



UNIVERSIDAD DE CHILE



FACULTAD DE CIENCIAS VETERINARIAS Y PECUARIAS
ESCUELA DE CIENCIAS VETERINARIAS

**EFFECTOS DE FITOESTRÓGENOS PRESENTES EN UN
EXTRACTO DE PLANTA MEDICINAL SOBRE ALGUNAS
RESPUESTAS ESTROGÉNICAS GENÓMICAS Y NO-
GENÓMICAS EN ÚTERO DE RATA PREPÚBER**

CLAUDIO ARENAS ZAMORA

Memoria para optar al Título
Profesional de Médico Veterinario
Departamento de ciencias biológicas

PROFESOR GUÍA : ANDREI TCHERNITCHIN V.

PROFESOR CONSEJERO: MARCO GALLEGUILLOS C.

PROFESOR CONSEJERO: BESSIE URQUIETA M.

**SANTIAGO, CHILE
2009**

AGRADECIMIENTOS

Esta memoria es la culminación de un largo trayecto reflejo de esfuerzo, dedicación, perseverancia, conocimientos, experiencia y gratitud. Este camino hubiese sido imposible de recorrer sin el apoyo de aquellas personas que compartieron conmigo sus conocimientos y su amistad.

En primer lugar deseo agradecer a mis padres, Javier y Adriana, y en especial a mi hermana, Magaly Arenas, por su guía, su comprensión y apoyo incondicional a lo largo de todos estos años. Esta memoria se las dedico a ellos por su amor y por creer en mí.

Agradezco al doctor Andrei Tchernitchin por su paciencia, su dedicación y los conocimientos entregados en estos tres años.

Deseo destacar el apoyo incondicional del profesor Leonardo Gaete, ejemplo docente digno de imitar, por todo el tiempo dedicado a esclarecer dudas de materias no concernientes a mi carrera y por su amistad. Valoro también el apoyo docente de los profesores Rodrigo Bustamante y Karla Ferrada. Agradezco a Iris Rodríguez por su trabajo técnico, su amistad y su humor peculiar, que hicieron posible un ambiente de trabajo más cálido y divertido.

Finalmente, agradezco a todos los profesores de veterinaria que me entregaron las herramientas necesarias para emprender esta nueva etapa de vida profesional.

INDICE GENERAL

Páginas.

AGRADECIMIENTOS	ii
INDICE GENERAL	iii
INDICE TABLAS Y FIGURAS	v
RESUMEN	vii
SUMMARY	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	3
2.1.- Dinámica de acción de las hormonas esteroidales.....	3
2.1.1.- Receptores estrogénicos.....	3
2.1.2.- Respuesta genómica.....	4
2.1.3.- Respuesta no-genómica.....	6
2.2.- Fitoestrógenos.....	8
2.2.1.- Clasificación y fuentes alimenticias de fitoestrógenos.....	8
2.2.2.- Estructura, absorción y metabolismo de los fitoestrógenos.....	11
2.2.3.- Efectos biológicos de los fitoestrógenos.....	14
2.2.3.1.- Efectos cardiovasculares.....	14
2.2.3.2.- Efectos anticancerígenos.....	15
2.2.3.3.- Efectos sobre estructura ósea.....	19
2.2.3.4.- Otros efectos.....	20
2.3.- Fitoestrógenos y la medicina veterinaria.....	23
III. OBJETIVOS	26
3.1.- Objetivo General.....	26
3.2.- Objetivos específicos.....	26
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	27
4.1.- Animales de experimentación.....	27
4.2.- Preparación de las soluciones.....	27

4.2.1. Soluciones controles.....	27
4.2.2. Soluciones fitoestrógenos.....	28
4.3.- Procedimiento experimental para la obtención de cortes histológicos uterinos de ratas.....	29
4.4.- Variables morfométricas de evaluación de respuesta estrogénica.....	32
4.4.1.- Evaluación no genómica.....	32
4.4.2.- Evaluación genómica.....	35
4.5.- Análisis estadístico.....	36
V. RESULTADOS.....	37
5.1.- Extracto 21a.....	37
5.1.1.- Eosinofilia uterina.....	37
5.1.2.- Eosinofilia por estrato uterino.....	38
5.1.3.- Distribución y degranulación.....	40
5.1.4.- Edema endometrio profundo.....	41
5.1.5.- Edema endometrio superficial.....	42
5.1.6.- Hipertrofia miometrio circular.....	43
5.2.- Extracto 22a.....	44
5.2.1.- Eosinofilia uterina.....	44
5.2.2.- Eosinofilia por estrato uterino.....	45
5.2.3.- Distribución y degranulación.....	47
5.2.4.- Edema endometrio profundo.....	48
5.2.5.- Edema endometrio superficial.....	49
5.2.6.- Hipertrofia miometrio circular.....	50
VI. DISCUSIÓN.....	52
VII. CONCLUSIONES.....	58
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	59

INDICE DE TABLAS

Tabla 1	Clasificación de las principales moléculas con actividad estrogénica.....	9
Tabla 2	Fuentes alimenticias de fitoestrógenos.....	10
Tabla 3	Cuadro resumen de condiciones experimentales, horas post-sacrificio y número de ratas por grupos.....	29
Tabla 4	Abreviaturas de las condiciones experimentales a las 6 y 24 h post tratamiento.....	37
Tabla 5	Comparación actividad antagonista de los dos extractos.....	51
Tabla 6	Comparación actividad agonista de los dos extractos.....	51

INDICE DE FIGURAS

Figura 1	Estructura de las principales isoflavonas y lignanos.....	11
Figura 2	Fotografía extracción cuernos uterinos	30
Figura 3	Distribución de tríadas sobre portaobjetos.....	31
Figura 4	Fotografía de corte cuerno uterino de rata prepúber.....	33
Figura 5	Fotografía capas tisulares uterinas.....	33
Figura 6	Fotografía de eosinófilos uterinos.....	33
Figura 7	Fotografía de útero de ratas sin edema.....	34
Figura 8	Fotografía de útero de ratas con edema.....	34
Figura 9	Fotografía tejido uterino sin hipertrofia.....	35
Figura 10	Fotografía tejido uterino con hipertrofia.....	35
Figura 11	Eosinofilia uterina extracto 21a 6 y 24 h.....	37
Figura 12	Eosinofilia en endometrio y miometrio, extracto 21a 6 y 24 h.....	38
Figura 13	Eosinofilia en endometrio, extracto 21a 6 y 24 h.....	39
Figura 14	Proporción de eosinófilos localizados en miometrio y endometrio [A], extracto 21a 6 y 24 h.....	40
	Proporción de eosinófilos degranulados y no degranulados [B], extracto 21a 6 y 24 h.....	40
Figura 15	Edema endometrial profundo, extracto 21a 6 y 24 h.....	41

Figura 16	Edema endometrial superficial, extracto 21a 6 y 24 h.....	42
Figura 17	Hipertrofia miometrio circular, extracto 21a 6 y 24 h.....	43
Figura 18	Eosinofilia uterina extracto 22a 6 y 24 h.....	44
Figura 19	Eosinofilia en endometrio y miometrio, extracto 22a 6 y 24 h.....	45
Figura 20	Eosinofilia en endometrio, extracto 22a 6 y 24 h.....	46
Figura 21	Proporción de eosinófilos localizados en miometrio y endometrio [A], extracto 22a 6 y 24 h.....	47
	Proporción de eosinófilos degranulados y no degranulados [B], extracto 22a 6 y 24 h.....	47
Figura 22	Edema endometrial profundo, extracto 22a 6 y 24 h.....	48
Figura 23	Edema endometrial superficial, extracto 22a 6 y 24 h.....	49
Figura 24	Hipertrofia miometrio circular, extracto 22a 6 y 24 h.....	50

RESUMEN

Las acciones estrogénicas de los fitoestrógenos han sido ampliamente estudiadas en las últimas décadas. Estos efectos agonistas y/o antagonistas estrogénicos en diversos órganos, despertó el interés de la comunidad científica en la medicina tradicional y ancestral.

El presente estudio *in vivo*, se realizó en útero de ratas impúberes de 21 días de edad, tratadas con dos extractos preparados a partir de la misma planta medicinal, pero procesados de forma distinta. Las ratas fueron inyectadas subcutáneamente con cada uno de los extractos o su vehículo y/o 17β estradiol; los cuernos uterinos fueron extraídos 6 y 24 h post-tratamiento y luego procesados histológicamente. Las variables no genómicas evaluadas fueron: número de eosinófilos uterinos, su distribución dentro del útero, porcentaje de eosinófilos degranulados y edema en estroma endometrial profundo y superficial. Entre las respuestas genómicas se evaluó hipertrofia celular en miometrio circular.

En ausencia de estradiol, los extractos **21a** (solución hidroalcohólica) y **22a** (solución etanólica) no inducen eosinofilia uterina, pero generan edema en estroma, aunque de menor magnitud que el generado por estrógeno. Los dos extractos generaron una hipertrofia de miometrio circular de magnitud comparable a la generada por estradiol. La administración del extracto **21a**, previo a la administración de 17β estradiol, disminuyó drásticamente la eosinofilia, efecto que no fue generado por el extracto **22a**. Sin embargo, con ambos extractos se evidenció una mayor proporción de eosinófilos en los tejidos más profundos de útero (miometrio circular y estroma) y una mayor proporción de degranulados, en comparación a lo observado con 17β estradiol. La administración de cada

extracto asociado a 17β estradiol, generó edema endometrial de mayor magnitud al generado por estrógeno, para el caso del extracto **22a** la máxima respuesta se observó a las 6 h y para el extracto **21a** a las 24 h. Se observó un efecto potenciador de la hipertrofia celular de miometrio circular a las 24 h, luego de administrar los extractos asociados a 17β estradiol.

El extracto **21a** mostró la capacidad de generar respuestas no genómicas (edema) y genómicas (hipertrofia), e inhibir la eosinofilia en útero de rata prepúber, por lo que posee algún principio activo con capacidad de disociar respuestas estrogénicas. Se hace necesario evaluar otras respuestas estrogénicas consideradas de riesgo, tales como hiperplasia uterina para visualizar potenciales aplicaciones terapéuticas.

SUMMARY

The oestrogenic actions of phytoestrogens were widely investigated during the last decades. Their beneficial effects are well documented in experimental and in epidemiological studies. Their agonistic and/or antagonistic oestrogenic effects in various organs oriented the scientific community interest on traditional and ancestral medicine.

The present *in vivo* study was performed in immature 21-day-old female rats, treated with two extracts prepared from the same medicinal plant but processed in a different way. The rats were subcutaneously injected with one of both extracts or vehicle and/or 17 β estradiol, the uterine horns were excised 6 and 24 h after hormone or extract treatment, and further histologically processed. The following non-genomics parameters were evaluated: number of uterine eosinophils, their distribution within the uterus, percentage of degranulated eosinophils, and edema in deep and superficial endometrial stroma. Among genomic responses, circular myometrial cell hypertrophy was evaluated.

In the absence of oestradiol, the extracts **21a** (hydroalcoholic solution) and **22a** (ethanolic solution) do not induce uterine eosinophilia but cause an endometrial oedema of less magnitude than the induced for oestrogen. Both extracts cause myometrial cell hypertrophy of similar magnitude than generated by oestradiol. The association extract **21a**, but not **22a**, displayed an antagonistic effect for uterine eosinophilia. Both extracts showed a greater proportion of eosinophils in the deeper tissues of uterus (myometrium and endometrium) and a greater proportion of degranulated eosinophils as compared to treatment with oestradiol alone. The association of extracts **21a** or **22a** with estradiol induces endometrial oedema of greater magnitude than that induced by oestrogen alone, at 6 h (extract **22a**) or 24 h (extract **21a**) of estrogen treatment. In addition, an important

synergistic effect of the extracts on estrogen-induced myometrial hypertrophy was observed at 24 h after hormone treatment.

The extract **21a** showed the capacity to induce responses no genomic (oedema) and responses genomic (hipertrophy) and inhibition of eosinophilia in uterus the rat prepuber, dissociate estrogenic responses in the rat uterus. Other estrogenic responses considered at risk, such as uterine hyperplasia, need to be evaluated to foresee potential therapeutic applications.

I. INTRODUCCIÓN

El estrógeno, una hormona descubierta a principios del siglo XX, que en la actualidad continúa sorprendiendo a la comunidad científica por sus complejos mecanismos de acción genómicos y no genómicos sobre diversos tejidos vivos humanos y animales. Hoy en día la comunidad mundial esta expuesta a una gran gama de productos químicos con acción estrogénica, entre éstos se encuentra el uso de estrógenos sintéticos propios de terapias anticonceptivas, de moléculas con acción estrogénica selectiva (tamoxifeno, raloxifeno) de uso en terapias de reemplazo hormonal y a sustancias no esteroideas con actividad estrogénica potente constituyentes de plaguicidas, materiales plásticos y de desecho. Las consecuencias de su acción en el organismo pueden ser muy diversas, que van desde efectos indeseables como bochornos, descargas vaginales, menstruaciones irregulares, trombosis venosa e hiperplasia endometrial hasta el desarrollo de ciertos cánceres hormono-dependientes como por ejemplo cáncer endometrial y mamario. Éstas son algunas de las razones por las cuales existe un creciente interés de las ciencias médicas actuales por el rol fisiológico y farmacológico de los componentes bioactivos presentes en las plantas y de los efectos capaces de producir en los tejidos vivos. Las sustancias de origen vegetal con propiedades agonistas estrogénicas en algunos tejidos y antagonistas en otros se les conoce bajo el nombre de fitoestrógenos y esta acción selectiva, los hace futuros candidatos para utilizarlos como moduladores selectivos de receptores estrogénicos (SERM) en las terapias de reemplazo hormonal (Fitzpatrick, 1999). Existen numerosos estudios que aportan resultados convincentes sobre la acción benéfica de los fitoestrógenos en hueso, sistema cardiovascular, desórdenes cognitivos, sintomatología climatérica, metabolismo de lípidos, diabetes y cáncer (Takeshi, 2006).

El presente estudio utilizará un extracto de planta nativa chilena de la cual se tiene antecedentes de acción estrogénica y antiestrogénica basados en conocimientos de pueblos originarios sobre la flora medicinal autóctona. Se observarán los cambios en algunas respuestas estrogénicas no genómicas y genómicas sobre útero de ratas pre-púberes. En relación a las respuestas no-genómicas, los eosinófilos migran al útero luego de la exposición a estrógenos y degranulan su contenido, provocando cambios en la matriz extracelular, entre los cuales el más evidente es el edema endometrial. Las variables no genómicas a evaluar son edema uterino, número, distribución y degranulación de eosinófilos uterinos. Entre las respuestas genómicas a evaluar, se encuentra la hipertrofia celular en miometrio circular.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

2.1. DINÁMICA DE ACCIÓN DE LAS HORMONAS ESTEROIDALES

La actividad biológica de un esteroide está determinada por el número de carbonos presentes en su estructura; así, podemos decir que un esteroide de 21 carbonos tiene propiedad de progestágeno, uno de 19 carbonos tiene acción de andrógeno, en cambio uno de 18 carbonos tiene actividad de estrógeno; todos los cuales poseen un origen común desde un esteroide de 27 carbonos conocido como colesterol (Hafez, 1996).

El ovario sintetiza al menos 8 tipos de estrógenos; entre ellos el estradiol, y en menor importancia estrona y estriol. El estradiol circula en el plasma unido en un 58% a la albúmina, en un 40% a la proteína transportadora de hormonas sexuales (SHGB) y el 2% restante circula libre por el plasma (Tresguerres *et al.*, 2005). En el hígado sufren conjugaciones con ac. glucurónico y ac. sulfúrico, reduciendo su actividad y facilitando su excreción biliar y urinaria (Flórez *et al.*, 2003).

2.1.1. RECEPTORES ESTROGÉNICOS

Hasta el momento se han descrito dos isoformas de receptores estrogénicos nucleares, denominados alfa ($RE\alpha$) y beta ($RE\beta$) (Ascenzi *et al.*, 2006), sin embargo, esta clasificación no excluye la existencia de otras isoformas que no han sido demostradas por trabajos de investigación.

En cuanto a su distribución, los receptores de estrógenos α y β se coexpresan en hueso, ovario, mama y en vasos sanguíneos (Nilsson *et al.*, 2001). El $RE\alpha$ tiene una alta a

moderada expresión en hipófisis, útero, testículo, epidídimo, riñón y glándulas suprarrenales; por el contrario, los RE β tienen una alta expresión en tejidos tales como próstata, vías urinarias, pulmón y vejiga (Kuiper *et al.*, 1997). Existen disruptores endocrinos que se unen con una afinidad menor, mayor o similar a ambos tipos de receptores estrogénicos, entre ellos podemos mencionar al DDT (1,1,1-Tricloro-2,2-bis(4-clorofenil)-etano), PCB (bifenoles policlorinados) y las dioxinas. Los fitoestrógenos también se unen a receptores estrogénicos y pueden inducir o modificar al menos algunos de los efectos mediados por ellos. La zearalenona, genisteína, cumestrol y daidzeína son los fitoestrógenos más potentes, los cuales tienen una más alta afinidad por el RE β (Kuiper *et al.*, 1998) y, por consiguiente, una mayor potencia para gatillar la actividad transcripcional más con el RE β que con el RE α (Jinping *et al.*, 2001). En estos receptores se reconocen tres dominios funcionales independientes que interaccionan entre ellos. El dominio AF-1 (A/B; extremo aminoterminal), fracción del receptor independiente del ligando, que no necesita fijar estradiol para iniciar la transcripción génica (Levin, 2005). El dominio AF-2 (dominio D/E/F extremo carboxiterminal), dependiente del ligando, donde se fijan estradiol y fitoestrógenos. Existe un tercer sitio de interacción conocido como dominio de unión al ADN o dominio C, que participa en la dimerización del receptor y en la unión de éste a las secuencias específicas de ADN (Nilsson *et al.*, 2001).

2.1.2. RESPUESTA GENÓMICA

En estado de reposo o en ausencia de ligandos los receptores estrogénicos se encuentran unidos a proteínas de shock térmico 70 y 90 (HSP). En presencia del ligando las HSP se disocian del receptor y éste sufre cambios conformacionales que permiten su translocación al núcleo (Ascenzi *et al.*, 2006). El complejo hormona- receptor se une a

secuencias específicas de ADN conocidas como elementos de respuesta a estrógenos (ERE) y, como consecuencia, se produce un cambio en la velocidad de transcripción de los genes que contienen los elementos de respuesta hormonal (Tresguerres *et al.*, 2005). Esta descripción corresponde al mecanismo clásico de acción de las hormonas esteroidales y constituye lo que se conoce como respuesta genómica.

Los receptores de estrógenos pueden regular la expresión génica a través de distintos mecanismos (Björnström & Sjöberg., 2005):

- a) Unión del complejo estrógeno-receptor directamente a los genes blanco de estrógenos (ERE).
- b) El complejo estrógeno-receptor se une a un factor de transcripción que interactúa con los promotores de ciertos genes.
- c) A través de acciones genómicas independientes de ligando que fosforilan y activan al receptor para unirse a los ERE (ej; receptores fosforilados por factores de crecimiento).
- d) El estrógeno se une a una proteína de membrana plasmática que activa las cascadas de proteínas quinasas que fosforilan receptores estrogénicos y factores de transcripción que actúan sobre el ADN, permitiendo la expresión de un amplio número de genes que responden a estrógenos sin mediar un ERE, por ejemplo proteína GPR 30 acoplada a proteínas G presentes en la membrana plasmática (Prossnitz *et al.*, 2007).

Las respuestas génicas finales dependerán entonces de la interacción directa del receptor con el ADN, del reclutamiento de cofactores y co-represores, de la localización celular de los receptores y de las modificaciones químicas del receptor de estrógenos (Diel, 2002).

La existencia de esta respuesta genómica se evidencia con el uso de actinomicina D (antibiótico y antineoplásico), fármaco que bloquea la transcripción. El resultado de un experimento demostró que la actinomicina D cuando fue administrada a ratas impúberes 1h antes de los estrógenos, bloqueó el aumento inducido por estrógenos en el contenido de proteínas y RNA, pero no bloqueó la eosinofilia uterina inducida por estrógenos ni el aumento del peso húmedo uterino, ambas respuestas no-genómicas (Tchernitchin & Galand, 1982). Este hecho dejó en evidencia la existencia de una respuesta de tipo no genómica e independiente de la respuesta genómica.

2.1.3. RESPUESTA NO GENÓMICA

Tchernitchin ha postulado un segundo mecanismo de acción hormonal para los estrógenos, el cual involucra a los leucocitos eosinófilos. De acuerdo a la propuesta, existiría un receptor de estrógenos en la superficie del eosinófilo que cumple con las siguientes características: a) alta afinidad de unión por 17β estradiol, b) alta especificidad por moléculas de acción estrogénica, pero no por otras hormonas esteroideas (progesterona, testosterona y corticosterona) y c) saturabilidad y competencia (Tchernitchin, 1969; Tchernitchin *et al.*, 1985).

Dentro del útero, con posterioridad a la administración de 17β estradiol, los eosinófilos se encuentran predominantemente en el estroma profundo de la mucosa y en el tejido conectivo entre las capas musculares, y, en grado menor, en el estroma subepitelial de la mucosa y otros lugares. La captación de estradiol tritiado por el receptor de membrana en eosinófilos es disminuída por la presencia de 17β estradiol, estriol y estrona (Tchernitchin, 1971).

Una vez que se forma el complejo hormona receptor en la superficie de los eosinófilos, éste sería reconocido por receptores presentes en los vasos sanguíneos y migrarían desde la sangre al interior del útero, liberando diversos agentes inductores de edema uterino, aumento de permeabilidad vascular y otras respuestas estrogénicas (Tchernitchin *et al.*, 1989). Esta migración se observa a los pocos minutos de la inyección endovenosa de estradiol y la máxima intensidad de esta respuesta estrogénica no genómica se produce entre las 6-12 h post-tratamiento con estradiol (Tchernitchin *et al.*, 1974, Tchernitchin *et al.*, 1978). Se sabe que el 17β estradiol es un estrógeno potente para inducir acumulación de eosinófilos en el útero, sin embargo se ha visto que otras sustancias estrogénicas, tales como, 17α estradiol (Silva *et al.*, 1997) y Dietilsilbestrol (DES) (Grunert *et al.*, 1986) son capaces de inducir una mayor degranulación de eosinófilos sanguíneos en comparación con estradiol.

Si bien es cierto que la migración y degranulación de eosinófilos en útero desarrolla edema uterino, no podemos obviar la participación de otros mecanismos paralelos y complementarios a la generación de este edema. Uno de estos mecanismos, es la liberación de óxido nítrico (Kim *et al.*, 2008) y prostaciclina (Bukhtiar, 2005) en el endotelio capilar en respuesta a estrógeno, los cuales son potentes vasodilatadores que conducen a un aumento de la permeabilidad vascular uterina y por ende a un mayor edema local.

2.2. FITOESTRÓGENOS

2.2.1. CLASIFICACIÓN Y FUENTES ALIMENTICIAS DE FITOESTRÓGENOS

Los estrógenos se dividen en naturales y sintéticos (Tabla 1). Entre los estrógenos naturales se encuentran los micoestrógenos como la zearalenona que es producida por los hongos que contaminan los cereales almacenados en condiciones de humedad y a los fitoestrógenos que son productos de síntesis de algunas plantas y con acción biológica semejante a la de los estrógenos, aunque la mayoría de ellos al carecer del núcleo esteroide de 18 carbonos no son esteroides. Entre los sintéticos encontramos a los promotores del crecimiento (mejor conocidos como anabólicos) y a los xenoestrógenos como algunos pesticidas, compuestos derivados de materiales plásticos o diversos productos de desecho, entre otros.

Existen tres grupos principales de fitoestrógenos: isoflavonas, cumestanos y ciertos derivados de algunos lignanos (Murkies *et al.*, 1998). Las primeras se encuentran en las legumbres y los productos del poroto de soya; dentro de este grupo las más conocidas son la genisteína y daidzeína, las que son sintetizadas a partir de sus precursores biochanina A y formononetina presentes en la planta (Tham *et al.*, 1998). El segundo grupo, los cumestanos, se encuentra en brotes de leguminosas como la alfalfa y trébol subterráneo (Hafez, 1996). En cuanto al tercer grupo, los lignanos, se encuentran principalmente en vegetales, frutas y otros alimentos ricos en fibra (Murkies *et al.*, 1998; Tham *et al.*, 1998). (Tabla 2)

Tabla 1.- Clasificación de las principales moléculas con actividad estrogénica.

<u>Naturales</u>	<u>Moléculas activas</u>
<p>Esteroides Ováricos</p>	<p>17β estradiol Estrona Estriol</p>
<p>Fitoestrógenos</p> <p>Cumestanos Lignanos Estilbenos Flavonas Isoflavonas</p>	<p>Cumestrol Enterodiol - enterolactona Resveratrol Apigenina- Quercetin Genisteína, p-etilfenol, daidzeína, equol, gliciteína</p>
<p>Micoestrógenos</p>	<p>Zearalenona Zearalanol</p>
<p><u>Sintéticos</u></p> <p>Promotores del crecimiento</p> <p>Xenoestrógenos</p>	<p>Dietilsilbestrol (DES) DDT</p>

Fuentes; Tresguerres *et al.*, 2005; Murkies *et al.*, 1998; Tham *et al.*, 1998; Lampe, 2003; Bustos *et al.*, 1996; Locatelli *et al.*, 2005

Tabla 2.- Fuentes alimenticias de fitoestrógenos

Isoflavonas	Lignanos	Cumestanos	Estilbenos
Legumbres:	Cereales:	Alfalfa	Hollejo de Uva
Lentejas	Trigo Avena	Trébol Subterráneo	Maní
Garbanzos	Cebada Salvado	Trébol Rosado	
Porotos	Lúpulos Arroz	Brotos tiernos de soya	
Derivados de la Soya:	Centeno Afrechos		
Harina	Frutas y Verduras:		
Poroto	Manzana Zanahoria		
Granos	Naranja Cebolla		
Leche	Cerezas Linaza		
Semillas	Peras Ajo		
Tofú	Brócoli Espárragos		
	Tomates Apio		

Fuentes; Murkies *et al.*, 1998; Tham *et al.*, 1998; Hafez, 1996.

Hoy en día uno de los cambios más drásticos de la cultura occidental es la incorporación en la alimentación de cantidades cada vez mayores de carne animal, aceites, grasas saturadas y, con ello, la menor ingesta de vegetales. En las culturas asiáticas, el consumo de alimentos vegetales es mayor y más diverso, llegando a un consumo promedio de 40 mg/día de isoflavonas. En contraste a lo observado en el mundo occidental, estudios epidemiológicos en poblaciones asiáticas sugieren que el consumo de dietas ricas en isoflavonas y lignanos está asociada con un bajo riesgo de enfermedades tales como cáncer de mama, próstata, colon y enfermedades cardiovasculares, entre otras (Adlercreutz, 1995).

2.2.2. ESTRUCTURA, ABSORCIÓN Y METABOLISMO DE LOS FITOESTRÓGENOS

Los fitoestrógenos son componentes de diversas especies vegetales a los cuales se les atribuyen propiedades estrogénicas y/o antiestrogénicas. Esta afirmación se sustenta en el hecho de que estos fitoquímicos poseen en su estructura química al menos un anillo fenólico (Figura 1), que tiene afinidad por el receptor de estrógenos (Setchell,1998).

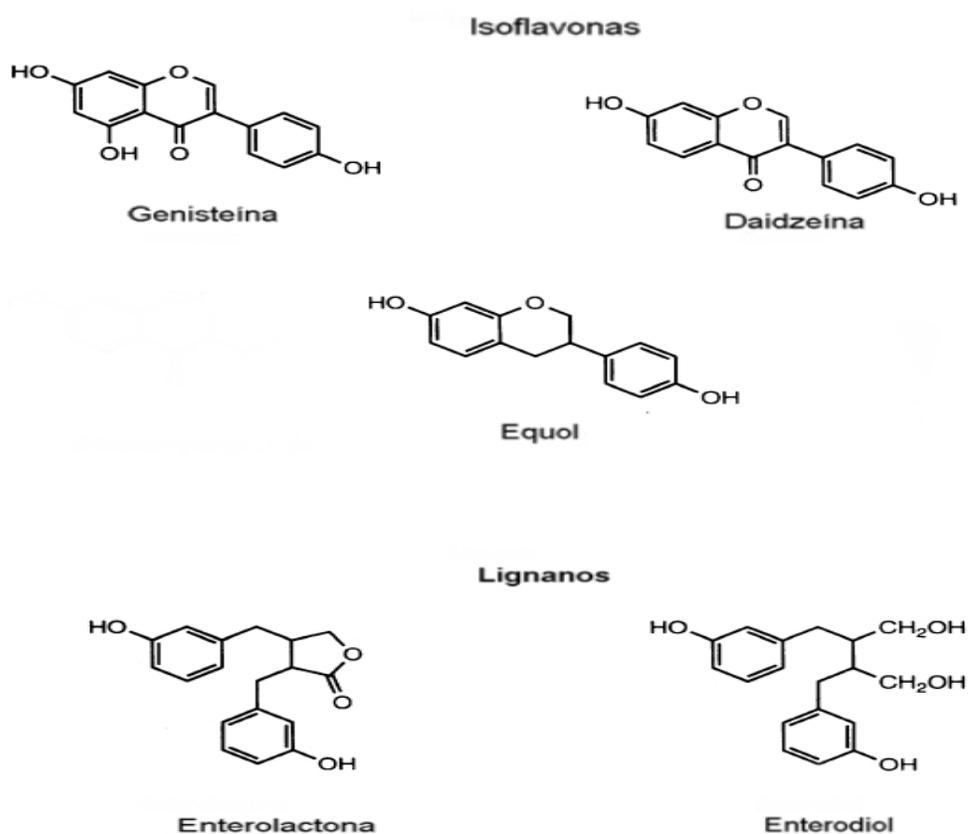


Figura 1: Estructura química de las principales isoflavonas y lignanos

Las isoflavonas presentes en las comidas de origen vegetal como por ejemplo poroto de soya, se encuentran predominantemente en forma de malonylglucósidos, acetylglucósidos, glucósidos (genistina, daidzina, glicitina) y en proporción muy menor como agliconas (genisteína, daidzeína, gliciteína). Los lignanos, en cambio, se encuentran en las formas secoisolariciresinol y metairesinol, ambos precursores de sus metabolitos enterodiol y enterolactona (Lampe, 2003).

Muchos de los cambios metabólicos de los fitoestrógenos ocurren en el colon, intestino delgado e hígado (circulación enterohepática). La mayor biotransformación se realiza por la microflora intestinal a través de las glicosidasas bacterianas que actúan sobre los glicósidos dietarios de lignanos e isoflavonas (Wiseman *et al.*, 2004; Setchell, 1998; Setchell *et al.*, 1984). Los metabolitos principales son p-ethylphenol en relación a genisteína; equol en cuanto a daidzeína y enterodiol, enterolactona para secoisolariciresinol y metairesinol respectivamente (Lampe, 2003). Wiseman *et al.* (2004), en su estudio con individuos humanos concluyó que una dieta alta en soya (104 mg/día de isoflavonas) determina mayores concentraciones de agliconas genisteína, daidzeína y de sus metabolitos en sangre, orina y fecas. En cuanto al metabolito equol, éste y otros trabajos han demostrado que su producción se presenta sólo en el 35% de los individuos, concluyendo que existen diferencias en la microbiota bacteriana intestinal de humanos, independiente del sexo y capaz de sintetizar al metabolito (Wiseman *et al.*, 2004; Setchell *et al.*, 1984). En cuanto a los lignanos, la conversión del secoisolariciresinol requiere de la participación de comunidades anaerobias bacterianas para su desmetilación (formación de enterodiol) y deshidroxilación (formación de enterolactona). A diferencia de los hombres, las mujeres tienden a presentar más altas concentraciones de organismos productores de enterolignanos (Clavel *et al.*, 2005).

Las isoflavonas una vez hidrolizadas y metabolizadas quedan libres en intestino para su absorción y conjugación con ácido glucurónico y en menor proporción con ácido sulfúrico. Esta conjugación ocurre principalmente en hígado y en menor importancia en riñón e intestino. Su capacidad esta dada por la actividad de los microsomas tisulares presentes en estos tejidos, los cuales contienen variadas isoformas de enzimas (glucuronosyl transferasas y sulfotranferasas) que originan a la vez diferentes cantidades y variaciones de isómeros para las respectivas agliconas, como el caso del 7- glucurónido que tiene una magnitud más alta que el 4- glucurónido tanto para genisteína como para daidzeína (Doerge *et al.*, 1999; Setchell, 1998).

La genisteína y daidzeína presentes en los alimentos pueden ser detectadas en sangre a los 30 minutos de ingeridas, con un peak de concentración plasmática entre las 5 y 9 h post alimentación. Estas concentraciones máximas y sus tiempos plasmáticos varían dependiendo del tipo de alimento, relación agliconas/glicósidos y de la matriz alimenticia (Cassidy *et al.*, 2006). Se ha cuantificado la excreción de fitoestrógenos y sus metabolitos en orina, leche (Franke *et al.*, 1998) y fecas (King 1998). En cuanto a la tasa de excreción urinaria en humanos, ésta es notoriamente más alta para daidzeína al compararla con genisteína (King & Bursill 1998) y la tasa de excreción urinaria de sus metabolitos en ratas es más alta para equol al compararlo con su homólogo p-ethylfenol (King, 1998).

2.2.3. EFECTOS BIOLÓGICOS DE LOS FITOESTRÓGENOS

La acción de los fitoestrógenos sobre los tejidos esta sustentada por diversos estudios científicos *in vitro*, *in vivo* y epidemiológicos. La respuesta de los distintos tejidos a las isoflavonas comprende vías no genómicas en algunos y genómicas o ambas en otros, que otorgan a los fitoestrógenos la capacidad de actuar como moduladores selectivos de respuestas estrogénicas en los diversos tejidos.

2.2.3.1. EFECTOS CARDIOVASCULARES

Estudios de seguimiento hechos en poblaciones humanas, indican que el consumo de isoflavonas y lignanos en mujeres postmenopáusicas se relaciona con un riesgo menor para desarrollar enfermedad cardiovascular y síndrome metabólico (hipertensión, obesidad, dislipemia con o sin hiperglicemia) (de Kleijn *et al.*, 2002; van der Schouw *et al.*, 2002).

Se reconoce hoy en día la presencia de receptores estrogénicos alfa y beta en el endotelio y músculo liso de los vasos sanguíneos. A través de éstos, los estrógenos ejercen sus efectos sobre el endotelio vascular, a los cuales podemos clasificar en dos tipos (Mendelsohn, 2000):

- a) Rápidos; como el aumento de la vasodilatación y de la producción de óxido nítrico.
- b) Prolongados o Tardíos; como la disminución de la aterosclerosis, injuria vascular y proliferación de células de músculo liso.

En el endotelio vascular se sintetizan y liberan numerosos factores biológicamente activos y entre ellos podemos mencionar al óxido nítrico y la prostaciclina, que participan en los fenómenos de vasodilatación de grandes y pequeñas arterias y venas. La genisteína ha demostrado aumentar la actividad de la enzima óxido nítrico sintasa, la cual a partir del sustrato L-arginina sintetiza óxido nítrico en las células endoteliales, lo que lleva a relajación de la musculatura lisa de la pared vascular tanto en hombres como en mujeres con una potencia similar a la del 17β estradiol (Walker *et al.*, 2001).

La prostaciclina es una prostaglandina que se origina a nivel endotelial a partir del ácido araquidónico por la acción de ciclooxigenasas 2 (COX 2). En células endoteliales humanas la genisteína y daidzeína han demostrado aumentar la expresión del RNAm y del contenido de proteína COX 2, a través de mecanismos que involucran la participación del receptor de estrógenos, con el consecuente aumento de la producción de prostaciclina (Hermenegildo *et al.*, 2005).

Estos efectos sumados a otras propiedades de los fitoestrógenos como la inhibición de la agregación plaquetaria (Liu *et al.*, 1998) y efectos antioxidantes (Murkies *et al.*, 1998; Tham *et al.*, 1998; Setchell, 1998), adquieren importancia para la prevención y/o tratamiento de enfermedades cardiovasculares como la hipertensión y aterogénesis tanto en hombres como en mujeres predispuestas a desarrollarlas.

2.2.3.2. EFECTOS ANTICANCERIGENOS

Diversos datos epidemiológicos demuestran un efecto anticarcinogénico en las sociedades asiáticas al compararlas con las occidentales. Estudios *in vitro* e *in vivo* demuestran una correlación negativa entre el consumo y excreción urinaria de

fitoestrógenos con el cáncer de mama, ovarios, próstata, pancreático, gástrico y colon (Herman *et al.*, 1995).

En un estudio *in vitro*, por ejemplo, trabajando con líneas celulares de cáncer pancreático Mia Pa Ca-2 (expresan receptores de estrógeno) y PANC-1 (no expresan receptores de estrógeno), se observó en ellas que la daidzeína tuvo efectos antiproliferativos a un IC50 (concentración inhibitoria) menor en las primeras y mayor en las segundas. El autor de este trabajo concluye que las diferencias en las concentraciones inhibitorias indican mecanismos de acción distintos en ambos tipos celulares, postulando que en las células Mia Pa Ca-2 participan fenómenos de competencia o saturación del receptor de estrógenos y que en las PANC-1 participa un mecanismo independiente del receptor, no del todo claro (Guo *et al.*, 2004).

Zhou *et al.*, (1999) demostraron la inhibición del crecimiento de un carcinoma prostático humano (LNCaP) trasplantado a ratones; en este experimento se observó que los fitoestrógenos (genisteína, daidzeína) presentes en las dietas a distintas concentraciones, disminuyeron significativamente el tamaño tumoral y que mientras más altas las concentraciones mayor la respuesta antitumoral (Zhou *et al.*, 1999). Otros investigadores han observado que el peso prostático disminuye con dietas ricas en fitoestrógenos (equol, genisteína y daidzeína) asociado a una disminución paralela de la expresión del receptor de andrógenos (Lund *et al.*, 2004a). Otros estudios consideran al equol como un antiandrógeno capaz de unirse y secuestrar a la hormona dihidrotestosterona. Esta disminución en los niveles sanguíneos del andrógeno activo determina un menor crecimiento prostático (Lund *et al.*, 2004b).

En un estudio *in vitro* genisteína y quercetina a bajas concentraciones mostraron un efecto agonista estrogénico sobre las células de cáncer de mama humano MCF7 que

expresan sólo receptores de estrógenos alfa y con ello un aumento de la proliferación. Por el contrario, dosis más elevadas produjeron una inhibición de la proliferación no sólo de estas células, sino que también de la línea celular HeLa que no expresa receptores de estrógenos (Maggiolini *et al.*, 2001). Algunos investigadores postulan que los mecanismos que utilizan estos fitoquímicos para la inhibición del crecimiento mamario es independiente del receptor de estrógenos y de la inhibición de las vías del factor de crecimiento epidermal (Peterson & Barnes, 1996).

Por otro lado, Jinping *et al.*, (2001) trabajando con una línea celular de osteosarcoma humano (U20S) que coexpresa receptores de estrógenos α y β , observó que la presencia de genisteína inhibía la formación del RNAm (transcripción) necesario para la producción de factor de crecimiento tumoral α (TNF α) a través del RE β (Jinping *et al.*, 2001).

De los trabajos científicos citados precedentemente, podemos concluir que el potencial anticancerígeno de los fitoestrógenos se debe tanto a mecanismos que involucran la participación del receptor de estrógenos como también a mecanismos que modifican las vías de señalización intracelular. La literatura actual propone diversos mecanismos para explicar las propiedades anticancerígenas de los fitoestrógenos, entre los cuales podemos citar a:

- Competencia de los fitoestrógenos y el 17 β estradiol por unirse a los receptores de estrógenos. Los fitoestrógenos presentan una mayor afinidad por el RE β y, por ende, una mayor actividad transcripcional asociada a este receptor (Jinping *et al.*, 2001; Kuiper *et al.*, 1998). Estas últimas investigaciones no permiten descartar una posible represión o atenuación de la actividad transcripcional del RE α a través de la activación del RE β por los fitoestrógenos (Jin *et al.*, 2008).

- Reclutamiento de co-activadores o co-represores distintos (Jinping *et al.*, 2001), lo que sumado a diferencias en el número, tipo y distribución de receptores estrogénicos tisulares determina una respuesta final selectiva en los múltiples órganos diana (Nilsson *et al.*, 2001).
- Inducción de apoptosis por la genisteína. La presencia de proteína PTEN (fosfatasa y tensina homóloga ubicada en el cromosoma 10) se ha relacionado positivamente con fenómenos de apoptosis. La genisteína ha demostrado aumentar la expresión de PTEN y la expresión de genes pro-apoptóticos p21y Bok en líneas celulares de cáncer de mama MCF-7 (Dave *et al.*, 2005).
- Inhibición de diversas enzimas implicadas en la diferenciación y crecimiento tumoral. Por ejemplo; la inhibición de la genisteína sobre las proteínas tirosin kinasas que son receptoras del factor de crecimiento epidermal, contribuyendo con ello a un importante rol antiproliferativo y bloqueo de señales de transformación celular (Akiyama *et al.*, 1986). Además, se puede citar la inhibición de enzimas esteroidogénicas como 3 y 17 β deshidrogenasas (Whitehead *et al.*, 2002), sulfatasa estrona (Rice & Whitehead, 2006), DNA polimerasas (Locatelli *et al.*, 2005) y aromatasas (Kao *et al.*, 1998).
- Inhibición de la angiogénesis a través del bloqueo de la producción de factores de crecimiento del endotelio vascular (VEGF y IGF-1) (Zhou *et al.*, 1999).
- Aumento de los niveles de globulinas transportadoras de hormonas sexuales. Se ha estudiado que un consumo promedio de 69 mg/día de isoflavonas determina un aumento de estas proteínas en el plasma de mujeres postmenopáusicas y con ello una menor concentración de estradiol libre circulante (Pino *et al.*, 2000).

- Aumento de la conjugación de estradiol. Pfeiffer *et al.* (2006), trabajando con microsomas hepáticos demostraron que la daidzeína aumenta la glucuronidación del estradiol, específicamente del 3- glucurónido estradiol. La inactividad de este estradiol conjugado, convierte a este mecanismo en un medio protector de la carcinogénesis mediada por estradiol (Pfeiffer *et al.*, 2006).
- Antioxidante. Las isoflavonas genisteína - apigenina poseen propiedades antioxidantes relacionadas en parte a sus grupos hidroxilos presentes en su estructura y, por otra parte, al aumento de la actividad de enzimas antioxidantes (catalasa, superóxido dismutasa, glutatión peroxidasa) en tejidos tales como piel e intestino, pero también en otros órganos como hígado, riñón y pulmón (Wei *et al.*, 1995). La producción de radicales libres peróxido de hidrógeno y aniones superóxidos son capaces de estimular algunas vías genómicas, la genisteína entonces mostraría una actividad antiproliferativa a través de sus propiedades antioxidantes.

2.2.3.3. EFECTOS SOBRE ESTRUCTURA ÓSEA

La edad y el progresivo descenso de los estrógenos endógenos aceleran la pérdida de hueso en mujeres postmenopáusicas. Estudios *in vitro* en líneas celulares de osteosarcoma humano (MG-63) tratadas con genisteína, daidzeína y resveratrol, han demostrado inducir en los osteoblastos un aumento de la síntesis de fosfatasa alcalina y osteoprotegerina (inhibidora de la osteoclastogénesis), como también una inhibición de la secreción de IL-6 (citoquina osteolítica), todos fenómenos relacionados con diferenciación osteoblástica (Gortázar *et al.*, 2005). Estudios de intervención dietaria en mujeres postmenopáusicas han demostrado que una ingesta de 53 mg/día de isoflavonas determina una

mayor densidad mineral ósea de vértebras lumbares (L1-L2) y caderas al compararlas con mujeres postmenopáusicas que consumen una concentración más baja de isoflavonas (2,1 mg/día). Éstos cambios se correlacionan con una menor concentración plásmatica de indicadores de resorción ósea como hormona paratiroídea, osteocalcina y N telepéptido (Mei *et al.*, 2001). El equol también ha demostrado influir en la arquitectura del hueso. Una dosis de 0,5 mg/día de equol en ratas ovariectomizadas (OVX) se correlaciona positivamente con una mayor densidad mineral ósea en vértebras lumbares y fémur; además, esta dosis se asocia a un menor número de osteoclastos y sus efectos, al igual que genisteína, ocurren sin inducción de cambios morfológicos a nivel uterino (Fujioka *et al.*, 2004; Ishimi *et al.*, 1999). Por esta acción selectiva se considera a los fitoestrógenos como fármacos naturales capaces de reemplazar o disminuir el uso de estrógenos sintéticos en períodos postmenopáusicos.

2.2.3.4. OTROS EFECTOS

Algunos investigadores reconocen el efecto de la soya sobre las concentraciones de lípidos y lipoproteínas plasmáticas, es decir, una disminución del colesterol total, LDL y VLDL y aumentos del HDL (Murkies *et al.*, 1998; Potter, 1995). Una dieta alta en soya protege de la peroxidación lipídica *in vivo*; ésta se relaciona a niveles plasmáticos más bajos de prostaglandina 8-epi-PGF_{2α} (bioindicador de peroxidación lipídica) y a una mayor resistencia de las LDL a la oxidación (Wiseman *et al.*, 2000, Tikkanen *et al.*, 1998). Polifenoles presentes en el vino tinto, entre ellos resveratrol y quercetina, han demostrado aumentar la actividad del receptor LDL y disminuir la secreción de apolipoproteína B100

(constituyente de LDL y VLDL) de una forma similar a la atorvastatina en células hepáticas HepG2 (Pal *et al.*, 2003).

La genisteína *in vitro* ha demostrado aumentar la secreción de insulina por las células β pancreáticas en presencia de glucosa y en forma independiente del receptor de estrógenos. Esta secreción de insulina se correlaciona con el aumento del AMPc y éste a un aumento de la actividad adenilato ciclasa por la genisteína (Liu *et al.*, 2006).

Los estrógenos actúan a nivel de sistema nervioso central a través de mecanismos genómicos dependientes e independientes del receptor de estrógenos. Las vías de acción rápida parecen ser más importantes cuando se habla de funciones cerebrales, entre ellas destacan las vías de señales MAPK e IP-3, relacionadas con el aumento de la sobrevivencia neuronal (Belcher & Zsarnovszky, 2001). Aunque se requieren de mayores estudios para confirmar la influencia positiva de los fitoestrógenos en las funciones del sistema nervioso central, existen publicaciones que relacionan su consumo con un mejoramiento de las funciones cognitivas en mujeres postmenopáusicas que presentan un período de climaterio mayor (Franco *et al.*, 2005).

El equol aplicado tópicamente ha demostrado proteger del daño inducido por la luz ultravioleta en el DNA de las células dérmicas y epidérmicas de la piel, considerando su uso en lociones o cremas tópicas destinadas a prevenir el cáncer de piel (Widyarini, 2006).

Por el contrario, algunos autores describen aspectos negativos de los fitoestrógenos, entre estos podemos citar:

Disminución de la fertilidad inducida por el cumestrol que a bajas dosis inhibió el ciclo estral en ratas hembras adultas y las crías hembras expuestas neonatalmente por 21 días de tratamiento a este fitoestrógeno presentaron estro persistente a la edad reproductiva.

También se ha descrito una demasculinización de crías machos, provenientes de madres tratadas con cumestrol durante la gestación hasta los 10 días post nacimiento; en ellos se observó que a la edad adulta aumentó la latencia de montas y latencia de eyaculaciones (Whitten *et al.*, 1995).

Otros autores destacan el riesgo que involucran los altos niveles de fitoestrógenos en fórmulas alimenticias infantiles, ya que los infantes desde las 4 semanas de edad pueden digerir, absorber y excretar estas isoflavonas tan eficientemente como un adulto. Un estudio en Nueva Zelanda determinó que las dosis diarias de isoflavonas que aportaban las fórmulas infantiles en base a soya eran de 3,2 mg/kg/día (Irvine *et al.*, 1998). Franke *et al.*, (1998) analizando las concentraciones promedio de isoflavonas presentes en productos infantiles de distintas marcas, concluyeron que el consumo de isoflavonas totales puede llegar a 7 mg/kg/día, equivalente a una ingesta 4 a 6 veces más elevada que la ingesta diaria de un adulto consumidor de alimentos ricos en soya. Su ingesta y efectos ocurren durante la etapa de vida más sensible para la inducción o programación de enfermedades en la vida adulta, lo que podría involucrar cambios en los patrones de diferenciación de los tejidos (imprinting) (Tchernitchin *et al.*, 1999). La exposición a elevadas concentraciones de fitoestrógenos a edades precoces puede ser perjudicial en niños, pudiendo ser la responsable de telarquia precoz y el adelanto de la pubertad en niñas, o ginecomastia en varones (García, 1999).

2.3. FITOESTRÓGENOS Y MEDICINA VETERINARIA

La información disponible en la actualidad sobre los efectos de fitoestrógenos en animales de producción y compañía es muy escasa. En el presente capítulo se comentarán brevemente algunos de los efectos observados en las especies de interés en medicina veterinaria.

Las especies de plantas forrajeras que contienen elevadas concentraciones de fitoestrógenos son alfalfa, trébol blanco, trébol subterráneo, trébol rosado, poroto de soya, trébol alejandrino, vicia, avena, centeno y otras, todas destinadas a la alimentación animal de rumiantes. La concentración de estrógenos vegetales en las plantas puede variar por diversos factores, entre ellos la edad de la planta, sequía, fertilización, parásitos, estación del año, entre otros.

El efecto principal que se observa en el ganado expuesto a praderas con una elevada concentración de fitoestrógenos es la disminución de la fertilidad en el rebaño, que cede con la disminución del consumo de las praderas (Adams, 1995). Una vez que la planta es ingerida por los rumiantes, ésta es fraccionada, digerida y metabolizada por los microorganismos ruminales. Las agliconas y sus metabolitos son conjugados en la mayor parte del epitelio gastrointestinal, con una tasa de conjugación más alta en la oveja que en la vaca. El sitio más importante encargado de la detoxificación después del hígado es el rumen. La tasa de conjugación es más alta para el equol que para formononetina y daidzeína, ya que el equol es la mayor sustancia absorbida desde el rumen a la circulación (Lundh, 1995). Las alteraciones reproductivas descritas regularmente en rebaños bajo acción estrogénica son endometriosis, quistes ováricos, metritis, prolapsos uterinos y abortos, lo que determina una disminución de la tasa de concepción del rebaño (Romero *et*

al., 1997). Se ha demostrado *in vitro* que los estrógenos vegetales (genisteína, daidzeína, equol y p-etilfenol) son capaces de aumentar la producción de prostaglandina F_{2α} (luteolítica) en células de endometrio uterino a través de un mecanismo dependiente del receptor de estrógenos (Woclawek-Potocka *et al.*, 2005). La síntesis de esta prostaglandina determina un desbalance en la relación PGF_{2α}:PGE₂ (luteotrófica), alteración que dificulta la implantación del blastocisto y con ello una mayor mortalidad embrionaria.

Kamegai *et al.*, (2001), demostró que el 70% de las neuronas presentes en el núcleo arcuato del hipotálamo de ratas machos, productoras del factor liberador de hormona del crecimiento (GHRH) expresaban sólo RNAm del RE α y no del RE β (Kamegai *et al.*, 2001). Éste y otros autores postulan que el control de la secreción de GHRH en machos, se lleva a cabo por la acción directa de estrógenos sobre las neuronas hipotalámicas a través del receptor de estrógenos, previa aromatización de la testosterona a estrógeno (Meinhardt & Ho., 2006). Trabajos con implantes de zeranol en bovinos de carne han demostrado un aumento de la concentración plasmática promedio de hormona del crecimiento (Williams *et al.*, 1991). Se ha visto también, que en machos ovinos la genisteína posee un efecto estimulador sutil sobre la amplitud de los pulsos de secreción de hormona del crecimiento (Misztal *et al.*, 2008). Por otro lado, trabajos efectuados en ovinos con genisteína infundida en el SNC (tercer ventrículo) de hembras ovariectomizadas demostró aumentar los niveles plasmáticos de hormona del crecimiento, por una mayor actividad secretoria de los somatotrofos en la adenohipófisis con un patrón similar al inducido por 17 β estradiol (Misztal *et al.*, 2007). Es necesario destacar que otros autores proponen un efecto anabólico directo de los estrógenos sobre las fibras musculares estriadas debido a la presencia de receptores de estrógenos en estos tejidos (Meyer & Rapp., 1985).

Un estudio en aves *broilers* describe que la incorporación de 10 mg/kg de dieta tradicional de isoflavonas aumentó la ganancia diaria de peso y la ingesta diaria de alimento, obteniéndose un peso terminal de mercado mayor que las aves alimentadas con dieta control. Un consumo entre los 20 y 40 mg/kg de dieta mostró una mayor actividad de las enzimas superoxidodismutasa, catalasa (enzimas antioxidantes) y una menor concentración de ácido láctico en músculos. Suplementos de 40 a 80 mg de isoflavonas/kg de dieta mejoran la calidad de la carne obteniéndose un valor de pH mayor, un color cárneo más brillante y una disminución de la producción de malonildialdehído (MDA, indicador de peroxidación lipídica) en los músculos (Jiang *et al.*, 2007).

Un estudio efectuado en gallinas ponedoras con dietas altas en isoflavonas (124 mg/100 g alimento) comparadas con dietas tradicionales o control (37 mg isoflavonas/g alimento), demostró que los huevos contenían mayores concentraciones de isoflavonas tanto en clara (3000 nmol/L) como en yema (60 μ g/100 g) (Saitoh *et al.*, 2001).

Los estudios de fitoestrógenos en animales de compañía son muy escasos, un estudio realizado en felinos demuestra que son capaces de absorber agliconas (genisteína-daidzeína), de alcanzar un rápido peak plasmático (1,5 h) y de eliminarlas por orina en forma de conjugados glucurónidos y sulfatos (Bell *et al.*, 2006). Si caninos y felinos son capaces de metabolizar isoflavonas, se puede considerar la inclusión de fitoestrógenos en dietas de mascotas para la prevención y tratamiento de enfermedades frecuentes en clínica como diabetes, obesidad, y cáncer. De éste último, por ejemplo, las neoplasias malignas de glándula mamaria constituyen los casos más frecuentes de consulta en clínicas veterinarias de Santiago de Chile y de éstas un 62 % corresponden a carcinomas que se caracterizan por ser hormonosensibles (Ziller, 2004).

III. OBJETIVOS

3.1. Objetivo general

Evaluar la acción estrogénica no genómica y genómica de extractos de una planta¹ medicinal que contiene fitoestrógenos y observar si existe acción selectiva sobre útero de ratas prepúberes al comparar las mismas respuestas con 17β estradiol como control.

3.2. Objetivos específicos

1. Evaluar las respuestas no genómicas en los distintos tipos celulares uterinos de rata prepúber a través de la cuantificación de:
 - Recuento de eosinófilos en los distintos estratos uterinos
 - Edema en el estroma superficial y profundo
 - Degranulación y distribución de eosinófilos uterinos

Evaluar una respuesta genómica a los estrógenos en útero de rata, a través de la evaluación de:

- Hipertrofia celular en miometrio circular

¹ Debido a que dichas preparaciones se encuentran sin patentar, la información más detallada de la planta y las soluciones se mantendrán durante el proceso de su patentación en forma confidencial.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Endocrinología Experimental y Patología Ambiental (LEEPA) perteneciente a la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

4.1. ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN

El estudio se realizó en ratas impúberes de la cepa Sprague-Dawley de 21 días de vida, con un rango de peso de 40 a 60 gramos, criadas y mantenidas bajo condiciones controladas de luz, temperatura y sin limitación de alimentación, en el vivero del bioterio del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina, Sede Norte, de la Universidad de Chile.

4.2. PREPARACIÓN DE LAS SOLUCIONES

4.2.1. SOLUCIONES CONTROLES:

Control negativo: se empleó solución de NaCl 0,9 % a pH 7,5.

Control positivo: se dispuso de una solución de 500 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de 17β estradiol, la que se diluyó en suero fisiológico 1:9 v/v, obteniendo una concentración final a inyectar de 50 $\mu\text{g} / \text{mL}$ de solución. La concentración utilizada en éste y otros trabajos del LEEPA para inducir la máxima respuesta fisiológica a 17β -estradiol en útero de rata pre-púber es de 300 $\mu\text{g} / \text{Kg}$ de peso corporal (p.c.).

4.2.2. SOLUCIONES DE FITOESTRÓGENOS:

En este trabajo se utilizaron dos preparaciones obtenidas de una planta medicinal a las cuales se les clasificó como:

- 1. Solución hidroalcohólica o Extracto 21a (Decocto)**
- 2. Solución etanólica o Extracto 22a**

PREPARACIÓN DE LOS EXTRACTOS:

Extracto 21a (Decocto)

Preparación del Decocto:

Para la preparación del decocto se utilizaron 500 g de sumidades floridas y se hirvieron en 250 mL de agua destilada durante 10 minutos. Una alícuota de 126 mL se diluyó con 150 mL de etanol absoluto (Merck) y se filtró a través de papel filtro Wattman 1N.

Antes de inyectar al animal, se diluyó en suero fisiológico 1:9 v/v, y se inyectó s.c. 6 mL / kg p.c.

Extracto 22a (Extracto etanólico)

Se recolectaron 160 g de sumidades floridas y se sometieron a extracción con 160 mL de etanol (Merck) durante 30 días. Se filtró a través de papel filtro Wattman 1N.

Antes de inyectar al animal, se diluyó en suero fisiológico 1: 9 v/v, y se inyectó s.c. 6 mL / kg p.c.

4.3. Procedimiento experimental para la obtención de cortes histológicos uterinos de ratas

Para este estudio se contó con 154 ratas las que fueron inyectadas vía subcutánea con 0,3 mL de cada condición experimental (Tabla 3) con el objeto de evaluar su efecto a las 6 y 24 h post tratamiento:

Tabla 3.- Cuadro resumen de condiciones experimentales, horas post-sacrificio y número de ratas por grupos.

Condiciones experimentales	Horas post tratamiento	N° de ratas por grupo
Suero fisiológico (Control)	6 h	13
	24 h	13
17β estradiol	6 h	12
	24 h	12
Extracto 21a	6 h	13
	24 h	13
Extracto 22a	6 h	13
	24 h	13
*Extracto 21a + 17β estradiol	6 h	13
	24 h	13
*Extracto 22a + 17β estradiol	6 h	12
	24 h	12

*Administración de los extractos 2 h antes del estradiol

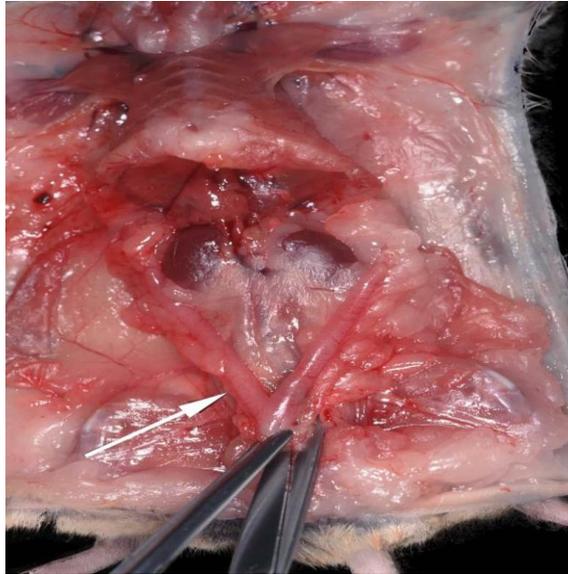


Figura 2: Extracción de cuernos uterinos (flecha blanca) bajo anestesia inhalatoria con éter.

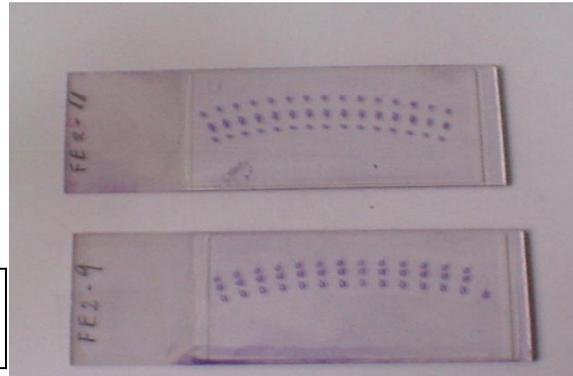
Transcurridas las horas correspondientes, se extrajeron los cuernos uterinos bajo anestesia con éter (figura 2) y se procedió a fijarlos en formalina 10% tamponada con buffer fosfato pH 7,3-7,4 por un intervalo de tiempo de 24 h a temperatura ambiente. Luego se efectuaron cortes histológicos sobre los cuernos uterinos para obtener tres porciones de útero: parte proximal a trompa, parte media del cuerpo y región distal cercana al cérvix. Posteriormente, los cortes se sometieron a los siguientes procedimientos:

a) **Deshidratación:** Cada porción de útero fue deshidratada en una gradiente ascendente de etanol (70%, 95%, 100%) y posteriormente se depositaron en xilol, entre cada paso existió un intervalo de tiempo de 10 minutos.

b) **Inclusión en parafina:** La impregnación se realizó en una batería de tres parafinas líquidas en una estufa a 56°C por 15 a 20 minutos cada una, a objeto de eliminar los residuos de xilol y asegurar una correcta impregnación. De esta forma, se obtuvieron los bloques de parafina con las respectivas porciones del cuerno uterino.

c) **Corte en micrótopo:** Los bloques se sometieron a cortes en micrótopo para la obtención de cortes finos de útero (5 μm). Posteriormente, se dispusieron en forma de tríadas (figura 3) y fueron colocados en un baño de flotación a 40°C sobre un portaobjetos embebido en albúmina.

Figura 3: Distribución de las tríadas sobre portaobjetos para su posterior evaluación bajo microscopía óptica.



d) **Secado:** Los portaobjetos se llevaron a una estufa a 37° C por 24 h.

e) **Rehidratación:** Con el objeto de sacar la parafina para la posterior fase de tinción, los cortes se rehidrataron en la siguiente secuencia; xilol (3 repeticiones), etanol 100% (3 repeticiones), etanol 95%, etanol 75% y agua destilada.

Procedimiento de tinción Hematoxilina – Eosina

Los portaobjetos se sumergieron en las siguientes soluciones:

- Hematoxilina de Harris acidificada (filtrada) por 45 segundos
- Solución de Carbonato de Litio al 10 % por 30 segundos
- Agua Destilada
- Eosina Y acuosa al 1% por 60 segundos
- Deshidratación con etanol 75% (5'), etanol 95% (10'), etanol 100% (10') y xilol (10')

Para finalizar el proceso, los portaobjetos se cubrieron con bálsamo de Canadá y se procedió a colocar el cubreobjeto. La tinción con hematoxilina-eosina tiene por finalidad teñir de color violeta los núcleos de todas las células uterinas, y de color rojo a los gránulos presentes en los eosinófilos por los que posee gran afinidad.

4.4. Variables morfológicas de evaluación de respuesta estrogénica

En el presente estudio se trabajó con las variables de eosinofilia y edema uterino para medir respuesta no genómica, y con hipertrofia en miometrio circular para medir respuesta genómica. La ventaja de los métodos morfológicos está dada por ser procedimientos simples que permiten evaluar la reacción de los diferentes tipos celulares uterinos separadamente frente a diferentes condiciones experimentales (figura 4), lo que no es posible a través de los procedimientos bioquímicos tradicionales (Grunert, 1984).

4.4.1. Evaluación no genómica

Eosinofilia

Esta medición se realizó bajo microscopía óptica (x 1000) con aceite de inmersión; para ello se observaron 9 tríadas del portaobjeto en forma alternada y en cada corte se procedió a contabilizar el número de eosinófilos, su distribución (Mesometrio, miometrio longitudinal, miometrio circular, estroma superficial y profundo, ver figura 5) y su estado de degranulación (figura 6) para cada condición experimental.

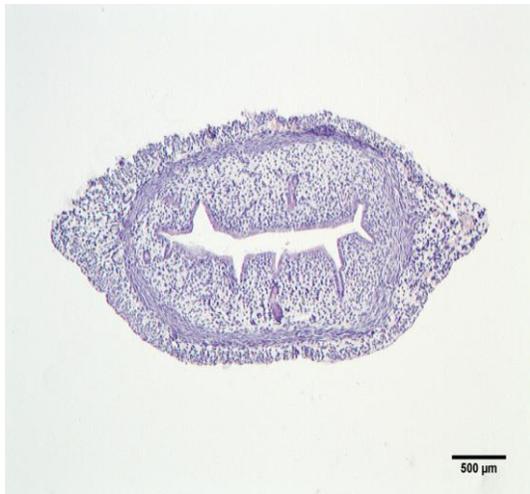


Figura 4 (4x)

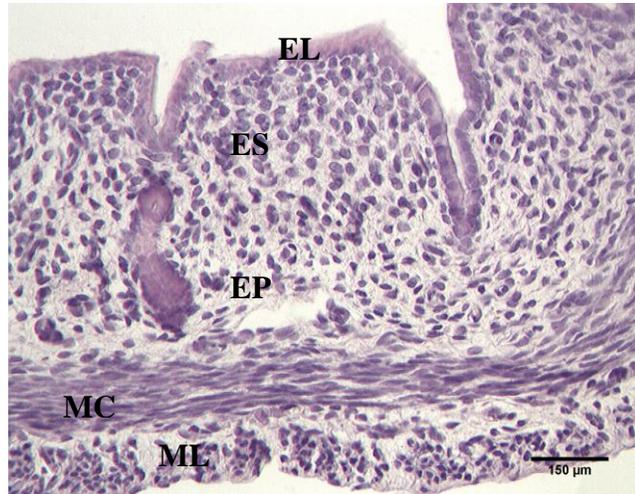


Figura 5 (20x)

Vista general de corte cuerno uterino de rata prepúber (figura 4) y las capas tisulares evaluadas en este estudio (figura 5); epitelio luminal (EL), estroma superficial (ES), profundo (EP), miometrio circular (MC) y miometrio longitudinal (ML).

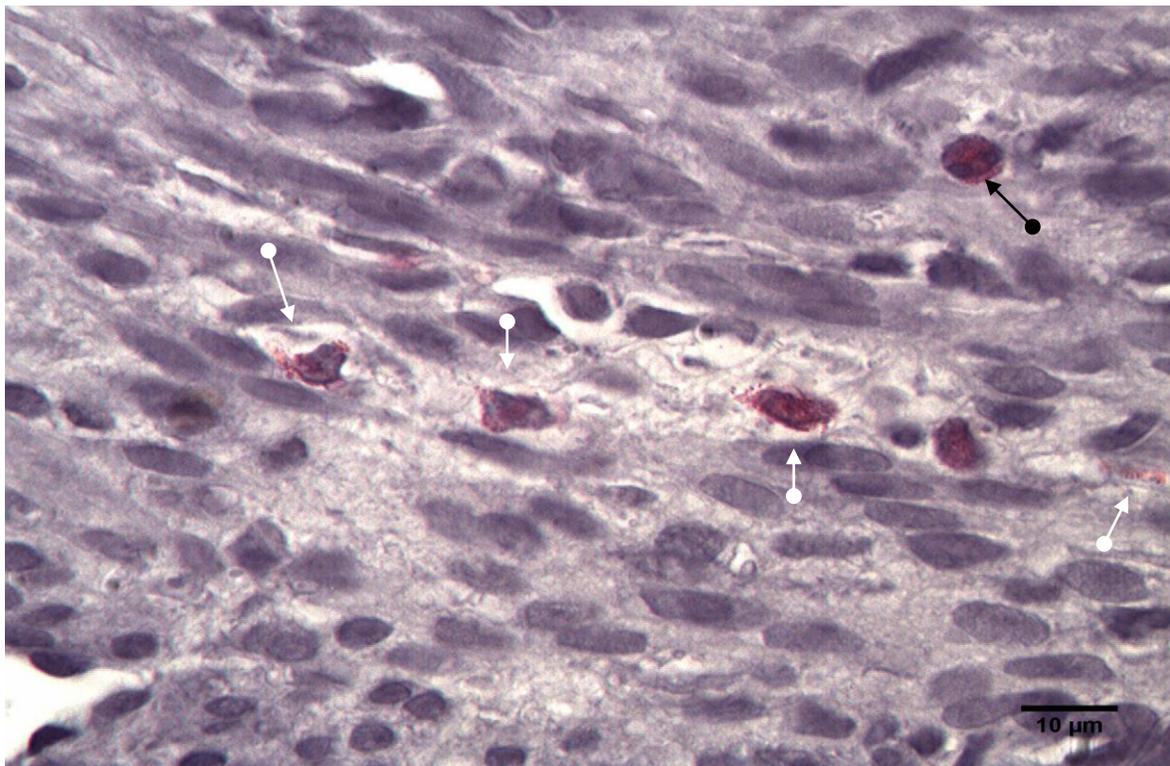


Figura 6: Fotografía de Eosinófilos uterinos en útero de rata prepúber, A) eosinófilo intacto (Flecha negra); B) eosinófilos degranulados (flechas blancas). (100x)

Edema endometrial superficial y profundo

La cuantificación de esta respuesta no genómica se realizó a través de microscopía óptica (x1000) con aceite de inmersión; para esta variable se escogieron tres tríadas al azar de los cortes sobre el portaobjeto. En cada corte se procedió a contabilizar el número de núcleos presentes en un área constante, delimitada por campos circulares de $1195 \mu\text{m}^2$ a través del uso de una mica introducida en un ocular del microscopio. Para edema se observaron 4 áreas en el estroma profundo (EP) y 4 en el estroma superficial (ES) sin tomar en cuenta los polos de los cortes uterinos ya que en estas zonas se pierde la arquitectura del estrato celular. Luego, el área circular de la mica ($1195 \mu\text{m}^2$) se dividió por el número promedio de núcleos contabilizados por campo en cada estrato celular obteniéndose de esta forma el valor recíproco de densidad celular (VRDC). Una mayor respuesta edematosa determina un menor número de células por área circular y, por ende, un valor recíproco de densidad celular mayor (ver figuras 7 y 8).



Figura 7.- Útero sin edema endometrial visible (20x).

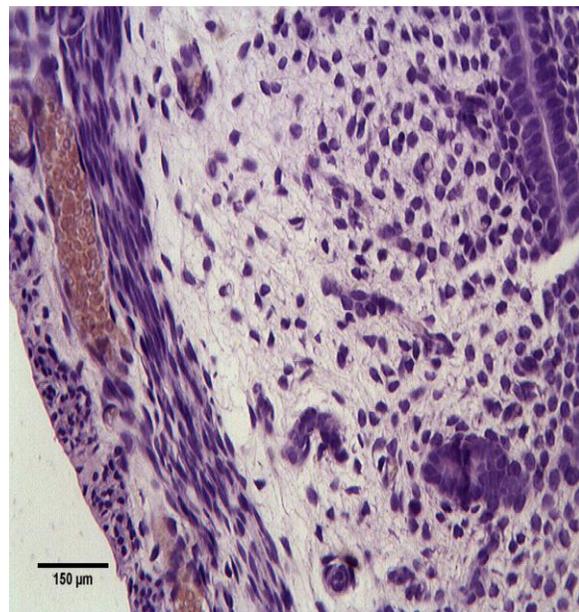


Figura 8.- Edema de EP y ES (20x).

4.4.2. Evaluación genómica

Hipertrofia del miometrio circular

La medición de esta variable también se realizó bajo microscopía óptica con aceite de inmersión (X 1000), y al igual que para cuantificar edema, se escogieron tres tríadas al azar. El conteo celular se llevó a cabo con la misma técnica de campos circulares de diámetro $1195 \mu\text{m}^2$ utilizada anteriormente y para ello se observaron 8 áreas del miometrio circular distribuidas en toda su extensión sin considerar los polos de cada corte por ser zonas muy difusas. Luego el área circular de la mica ($1195 \mu\text{m}^2$) se dividió por el número promedio de núcleos contabilizados por campo en miometrio circular obteniéndose de esta forma el valor recíproco de densidad celular (VRDC). Mientras mayor sea la hipertrofia, menor será el número de núcleos presentes por área circular y mayor el valor recíproco de densidad celular (ver figura 9 y 10).

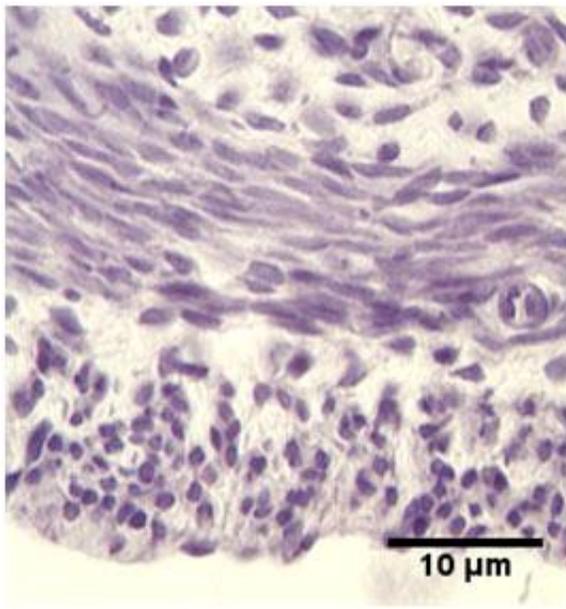


Figura 9.- Miometrio circular sin hipertrofia (40x)

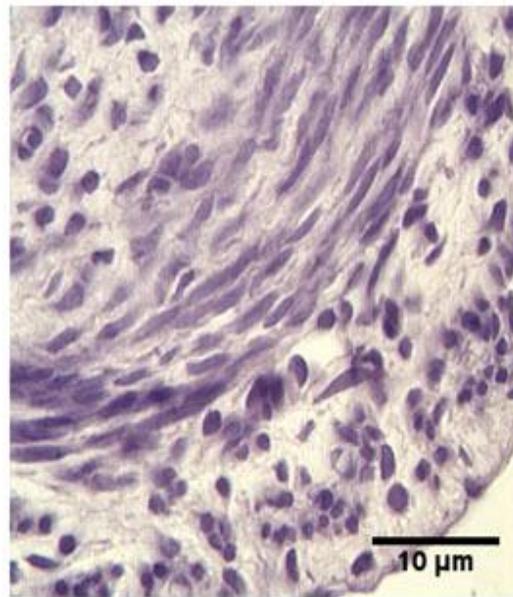


Figura 10.- Miometrio circular con hipertrofia (40x)

4.5. Análisis estadístico

A los resultados que se obtuvieron de las seis condiciones experimentales (tabla 3), se aplicó la prueba de análisis de varianza (ANDEVA) con un nivel de significación del 5%. Al existir diferencias se procedió a realizar la prueba de las mínimas diferencias (LSD) a posteriori, la cual se utiliza para realizar comparaciones múltiples entre las condiciones experimentales, y así determinar entre cuáles de ellas existe diferencia significativa y evaluar su magnitud.

Para la distribución de los eosinófilos y para las diferencias entre las proporciones de eosinófilos degranulados e intactos, se utilizó la prueba de CHI- CUADRADO.

En los parámetros de recuento de eosinófilos uterinos, edema, e hipertrofia celular del miometrio circular se utilizó la prueba de ANDEVA y LSD a posteriori.

Para establecer y resumir las diferencias entre los extractos analizados se utilizó la prueba t de Student con un nivel de significancia del 5%.

V. RESULTADOS

Tabla 4: Abreviaturas de las condiciones experimentales a las 6 y 24 h post-tratamiento.

CONDICIONES EXPERIMENTALES	Abreviatura 6 Horas	Abreviatura 24 Horas
Suero fisiológico	C 6	C 24
17β estradiol	E 6	E 24
Extracto 21a	21a 6	21a 24
Extracto 22a	22a 6	22a 24
Extracto 21a + 17β estradiol	21a E 6	21a E 24
Extracto 22a + 17β estradiol	22a E 6	22a E 24

5.1 EXTRACTO 21a

5.1.1 EOSINOFILIA UTERINA

El control estradiol (**E**) alcanza una eosinofilia máxima a las 24 h de tratamiento ($p < 0,0001$) al compararlo con la condición suero fisiológico o control negativo. Los tratamientos con suero fisiológico y extracto solo (**21a**) no muestran variaciones ni a las 6 h ni a las 24 h. La condición **21a E** no muestra diferencias con las condiciones control negativo y **21a** a las 6 h. Sin embargo, a las 24 h alcanza una eosinofilia significativa del 15 % de la respuesta máxima a estradiol ($p < 0,0001$) y estadísticamente superior al tratamiento **21a** 24 h ($p < 0,001$). Figura 11; [A] y [B]

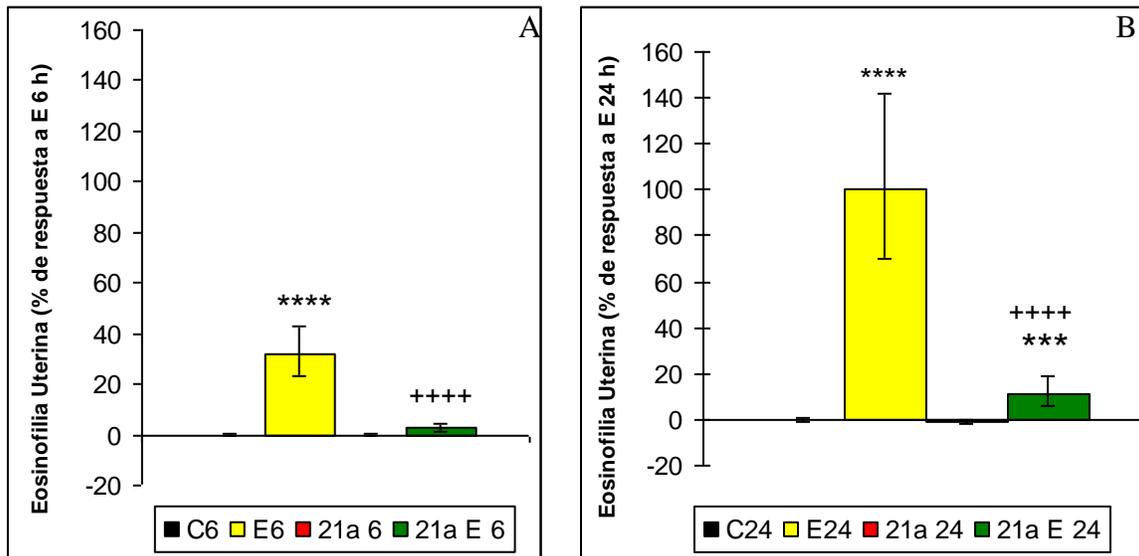


Fig. 11 Eosinofilia uterina de ratas pre-púberes a las 6 h [A] y 24 h [B] post-tratamiento. Comparación soluciones NaCl 0,9% (C), 17β estradiol (E), extracto vegetal (21a) y 17β estradiol + extracto (21a E).

(***) = $p < 0,001$; (****) = $p < 0,0001$. En comparación a la condición sin E.

(++++) = $p < 0,0001$. En comparación a la condición sin extracto o control.

5.1.2 EOSINOFILIA POR ESTRATO UTERINO

Endometrio más miometrio

La figura 12; [A] y [B], nos muestra que la condición estradiol es la única que induce una eosinofilia significativa a las 6 h ($p < 0,0001$) alcanzando el 100 % de respuesta a las 24 h ($p < 0,0001$) al compararla con suero fisiológico. Por otro lado, la asociación **21a E** 24 h obtiene una respuesta máxima (12%) muy inferior al **E** 24 h ($p < 0,0001$) y estadísticamente superior con respecto a la condición **21a** 24 h ($p < 0,001$).

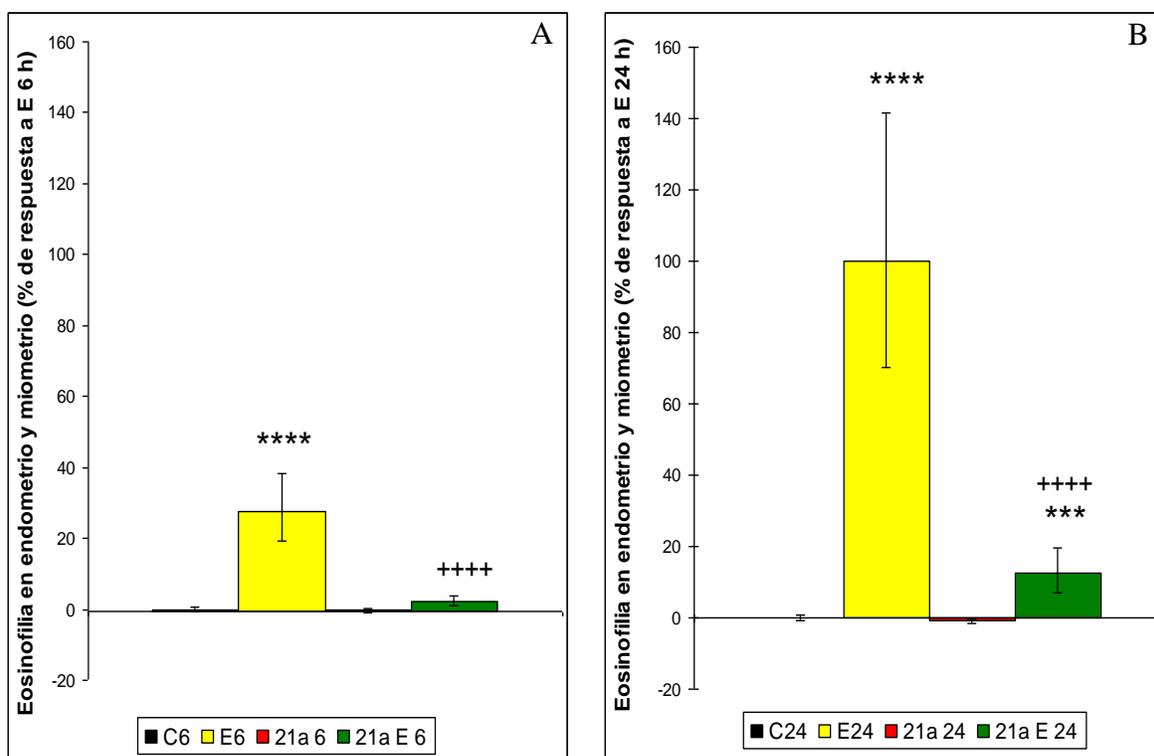


Fig. 12 Eosinofilia uterina de ratas pre-púberes por estratos celulares; endometrio más miometrio a las 6 h [A] y 24 h [B] post- tratamiento. Comparación soluciones NaCl 0,9% (C), 17β estradiol (E), extracto vegetal (21a) y 17β estradiol + extracto (21a E).

(***) = $p < 0,001$; (****) = $p < 0,0001$. En comparación a la condición sin E.

(++++) = $p < 0,0001$. En comparación a la condición sin extracto o control.

Endometrio

A las 6 h (Fig. 13; [A]), el estradiol es la única condición que estimula una eosinofilia significativa al compararla con suero fisiológico ($p < 0,01$). A las 24 h (Fig. 13; [B]) la condición estradiol alcanza su máximo (100%) al compararlo con C 24 h ($p < 0,0001$), en cambio la condición **21a E** muestra una eosinofilia aproximadamente del 20 % de la respuesta máxima a estradiol ($p < 0,0001$) y estadísticamente significativa a **21a** ($p < 0,01$).

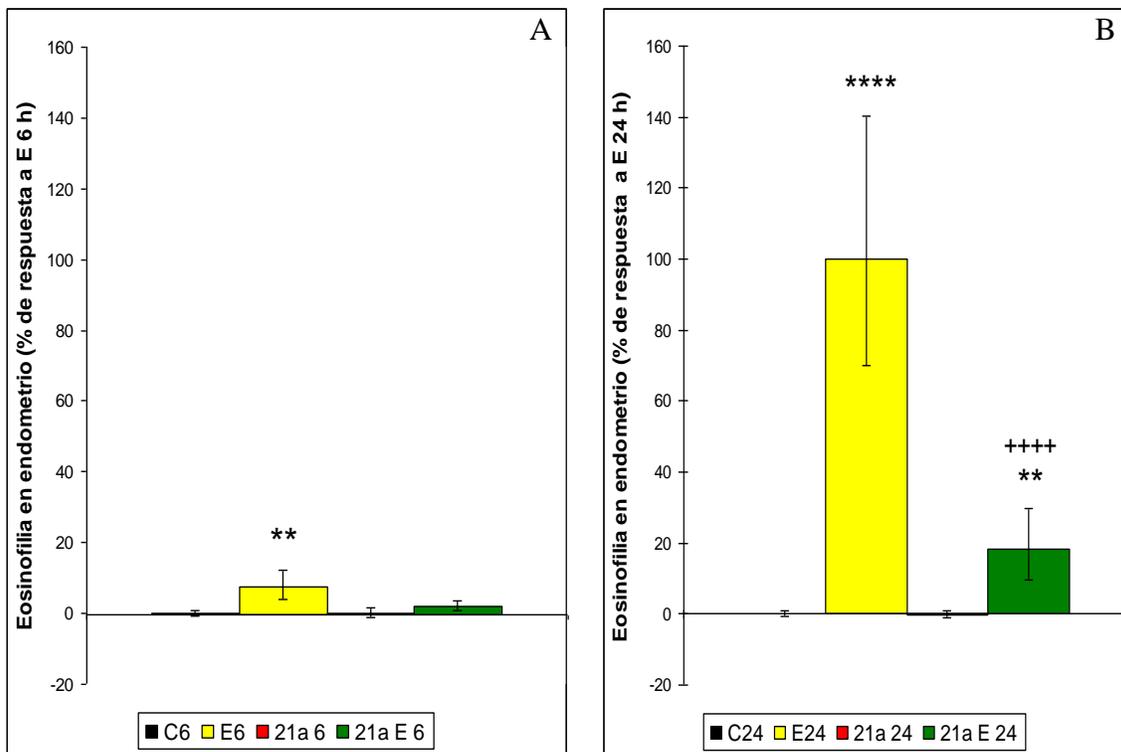


Fig. 13 Eosinofilia uterina de ratas pre-púberes por estratos celulares; endometrio a las 6 h [A] y 24 h [B] post- tratamiento. Comparación soluciones NaCl 0,9% (C), 17 β estradiol (E), extracto vegetal (21a) y 17 β estradiol + extracto (21a E).

(**) = $p < 0,01$; (****) = $p < 0,0001$. En comparación a la condición sin E
(++++)= $p < 0,0001$. En comparación a la condición sin extracto o control.

5.1.3 DISTRIBUCIÓN Y DEGRANULACIÓN

Del total de eosinófilos uterinos localizados en miometrio y endometrio (Fig. 14; [A]) menos de un 15 % se encontraban en endometrio a las 6 h con la condición estradiol y algo más del doble al tratar con **21a E** 6 h, sin encontrarse diferencias estadísticas entre las condiciones. A las 24 h la condición **21a E** obtuvo sobre un 50% de eosinófilos en endometrio diferenciándose estadísticamente de **E** 24 h ($p < 0,001$). En cuanto a la degranulación de eosinófilos (Fig. 14; [B]) podemos destacar que no existen diferencias estadísticas entre las condiciones **E** 6 h y **21a E** a las 6 h de tratamiento. Sin embargo a las 24 h se observa que **21a E** 24 h induce una mayor degranulación de eosinófilos al compararlo con **E** 24 h con una significancia de $p < 0,001$.

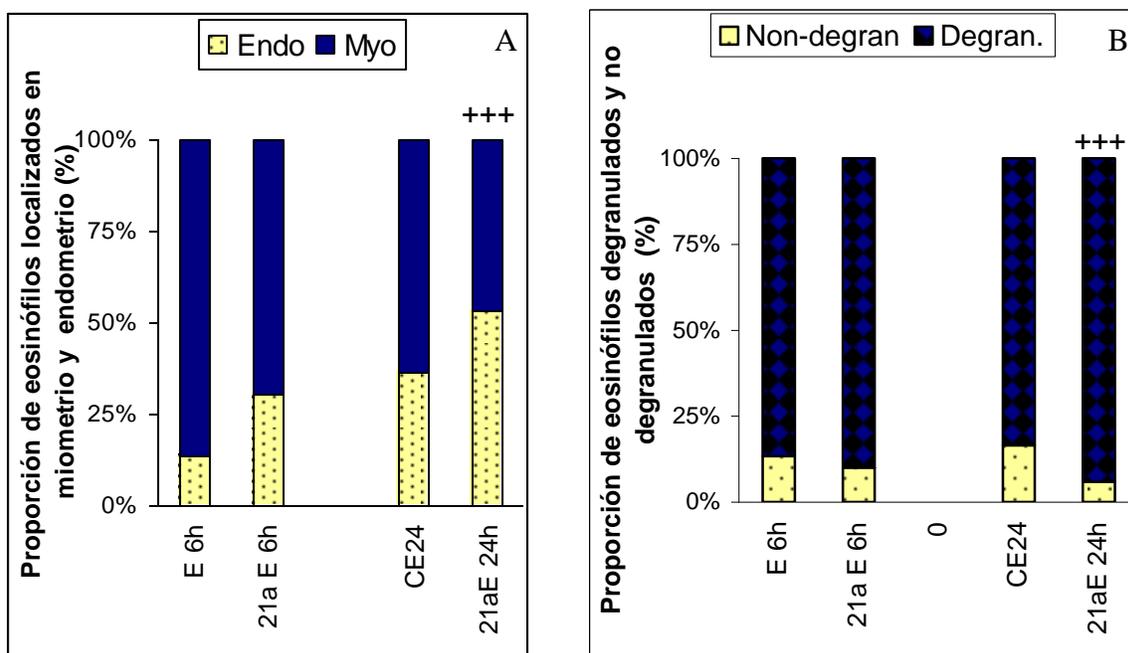


Fig. 14 Proporción de eosinófilos localizados en los estratos uterinos endometrio v/s miometrio [A]. Proporción de eosinófilos degranulados e intactos en útero de ratas prepúberes [B]. Comparación condiciones 17β estradiol y extracto 21a asociado a 17β estradiol a las 6 y 24 h.

Prueba de CHI CUADRADO; (+++) = $p < 0,001$. En comparación a la condición sin extracto o control.

5.1.4 EDEMA ESTROMA PROFUNDO

El edema de endometrio profundo alcanza una respuesta máxima (100%) a las 6 h con la condición estradiol con una significancia estadística de $p < 0,0001$ al compararlo con el control suero fisiológico (Fig. 15; [A]). La condición **21a** y **C** 6 h no muestran edema, pero la respuesta obtenida con el tratamiento **21a E** 6 h fue idéntica a la de **E** 6 h y estadísticamente muy superior ($>104%$) a **21a** ($p < 0,0001$).

A las 24 h (Fig. 15; [B]), el control estradiol obtuvo una significancia estadística de $p < 0,0001$ para edema en endometrio profundo al compararla con **C** 24 h, pero esta respuesta fue de menor magnitud (64%) que la observada a las 6h. El tratamiento con **21a** 24 h estimuló la formación de un edema que alcanzó un 30% de la respuesta a estradiol con un $p < 0,001$ al compararlo con **C** 24 h. Por otro lado **21a E** 24 h generó un edema 2 a 4 veces superior en magnitud a la respuesta observada con **E** 24 h ($p < 0,0001$) y **21a** 24 h ($p < 0,0001$), respectivamente.

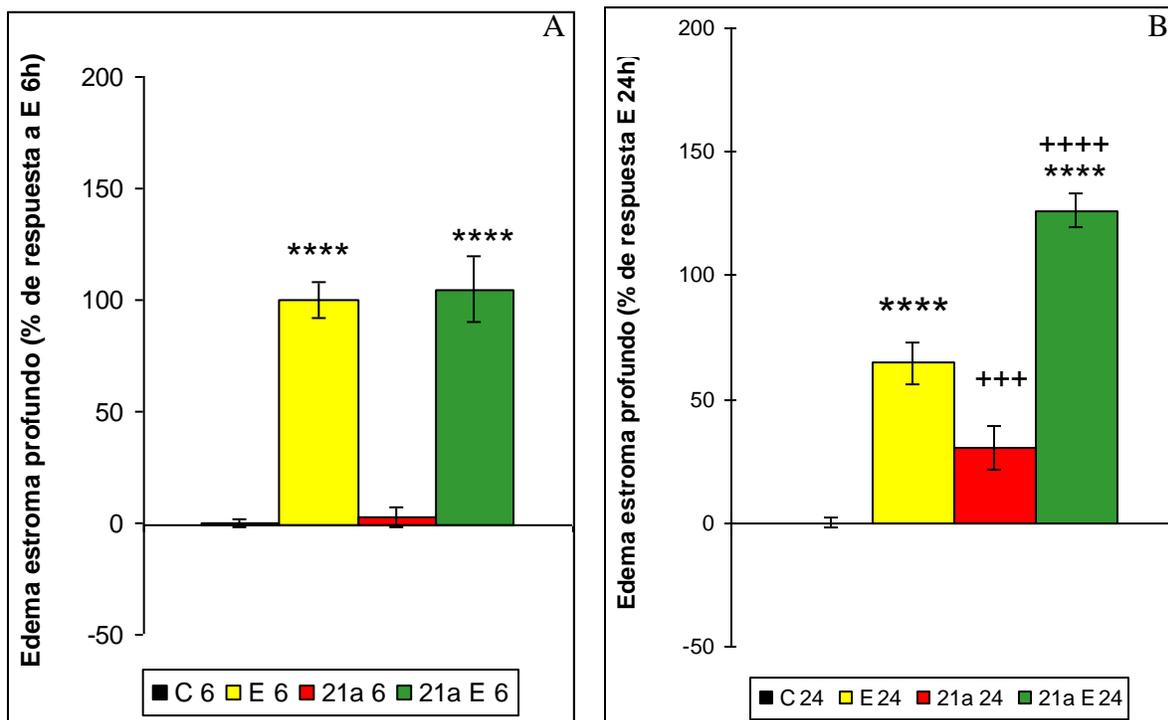


Fig. 15 Edema estroma profundo de útero de ratas pre-púberes a las 6 h [A] y 24 h [B] Comparación soluciones NaCl 0,9% (C), 17 β estradiol (E), extracto vegetal (21a) y 17 β estradiol + extracto (21a E).

(****) = $p < 0,0001$. En comparación a la condición sin Estradiol.

(+++)= $p < 0,001$; (++++)= $p < 0,0001$. En comparación a la condición sin extracto o control.

5.1.5 EDEMA ESTROMA SUPERFICIAL

Las condiciones **C** 6 h y **21a** 6 h no estimularon la formación de edema (Fig. 16; [A]). Estradiol 6 h generó un 100% de edema con una significancia de $p < 0,0001$ comparado a **C** 6 h. La condición **21a E** 6 h indujo un 75% del edema máximo a estradiol $p < 0,05$ y una diferencia estadística con **21a** 6 h de $p < 0,0001$. A las 24 h (Fig. 16; [B]), el edema alcanzado con estradiol es menor al 60% de la respuesta máxima, pero todavía significativo ($p < 0,0001$) al compararlo con **C** 24 h. La condición **21a** 24 h desarrolla un edema de endometrio superficial significativo cercano al 34% de la respuesta máxima a estradiol al compararlo con suero fisiológico ($p < 0,01$). El tratamiento con **21a E** 24 h determina un edema superficial de magnitud 3 veces superior al estradiol 24 h ($p < 0,0001$) y **21a** 24 h ($p < 0,0001$).

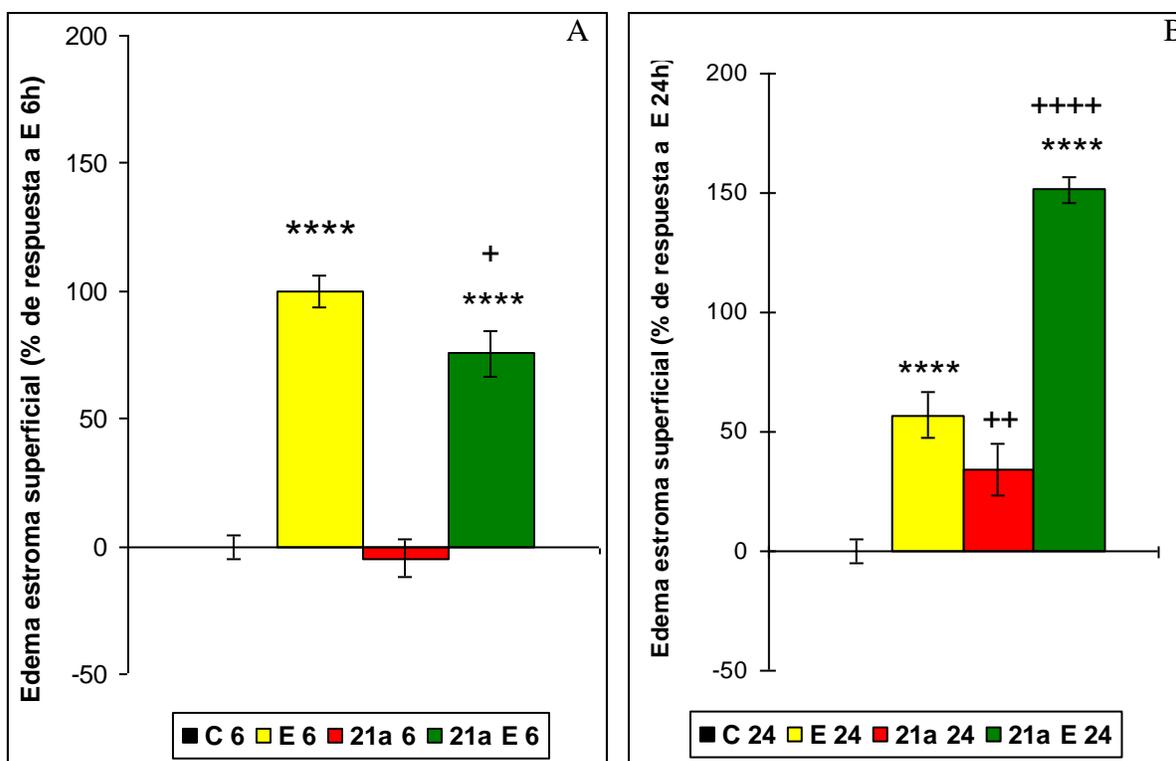


Fig. 16 Edema estroma superficial uterino de ratas pre-púberes a las 6 h [A] y 24 h [B]. Comparación soluciones NaCl 0,9% (C), 17 β estradiol (E), extracto vegetal (21a) y 17 β estradiol + extracto vegetal (21aE).

(****) = $p < 0,0001$. En comparación a la condición sin Estradiol.

(+) = $p < 0,05$; (++) = $p < 0,01$; (++++) = $p < 0,0001$. En comparación a la condición sin extracto o control.

5.1.6 HIPERTROFIA MIOMETRIO CIRCULAR

La hipertrofia de miometrio circular a las 6 h con estradiol alcanza un 44 % con una significancia estadística de $p < 0,05$ al compararlo con **C** 6 h, sin mostrar diferencias estadísticas con **21a E** 6 h (Fig. 17; [A]). El tratamiento con **21a** muestra una hipertrofia significativa del 55 % de respuesta al compararla con **C** 6 h ($p < 0,001$).

La figura 17; [B], muestra que la hipertrofia miometrial máxima se alcanza a las 24 h con estradiol con una significancia de $p < 0,0001$ en comparación a **C** 24 h. La hipertrofia con **21a** 24 h supera el 50% con una significancia estadística sobre suero fisiológico de $p < 0,001$. La solución **21a E** 24 h indujo una hipertrofia equivalente a 2 veces la respuesta **E** 24 h ($p < 0,0001$) y 3 veces la de **21a** 24 h con un valor de $p < 0,0001$.

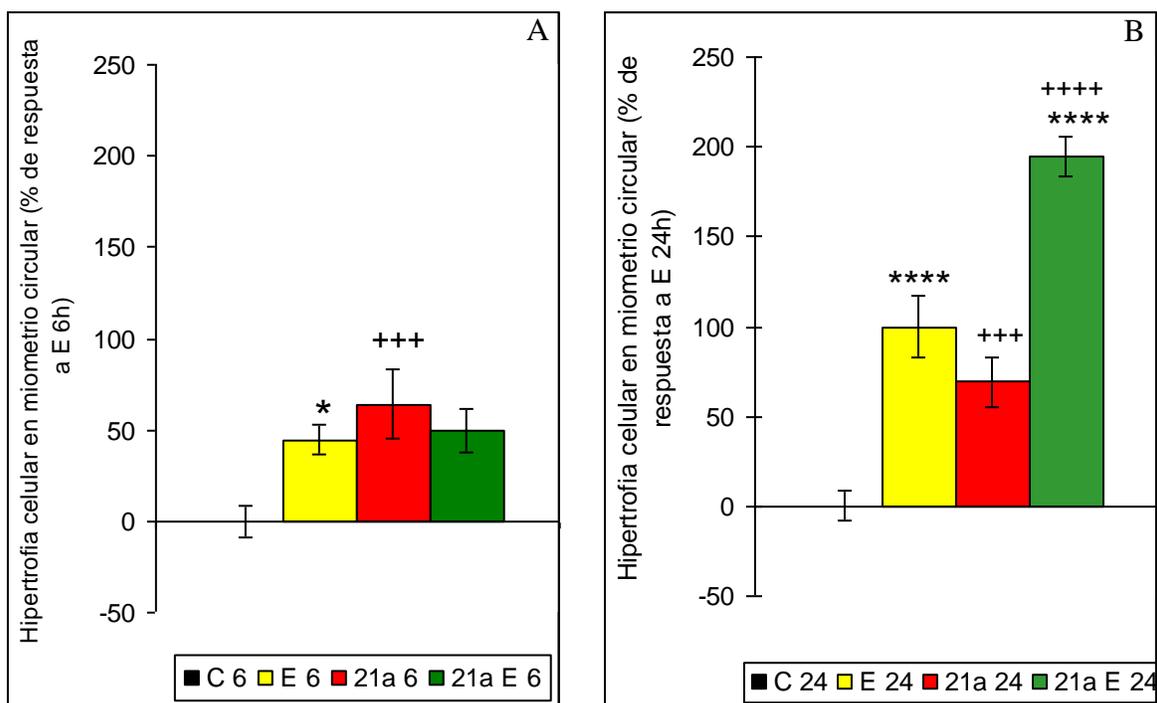


Fig. 17 Hipertrofia celular en miometrio circular de útero de ratas pre-púberes a las 6 h [A] y 24 h [B] de tratamiento con solución de NaCl 0,9% (C), 17 β estradiol (E), extracto vegetal (21a) y 17 β estradiol + extracto vegetal (21aE).

(*) = $p < 0,05$; (****) = $p < 0,0001$. En comparación a la condición sin E.

(+++)= $p < 0,001$; (****)= $p < 0,0001$. En comparación a la condición sin extracto o control.

5.2 EXTRACTO 22a

5.2.1 EOSINOFILIA UTERINA

Las condiciones suero fisiológico y extracto solo, no muestran eosinofilia ni a las 6h, ni a las 24 h (Fig. 18; [A] y [B]). La condición estradiol por el contrario determina una eosinofilia pequeña a las 6 h ($p < 0,0001$), alcanzando una respuesta máxima (100%) a las 24 h ($p < 0,0001$) al compararlo con suero fisiológico. El extracto **22a E** 6 h genera el 55 % de la respuesta máxima a estradiol, superando significativamente la condición **22a** 6 h ($p < 0,0001$). A las 24 h la eosinofilia con **22a E** presenta una magnitud similar al **E** 24 h y estadísticamente significativa al compararla con **22a** 24 h ($p < 0,0001$).

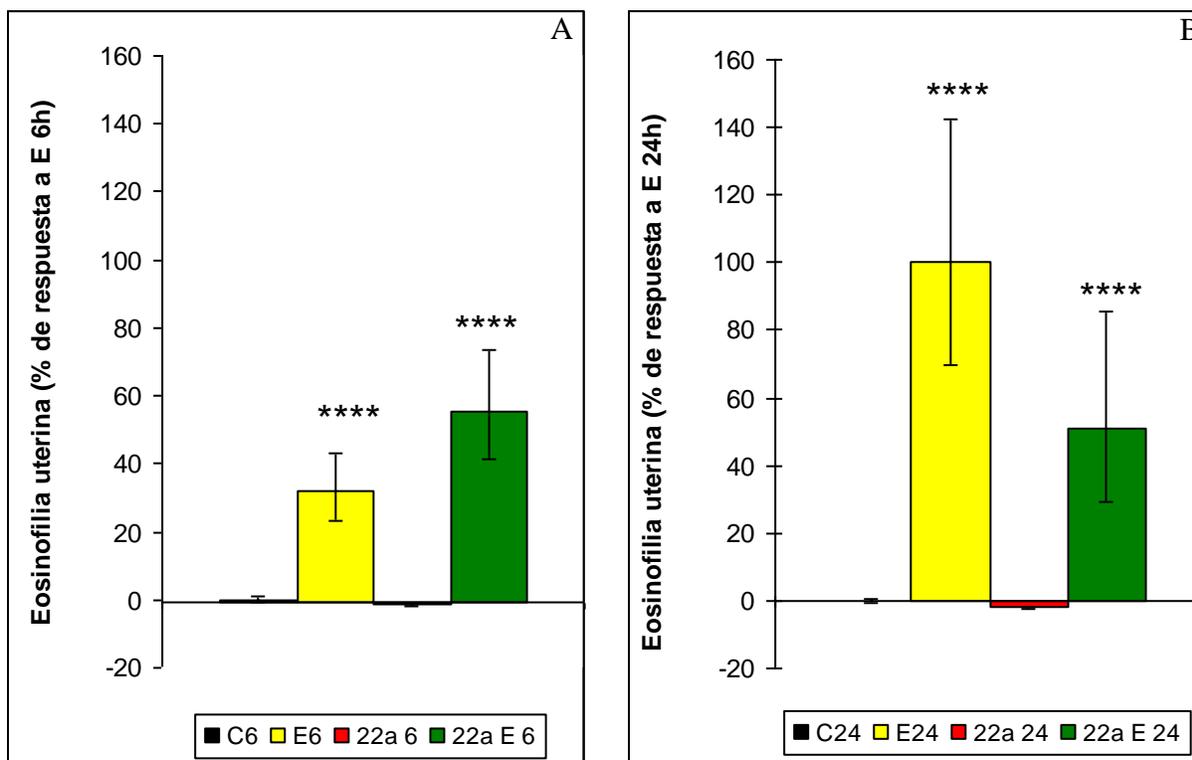


Fig. 18 Eosinofilia uterina de ratas pre-púberes a las 6 h [A] y 24 h [B] post-tratamiento. Comparación soluciones NaCl 0,9% (C), 17β estradiol (E), extracto vegetal (21a) y 17β estradiol + extracto (21a E).

(****) = $p < 0,0001$. En comparación a la condición sin E.

5.2.2 EOSINOFILIA POR ESTRATO UTERINO

Endometrio más miometrio

El tratamiento con **22a E 6 h** obtuvo una eosinofilia del 53%, respuesta significativa al compararla con **22a** ($p < 0,0001$) y con una diferencia estadística superior al compararlo con **E 6 h** ($p < 0,05$) (Fig. 19; [A]). La eosinofilia es máxima (100%) a las 24 h con estradiol (Fig. 19; [B]) y es estadísticamente significativa al compararla con **C 24 h** ($p < 0,0001$). La condición experimental **22a E 24 h** alcanza un 50 % de la respuesta a estradiol con una significancia estadística en relación a **22a** de $p < 0,0001$.

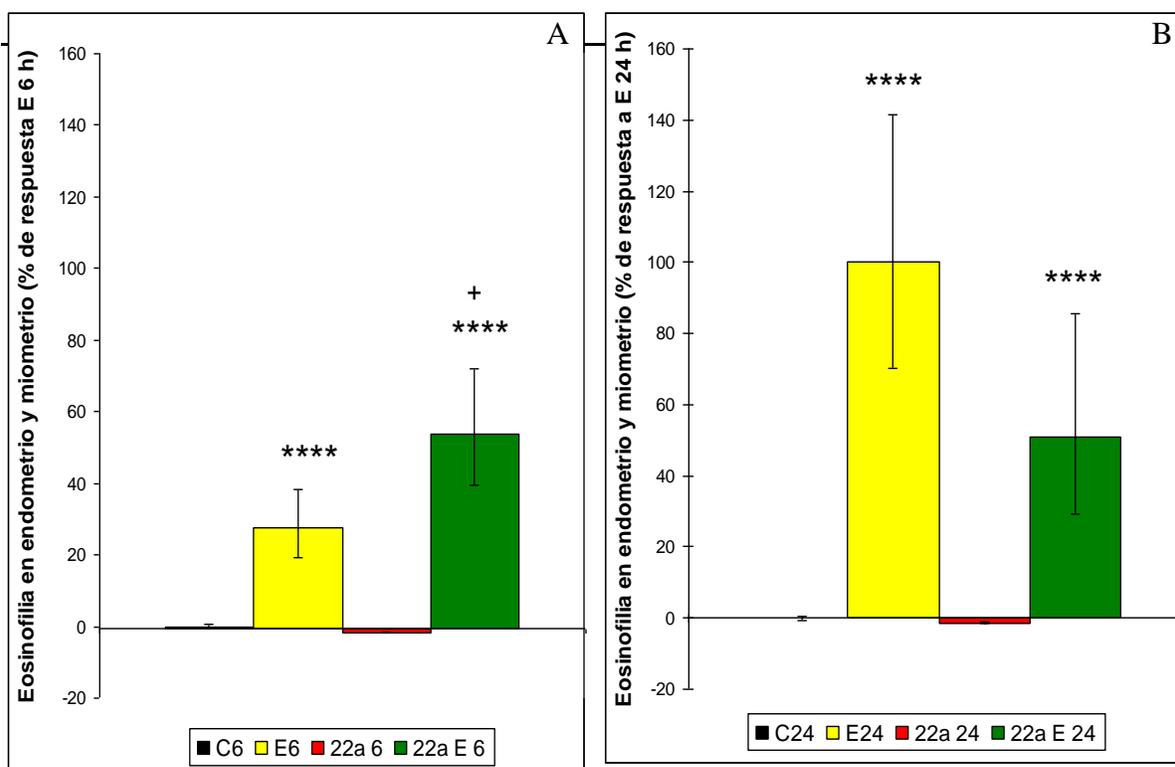


Fig. 19 Eosinofilia uterina de ratas pre-púberes por estratos celulares; endometrio más miometrio a las 6 h [A] y 24 h [B] post- tratamiento. Comparación soluciones NaCl 0,9% (C), 17 β estradiol (E), extracto vegetal (21a) y 17 β estradiol + extracto (21a E).

(****) = $p < 0,0001$. En comparación a la condición sin E.

(+) = $p < 0,05$. En comparación a la condición sin extracto o control.

Endometrio

En la figura 20; [A], se observa que estradiol induce una pequeña eosinofilia a las 6 h estadísticamente no significativa al compararlo con C 6 h. La condición **22a E** en cambio, presenta una moderada eosinofilia equivalente al 28 %, pero estadísticamente significativa cuando se compara con extracto solo ($p < 0,0001$) y estradiol ($p < 0,01$) 6 h. Las condiciones experimentales suero fisiológico y extracto **22a** no inducen eosinofilia ni a las 6 y 24 h. La condición **E** 24 h (Fig. 20; [B]) alcanza el 100% ($p < 0,0001$) y el tratamiento con **22a E** determina una eosinofilia casi del 60 % de respuesta máxima a estradiol con una significancia de $p < 0,0001$ respecto a **22a** 24 h.

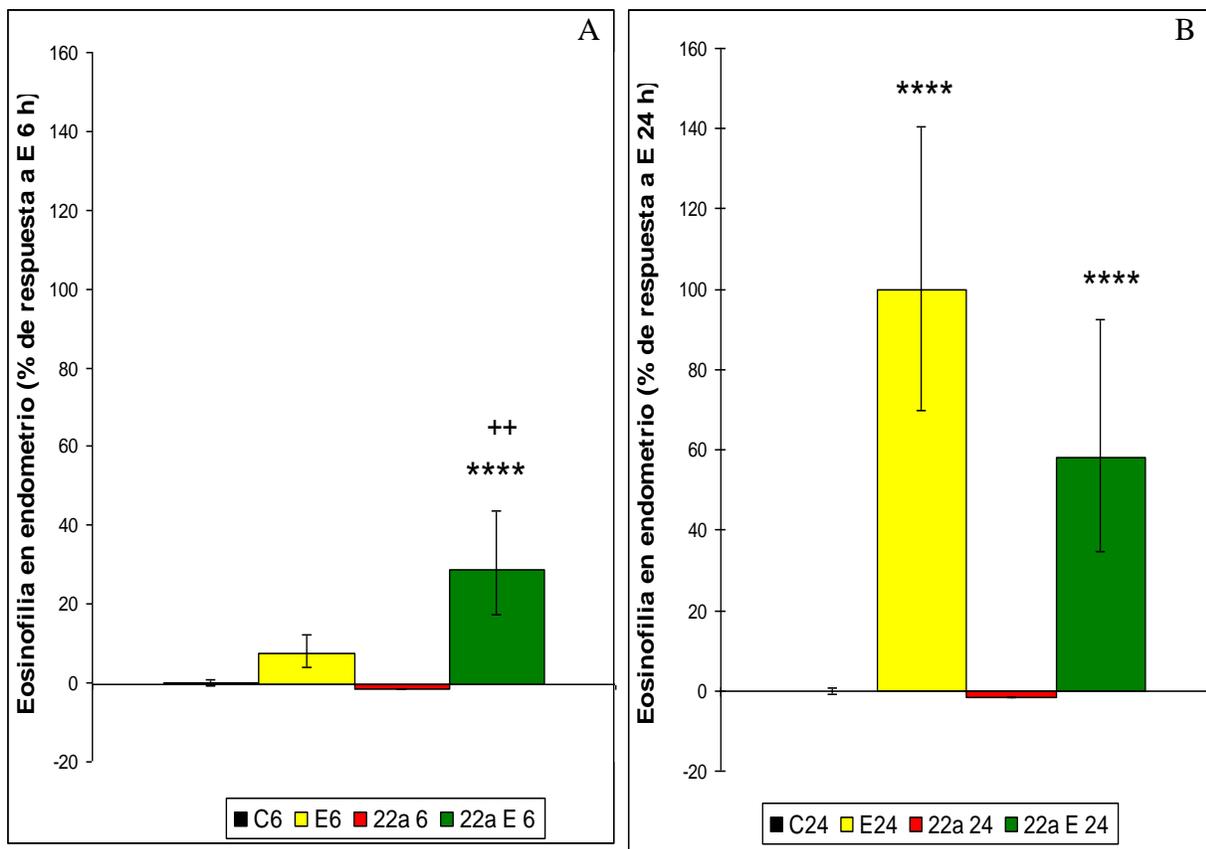


Fig. 20 Eosinofilia uterina de ratas pre-púberes por estratos celulares; endometrio a las 6 h [A] y 24 h [B] post- tratamiento. Comparación soluciones NaCl 0,9% (C), 17 β estradiol (E), extracto vegetal (21a) y 17 β estradiol + extracto (21a E).

(****) = $p < 0,0001$. En comparación a la condición sin E.

(++) = $p < 0,01$. En comparación a la condición sin extracto o control.

5.2.3 DISTRIBUCIÓN Y DEGRANULACIÓN

Del total de eosinófilos uterinos localizados en miometrio y endometrio (Fig. 21; [A]) menos de un 13 % se encontraban en endometrio a las 6 h con la condición estradiol y algo más del doble al tratar con **22a E** con una diferencia estadística con respecto a estradiol de $p < 0,001$. A las 24 h las condiciones **22a E** y **E** 24 h no presentaron diferencias estadísticas.

En cuanto a la degranulación (Fig. 21; [B]) el extracto **22a E** 6 h estimula una mayor degranulación y esta es significativamente mayor que el control **E** 6 h ($p < 0,001$). A las 24 h no se encontraron diferencias estadísticas de eosinófilos degranulados entre las condiciones **22a E** y estradiol.

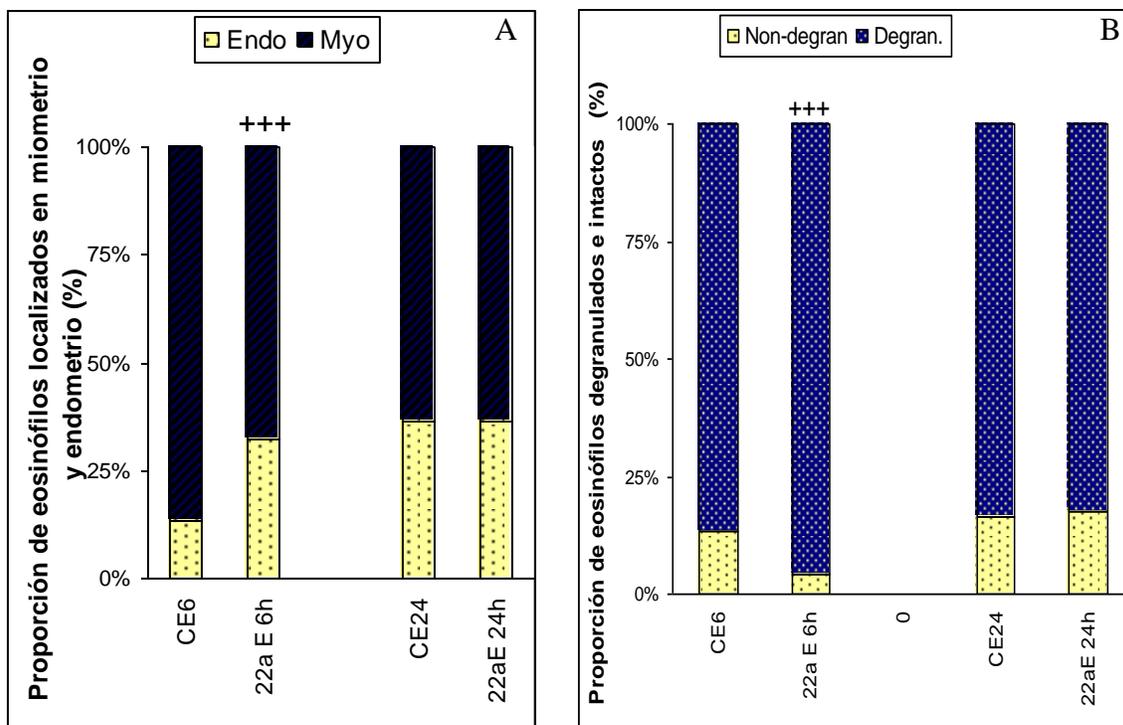


Fig. 21 Proportión de eosinófilos localizados en estratos uterinos de endometrio y miometrio [A]. Proportión de eosinófilos degranulados e intactos de útero de ratas prepúberes [B]. Comparación condiciones 17β estradiol y extracto 22a asociado a 17β estradiol 6 y 24 h.

Prueba de CHI CUADRADO; (+++) = $p < 0,001$.

5.2.4 EDEMA ESTROMA PROFUNDO

Estradiol presenta un edema de endometrio profundo (Fig. 22; [A]) que alcanza el 100 % de respuesta a las 6 h ($p < 0,0001$). El extracto **22a** 6 h genera un edema (46%) estadísticamente significativo al comparar con control suero fisiológico ($p < 0,01$). El edema de endometrio profundo generado por **22a E** es de una magnitud tres veces superior a la condición extracto solo ($p < 0,0001$) y aproximadamente un 50 % mayor que el edema observado con estradiol a las 6 h ($p < 0,001$).

A las 24 h (Fig. 22; [B]) estradiol muestra un edema endometrial menor que el presente a las 6 h, pero significativo todavía al compararlo con **C** 24 h ($p < 0,0001$). El extracto **22a** ha disminuído hasta no presentar diferencias estadísticas a las 24 h con respecto a control suero fisiológico. La condición **22a E** nos muestra un edema estadísticamente mayor ($>100\%$) que la respuesta observada con **E** 24 h ($p < 0,0001$) y **22a** 24 h ($p < 0,0001$).

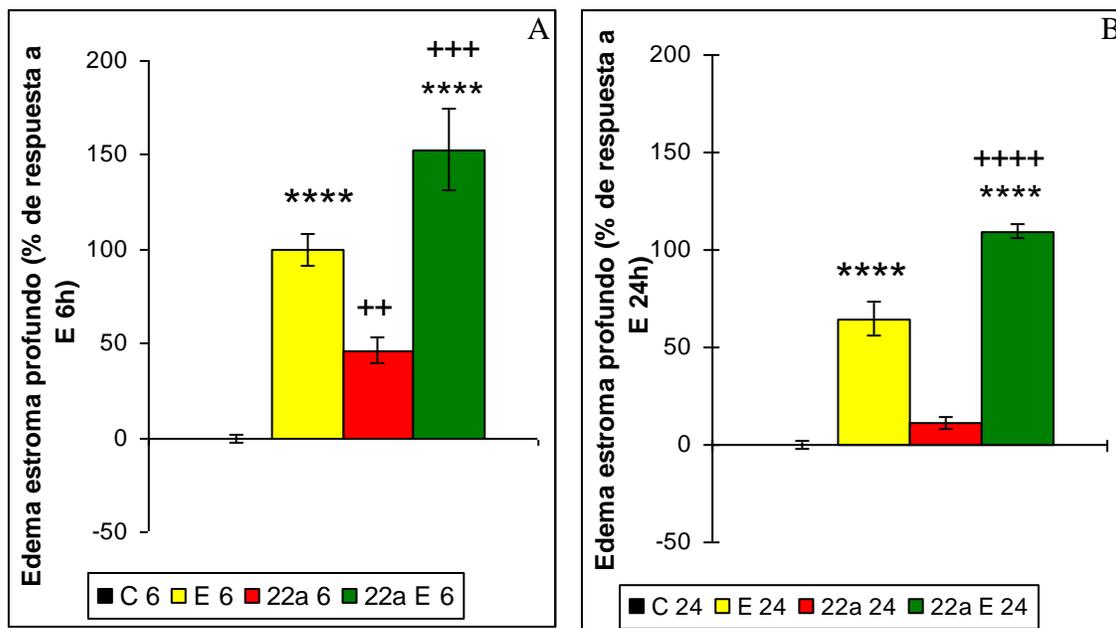


Fig. 22 Edema estroma profundo uterino de ratas pre-púberes a las 6 h [A] y 24 h [B]. Comparación soluciones NaCl 0,9% (C), 17 β estradiol (E), extracto vegetal (22a) y 17 β estradiol + extracto vegetal (22aE).

(****) = $p < 0,0001$. En comparación a la condición sin Estradiol.

(++) = $p < 0,01$; (+++) = $p < 0,001$; (+++++) = $p < 0,0001$. En comparación a la condición sin extracto o control.

5.2.5 EDEMA ESTROMA SUPERFICIAL

La figura 23; [A], muestra un edema de endometrio superficial que alcanza su máximo a las 6 h con la condición estradiol (100%) ($p < 0,0001$). La condición **22a** induce un edema estadísticamente significativo (46%) con respecto al **C** 6 h ($p < 0,0001$). El tratamiento con **22a E** 6 h estimula una respuesta estadísticamente mayor que **22a** 6 h ($p < 0,05$) y sin diferencias estadísticas al compararla con la respuesta estradiol 6 h.

A las 24 h (Fig. 23; [B]) la respuesta con la condición **22a** es menor y sin diferencias estadísticas con respecto a suero fisiológico. El edema presente con **E** 24 h es alrededor de un 50% menor que el existente a las 6 h ($p < 0,0001$). La respuesta edematosa presente con la condición experimental **22a E** 24 h es altamente significativo, su magnitud corresponde a 3 veces el edema presente con estradiol 24 h ($p < 0,0001$) y estadísticamente superior a la condición **22a** 24 h (0,0001).

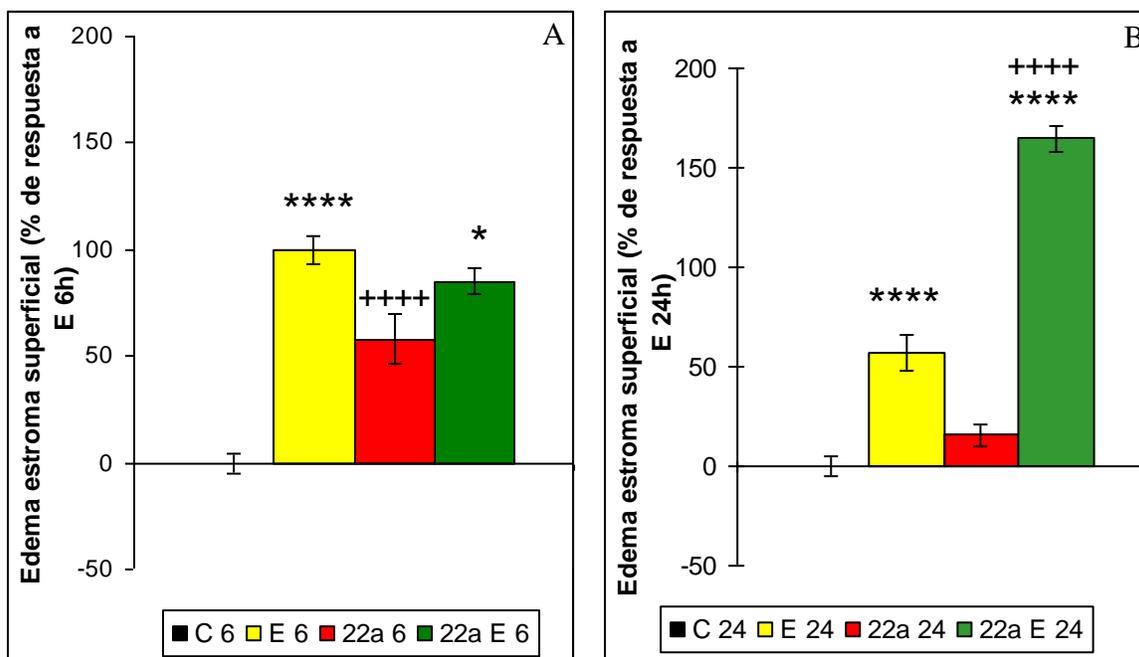


Fig. 23 Edema estroma superficial uterino a las 6 h [A] y 24 h [B]. Comparación de las soluciones NaCl 0,9% (C), 17β estradiol (E), extracto vegetal (22a) y 17β estradiol + extracto vegetal (22aE).

(*) = $p < 0,05$; (****) = $p < 0,0001$. En comparación a la condición sin E.

(++++) = $p < 0,0001$. En comparación a la condición sin extracto o control.

5.2.6 HIPERTROFIA MIOMETRIO CIRCULAR

La hipertrofia celular en miometrio circular alcanzada con estradiol es de un 43 % a las 6 h ($p < 0,05$) (Fig. 24; [A]). El tratamiento con **22a** 6 h induce una hipertrofia del 93% de la respuesta máxima a estradiol y al compararla con suero fisiológico presenta una significancia estadística de $p < 0,0001$. La condición **22a E** 6 h tiene una magnitud similar a **E** 6 h sin diferencias estadísticas, y una hipertrofia menor que **22a** ($p < 0,001$).

Estradiol a las 24 h (Fig. 24; [B]) alcanza la respuesta máxima (100%) y la condición **22a** mantiene la magnitud de hipertrofia observada a las 6 h con una diferencia estadística para ambas condiciones igual a $p < 0,0001$ al compararlas con suero fisiológico. Por otro lado la condición experimental **22a E** 24 h induce una hipertrofia cuya magnitud es superior a tres veces la respuesta generada por **E** 24 h ($p < 0,0001$) y **22a** 24 h ($p < 0,0001$).

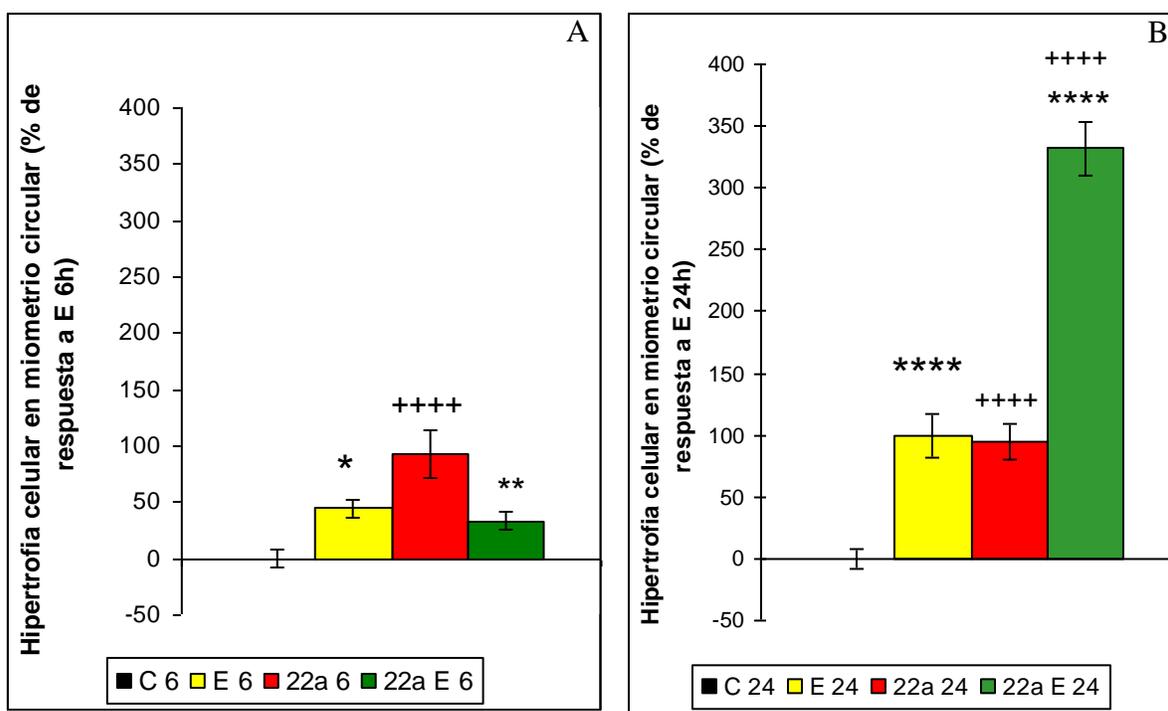


Fig. 24 Hipertrofia celular en miometrio circular de útero de ratas pre-púberes a las 6 h [A] y 24 h [B] post tratamiento con solución de NaCl 0,9% (C), 17 β estradiol (E), extracto vegetal (22a) y 17 β estradiol + extracto vegetal (22aE).

(*) = $p < 0,05$; (**) = $p < 0,01$; (****) = $p < 0,0001$. En comparación a la condición sin E.

(+++++) = $p < 0,0001$. En comparación a la condición sin extracto o control.

Tabla 5: Comparación actividad antagonista de los dos extractos

Respuesta estrogénica †	21a	22a	Compar 21aE vs 22aE
Eosinofilia			
6 h	2,60 ± 1,71 (n=13)	55,48 ± 16,01 (n=12)	****
24 h	11,48 ± 6,22 (n=13)	50,89 ± 28,03 (n=12)	NS
Edema			
<i>Estroma Superficial</i>			
6 h	75,57 ± 9,10 (n=13)	85,17 ± 6,15 (n=12)	NS
24 h	151,26 ± 5,07 (n=13)	164,53 ± 6,26 (n=12)	NS
<i>Estroma Profundo</i>			
6 h	104,81 ± 14,93 (n=13)	152,97 ± 21,20 (n=12)	NS
24 h	126,40 ± 6,70 (n=13)	109,46 ± 3,44 (n=12)	*
Hipertrofia			
6 h	49,75 ± 11,72 (n=13)	33,80 ± 7,64 (n=12)	NS
24 h	194,36 ± 11,16 (n=13)	332,10 ± 21,67 (n=12)	****

(†) Valores expresados en comparación a la respuesta máxima obtenida con estradiol (100%) y a la respuesta definida como control obtenida con suero fisiológico, (0%).

(n=); Número de ratas utilizado para la medición de cada respuesta estrogénica.

(*) = p<0,05; (****) = p<0,001; diferencias estadísticas al comparar las respuestas de cada extracto a las 6 y 24 h (prueba t de Student). NS= Sin diferencias estadísticas.

Tabla 6: Comparación actividad agonista de los dos extractos

Respuesta estrogénica †	21a	22a	Compar 21a vs 22a
Eosinofilia	SR	SR	
Edema			
<i>Estroma Superficial</i>			
6 h	-4,68 ± 7,37 (n= 13)	57,96 ± 11,89 (n=13)	***
24 h	34,26 ± 10,91 (n= 13)	15,74 ± 5,25 (n=13)	NS
<i>Estroma Profundo</i>			
6 h	2,67 ± 4,48 (n= 13)	46,31 ± 6,70 (n=13)	****
24 h	30,49 ± 8,62 (n=13)	11,42 ± 3,36 (n=13)	NS
Hipertrofia			
6 h	63,77 ± 18,98 (n= 13)	93,03 ± 20,42 (n=13)	NS
24 h	69,22 ± 13,77 (n= 13)	95,14 ± 14,66 (n=13)	NS

(†) Valores expresados en comparación a la respuesta máxima obtenida con estradiol (100%) y a la respuesta definida como control obtenida con suero fisiológico, (0%).

SR= Sin respuesta o sin diferencia estadística con respecto a control suero fisiológico.

(n=); Número de ratas utilizado para la medición de cada respuesta estrogénica.

(****) = p<0,0001; (***) = p<0,001; diferencias estadísticas al comparar las respuestas de cada extracto a las 6 y 24 h (prueba t de Student). NS= Sin diferencias estadísticas.

VI. DISCUSIÓN

EOSINOFILIA UTERINA

En el modelo experimental empleado en esta memoria, se demostró que la eosinofilia uterina es una respuesta no genómica, que se produce frente a la administración de 17β estradiol y cuya intensidad alcanza un máximo a las 24 h. Al analizar el efecto de los extractos sobre la eosinofilia, puede desprenderse que la respuesta es diferente de acuerdo al extracto que se considere. Así por ejemplo, a las 6 h, el extracto **21a** tiene la capacidad de antagonizar la respuesta eosinofílica inducida por 17β estradiol, y el extracto **22a**, por el contrario, carece de la capacidad para antagonizar dicha respuesta (Tabla 5).

Considerando que ambos extractos difieren en la forma de preparación desde la misma planta, una explicación razonable para las diferencias observadas es que los extractos contengan compuestos de distinta polaridad. De acuerdo a esta explicación, el extracto **21a** contendría en mayor proporción, algún compuesto con capacidad de antagonizar la eosinofilia uterina inducida por 17β estradiol. Dentro de los compuestos que pudieran separarse por polaridad y estar presentes en una mayor concentración en el extracto **21a** en relación al **22a**, son las gliconas, para las cuales Farmakalidis *et al.*, (1985) también describió una potencia estrogénica en útero de ratas. Sin embargo, no se puede descartar la acción de las agliconas presentes en el extracto **21a** sobre algunas de las respuestas estrogénicas uterinas analizadas. No obstante, se requiere realizar otros tipos de análisis enfocados a la identificación y cuantificación de los compuestos presentes en el extracto **21a** que antagonizan las respuestas uterinas inducidas por 17β estradiol.

En el año 1960, Rytöma, estableció que el número de eosinófilos en el útero de ratas varía de acuerdo a la etapa del ciclo estral (diestro, proestro, estro y metaestro). En el año 1974, Tchernitchin y colaboradores describieron un aumento dramático de la eosinofilia uterina post-tratamiento con estradiol a ratas prepúberes (Tchernitchin *et al.*, 1974). Tchernitchin *et al.* (1985) postularon un segundo mecanismo de acción hormonal para los estrógenos en los leucocitos eosinófilos, en el cual estaría involucrado un receptor de estrógenos ubicado en la membrana del eosinófilo que tiene como característica una alta especificidad por moléculas de acción estrogénica (Tchernitchin, 1969). Las investigaciones anteriores, permiten proponer un mecanismo que podría explicar la inhibición de la eosinofilia uterina inducida por el extracto **21a** asociado a estradiol (**21aE**). De este modo, algún fitoestrógeno presente en el extracto **21a** podría estar ocupando el receptor del eosinófilo o estar ligado a otro sitio del receptor, lo que induciría cambios conformacionales en éste e impediría la unión del estradiol. Por esta vía, se impediría la formación del complejo estradiol - receptor en la superficie de los eosinófilos y el reconocimiento de éste por el receptor del endotelio vascular para la posterior migración de los eosinófilos a útero.

Un segundo mecanismo descrito que explica la eosinofilia uterina es la producción de eotaxina -sustancia eosinofilotáctica- sintetizada en el útero por estímulo de 17β estradiol. Esta eotaxina es necesaria para la migración de eosinófilos al estroma uterino bajo acción estrogénica (Gouon-Evans & Pollard, 2001). De esta forma, algún principio activo presente en el extracto **21a** podría estar inhibiendo la producción de eotaxina y explicar asimismo el antagonismo de la eosinofilia uterina observado por la asociación del extracto **21a** a estradiol.

EDEMA

La condición experimental suero fisiológico no indujo edema, por el contrario 17β estradiol (control positivo) generó un edema significativo a las 6 h de tratamiento, que se consideró como el 100% de respuesta. De acuerdo con otros trabajos realizados en este laboratorio el edema es una respuesta de tipo no genómica temprana que se evidencia entre las 6 – 12 h (Grunert *et al.*, 1984).

Los extractos por sí solos indujeron edema, pero la cinética de generación del edema para el extracto **21a** fue distinta de la inducida por 17β estradiol y por el extracto **22a**, es decir, indetectable a las 6 h y de intensidad máxima a las 24 h para el extracto **21a** (Tabla 6). Respecto de la magnitud del edema, la asociación de cada extracto con estradiol determinó un probable efecto aditivo de la respuesta estrogénica para el extracto **22a** a las 6 h (Fig. 22; [A]) y un aparente efecto sinérgico para el extracto **21a** a las 24 h (Fig. 15; [B]). Por lo anterior, resulta interesante analizar la mantención del edema a las 24 h inducido por el extracto **21a** y los probables mecanismos participantes en esta respuesta. Uno de los mecanismos que no podemos descartar en el aporte a la generación de este edema con el extracto **21a** es la presencia significativa de unos pocos eosinófilos (15%) a nivel uterino a las 24 h (Fig. 11; [B]). La migración de estos eosinófilos estaría favorecida por una matriz extracelular uterina más líquida, lo que se evidenció tras la administración de ambos extractos, por una mayor proporción de eosinófilos en los tejidos más profundos de útero (miometrio circular y estroma endometrial) y una mayor proporción de degranulados en comparación a lo observado con 17β estradiol (Fig. 14 y 21). La llegada de estos eosinófilos a su sitio de acción y la posterior degranulación en estos tejidos determinaría la liberación de sustancias proinflamatorias y de enzimas que inducirían cambios en la matriz

extracelular uterina, favoreciendo de esta manera la difusión de agua a los diferentes estratos uterinos (Tchernitchin *et al.*, 1989).

Otra explicación plausible es el aumento de la síntesis de acuaporinas en útero (Jablonski *et al.*, 2003), que necesariamente involucra la participación de una respuesta tipo genómica entre las 6 y 24 h post exposición al extracto **21a**. Estas proteínas constituyen poros o canales para el ingreso o salida de agua y de otros solutos, tales como glicerol y urea en tejidos sometidos a un gran intercambio de agua, entre ellos el riñón, intestino, glándulas salivales, etc. El tejido uterino durante la etapa estral o bajo acción estrogénica también aumenta la expresión de acuaporinas (Jablonski *et al.*, 2003). Estos canales además de favorecer el flujo de agua hacia el lumen uterino, podrían incrementar el transporte de óxido nítrico (Herrera *et al.*, 2006) a través de AQP tipo 1 presentes en la membrana de células endoteliales uterinas. A este respecto, se ha demostrado que la genisteína es capaz de estimular tanto la síntesis como la liberación de óxido nítrico en el endotelio vascular (Walker *et al.*, 2001). Otros estudios han demostrado que la daidzeína y genisteína aumentan la producción de prostaciclina entre las 12 y 24 h post-tratamiento (Hermenegildo *et al.*, 2005). Así, estos factores actúan como vasodilatadores a través de la relajación de la musculatura lisa de los vasos uterinos, lo que se traduce en un aumento del flujo sanguíneo o hiperemia en la zona, con el consiguiente aumento de la presión hidrostática y salida de líquidos al extravascular (transudación).

HIPERTROFIA

La administración de los extractos **21a** y **22a** a ratas prepúberes generó una hipertrofia o aumento de volumen celular en miometrio circular a las 6 h, cuya magnitud se

mantuvo sin variaciones hasta las 24 h, hecho que contrasta con la hipertrofia inducida por 17β estradiol la cual se presenta ya a las 6 h y alcanza su máxima intensidad a las 24 h. La administración de cada extracto asociado a estradiol, determinó la aparición de una hipertrofia de magnitud similar a la generada con 17β estradiol a las 6 h. Sin embargo, a las 24 h, el extracto **22a** generó un efecto sinérgico sobre esta respuesta, en tanto el extracto **21a** generó solamente un efecto aditivo (Tabla 5).

Los dos extractos analizados generaron hipertrofia celular en miometrio circular en magnitud comparable a la inducida por estradiol tanto a 6 h como 24 h. El fenómeno de hipertrofia puede explicarse por la activación de mecanismos clásicos de acción genómica, determinantes de una mayor actividad transcripcional, lo que conlleva al aumento de la biosíntesis de proteínas, y por lo tanto, del volumen celular. Investigaciones anteriores en nuestro laboratorio (LEEPA) han demostrado que la genisteína a dosis de 500 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de p.c. vía subcutánea, tiene un efecto agonista estrogénico, determinante de hipertrofia en útero de ratas prepúberes (Alvarez, 2001). Kuiper *et al.* (1998), describieron que los fitoestrógenos tienen la capacidad de unirse y de activar a los receptores alfa y beta, aunque también se ha descrito que tanto las afinidades como las potencias son claramente ligando dependientes, presentando una mayor afinidad por el RE β (Jinping *et al.*, 2001). Dentro de las proteínas que podrían aumentar su expresión encontramos a proteínas integrales del citoesqueleto celular, al receptor de estrógenos (“up regulation”) y proteínas funcionales tales como óxido nítrico sintasa (Khorram *et al.*, 1999) y acuaporinas tipo 2 (Jablonski *et al.*, 2003).

Estudios efectuados por otros co-investigadores en nuestro Laboratorio de Endocrinología Experimental y Patología Ambiental (LEEPA) en forma paralela bajo las mismas condiciones experimentales descritas en el presente trabajo para cada extracto, concluyeron que el 17β estradiol tiene un claro efecto mitótico, no así los extractos **21a** y

22a (datos no publicados). Por lo anterior puede descartarse la presencia de hiperplasia por efecto de la administración de los extractos.

Una consideración aparte debe darse a la posibilidad de cuestionar el análisis morfométrico empleado. A este respecto, si bien es cierto, el conteo del número de núcleos por campo visual es una herramienta aceptada (Grunert *et al.*, 1984), cabe la posibilidad que en parte, la disminución de núcleos por campo visual se deba a edema o degeneración higrópica inducida por los extractos. Para descartar esta posibilidad, se hace necesario y recomendable la cuantificación de alguna proteína integral del citoesqueleto- por ejemplo; alfa tubulina - en miometrio circular.

El presente trabajo es una evaluación preliminar del extracto de planta nativa, por ello es necesario; identificar cual es el principio activo de este extracto que ejerce esta actividad de tipo selectiva, sus mecanismos de acción, sus efectos en otros tejidos distintos al uterino y estudiar otros parámetros de acción hormonal considerados como de riesgo, entre ellos, proliferación celular en miometrio y epitelio luminal uterino.

VII. CONCLUSIONES

- Los extractos **21a** y **22a**, obtenidos de una planta medicinal chilena, exhibieron la capacidad de modificar las respuestas estrogénicas en un modelo de útero de rata prepúber.
- La magnitud y el mecanismo mediante el cual ambos extractos modificaron la respuesta estrogénica, sugiere la presencia de compuestos diferentes o de características distintas en cada extracto.
- Ningún extracto generó eosinofilia uterina, sin embargo ambos generaron edema estromal e hipertrofia de miometrio circular, por lo que contendrían algún fitoestrógeno.
- El extracto **21a**, administrado conjuntamente con 17β estradiol, mostró un antagonismo de la eosinofilia uterina y una potenciación del edema y de la hipertrofia.
- El extracto **22a**, administrado conjuntamente con 17β estradiol, no modificó la eosinofilia inducida por estradiol, pero potenció el edema y la hipertrofia.
- La administración de cada extracto junto a 17β estradiol, evidenció una mayor proporción de eosinófilos en los tejidos más profundos de útero (miometrio circular y estroma) y una mayor proporción de eosinófilos degranulados, en comparación a lo observado con la administración de 17β estradiol.
- Considerando los antecedentes anteriormente expuestos y que el extracto **21a** -en presencia de estradiol- posee la capacidad de disociar algunas respuestas estrogénicas; esto es, inhibir la eosinofilia uterina, pero potenciar el edema endometrial y la hipertrofia celular miometrial, podemos proponer que contendría un compuesto con actividad de tipo SERM.

VIII. BIBLIOGRAFÍA

ADAMS N., 1995. Detection of the effects of phytoestrogens on sheep and cattle. *Journal of Animal Science*. 73:1509-1515.

ADLERCREUTZ H., 1995. Phytoestrogens: Epidemiology and a possible role in cancer protection. *Environmental Health Perspectives* 103(7):103-112.

AKIYAMA T., ISHIDA J., NAKAGAWA S., OGAWARA H., WATANABE S., ITOH N., SHIBUYA M., FUKAMI Y., 1986. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *The Journal of Biological Chemistry* 262(12): 5592-5595.

ALVAREZ R., 2001. Efecto de fitoestrógenos en útero de rata y potenciales aplicaciones terapéuticas; respuesta estrogénica genómica. Memoria (Título de Químico Farmacéutico). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas.

ASCENZI P., BOCEDI A., MARINO M., 2006. Structure-function relationship of estrogen receptor α and β : Impact on human health. *Molecular Aspects of Medicine* 27:299-402.

BELCHER S. AND ZSARNOVSZKY A., 2001. Estrogenic actions in the brain: estrogen, phytoestrogens, and rapid intracellular signaling mechanisms. *The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 299:408-414.

BELL K., PEARCE P., UGARTE C., HENDRIKS H., 2006. Preliminary investigation into the absorption of genistein and daidzein by domestic cats (*Felis catus*). *The Journal of Nutrition* 136: 2004S-2006S.

BJÖRNSTRÖM & SJÖBERG., 2005. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Molecular Endocrinology* 19(4):833-842.

BUKHTIAR S., 2005. Estrogen stimulation of COX-2-derived PGI₂ confers atheroprotection. *Endocrinology and Metabolism* Vol.16(5):199-201.

BUSTOS S., SOTO J., TCHERNITCHIN A., 1996. Estrogenic activity of p,p'-DDT. *Environmental Toxicology and Water Quality: An international journal*, Vol.11:265-271.

CASSIDY A., BROWN J., HAWDON A., FAUGHNAN, KING L., MILLWARD J., ZIMMER-NECHEMIAS L., WOLFE B., SETCHELL K., 2006. Factors affecting the bioavailability of the soy isoflavones in humans after ingestion of physiologically relevant levels from different soy foods. *The Journal of Nutrition* 136: 45-51.

CLAVEL T., HENDERSON G., ALPERT C., PHILIPPE C., RIGOTTIER-GOIS L., DORÉ J., BLAUT M., 2005. Intestinal bacterial communities that produce active estrogen-like compounds enterodiol and enterolactone in humans. *Applied and Environmental Microbiology* N° 10, 71:6077-6085.

DAVE B., EASON R., TILL S., GENG Y., VELARDE M., BADGER T., SIMMEN R., 2005. The soy isoflavone genistein promotes apoptosis in mammary epithelial cells by inducing the tumor suppressor PTEN. *Carcinogenesis* 26(10):1793-1803

DE KLEIJN M., VAN DER SCHOUW Y., WILSON P., GROBBEE D., JACQUES P., 2002. Dietary intake of phytoestrogens is associated with a favorable metabolic cardiovascular risk profile in postmenopausal U.S. women: The Framingham study. *The Journal of Nutrition* 132:276-282.

DIEL P., 2002. Tissue-specific estrogenic response and molecular mechanisms. *Toxicology letters* 127:217-224.

DOERGE D., HEBRON C., CHANG C., MONA I., HOLDER C., 1999. Analysis of soy isoflavone conjugation in vitro and human blood using liquid chromatography-mass spectrometry. *Drug Metabolism and Disposition* 28 (3):298-307.

FARMAKALIDIS E., HATHCOCK J., MURPHY P., 1985. Oestrogenic potency of genistin and daidzin in mice. *Food and Chemical Toxicology* 23(8):741-745.

FITZPATRICK L., 1999. Selective estrogen receptor modulators and phytoestrogens: new therapies for the postmenopausal woman. *Mayo Clinic Proceedings* 74:601-607.

FLÓREZ J., ARMIJO J. A., MEDIAVILLA A., 2003. In: *Hormonas sexuales; estrógenos, gestágenos, andrógenos y anticonceptivos hormonales*. *Farmacología Humana*, cuarta edición, editorial Masson. Págs. 887-912.

FRANCO O., BURGER H., LEBRUN C., PEETERS P., LAMBERTS S., GROBBEE D., VAN DER SCHOUW Y., 2005. Higher dietary intake of lignans is associated with better cognitive performance in postmenopausal women. *The Journal of Nutrition* 135:1190-1195.

FRANKE A., CUSTER L., TANAKA Y., 1998. Isoflavones in human breast milk and other biological fluids. *American Journal of Clinical Nutrition* 68:1466S-1473S.

FUJIOKA M., UEHARA M., WU J., ADLERCREUTZ H., SUZUHI K., KANAZAWA K., TAKEDA K., YAMADA K., ISHIMI Y., 2004. Equol, a metabolite of daidzein, inhibits bone loss in ovariectomized mice. *The Journal of Nutrition* 134:2623-2627.

GARCIA H., 1999. Fitoestrógenos: una nueva preocupación en la alimentación infantil. *Revista Chilena de Pediatría* 70:92-99.

GORTÁZAR R., RODRÍGUEZ A., ARGÜELLES E., 2005. Efectos moduladores de los fitoestrógenos sobre la diferenciación de osteoblastos humanos. *Mapfre Medicina* N°3 16:174-183.

GOUON-EVANS V., POLLARD J., 2001. Eotaxin is required for eosinophil homing into the stroma of the prepubertal and cycling uterus. *Endocrinology* 142 (10):4515-4521.

GRUNERT G., FERNANDEZ S., TCHERNITCHIN A., 1984. Methods for the evaluation of responses to estrogen in individual cell types or regions of the uterus. *Hormone Research* 19:253-262.

GRUNERT G., PORCIA M., TCHERNITCHIN A., 1986. Differential potency of oestradiol-17 β and diethylstilboestrol on separate groups of responses in the rat uterus. *Endocrine Journal* 110:103-114.

GUO JUNG-MING., XIAO BING-XIU., DAI DE-JIAN., LIU QIONG., MA HONG-HUI., 2004. Effects of daidzein on estrogen-receptor-positive and negative pancreatic cancer cells in vitro. *World Journal of Gastroenterology* 10(6):860-863.

HAFEZ E.S.E., 1996. Reproducción, hormonas y factores de crecimiento. In: Reproducción e inseminación artificial en animales. Sexta ed en español, editorial interamericana McGraw-Hill. Pág. 56-88.

HERMAN C., ADLERCREUTZ T., GOLDIN B., GORBACH S., HÖCKERSTEDT K., WATANABE S., HÄMÄLÄINEN E., MARKKANEN M., MÄKELÄ T., WÄHALÄ K., HASE T., FOTSIS T., 1995. Soybean Phytoestrogen intake and cancer risk. *The Journal of Nutrition* 125:757S-770S.

HERMENEGILDO C., OVIEDO P., GARCÍA-PÉREZ M., TARÍN J., CANO A., 2005. Effects of phytoestrogens genistein and daidzein on prostacyclin production by human endothelial cells. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics* 315: 722-728

HERRERA M., HONG N., GARVIN J., 2006. Aquaporin-1 transports NO across cell membranes. *Hypertension* 48:157-164

IRVINE C., SHAND N., FITZPATRICK M., ALEXANDER S., 1998. Daily intake and urinary excretion of genistein and daidzein by infants fed soy- or dairy-based infant formulas. *American Journal of Clinical Nutrition* 68:1462S-1465S.

ISHIMI Y., MIYAURA C., OHMURA M., ONOE Y., SATO T., UCHIYAMA Y., ITO M., WANG X., SUDA T., IKEGAMI S., 1999. Selective effects of genistein, a soybean isoflavone, on B-Lymphopoiesis and bone loss caused by estrogen deficiency. *Endocrinology* 104(4): 1893-1900.

JABLONSKI E., McCONNELL N., HUGHES F., HUET-HUDSON Y., 2003. Estrogen regulation of aquaporins in the mouse uterus: potential roles in uterine water movement. *Biology of Reproduction* 69:1481-1487.

JIANG Z., JIANG S., LIN Y., XI Y., YU D., WUT T., 2007. Effects of soybean isoflavone on growth performance, meat quality and antioxidation in male broilers. *Poultry Science* 86:1356-1362.

JIN W., CHEN Y., DI G., MIRON P., HOU Y., GAO H., SHAO Z., 2008. ER β or p53 attenuates ER α -mediated transcriptional activation on the BRCA2 promoter. *The Journal of Biological Chemistry* 283(44):29671-80.

JINPING A., TZAGARAKIS-FOSTER C., SCHARSCHMIDT T., LOMRI N., LEITMAN D., 2001. Estrogen receptor B-selective transcriptional activity and recruitment of coregulators by Phytoestrogens. *The Journal of Biological Chemistry* 276:17808-17814.

KAMEGAI J., TAMURA H., SHIMIZU T., ISHII S., SUGIHARA H., WAKABAYASHI I., 2001. Estrogen receptor (ER) α , but not ER β , gene is expressed in growth hormone – releasing hormone neurons of the male rat hypothalamus. *Endocrinology* 142:538-543.

KAO Y., ZHOU C., SHERMAN M., LAUGHTON C., CHEN S., 1998. Molecular basis of the inhibition of human aromatase (estrogen synthetase) by flavone and isoflavone phytoestrogens: A site-directed mutagenesis study. *Environmental Health Perspectives* 106:85-92.

KHORRAM O., GARTHWAITE M., MAGNESS R., 1999. Endometrial and myometrial expression of nitric oxide synthase isoforms in pre- and postmenopausal women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 84:2226-2232.

KIM K., MORIARTY K., BENDER J., 2008. Vascular cell signaling by membrane estrogen receptor. *Steroids* 73:864-869.

KING R., 1998. Daidzein conjugates are more bioavailable than genistein conjugates in rats. *American Journal of Clinical Nutrition* 68:1496S-9S.

KING R., BURSILL D., 1998. Plasma and urinary kinetics of the isoflavones daidzein and genistein after a single soy meal in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 67:867-72.

KUIPER G., CARLSSON B., GRANDIEN K., ENMARK E., HÄGGBLAD J., NILSSON S., GUSTAFSSON J., 1997. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors α and β . *Endocrinology* 138:863-870.

KUIPER G., LEMMEN J., CARLSSON BO., CORTON J., SAFE S., SAAG P., BURG B., GUSTAFSSON J., 1998. Interaction of estrogenic chemicals and Phytoestrogens with estrogen receptor β . *Endocrinology* 139: 4252-4263.

LAMPE J., 2003. Isoflavonoid and lignan phytoestrogens as dietary biomarkers. *The Journal of Nutrition* 133:956S-964S.

LEVIN E., 2005. Integration of the extranuclear and nuclear actions of estrogen. *Molecular Endocrinology* 19:1951-1959

LIU D., ZHEN W., YANG Z., CARTER J., SI H., REYNOLDS K., 2006. Genistein acutely stimulates insulin secretion in pancreatic β - cells through a cAMP-dependent protein kinase pathway. *Diabetes* 55:1043-1050.

LIU W., SONG Z., LIANG N., 1998. Effects of genistein on aggregation and cytosolic free calcium in pig platelets. *Acta Pharmacologica Sinica* 19(6):540-542.

LOCATELLI G., SAVIO M., FORTI L., SHEVELEV I., RAMADAN K., STIVALA L., VANNINI V., HÜBSCHER U., SPADARI S., MAGA G., 2005. Inhibition of mammalian DNA polymerases by resveratrol: mechanism and structural determinants. *Biochemical Journal* 389:259-268.

LUND T., MUNSON D., ADLERCREUTZ H., HANDA R., LEPHART E., 2004a. Androgen receptor expression in the rat prostate is down-regulated by dietary phytoestrogens. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2:1-5.

LUND T., MUNSON D., HALDY M., SETCHELL K., LEPHART E., HANDA R., 2004b. Equol is a novel anti-androgen that inhibits prostate growth and hormone feedback. *Biology of Reproduction* 70:1188-1195.

LUNDH T., 1995. Metabolism of estrogenic isoflavones in domestic animals. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 208:33-39.

MAGGIOLINI M., BONOFIGLIO D., MARSICO S., PANNO M., CENNI B., PICARD D., ANDO S., 2001. Estrogen receptor alfa mediates the proliferative but not the cytotoxic dose-dependent effects of two major phytoestrogens on human breast cancer cells. *Molecular Pharmacology* 60:595-602.

MEI J., YEUNG S., KUNG A., 2001. High dietary phytoestrogen intake is associated with higher bone mineral density in postmenopausal but not premenopausal women. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 86(11):5217-5221.

MEINHARDT U., HO K., 2006. Modulation of growth hormone action by sex steroids. *Clinical Endocrinology* 65:413-422.

MENDELSON M., 2000. Mechanisms of estrogen action in the cardiovascular system. *Journal of Steroid & Molecular Biology* 74:337-343.

- MEYER H., RAPP M., 1985. Estrogen receptor in bovine skeletal muscle. *Journal of Animal Science* 60:294-300.
- MISZTAL T., WANKOWSKA M., GORSKI K., ROMANOWICZ K., 2007. Central estrogen-like effect of genistein on growth hormone secretion in the ewe. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 67:411-419.
- MISZTAL T., GORSKI K., ROMANOWICZ K., 2008. Differential endocrine response in rams to intracerebroventricular infusion of genistein. *Acta Neurobiologiae Experimentalis* 68:43-50.
- MURKIES A., WILCOX G., DAVIS S., 1998. Clinical review 92: Phytoestrogens. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 83: 297-303.
- NILSSON S., MÄKELÄ S., TREUTER E., TUJAGUE M., THOMSEN J., ANDERSSON G., ENMARK E., PETTERSSON K., WARNER M., GUSTAFSSON J., 2001. Mechanisms of estrogen action. *Physiological Reviews* 81:1535-1565.
- PAL S., HO N., SANTOS C., DUBOIS P., MAMO J., CROFT K., ALLISTER E., 2003. Red wine polyphenolics increase LDL receptor expression and activity and suppress the secretion of ApoB100 from human HepG2 cells. *Journal of Nutrition* 133:700-706.
- PETERSON G., BARNES S., 1996. Genistein inhibits both estrogen and growth factor-stimulated proliferation of human breast cancer cells. *Cell Growth & Differentiation* 7:1345-1351.
- PFEIFFER E., GRAF E., GERSTNER S., METZLER M., 2006. Stimulation of estradiol glucuronidation: A protective mechanism against estradiol-mediated carcinogenesis. *Molecular Nutrition & Food Research* 50:385-389.
- PINO A., VALLADARES L., PALMA M., MANCILLA A., YAÑEZ M., ALBALA C., 2000. Dietary isoflavones affect sex hormone-binding globulin levels in postmenopausal women. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 85:2797-2800.
- POTTER S., 1995. Overview of proposed mechanisms for the hypocholesterolemic effect of soy. *The Journal of Nutrition* 125:606S-611S.

PROSSNITZ E., ARTERBURN J., SKLAR L., 2007. GPR30: a G protein-coupled for estrogen. *Molecular and Cellular Endocrinology* 265:138-142.

RICE S., WHITEHEAD S., 2006. Phytoestrogens and breast cancer- promoters or protectors?. *Endocrine-Related Cancer* 13:995-1015.

ROMERO C., TARRAGÓ M., MUÑOZ R., ARISTA R., ROSADO A., 1997. Síndrome estrogénico en vacas lecheras por consumo de alfalfas con grandes cantidades de coumestrol. *Veterinaria México* 28(1):25-30.

RYTÖMA T., 1960. Organ distribution and histochemical properties of eosinophil granulocytes in the rat. *Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica (Suppl 140)* 50:1-118.

SAITOH S., SATO T., HARADA H., TAKITA T., 2001. Transfer of soy isoflavone into the egg yolk of chickens. *Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry* 65(10):2220-2225.

SETCHELL K., BORRIELO S., HULME P., KIRK D., AXELSON., 1984. Nonsteroidal estrogens of dietary origin: possible roles in hormone-dependent disease. *American Journal of Clinical Nutrition* 40:569-578.

SETCHELL K.D.R. 1998. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavonas. *American Journal of Clinical Nutrition* 68:1333S-1346S.

SILVA H., TCHERNITCHIN A., TCHERNITCHIN N., 1997. Low doses of estradiol-17 α degranulate blood eosinophil leucocytes and high doses alter homeostatic mechanisms. *Journal of Medical Sciences Research* 25:201-204.

TAKESHI U., 2006. Pharmaceutical prospects of phytoestrogens. *Endocrine Journal* 53 (1):7-20.

TCHERNITCHIN A., 1969. Radioautographic analysis of 6,7- ³H estradiol-17 β uptake in rat uterus following extraction of endogenous estrogens. *Steroids* 15:799-808.

TCHERNITCHIN A., 1971. Radioautographic study of the effect of estradiol- 17 β , estrone, estriol, progesterone, testosterone and corticosterone on the in vitro uptake of 2,4,6,7-H³ estradiol-17 β by uterine eosinophils of the rat. *Steroids* 19:575-584.

TCHERNITCHIN A., ROORIJCK J., TCHERNITCHIN X., VANDENHENDE J., GALAND P., 1974. Dramatic early increase in uterine eosinophils after oestrogen administration. *Nature* N°5443 (248):142-143.

TCHERNITCHIN A., TCHERNITCHIN X., COLLAO C., RODRIGUEZ A., 1978. Dynamics of estrogen binding by uterine cells in vivo. *Experientia* 34:134-136.

TCHERNITCHIN A., GALAND P., 1982. Dissociation of separate mechanisms of estrogen action by actinomycin D. *Experientia* 38:511-512.

TCHERNITCHIN A., MENA M., RODRIGUEZ A., MATURANA M., 1985. Radioautographic localization of estrogen receptors in the rat uterus: a tool for the study of classical and nontraditional mechanisms of hormone action. In: *Localization of Putative Steroid Receptors. Experimental Systems*, Pertschuk LP, Lee SH, Eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A. Vol 1:5-37.

TCHERNITCHIN A., MENA M., SOTO J., UNDA C., 1989. The role of eosinophils in the action of estrogens and other hormones. *Journal of Medical Sciences Research* 17:5-10.

TCHERNITCHIN A., TCHERNITCHIN N., MENA M., UNDA C., SOTO J., 1999. Imprinting: perinatal exposures cause the development of disease during the adult age. *Acta Biologica Hungarica* 50(4):425-440.

THAM D., GARDNER C., HASKELL W., 1998. Clinical review 97: Potential Health Benefits of Dietary Phytoestrogens: A Review of the Clinical, Epidemiological, and Mechanistic Evidence. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 83:2223-2235.

TIKKANEN M., WÄHÄLÄ K., OJALA S., VIHMA V., ADLERDCREUTZ H., 1998. Effect of soybean phytoestrogen intake on low density lipoprotein oxidation resistance. *Proceedings of the National Academy Sciences USA* 95:3106-3110.

TRESGUERRES J., ARIZNAVARRETA C., CACHOFEIRO V., CARDINALI D., ESCRICH E., LOYZAGA P., LAHERA JULIÁ V., MORA TERUEL F., ROMANO PARDO M., TAMARGO MENÉNDEZ J., 2005. Mecanismos de acción hormonal In:

Fisiología humana., tercera ed en español, editorial Mc Graw Hill interamericana, Madrid, España. pp. 803- 823.

VAN DER SCHOUW Y., PIJPE A., LEBRUN C., BOTS M., PEETERS P., VAN STAVEREN W., LAMBERTS S., GROBBEE D., 2002. Higher usual dietary intake of phytoestrogens is associated with lower aortic stiffness in postmenopausal women. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 22:1316-1322.

WALKER H., DEAN T., SANDERS T., JACKSON G., RITTER J., CHOWIENCZYK P., 2001. The phytoestrogen genistein produces acute nitric oxide-dependent dilation of human forearm vasculature with similar potency to 17 β estradiol. *Circulation* 103:258-262.

WEI H., BOWEN R., CAI Q., BARNES S., WANG Y., 1995. Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine* 208:124-130.

WHITEHEAD S., CROSS J., BURDEN C., LACEY M., 2002. Acute and chronic effects of genistein, tyrphostin and lavendustin A on steroid synthesis in luteinized human granulosa cells. *Human Reproduction* 17(3):589-594.

WHITTEN P., LEWIS C., RUSSELL E., NAFTOLIN F., 1995. Potential Adverse Effects of Phytoestrogens. *The Journal of Nutrition* 125:771S-776S.

WIDYARINI S., 2006. Protective effect of the isoflavone equol against DNA damage induced by ultraviolet radiation to hairless mouse skin. *The Journal of Veterinary Science* 7(3): 217-223.

WILLIAMS J., IRELAND S., MOLLETT T., HANCOCK D., BEAVER E., HANNAH S., 1991. Influence of zeranol and breed on growth, composition of gain, and plasma hormone concentrations. *Journal of Animal Science* 69:1688-1696.

WISEMAN H., O'REILLY J., ADLERCREUTZ H., MALLET A., BOWEY E., ROWLAND I., SANDERS T., 2000. Isoflavone phytoestrogens consumed in soy decrease F2-isoprostane concentrations and increase resistance of low-density lipoprotein to oxidation in humans. *American Journal of Clinical Nutrition* 72: 395-400.

WISEMAN H., CASEY K., BOWEY E., DUFFY R., DAVIES M., ROWLAND I., LLOYD A., MURRAY A., THOMPSON R., CLARKE D., 2004. Influence of 10 wk of the

soy consumption on plasma concentrations and excretion of isoflavonoids and on gut microflora metabolism in healthy adults. *American Journal of Clinical Nutrition* 80: 692-9.

WOCLAWEK-POTOCKA I., ACOSTA T., KORZEKWA A., BAH M., SHIBAYA M., OKUDA K., SKARZYNSKI D., 2005. Phytoestrogens modulate prostaglandin production in bovine endometrium: cell type specificity and intracellular mechanisms. *Experimental Biology and Medicine* 230:326-333.

ZHOU J-R., GUGGER E., TANAKA T., GUO Y., BLACKBURN G., CLINTON S., 1999. Soybean Phytochemicals Inhibit the Growth of Transplantable Human Prostate Carcinoma and Tumor Angiogenesis in Mice. *The Journal of Nutrition* 129:1628-1635.

ZILLER H., 2004. Clasificación histopatológica de tumores mamarios caninos extraídos en clínicas veterinarias de la ciudad de Santiago, Chile. Memoria (Título de Médico Veterinario). Valdivia, Chile. Universidad Austral de Chile, Facultad de Ciencias Veterinarias.