiovascular no debe ser el gestágeno de elección. Los hallazgos endometriales también apoyan una correcta dosificación del mismo respecto al estradiol.

## **8. CONCLUSIONES.**

Del análisis de los resultados obtenidos en este estudio se pueden obtener las siguientes conclusiones siempre teniendo en cuenta que ha sido realizado con animales de experimentación:

- 1. El modelo de la coneja ooforectomizada sometida a una dieta hipercolesterolémica es un modelo útil para el estudio de la aterosclerosis. De todas formas utilizar un grupo sham para este tipo de estudios no parece necesario de acuerdo con los resultados obtenidos en que en ningún caso se han hallado diferencias entre los grupos control y sham.**
- 2. La cuantificación (macroscópica y microscópica) de la placa de ateroma es un método útil para valorar la extensión y grosor de la placa de ateroma. La cuantificación del colesterol de la placa de ateroma es útil para valorar la composición de la misma.**
- 3. Un estudio completo de las distintas lipoproteínas plasmáticas no parece aportar en este modelo mayores ventajas que un análisis simple de colesterol y triglicéridos.**



- 4. a) De acuerdo con nuestros resultados el tratamiento con estradiol presenta una clara tendencia beneficiosa en la prevención de patología cardiovascular.**
- b) Añadir acetato de ciproterona al estradiol no ofrece ninguna ventaja sino un efecto deletéreo sobre todas las variables cuantificadas en la placa de ateroma, por lo que no sería de elección como gestágeno para la prevención de patología cardiovascular.**
- 5. a) El tratamiento con tibolona puede ser útil para la prevención de patología cardiovascular debido a la homogeneidad de resultados obtenidos, aunque con dudas en su extrapolación a humanos.**
- b) El papel del raloxifeno en la prevención de patología cardiovascular es difícil de valorar debido a la disparidad los resultados obtenidos.**

## **9. INDICE DE FIGURAS.**

<b>Figura 1. Mortalidad cardiovascular y por cáncer.</b>	<b>15</b>
<b>Figura 2. Producción de la placa de ateroma.</b>	<b>17</b>
<b>Figura 3. Corte histológico de una arteria coronaria de una lesión tipo II.</b>	<b>19</b>
<b>Figura 4. Corte histológico de una arteria coronaria con una lesión tipo IV.</b>	<b>21</b>
<b>Figura 5. Células espumosas rellenas de vacuolas lipídicas.</b>	<b>25</b>
<b>Figura 6. Resultados del estudio HERS a lo largo del tiempo.</b>	<b>56</b>
<b>Figura 7. Disposición de las distintas jaulas en el estabulario.</b>	<b>79</b>
<b>Figura 8. Detalle de una de las jaulas.</b>	<b>80</b>
<b>Figura 9. La coneja ya anestesiada antes de iniciar la intervención.</b>	<b>81</b>
<b>Figura 10. Laparotomía ya realizada.</b>	<b>82</b>
<b>Figura 11. Visión de los genitales internos.</b>	<b>83</b>
<b>Figura 12. Otra visión de los genitales internos.</b>	<b>83</b>
<b>Figura 13. Pinzamiento de los pedículos ováricos.</b>	<b>84</b>
<b>Figura 14. Finalización de la intervención.</b>	<b>84</b>
<b>Figura 15. Fotografías de las aortas teñidas con Sudán IV.</b>	<b>91</b>
<b>Figura 16. Evolución del peso de los animales a lo largo del estudio.</b>	<b>102</b>
<b>Figura 17. Cuantificación colorimétrica de la placa de ateroma.</b>	<b>105</b>
<b>Figura 18. Placas de ateroma teñidas con hematoxilina- eosina.</b>	<b>107</b>
<b>Figura 19. Relación entre el colesterol total plasmático y las placas de ateroma.</b>	<b>108</b>
<b>Figura 20. Determinaciones del colesterol aórtico en función del peso aórtico.</b>	<b>111</b>

<b>Figura 21. Determinaciones del colesterol aórtico en función de las proteínas aórticas.</b>	<b>112</b>
<b>Figura 22. Relación entre el colesterol total plasmático y el colesterol aórtico</b>	<b>113</b>
<b>Figura 23. Fotografías microscópicas correspondientes a una tinción de inmunohistoquímica para células musculares lisas.</b>	<b>126</b>
<b>Figura 24. Fotografías microscópicas correspondientes a una tinción de inmunohistoquímica para macrófagos.</b>	<b>128</b>
<b>Figura 25. Fotografías microscópicas correspondientes a una tinción de inmunohistoquímica para apoptosis.</b>	<b>130</b>
<b>Figura 26. Fotografías microscópicas correspondientes a una tinción de inmunohistoquímica para replicación celular.</b>	<b>132</b>
<b>Figura 27. Representación de los pesos uterinos.</b>	<b>136</b>
<b>Figura 28. Relación entre el peso corporal y cardíaco a lo largo del tiempo.</b>	<b>137</b>
<b>Figura 29. Fotos microscópicas de cortes histológicos de los úteros.</b>	<b>138</b>
<b>Figura 30. Fotos microscópicas de cortes histológicos de los hígados.</b>	<b>140</b>
<b>Figura 31. Tibolona y sus distintos metabolitos.</b>	<b>175</b>
<b>Figura 32. Conversión de la tibolona a nivel endometrial.</b>	<b>176</b>

## **10.- INDICE DE TABLAS.**

---

<b>Tabla 1. Distribución por grupos de los animales.</b>	<b>100</b>
<b>Tabla 2. Pesos de los animales.</b>	<b>101</b>
<b>Tabla 3. Porcentajes de ateroma aórtico.</b>	<b>104</b>
<b>Tabla 4. Extensión de la placa de ateroma medida microscópicamente.</b>	<b>106</b>
<b>Tabla 5. Determinaciones del colesterol aórtico.</b>	<b>110</b>
<b>Tabla 6. Niveles de colesterol plasmático al inicio del estudio.</b>	<b>115</b>
<b>Tabla 7. Niveles de triglicéridos plasmáticos al inicio del estudio.</b>	<b>116</b>
<b>Tabla 8. Niveles de colesterol plasmático al final del estudio.</b>	<b>118</b>
<b>Tabla 9. Niveles de triglicéridos plasmáticos al final del estudio.</b>	<b>119</b>
<b>Tabla 10. Area bajo la curva de los niveles de colesterol plasmático.</b>	<b>121</b>
<b>Tabla 11. Area bajo la curva de los niveles de triglicéridos plasmáticos.</b>	<b>122</b>
<b>Tabla 12. Ratios de colesterol y triglicéridos.</b>	<b>124</b>
<b>Tabla 13. Comparaciones entre los pesos de los distintos órganos extraídos.</b>	<b>135</b>

## **11. BIBLIOGRAFIA.**

Adams MR, Kaplan JR, Clarkson TB, Koritnik DR. Ovariectomy, social status, and atherosclerosis in *Cynomolgus* monkeys. *Arteriosclerosis* 1985; 5 : 192-200.

Adams MR, Kaplan JR, Manuck SB, Koritnik DR, Parks JS, Wolfe MS, Clarkson TB. Inhibition of coronary artery atherosclerosis by 17-beta-estradiol in ovariectomized monkeys: lack of an effect of added progesterone. *Arteriosclerosis* 1990; 10: 1051-7.

Adams MR, Register TC, Golden DL, Wagner JD, Williams JK. Medroxyprogesterone acetate antagonizes inhibitory effects of conjugated equine estrogens on coronary artery atherosclerosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 217-21.

Al-Azzawi F, Wahab M, Habiba M, Akkad A, Mason T. Continuous combined hormone replacement therapy compared with tibolone. *Obstet Gynecol* 1999; 93: 258-64.

Alexandersen P, Haarbo J, Sandholdt I, Shalmi M, Lawaetz H, Christiansen C. Norethindrone acetate enhances the antiatherogenic effect of 17-beta-estradiol. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 902-907.

Alwers R, Urdinola J, Onatra W, Sánchez F, Posso H. Changes in normal lipid profile of menopausal women with combined hormone replacement therapy. Comparative clinical trial of two hormonal combinations (conjugated



estrogens/medroxyprogesterone acetate versus estradiol valerate/ cyproterone acetate). *Maturitas* 1999; 32: 41-50.

Angerer P, Störk S, Kothny W, Schmitt P, Von Schacky C. Effect of oral postmenopausal hormone replacement on progression of atherosclerosis. A randomized, controlled trial. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 262-8.

Anitschkow N. Über die veränderungen der kaninchenaorta bei experimenteller cholesterinsteatose. *Beitr Pathol Anat Allg Pathol* 1913; 56: 379-404.

Anitschkow N. ; in *Arteriosclerosis: A survey of the problem*, Edited by E.V. Cowdry, New York, The Macmillan Company, 1933, chap.10.

Armstrong ML, Heistad DD. Animal models of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1990; 85: 15-23.

Barnabei VM, Phillips TM, Hsia J. Plasma homocysteine in women taking HRT: the PEPI Trial. *J Womens Health Gend Based Med* 1999; 9: 1167-72.

Barrett-Connor E. Sex differences in coronary heart disease. Why are women superior ?The 1995 Ancel Keys Lecture. *Circulation* 1997; 95: 252-64.

Barrett-Connor E, Wenger NK, Grady D, Mosca L, Collins P, Kornitzer M, Cox DA, Moscarelli E, Anderson PW. Hormone and non-hormone therapy for the

maintenance of postmenopausal health: the need for randomized controlled trials of estrogen and raloxifene. *J Womens Health* 1998; 7: 839-47.

Barrett-Connor, E, Grady D. HRT, heart disease, and other considerations. *Annu Rev Public Health* 1998; 19: 55-72.

Barter PJ, Rye KA. Molecular mechanisms of reverse cholesterol transport. *Curr Opin Lipidol* 1996; 7(2): 82-87.

Bass KM, Craig JN, Klag MJ, Bush TL. Plasma lipoproteins levels as predictors of cardiovascular death in women. *Arch Intern Med* 1993; 153: 2209-16.

Bjarnason NH, Bjarnason K, Haarbo J, Rosenquist C, Christiansen C. Tibolone: prevention of bone loss in late post-menopausal women: *J Clin Endocrinol Metabol* 1996; 81: 2419-22.

Bjarnason NH, Bjarnason K, Haarbo J, Coelingh Bennink HJT, Christiansen C. Tibolone: influence of cardiovascular disease. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 1752-6.

Bjarnason NH, Haarbo J, Byrjalsen I, Kauffman RF, Christiansen C. Raloxifene inhibits aortic accumulation of cholesterol in ovariectomized, cholesterol-fed rabbits. *Circulation* 1997; 96:1964-1969.

Bjarnason NH, Haarbo J, Byrjalsen I, Kauffman RF, Knadler MP, Christiansen C. Raloxifene reduces atherosclerosis: studies of optimized raloxifene doses in ovariectomized, cholesterol-fed rabbits. *Clinical Endocrinology*, 2000; 52: 225-233.

Bjarnason NH, Haarbo J, Byrjalsen I, Alexandersen P, Kauffman RF, Christiansen C. Raloxifene and estrogen reduces progression of advanced atherosclerosis-a study in ovariectomized, cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 2001; 154: 97-102.

Boix R, Medrano MJ, Almazán J. Mortalidad por enfermedad cerebrovascular y enfermedad isquémica del corazón. Período 1996-1997. *SEMERGEN* 2001; 27: 98-102.

Boss S, Huster WJ, Neild JA, Glant MD. Effects of raloxifene on the endometrium of postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol* 1997; 177: 1458-64.

Braunwald E. Shattuck Lecture-cardiovascular medicine at the turn of the millenium: triumphs, concerns, and opportunities. *N Engl J Med* 1997; 337: 1360-9.

Brehme U, Bruck B, Gugel N, Wehrmann M, Hanke S, Finking G, Schmahl F, Hanke H. Aortic plaque size and endometrial response in cholesterol-fed rabbits treated with estrogen plus continuous or sequential progestin. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1999; 19: 1930-37.

Breslow JL. Cardiovascular disease burden increase, NIH funding decrease. *Nat Med* 1997; 3: 600-1.

Brotons C. Epidemiología de la enfermedad cardiovascular en la mujer: mortalidad. En: *Post-Menopausia y enfermedad cardiovascular*. A. Cabero Roura. ISBN 84-07-00201-1. Ed. Springer-Verlag Ibérica, Barcelona 1998.

Bruck B, Brehme U, Gugel N, Hanke S, Finking G, Lutz C, Benda N, Schmahl FW, Haasis R, Hanke H. Gender-specific differences in the effects of testosterone and estrogen on the development of atherosclerosis in rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 2192-99.

Bush TL, Barrett-Connor E, Cowan LD, Criqui MH, Wallace RB, Suchindran CM, Tyroler HA, Rifkind BM. Cardiovascular mortality and noncontraceptive use of estrogens in women: results from the Lipid Research Clinics Follow-up Study. *Circulation* 1987; 75: 1102-1109.

Caine YG, Bauer KA, Barzegar S, Ten Cate H, Sacks FM, Walsh BW, Schiff I, Rosenberg RD. Coagulation activation following estrogen administration to postmenopausal women. *Thromb Haemost* 1992; 68: 392-5.

Carmona F. Transplante homólogo vascularizado de trompa y ovario. Tesis Doctoral 1991. Hospital Clínico de Barcelona. Universidad de Barcelona.

Castelli WP. Epidemiology of coronary heart disease: The Framingham Study. Am J Med 1984; 76: 4-12.

Castelli WP. The triglyceride issue: a view from Framingham. Am Heart J 1986; 112: 432-7.

Castelli WP. Cardiovascular disease in women. Am J Obstet Gynecol 1988; 158: 1553-60.

Castelo- Branco C, Casals E, Sanllehy C, González-Merlo J, Iglesias X. Effects of oophorectomy and hormone replacement treatment on plasma lipids. Maturitas 1993; 17:113-22.

Castelo- Branco C, Casals E, Sanllehy C, Fortuny A, Vanrell JA, González-Merlo J. Postmenopausal HRT with low-dose medroxyprogesterone acetate. Endometrium, plasma lipids, lipoproteins and apolipoproteins. J Reprod Med 1995; 40: 305-11.

Castelo-Branco C. En Terapéutica hormonal sustitutiva en la menopausia, lípidos y riesgo cardiovascular. De Fundamentos básicos y clínicos en menopausia. Cano Sánchez A. Editorial Libro del Año, S.L. ISBN: 84-87748-89-9. 1996.

Castelo-Branco C, Casals E, Figueras F, Sanjuán A, Vicente JJ, Balasch J, Vanrell JA. Two-year prospective and comparative study on the effects of tibolone on lipid pattern, behavior of apolipoproteins AI and B. *Menopause* 1999; 6(2):92-7.

Castelo-Branco C, Vicente JJ, Figueras F, Sanjuán A, Martínez de Osaba MJ, Casals E, Pons F, Balasch J, Vanrell JA. Comparative effects of estrogens plus androgens and tibolone on bone, lipid pattern and sexuality in postmenopausal women. *Maturitas* 2000; 34: 161-8.

Caulin-Glaser T, Farrell WJ, Pfau SE, Zaret B, Bungler K, Setaro JF, Brennan JJ, Bender JR, Cleman MW, Cabin HS, Remetz MS. Modulation of circulating cellular adhesion molecules in postmenopausal women with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1998; 31: 1555-60.

Chae CU, Ridker PM, Manson JAE. Postmenopausal HRT and cardiovascular disease. *Thromb Haemost* 1997; 78: 770-80.

Chovanian AV, Dzau VJ. Renin angiotensin system and atherosclerotic vascular disease . Vol 1. Philadelphia : Lippincott-Raven, 1996: 237-42.

Clarkson TB, Anthony MS, Klein KP. Hormone replacement therapy and coronary artery atherosclerosis: the monkey model. *British Journal of Obstetrics and Gynaecology* 1996; 103: 53-58.

Clarkson TH, Anthony MS, Jerome CP. Lack of effect of raloxifene on coronary artery atherosclerosis of postmenopausal monkeys. *J Clin Endocrinol Metab* 1998; 83: 721-6.

Clay MC, Hopkins GJC, Ehnholm CP, Barter PJ. The rabbits as an animal model of hepatic lipase deficiency. *Biochim Biophys Acta* 1989; 1002: 173-181.

Cohen FJ, Watts S, Shah A, Akers R, Plouffe L Jr. Uterine effects of 3-year raloxifene therapy in postmenopausal women younger than age 60. *Obstet Gynecol (US)* 2000; 95(1): 104-110.

Colditz GA, Willett WC, Stampfer MJ, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. Menopause and the risk of coronary heart disease in women. *NEJM* 1987; 316: 1105-1110.

Colvin PL, Wagner JD, Adams MR, Sorci-Thomas MG. Sex steroids increases cholesterol 7- $\alpha$ -hydroxylase mRNA in nonhuman primates. *Metabolism* 1998; 4: 391-5.

Constantinides P, Gutmann-Auersperg N, Hopes D, Williams K. Estriol and prednisolone in rabbit atherosclerosis. *Arch Pathol* 1962; 73: 277-80.

Crook D, Cust MP, Gangar KF, Worthington M, Hillard TC, Stevenson JC, Whitehead MI, Wynn V. Comparison of transdermal and oral estrogen-progestin

replacement therapy: effects on serum lipids and lipoproteins. *Am J Obstet Gynecol* 1992; 166: 950-5.

Crook D. Cardiovascular risk assessment for postmenopausal HRT such as tibolone. *Controversies in cardiovascular disease and HRT*. Ed. by Genazzani. The Proceedings of a Workshop arranged by the International Menopause Society, Oct. 2000. London.

Cummings SR, Eckert S, Krueger KA, Grady D, Powles TJ, Cauley JA, Norton L, Nickelsen T, Bjarnason NH, Morrow M, Lippman ME, Black D, Glusman JE, Costa A, Jordan VC. The effect of raloxifene on risk of breast cancer in postmenopausal women. Results from the MORE randomized trial. *JAMA* 1999; 281: 2189-2197.

Cushman M, Legault C, Barrett-Connor E, Stefanick ML, Kessler C, Judd HL, Sakkinen PA, Tracy RP. Effect of postmenopausal hormones on inflammation-sensitive proteins. The Postmenopausal Estrogen/Progestogen Intervention Trial (PEPI). *Circulation* 1999; 100: 717-722.

Cushman M, Constantino JP, Tracy RRP, Song K, Buckley L, Roberts JD, Krag DN. Tamoxifen and cardiac risk factors in healthy women. Suggestion of an anti-inflammatory effect. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2001; 21: 255-61.



Danesh J, Collins R, Peto R. Chronic infections and coronary heart disease: is there a link?. *Lancet* 1997; 350: 430-36.

Danesh J, Collins R, Peto R. Lp(a) and coronary heart disease. Meta-analysis of prospective studies. *Circulation* 2000; 102: 1082-85.

Davies MJ, Woolf N, Rowles PM, Pepper J. Morphology of the endothelium over atherosclerotic plaques in human coronary arteries. *Br Heart J* 1988; 60: 459-64.

Davies MJ. Pathology and morphology of atherosclerosis. *B J Cardiol* 1997; 4 (suppl. 1): S-47.

De Aloysio D, Fabiani AG, Mauloni M, Bottiglioni F. Use of Org OD14 for the treatment of climacteric complaints. *Maturitas* 1987; 1: 49S-65S.

De Visser J, Coert A, Feenstra H, Van der Vies J. Endocrinological studies with Org OD 14. *Drug Res* 1984; 34 (II): 1010-17.

Donnelly TM, Kelsey SF, Levine DM, Parker TS. Control of variance in experimental studies of hyperlipidemia using WHHL rabbit. *J Lipid Res* 1991; 32: 1089-98.

Doren M, Rubig A, Coelingh Bennink HJ, Holzgreve W. Resistance of pelvic arteries and plasma lipids in postmenopausal women: comparative study of

tibolone and continuous combined estradiol and norethindrone acetate replacement therapy. *Am J Obstet Gynecol* 2000; 183: 575-82.

Dueñas JL, Cano A. Hipoestrogenismo como factor de riesgo en la mujer postmenopáusica. En: *Postmenopausia y enfermedad cardiovascular*, Cabero- Roura A. Ed. Springer-Verlag Ibérica, barcelona 1998. ISBN 84-07-00201-1.

Editorial. Coronary Heart disease in women-an ounce of prevention. *NEJM* 2000; 343: 572-4.

Editorial. The Women's Health Initiative: a Heart-to-HRT conversation. *Mayo Clin Proc* 2000; 75: 559-61.

Espeland MA, Applegate W, Furberg CD, for the ACAPS investigators. ERT and progression of intimal-medial thickness in the carotid arteries of postmenopausal women. *Am J Epidemiol* 1995; 142: 1011-1019.

Ettinger B, Black D, Mitlak BH, Knickerbocker RK, Nickelsen T, Genant HK, Christiansen C, Delmas PD, Zanchetta JR, Stakkestad J, Glüer CC, Krueger K, Cohen FJ, Eckert S, Ensrud KE, Avioli LV, Lips P, Cummings SR en representación de los investigadores del MORE (Multiple outcomes of raloxifene evaluation). Reducción del riesgo de fracturas vertebrales en mujeres posmenopáusicas con osteoporosis tratadas con raloxifeno. Resultados de un ensayo clínico aleatorizado de 3 años de duración. *JAMA* 1999; 282:637-45.

Falkeborn M, Persson I, Adami HO, Bergstrom R, Eaker E, Lithell H, Mohsen R, Naessén T. The risk of acute myocardial infarction after estrogen-progestogen replacement. *Br J Obstet Gynaecol* 1992; 99: 821-8.

Falkeborn M, Persson I, Terént A, Adami HO, Lithell H, Bergstrom R. HRT and the risk of stroke. *Arch Intern Med* 1993; 153: 1201-9.

Felton CV, Crook D, Davies MJ, Oliver MF. Relation of plaque lipid composition and morphology to the stability of human aortic plaques. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1337-45.

Figtree GA, Lu Y, Webb C, Collins P. Raloxifene acutely relaxes rabbit coronary arteries in vitro by an estrogen receptor-dependent and nitric oxide-dependent mechanism. *Circulation* 1999; 100: 1095-1101.

Finucane FF, Madans JH, Bush TL, Wolf PH, Kleinman JC. Decreased risk of stroke among postmenopausal hormone users. *Arch Intern Med* 1993; 153: 73-9.

Fisher GM, Swain ML. Effects of estradiol and progesterone on the increased synthesis of collagen in atherosclerotic rabbit aortas. *Atherosclerosis* 1985; 54: 177-85.

Folch J, Lees M, Stanley GHS. A simple method for the isolation and purification of total lipids from animals tissues. *J Biol Chem.* 1957; 226: 497-509.

Fuster V, Stein B, Ambrose JA, Badimon L, Badimon JJ, Chesebro JH. Atherosclerotic plaque rupture and thrombosis: evolving concepts. *Circulation* 1990; 82(Suppl. II): 1147-59.

García-Fantini M. Reactividad vascular y placa de ateroma en mujeres postmenopáusicas en tratamiento con tibolona oral. *Toko-Gin Pract* 2001; 60(3): 138-46.

Genazani Ar, Benedek-Jaszman LJ, Hart DM, Andolsek L, Kicovic PM, Tax L. Org OD 14 and the endometrium. *Maturitas* 1991; 13: 243-251.

Gilabert J, Estellés A, Cano A, Espana F, Barrachina R, Grancha S, Aznar J, Tortajada M. The effect of ERT with or without progestogen on the fibrinolytic system and coagulation inhibitors in postmenopausal status. *Am J Obstet Gynecol* 1995; 173: 1849-54.

Ginsburg J, Prelevic GM, Butler D, Okolo S. Clinical experience with tibolone over 8 years. *Maturitas* 1995; 21: 71-6.

Ginsburg J, Prelevic GM. Cause of vaginal bleeding in postmenopausal women taking tibolone. *Maturitas* 1996; 24:107-110.

Gordon T, Kannel WB, Hjortland MC, McNamara PM. Menopause and coronary hearth disease : the Framingham study. *Ann Intern Med* 1978; 89: 157-161.

Gorodeski GI, Yang T, Levy MN, Goldfarb J, Utian WH. Modulation of coronary vascular resistance in female rabbits by estrogen and progesterone. *J Soc Gynecol Invest* 1998; 5: 197-202.

Grady D, Rubin SM, Petitti DB, Fox CS, Black D, Ettinger B, Ernster VL, Cummings SR. Hormone therapy to prevent disease and prolong life in postmenopausal women. *Ann Intern Med* 1992; 117: 1016-37.

Grainger DJ, Kirschenlohr HL, Metcalfe JC, Weissberg PL, Wade DP, Lawn RM. Proliferation of human smooth muscle cells promoted by lipoprotein(a). *Science* 1993; 260: 1655-58.

Grayston JT. Secondary prevention antibiotic treatment trials for coronary artery disease. *Circulation* 2000; 102: 1742-3.

Grodstein F, Stampfer MJ. The epidemiology of coronary heart disease and estrogen replacement in postmenopausal women. *Prog Cardiovasc Diseases* 1995; 38: 199-210.

Grodstein F, Stampfer MJ, Manson JE, Colditz GA, Willett WC, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. Postmenopausal estrogen and progestin use and the risk of cardiovascular disease. *NEJM* 1996; 335: 453-61.

Grodstein F. Invited commentary: can selection bias explain the cardiovascular benefits of estrogen replacement therapy? *Am J Epidemiol* 1996; 143: 979-82.

Grodstein F, Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Manson JE, Joffe M, Rosner B, Fuchs C, Hankinson SE, Hunter DJ, Hennekens CH, Speizer FE. Postmenopausal hormone therapy and mortality. *NEJM* 1997; 336: 1769-75.

Gruchow HW, Anderson AJ, Barboriak JJ, Sobocinski KA. Postmenopausal use of estrogen and occlusion of coronary arteries. *Am Heart J* 1988; 115: 954-63.

Guetta V, Quyyumi AA, Prasad A, Panza JA, Waclawiw M, Cannon Ro III. The role of nitric oxid in coronary vascular effects of estrogen in postmenopausal women. *Circulation* 1997; 96: 2795-801.

Haarbo J, Hassager C, Riis BJ, Christiansen C. Relation of body fat distribution to serum lipids and lipoproteins in elderly women. *Atherosclerosis* 1989; 80: 57-61.

Haarbo J, Leth-Espensen P, Stender S, Christiansen C. Estrogen monotherapy and combined estrogen-progestogen replacement therapy attenuate aortic accumulation

of cholesterol in ovariectomized cholesterol -fed rabbits. *J Clin Invest* 1991; 87: 1274-9.

Haarbo J. HRT and cardiovascular disease: the rabbit model. *Br J Obstet Gynaecol* 1996; 103 (suppl. 13): 49-52.

Haarbo J, Christiansen C. The impact of female sex hormones on secondary prevention of atherosclerosis in ovariectomized cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 1996; 123: 139-144.

Haines CJ, James AE, Panesar NS, Ngai TJ, Sahota DS, Jones RL, Chang AMZ. The effect of percutaneous oestradiol on atheroma formation in ovariectomized cholesterol-fed rabbits. *Atherosclerosis* 1999; 143: 369-375.

Hammond CB. Menopause and hormone replacement therapy: an overview. *Obstet Gynecol* 1996; 87: 2S-15S.

Hanke H, Hanke S, Bruck B, Brehme U, Gugel N, Finking G, Mück AO, Schmahl FW, Hombach V, Haasis R. Inhibition of the protective effect of estrogen by progesterone in experimental atherosclerosis. *Atherosclerosis* 1996; 121: 129-38.

Hanke H, Hanke S, Finking G, Muhic-Lohrer A, Mück AO, Schmahl FW, Haasis R, Hombach V. Different effects of estrogen and progesterone on experimental atherosclerosis in female versus male rabbits. *Circulation* 1996; 94: 175-81.

Hanke H, Kamenz J, Hanke S, Spieb J, Lenz C, Brehme U, Bruck B, Finking G, Hombach V. Effect of 17-beta-estradiol on pre-existing atherosclerotic lesions: role of the endotelium. *Atherosclerosis* 1999; 147: 123-32.

Hankey GJ, Eikelboom JW. Homocysteine and vascular disease. *Lancet* 1999; 354: 407-13.

Hansson GK, Jonasson L, Seifert PS, Stemme S. Immune mechanisms in atherosclerosis. *Arteriosclerosis* 1989; 9: 567-78.

Hayashi T, Jayachandran M, Sumi D, Thakur NK, Esaki T, Muto E, Kano H, Asai Y, Iguchi A. Physiological concentration of 17-beta-estradiol retards the progression of severe atherosclerosis induced by a high-cholesterol diet plus balloon catheter injury. Role of NO. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1613-21.

Henderson BE, Paganini-Hill A, Ross RK. Decreased mortality in users of ERT. *Arch Intern Med* 1991; 51: 75-78.

Herrington DM, Werbel BL, Riley WA, Pusser BE, Morgan TM. Individual and combined effects of estrogen/progestin therapy and lovastatin on lipids and flow-mediated vasodilatation in postmenopausal women and coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1999; 33: 2030-7.



Herrington DM, Reboussin DM, Brosnihan KB, Sharp PC, Shumaker SA, Snyder TE, Furberg CD, Kowalchuk GJ, Stuckey TD, Rogers WJ, Givens DH, Waters D. Effects of estrogen replacement on the progression of coronary-artery atherosclerosis. *NEJM* 2000; 343: 522-9.

Herrington DM, Pusser BE, Riley WA, Thuren TY, Brosnihan B, Brinton EA, MacLean DB. Cardiovascular effects of droloxifene, a new selective estrogen receptor modulator, in healthy postmenopausal women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 2000; 20: 1606-12.

Holm P, Stender S, Andersen HO, Hansen BF, Kjeldsen K, Nordestgaard BG. Antiatherogenic effect of estrogen abolished by balloon catheter injury in cholesterol-clamped rabbits. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1504-11.

Holm P, Korsgaard N, Shalmi M, Andersen HL, Hougaard P, Skouby SO, Stender S. Significant reduction of the antiatherogenic effect of estrogen by long-term inhibition of nitric oxide synthesis in cholesterol-clamped rabbits. *J Clin Invest* 1997; 100: 821-8.

Holm P, Andersen HL, Andersen MR, Erhardtsen E, Stender S. The direct antiatherogenic effect of estrogen is present, absent, or reversed, depending on the state of the arterial endothelium. A time course study in cholesterol-clamped rabbits. *Circulation* 1999; 100: 1727-33.

Hong MK, Romm PA, Reagan K, Green CE, Rackley CE. Effects of ERT on serum lipid values and angiographically defined coronary artery disease in postmenopausal women. *Am J Cardiol* 1992; 69: 176-8.

Hu FB, Stampfer MJ, Manson JE, Grodstein F, Colditz GA, Speizer FE, Willett WC. Trends in the incidence of coronary heart disease and changes in diet and lifestyle in women. *NEJM* 2000; 343: 530-7.

Hulley S, Grady D, Bush T, Furberg C, Herrington D, Riggs B, Vittinghoff E for the Heart and Estrogen/progestin Replacement Study (HERS) Research Group. Randomized trial of estrogen plus progestin for secondary prevention of coronary heart disease in postmenopausal women. *JAMA* 1998; 280: 605-613.

Hunt K, Vessey M, McPherson K, Coleman M. Long-term surveillance of mortality and cancer incidence in women receiving HRT. *Br J Obstet Gynaecol* 1987; 94: 620-635.

Imthurn B, Roselli M, Jaeger A, Keller PJ, Dubey RK. Differential effects of HRT on endogenous nitric oxide (nitrite/nitrate) levels in postmenopausal women substituted with 17-beta-estradiol valerate and cyproterone acetate or medroxyprogesterone acetate. *J Clin Endocrinol Metab* 1997; 82: 388-94.

Instituto Nacional de Estadística. Encuesta de morbilidad hospitalaria. Año 1994. Madrid: Instituto Nacional de Estadística, 1996.

Jonas HA, Kronmal RA, Psaty BM, Manolio TA, Meilahn EN, Tell GS, Tracy RP, Robbins JA, Anton-Culver H. Current estrogen-progestin and ERT in elderly women: association with carotid atherosclerosis. CHS Collaborative Research Group. Cardiovascular Health Group. *Ann Epidemiol* 1996; 6: 314-323.

Kannel WB, Wolf PA, Castelli WP, d'Agostino RB. Fibrinogen and risk of cardiovascular disease: The Framingham Study. *JAMA* 1987; 25: 1183-86.

Kim CJ, Ryu WS, Kwak JW, Park CT, Ryoo UH. Changes in Lp(a) lipoprotein and lipid levels after cessation of female sex hormone production and estrogen replacement therapy. *Arch Intern Med* 1996; 156: 500-4.

Koh KK, Minemoyer R, Bui MN, Csako G, Pucino F, Guetta V, Waclawiw M, Cannon RO. Effects of HRT on fibrinolysis in postmenopausal women. *NEJM* 1997; 336: 683-90.

Koninckx R, Schmidt-Gollwitzer K. Uso del estradiol valerato en combinación con ciproterona acetato para el control de los síntomas menopáusicos: revisión de su eficacia y de su influencia sobre el endometrio, sobre el metabolismo óseo y sobre los factores de riesgo cardiovascular. *European Menopause Journal*, 1997. Separata facilitada por laboratorios Schering.

Kroon U-B, Silfverstolpe G, Tengborn L. The effects of transdermal estradiol and oral conjugated estrogens on haemostasis variables. *Thromb Haemost* 1994; 71: 420-3.

Lagrand WK, Visser CA, Hermens WT, Niessen HWM, Verheugt FWA, Wolbink GJ, Hack CE. C-reactive protein as a cardiovascular risk factor. More than an epiphenomenon?. *Circulation* 1999; 100: 96-102.

Lee AJ, Lowe GOD, Smith WCS, Tunstall-Pedoe H. Plasma fibrinogen in women: relation-ship with oral contraception, the menopause and hormone replacement therapy. *Br J Haematol* 1993; 83: 616-21.

Lee M, Giardina EG, Homma S, DiTullio MR, Sciacca RR. Lack of effect of estrogen on rest and treadmill exercise in postmenopausal women without known cardiac disease. *Am J Cardiol* 1997; 80: 793-7.

Lee RT, Libby P. The unstable atheroma. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1859-67.

L'Enfant. Preliminary trends in the Women's Health Initiative (press release). Bethesda, Md: National Heart, Lung, and Blood Institute; April 3, 2000.

Ley C, Lees B, Stevenson J. Sex and menopause associated changes in body fat distribution. *Am J Clin Nutr* 1992; 55: 950-54.

Lipid Research Clinics Program. The Lipid Research Clinics Coronary Primary Prevention Trial Results: II. The relation-ship of reduction in incidence of coronary heart disease to cholesterol lowering. *JAMA* 1984; 251: 365-74.

Lloyd G, Patel N, McGing E, Cooper A, Kamalvand K, Jackson G. Acute effects of hormone replacement with tibolone on myocardial ischaemia in women with angina. *Int J Clin Pract* 1998; 52(3): 155-7.

Lloyd G, McGing E, Cooper A, Patel N, Lumb PJ, Wierzbicki AS, Jackson G. A randomised placebo controlled trial of the effects of tibolone on blood pressure and lipids in hypertensive women. *J Hum Hypertension* 2000; 14: 99-104.

Lobo RA, Pickar JH, Wild RA, Walsh B, Hirvonen E for the Menopause Study Group. Metabolic impact of adding medroxyprogesterone acetate to conjugated estrogen therapy in postmenopausal women. *Obstet Gynecol* 1994; 84: 987-95.

Lowry OH, Rosebrough MJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 1951; 193: 265-275.

Mahley, RM, Weisgraber KH, Hussain MM, Greenman B, Fisher M, Vogel T, Goreki M. Intravenous infusion of apolipoprotein E accelerates clearance of plasma lipoproteins in rabbits. *J Clin Invest* 1989; 83: 2125-2130.

Marchand F. Über Arteriosklerose (Athero-Sklerose), Verhandl, 21. Kong. Inn. Med. 1904 ; 21: 23.

Mares P, Dauzat M, Abramovici Y, deklunder G, Body G, Crepin G, Denis A, Favier M. Effects of a sequential combination of estradiol valerate and cyproterone acetate on the functional properties of the arterial wall in menopausal women. *Gynecol Obstet Fertil* 2000; 28: 509-517.

McCrohon JA, Adams MR, McCredie RJ, Robinson J, Pike A, Abbey M, Keech AC, Celermajer DS. HRT is associated with improved arterial physiology in healthy postmenopausal women. *Clin Endocrinol (Oxford)* 1996; 45: 435-41.

McFarland KF, Boniface ME, Hornung CA, Earnhardt W, O'Neal Humphries J. Risk factors and non-contraceptive estrogen use in women with and without of coronary disease. *Am Heart J*, 1989; 117: 1209-14.

McKinley SM, Bigano NL, McKinley JB. Smoking and age at menopause. *Ann Intern Med* 1985; 103: 350.

Meade TW, Ruddock V. Fibrinolytic activity, clotting factors, and long-term incidence of ischaemic heart disease in the Northwick Park Heart Study. *Lancet* 1993; 342: 1076-79.

Medical Research Council's General Practice Research Framework. Randomized comparison of oestrogen versus oestrogen plus progestogen HRT in women with hysterectomy. *BMJ* 1996; 312: 473-8.

Mendelsohn ME, Karas RH. Estrogen and the blood vessel wall. *Current Opinion Cardiol* 1994; 9: 619-26.

Mendelsohn ME, Karas RH. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *NEJM* 1999; 340: 1801-11.

Millán J, Valderrama M, Torres F, Alvarez-Sala L. Aspectos generales de la patogenia de la arteriosclerosis. *Clin Invest Arterioscl*, 2000; 12. supl. 9-18.

Milner MH, Sinnott MM, Cooke TM, Kelly A, McGill T, Harrison RF. A 2-year study of lipid and lipoprotein changes in postmenopausal women with tibolone and estrogen-progestin. *Obstet Gynecol* 1996; 87: 593-9.

Miyagawa K, Rosch J, Stanczyk F, Hermsmeyer K. Medroxyprogesterone interferes with ovarian steroid protection against coronary vasospasm. *Nat Med* 1997; 3: 324-7.

Moncada S, Higgs A. The L-arginine –nitric oxide pathway. *NEJM* 1993; 329: 2002-12.

Morris EP, Denton ERE, Robinson J, MacDonald LM, Rymer JM. High resolution ultrasound assessment of the carotid artery: its relevance in postmenopausal women and the effects of tibolone on carotid artery ultrastructure. *Climacteric* 1999; 2: 13-20.

Muscat-Baron, Y, Brincat M, Galea R. Carotid artery thickness in women treated with HRT. *Maturitas* 1997; 27: 47-53.

Nachtigall LE, Nachtigall RH, Nachtigall RD, Beckman EM. ERT II: a prospective study in the relationship to carcinoma and cardiovascular and metabolic problems. *Obstet Gynecol* 1979; 54: 74-9.

Navab M, Berliner JA, Watson AD, Hama SY, Territo MC, Lusis AJ, Shih DM, Van Lenten BJ, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Fogelman AM. The Yin and Yang of oxidation in the development of the fatty streak: a review based on the 1994 George Lyman Duff Memorial Lecture. *Arterioscler Thromb vasc Biol* 1996; 16: 831-842.



Nickenig G, Strehlow K, Wassmann S, Bäumer AT, Albory K, Sauer H, Böhm M. Differential effects of estrogen and progesterone on AT<sub>1</sub> receptor gene expression in vascular smooth muscle cells. *Circulation* 2000; 102: 1828-33.

Overturf ML, Loose-Mitchel DS. In vivo model systems: the choice of the experimental animal model for analysis of lipoproteins and atherosclerosis. *Curr Opin Lipid* 1992; 3: 179-85.

Palacios S. Consecuencias de la menopausia. En : *Encycl. Méd. Chir.* (Elsevier, Paris, France), Gynécologie 38-A-11, 1999, 8p.

Palacios S. Tibolona:¿qué significa la actividad tejido-específica?. *Maturitas* 2001; 37: 159-65.

Parkin DE, Smith D, Al Azzawi F, Lindsay R, Hart DM. Effects of long-term ORG OD 14 administration on blood coagulation in climateric women. *Maturitas* 1987; 9: 95-101.

Parthasaraty S, Printz DJ, Boyd D, Joy L, Steinberg D. Macrophage oxidation of LDL generates a modified form recognized by the scavenger receptor. *Arteriosclerosis* 1986; 6: 505-10.

Patterson E, Ma L, Szabo B, Robinson CP, Thadani U. Ovariectomy and estrogen-induced alterations in myocardial contractility in female rabbits: role of the L-type calcium channel. *The Journal Pharmacol Exper Therap* 1998; 284: 586-91.

Peters NS, Rosano GMC, Sarrel P, Collins P, Lindsay DC, Lefroy DC, Poole-Wilson PA. A randomised double-blind crossover placebo-controlled trial of 17-beta-estradiol therapy in female patients with syndrome X (abstract). XIIth World Congress of Cardiology. *Eur Heart J* 1994; 15: 10.

Petitti DB. Coronary heart disease and ERT can compliance bias explain the results of observational studies? *Ann Epidemiol* 1994; 4: 115-8.

Prelevic GM, Beljic T, Ginsburg J. The effect of tibolone on cardiac flow in postmenopausal women with non-insulin dependent diabetes mellitus. *Maturitas* 1997; 27(1): 85-90.

Psaty BM, Heckbert SR, Atkins D, Lemaitre R, Koepsell TD, Wahl PW, Siscovick DS, Wagner EH. The risk of myocardial infarction associated with the combined use of estrogens and progestins in postmenopausal women. *Arch Intern Med* 1994; 154: 1333-9.

Quéreux C, Abramovici Y, Bohec M, Crépin G, Elia D, Janaud A, Leclère J, Nahmanovici C, Ribot C, Rozenbaum H. Ménopause et facteurs de risque

cardiovasculaire: effets de Climene® sur le poids, la pression artérielle et les paramètres lipidiques. *Reprod. Hum. et Horm* 1994; vol. VII, n.8: 383-8.

Quinn MT, Parthasarathy s, Fong LG, Steinberg D. Oxidatively modified low density lipoproteins : a potential role in recruitment and retention of monocyte/macrophages during atherogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 1987; 84: 2995-8.

Reaven GM. Pathophysiology of insulin resistance in human disease. *Physiol Rev* 1995; 75: 473-486.

Register Tc, Adams MR, Golden DL, Clarkson TB. Conjugated equine estrogens alone, but not in combination with medroxyprogesterone acetate, inhibit aortic connective tissue remodeling after plasma lipid lowering in female monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1998; 18: 1164-71.

Rekhter MD, Hicks GW, Brammer DW, Work CW, Kim JS, Gordon D, Keiser JA, Ryan MJ. Animal model that mimics atherosclerotic plaque rupture. *Circ Res* 1998; 83: 705-13.

Rekhter MD, Hicks GW, Brammer DW, Hallak H, Kindt E, Chen J, Rosebury WS, Anderson MK, Kuipers PJ, Ryan MJ. Hypercholesterolemia causes mechanical weakening of rabbit atheroma: local collagen loss as a prerequisite of plaque rupture. *Circ Res* 2000; 86(1): 101-8.

Ridker PM. Fibrinolytic and inflammatory markers for arterial occlusion: the evolving epidemiology of thrombosis and haemostasis. *Thromb Haemostas* 1997; 78: 53-59.

Ridker PM, Buring JE, Shih J, Matias M, Hennekens CH. Prospective study of C-reactive protein and the risk of future cardiovascular events among apparently healthy women. *Circulation* 1998; 98: 731-33.

Ridker PM, Hennekens CH, Rifai N, Buring JE, Manson JAE. HRT and increased plasma concentration of C-reactive protein. *Circulation* 1999; 100: 713-6.

Rosano GMC, Clarke D, Sarrel PM, Collins P. 17-beta-estradiol improves myocardial ischemia in postmenopausal women with coronary heart disease (abstract). 65<sup>th</sup> Scientific Sessions New Orleans Convention Center. *Circulation* 1992; 86 (suppl I): 2137.

Rosenfeld ME, Chait A, Bierman EL, King W, Goodwin P, Walden CE, Ross R. Lipid composition of aorta of Watanabe Heritable Hiperlipidemic and comparably hypercholesterolemic fat-fed rabbits. *Arteriosclerosis* 1988; 8: 338-47.

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis-an update. *N Engl J Med* 1986; 314:488-500.

Ross R. The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s. *Nature* 1993; 362: 801-809.

Ross R. Cell biology of atherosclerosis. *Annu Rev Physiol.* 1995, 57: 791-804.

Ross R. Atherosclerosis . an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999; 340: 115-126.

Rymer J, Chapman MG, Fogelman I. Effect of tibolone on postmenopausal bone loss. *Osteoporosis Int* 1994; 4: 314-19.

Sbarouni E, Kyriakides ZS, Nikolaou N, Kremastinos DTH. ERT and exercise performance in postmenopausal women with coronary artery disease. *Am J Cardiol* 1997; 79: 87-89.

Sbarouni E, Kyriakides ZS, Kremastinos DTH. The effect of HRT alone and in combination with simvastatin on plasma lipids of hypercholesterolemic postmenopausal women with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* 1998; 32: 1244-50.

Scanu AM, Lawn RM, Berg K. Lipoprotein(a) and atherosclerosis. *Ann Intern Med* 1991; 115: 209-218.

Scarabin PY, Alhenc-Gelas M, Oger E, Plu-Bureau G. HRT and circulating ICAM-1 in postmenopausal women-a randomised controlled trial. *Thromb Haemost* 1999; 81(5): 673-5.

Shibata H, Spencer TE, Onate SA, Jenster G, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Role of co-activators and co-repressors in the mechanism of steroid/thyroid receptor action. *Recent Prog Horm Res* 1997; 52: 141-65.

Shurtleff D. Some characteristics related to the incidence of cardiovascular disease and death. *DHEW Publication* 1974; 74: 599-604 .

Sidney S, Petitti DB, Quesenberry CP. Myocardial infarction and the use of estrogen and estrogen-progestogen in postmenopausal women. *Ann Intern Med* 1997; 127: 501-8.

Simon JA, Hsia J, Cauley JA, Richards C, Harris F, Fong J, Barrett-Connor E, Hulley SB, for the HERS Research Group. Postmenopausal Hormone Therapy and risk of stroke. *HERS. Circulation* 2001; 103: 638-42.

Skouby SO, Andersen LF. Estrógenos, gestágenos y glucosa. *Metabolismo en mujeres post-menopáusicas*. En: *Post-menopausia y enfermedad cardiovascular*. Cabero Roura A. Ed. Springer-Verlag Ibérica, Barcelona 1998. ISBN 84-07-00201-1.

Speroff L. The effect of estrogen-progestogen HRT on the cardiovascular system  
Eur Menopause Journal 1996; 3: 151-163.

Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Manson JE, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from The Nurses' Health Study. NEJM 1991; 325: 756-762.

Stampfer MJ, Colditz GA. ERT and coronary heart disease : a quantitative assessment of the epidemiologic evidence. Prev Med 1991; 20: 47-63.

Sary HC, Chandler AB, Glagov S, Guyton JR, Insull W, Rosenfeld ME, Schaffer SA, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of initial, fatty streak, and intermediate lesions of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Circulation 1994; 89: 2462-78.

Sary HC, Chandler AB, Dinsmore RE, Fuster V, Glagov S, Insull W, Rosenfeld ME, Schwartz CJ, Wagner WD, Wissler RW. A definition of advanced types of atherosclerotic lesions and a histological classification of atherosclerosis: a report from the Committee on Vascular Lesions of the Council on Arteriosclerosis, American Heart Association. Circulation 1995; 92: 1355-74.

Stary HC. The histological classification of atherosclerotic lesions in human coronary arteries. *Atherosclerosis and coronary artery disease*, edited by V. Fuster, R. Ross, and E.J. Topol. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996.

Sulistiyani SJ, Adelman A, Chandrasekaran J, Jayo J, St Clair RW. Effect of 17 alpha-dihydroequilin sulfate, a conjugated equine estrogen, and etynylestradiol on atherosclerosis in cholesterol-fed rabbits. *Arterioscler Thromb vasc Biol* 1995; 15(7): 837-46.

Sullivan JM, Van der Zwaag R, Lemp GF, Hughes JP, Maddock V, Kroetz FW, Ramanathan KB, Mirvis DM. Postmenopausal estrogen use and coronary atherosclerosis. *Ann Intern Med* 1988; 108: 358-63.

Sullivan JM, Van der Zwaag R, Hughes JP, Maddock V, Kroetz FW, Ramanathan KB, Mirvis DM. ERT and coronary artery disease-effect on survival in postmenopausal women. *Arch Intern Med* 1990; 150: 2557-62.

Sullivan JM, El-Zeky F, Van der Zwaag R, Ramanathan KB. ERT after coronary artery by-pass surgery. Effect on survival (abstract). 43<sup>rd</sup> Annual Scientific Session of the American College of Cardiology. *J Am Coll Cardiol* 1994; 1A-484<sup>a</sup>, 702-6.

Sullivan JM, El-Zeky F, Van der Zwaag R, Ramanathan KB. Effect on survival of ERT after coronary artery by-pass grafting. *Am J Cardiol* 1997; 79: 847-50.



Tang B, Markiewicz L, Kloosterboer HJ, Gurside E. Human endometrial 3-beta-hydroxysteroid dehydrogenase/isomerase can locally reduce intrinsic estrogenic/progestagenic activity ratios of a steroidal drug (Org OD 14). *J Steroid Biochem Molec Biol* 1993; 45: 345-351.

Taskinen MR. Oestrogen replacement therapy and coronary heart disease. *Ann Med* 1998; 30: 443-51.

The Postmenopausal Estrogen/Progestogen Intervention Trial (PEPI). Effects of estrogen or estrogen/progestogen regimens on heart disease risk factors in postmenopausal women. *JAMA* 1995; 273: 199-208.

The Women's Health Initiative Study Group. Design of the Women's Health Initiative clinical trial and observational study. *Control Clin Trials* 1998; 19: 61-109.

Tikkanen MJ. Mechanism of cardiovascular protection by postmenopausal hormone replacement therapy. *Cardiovascular risk factors* 1993; 3: 138-143.

Tollin C, Ericsson M, Johnson O, Backman C. Clearance of triglycerides from the circulation and its relationship to serum lipoproteins: influence of age and sex. *Scan J Clin Lab Invest* 1985; 45: 679-84.

Tonnes Pedersen A, Lidegaard O, Kreiner S, Ottesen B. HRT and risk of non-fatal stroke. *Lancet* 1997; 350: 1277-83.

Tunstall-Pedoe H. Myth and paradox of coronary risk and the menopause. *Lancet* 1998; 351: 1425-7.

Valk-de Roo GW, Stehouwer CDA, Meijer P, Mijatovic V, Kluft C, Kenemans P, Cohen F, Watts S, Netelenbos C. Both raloxifene and estrogen reduces major cardiovascular risk factors in healthy postmenopausal women. A 2-year, placebo-controlled study. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1999; 19: 2993-3000.

Verhoef P, Stampfer MJ. Prospective studies of homocysteine and cardiovascular disease. *Nutr Rev* 1995; 53: 283-8.

Wagner JD, Clarkson TB, St Clair RW, Schwenke DC, Shively CA, Adams MR. Oestrogen and progesterone replacement therapy reduces LDL accumulation in the coronary arteries of surgically postmenopausal Cynomolgus monkeys. *J Clin Invest* 1991; 88: 1995-2002.

Wagner JD, Schwenke DC, Zhang L, Applebaum-Bowden D, Bagdade JD, Adams MR. Effects of short-term HRT on LDL metabolism in cynomolgus monkeys. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 1997; 17: 1128-34.

Wagner JD. Rationale for HRT in atherosclerosis prevention. *J Reprod Med* 2000; 45: 245-58.

Walsh BW, Schiff I, Rosner B, Greenberg L, Ravnikar V, Sacks FM. Effects of postmenopausal estrogen replacement on the concentrations and metabolism of plasma lipoproteins. *NEJM* 1991, 325: 1196-1204.

Walsh BW, Kuller LH, Wild RA, Paul S, Farmer M, Lawrence JB, Shah AS, Anderson PW. Effects of raloxifene on serum lipids and coagulation factors in healthy postmenopausal women. *JAMA* 1998; 279: 1445-1451.

Walsh BW, Paul S, Wild RA, Dean RA, Tracy RP, Cox DA, Anderson PW. The effects of HRT and raloxifene on C-reactive protein and homocysteine in healthy postmenopausal women: a randomized controlled trial. *J Clin Endocrinol Metab* 2000; 85: 214-218.

Walton C, Godsland I, Proudler A, Wynn W, Stevenson JC. The effects of the menopause on insulin sensitivity, secretion and elimination in nonobese, healthy women. *Eur J Clin Invest* 1993; 23: 466-73.

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.

Westendorp ICD, Kleijn MJJ, Bots ML, Bak AAA, Planellas J, Coelingh Bennink HJT, Hofman A, Grobbee DE, Witteman JCM. The effect of HRT on arterial distensibility and compliance in perimenopausal women: a 2-year randomised trial. *Atherosclerosis* 2000; 152: 149-157.

Williams JK, Adams MR, Klopfenstein HS. Oestrogen modulates responses of atherosclerotic coronary arteries. *Circulation* 1990; 81: 1680-7.

Williams JK, Adams MR, Herrington DM, Clarkson TB. Short-term administration of estrogen and vascular responses of atherosclerotic coronary arteries. *J Am Coll Cardiol* 1992; 20: 452-7.

Williams JK, Honoré EK, Washburn SA, Clarkson TB. Effects of HRT on reactivity of atherosclerotic coronary arteries in *Cynomolgus* monkeys. *J Am Coll Cardiol* 1994; 24: 1757-61.

Williams JK, Anthony MS, Honoré EK, Herrington DM, Morgan TM, Register TC, Clarkson TB. Regression of atherosclerosis in female monkeys. *Arterioscler Thromb vasc Biol* 1995; 15: 827-36.

Wing RR, Matthews KA, Kuller LH, Meilahn EN. Weight gain at the time of menopause. *Arch Intern Med* 1991; 151(1): 97-102.

Winkler UH, Altkemper R, Kwee B, Helmond FA, Coelingh Bennink HJT. Effects of tibolone and continuous combined HRT on parameters in the clotting cascade: a multicenter, double-blind, randomized study. *Fertil Steril* 2000; 74: 10-19.

Wreng BG. Megatrials of HRT. *Drug aging* 1998; 12: 343-8.

Zandberg P, Peters JLM, Demacker PNM, Smit MJ, Reeder EG, Meuleman DG. Tibolone prevents atherosclerotic lesion formation in cholesterol-fed , ovariectomized rabbits. *Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol.* 1998; 18: 1844-1854.

Zandberg P, Peters JLM, Reeder EG, Dinther TH , Meuleman DG, Kloosterboer HJ. The atheroprotective effects of tibolone and its metabolites. Poster on 9<sup>th</sup> International Menopause Symposium 1999. Yokohama. Japan.

Zandberg P, Peters JLM, Demacker PNM, Reeder EG, Smit MJ, Meuleman DG. Comparison of the antiatherosclerotic effect of tibolone with that of estradiol and ethinyl estradiol in cholesterol-fed ovariectomized rabbits. *Menopause* 2001; 8(2): 96-105.

Zhu XD, Bonet B, Knopp RH. Estradiol 17-beta inhibition of LDL oxidation and endothelial cell cytotoxicity is opposed by progestins to different degrees. *Atherosclerosis* 2000; 148: 31-41.

Zoma W, Baber RS, Lang U, Clark KE. Hemodynamic response to tibolone in reproductive and nonreproductive tissues in the sheep. *Am J Obstet Gynecol* 2001; 184 (4): 544-51.