

NIVELES DE ESTRADIOL EN NIÑOS Y JÓVENES Y SU RELACIÓN CON GÉNERO, EDAD, PRESIÓN ARTERIAL, LÍPIDOS PLASMÁTICOS Y POLIMORFISMO *XbaI* DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS

Johanny Aguillón Osma¹
Ángela María Bedoya Blandón²
Nelsy Loango Chamorro³
Patricia Landázuri⁴

ABSTRACT

Introducción: La identificación de factores de riesgo para las enfermedades cardiovasculares (ECV) puede ayudar a prevenir su desarrollo. Las hormonas esteroides a través de sus receptores y las variaciones genéticas influyen sobre el metabolismo de los lípidos y la presión arterial, entre otras funciones. **Métodos:** Estudio descriptivo realizado en niños y adolescentes entre 8 y 18 años de edad. **Objetivo:** Determinar los niveles de estradiol y su relación con género, edad, presión arterial, lípidos plasmáticos y polimorfismo *XbaI* del receptor de estrógenos. **Resultados:** No se encontró relación estadística entre el polimorfismo *XbaI* y las concentraciones de estradiol, pero sí entre el polimorfismo y el perfil lipídico, de igual manera entre las concentraciones de esta hormona con triglicéridos y c-VLDL. **Conclusión:** Este trabajo evidencia la relación entre niveles de estrógenos, edad, presión sanguínea y lípidos plasmáticos, de igual forma demuestra una relación entre polimorfismo *XbaI* del ESR1 y los niveles de lípidos.

Key words: estrógenos, polimorfismo genético, lípidos, estradiol, presión arterial, índice de masa corporal.

ESTRADIOL LEVELS IN CHILDREN AND YOUNG ADOLESCENTS AND ITS RELATION WITH GENDER, AGE, BLOOD PRESSURE, PLASMATIC LIPIDS AND POLYMORPHISM *XbaI* OF ESTROGENS RECEPTOR

RESUMEN

Introduction: The identification of risk factors for cardiovascular diseases (CVD), can help to prevent their development. The steroid hormones, through their receptors and genetic variations, influence the lipids metabolism and blood pressure among other functions. **Methods:** a descriptive study carried out with children and adolescents between 8 and 18 years old. **Objective:** To determine levels of estradiol and its relationship with gender, age, blood pressure, plasmatic lipids and polymorphism *XbaI* of the estrogens receptor. **Results:** No statistical relationship between polymorphism *XbaI* and concentrations of estradiol was found, but it was found between polymorphism and lipid profile and, in the same way, between the concentrations of the hormone and triglycerides and VLDL-c. **Conclusion:** This work shows a relationship between estrogen levels, age, blood

¹ M MSc. Bioquímica. Programa Lic. en Biología, Facultad de Educación, Universidad del Quindío. Armenia, Colombia. E-mail: jaguillon@uniquindio.edu.co ORCID: 0000-0002-1041-1140

² Bióloga. Programa de Biología, Facultad Ciencias Básicas y Tecnológicas, Universidad del Quindío. Armenia, Colombia. E-mail: angelamariabedoya26@gmail.com ORCID: 0000-0002-9016-2454

³ PhD. Biotecnología. Programa de Biología, Facultad de Ciencias Básicas y Tecnológicas, Universidad del Quindío. Armenia, Colombia. E-mail: neloango@uniquindio.edu.co ORCID: 0000-0002-4777-3647

⁴ PhD. Bioquímica. Programa de Medicina, Facultad de Ciencias de la Salud, Universidad del Quindío. Armenia, Colombia. E-mail: plandazu@uniquindio.edu.co ORCID: 0000-0002-6893-1405

pressure and plasma lipids as well as it shows a relationship between *XbaI* polymorphism of ESR1 and lipid levels.

Palabras clave: estrogens receptor 1, genetic polymorphism, lipids, estradiol, blood pressure, body mass index (MeSH).

INTRODUCCIÓN

Las hormonas sexuales (testosterona y estradiol), en especial este último, desempeñan un papel importante en la fisiología normal y patológica del organismo humano. Hay abundante evidencia que muestra que el impacto de los estrógenos va más allá de las gónadas y se extiende a la fisiología del sistema cardiovascular, esquelético, óseo, nervioso, presión sanguínea, sistema inmune y metabolismo de los lípidos, entre otros (1-4). Es reconocido que existen diferencias de sexo en el efecto de las hormonas esteroides sobre estos y otros sistemas y que estas diferencias se manifiestan desde edades muy tempranas y se mantienen a lo largo de la vida de hombres y mujeres (1). El estradiol, el principal estrógeno, es tal vez la más potente y simple molécula en los humanos; se le ha demostrado un sinnúmero de acciones sobre casi todos los órganos y sistemas del cuerpo a través de muchas vías. Entre otras, se ha referenciado que el estradiol tiene efecto cardioprotector no solo por su acción en el metabolismo de los lípidos (5-7), sino también por su modulación sobre el endotelio (8, 9). También se ha relacionado con sistemas que regulan la presión sanguínea (10, 11). En las mujeres el efecto cardioprotector de los estrógenos y la modulación sobre la presión sanguínea, se pierde cuando se llega a la menopausia (12), donde los niveles de estradiol son muy bajos.

Los estrógenos ejercen su acción a través de dos tipos de receptores: receptores de estrógenos alfa (ESR1) y receptores de estrógenos beta (ESR2) (4, 9, 13), los cuales son traslocados al núcleo y regulan la expresión de genes blanco a través

de diversos mecanismos, llamados mecanismos genómicos, que son lentos; pero los estrógenos también pueden actuar más rápido a través de mecanismos no genómicos que involucran vías de señalización celular (14, 15). Ambos tipos de receptores tienen isoformas o polimorfismos que exhiben diferentes modelos de expresión y función en los tejidos (5). El gen receptor de estrógenos ESR1 está constituido por 140 kb de ADN, distribuidos en ocho exones que codifican para una proteína ácida de 595 aminoácidos de un peso molecular aproximado de 66 KDa (16). Varios polimorfismos de nucleótido único (SPN) han sido identificados en el ESR1, aunque el mejor caracterizado es el polimorfismo *XbaI*, el cual es identificado por la enzima de restricción *XbaI*. Este está localizado en el primer intrón del gen ESR1; el sitio de restricción involucra una transición de una A por una G en la posición 351 (17, 18).

Varios estudios han demostrado que la variación genética de los receptores de estrógenos está asociada con las enfermedades cardiovasculares en ambos sexos (3, 8, 9). Estos receptores de estrógenos pueden modular el riesgo cardiovascular indirectamente a través de las alteraciones del metabolismo de los lípidos y la glucosa (19-21), o directamente a través de sus efectos sobre el endotelio (8, 11).

Siendo que los estrógenos ejercen acciones sobre el sistema cardiovascular, se hace necesario identificar en niños y adolescentes, como estrategia de prevención, las relaciones de los niveles de esta hormona con factores como lípidos plasmáticos y presión sanguínea que predisponen al desarrollo de la enfermedad

cardiovascular (22, 23). La identificación de factores de riesgo cardiovascular en edades tempranas puede ayudar a prevenir el desarrollo de estas enfermedades en la edad adulta.

El objetivo de este estudio fue analizar en niños, niñas y adolescentes de diferentes grupos de edad, la posible relación entre los niveles plasmáticos de estradiol, la presión sanguínea, los lípidos y el polimorfismo del ESR1.

MATERIALES Y MÉTODOS

Tipo de estudio

Estudio descriptivo de corte transversal, con una muestra representativa de la población escolarizada del departamento del Quindío (escolares de 8-18 años). La selección se estableció por conglomerados de colegios públicos, mediante un muestreo aleatorio simple.

Se excluyeron del estudio los escolares que en el momento de la toma de muestra presentaron endocrinopatías o enfermedades crónicas o agudas. El consentimiento informado fue firmado por los padres o adultos responsables de los escolares. La investigación fue aprobada por el Comité de Bioética de la Universidad del Quindío.

Determinaciones bioquímicas

Las muestras de sangre se tomaron por venopunción en un tubo sin anticoagulante para la obtención del suero y un tubo con EDTA para la extracción del ADN. Los niveles de estradiol en suero se midieron con el kit Estradiol (E2) Enzyme Immunoassay Test (BioCheck). Brevemente, el ensayo se realizó en placa de 96 pozos, se adicionaron 100 µl del reactivo conjugado de estradiol-HPR en cada pozo, luego se adicionaron 50 µl de anti-estradiol (E2), se mezcló durante 30 segundos y se incubó a temperatura ambiente durante 90 minutos. Después se lavó cinco veces con agua destilada y se adicionaron 100 µl del reactivo

TMB, luego se incubó a temperatura ambiente durante 20 minutos; la reacción fue detenida adicionando 100 µl de solución Stop, para leer a 450 nm. El perfil lipídico se cuantificó por métodos enzimáticos colorimétricos estándar de la línea Sera-Pak® Plus (Bayer S.A.), siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante.

Polimorfismo *XbaI* del receptor de estrógenos

La extracción del ADN se realizó utilizando el kit Wizard Genomic DNA Purification. Siguiendo las indicaciones del fabricante. El polimorfismo *XbaI* del gen receptor de estrógenos ESR-1 fue amplificado por PCR durante 35 ciclos; utilizando las siguientes condiciones: desnaturalización a 94°C por 30 segundos, el alineamiento a 61°C por 40 segundos y la extensión a 37°C por 90 segundos (24); usando las siguientes secuencias de Primers: Forward 5'CTCTACATGTTCTAAAGAGG3' y Reward 5'CGATTATCTGAATTTGGCCTGG3'. La visualización del producto de PCR se realizó en un gel de agarosa al 2%, esperando como resultado una banda de 596 pb.

Luego, este producto de PCR fue digerido con la enzima de restricción *XbaI*. Se tomaron 5 µl del producto amplificado, se le añadieron 2 µl de buffer y 0,5 µl de la enzima de restricción *XbaI*; las muestras fueron incubadas a 37°C durante 40 minutos. Los resultados de la digestión fueron visualizados en geles de agarosa al 2%. La presencia de dos bandas con tamaños moleculares de 226 pb y 370 pb indicaba un homocigoto para el genotipo AA; la presencia de tres bandas de 226 pb, 370 pb y 596 pb indicaba un individuo heterocigoto con un genotipo AG y la presencia de una sola banda de 596 pb indicaba un individuo homocigoto para el alelo normal con un genotipo GG (24).

Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó utilizando SPSS v.18.0. Se determinó la normalidad de las variables cuantitativas mediante la prueba

de Kolmogorov-Smirnov. Para las frecuencias genotípicas del polimorfismo se realizó una prueba de Chi cuadrado. Se relacionaron las diferentes variables clínicas (perfil lipídico, presión arterial, índice de masa corporal) con los niveles de estradiol en suero y el polimorfismo *XbaI* del gen ESR-1 así como el polimorfismo *XbaI* con las concentraciones de estradiol usando la prueba de Kruskal-Wallis y correlación de Pearson, y para las variables con distribución normal se aplicó un modelo lineal general. Se asume como valor estadísticamente significativo cuando el valor $p < 0,05$.

RESULTADOS

Características generales de la población

La muestra poblacional total estudiada fue de 213 escolares, de los cuales 89 eran niños (41,8%) y 124 niñas (58,2%). En la Tabla 1 se describen las variables generales de estudio en la población, evidenciando una edad promedio de 13 años, el índice de masa corporal dentro de los rangos normales para la edad, al igual que la presión arterial. En cuanto al perfil lipídico, el colesterol total, triglicéridos, VLDL y LDL, fueron normales según los valores de referencia internacional (25), pero los valores del HDL fueron bajos.

Tabla 1. Características generales de la población de estudio

Variable	Media	I.C 95%	Rango (Min - Max)
Edad (años)	13,4	(13,03 - 13,78)	(8 - 18)
Índice de masa corporal (kg/m ²)	19,01	(18,6 - 19,6)	(11,3 - 33,65)
Presión sistólica (mmHg)	97,95	(95,96 - 99,94)	(60 - 137)
Presión diastólica (mmHg)	64,5	(62,77 - 66,22)	(40 - 128)
Colesterol (mg/dl)	150,0	(145,5 - 154,5)	(90 - 351)
Triglicéridos (mg/dl)	107,5	(98,8 - 116,03)	(28 - 410)
c-HDL (mg/dl)	36,95	(35,78 - 38,3)	(22 - 72)
c-VLDL (mg/dl)	21,36	(19,7 - 23,0)	(6 - 77)
c-LDL (mg/dl)	91,62	(83,3 - 96,1)	(12 - 298)
Niveles de estradiol (pg/ml)	89,72	(86,5 - 93,0)	(61 - 219)

Niveles de estradiol y variables bioquímicas, fisiológicas y antropométricas

Se encontraron diferencias significativas entre las concentraciones de estradiol en suero con respecto al género ($p = 0,00$), observándose concentraciones más altas de estradiol en las niñas (91,86 pg/ml) que en los niños (78,39 pg/ml).

Por otro lado, se encontró que las concentraciones de estradiol aumentan con la edad de los niños y adolescentes ($p = 0,0001$), esta diferencia es más notable entre el grupo de niños menores de 10 años y los otros dos grupos (Figura 1).

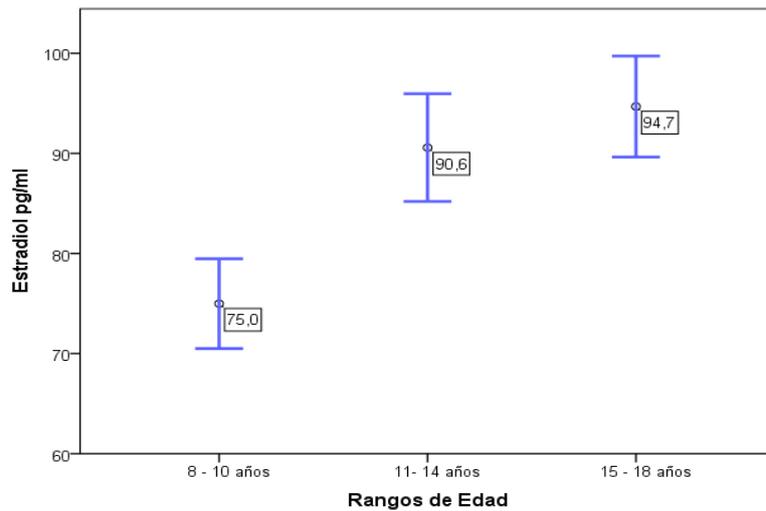


Figura 1. Relación de las concentraciones de estradiol en suero con los rangos de edades.

Con respecto a las concentraciones de estradiol en suero y los componentes del perfil lipídico, se observó una relación inversamente proporcional y estadísticamente significativa entre estradiol,

triglicéridos y el c-VLDL (Tabla 2). Sin embargo, los niveles de estradiol en suero solo explican el 5% de la variabilidad de los niveles de los triglicéridos y el c-VLDL.

Tabla 2. Relación entre las concentraciones de estradiol con el perfil lipídico y la presión arterial

Variables	Estradiol en suero	
	Tipo de relación	Valor p
Colesterol	No se evidenció	0,984
Triglicéridos	Inversa	0,002*
c-HDL	No se evidenció	0,380
c-LDL	No se evidenció	0,134
c-VLDL	Inversa	0,001*
Edad	Directa	0,0001*
Presión arterial sistólica	Directa	0,001*
Presión arterial diastólica	Directa	0,005*
IMC	Directa	0,016*

* Relación estadísticamente significativa entre las variables, con p-valor <0,05.

Por otro lado, los resultados muestran una relación directamente proporcional y estadísticamente significativa entre concentración de estradiol y la presión arterial sistólica y diastólica ($p = 0,001$

y $p = 0,005$, respectivamente); la variación en la presión arterial sistólica fue explicada solo en un 10% por la variable predictora (niveles de estradiol).

Finalmente, la relación de los niveles de estradiol con el IMC es estadísticamente significativa ($p = 0,016$), siendo esta relación directamente proporcional.

Polimorfismo *XbaI* del receptor ESR1

La Tabla 3 describe la frecuencia de cada genotipo y alelo en la población. Los datos muestran que la población no está en equilibrio Hardy-Weinberg para el polimorfismo *XbaI* del gen del ESR1, ($X^2 = 83,83$); valor que no se encuentra dentro del rango de aceptación.

Tabla 3. Distribución alélica y genotípica del polimorfismo *XbaI* del receptor ESR1 en la población

Alelos	No. de alelos	Frecuencia alélica
A	179	42%
G	247	58%
Genotipos	No. de individuos	Frecuencias genotípicas
AA	7	3,3 %
AG	164	77,0%
GG	42	19,7%
Total	213	100%

Niveles de estradiol y polimorfismo *XbaI*

Los resultados muestran que no hay relación entre niveles de estradiol y polimorfismo *XbaI*

($p = 0,97$); sin embargo, los niveles más altos de estradiol se presentaron en individuos portadores del genotipo GG (Tabla 4).

Tabla 4. Relación del polimorfismo *XbaI* con los niveles de estradiol

Genotipo	Niveles de estradiol (pg/ml)	Valor p
AA	86,6±20,7	p = 0,97
AG	89,5±22,8	
GG	90,9±29,1	

Polimorfismo *XbaI* y perfil lipídico

La Figura 2 muestra la relación entre los genotipos del polimorfismo *XbaI* del receptor ESR1 y los parámetros del perfil lipídico. Se encontraron diferencias significativas en los niveles de triglicéridos y c-VLDL con respecto a los genotipos del polimorfismo ($p = 0,016$ y $p = 0,015$, respectivamente); los individuos con genotipo AA presentaron los valores más

altos de los dos tipos de lípidos. El análisis, usando un modelo lineal generalizado para relacionar el polimorfismo *XbaI* del receptor ESR1 con cada uno de los componentes del perfil lipídico, mostró que el polimorfismo *XbaI* no afecta los niveles de c-LDL. Sin embargo, las variables como colesterol total, triglicéridos, c-HDL y c-VLDL fueron influenciadas por el polimorfismo del gen receptor de estrógenos.

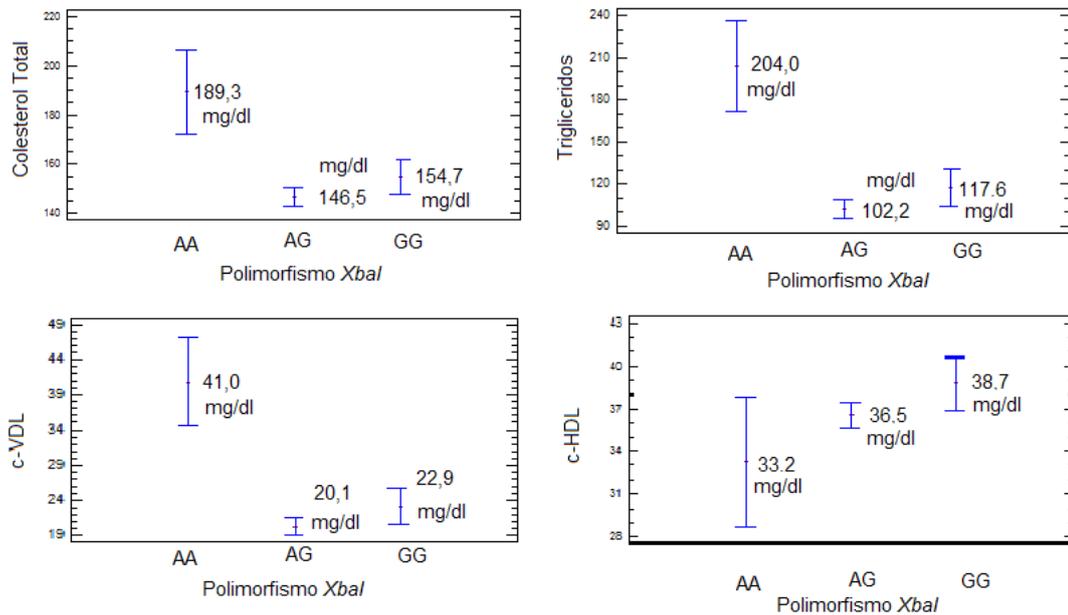


Figura 2. Relación del polimorfismo *XbaI* con los niveles de CT, triglicéridos, c-VLDL y c-HDL.

DISCUSIÓN

En este trabajo se investigaron los niveles de estradiol y su relación con el género, la edad, la presión arterial, los lípidos plasmáticos y el polimorfismo *XbaI* del gen del receptor ESR1 de estrógenos.

El presente trabajo evidenció diferencias en la concentración de estradiol por género, de manera que las niñas tenían mayores niveles de la hormona que los niños; hay evidencia de que los niveles de estradiol son muy bajos antes del inicio de la pubertad tanto en niños como en niñas, pero aún en esta etapa los niveles de esta hormona son más altos en las niñas que en los niños; en la pubertad estas diferencias se acrecientan entre ambos sexos (26-30) y permanecen hasta que la mujer alcanza la menopausia, donde los niveles de estrógenos disminuyen significativamente (31) hasta ser similares a los de los hombres.

De igual forma, en este trabajo se evidenciaron diferencias en la concentración del estradiol con la edad, aumentando significativamente a

medida que aumentaba la edad de los grupos, pero siendo menor la diferencia entre los grupos de 11-14 y 15-18 años, edad en la que se ha alcanzado y pasado la pubertad (28, 32). Estos datos también confirman resultados previos que describen un aumento de estradiol con la edad hasta alcanzar sus niveles de adulto en la preadolescencia y adolescencia (26), para volver a cambiar en la mujer en la menopausia (29, 31), donde los niveles de estradiol disminuyen hasta alcanzar valores muy similares a los niveles en hombres (31). Se conoce que los estrógenos a través de sus receptores ejercen efectos importantes en los órganos reproductivos y en otros órganos y sistemas en hombres y mujeres (1); los niveles de estrógenos en sangre son responsables de la mayoría de las diferencias de género, especialmente en embriogénesis (33), pubertad y adolescencia (28), de allí que los niveles plasmáticos de estrógenos estén relacionados con el ciclo vital de humanos y mamíferos (26, 27, 29).

Esta investigación también encontró una relación directa entre niveles de estrógenos y presión arterial sistólica y diastólica. En un trabajo

anterior Landázuri et al. (34) habían descrito un aumento de la presión sistólica y diastólica con la edad en niños, niñas y adolescentes de los mismos rangos de edad, que los del presente estudio; sin embargo, en ese trabajo no se midieron los estrógenos, pero podría asumirse que si los estrógenos aumentan con la edad (presente trabajo) y la presión aumenta con la edad (34), exista una relación directa entre estrógenos, edad y presión. Así se conoce que hombres y mujeres comienzan la pubertad entre 9 y 12 años (32, 35) y que este periodo está acompañado por un incremento en las hormonas sexuales, testosterona en hombres y estradiol en mujeres (32), estas hormonas influyen sobre diversos sistemas que regulan presión arterial como el sistema renina angiotensina aldosterona (23, 36), y la osmolaridad, entre otros (37); además los estrógenos ejercen efectos directos sobre las células vasculares del músculo liso, también inhiben la proliferación celular e inducen la vasodilatación mediante la regulación de la permeabilidad iónica de la membrana y la modulación de factores de relajación derivados del endotelio (10, 11). Se han identificado receptores de estrógenos funcionales en células de músculo liso vascular y también se han demostrado sitios específicos de unión de estrógenos en el endotelio (5); por tal motivo, no es sorprendente que en este trabajo se encontrara una relación directa entre estrógenos y presión arterial sistólica y diastólica.

Este trabajo también muestra una relación de los niveles de estrógenos con los triglicéridos y las VLDL, una lipoproteína rica en triglicéridos. Aquí, se observó que los individuos con concentraciones altas de estradiol mostraban concentraciones bajas de triglicéridos y c-VLDL. Evidencia científica muestra que los estrógenos tienen una amplia variedad de efectos sobre el perfil de lípidos en hombres y mujeres (19, 21), y se describen cambios significativos en los niveles de lípidos en suero y de lipoproteínas durante la pubertad (38-41).

Al respecto de niveles de estradiol y lípidos en adultos, Brynhildsen y Hammar (19) demostraron

que en mujeres que tomaban una combinación de estradiol/noretisterona, después de 24 semanas, el CT, la lipoproteína a, Lp(a) y c-VLDL disminuyeron significativamente, más que en las que tomaban placebo. Similar a lo encontrado en el presente estudio, excepto por la Lp(a) que no fue medida. Por otro lado, se conoce que un papel importante de los estrógenos, tanto endógenos como exógenos es elevar las concentraciones de c-HDL y disminuir las concentraciones de c-LDL (42, 43), a través de un mecanismo que aumenta, por un lado, la captación de LDL (43) y por otro lado el ARN mensajero de los receptores de c-LDL (42-44), aunque en el presente trabajo no se evidenció efecto sobre c-HDL y c-LDL. Sin embargo, es de anotar que los estudios anteriormente descritos se han hecho sobre población adulta con enfermedad o cambios hormonales y que la relación entre hormonas esteroides y el metabolismo lipídico en niños y adolescentes puede ser diferente, como lo demostró un estudio reciente (45) en el que se encontró que el número y tamaño de las lipoproteínas están más fuertemente relacionados con la estructura y la función vascular que los lípidos tradicionales en adolescentes que en adultos, y su medición puede ser mejor predictor de riesgo cardiovascular en adolescentes que en adultos.

Por otro lado, en este trabajo también se evaluó el efecto del polimorfismo del receptor de estrógenos sobre los lípidos plasmáticos, pues hay controversia sobre esta influencia; así, varios estudios han mostrado una relación entre los polimorfismos *XbaI* y *PvuII* y los lípidos plasmáticos, y otros no (5, 17, 46, 47). En el presente estudio se encontró relación entre el polimorfismo y los triglicéridos y el c-VLDL. Al respecto, la evidencia muestra que el efecto de las mutaciones en los receptores depende de los grupos étnicos, la edad y el género. En un estudio multiétnico/multirracial de mujeres caucásicas de edad media en Estados Unidos, no se encontró asociación entre ESR1 y niveles de lípidos (48). Mientras en un estudio con mujeres chinas se encontró asociación entre los

polimorfismos *XbaI* y *PvuII* con CT y c-LDL (49). Aunque el presente estudio no mostró una relación entre los niveles de estradiol y el polimorfismo, similar a lo reportado en otros estudios de poblaciones brasileras (50) y chinas (51), sí se evidenció una relación inversa entre los niveles de estradiol, los triglicéridos y c-VLDL, y de estos dos últimos con el polimorfismo del receptor. Si bien es posible que las mutaciones en el receptor no modifiquen los niveles de estrógenos, pues estos dependen de su síntesis y metabolismo, sí es posible que el polimorfismo del receptor modifique los niveles de lípidos a través de mecanismos en las vías de señalización, que modifican la transcripción de enzimas y proteínas que median el metabolismo de las lipoproteínas (38, 44).

Este estudio presenta varias limitaciones, una de ellas es que no tuvo en cuenta las variaciones de estradiol con el ciclo hormonal en las niñas, principalmente en aquellas de los dos últimos grupos (10-14 y 15-18 años). Otra limitación es la

conocida influencia sobre los niveles endógenos de hormonas sexuales que tienen factores exógenos como pubertad precoz, o disruptores endocrinos presentes en la dieta diaria (32), que tampoco fueron considerados en este trabajo.

En conclusión, este trabajo evidencia la relación entre niveles de estrógenos, edad, presión sanguínea y lípidos plasmáticos, de igual forma demuestra una relación entre el polimorfismo *XbaI* del ESR1 y los niveles de lípidos. Aunque se requieren más estudios para evidenciar los mecanismos que expliquen estas relaciones.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener ningún conflicto de interés relacionado con este artículo.

FINANCIACIÓN

Este trabajo fue financiado por la Universidad del Quindío.

REFERENCIAS

1. Simpson E, Santen RJ. Celebrating 75 years of oestradiol. *J Mol Endocrinol*. 2015;55(3):T1-T20. doi: 10.1530/JME-15-0128.
2. Xu B, Lovre D, Mauvais-Jarvis F. Effect of selective estrogen receptor modulators on metabolic homeostasis. *Biochimie*. 2016;124:92-97. doi: 10.1016/j.biochi.2015.06.018.
3. Del Principe D, Ruggieri A, Pietraforte D, Villani A, Vitale C, Straface C, et al. The relevance of estrogen/estrogen receptor system on the gender difference in cardiovascular risk. *Int J Cardiol*. 2015;187:291-298. doi: 10.1016/j.ijcard.2015.03.145.
4. Khalid AB, Krum SA. Estrogen receptors alpha and beta in bone. *Bone*. 2016;87:130-135. doi: 10.1016/j.bone.2016.03.016.
5. Efstathiadou ZA, Sakka C, Polyzos SA, Goutou M, Stakias N, Bargiota A, et al. Associations of estrogen receptor alpha and Beta gene polymorphisms with lipid levels and insulin resistance in men. *Metabolism*. 2015;64(5):611-617. doi: 10.1016/j.metabol.2015.01.006.
6. Boroumand M, Ghaedi M, Mohammadtaghvaei N, Pourgholi L, Anvari MS, Davoodi G, et al. Lipid profile and inflammatory markers associated with estrogen receptor alpha PvuII and XbaI gene polymorphisms. *Transl Res*. 2009;153(6):288-295. doi: 10.1016/j.trsl.2009.02.006.
7. Tomaszewski M, Charchar FJ, Maric C, Kuzniewicz R, Gola M, Grzeszczak W, et al. Association between lipid profile and circulating concentrations of estrogens in young men. *Atherosclerosis*. 2009;203(1):257-262. doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2008.06.002.
8. Chakrabarti S, Morton JS, Davidge ST. Mechanisms of estrogen effects on the endothelium: an overview. *Can J Cardiol*. 2014;30(7):705-712. doi: 10.1016/j.cjca.2013.08.006.
9. Muka T, Vargas KG, Jaspers L, Wen KX, Dhana K, Vitezova A, et al. Estrogen receptor β actions in the female cardiovascular system: A systematic review of animal and human studies. *Maturitas*. 2016;86:28-43. doi: 10.1016/j.maturitas.2016.01.009.
10. Tarhouni K, Guihot AL, Vessieres E, Procaccio V, Grimaud L, Abraham P, et al. Estrogens are needed for the improvement in endothelium-mediated dilation induced by a chronic increase in blood flow in rat mesenteric arteries. *Vascul Pharmacol*. 2016;80:35-42. doi: 10.1016/j.vph.2015.10.004.
11. Kong BWC, Vanhoutte PM, Man RYK, Leung SWS. 17β -estradiol potentiates endothelium-dependent nitric oxide- and hyperpolarization-mediated relaxations in blood vessels of male but not female apolipoprotein-E deficient mice. *Vascul Pharmacol*. 2015;71:166-173. doi: 10.1016/j.vph.2015.02.009.
12. Oliveras A, Sans-Atxer L, Vázquez S. [Is blood pressure control different in women than in men?]. *Hipertens y riesgo Vasc*. 2015;32(4):151-158. doi: 10.1016/j.hipert.2015.08.001.
13. Hewitt SC, Winuthayanon W, Korach KS. What's new in estrogen receptor action in the female reproductive tract. *J Mol Endocrinol*. 2016;56(2):R55-R71. doi: 10.1530/JME-15-0254.
14. Ervin KSJ, Phan A, Gabor CS, Choleris E. Rapid oestrogenic regulation of social and nonsocial learning. *J Neuroendocrinol*. 2013;25(11):1116-1132. doi: 10.1111/jne.12079.
15. Frick KM. Molecular mechanisms underlying the memory-enhancing effects of estradiol. *Horm Behav*. 2015;74:4-18. doi: 10.1016/j.yhbeh.2015.05.001.
16. Welboren WJ, Sweep FCGJ, Span PN, Stunnenberg HG. Genomic actions of estrogen receptor alpha: what are the targets and how are they regulated? *Endocr Relat Cancer*. 2009;16(4):1073-1089. doi: 10.1677/ERC-09-0086.
17. Silva FS, Sóter MO, Sales MF, Candido AL, Reis FM, Silva IF, et al. Estrogen receptor alpha gene (ESR1) PvuII and XbaI polymorphisms are associated to metabolic and proinflammatory factors in polycystic ovary syndrome. *Gene*. 2015;560(1):44-49. doi: 10.1016/j.gene.2015.01.037.
18. Araújo KL, Cunha L, Soncini L, Dalmashio R, Pirola K, Ferreira M, et al. Prevalence of Estrogen Receptor Alpha PvuII (c454- 397T > C) and XbaI (c454A > G) Polymorphisms in a Population of Brazilian Women. *Braz Arch Biol Technol*. 2011;54(6):1151-1157.

19. Brynhildsen J, Hammar M. Lipids and clotting factors during low dose transdermal estradiol/norethisterone use. *Maturitas*. 2005;50(4):344-352. doi: 10.1016/j.maturitas.2004.10.001.
20. Skouby SO, Endrikat J, Düsterberg B, Schmidt W, Gerlinger C, Wessel J, et al. A 1-year randomized study to evaluate the effects of a dose reduction in oral contraceptives on lipids and carbohydrate metabolism: 20 microg ethinyl estradiol combined with 100 microg levonorgestrel. *Contraception*. 2005;71(2):111-117. doi: 10.1016/j.contraception.2004.08.017.
21. Golden SH, Kim C, Barrett-Connor E, Nan B, Kong S, Goldberg R. The association of elective hormone therapy with changes in lipids among glucose intolerant postmenopausal women in the diabetes prevention program. *Metabolism*. 2013;62(9):1313-1322. doi: 10.1016/j.metabol.2013.04.005.
22. Dai W, Ming W, Li Y, Zheng HY, Wei CD, Rui Z, et al. Synergistic Effect of a Physiological Ratio of Estradiol and Testosterone in the Treatment of Early-stage Atherosclerosis. *Arch Med Res*. 2015;46(8):619-629. doi: 10.1016/j.arcmed.2015.11.003.
23. Almeida-Pereira G, Coletti R, Mecawi AS, Reis LC, Elias LLK, Antunes-Rodrigues J. Estradiol and angiotensin II crosstalk in hydromineral balance: Role of the ERK1/2 and JNK signaling pathways. *Neuroscience*. 2016;322:525-538. doi: 10.1016/j.neuroscience.2016.02.067.
24. Rokach A, Pollak A, Rosen L, Friedlander Y, Blumenfeld A, Reznik L, et al. Estrogen receptor alpha gene polymorphisms are associated with the angiographic extent of coronary artery disease. *J Clin Endocrinol Metab*. 2005;90(12):6556-6560. doi: 10.1210/jc.2005-0236.
25. Rubio M, Moreno C, Cabrerizo L. Guías para el tratamiento de las dislipemias en el adulto: Adult Treatment Panel III (ATP-III). *Endocrinol y Nutr*. 2004;51(05):254-266. doi: 10.1016/S1575-0922(04)74614-8.
26. Paris F, Servant N, Térouanne B, Balaguer P, Nicolas JC, Sultan C. A new recombinant cell bioassay for ultrasensitive determination of serum estrogenic bioactivity in children. *J Clin Endocrinol Metab*. 2002;87(2):791-797. doi: 10.1210/jc.87.2.791.
27. Aksglaede L, Juul A, Leffers H, Skakkebaek NE, Andersson AM. The sensitivity of the child to sex steroids: Possible impact of exogenous estrogens. *Hum Reprod Update*. 2006;12(4):341-349. doi: 10.1093/humupd/dml018.
28. Abd El-Meseeh NA, El-Shaarawy EAA, AlDomairy AF, Sehly RAA. Changes in rat testis morphology and androgen receptor expression around the age of puberty. *Ann Anat*. 2016;205:37-44. doi: 10.1016/j.aanat.2016.01.003.
29. Larmore KA, O'Connor D, Sherman TI, Funanage VL, Hassink SG, Klein KO. Leptin and estradiol as related to change in pubertal status and body weight. *Med Sci Monit*. 2002;8(3):CR206-CR210. doi: 2292 [pii].
30. Klein KO, Baron J, Colli MJ, McDonnell DP, Cutler GB. Estrogen Levels in Childhood Determined by an Ultrasensitive Recombinant Cell Bioassay. 1994;94(6):2475-2480.
31. Hall JE. Endocrinology of the Menopause. *Endocrinol Metab Clin North Am*. 2015;44(3):485-496. doi: 10.1016/j.ecl.2015.05.010.
32. Buck Louis GM, Gray LE, Marcus M, Ojeda SR, Pescovitz OH, Witchel SF, et al. Environmental Factors and Puberty Timing: Expert Panel Research Needs. *Pediatrics*. 2008;121(Suppl 3):S192-S207. doi: 10.1542/peds.1813E.
33. Atwood CS, Meethal SV. The spatiotemporal hormonal orchestration of human folliculogenesis, early embryogenesis and blastocyst implantation. *Mol Cell Endocrinol*. 2016;430:33-48. doi: 10.1016/j.mce.2016.03.039.
34. Landázuri P, Granobles C, Loango N. Gender Differences in Serum Angiotensin-Converting Enzyme Activity and Blood Pressure in Children: an Observational Study. *Arq Bras Cardiol*. 2008;6(91):352-357.
35. Gaete X, Codner E. Adelanto de la pubertad en Chile y el mundo. *Rev Chil pediatría*. 2006;77(5):456-465. doi: 10.4067/S0370-41062006000500002.
36. Mompeón A, Lázaro-Franco M, Bueno-Betí C, Pérez-Cremades D, Vidal-Gómez X, Monsalve E, et al.

- Estradiol, acting through ER α , induces endothelial non-classic renin-angiotensin system increasing angiotensin 1-7 production. *Mol Cell Endocrinol*. 2016;422:1-8. doi: 10.1016/j.mce.2015.11.004.
37. Curtis KS. Estradiol and osmolality: Behavioral responses and central pathways. *Physiol Behav*. 2015;152(Pt B):422-430. doi: 10.1016/j.physbeh.2015.06.017.
 38. Kamper M, Manns CC, Plieschnig JA, Schneider WJ, Ivessa NE, Hermann M. Estrogen enhances secretion of apolipoprotein B-100 containing lipoproteins by BeWo cells. *Biochimie*. 2015;112:121-128. doi: 10.1016/j.biochi.2015.03.002.
 39. Palmeira AC, Leal AA de F, Ramos N de MN, Neto J de AF, Simoes MO da S, Medeiros CCM. Lipoprotein (a) and cardiovascular risk factors in children and adolescents. *Rev Paul Pediatr*. 2013;31(4):531-537. doi: 10.1590/S0103-05822013000400017.
 40. Ohta T, Hattori S, Murakami M, Nishiyama S, Matsuda I. Age- and Sex-related Differences in Lipoproteins Containing Apoprotein A-I. *Arteriosclerosis Thromb Vasc Biol*. 1989;9:90-95. doi: 10.1161/01.ATV.9.1.90.
 41. Pelegrini A, Glaner MF, Petroski EL. Association between anthropometric indicators and serum lipid profile in adolescents. *Hum Mov*. 2012;13(3):242-246. doi: 10.2478/v10038-012-0028-z.
 42. Persson L, Henriksson P, Westerlund E, Hovatta O, Angelin B, Rudling M. Endogenous estrogens lower plasma PCSK9 and LDL cholesterol but not Lp(a) or bile acid synthesis in women. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2012;32(3):810-814. doi: 10.1161/ATVBAHA.111.242461.
 43. Hussain Y, Ding Q, Connelly PW, Brunt JH, Ban MR, McIntyre AD, et al. G-protein estrogen receptor as a regulator of low-density lipoprotein cholesterol metabolism: Cellular and population genetic studies. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2015;35(1):213-221. doi: 10.1161/ATVBAHA.114.304326.
 44. Simoncini T, Mannella P, Fornari L, Caruso A, Willis MY, Garibaldi S, et al. Differential signal transduction of progesterone and medroxyprogesterone acetate in human endothelial cells. *Endocrinology*. 2004;145(12):5745-5756. doi: 10.1210/en.2004-0510.
 45. Urbina EM, McCoy CE, Gao Z, Khoury PR, Shah AS, Dolan LM, et al. Lipoprotein particle number and size predict vascular structure and function better than traditional lipids in adolescents and young adults. *J Clin Lipidol*. 2017;11(4):1023-31. doi: 10.1016/j.jacl.2017.05.011.
 46. Zavrtnik A, Prezelj J, Kocijancic A, Marc J. Exonic, but not intronic polymorphisms of ESR1 gene might influence the hypolipemic effect of raloxifene. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2007;104(1-2):22-26. doi: 10.1016/j.jsbmb.2006.10.009.
 47. Almeida S, Fiegenbaum M, de Andrade FM, Osório-Wender MC, Hutz MH. ESR1 and APOE gene polymorphisms, serum lipids, and hormonal replacement therapy. *Maturitas*. 2006;54(2):119-126. doi: 10.1016/j.maturitas.2005.09.009.
 48. Klos KLE, Boerwinkle E, Ferrell RE, Turner ST, Morrison AC. ESR1 polymorphism is associated with plasma lipid and apolipoprotein levels in Caucasians of the Rochester Family Heart Study. *J Lipid Res*. 2008;49:1701-1706. doi: 10.1194/jlr.M700490-JLR2
 49. Sowers MR, Symons JP, Jannausch ML, Chu J, Kardia SR. Sex steroid hormone polymorphisms, high-density lipoprotein cholesterol, and apolipoprotein A-1 from the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN). *Am J Med*. 2006;119(9 Suppl 1):S61-S68. doi: 10.1016/j.amjmed.2006.07.008.
 50. De Mattos CS, Trevisan CM, Peluso C, Adami F, Cordts EB, Christofolini DM, et al. ESR1 and ESR2 gene polymorphisms are associated with human reproduction outcomes in Brazilian women. *J Ovarian Res*. 2014;7:114. doi: 10.1186/s13048-014-0114-2.
 51. Zhou GY, Ren LI, Hou JX, Cui LX, Ding Z, Cheng XM, et al. Endemic fluorosis in Henan province, China: ER α gene polymorphisms and reproductive hormones among women. *Asia Pac J Clin Nutr*. 2016;25(4):911-9. doi: 10.6133/apjcn.062016.01.