



UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS Y FARMACÉUTICAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA FARMACOLÓGICA Y TOXICOLÓGICA
LABORATORIO DE ENDOCRINOLOGÍA EXPERIMENTAL Y PATOLOGÍA AMBIENTAL
PROGRAMA DE FISIOPATOLOGÍA. FACULTAD DE MEDICINA.

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ESTROGÉNICA DE UN EXTRACTO DE PLANTA MEDICINAL ENDÉMICA EN ÚTERO DE RATA PRE-PÚBER Y DE SU TOXICIDAD ORAL AGUDA EN RATAS ADULTAS

Profesor Patrocinante
QF. Igor Lemus G.
Departamento de Química
Farmacológica y Toxicológica
Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas
Universidad de Chile

Directores de Memoria
MCs. Leonardo Gaete G.
Dr. Rodrigo Bustamante V.
Programa de Fisiopatología
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

Memoria para optar al Título de Químico Farmacéutico

VALERIA DENISSE MEDINA GALLEGUILLOS

Santiago de Chile

2010

DEDICATORIA

Dedicado con mucho amor a toda mi familia, especialmente a mi abuelo Ricardo Godoy y a mi madre Virginia Galleguillos, quienes, cada uno en su momento y a su manera forjaron lo que hoy soy.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco principalmente a mi familia, quienes siempre me apoyaron incondicionalmente durante este largo camino. También hago presente la gratitud hacia mis queridos directores de memoria MCs. Leonardo Gaete y Dr. Rodrigo Bustamante, los que junto a mi profesor patrocinante Q.F. Igor Lemus, confiaron en mí y me guiaron durante este proceso. No puedo olvidar a mis compañeros de memoria y el personal del LEEPA con quienes se volvió muy grata mi tarea. Por último imposible dejar de nombrar a los amigos de la vida, quienes se han convertido en mi familia y me han apoyado con el mismo cariño.

Doy las gracias también al Dr. Andrei Tchernitchin por permitirme desarrollar esta memoria al alero de su proyecto.

Esta investigación se realizó gracias al financiamiento del Proyecto Anillo ACT/07, de Conicyt, Chile.

TABLA DE CONTENIDO

| | |
|---|------------|
| PORTADA | I |
| DEDICATORIA | II |
| AGRADECIMIENTOS | III |
| TABLA DE CONTENIDO | IV |
| ABREVIATURAS | V |
| RESUMEN | VII |
| ABSTRACT | IX |
| I. INTRODUCCIÓN | 1 |
| Hipótesis..... | 23 |
| Objetivos | 23 |
| 1. Generales..... | 23 |
| 2. Específicos..... | 23 |
| II. MATERIALES Y MÉTODOS | 24 |
| Métodos..... | 24 |
| 1. Evaluación estrogénica..... | 25 |
| 2. Evaluación Toxicológica | 29 |
| 3. Caracterización química del extracto 185a y de la fracción 185a..... | 31 |
| Análisis estadístico. | 32 |
| III. RESULTADOS | 33 |
| Evaluación Estrogénica Fracción 185a4 | 33 |
| Evaluación toxicológica del extracto 185a..... | 38 |
| Caracterización del extracto 185a..... | 39 |
| III. DISCUSIÓN | 42 |
| V. CONCLUSIONES | 46 |
| VI. REFERENCIAS | 47 |

TABLA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| FIGURA 1. ESTRÓGENOS ENDÓGENOS..... | 2 |
| FIGURA 2. BIOSÍNTESIS DE HORMONAS ESTEROIDALES. | 5 |
| FIGURA 3. ORGANIZACIÓN ESTRUCTURAL DE LOS RE NUCLEARES..... | 8 |
| FIGURA 4. VÍA DE SEÑALIZACIÓN GENÓMICA | 10 |
| FIGURA 5. VÍA DE SEÑALIZACIÓN NO GENÓMICA | 11 |
| FIGURA 6. COMPARACIÓN ESTRUCTURAL ENTRE 17-B ESTRADIOL Y EQUOL..... | 13 |
| FIGURA 7. CLASIFICACIÓN DE LOS FITOESTRÓGENOS | 14 |
| FIGURA 8. ESTRUCTURAS DE LOS PRINCIPALES FITOESTRÓGENOS | 14 |
| FIGURA 9. GENISTEÍNA (AGLICONA) Y GENISTINA (GLICONA)..... | 16 |
| FIGURA 10. BIOTRANSFORMACIÓN DE GLUCÓSIDOS Y PRECURSORES..... | 18 |
| FIGURA 11. TRIADAS DE CORTES DE CUERNOS UTERINOS DE RATA. | 27 |
| FIGURA 12. EOSINOFILIA UTERINA..... | 33 |
| FIGURA 13. EDEMA ESTROMA SUPERFICIAL | 34 |
| FIGURA 14. EDEMA ESTROMA PROFUNDO. | 35 |
| FIGURA 15. HIPERTROFIA MIOMETRIO CIRCULAR. | 36 |
| FIGURA 16. MITOSIS TOTAL..... | 37 |
| FIGURA 17. EVOLUCIÓN PESO CORPORAL..... | 38 |
| FIGURA 18. HPLC DE LA FRACCIÓN 185A4..... | 41 |
| FIGURA 19. PATRONES HPLC..... | 41 |

TABLA DE TABLAS

| | |
|---|----|
| TABLA 1. ALIMENTOS QUE CONTIENEN FITOESTRÓGENOS. | 15 |
| TABLA 2. ESQUEMA DE TRATAMIENTO | 25 |
| TABLA 3. GRADIENTE DE ELUCIÓN..... | 31 |
| TABLA 4. REVELADORES SEGÚN SUSTANCIA PATRÓN..... | 32 |
| TABLA 5. RESULTADO ANÁLISIS HISTOPATOLÓGICO..... | 38 |
| TABLA 6. RESUMEN RESULTADOS CCF. | 39 |
| TABLA 7. ANÁLISIS ESTEROLES..... | 39 |
| TABLA 8. ANÁLISIS FLAVONOIDES..... | 40 |

ABREVIATURAS

| | |
|-------------|--|
| Aá | Amino ácido |
| CCF | Cromatografía en Capa Fina |
| E1 | Estrona |
| E2 | 17 β -estradiol |
| E3 | Estriol |
| ECV | Enfermedad cardio-vascular |
| EG | Epitelio Glandular |
| EL | Epitelio Luminal |
| ERE | Elementos de respuesta estrogénica |
| FE | Fitoestrógeno |
| HDL | Lipoproteína de alta densidad |
| HPLC | High Performance Liquid Chromatography |
| LBD | Ligand-binding domain |
| LDL | Lipoproteína de baja densidad |
| LEEPA | Laboratorio de Endocrinología Experimental y Patología Ambiental |
| MC | Miometrio Circular |
| NADPH | Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reducido |
| OECD/OCDE | Organization for Economic Cooperation and Development |
| PBS | Solución buffer-fosfato |
| RE | Receptor estrogénico |
| Re α | Receptor estrogénico α |
| Re β | Receptor estrogénico β |
| s.c. | Subcutánea |
| SERMs | Moduladores selectivos del receptor estrogénico |
| SHBG | Sex hormone binding globuling |
| THR | Terapia de reemplazo hormonal |
| UDPGT | Uridina difosfato Glucuroniltransferasa |

Resumen

La administración de 17- β estradiol (E2) vía subcutánea desencadena una serie de conocidas respuestas estrogénicas a nivel uterino, clasificadas como tempranas y tardías. Estas respuestas también han sido observadas tras la administración de ciertos compuestos polifenólicos, conocidos como fitoestrógenos (FE), los cuales pueden actuar como agonistas, antagonistas o moduladores selectivos de receptores estrogénicos. Los FE se encuentran en grandes cantidades en especies vegetales como *Glicine max* (poroto de soja) y trébol rojo.

Por otra parte, muchas especies vegetales de nuestro país han sido usadas durante siglos por los pueblos originarios de Chile con propósitos medicinales. Por lo anterior, el análisis de estas plantas y de sus componentes, es una estrategia atractiva en la búsqueda de nuevos principios activos.

Una planta del sur de nuestro país fue seleccionada debido a los antecedentes de su uso folklórico en la interrupción del embarazo o como reguladora del ciclo menstrual (emenagogo), siendo ambos efectos estrogénicos alcanzados a diferentes dosis. Se obtuvo un extracto etanólico de esta planta y cuatro fracciones utilizando solventes de distintas polaridades. Una de esas fracciones fue escogida debido a su gran actividad en estudios preliminares y se designó como la fracción polar 185a4.

La fracción 185a4 fue usada para llevar a cabo varios estudios *in vivo* en útero de rata pre-púber, en los cuales se evaluaron respuestas estrogénicas tempranas, tales como edema y eosinofilia. Se dispuso cuatro grupos de ratas (n=20) de 21 días de edad, que recibieron uno de los siguientes tratamientos vía sc.: 1.- vehículo (control negativo); 2.- estradiol 300 μ g/k de peso (control positivo); 3.- fracción 185a4; 4.- fracción 185a4 seguido una hora más tarde de E2; Se analizaron las respuestas a 6 y 24 horas post tratamiento.

A 24 horas de administrada la fracción, se observó la presencia de edema y eosinofilia en el tejido uterino. Además, se observó un efecto antagonista en ambas respuestas a las 6 h. y sinergia en la respuesta edematosa a las 24 h. post administración del tratamiento combinado.

También se evaluaron respuestas estrogénicas tardías, tales como mitosis e hipertrofia celular. No se observó hipertrofia como efecto de la fracción, pero se evidenció un significativo aumento de las mitosis en ambos tiempos, siendo la respuesta mitótica a 24 h. significativamente menor a la inducida por E2. No se observaron efectos

antagónicos sobre ambas respuestas a 6 ni a 24 h tras la administración del tratamiento combinado.

Adicionalmente se realizó la caracterización química del extracto 185a. De acuerdo con nuestros resultados, la presencia de FE incluyendo genisteína, daidzeína, biochanina A y formononetina fue descartada; Por el contrario, la presencia de kaempferol y apigenina fue confirmada. Finalmente, se realizó un test toxicológico en ratas adultas usando una dosis oral aguda de 5g/kg de peso corporal de rata. Durante el período de observación (14 días) posterior a la administración del extracto no se identificaron signos de toxicidad como pérdida de peso corporal, diarrea, irritación de las mucosas o hemorragias. Los análisis histopatológicos de hígado, riñón y cerebro confirmaron que el extracto de la planta no presenta efectos tóxicos a las dosis ensayadas.

Dado lo anterior, podemos inferir que el extracto 185a4 posee actividad estrogénica, la que se expresa a través de las respuestas antes descritas para E2 y que su dosis tóxica en ratas es superior a 5g/kg de peso corporal.

ABSTRACT

ESTROGENIC ACTIVITY EVALUATION OF AN ENDEMIC MEDICINAL PLANT EXTRACT IN PRE-PUBERAL RAT UTERUS AND ITS ACUTE ORAL TOXICITY IN ADULT RATS.

The administration of 17- β estradiol (E2) subcutaneously triggers a series of well known estrogenic responses both early and late in the uterus. Such responses have also been observed after administration of certain polyphenolic compounds known as phytoestrogens (PE), which can act as agonists, antagonists or as selective estrogen receptor modulators (SERMS). PE are founded in large quantities in plant products such as *Glycine max* (soybean) and *red clover*. Due to the above, the analysis of plant species from our country, many of which have been used for centuries for medicinal purposes by native people of Chile, is an attractive strategy to search new drugs.

A plant from the south of our country was selected because of the history of its folk use to induce abortion or as menstrual cycle regulator (emmenagogue), being both effects attributed to estrogen at different doses. An ethanolic plant extract was obtained and furthermore, four fractions with different solvent polarities were obtained. One of these fractions was chosen because of its greater activity in preliminary studies and was labeled as the polar fraction 185a4.

Fraction 185a4 was used to perform several *in vivo* studies in pre-puberal rat uterus, where early estrogenic responses, like eosinophilia and edema were evaluated:

Twenty rats 21 years old were randomly assigned to one of the four treatment groups:

1.- Vehicle (negative control); 2.-E2 (300 μ g/k) positive control); 3.- 185a4 fraction; 4.- 185a4 fraction and one hour after, E2; All treatments were administered sc. Responses were evaluated at 6 and 24 hours after treatment administration.

A significant eosinophilia and edema were observed only at 24 hours after fraction administration. An antagonistic effect in both responses at 6 hours and a synergistic response only for edema at 24 hours were detected after combined treatment administration.

Late estrogenic responses were also evaluated, like uterine mitosis and cell hypertrophy. No effect of the fraction over cell hypertrophy but a significant mitotic effect were observed at both times, being the mitotic response at 24 hours lower than E2 induced. No antagonistic effects over both responses were observed at 6 or 24 hours after combined treatment administration.

Further, a chemical characterization of the 185a extract was performed. According to our results, the presence of PE including genistein, daidzein, biochanin A and formononetin was discarded; by contrary, the presence of kaempferol and apigenin was confirmed.

Finally, a toxicity test in adult rats was carried out using a 5g/kg of body weight as acute oral dose. No toxicity signs such as loose of body weight, diarrhea, mucose irritation or bleeding were detected during the observation period (14 days) after extract administration. Histopathological analysis of liver, kidney and brain confirmed that plant extract has no toxic effect at the assayed dose.

We concluded that fraction 185a4 exert estrogenic activity in pre-puberal rat uterus such as eosinophilia, edema and induces uterine mitose, all responses attributed to E2 and the extract is not toxic at dose of 5 g/kg body weight of rats.

I. INTRODUCCIÓN

En nuestro país encontramos una gran variedad de especies vegetales endémicas que son utilizadas por nuestras etnias originarias con fines curativos. Es por eso nuestro interés acerca del uso de muchas de estas especies para tratar o prevenir enfermedades que involucren respuestas estrogénicas (generalmente ginecológicas). Es conocida la existencia de especies ricas en fitoestrógenos (FE) como la soja y el trébol rojo, las que ya están siendo estudiadas para ser empleadas en la prevención de algunas enfermedades asociadas al déficit hormonal secundario al climaterio como son la osteoporosis, enfermedades cardiovasculares, algunos tipos de cáncer y en el control de síntomas típicos del climaterio [1].

Las primeras evidencias del uso de extractos de plantas que exhibían actividad estrogénica datan del año 1926 [2], pero es en la década de los cuarenta donde toman gran importancia biológica y económica debido a la conocida ``clover disease`` (enfermedad del trébol) la que quedó en evidencia al observar los trastornos en la fertilidad de ovejas que se alimentaban de pastos ricos en trébol subterráneo (con alto contenido en FE) al oeste de Australia [3].

Diversos estudios epidemiológicos han aportado datos concluyentes sobre los factores etiológicos de las enfermedades, ya que es ampliamente aceptado y respaldado también por estudios de casos-control, que gran parte de las enfermedades en países desarrollados están relacionadas con la dieta [4]. Otros estudios sugieren que el consumo de altas cantidades de alimentos ricos en FE está fuertemente relacionado con el bajo riesgo de sufrir alguna de las llamadas ``enfermedades occidentales``, tales como el cáncer de próstata y de mamas, osteoporosis y enfermedades cardiovasculares [5].

Estrógenos endógenos

Los estrógenos circulantes más abundantes en el cuerpo humano son el estradiol, la estrona y estriol. Estos compuestos tienen una estructura esteroidea (Fig. 1) lo que les permite interactuar con receptores estrogénicos (RE), desencadenando una serie de respuestas fisiológicas de gran importancia en los mamíferos superiores. Esto se hace evidente desde el inicio de la pubertad femenina donde no sólo son secretados por la glándula suprarrenal sino también por los ovarios, luego de ser estimulados por la hormona folículo estimulante. El alza en los niveles séricos principalmente de 17- β estradiol (E2) posibilita que por ejemplo, la vagina, el útero y las trompas uterinas alcancen su máximo desarrollo y funcionalidad, estimulando además, el crecimiento de los conductos en la mama, la fase de crecimiento acelerado y el cierre de las epífisis de los huesos largos [6]. Los estrógenos están también involucrados en el mantenimiento de la estructura normal de la piel y de los vasos sanguíneos e influyen en el metabolismo del calcio, disminuyendo el índice de resorción de huesos al antagonizar el efecto de la hormona paratiroidea. Otra de sus acciones se refleja en la modificación del perfil lipídico, aumentando las lipoproteínas de alta densidad (HDL), con una discreta reducción en las lipoproteínas de baja densidad (LDL) cuya consecuencia es una disminución en los valores de colesterol plasmático [7-8].

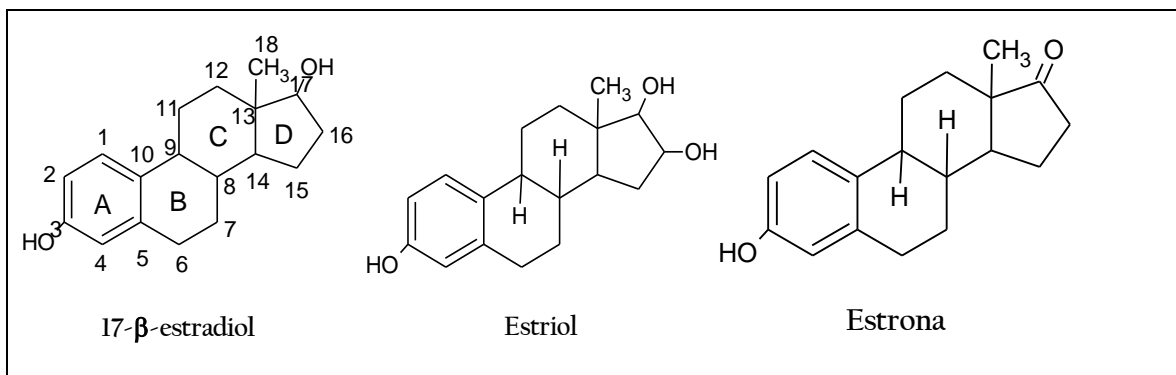


Figura 1. Estrógenos endógenos.

Climaterio

Hacia los 50 años de vida, en la mujer comienza a evidenciarse un descenso en los niveles plasmáticos de estrógenos. Esta etapa se denomina climaterio y comprende el período entre la madurez sexual y la senectud, en el que desaparece la función reproductiva y se producen variaciones hormonales que conllevan cambios en el aparato genital y en la esfera social, psíquica y sexual. El climaterio abarca 3 períodos:

Premenopausia: Comprende desde el inicio de los síntomas climatéricos hasta la menopausia.

Menopausia: Es la última menstruación. Su diagnóstico es retrospectivo y se realiza después de 12 meses de amenorrea continua.

Postmenopausia: Período entre 5 y 10 años subsiguientes a la ocurrencia de la menopausia [9].

Debido a lo anterior el estrógeno predominante pasa a ser la estrona, mucho menos potente que el estradiol [10]. Esta deficiencia de estrógenos será la causante de la sintomatología climatérica. Estos síntomas pueden manifestarse a corto o largo plazo y con distintas intensidades. Entre los síntomas a corto plazo se encuentran los sofocos (bochornos), trastornos del sueño, disfunción sexual, incontinencia urinaria, infecciones del tracto urinario y cambios en el tejido conectivo [9, 11].

Complicaciones del climaterio

Osteoporosis

Una de las consecuencias a largo plazo de la reducción en los niveles de estrógenos es el desarrollo de osteoporosis y fracturas de hueso patológico. Alrededor de los 50 años junto con la menopausia y el hipoestrogenismo aumenta el remodelamiento óseo y la pérdida de masa supera a la velocidad de formación [1]. El tipo de fractura más frecuente es el aplastamiento vertebral, representando el 50% del total de las fracturas. Estas fracturas son las responsables de la disminución de estatura, dolores crónicos de espalda e hipercifosis dorsal [9].

Enfermedad cardiovascular (ECV)

Ésta es la principal causa de muerte en mujeres postmenopáusicas [11]. Dentro de los factores de riesgo de ECV están la dislipidemia, hipertensión arterial y obesidad centrípeta [1]. Los niveles de HDL disminuyen y los LDL aumentan en mujeres que experimentan una menopausia en comparación con mujeres pre-menopáusicas, por lo que las mujeres postmenopáusicas presentan un mayor riesgo cardiovascular [9].

Biosíntesis de estrógenos

El precursor de la síntesis de estrógenos es el colesterol, que es obtenido desde la dieta o bien, sintetizado endogenamente. El paso limitante del proceso es la conversión del colesterol a pregnenolona por la enzima que rompe la cadena lateral del colesterol (CYP450ssc). La pregnenolona se oxida e isomeriza después a progesterona, y ésta se transforma a androstenediona a través de la 17 α -hidroxi-17,20-liasa. Tanto el estradiol como la estrona se sintetizan a partir de precursores androgénicos, proceso catalizado por el complejo enzimático CYP450 aromatasa. Este complejo cataliza la secuencia de hidroxilación y oxidación del grupo metilo en posición 19, la creación de un doble enlace 1-2, la descarboxilación en la posición 19 y la formación de un anillo bencénico característico de los estrógenos. Finalmente la enzima aromatasa biotransforma la androstenediona a estrona y/o la testosterona a estradiol (Fig. 2) [6, 12].

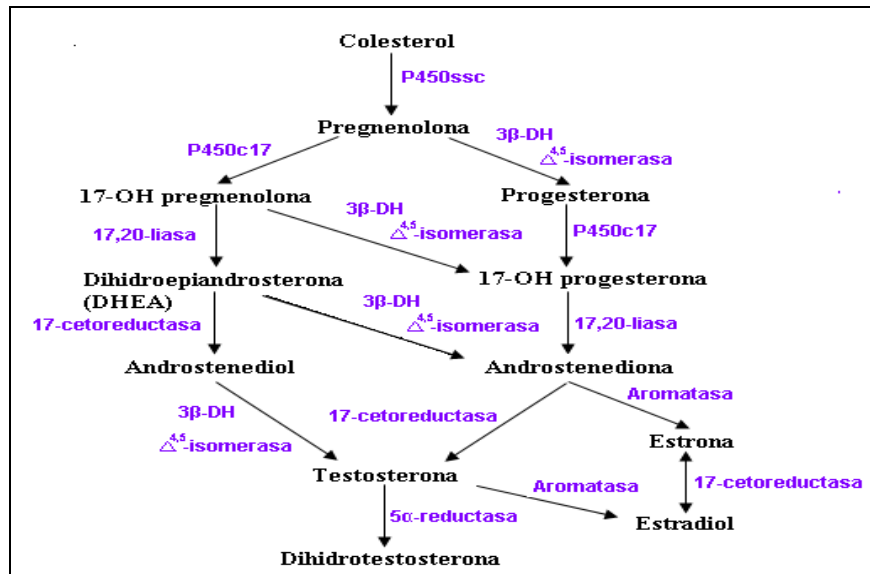


Figura 2. Biosíntesis de hormonas esteroidales.

Potencia de los estrógenos endógenos

Los estrógenos endógenos producidos durante la vida fértil son tres. En la mujer pre-menopáusica el 17β-estradiol (estradiol) es el producido en mayor cantidad, también es el más potente debido en parte a su alta afinidad por los RE. Ordenándolos según su potencia le sigue la estrona, metabolito del E2. La estrona (E1) es producida a través de la conversión de la androstenediona en el tejido adiposo. El tercer estrógeno endógeno es el estriol (E3), también metabolito del estradiol, y menos potente que los dos anteriores. El estriol es el principal estrógeno producido por la placenta durante el embarazo. En mujeres no gestantes, se encuentra en cantidades mucho menores que el estradiol y la estrona [13].

Efecto primer paso

El E2 administrado por vía oral es rápidamente metabolizado a E1 antes de alcanzar la circulación sistémica, tanto en el estómago como en el hígado. A nivel hepático, el efecto de primer paso trae como consecuencia la disminución del E2 disponible en la circulación sistémica [13].

Biotransformación

Las vías de metabolización de los estrógenos son similares en las mujeres pre y posmenopáusicas. La primera vía es la oxidación hacia la producción de hidroxiderivados (formación de compuestos inactivos e hidrosolubles), principal camino de metabolización. El hidroxilo puede ser ubicado en la posición 2, 4, o 16, siendo responsable de este proceso el complejo enzimático citocromo P450. Los metabolitos hidroxilados serán: 2-hidroxi-estradiol, 2-hidroxi-estrona, 4-hidroxi-estradiol, 4-hidroxi-estrona, 16-alfa-hidroxi-estradiol y 16-alfa-hidroxi-estrona. Estos metabolitos son excretados por la orina. Finalmente, estos hidroxiderivados son metilados y conjugados a glucuronidos o sulfoconjugados, por acción de la enzima UDPGT (Uridina difosfato glucoroniltransferasa) y sulfotransferasa. Parte de estos metabolitos tienen circulación entero-hepática. La metabolización predominante en sujetos normales es hacia los 2 hidroxiderivados, siendo la metabolización hacia los 16 hidroxil-derivados no mayor a 10% [12].

La segunda vía es la conversión del estradiol hacia estrona o estriol, compuestos biológicamente activos, pero con potencias al menos diez veces menor que el estradiol [13].

Circulación entero-hepática

Los estrógenos son conjugados por la UDPGT a nivel hepático, lo que los convierte en compuestos más hidrosolubles. Dependiendo de las modificaciones a las que sean sometidos pueden llegar a ser estructuralmente muy similares a los ácidos biliares, los que luego son excretados hacia el intestino a través de la vía biliar. En el intestino, la flora bacteriana normal desconjuga los estrógenos, haciéndolos nuevamente liposolubles. Estas formas liposolubles vuelven a tener actividad biológica y son reabsorbidos vía circulación entero-hepática, regresando de este modo a la circulación como un metabolito activo [13].

Receptor estrogénico

El primer receptor estrogénico descrito, llamado en un comienzo RE y más tarde receptor estrogénico α (RE α), fue caracterizado por el equipo de Jensen y DeSombre en el año 1973 [14]. Un segundo receptor estrogénico, el receptor estrogénico β (RE β), fue descubierto en el año 1996 por Kuiper y cols. [15].

Aunque son altamente homologables, el RE α presenta diferencias tanto en el dominio de activación transcripcional como en su distribución en los diferentes tejidos con respecto al RE β , lo que sugiere diferencias funcionales entre ambos. Como la caracterización funcional de ambos RE aún continúa, es aceptado que las distintas funciones de E2 podrían ser atribuidas a la combinación de efectos del RE α y el RE β .

Sin embargo, también existen reportes que describen propiedades de unión estrogénica y efectos celulares y fisiológicos del E2 que no fueron explicados completamente por la activación transcripcional mediada por los REs [16].

Estructura RE

En las cercanías del dominio N-terminal, se halla una región del péptido que tiene la característica de ser intensamente inmunogénica. A ésta le sigue una región central que contiene unos 65 aminoácidos (aá) y se denomina DBD (del inglés DNA-binding domain); esta región interactúa con el ADN. Luego del DBD continúa una zona hidrófila de unos 50 a 70 aá. Finalmente, acercándose al dominio C-terminal, se halla una región que consta de 250 aá conocida como LBD (del inglés ligand-binding domain), región a la cual se unen los ligandos. (Fig. 3) [6].

Estos receptores también contienen dos zonas que cumplen funciones de activación de la transcripción, AF-1 localizada en el dominio A/B en el N-terminal, y AF-2 localizada dentro del dominio de unión al ligando en el C-terminal. Aunque la función de AF-2 es dependiente de la unión al ligando, la función de AF-1 es independiente, pero es sinergizada por la función de AF-2 en la promoción de la activación de la transcripción dependiente de ligando [17].

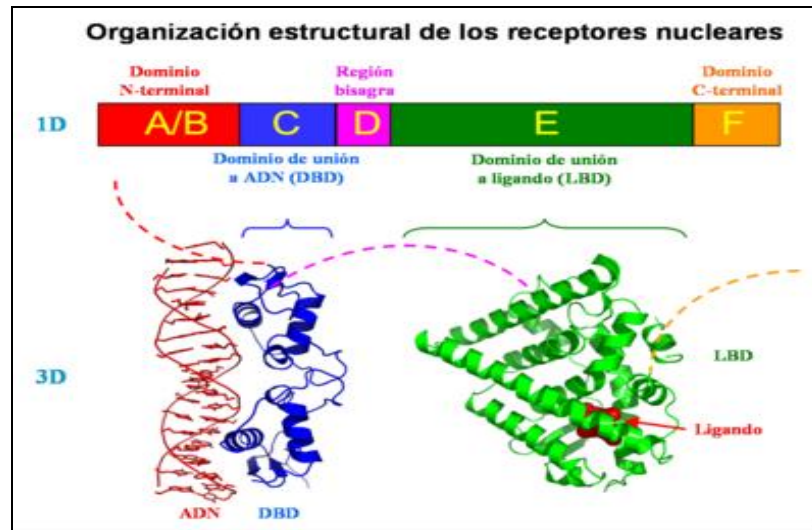


Figura 3. Organización estructural de los RE nucleares.

Distribución de los RE

Los RE son miembros de la super familia de genes que codifican para receptores nucleares de diversos ligandos hidrofóbicos como las hormonas esteroidales (estrógenos, progestágenos, glucocorticoides, etc...), ácido retinoico, vitamina D, prostaglandinas y hormonas tiroideas. Estos receptores tienen diferentes distribuciones tisulares y sus proporciones varían de acuerdo al tipo de tejido [20]. El RE α se expresa principalmente en útero, hígado, mamas y riñón, mientras que el RE β se expresa en el cerebro, osteoblastos, vía urinaria y sistema vascular. Esta particular distribución es de gran importancia en el diseño o uso de SERMs (Moduladores selectivos de respuesta estrogénica), ya que, según su afinidad por uno u otro receptor, podrían actuar de manera más localizada en los tejidos blanco [21].

Relación estructura actividad

La principal fuerza de unión entre los estrógenos y sus receptores es la hidrófoba, sin embargo, su especificidad viene determinada por otras interacciones electrostáticas y de Van der Waals, así como también, por la formación de enlaces de hidrógeno con los hidroxilos ubicados en los carbonos 3 y 17 de la molécula esteroidea. Cambios conformacionales muy pequeños pueden ser cruciales para originar una afinidad específica por uno u otro ligando [6].

Respuesta estrogénica

Se han descrito diferentes vías de señalización para respuestas estrogénicas dependiendo de: localización subcelular del receptor, cinética de la respuesta, especificidad de los receptores, regiones del receptor requeridas para la respuesta, proteínas involucradas en la respuesta y susceptibilidad a la inhibición con agentes farmacológicos, entre otros [22].

Vía de señalización genómica

Una de las vías para desencadenar respuestas estrogénicas es mediada por la interacción y activación de los receptores. Los ligandos liposolubles pueden atravesar la membrana celular por difusión simple y unirse a RE citosólicos. Los REs activados son factores de transcripción que unen sus formas diméricas a secuencias de ADN específicas en la región reguladora de los genes blanco, los EREs (Elementos de respuesta estrogénica). Tanto el RE α como el RE β pueden formar homo y hétéro dímeros antes de unirse al ADN [23]. Ambos subtipos de receptores tienen distintas afinidades por diferentes ERE y pueden por lo tanto, producir diferentes efectos transcripcionales en el mismo sitio (Fig. 4) [24]. Cuando un ligando agonista se une a los RE se produce un cambio conformacional en la zona AF-2 que permite la unión de co-activadores transcripcionales y la interacción con los promotores. Numerosos co-factores han sido implicados en la acción de los REs, incluyendo los miembros de la familia p160, p300/CBP, PCAF, los complejos DRIP/ TRAP entre otros [25]. Durante este proceso también se le unen chaperonas intracitoplasmáticas, como las proteínas de shock térmico 70 y 90, las que posteriormente se disocian de la molécula del receptor [26]. Luego, el receptor se une con el ADN y la respuesta transcripcional es modulada por interacción con proteínas co-reguladoras [25]. El reclutamiento de los complejos co-activadores trae como consecuencia la acetilación de una histona por co-factores, la remodelación de la cromatina y el reclutamiento de la ARN polimerasa II por el promotor.

Las respuestas genómicas se caracterizan además porque no se evidencian con el uso de compuestos que inhiben la transcripción génica o bien, la biosíntesis de proteínas. En otras palabras, la respuesta genómica requiere de la síntesis de nuevas proteínas.

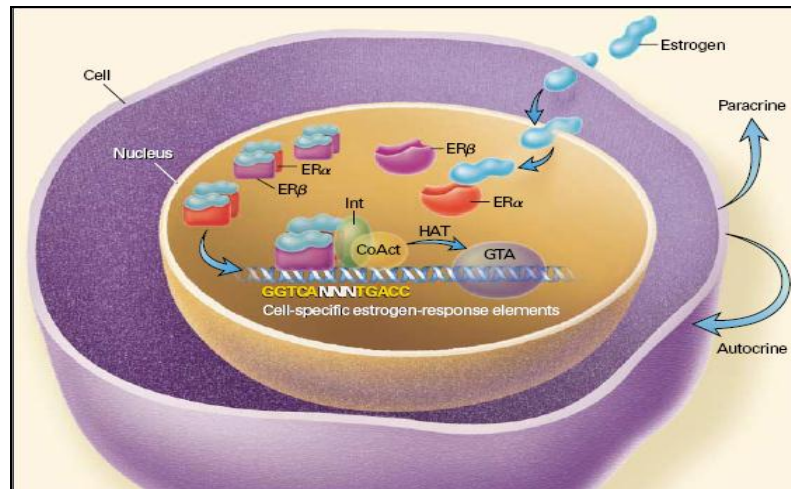


Figura 4. Vía de señalización genómica (Mendelsohn E. and Karas R . 1999 [27]).

Vía de señalización no genómica

Las acciones a través de esta vía son extremadamente rápidas, y parecen involucrar complejos de señalización asociados a la membrana que son capaces de responder a concentraciones picomolares de estrógenos. El tiempo requerido para la aparición de cada una de estas respuestas es inconsistente con el mecanismo requerido durante la transcripción génica. Cada una de estas vías es activada directamente por la acción del estrógeno sobre los canales iónicos (aproximadamente ocurren a los 5 min.), pero los componentes de estas vías aún no han sido completamente dilucidados (Fig. 5) [22]. Esta vía de transducción no es afectada por el uso de inhibidores de la transcripción génica o por inhibidores de la biosíntesis de proteínas.

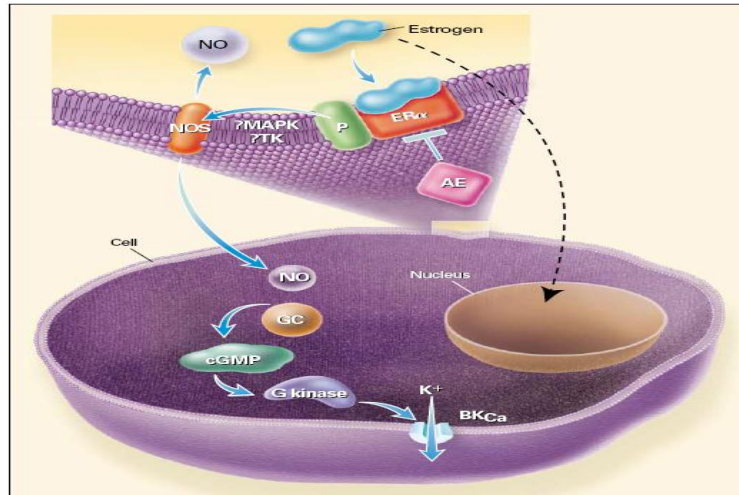


Figura 5. Vía de señalización no genómica (Mendelsohn E. and Karas R . 1999 [27]).

Luego de haber definido dos vías de acción estrogénica podemos hablar de dos tipos de respuesta estrogénica que pueden manifestarse a través de cualquiera de estas vías.

Respuesta estrogénica temprana

Las respuestas tempranas se evidencian en el transcurso de minutos desde la exposición al ligando del RE (Ej. Cambios en el tono vasomotor). Otro ejemplo lo constituye la notable eosinofilia uterina observada tras la administración de estradiol a ratas pre-púberes [28], la que desencadenaría otras respuestas uterinas como edema, aumento de la permeabilidad vascular y liberación de histamina [29]. La migración de eosinófilos inducida por estrógenos y las respuestas posteriores son consideradas como respuestas estrogénicas no genómicas, dado que el bloqueo de la síntesis de ARNm y de proteínas no afecta la aparición de este tipo de respuestas estrogénicas [30].

Respuesta estrogénica tardía

Se entienden como tales a aquellas respuestas que se evidencian en periodos que abarcan desde las primeras horas hasta días tras la exposición al ligando.

En útero podemos observar dos ejemplos de este tipo de respuesta: mitosis e hipertrofia. Al igual que el edema, estas dos respuestas producen un aumento en el peso uterino, lo que las hace diferentes es que las respuestas tardías se hacen evidentes entre 8 y 24 h. posteriores a la estimulación estrogénica [31] y son consideradas como respuestas genómicas debido a que se ven afectadas por el bloqueo de la síntesis de ARNm por agentes inhibidores de la transcripción génica como la actinomicina D o por inhibidores de la síntesis de proteínas tales como puromicina o cicloheximida [30].

Aunque las respuestas tempranas y tardías se distinguen claramente por el tiempo en que se manifiestan, debe señalarse que ambas convergen en una respuesta fisiológica. Así por ejemplo lo que se inicia como respuesta temprana (apertura de un canal iónico) puede activar una vía de transducción que conlleve a la activación de un factor de transcripción. Por otra parte el cambio en el nivel de expresión de una enzima puede significar un cambio fisiológico. Por lo expuesto, resulta más conveniente y didáctico agrupar las respuestas como tempranas o tardías en función del tiempo requerido para evidenciar la aparición del efecto.

Fitoestrógenos

El número de publicaciones referentes a FE ha aumentado significativamente en los últimos años. Este interés se explica en parte por su potencial aplicación farmacológica en la prevención o tratamiento de enfermedades relacionadas con bajas concentraciones plasmáticas de estrógenos [32]. Los FE son compuestos de origen vegetal que poseen una estructura química y una actividad biológica significativamente similares a los estrógenos, a pesar de que su estructura es no esteroidea y que corresponden a compuestos polifenólicos. Sus similitudes con los estrógenos son suficientes como para que estas sustancias puedan interactuar con los RE e incluso desencadenar otros tipos de respuestas que no son mediadas por ellos [16]. Dichas similitudes se muestran en la figura 6.

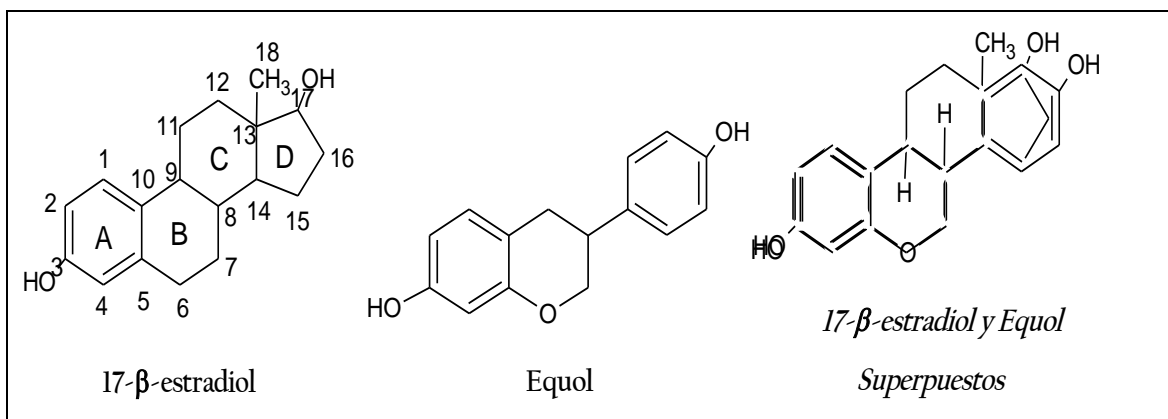


Figura 6. Comparación estructural entre 17-β estradiol y Equol.

La figura 6 muestra que la distancia que existe entre los grupos hidroxilos de ambas moléculas y su ubicación espacial son muy similares. Esto es de suma importancia puesto que, el 17-β estradiol para interactuar con su receptor, necesita tanto el hidroxilo en posición 3 del anillo A aromático, como un segundo hidroxilo en posición 17 β en su anillo D [6].

Clasificación

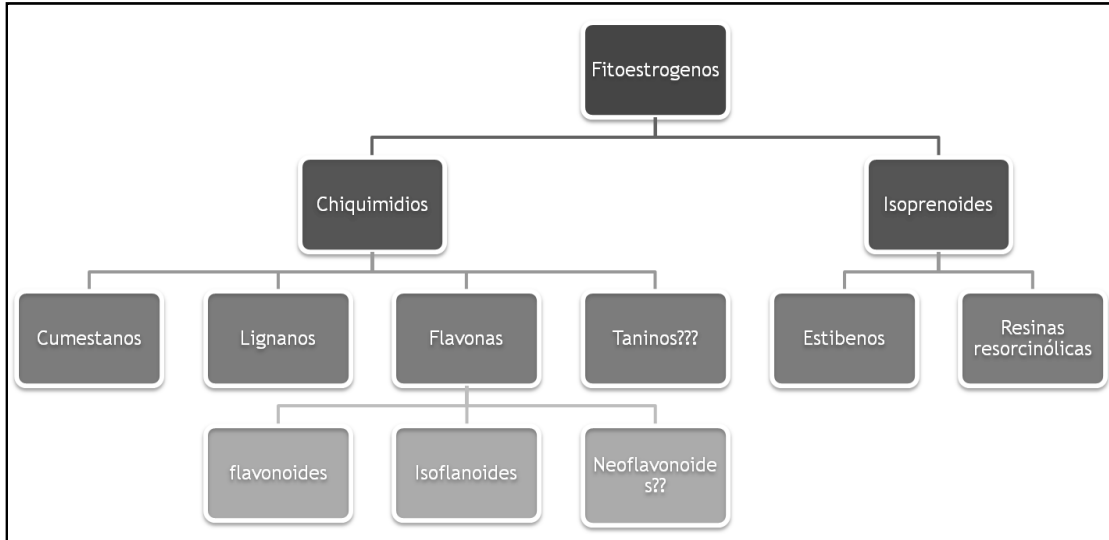


Figura 7. Clasificación de los Fitoestrógenos (Modificado de Haya y cols. 2002).

Las tres clases principales de FE son los lignanos, cumestanos y flavonas (Fig.8). Los Lignanós se encuentran preferentemente en la linaza y otros aceites de semillas, cuyos ingredientes activos son el enterodiól, podofilina y la enterolactona, jugando los dos primeros un importante papel en la terapia y prevención del cáncer [33]. Los cumestanos están presentes en el trébol rojo, aceite de maravilla y en brotes de porotos. Su ingrediente activo es el cumestrol. Las flavonas por su parte, están presentes en la soja, lentejas y otras legumbres; dentro de las flavonas se ubica un subgrupo denominado isoflavonas, siendo la genisteína y la daidzeína, las que presentan actividad antineoplásica y antioxidante [34].

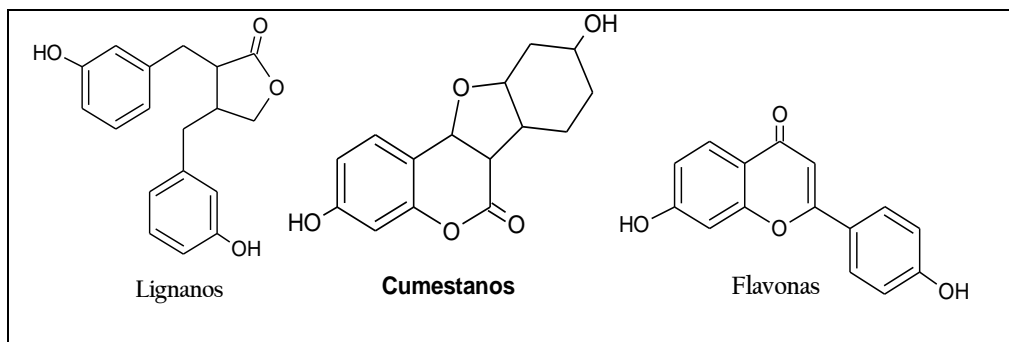


Figura 8. Estructuras de los principales FE

Biosíntesis

La biosíntesis de las isoflavonas y lignanos se inicia con la condensación de la eritrosa-4P y el fosfoenol-pirúvico procedentes de la fotosíntesis, siguiendo la vía chiquimico-corísmico-fenilalanina [33].

Fuentes

Los FE se pueden encontrar en una gran variedad de vegetales, entre ellos frutas, verduras y otros alimentos más elaborados que se detallan en la tabla 1, siendo los más conocidos y estudiados los derivados del poroto de soja.

Tabla 1. Alimentos que contienen FE.

| Isoflavonas | | Lignanos | | | Cumestanos | |
|---------------------|----------------------|--------------------------|--------------------------------------|---------------------|-------------------|---------|
| Legumbres | Derivados de la Soja | Cereales de grano entero | Frutas, vegetales, Semillas | Fuentes Alcohólicas | Brotos de plantas | Forraje |
| Poroto de Soja | Salvado de Soja | Trigo, Avena | Cereza, Ciruela, Duraznos | Cerveza de Lupino | Alfalfa | Trébol |
| Lenteja poroto | Harina de soja | Germen Trigo | Manzana, Pera, Damasco | Licor de maíz | Judía | |
| Habas | Tofu | Cebada | Nueces, Avellana | Vino | | |
| Garbanzo | Leche de soja | Lupino | Zanahoria, Cebolla, Ajo | | | |
| Cimicifuga racemosa | Salsa de soja | Centeno Arroz | Semilla de girasol Aceite vegetal | | | [35] |

En los vegetales los FE se encuentran en distintas proporciones y en distintas formas, a modo de ejemplo, se sabe que la mayoría de las isoflavonas en su estado natural se encuentran conjugadas con glucosa u otros carbohidratos (gliconas) (Fig 9). La proporción de formas conjugadas o no conjugadas varía sustancialmente de una especie a otra y también dentro de una misma especie. Los fermentos de soja como el miso, por ejemplo, contienen mayor proporción de agliconas que otras preparaciones.

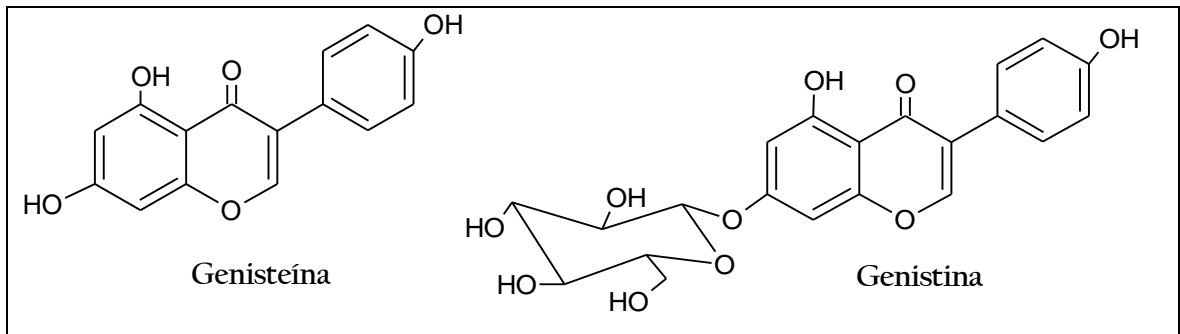


Figura 9. Genisteína (aglicona) y Genistina (glicona)

Función de los FE en los vegetales

Los vegetales superiores se valen de diferentes mecanismos tanto físicos como químicos para defenderse de los depredadores y patógenos. Uno de estos mecanismos es llamado defensa congénita continua, el cual consiste en la síntesis y acumulación de metabolitos secundarios en las partes de las plantas consumidas por los predadores [33]. Este es el caso de los FE, los que son utilizados en la defensa contra herbívoros y mamíferos principalmente, afectando entre otros aspectos, la fertilidad de éstos [3]. También se sabe que los lignanos son intermediarios en la síntesis de lignina, compuesto fenólico de gran importancia en la pared celular vegetal [33].

Por otra parte, es necesario señalar que en el año 1992, se describió en plantas la presencia de ciertas proteínas- las acuaporinas- capaces de transportar agua y otros sustratos desde y hacia la raíz. Estas proteínas también han sido descritas en mamíferos y recientemente [36], se ha descrito que la acuaporina-2 está ausente en células epiteliales y en miometrio uterino de ratas, pero que su expresión aumenta fuertemente tras la administración de estradiol. Esto ha llevado a algunos investigadores a postular que la función de los FE en las plantas, sería modular la expresión de estas proteínas, lo que permitiría a las plantas adaptarse fisiológicamente a diversas condiciones ambientales y nutricionales, entre otras.

Biotransformación

Luego de ser ingeridos, los FE son biotransformados a través de dos vías:

1. Por la microflora intestinal, luego pasan a la circulación hepática (donde son re-conjugados) y finalmente excretados principalmente por la orina; aunque pueden ser medidos también en heces, semen, bilis, saliva y leche materna [37].
2. Una vez que alcanzan el tubo digestivo, son absorbidos en sus formas conjugadas con biodisponibilidad limitada, pasan a la circulación entero-hepática, retornan al intestino (bilis) donde pueden ser desconjugados por la flora intestinal. Es aquí donde se obtienen la genisteína y la daidzeína, a partir de sus precursores (biochanina A y Formononetina respectivamente), (Fig. 10), todo esto metabolizado por las glucosidasas intestinales.

La vida media de los metabolitos más estudiados daidzeína y genisteína se ha estimado en 7,9 h. en adultos [35].

Es importante hacer notar que la bioconversión intestinal de daidzeína en su principal metabolito el equol (Fig. 10), es realizada por un tipo muy específico de flora intestinal, la que aparentemente estaría presente solo en el 30%-50% de los individuos, siendo mucho más probable en vegetarianos y población asiática. El metabolito alternativo de la conversión anterior es la O-desmetilangiolensina (O-DMA). Aún no han sido claramente dilucidados los factores que influyen en la capacidad de producción de uno u otro metabolito, pero se piensa que los factores genéticos, fisiológicos y el tipo de dieta podrían contribuir a estas diferencias interindividuales [34].

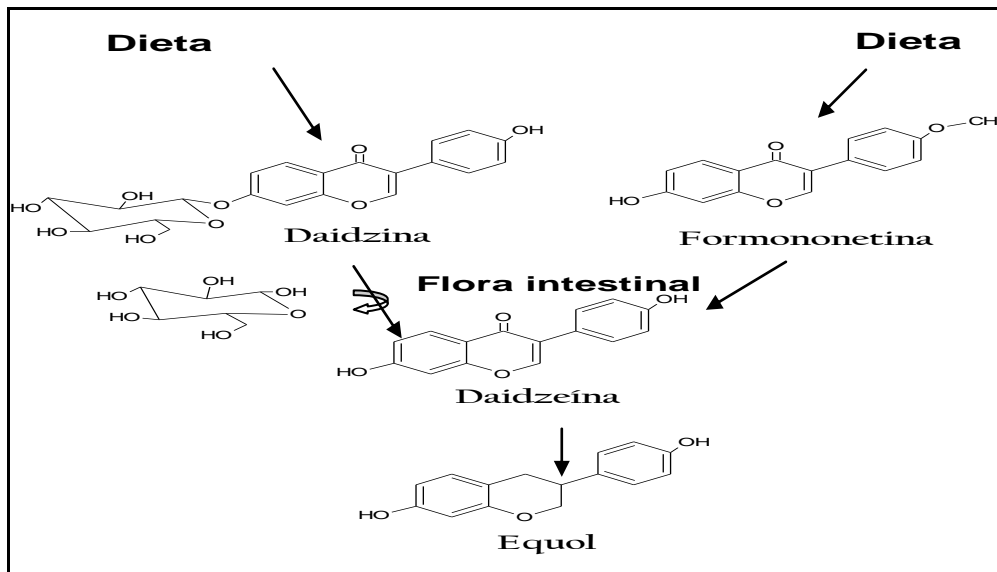


Figura 10. Biotransformación de glucósidos y precursores.

Potencia de sus efectos biológicos

Las potencias relativas, determinadas por bioensayos en cultivos de células humanas (comparadas con el estradiol, al que se le asignó un valor arbitrario de 100) son: coumestrol 0,202; genisteína 0,084; equol 0,061; daidzeína 0,013 y formononetina 0,0006 [38].

Mecanismo de acción

La mayoría de los FE se unen con mayor afinidad al RE β que al RE α , lo cual es funcionalmente significativo puesto que estos receptores tienen distintas distribuciones tisulares y parecen ejercer up-regulation mediante la activación de distintas familias de genes [39].

Una vez que los FE se unen a los RE pueden iniciar la transcripción por la vía clásica, es decir, a través de la interacción con EREs y unión de éstos a genes de respuesta inmediata, como son jun y fos [40]. La vía no clásica, cuyos efectos son principalmente mediados por segundos mensajeros ubicados a nivel de membrana, pueden ser gatillados por la unión del ligando al RE ubicado en ella, como también a otras proteínas que son capaces de responder a la presencia de estradiol [41]. Al igual que E2, estos mensajeros son capaces de desencadenar respuestas estrogénicas tempranas y tardías.

Actividad fisiológica

Los FE despiertan gran interés biológico porque exhiben débil actividad estrogénica y acción antiestrogénica tanto *in vivo* como *in vitro* [42]. Lo cual parece depender de la cantidad circulante de FE, número y tipo de RE involucrado.

De las isoflavonas, la genisteína ha exhibido propiedades proliferativas (estrogénicas) y antiproliferativas (antiestrogénicas) *in vitro* (en líneas celulares humanas). Una vez unidas al RE, las isoflavonas no actúan como típicos agonistas estrogénicos, sino más bien, como moduladores selectivos de receptores estrogénicos (SERMs) tal como un fármaco usado en el tratamiento de cáncer de mamas, Tamoxifeno, que actúa como agonista del RE en el útero y huesos y como antagonista en el RE de la mama [43].

Aplicaciones clínicas de los FE

FE y Osteoporosis

Datos epidemiológicos muestran que la menor incidencia de esta enfermedad ocurre en mujeres asiáticas, aproximadamente un tercio de lo observado en mujeres de occidente, algo similar ocurre con la frecuencia de fracturas patológicas [44-45]. Esto se debería a que las mujeres asiáticas consumen alimentos con mayor contenido de FE como la soja. Coincidente con esta observación, Kardinaal y cols., en el año 1998 sugirieron que la velocidad de pérdida de masa ósea es inversamente proporcional a la cantidad de excreción urinaria de fitoestrógenos. Otros estudios muestran que los fitoestrógenos promueven el almacenamiento de calcio y la mantención de la densidad ósea en ratas ovariectomizadas. En humanos, la administración de extracto de soja durante 24 meses a mujeres menopáusicas, también provocó el aumento de la densidad ósea [45]. Las evidencias de los efectos de los FE en el hueso son escasas, pero parecen tener un efecto preventivo de la osteoporosis y sus efectos a largo plazo deben ser más estudiados [37].

Enfermedades cardiovasculares

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) son la principal causa de muerte en países occidentales donde la dieta juega un importante papel entre los factores de riesgo. Basados en estos antecedentes la investigación científica se ha enfocado al manejo de los factores de riesgo. Numerosos estudios han demostrado que el consumo de proteína de soja es un factor protector, disminuyendo el riesgo de ECV [44]. En 1994 Cassidy y cols. observaron la disminución de un 9% en el colesterol total en un pequeño estudio en mujeres premenopáusicas normo-lipidémicas que consumieron 60 g de proteína de soja diarios. En 1991 la agencia FDA (Food and Drug Administrations) asoció el consumo de proteínas de soja y una dieta baja en grasas saturadas, a una disminución del riesgo de ECV. Esta asociación se basó en un metanálisis que incluyó 38 estudios clínicos controlados en que se usó la proteína de soja. Este metanálisis estableció que la sustitución de la proteína animal por la de soja, reduce significativamente el colesterol total, las LDL y los TG (triglicéridos) sin afectar los niveles de HDL [44]. Además el consumo de proteína de soja permitiría prevenir estas enfermedades gracias a su propiedad antioxidante [5].

Cáncer

La incidencia de cáncer en Asia y Europa del este, es mucho menor que en occidente, lo que se ha relacionado directamente con el alto consumo de FE en la dieta [5]. Otros estudios revelaron que las inmigrantes Japonesas que residen en EE.UU. presentan mayor incidencia de cáncer que si hubiesen permanecido en su tierra natal y que además las mujeres japonesas que padecen de cáncer (en su país) presentan un alto número de tumores *in situ* con pocos nódulos metastáticos en comparación con las mujeres en EE.UU. o Inglaterra, aquejadas por esta patología [46].

Por otro lado, las isoflavonas inhiben la angiogénesis, la progresión del ciclo celular y algunas enzimas como la aromatasa y la 5 α -reductasa presentando actividad antineoplásica [47].

Efectos de los FE sobre el metabolismo de la glucosa

La baja frecuencia de obesidad y de desórdenes metabólicos en la población asiática ha desviado la atención hacia la soja, que es un componente característico en su dieta y con alto contenido de FE. Estudios epidemiológicos han demostrado que la diabetes tipo 2 es cuatro veces menos prevalente en la población japonesa que reside en Tokio que en Japoneses-Americanos en Seattle[48].

FE y transporte de hormonas sexuales

Las isoflavonas y los lignanos modulan la producción de globulina transportadora de hormonas sexuales (sex hormone binding globulin, SHBG), estimulando su síntesis por parte de los hepatocitos e incrementando sus niveles citoplasmáticos en mujeres post-menopáusicas, sobre todo en mujeres con bajos niveles previos de SHBG, con la consiguiente reducción de los niveles de estradiol libre circulante [49].

Seguridad en el uso de FE

El posible uso de los FE en la prevención o tratamiento de enfermedades como alternativa a los tratamientos convencionales, se basa no solo en su actividad biológica, sino también, en su calidad de productos naturales, lo que los convierte en una alternativa más segura, comparada por ejemplo, con terapias de reemplazo hormonal basadas en estrógenos o en estrógenos más un progestágeno. Muchas de las preocupaciones en cuanto a la seguridad de los FE están relacionadas con sus débiles propiedades estrogénicas, que podrían promover patologías como cáncer de mamas o disrupción endocrina. Sin embargo, el consenso actual es que estos compuestos tienen un buen perfil de seguridad cuando se consumen en dosis habituales [50].

Sobre la base de lo expuesto precedentemente, este estudio busca establecer si el extracto 185a4 posee actividad estrogénica, para lo cual se comparó la respuesta biológica estrogénica de E2 versus el extracto 185a4 (de una especie vegetal endémica), utilizando el modelo de útero de rata pre-púber. Ésto se realizó a través de la evaluación de cuatro parámetros de actividad estrogénica en cortes histológicos, dos para respuestas estrogénicas tardías: hipertrofia y mitosis uterina, y otros dos para

respuestas estrogénicas tempranas: eosinofilia y edema uterino. Además se buscó obtener información de la toxicidad de este extracto, por lo que se realizó un estudio de toxicidad oral aguda en ratas adultas, basado en el protocolo de la OECD/OCDE número 420, para estimar el peligro potencial del consumo de la planta 185a (extracto completo), en humanos.

Se espera contribuir al conocimiento que proporcione una base racional para el uso de productos de origen natural en la prevención y tratamiento de algunas patologías de alta prevalencia, tales como enfermedades cardiovasculares, neoplasias u osteoporosis.

HIPÓTESIS

Hipótesis Nula

Ho: La fracción 185a4 no presenta actividad estrogénica *in vivo* en útero de rata pre-púber y la toxicidad oral aguda del extracto completo 185a, se manifiesta a una dosis igual o menor a 5g/Kg de peso corporal de rata.

Hipótesis Alternativa

H1: La fracción 185a4 presenta actividad estrogénica *in vivo* en útero de rata pre-púber y la toxicidad oral aguda del extracto completo 185a, se produce a dosis iguales o superiores a 5g/ Kg de peso corporal de rata.

Objetivos

1. Generales

- Evaluar la actividad estrogénica de la fracción 185a4 en útero de rata pre-púber.
- Cualificar la toxicidad aguda del extracto 185a en ratas adultas.
- Caracterizar el extracto completo 185a.

2. Específicos

- Cuantificar el número de eosinófilos en útero de rata pre-púber en presencia de la fracción 185a4.
- Determinar edema uterino producido por la fracción.
- Medir el número de células en etapa de mitosis en el tejido uterino luego de administrar la fracción 185a4.
- Evaluar hipertrofia uterina en presencia de la fracción.
- Evaluar si el extracto 185a presenta toxicidad oral aguda.
- Determinar DL50 para el extracto 185a.

I. MATERIALES Y MÉTODOS

Reactivos.

17 β -estradiol, Albúmina y todos las isoflavonas patrón para HPLC y TLC fueron obtenidos de SIGMA Co., EEUU. NaCl 0.9% fue obtenido de Laboratorio Biosano, Chile. La tinción Hematoxilina-Eosina fue obtenida de Harris, Chile. Bálsamo Canadá, Éter dietílico, Xileno, Aceite de inmersión, Etanol absoluto, Parafina Histosec[®], Formalina y solución Giemsa fueron obtenidos de Laboratorio Merck, Chile. Flo-texx fue obtenido de Lerner Laboratories, EEUU.

Métodos

Obtención del vegetal en estudio

La parte aérea (tallos, hojas, frutos e inflorescencias) fue recolectada el tres de marzo del año 2009 en la comuna de Santa Bárbara (octava región, Chile) a 42 Km de la ciudad de las Ángeles.

Obtención extracto 185a y fracción 185a4.

El vegetal recolectado fue secado a temperatura durante un mes. Con él se preparó un extracto etanólico (etanol absoluto) en una proporción de 1:2 (500g de planta y 1L de etanol), el que luego se llevó a sequedad. Con una porción de éste se realizó el ensayo de toxicidad y la caracterización química del extracto. La porción restante se fraccionó con cuatro solventes de polaridades crecientes (Hexano, diclorometano, acetato de etilo y etanol) en columna de fraccionamiento de sílica gel, obteniéndose cuatro fracciones concentradas de distintas polaridades. Las fracciones se enviaron al laboratorio de Biología del Departamento de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Valparaíso, para realizar el estudio de su actividad estrogénica sobre líneas de cultivo celular de cáncer de mamas (MCF-7 y MDA-MB231). Finalmente la fracción con mejor actividad biológica antiproliferativa fue seleccionada para el estudio *in vivo* de los parámetros de actividad estrogénica en útero, la que fue denominada extracto 185a4.

1. Evaluación estrogénica

Diseño del estudio

Doble ciego, con muestra de tipo probabilística, en donde los elementos muestrales tuvieron la misma probabilidad de ser seleccionados dentro de un conjunto total.

Modelo de estudio

Útero de rata Sprague Dawley pre-púber (21 días), debido que a esta edad la rata tiene sus receptores hormonales completamente funcionales y su secreción endógena de estrógenos es mínima, la que no es significativa para interferir con las mediciones. Este modelo experimental es ampliamente utilizado para estudiar los mecanismos de crecimiento inducidos por el estrógeno.

Controles





Como control negativo se utilizó suero fisiológico (NaCl 0.9%) y como control positivo, E2 (300 µg/ kg de peso corporal de rata).

Preparación de las muestras

Para evaluar la respuesta estrogénica temprana y tardía se utilizaron 4 grupos de 20 ratas Sprague Dawley pre-púberes de 21 días de edad para minimizar la posibilidad de secreción estrogénica endógena. Cada uno de estos grupos se trató según el siguiente esquema:

Tabla 2. Esquema de tratamientos.



| Eutanasia |  |  |  |  |
|---------------------|---|--|---|---|
| 6 h post inyección | n= 9 | n= 10 | n= 10 | n= 10 |
| 24 h post inyección | n= 10 | n= 10 | n= 10 | n= 10 |

Las ratas del grupo 1 se inyectaron vía s.c. con 0,3 mL de NaCl 0,9 % y fueron sacrificadas 6 y 24 h post-inyección como controles para las respuestas tempranas y tardías.

Las ratas del grupo 21 fueron inyectadas vía subcutánea (s.c.) con 0.3 mL de E2 (300 µg/Kg de peso corporal de rata). La mitad de ellas fueron eutanasiadas 6 h post-inyección para comparar las respuestas tempranas. Las diez restantes se sacrificaron 24 h post-inyección para establecer la respuesta tardía máxima.

Al grupo 3 se le inyectó vía s.c. 0,3 mL de la fracción 185a4 diluido en etanol (300 µg/Kg de peso corporal de rata) y se sacrificaron a las 6 y 24 h post-inyección para comparar sus resultados con los controles de respuesta máxima y mínima.

Por último, el grupo 4 fue inyectado vía s.c. con 0,3 mL de la fracción 185a4 diluido en etanol (300 µg/kg de peso corporal de rata) y 1 h después, también vía s.c., se le inyectó E2 en la dosis antes mencionada.

Procesamiento de las muestras

En hipertrofia, edema y eosinofilia uterina.

Una vez transcurridas las 6 o 24 h, se extrajeron los cuernos uterinos bajo el efecto de éter, para finalmente ser eutanasiadas por sobredosis de este anestésico. Los cuernos fueron fijados durante 24 h en una solución de formalina al 10% tamponada con buffer fosfato 0,1 M, pH 7,4. Los cuernos extraídos fueron sometidos a los siguientes procesos: Deshidratación completa, inclusión en parafina y corte en micrótomos de 5 µm.

La deshidratación se realizó en una batería con gradientes de alcohol etílico ascendente y luego se procedió al aclaramiento con xileno. Finalmente la impregnación se llevó a cabo en tres cambios de parafina sólida en estufa a 60 °C y luego se procedió a la construcción de los bloques, dejándolos solidificar a temperatura ambiente.

Los cortes histológicos uterinos, llamados triadas, representan las tres porciones del cuerno uterino: Proximal al cervix, parte media del cuerno y distal cercana al ovario. Los cortes se sometieron a baño de flotación (37°C), luego se dispusieron en porta objetos embebidos en albúmina (Fig. 11). Se insertaron los respectivos cortes en forma de triadas. El orden de las porciones uterinas fue al azar.

Las muestras se tiñeron con colorante Hematoxilina-eosina, para teñir de color violeta los núcleos de las células uterinas y de color rojo los gránulos de los leucocitos eosinófilos. Finalmente los cortes se deshidrataron, aclararon y montaron con bálsamo de Canadá.

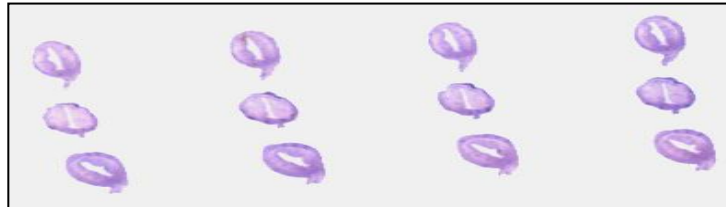


Figura 11. Triadas de cortes de cuernos uterinos de rata

Para Mitosis uterina

Los cortes desparafinados e hidratados (sólo hasta agua destilada) se mantuvieron durante 30 segundos en solución de trabajo Giemsa 20 %, se lavaron con agua ácida, con etanol 95%, y finalmente fueron pasados por dos baños de isopropanolol, 2 baños de xilol y luego se procedió al montaje.

Parámetros de evaluación

Respuestas tempranas

Recuento del número de eosinófilos en los distintos estratos uterinos.

Se realizó por microscopía óptica (1.000 x) en diez triadas al azar, contabilizando los eosinófilos en los distintos estratos uterinos (Mesometrio, Miometrio longitudinal, Miometrio circular, Estroma profundo y Estroma superficial).

Para cada condición experimental se calculó el número de eosinófilos por estrato uterino y se reportó el total por cada placa.

Recuento del número de células para evaluar edema

Edema se define como acumulación de cantidades anormales de líquido en los espacios intercelulares. Su evaluación se realizó por microscopía óptica (1.000 x) contabilizando el número de núcleos celulares por área en tres triadas escogidas al azar. Cuatro áreas en estroma profundo y otras cuatro en estroma superficial, sin considerar los extremos de cada corte (mesometrio y antimesometrio) debido a que en esa zona ambos tejidos se deforman y tienden a confundirse (área difusa).

Para cuantificar se sumó el número de núcleos contabilizados por campo, y se informó el total por cada triada. Una disminución en el número de núcleos por triada fue considerado como presencia de edema.

Respuestas tardías

Recuento del número de células que presentan hipertrofia

Hipertrofia se define como aumento del tamaño celular. Su evaluación se realizó por microscopía óptica (1.000 x) en tres triadas escogidas al azar. Se contabilizó el número de núcleos por área en cuatro campos de área constante en miometrio circular (MC). Se calculó el número de núcleos por campo en cada corte y se obtuvo el total por triada. La disminución en el número de núcleos por triada se consideró como presencia de hipertrofia celular en el MC. En este tejido las células están en estrecha conexión, de tal manera que la disminución de núcleos por campo se interpreta como aumento del volumen del citoplasma.

Recuento del número de células en Mitosis

Se realizó por microscopía óptica (1.000 x). Se contabilizaron las células en cualquier fase de la mitosis en tres triadas al azar en tres estratos: MC, Epitelio glandular (EG) y Epitelio luminal (EL). Para cada condición experimental se calculó el número total de células en mitosis en cada estrato uterino señalado y se reportó el número total de mitosis por placa.

2. Evaluación Toxicológica

Animales

Se utilizaron 10 ratas Sprague Dawley adultas de 8 a 12 semanas de edad, de sexo femenino, nulíparas y no gestantes al momento del ensayo. Su peso corporal no varió más allá de un 20% durante el periodo de tratamiento.

Condiciones de alojamiento y alimentación

Los animales permanecieron en una habitación a 22 °C (± 3), con una humedad de 60%, con luz artificial, en ciclos de 12 h de luz y 12 h de oscuridad y agua y alimentación *ad libitum*. Todas estas condiciones fueron otorgadas por el Bioterio Central del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina, Sede Norte, de la Universidad de Chile.

Preparación de los animales

Los animales fueron seleccionados aleatoriamente dentro de la población que cumplió con los criterios de inclusión. Se marcaron para facilitar su identificación individual y se mantuvieron separados del resto de la población 6 días antes del comienzo del ensayo para permitir la aclimatación a las nuevas condiciones de alojamiento.

Preparación de la dosis

La dosis calculada para cada rata (5g/Kg de peso corporal) fue fraccionada en tres administraciones (cada 3 h) que no superaron los 2mL/100g de peso corporal. Para mejorar la solubilidad el extracto se adsorbió con almidón de maíz y fue reconstituido en agua potable. El grupo control recibió la misma dosis de almidón que el grupo experimental, diluido en agua.

La dosis/Kg de peso corporal de extracto fue establecida según la guía OECD/OCDE 420 [51] en una experiencia previa con un solo espécimen.

Procedimiento

La alimentación y el agua fueron restringidas 4 h pre-administración del extracto y el alimento, hasta 3 h posteriores a la administración de la última fracción de la dosis total. La dosis fue administrada en tres fracciones (cada 3 h) vía oral, directamente al estómago a través de una aguja gavage número 16 (similar a una sonda gastroesofágica). Durante los 14 días posteriores a la administración del extracto los animales se mantuvieron en observación y sus pesos corporales fueron registrados diariamente a la misma hora (Fig. 7). Una vez finalizado el periodo de observación establecido, todos los animales tanto del grupo experimental como del grupo control fueron eutanasiados con exceso de anestésico (éter) y se extrajeron los órganos - hígado, riñón y cerebro- para su análisis histopatológico.

Procesamiento de las muestras

Los tejidos fueron fijados en formalina al 10%, tamponada con PBS (solución buffer-fosfato) 0,15 M pH 7,4, incluidos en parafina y contrastados con Hematoxilina-Eosina. Estos tejidos fueron enviados a BIOPCYT S.A. para su análisis. Los parámetros de toxicidad celular analizados fueron: hiperemia, hemorragia, edema, fibrosis, inflamación, hiperplasia, atrofia, necrosis, degeneración grasa, licuefacción a nivel tisular, vacuolización y binucleación a nivel celular.

3. Análisis cualitativo del extracto completo 185a y fracción 185a4

HPLC

Éste análisis se realizó en Venturelab, de la Universidad Adolfo Ibañez y estuvo a cargo del Dr. Gustavo Cabrera, quien participa como co-investigador del proyecto anillo ACT-07

Condiciones de Inyección

Las muestras se solubilizaron en metanol : agua (1 : 1) y luego fueron filtradas. Los patrones fueron inyectados en concentración de 3 mg/mL en un volumen de inyección de 20 uL. La fase móvil consistió en agua acida 0,1% y Metanol (en gradiente de elución. Se utilizó una columna RP C18, 250 x 4,6 mm, tamaño partícula 5um. Las lecturas se realizaron a una longitud de onda de 362nm.

Tabla 3. Gradiente de elución: A=agua ácida y B=metanol.

| Tiempo (min) | %A | %B |
|--------------|----|----|
| 0 | 67 | 33 |
| 17 | 50 | 50 |
| 19 | 50 | 50 |
| 20 | 67 | 33 |
| 25 | 67 | 33 |

Cromatografía en Capa Fina

Para analizar la presencia o ausencia de algunos metabolitos secundarios en el extracto etanólico 185a se realizó un rastreo en cromatografía de capa fina (CCF), empleando cromatofolios de gel de sílice G tipo 60 con indicador de fluorescencia (Nº 5554 Merck). Las fases móviles utilizadas se detallan más adelante según la naturaleza química del metabolito a analizar y con la proporción con la que se obtuvo la mejor resolución y Rf ($\approx 0,5$). Las cromatografías fueron reveladas con reactivos cromogénicos y visualizadas con fluorescencia bajo luz UV a 254 y 366 nm de longitud de onda.

Los reactivos reveladores, los patrones y las fases móviles escogidas se señalan a continuación.

Tabla 4. Reveladores según sustancia patrón.

| Metabolitos secundarios | Sustancia patrón | Reactivo revelador | Fase móvil CH ₂ Cl ₂ :EtOAc |
|-------------------------|---|--|--|
| Alcaloides | | Dragendorff | (9:1) |
| Esteroles | Acido oleanólico β-sitosterol, Lupeol | Lieberman- Bürchard p- anisaldehído | (9:1) |
| Antraquinonas | | Börntrager | (9:1) |
| Flavonoides | Quercetina, Genisteína, kaempferol, Apigenina, Daidzeína, Biochanina A, Formononetina | Luz UV, NP/PEG, AlCl ₃ y NH ₃ | (7:3) |

Análisis estadístico.

Los resultados fueron procesados con el programa Graph Pad, PRISM, versión 5.0, 2007. Para el análisis de actividad estrogénica los datos obtenidos fueron sometidos al test de D' Agostino Pearson normality. Basados es esos resultados se realizaron los siguientes test no paramétricos: Test de suma de rangos de Wilcoxon, seguido por un test de Mann Whitney de dos colas. Para evaluar la variación de peso durante el ensayo toxicológico se utilizó el T de Student para muestras independientes. Las diferencias calculadas se consideraron significativas a un valor de $p < 0,05$.

III. RESULTADOS

Evaluación Estrogénica de la fracción 185a4

Eosinofilia

La primera respuesta estrogénica estudiada fue la eosinofilia cuyos resultados se muestran en la fig. 12.

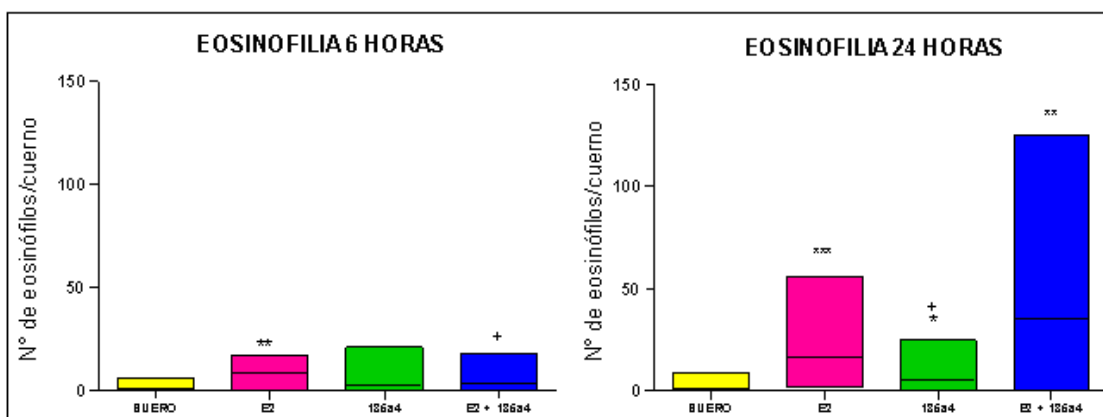


Figura 12. Eosinofilia uterina

Las ratas pre-púberes recibieron vía s.c. uno de los 4 tratamientos: a) Suero fisiológico, b) E2, c) 185a4 o d) 185 a4 y una hora después E2. Cada barra representa el rango del número de eosinófilos y la línea horizontal dentro de ella la mediana de los datos. Los * representan la comparación con la condición adyacente hacia la izquierda y el signo + el contraste con la condición subsiguiente hacia la izquierda.

* = 0,05 > p > 0,01, + = 0,05 > p > 0,01, ** = 0,01 > p > 0,001, *** = p < 0,0001, +++ = p < 0,0001.

La eosinofilia uterina es una respuesta observable a las 6 h y que alcanza su máxima intensidad 24 h post-tratamiento (Tchernitchin y cols., 1974). Nuestros resultados son concordantes con lo descrito en la literatura, ya que la máxima intensidad se alcanzó a las 24 h de administrado el E2. En la misma figura se presenta el efecto inducido tras la administración de la fracción 185a4 sola. Transcurridas 6 h no se evidenció efecto estrogénico significativo, mientras que a las 24 h la fracción si presenta efecto estrogénico en comparación con el control negativo. Al administrar la fracción a las ratas, una hora antes de administrar E2, a 6 h sólo se observa actividad atribuible a E2. Pasadas 24 h la fracción sinergiza la actividad de E2, aumentándola significativamente.

Edema

Los resultados para la generación de edema superficial y profundo se muestran en las figuras número 13 y 14 respectivamente.

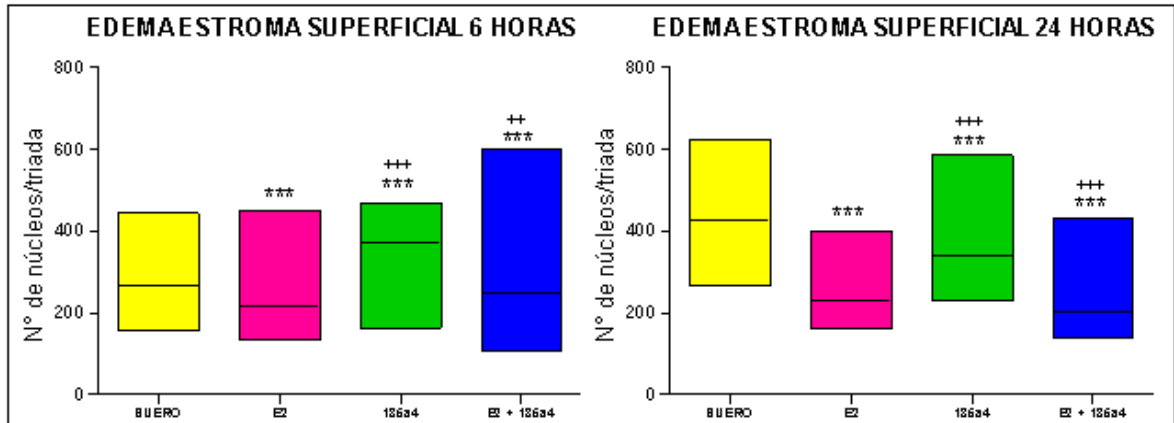


Figura 13. Edema estroma superficial

Las ratas pre-púberes recibieron vía s.c. uno de los 4 tratamientos. A) Suero fisiológico, b) E2, c) 185a4 o d) 185 a4 y una hora después E2. Cada barra representa el rango en que fluctuó el número de núcleos para cada respuesta y la línea horizontal dentro de ella la mediana de los datos. Los * representan la comparación con la condición adyacente hacia la izquierda y el signo + el contraste con la condición subsiguiente hacia la izquierda.

* = $0.05 > p > 0.01$, + = $0.05 > p > 0.01$, ** = $0.01 > p > 0.001$, ++ = $0.01 > p > 0.001$, *** = $p < 0.0001$, +++ = $p < 0.0001$.

La disminución en el número de núcleos por triada de placa histológica obtenida de cuerno de útero fue considerada como presencia de edema (ver métodos). En la figura 13 se evidencia la generación de edema tanto a 6 como a 24 h después de administrar E2 y que la máxima intensidad de esta respuesta se alcanzó a las 24 h.

Al administrar vía s.c. la fracción 185a4 no hubo respuesta edematosa a las 6 h. Transcurridas 24 h sí se observó una respuesta significativa en comparación con el control negativo. Cuando se administró la fracción una hora antes que E2 vía s.c. se evidenció una significativa respuesta edematosa con respecto al control negativo. Lo que se repitió a las 24 h, pero esta vez la respuesta fue significativamente mayor a la de E2.

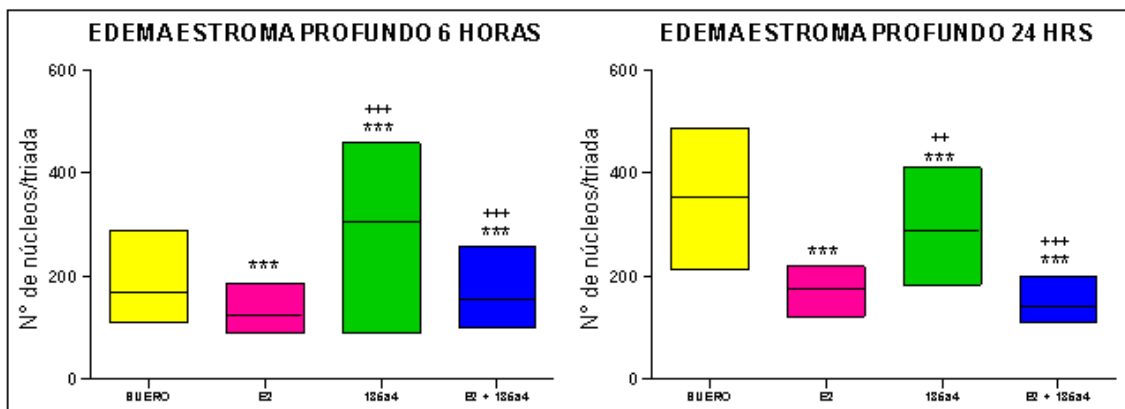


Figura 14. Edema estroma profundo.

Cada uno de los cuatro grupos de ratas pre-púberes recibió vía s.c. uno de los siguientes tratamientos. a) Suero fisiológico, b) E2, c) 185a4 o d) 185 a4 y una hora después E2. Cada barra representa el rango para cada respuesta y la línea horizontal dentro de ella la mediana de los datos. Los * representan la comparación con la condición adyacente hacia la izquierda y el signo + el contraste con la condición subsiguiente hacia la izquierda.

* = $0.05 > p > 0.01$, + = $0.05 > p > 0.01$, ** = $0.01 > p > 0.001$, +++ = $0.01 > p > 0.001$, **** = $p < 0.0001$, +++++ = $p < 0.0001$.

La cinética de la generación de edema inducido por E2 siguió el mismo comportamiento tanto en estroma superficial como en estroma profundo; es decir para ambos casos fue significativo a 6 y a 24 h, en donde se alcanzó la máxima intensidad de la respuesta. La fracción 185a4 no generó edema significativo a 6 h. Pasadas 24 h si fue capaz de inducir una respuesta edematosa significativa. Tras la administración concomitante de E2 más la fracción, se observó respuesta tanto a 6 como a 24 h, siendo significativamente mayor a las 24 h.

Hipertrofia

La hipertrofia celular se evaluó solamente en MC; cabe recordar que esta es una respuesta estrogénica de tipo tardía ya que involucra la síntesis de nuevas proteínas, lo que se traduce en un aumento del volumen citoplasmático. Los resultados se presentan en la figura 15.

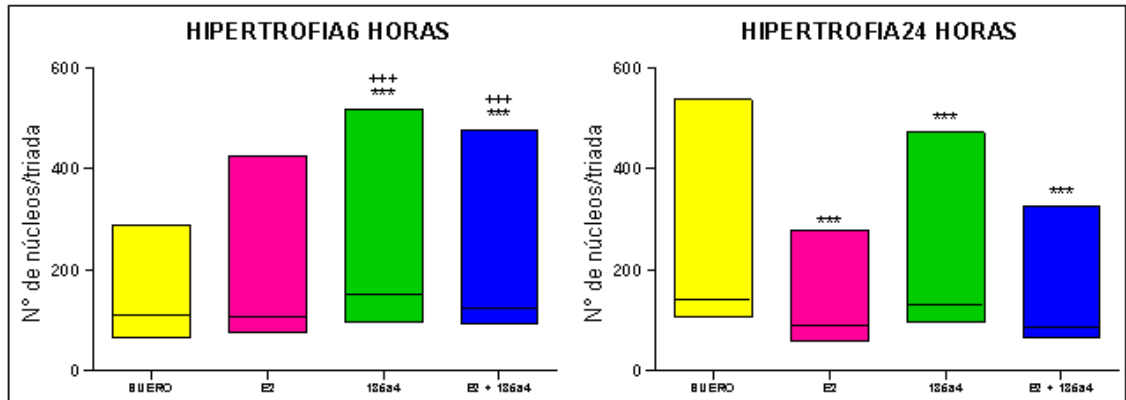


Figura 15. Hipertrofia miometrio circular.

Cada uno de los cuatro grupos de ratas pre-púberes recibió vía s.c. uno de los siguientes tratamientos. a) Suero fisiológico, b) E2, c) 185a4 o d) 185 a4 y una hora después E2. Cada barra representa el rango para cada respuesta y la línea horizontal dentro de ella la mediana de los datos. Los * representan la comparación con la condición adyacente hacia la izquierda y las + el contraste con la condición subsiguiente hacia la izquierda.

* = $0.05 > p > 0.01$, + = $0.05 > p > 0.01$, ** = $0.01 > p > 0.001$, +++ = $0.01 > p > 0.001$, *** = $p < 0.0001$, ++++ = $p < 0.0001$.

Los resultados obtenidos tras la administración de E2 son concordantes con lo descrito en la literatura internacional, es decir la hipertrofia celular solo se manifestó a las 24 y fue muy significativa ($p < 0.0001$). Luego de administrar la fracción no se observó respuesta hipertrófica a 6 y tampoco a 24 h. Al administrar la fracción una hora antes de E2 hubo respuesta significativa sólo a 24 h, la que fue atribuida sólo al efecto de E2 sobre el tejido uterino.

Mitosis

Se sabe que E2 tiene un potente efecto mitótico sobre diversos tejidos. En el caso del útero de rata pre-púber, evaluamos las mitosis inducidas en EL, EG y MC. Encontramos que el efecto mitótico del E2 en EG no era significativo tras la administración de estradiol (datos no mostrados). Para fines de simplicidad decidimos agrupar los datos obtenidos en EL junto a las de MC, resultados que fueron muy similares, por lo que fueron expresados como mitosis uterina.

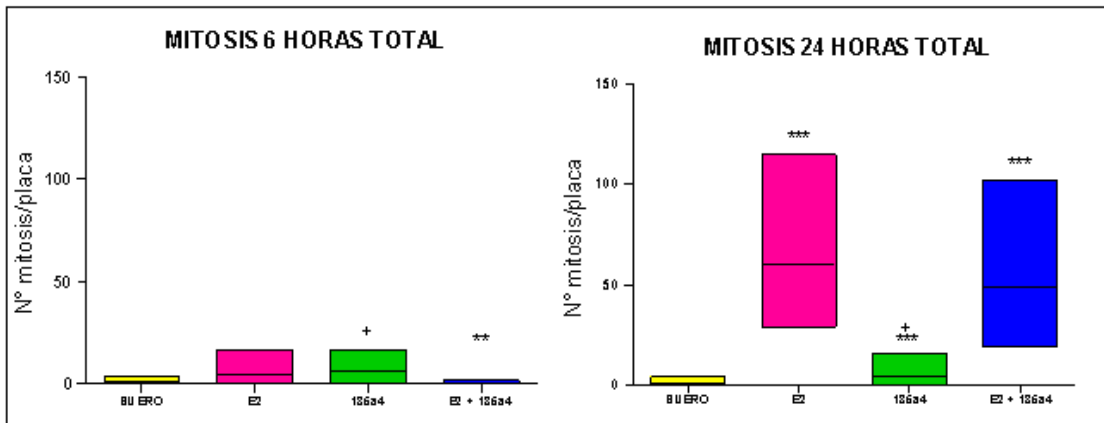


Figura 16. Mitosis total.

Cada grupo de ratas pre-púberes recibió vía s.c. uno de los siguientes tratamientos. a) Suero fisiológico, b) E2, c) 185a4 o d) 185 a4 y una hora después E2. En la figura se muestra el número de mitosis por placa para cada grupo de ratas, donde cada barra representa el rango para cada respuesta y la línea horizontal dentro de ella la mediana de los datos. Los * representan la comparación con la condición adyacente hacia la izquierda y las + el contraste con la condición subsiguiente hacia la izquierda.

* = $0.05 > p > 0.01$, + = $0.05 > p > 0.01$, ** = $0.01 > p > 0.001$, +++ = $0.01 > p > 0.001$, **** = $p < 0.0001$, +++++ = $p < 0.0001$.

Tras la administración de E2 se observó que a 6 h éste no presenta acción mitogénica; sin embargo y concordantemente con lo reportado en la literatura internacional, a las 24 h. se observó un notable incremento del número de células en mitosis por placa. En la misma figura se presenta el efecto mitótico inducido a las 6 h tras la administración de la fracción 185a4, el que fue significativo con respecto al control negativo. Trascorridas 24 h la intensidad de la respuesta a la fracción se mantiene, pero es significativamente menor a la inducida por E2 a 24 h. Cuando ésta fue administrada a las ratas una hora antes de administrar E2 a 6 h no se evidenció respuesta, y a 24 h se observó una respuesta significativa solo atribuible a E2.

Evaluación toxicológica del extracto 185a

En la figura se observa el comportamiento del peso corporal durante el periodo de observación de 14 días post administración del extracto. La administración del extracto 185a por vía oral no afectó el incremento de peso en las ratas.

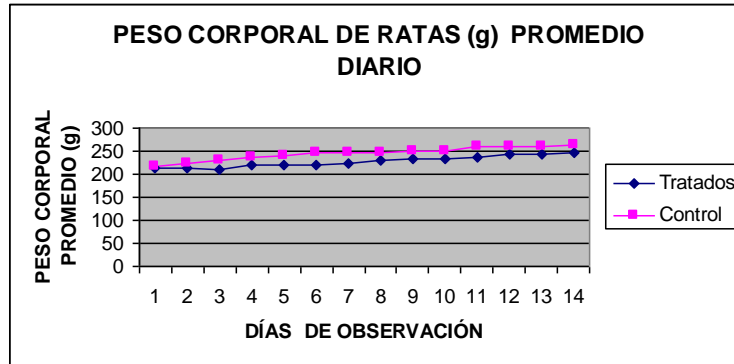


Figura 17. Evolución peso corporal.

No se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las pendientes de la curva de ganancia de peso corporal obtenidas desde el grupo tratado y del control.

Tabla 5. Resultado análisis histopatológico.

| Parámetros Evaluados | Dif. estadística entre grupo control y tratado |
|----------------------|--|
| Hiperemia | NS |
| Hemorragia | NS |
| Edema | NS |
| Fibrosis | NS |
| Inflamación | NS |
| Hiperplasia | NS |
| Atrofia | NS |
| Deg. Grasa | NS |
| Necrosis | NS |
| Binucleación | NS |
| Vacuolización | NS |
| Licuefacción | NS |

Comparación entre grupo control y tratado. Los resultados representan los 3 tejidos analizados: Hígado, riñón y cerebro. NS: No significativa

El análisis tisular del efecto de la fracción 185a4 mostró un leve grado de vacuolización intersticial y necrosis en cerebro, además de hiperemia en tejido renal. Ambos hallazgos no presentaron diferencias significativas en comparación a los tejidos controles.

Caracterización del extracto 185a.

CCF

Los resúmenes de los resultados del rastreo de metabolitos secundarios realizado al extracto se entregan en la tabla 6.

Tabla 6. Resumen resultados CCF.

| Metabolito secundario | Extracto 185 ^a | Reactivo Revelador | Proporción Fase móvil CH ₂ Cl ₂ :EtOAc |
|-----------------------|---------------------------|---|--|
| Alcaloides | - | Dragendorff | (9:1) |
| Esteroles | + | Lieberman-Bürchard p- anisaldehído | (9:1) |
| Antraquinonas | - | Börntrager | (9:1) |
| Flavonoides | + | Luz UV, NP/PEG, AlCl ₃ y NH ₃ | (7:3) |
| Cumarinas | - | Luz UV, NP/PEG, AlCl ₃ y NH ₃ | (9:1) |
| Taninos | + | FeCl ₃ | ---- |
| Saponinas | + | Espuma | ---- |

+: Presencia del metabolito en la muestra, -: Ausencia del metabolito en la muestra

En los siguientes análisis se estudian distintos patrones de metabolitos secundarios y se indica la presencia o ausencia del compuesto en la tabla correspondiente.

Esteroles

Tabla 7. Análisis esteroides.

| Patrón | Extracto 185 ^a | Rf patrón | Rf Extracto |
|------------------|---------------------------|-----------|-------------|
| B-sitosterol | + | 0.5 | 0.52 |
| Lupeol | - | --- | --- |
| Ácido oleanólico | + | 0.288 | 0.288 |
| Ácido Ursólico | - | --- | --- |

+: Presencia del metabolito en la muestra, -: Ausencia del metabolito en la muestra

Según los resultados obtenidos podemos decir que en el extracto etanólico existe un compuesto cuyo Rf es comparable con el del β-sitosterol y posiblemente con el ácido oleanólico, y no existen evidencias de la presencia de lupeol o ácido ursólico.

Flavonoides

Tabla 8. Análisis flavonoides.

| Patron | Extracto 185a | Rf patrón | Rf Extracto |
|---------------|---------------|-----------|-------------|
| Kaempferol | - | 0.67 | - |
| Quercetina | + | 0.19 | 0.19 |
| Genisteína | - | 0.59 | - |
| Daitzeína | - | 0.28 | - |
| Cumestrol | - | 0.54 | - |
| Biochanina | - | 0.85 | - |
| Formononetina | - | 0.66 | - |

+: Presencia del metabolito en la muestra, -: Ausencia del metabolito en la muestra

El análisis de flavonoides del extracto 185a evidenció la presencia de un compuesto con Rf coincidente con el de la quercetina. Los Rf que presentaron otros componentes del extracto son incompatibles con la presencia de los otros patrones empleados en este análisis.

Taninos

Se corroboró su presencia debido al color azulado que tomó el extracto 185a4 al contacto con el reactivo revelador.

Saponinas

Se evidenció su presencia por la aparición de espuma persistente posterior a su agitación.

High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

En la figura 18 se observan 2 picos coincidentes con los tiempos de retención (RT) de los compuestos Kaempferol y Apigenina (ver figura 19)

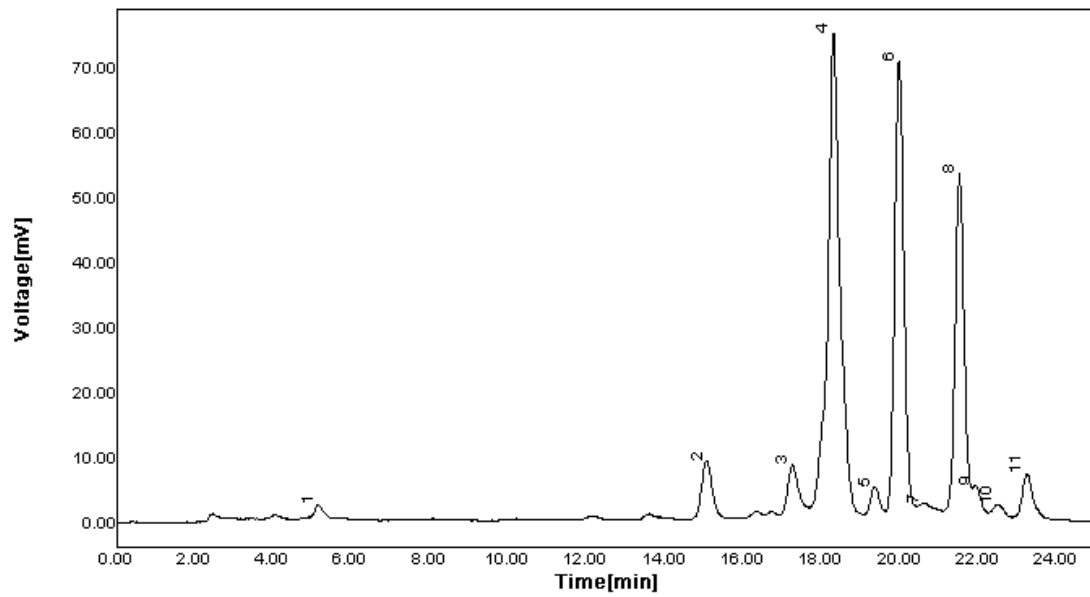


Figura 18. HPLC de la fracción 185a4.

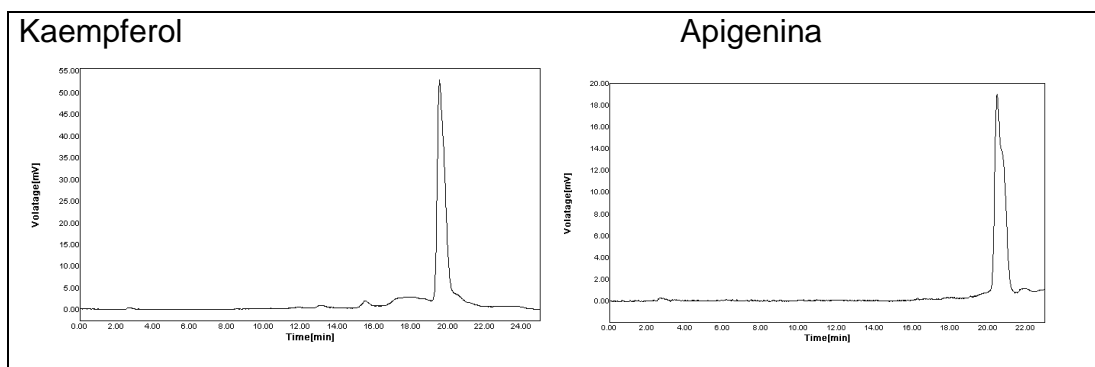


Figura 19. Patrones HPLC

III. DISCUSIÓN

Durante los últimos años, el estudio de la actividad benéfica de extractos naturales de plantas ha tomado gran importancia debido a la enorme variedad de compuestos que existen en el reino vegetal, capaces de inducir respuestas biológicas de todo tipo. Entre los muchos compuestos destacan los FE, que son capaces de inducir más de una respuesta fisiológica y en distintos grados. Por ejemplo, presentan actividad antioxidante, disminuyen el riesgo de enfermedades cardiovasculares y en general, producen diversos efectos benéficos, como la disminución de síntomas del climaterio tanto a corto como largo plazo, y presentan además una baja incidencia de efectos adversos (no aumentan el riesgo de padecer cáncer de mamas o de otro tipo), presentando una clara ventaja sobre los tratamientos actualmente disponibles. Así por ejemplo, la terapia de reemplazo hormonal que es altamente efectiva contra los síntomas climatéricos, no puede ser prescrita a pacientes con antecedentes de cáncer de mama o con factores de riesgo para dicha patología.

Nuestro país no ha estado exento del interés por los productos naturales y es así como desde hace un par de años, el Laboratorio de Endocrinología Experimental y Patología Ambiental de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, ha llevado a cabo estudios sobre la actividad estrogénica de extractos de plantas nativas de distintas zonas geográficas del país.

Para estudiar la actividad de plantas endémicas, se ha utilizado por años el modelo de útero de rata pre-púber [28], debido a la baja presencia de hormonas endógenas y a la completa funcionalidad de los RE a los 21 días de edad. Mediante la utilización de este modelo experimental se han descrito respuestas estrogénicas tempranas, las que se hacen evidentes 6 horas post -administración de E2 y respuestas tardías, donde se ha observado la máxima intensidad de otras respuestas estrogénicas 24 h post administración de E2. Dentro de las respuestas estrogénicas benéficas se incluye al edema y la eosinofilia, en tanto que la inducción de mitosis y la

hipertrofia celular son consideradas respuestas desfavorables. De tal forma que el FE ideal sería aquel capaz de generar sólo las respuestas favorables atribuidas al E2.

Una de las plantas analizadas que más se acerca al FE ideal es la designada con el código 185a. Utilizando el modelo descrito y luego de someter la planta a fraccionamiento con solventes de polaridad creciente, hemos podido demostrar que la fracción polar 185a4 es capaz de inducir respuestas estrogénicas favorables.

Se observó que la fracción 185a4 inducía eosinofilia uterina a las 24 h, esta respuesta no se manifestó a las 6 h como sucede con el E2 (Fig. 12). De lo anterior se deduce que alguno de los compuestos de esta fracción sería capaz de unirse a los RE presentes en los tejidos uterinos analizados, requiriendo más de 6 h para provocar una respuesta estrogénica. Además se observó un efecto antagonista de la fracción 185a4, el cual disminuyó significativamente la respuesta inducida por E2 sólo a las 6 horas. Para explicar lo anterior, puede considerarse que en la fracción 185a4 existe algún compuesto capaz de unirse a RE sin activar los mecanismos que generan eosinofilia pero compitiendo con el estradiol por la unión a estos receptores.

Otra de las respuestas evaluadas fue el edema uterino, desarrollado en estroma superficial y profundo (figuras 13 y 14 respectivamente). En ambos tejidos uterinos la fracción no indujo edema a las 6 h; muy por el contrario, se evidenció un aumento significativo de núcleos por campo ($p < 0,0001$) en relación al grupo tratado con suero. Esto significa que en el grupo que recibió la fracción 185a4 se produjo una deshidratación con la consecuente disminución del volumen celular. Este efecto podría atribuirse a la capacidad de algún compuesto presente en la fracción ensayada, capaz de invertir la direccionalidad de los canales de agua presentes en las células, o de aumentar la permeabilidad. Al respecto, se ha demostrado que algunos FE como la genisteína y la daidzeína pueden cambiar los patrones de expresión de las aquaporinas 1, 3, 5 y 9 presentes en útero de rata [52]

La administración de la fracción 185a4 una hora antes de E2, fue capaz de antagonizar la actividad estrogénica sólo a las 6 h, sugiriendo el uso del mismo mecanismo de acción tanto para la fracción 185a4 como para E2.

Pasadas 24 h la fracción 185a4 fue capaz de provocar una clara respuesta estrogénica (edema) en estroma superficial ($p < 0,0001$) y profundo ($p < 0,05$) donde actuó como un sinergista de la actividad de E2 al administrarlo una hora antes de éste

(Fig. 13 y 14). Lo anterior, al igual que lo observado para eosinofilia sugiere que el compuesto responsable de la actividad del extracto comparte las mismas vías de acción estrogénicas que E2, pero que necesitaría más de 6 h para inducir edema (transactivación más lenta del receptor).

En cuanto a las respuestas tardías, durante este trabajo se midió la capacidad de inducir hipertrofia celular en MC de la fracción 185a4 comparándolo con la de E2. Pasadas 6 h la fracción no es capaz de inducir respuesta significativa, y al igual que en edema incluso se observó un aumento del número de células por campo (Fig. 15). A las 24 h la fracción tampoco indujo hipertrofia celular, pero no se observó el aumento del número de células por campo al contrastarlo con el control negativo.

El último parámetro evaluado *in vivo* también corresponde a los clasificados como respuesta tardía. La fracción 185a4 fue capaz de inducir mitosis uterina a las 6 h, efecto que esta vez fue antagonizado por la actividad de E2 administrado una hora después del extracto; nuevamente apuntando al uso de mismo mecanismo de acción de la fracción y de E2 (Fig. 16). Transcurridas 24 h la fracción mantuvo una actividad mitótica significativa con respecto al control, pero definitivamente mucho menor que la actividad de E2.

Durante el ensayo toxicológico no se observaron signos de toxicidad oral aguda, ni tampoco variación significativa del peso de las ratas tratadas con el extracto completo 185a en comparación con el de las ratas no tratadas, estableciendo que la dosis tóxica para este extracto es mayor a la utilizada durante este ensayo (5g/kg de peso corporal de rata), dosificación máxima permitida en ensayos de toxicidad oral aguda en ratas según la OECD/OCDE. Estos resultados confirman la presunción del bajo riesgo para la salud del uso de este extracto.

Anexo a lo anterior se realizaron análisis cualitativos del extracto polar 185a y de su fracción 185a4. La cromatografía en capa fina permitió detectar cualitativamente la presencia de esteroides como β -sitosterol utilizado en el tratamiento de la hiperplasia prostática, la quercetina y el ácido oleanólico además de la presencia de taninos y saponinas no identificados, descartando la presencia de los siguientes FE: genisteína, daidzeína, cumestrol, biochanina A y formononetina. No se descarta la presencia de

otros principios activos. Estos resultados son casi totalmente concordantes con el análisis por HPLC, el que también descartó la presencia de genisteína, daidzeína, pero además constató la presencia de kaemferol y apigenina. Esta discrepancia con el método de CCF puede deberse a la baja concentración del kaempferol en el extracto, que si se pudo evidenciar con una técnica más sensible como HPLC, por lo que los efectos *in vivo* de este extracto podrían ser atribuidos al Kaempferol y/o apigenina, o a otras moléculas aún no identificadas, y no necesariamente a un FE.

V. CONCLUSIONES

- Luego de administrar la fracción 185a4 a ratas pre-púberes se observa eosinofilia uterina significativa a 24 h. La fracción podría actuar como antagonista estrogénico debido a que inhibe la respuesta inducida por 17- β estradiol aunque sólo a las 6 h.
- La fracción 185a4 induce edema uterino en estroma profundo y superficial a 24 h y podría actuar como antagonista estrogénico ya que inhibe la respuesta a E2 a 6 h, o como sinergista debido a la potenciación del efecto estrogénico evidenciado a 24 h.
- La fracción 185a4 no tuvo la capacidad de inducir hipertrofia uterina a 6 ni a 24 h, y tampoco modificó la respuesta E2 al administrarse conjuntamente.
- La fracción 185a4 produce mitosis uterina a 6 y a 24 h, aunque cabe destacar que a 24 h la respuesta a la fracción 185a4 fue significativamente menor a la inducida por E2.
- El extracto 185a no genera toxicidad oral aguda a una dosis de 5g/kg de peso corporal de rata, ni produce alteraciones patológicas asociadas a su consumo en hígado riñón o cerebro.
- Los resultados obtenidos mediante HPLC y CCF para el extracto 185a sugieren la presencia de esteroides como β -sitosterol, quercetina y ácido oleanólico y de flavonoides como apigenina y kaempferol

VI. REFERENCIAS

1. Petri Nahas, E., y cols., *Benefits of soy germ isoflavones in postmenopausal women with contraindication for conventional hormone replacement therapy*. *Maturitas*, 2004. 48(4): p. 372-80.
2. Loewe S, Spohr E., *Über welche Sexual hormone*. *Biochem Zeitschr*, 1927. 180: p. 1-26.
3. Bennetts, H.W., Underwood, E.J., and Shier, F.L., *A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia*. *Aust Vet J*, 1946. 22: p. 2-12.
4. Lowenstein, F.W., *Major nutritional findings from the First Health and Nutrition Examination Survey in the United States of America, 1971-1974*. *Bibl Nutr Dieta*, 1981(30): p. 1-16.
5. Adlercreutz, H. and Mazur, W., *Phyto-oestrogens and Western diseases*. *Ann Med*, 1997. 29(2): p. 95-120.
6. Avendaño, C., *Introducción a la química y farmacia* 2001.
7. Guyton, A.C. and Hall, J.E., *Textbook of medical physiology*. 11th ed. 2006, Philadelphia: Elsevier Saunders. xxxv, 1116 p.
8. Williams, R.H. and Wilson, J.D., *Williams textbook of endocrinology*. 9th ed. 1998, Philadelphia: Saunders. xix, 1819 p.
9. Arriagada, M., *Recomendaciones de tratamiento en la Menopausia*. *REV CHIL OBSTET GINECOL*, 2005. 70(5): p. 340-345.
10. Wilson, D.H., Taylor, A.W. and A.H. MacLennan, *Health status of hormone replacement therapy users and non-users as determined by the SF-36 quality-of-life dimension*. *Climacteric*, 1998. 1(1): p. 50-4.
11. Oyarzabal, A.M., *Sesiones Clínicas Ginecológicas*. M.R.I., 2005: p. 181-182.
12. Cópola, F., *Metabolismo de los estrógenos endógenos y cáncer de mama*. *Rev Med Uruguay*, 2005. 21: p. 15-22.
13. Ruggiero, R.J. and Likis, F.E. *Estrogen: physiology, pharmacology, and formulations for replacement therapy*. *J Midwifery Womens Health*, 2002. 47(3): p. 130-8.
14. Jensen, E.V. and DeSombre, E.R. *Estrogen-receptor interaction*. *Science*, 1973. 182(108): p. 126-34.
15. Kuiper, G.G., y cols. *Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1996. 93(12): p. 5925-30.
16. Ho, K.J. and Liao, J.K. *Nonnuclear actions of estrogen*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2002. 22(12): p. 1952-61.
17. Tsai, M.J. and O'Malley, B.W. *Molecular mechanisms of action of steroid/thyroid receptor superfamily members*. *Annu Rev Biochem*, 1994. 63: p. 451-86.
18. Greene, G.L., y cols. *Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA*. *Science*, 1986. 231(4742): p. 1150-4.
19. Moore, J.T., et al., *Cloning and characterization of human estrogen receptor beta isoforms*. *Biochem Biophys Res Commun*, 1998. 247(1): p. 75-8.
20. Warner, M., Nilsson, S. and Gustafsson, J.A. *The estrogen receptor family*. *Curr Opin Obstet Gynecol*, 1999. 11(3): p. 249-54.

21. Jordan, V.C., y cols. *Structure-activity relationships of estrogens*. Environ Health Perspect, 1985. 61: p. 97-110.
22. Segars, J.H. and Driggers, P.H. *Estrogen action and cytoplasmic signaling cascades. Part I: membrane-associated signaling complexes*. Trends Endocrinol Metab, 2002. 13(8): p. 349-54.
23. Pettersson, K., y cols. *Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha*. Mol Endocrinol, 1997. 11(10): p. 1486-96.
24. Kulakosky, P.C., y cols. *Response element sequence modulates estrogen receptor alpha and beta affinity and activity*. J Mol Endocrinol, 2002. 29(1): p. 137-52.
25. McKenna, N.J. and O'Malley, B.W. *Minireview: nuclear receptor coactivators--an update*. Endocrinology, 2002. 143(7): p. 2461-5.
26. Smith, D.F. and Toft, D.O. *Steroid receptors and their associated proteins*. Mol Endocrinol, 1993. 7(1): p. 4-11.
27. Mendelsohn, M.E. and Karas, R.H. *The protective effects of estrogen on the cardiovascular system*. N Engl J Med, 1999. 340(23): p. 1801-11.
28. Tchernitchin, A., *Fine structure of rat uterine eosinophils and the possible role of eosinophils in the mechanism of estrogen action*. J Steroid Biochem, 1973. 4(3): p. 277-82.
29. Grunert, G., y cols. *Progesterone interaction with eosinophils and with responses already induced by oestrogen in the uterus*. J Endocrinol, 1984. 102(3): p. 295-303.
30. Tchernitchin, A.N. and P. Galand, *Dissociation of separate mechanisms of estrogen action by actinomycin D*. Experientia, 1982. 38(4): p. 511-3.
31. Kaye, A.M., Sheratzky, D. and Lindner, H.R. *Kinetics of DNA synthesis in immature rat uterus: age dependence and estradiol stimulation*. Biochim Biophys Acta, 1971. 261(2): p. 475-86.
32. Usui, T., *Pharmaceutical prospects of phytoestrogens*. Endocr J, 2006. 53(1): p. 7-20.
33. Allué, J., *Fitoestrógenos: Biología animal y biología vegetal*. Ginecología Clínica y Quirúrgica, 2001. 2(3): p. 163-165.
34. Patisaul, H.B. and Jefferson, W. *The pros and cons of phytoestrogens*. Front Neuroendocrinol, 2010. 31(4): p. 400-19.
35. Benvenuto, R. *Los Fitoestrógenos ¿ alternativa a la THR en el climaterio? Fronteras en Obstetricia y Genecología*, 2002. 2(1): p. 49-60.
36. Jablonski, E.M., y cols. *Estrogen regulation of aquaporins in the mouse uterus: potential roles in uterine water movement*. Biol Reprod, 2003. 69(5): p. 1481-7.
37. Murkies, A.L., Wilcox, G. and Davis, S.R. *Clinical review 92: Phytoestrogens*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. 83(2): p. 297-303.
38. Markiewicz, L., y cols. *In vitro bioassays of non-steroidal phytoestrogens*. J Steroid Biochem Mol Biol, 1993. 45(5): p. 399-405.
39. Zhang, J.Q., y cols. *Distribution and differences of estrogen receptor beta immunoreactivity in the brain of adult male and female rats*. Brain Res, 2002. 935(1-2): p. 73-80.
40. Kushner, P.J., y cols. *Oestrogen receptor function at classical and alternative response elements*. Novartis Found Symp, 2000. 230: p. 20-6; discussion 27-40.

41. Revankar, C.M., y cols. *A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling*. Science, 2005. 307(5715): p. 1625-30.
42. Price, K.R. and Fenwick, G.R. *Naturally occurring oestrogens in foods--a review*. Food Addit Contam, 1985. 2(2): p. 73-106.
43. Oseni, T., y cols. *Selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens*. Planta Med, 2008. 74(13): p. 1656-65.
44. Pérez, G. *La menopausia y los fitoestrógenos*. Temas de Hoy. 2001, 2001.
45. Garrido, A. *Fitoestrógenos dietarios y sus potenciales beneficios en la salud del adulto humano*. Revista Médica Chile, 2003. 131: p. 1321-1328.
46. Knight, D.C. and Eden, J.A. *Phytoestrogens--a short review*. Maturitas, 1995. 22(3): p. 167-75.
47. Fotsis, T., y cols. *Genistein, a dietary-derived inhibitor of in vitro angiogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1993. 90(7): p. 2690-4.
48. Fujimoto, W.Y., y cols. *Glucose intolerance and diabetic complications among Japanese-American women*. Diabetes Res Clin Pract, 1991. 13(1-2): p. 119-29.
49. Pino, A. *Dietary isoflavones effect*. J Clin and Metab, 2000. 85: p. 2797-2800.
50. Wuttke, W., H. Jarry, and D. Seidlova-Wuttke, *Isoflavones--safe food additives or dangerous drugs?* Ageing Res Rev, 2007. 6(2): p. 150-88.
51. The Organization for Economic Cooperation and Develop, *Guidelines for Testing of Chemicals*. 1992. Protocolo 420.
52. Möller F., y cols. *Long-term dietary isoflavone exposure enhances estrogen sensitivity of rat uterine responsiveness mediated through estrogen receptor alpha*. Toxicol Lett. 2010. 196(3):142-53.

