



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica.
Laboratorio de Endocrinología Experimental y Patología Ambiental.
Programa de Fisiopatología. Facultad de Medicina.

PROFESOR PATROCINANTE:

QF. Igor Lemus Gutiérrez.
Departamento de Química
Farmacológica y Toxicológica.
Facultad de Ciencias
Químicas y Farmacéuticas

DIRECTORES DE MEMORIA:

Dr. Andrei Tchernitchin Varlamov.
Dr. Rodrigo Bustamante Valdebenito.
Laboratorio de Endocrinología
Experimental y Patología Ambiental.
Programa de Fisiopatología.
Facultad de Medicina.

EVALUACIÓN DE RESPUESTAS DE TIPO ESTROGÉNICO, GENÓMICAS Y NO-GENÓMICAS, DE UN EXTRACTO DE PLANTA NATIVA.

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE QUÍMICO FARMACÉUTICO.

PABLO ANDRÉS YÁÑEZ SOTO

Santiago, Chile
2008.

Circulación restringida 2008-2010.



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas
Departamento de Química Farmacológica y Toxicológica.
Laboratorio de Endocrinología Experimental y Patología Ambiental.
Programa de Fisiopatología. Facultad de Medicina.

PROFESOR PATROCINANTE:

QF. Igor Lemus Gutiérrez.
Departamento de Química
Farmacológica y Toxicológica.
Facultad de Ciencias
Químicas y Farmacéuticas

DIRECTORES DE MEMORIA:

Dr. Andrei Tchernitchin Varlamov.
Dr. Rodrigo Bustamante Valdebenito.
Laboratorio de Endocrinología
Experimental y Patología Ambiental.
Programa de Fisiopatología.
Facultad de Medicina.

EVALUACIÓN DE RESPUESTAS DE TIPO ESTROGÉNICO, GENÓMICAS Y NO-GENÓMICAS, DE UN EXTRACTO DE PLANTA NATIVA.

PABLO ANDRÉS YÁÑEZ SOTO

Santiago, Chile
2008.

AGRADECIMIENTOS

Los agradecimientos iniciales van dirigidos a aquellas personas que amo y que me han acompañado, de diferentes formas, en este largo camino. Se agradece específicamente a Nicolle (mi pareja), Ivonne (mi madre), José y Patricio (mis hermanos) y a mi padre que de algún lugar incentivó esta trayectoria.

En el trayecto académico valoro el apoyo, conocimiento, dedicación y amistad entregados por los profesores Igor Lemus, Andrei Tchernitchin, Rodrigo Bustamante, Leonardo Gaete y todos aquellos académicos que apoyaron mi formación profesional.

Además agradezco a todo el personal del LEEPA, Sra. Iris especialmente, por la ayuda brindada y amistad compartida. Esta investigación se realizó gracias al financiamiento de Proyecto Anillo ACT/07, de Conicyt, Chile.

Finalmente agradezco a la vida que permite realizar sueños y compartir bellas experiencias.

DEDICATORIA

A quien más que a ti, Gustavo,

puedo dedicar la culminación de todos estos años de esfuerzo.

Te espero con tantas cosas para entregarte mi querido hijo.

ÍNDICE

Páginas.

RESUMEN.....	vii
SUMMARY.....	ix
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. MARCO TEÓRICO	
2.1.- Estrógenos.....	5
2.1.1.- Respuesta genómica de los estrógenos (RG).....	8
2.1.2.- Respuesta no-genómica a los estrógenos (RNG).....	9
2.2.- Fitoestrógenos.....	12
2.2.1.- Efectos sobre los síntomas del síndrome climatérico.....	16
2.2.2.- Efecto sobre densidad ósea y otras patologías óseas.....	16
2.2.3.- Efecto sobre la patología cardiovascular.....	17
2.2.4.- Protección frente a cáncer.....	18
2.2.5.- Otros efectos.....	19
III. HIPOTESIS.....	20
IV. OBJETIVOS.....	20
V. MATERIALES Y EQUIPOS	
5.1.- Equipos.....	21
5.2.- Instrumental.....	21
5.3.- Reactivos generales.....	22
5.4.- Análisis Estadístico.....	22
VI. MÉTODO DE TRABAJO	
6.1.- Diseño del estudio.....	23
6.2.- Área de estudio.....	23
6.3.- Modelo de estudio.....	23
6.4.- Obtención de controles y extracto vegetal.....	24
6.5.- Preparación de muestra.....	25
6.6.- Obtención y montaje de cortes histológicos.....	25
6.7.- Proceso de tinción histológico.....	27

VII. METODOLOGIA DIFERENCIAL HISTOLOGICA Y ESTADÍSTICA

7.1.- Parámetros a evaluar y procedimientos específicos que serán utilizados.....	29
6.1.1.- Edema en estroma superficial y estroma profundo.....	29
6.1.2.-Hipertrofia en el miometrio circular de cuernos uterinos.....	31
7.2.- Análisis estadístico.....	32

VIII. METODOLOGIA PARA ANÁLISIS POR HPLC

8.1.- Descripciones del equipo utilizado	34
8.2.- Reactivos para HPLC	35
8.3.- Identificación y valoración de compuestos con actividad estrogénica	35

IX. RESULTADOS

9.1.- Resultados estadísticos de análisis histológico.....	36
9.1.1.- Edema en estroma, medido a través de VRDC.....	36
9.1.2.- Hipertrofia celular en el miometrio circular.....	39
9.2.- Resultados para análisis por HPLC.....	41

X. DISCUSIÓN.....42

XI. CONCLUSIÓN.....47

XII. REFERENCIAS.....48

XIII. ANEXOS

13.1.- Perfiles cromatográficos para estándares.....	54
13.2.- Tablas numéricas con datos histológicos.....	56

ÍNDICE DE ILUSTRACIONES Y DIAGRAMAS.

	Páginas.
Figura 1	Principales estrógenos endógenos femeninos.....5
Figura 2	Corte histológico horizontal de útero de rata pre-púber 10X.....11
Organigrama	Clasificación estructural de fitoestrógenos.....13
Figura 3	Principales moléculas de fitoestrógenos identificados.....14
Figura 4	Similitud estructural entre estradiol y equol.....15
Tabla 1	Grupos y condiciones experimentales.....25
Figura 5	Inyección de soluciones vía subcutánea.....26
Figura 6	a y b: cuernos de útero de rata.....26
Figura 7	Batería de Tinción de H&E.....28
Figura 8	Tejidos uterinos montados en portaobjetos.....28
Figura 9	Corte de cuernos uterinos de rata sin exposición a estradiol 10x.....30
Figura 10	Corte de cuernos uterinos de rata expuesto a estradiol 10x.....30
Figura 11	Corte de cuerno uterino de rata 20x (estratos uterinos).....32
Figura 12	Corte de cuerno uterino de rata 40x (miometrio circular).....32
Gráfico 9.1.1a	Edema en estroma superficial a 6 horas.....36
Gráfico 9.1.1b	Edema en estroma superficial a 24 horas.....37
Gráfico 9.1.1c	Edema en estroma profundo a 6 horas.....37
Gráfico 9.1.1d	Edema en estroma profundo a 24 horas.....38
Gráfico 9.1.2a	Hipertrofia celular en miometrio circular a 6 horas.....39
Gráfico 9.1.2b	Hipertrofia celular en miometrio circular a 24 horas.....40

RESUMEN

Actualmente el interés por los principios activos de origen vegetal se ha incrementado debido, en parte, a la menor incidencia de efectos adversos atribuibles a estas terapias, en comparación con las tradicionales. El conocimiento sobre principios activos de origen vegetal se basa, por un lado, en el uso empírico de plantas originarias como agentes terapéuticos por los grupos étnicos y, por otro, en el estudio científico de los mismos, el que ha adquirido mayor relevancia. Entre los vegetales sometidos a estudios en el último tiempo, encontramos aquellos que contienen fitoestrógenos dentro de su composición. Estos compuestos presentan estructuras y propiedades físico-químicas similares a los estrógenos. Algunos de ellos provocan respuestas, tanto *in vivo* como *in vitro*, semejantes a las atribuidas a los estrógenos.

Es sabido que durante el climaterio, los niveles de estrógenos endógenos disminuyen, lo que conlleva a la aparición de síntomas y signos propios de este período y que deterioran la calidad de vida de las mujeres, entre ellos la inestabilidad vasomotora y atrofia genitourinaria. Como tratamiento a estos síntomas propios del climaterio surgieron las terapias de reemplazo hormonal. Si bien es cierto, éstas mejoran la calidad de vida de las mujeres sometidas a ellas, llevan también implícito un aumento en el riesgo relativo de patologías relacionadas con la estimulación hormonal. Es así, como algunos autores describen un aumento en la incidencia de cáncer de mama y/o endometrio en pacientes sometidas a este tipo de tratamientos.

Numerosos estudios poblacionales han asociado el consumo de dietas ricas en soya, vegetal que contiene altas cantidades de fitoestrógenos, a una menor prevalencia de cáncer de mama y otros procesos neoplásicos. El interés en los vegetales ricos en fitoestrógenos como alternativas terapéuticas, nos ha llevado a desarrollar la presente investigación, la que buscó comparar el efecto de tipo estrogénico de una planta nativa con propiedades medicinales empíricas, usada en desórdenes menstruales, con el efecto producido por el 17β -estradiol. Para esto se expuso a ratas pre-púberes a un extracto de esta planta y se observaron sus efectos, en tejidos uterinos. Las variables analizadas fueron la presencia de edema en estroma uterino (respuesta no-genómica) y la hipertrofia celular del miometrio (respuesta genómica).

Concluimos que el extracto aumenta el edema en el estroma profundo producido por 17β -estradiol a las 6 horas post-exposición y que no hubo modificación en la respuesta hipertrófica celular en ninguno de los grupos expuestos a extracto vegetal. Además se

realizó análisis cromatográfico del extracto, encontrándose $\pm 1 \mu\text{g/mL}$ de genistina, que estructuralmente representa a la glicosilación de genisteína.

Nuestros resultados mostraron una disociación de dos diferentes respuestas de tipo estrogénicas, por efecto del extracto de planta nativa, lo que podría llegar a ser una herramienta útil en tratamientos en los cuales es necesario potenciar algunas respuestas a estrógenos sin activar aquellas que pueden desencadenar efectos deletéreos, como es el caso de procesos neoplásicos. Es necesario entonces ahondar en el conocimiento de los mecanismos fisiológicos y potencial farmacológico de estas plantas nativas como agentes terapéuticos.

SUMMARY

EVALUATION OF ESTROGENIC-LIKE RESPONSES, GENOMIC AND NON-GENOMIC, OF A NATIVE PLANT EXTRACT.

Currently, the interest for active principles of vegetal origin has been increased, partly to the smaller incidence of adverse effects attributable to these therapies in comparison with traditional ones. The knowledge on active principles of vegetal origin are based on in one hand, in the empirical use of native plants like therapeutic agents by ethnic groups and in the other, in the scientific study of them, which has acquired more relevance. Among vegetable species that have been studied, we found those that contain phytoestrogens. These compounds have structures and physic-chemical properties similar to estrogen. Some of them cause responses that, *in vitro* and *in vivo*, mimic those attributed to estrogen.

It is known that the endogenous estrogen levels fall during climactery, promoting the triggering of symptoms and signs characteristic of this period, which deteriorate the quality of life of women, among them the vasomotor instability and genital-urinary atrophy. As treatment to these symptoms of climactery arose the hormone replacement therapies. Although these therapies improve the quality of life of women exposed to them, they also take implicit an increase in the relative risk of pathologies related to the hormonal stimulation. Some authors describe an increase in the incidence of breast and/or endometrium cancer in patients exposed to this kind of treatments.

Numerous population studies have associated the soja-rich diet, vegetables containing great amounts of phytoestrogens to a smaller prevalence of breast cancer and other neoplastic processes. The interest in vegetables with high contents of phytoestrogens like therapeutic alternatives has taken us to develop the present study, which pretends to compare the estrogen-like effect of a native plant having medicinal properties and used in menstrual disorders, with the effect produced by estradiol-17 β . Here, pre-pubertal rats were exposed to an extract of this plant, and later we determined their effects on uterine tissue. The analyzed parameters were the presence of oedema in uterine stroma (non-genomic response) and the cellular hypertrophy of myometrium (genomic response).

We conclude that the extract increased oedema in deep stroma produced by estradiol-17 β 6 hours after exposition and did not modify the hypertrophic cellular response

in any of the exposed groups to vegetal extract. In addition, chromatographic analysis of the extract was realized; we found $\pm 1 \mu\text{g/mL}$ of genistin which structurally represents the glycosylation of Genistein.

Our results show a dissociation of two different estrogenic responses, as an effect of the native plant extract. It would become a useful tool for treatments in which it is necessary to boost some responses to estrogens without activating those that can trigger deleterious effects, as neoplastic events. It is necessary to deepen in the knowledge of the physiological mechanisms and pharmacological potentials of these native plants like therapeutic agents.

I. INTRODUCCIÓN

Junto con el desarrollo de diversas civilizaciones, el hombre ha ocupado componentes del reino vegetal en la protección y recuperación de su salud. Varias sociedades no-occidentales consideran aún a terapias botánicas como componentes esenciales en las prácticas sanatorias. Resulta atrayente observar que en las últimas décadas se ha producido un nuevo interés por parte de culturas occidentales, por la sanación a través de productos vegetales, sean estos crudos o medianamente elaborados. Este creciente interés puede ser debido a las malas experiencias con el uso de productos sintéticos tales como el DDT, herbicidas, talidomida y varios colorantes carcinogénicos. De esta forma la “medicina alternativa o complementaria” renueva nuestro interés en investigar la existencia de productos vegetales que beneficien la salud humana.

La medicina botánica se basa en el uso de plantas medicinales y sus constituyentes. La OMS considera como planta medicinal, todo vegetal que contiene, en uno o más de sus órganos, sustancias que pueden ser usadas con finalidades terapéuticas o que son precursores en la semisíntesis químico-farmacéutica. Los efectos farmacológicos que producen son debidos a sustancias químicas, los principios activos, sintetizados en el cuerpo humano en procesos de metabolismo secundario. Por ejemplo, la quinina, para la malaria, los glucósidos digitálicos, para las alteraciones cardiacas, y algunos fármacos como la meperidina, derivados de penicilina, procaína y lidocaína se han desarrollado a partir de productos naturales como modelos estructurales. Estas mismas sustancias pueden ser responsables de efectos tóxicos o letales (Bruneton., 2001).

Desgraciadamente, solo una pequeña parte de las plantas medicinales utilizadas comúnmente están avaladas por rigurosos estudios científicos. La mayor parte de la información que llega a los pacientes y/o consumidores es a través de vendedores de estos productos vegetales o por los usos empíricos que se les ha atribuido a diferentes plantas

nativas usadas como agentes terapéuticos por grupos étnicos. Es por esto, se hace necesario ratificar las propiedades fármaco-terapéuticas que se les ha atribuido a diferentes plantas por siglos en diferentes culturas originarias.

Se conocen alrededor de 260.000 especies de plantas en el mundo, de éstas un 10% se consideran plantas medicinales y del 90% restante, no se conocen aún propiedades curativas. De este 10%, son de conocido interés las propiedades antidepressivas de la Hierba de San Juan (*Hypericum perforatum*) y la acción vasodilatadora del *Ginkgo biloba* (AESAN 2007). En el último tiempo, han sido materia de múltiples investigaciones algunos vegetales como la soya (*Glycine max*) y el trébol rojo (*Trifolium pratense*), en los cuales, se encuentran una variedad de compuestos denominados fitoestrógenos. Los fitoestrógenos son moléculas de origen vegetal que, con numerosas propiedades biológicas, dentro de las cuales, la más conocida es la de comportarse como estrógenos débiles sin tener una naturaleza esteroidea (Haya y cols, 2002).

Los fitoestrógenos se pueden encontrar mayoritariamente en:

- Hierbas y condimentos: alfalfa, ajo y perejil.
- Granos: trigo, maíz, linaza.
- Legumbres: soja, porotos (frejoles).
- Frutas: granadas, dátiles, cerezas y manzanas.

Existen más de 4000 fitoestrógenos descritos agrupándose en 3 familias farmacológicas: Lignanós, Cumestanos y Isoflavonas. De todos ellos el grupo más estudiado es el grupo de las isoflavonas, entre las cuales destacan dos de los componentes principales de la soya: la genisteína y la daidzeína (Navarro y cols., 2005).

Existe un interés creciente en los fitoestrógenos, específicamente en sus potenciales propiedades curativas y protectoras ante un variado número de entidades nosológicas, tales como: patologías cardiovasculares, patologías osteoarticulares, patologías

neoplásicas, entre ellas; cáncer de mama, endometrio, ovario, próstata y colo-rectal; así como también por su capacidad de disminuir los síntomas propios del climaterio en especial la inestabilidad vasomotora (sofocos o bochornos) (Khaodhiar y cols., 2008).

En el año 2002, se publicó parte del más extenso y completo estudio relacionados con la terapia de reemplazo hormonal (TRH), denominado Women's Health Initiative (WHI). Este estudio analiza y describe los diferentes beneficios y riesgos a los que están sujetas las mujeres que reciben TRH. Dentro de los riesgos comprobados de las TRH podemos mencionar; un aumento de entre 8-10 veces del riesgo de padecer cáncer endometrial al utilizar estrógenos sin gestágenos durante 10 años o más, un aumento de la incidencia entre 2-3 veces de padecer tromboflebitis, así como un aumento de 1,35 veces más de probabilidades de presentar cáncer de mama después de 5 años de TRH (Harrison 16^a Ed). Este estudio fue detenido a raíz del mayor riesgo a las que se exponía a mujeres tratadas con TRH, en comparación con el placebo. Debido a esto es que existe la necesidad imperante de buscar alternativas terapéuticas que sean más selectivas sobre tejidos que sufren efectos deletéreos por la disminución de la producción endógena de estrógenos, potenciando los efectos benéficos de los estrógenos y desarrollando los efectos adversos de los estrógenos en forma escasa o nula. Es en este punto donde jugarían un papel importante los fitoestrógenos, presentando ventajas en relación a las TRH.

La presente investigación tiene como finalidad encontrar en una planta nativa, que por datos empíricos ha sido ocupada por nuestros pueblos originarios en la regulación de ciclos menstruales y procesos abortivos, algún(os) compuesto(s) similar a los fitoestrógenos, que a través de su efecto de tipo estrogénico, desarrolle selectividad por ciertas respuestas hormonales y/o tejidos uterinos, disminuyendo de esta forma los riesgos relacionados con las TRH y privilegiando los beneficios propios de los estrógenos en diferentes procesos biológicos.

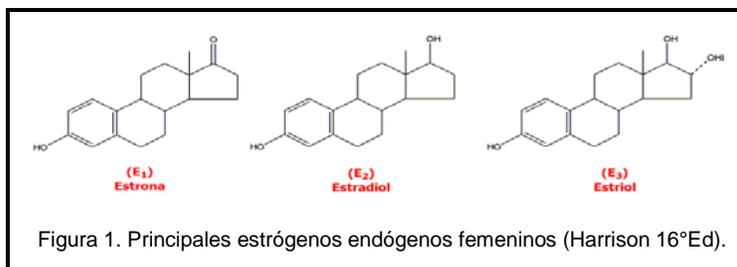
Para este fin se evaluaron dos tipos diferentes de respuestas de tipo estrogénicas (respuesta genómica y no-genómica) que desarrolló un extracto alcohólico de planta nativa, comparándolas con los efectos estudiados durante décadas del 17β -estradiol (E_2) (hormona endógena de mayor potencia), en úteros de ratas pre-púberes (Tchernitchin y cols., 1967).

Con esto se aportaran nuevas aristas en el estudio fito-farmacológico y endocrinológico relacionado con patologías donde los estrógenos juegan un rol importante y donde la necesidad de encontrar compuestos con menos riesgos, pero con efectos potenciales importantes, incentivaría la presente investigación.

II. MARCO TEÓRICO

2.1.- Estrógenos.

Los dos tipos de hormonas sexuales ováricas son los estrógenos y los gestágenos. Los estrógenos promueven principalmente la proliferación y crecimiento de células específicas de distintos tejidos, responsables del desarrollo de los caracteres sexuales secundarios de la mujer. La función principal de los gestágenos consiste en preparar el útero para la gestación y las mamas para la lactancia. Estas hormonas no son secretadas en cantidades constantes a lo largo del ciclo sexual mensual femenino (menstrual), sino que son secretadas en cantidades variables en las distintas partes el ciclo. En la mujer no gestante, los ovarios secretan cantidades importantes de estrógenos, aunque también las cortezas suprarrenales producen pequeñas cantidades, no así la placenta que durante el embarazo secreta grandes cantidades de estrógenos. Solo tres estrógenos se encuentran en cantidades significativas en el plasma de la mujer: estradiol, estrona y estriol (Fig.1). El principal estrógeno secretado por los ovarios es el estradiol y su isoforma más potente es el 17β -estradiol (E_2).



La potencia estrogénica del E_2 es 12 veces la de la estrona y 80 veces la del estriol. Considerando estas potencias relativas, puede verse que el efecto estrogénico del E_2 es, en condiciones normales, más significativo que el de los otros en conjunto. Por esta razón, se considera que el 17β -estradiol (E_2) es el estrógeno principal (Guyton y cols, 2006).

La producción de estrógenos en las niñas, se inicia durante la pubertad, por pulsos nocturnos de baja amplitud de gonadotropinas que aumenta las concentraciones séricas de

E₂. Durante el ciclo menstrual la producción de E₂ varía cíclicamente, con las concentraciones plasmáticas más altas durante la fase pre-ovulatoria y la más baja producción y concentración plasmática de E₂ ocurre durante la fase premenstrual. Por efecto estrogénico, el útero experimenta diversos cambios, tales como: crecimiento, proliferación de glándulas endometriales, hiperemia e hipertrofia del miometrio por aumento del contenido de proteínas contráctiles (Tchernitchin y cols., 1995), y también por el efecto estrogénico, el músculo adquiere mayor actividad y excitabilidad, así como también se hace más sensible a oxitocina (Cheviacoff y cols., 1984).

En mujeres climatéricas los ovarios cesan la producción cíclica de niveles fisiológicos de estrógenos y gestágenos, lo que lleva a ciclos menstruales irregulares, los que finalmente cesan. Dentro de las primeras manifestaciones de este declive hormonal están, la atrofia y falta de lubricación vaginal, inestabilidad vasomotora y la amenorrea o ausencia de menstruación. La última menstruación sufrida por la mujer se denomina menopausia y su diagnóstico es retrospectivo, el que se realiza después de +/- 12 meses de transcurrido este evento. El climaterio fluctúa entre 5 a 6 años antes y después de ocurrida la menopausia, caracterizándose por una disminución paulatina de los niveles séricos de hormonas sexuales (Lagos y cols., 1998). Pero la menopausia no es sólo un fenómeno fisiológico y orgánico, sino que, está íntimamente asociado a variables psicológicas, sociales y culturales que le confieren características particulares.

De las hormonas sexuales, los estrógenos son los que presentan un mayor número de efectos sistémicos, por lo tanto, alteraciones en sus niveles y/o su vía de transducción de señales originan múltiples efectos deletéreos en los distintos órganos blanco; útero, tubas uterinas, mamas, esqueleto, tejido adiposo, piel, entre otros. Dentro de los efectos deletéreos están: desarrollo anormal de características sexuales secundarias, trastornos reproductivos e infertilidad, estados depresivos, inestabilidad vasomotora caracterizada por

los sofocos, enfermedades cardiovasculares, patologías óseas, atrofia genitourinaria, con el consiguiente deterioro de la función sexual en la mujer (Guyton y cols., 2006).

Para explicar los cambios que producen los estrógenos en los distintos órganos blanco, es necesario revisar los diferentes hallazgos en relación a los receptores estrogénicos (RE) y los mecanismos de acción estrogénica propuestos, que explicarían los trastornos producidos tras el cese de producción hormonal endógena.

En el año 1972, Jensen y DeSombre, llegaron a la conclusión que el efecto biológico de los estrógenos era mediado por un receptor de naturaleza proteica. Esta conclusión se derivó a partir de la unión específica del E₂ observada en útero de rata; este receptor fue denominado "citosólico-nuclear". Después de 24 años, dos grupos reportaron la clonación de este receptor estrogénico (RE) (Green y cols., 1986) (Greene y cols., 1986). Hasta 1995 se consideró sólo a este receptor como el responsable de los efectos fisiológicos y farmacológicos de los estrógenos endógenos, sintéticos y otros productos con actividad estrogénica. Pero el mismo año, un segundo RE fue clonado a partir de ADN complementario de próstata de rata (Kuiper y cols., 1995), demostrando claramente la existencia de al menos dos tipos de receptores diferentes. Es así como se definieron los RE α y RE β , que poseen un dominio funcional característico de la superfamilia de receptores nucleares de hormonas esteroide/tiroideas. No obstante, las diferencias estructurales entre estos diferentes receptores (en humanos, comparten un 44% de similitud a nivel de secuencia aminoacídica), se produce una interacción con elementos de respuesta a estrógenos (EREs) de ADN idénticos y exhiben un perfil de afinidad similar para una serie de estrógenos endógenos y sintéticos. Sin embargo, la distribución de estos receptores en los diferentes tejidos blanco es diferente, siendo el RE α expresado predominantemente en mamas, útero, cuello uterino y vagina. Por su parte, el RE β se expresa mayoritariamente en ovario, próstata, testículos, bazo, pulmón, hipotálamo y timo

(Hall y cols., 2001). Para explicar la funcionalidad de ambos receptores, se han realizado diversos estudios, empleando ratas knockout para RE α y knockout para RE β (Couse y cols., 1999).

A partir de la clonación de estos dos diferentes RE se pudo avanzar en el conocimiento de los complejos mecanismos que engloban los diversos efectos fisiológicos de los estrógenos, involucrando dos tipos de respuestas estrogénicas, las genómicas y las no genómicas. La disociación de las respuestas a estrógenos en grupos separados de respuestas que pueden ser selectivamente estimuladas, inhibidas o completamente bloqueadas, ha sugerido la existencia de mecanismos de acciones múltiples e independientes de los estrógenos en el útero de rata (Tchernitchin, 1983).

Analizando separadamente los mecanismos propuestos para cada respuesta de tipo estrogénica entenderemos como algunos fitoestrógenos pueden ser capaces de disociar estas respuestas.

2.1.1.- Respuesta genómica a los estrógenos (RG):

En el mecanismo estrogénico genómico, el estrógeno induce incremento en la síntesis de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y la síntesis de proteínas, que parece ser mediado por receptores estrogénicos citosólico-nucleares a través de interacciones hormona-receptor con el genoma. En relación a la fisiología general de los estrógenos, debemos hacer notar que éstos son transportados por la sangre unidos a dos tipos de proteínas, por un lado, se unen a la albúmina (60%) y en menor cantidad (38%) a la globulina ligante de hormonas sexuales (SHBG), aunque con afinidades inversas, y solo un 2-3 % circula en forma libre (Grodin y cols., 1973). Al ser transportados los estrógenos unidos a proteínas plasmáticas no tendrían actividad biológica, ejerciendo esta unión una función de depósito.

En la actualidad, se reconoce que en el interior de la célula blanco existe un receptor citosólico-nuclear, el cual, al unirse a la hormona o ligando, se transloca al núcleo (Nilsson y cols., 2001). El complejo, estrógeno-receptor estrogénico, es difundido al interior del núcleo celular, para unirse a un sitio específico de secuencia de ADN conocido como Elementos de Respuesta a Estrógenos (EREs), en donde actúa como cofactor o factor de transcripción de algunos genes sensibles a estrógenos, causando el reclutamiento de proteínas co-reguladoras (co-activadoras o co-represoras) del promotor, aumentando o disminuyendo los niveles de ARNm y la producción de proteína asociada (Jensen y cols., 1972). Esto puede conducir a incrementos en el contenido de algunas enzimas específicas, diferenciación bioquímica, morfológica y funcional de las células blanco (Tchernitchin y cols., 1989). Este mecanismo clásico, o "genómico", demora en su ejecución, no menos de 6 horas aproximadamente, además puede ser bloqueado a nivel de la traducción por Actinomicina D (Tchernitchin y Galand., 1982). A través de este mecanismo se produce la hipertrofia de diversos tipos celulares uterinos, el incremento de la síntesis proteica, incremento de la actividad transcripcional y diferentes respuestas de proliferación para diversos tipos celulares, llevando, entre otras cosas, a una hipertrofia celular.

Respuestas genómicas: son aquellas que involucran un cambio en la expresión génica. **Hipertrofia:** se define como el aumento del volumen celular.

2.1.2.- Respuesta no-genómica a los estrógenos (RNG):

La respuesta "no genómica" ante la presencia de estrógenos es un proceso rápido, que ocurre en los primeros minutos, por lo que es posible evaluarla en forma significativa a las 6 horas después de la exposición a estrógenos; y no requiere de los procesos de transcripción y síntesis de nuevas proteínas para producir sus efectos.

En el LEEPA, lugar donde se desarrolló en mayor medida este trabajo, se postuló (Tchernitchin A.N., 1967) (Tchernitchin y cols., 1976a) y se estudió en profundidad mediante técnicas autoradiográficas (Tchernitchin y cols., 1985b) (Tchernitchin y cols., 1989), la presencia de RE en la superficie de los leucocitos eosinófilos (EOS) que estarían involucrados en el reconocimiento de la hormona y la posterior migración de éstas células, hacia el útero bajo estímulo estrogénico (los EOS se asociaron clásicamente a procesos de hipersensibilidad, enfermedades parasitarias y reacciones inflamatorias). Esto permitió proponer (Tchernitchin A., 1973 y 1983) y luego demostrar (Tchernitchin y cols., 1982 y 1985) el primero de los mecanismos no-genómicos de acción de hormonas esteroidales, el que está involucrado en diversas respuestas estrogénicas no-genómicas tales como: eosinofilia uterina, edema, incremento en la permeabilidad vascular y aumento de histamina. Estas respuestas son independiente del genoma y pueden ser mediadas por los leucocitos eosinófilos uterinos (Tchernitchin y Galand, 1982; Tchernitchin, 1983).

Los estrógenos y compuestos con actividad estrogénica interactúan con los RE ubicados en la superficie de los EOS con gran afinidad y especificidad a bajas concentraciones. Luego de dicha interacción se produce una masiva migración de EOS al útero que es independiente de los niveles de estrógenos en este órgano, pero depende de los niveles de estrógeno en la sangre (Tchernitchin y Galand, 1983). El complejo hormona-receptor formado en la superficie del EOS, es reconocido por receptores específicos ubicados en el endotelio vascular uterino adhiriéndose los EOS a los pequeños vasos ubicados en el mesometrio (Tchernitchin y cols., 1985). Una vez que los EOS traspasan el endotelio vascular por diapédesis, migran desde el mesometrio hacia el miometrio y luego al endometrio (estroma) (Fig. 2). Por el mismo efecto estrogénico, se produce una degranulación de los EOS con la consiguiente liberación de enzimas, entre las que destaca la histamina, contenida en los gránulos internos. Estas enzimas intervienen en la inducción

estrogénica de edema uterino e incrementan la permeabilidad vascular. La liberación de estas enzimas puede ser responsable de la depolimerización de los glicosaminoglicanos y fibras de colágeno, lo que aumenta el contenido de agua en el espacio extravascular desarrollándose el edema. El edema uterino inducido por los estrógenos se correlaciona con el número de EOS presentes en el útero, independiente de la respuesta genómica al estrógeno (Tchernitchin A. 1979; Tchernitchin y cols., 1989).

Los estrógenos causan la vasodilatación a corto plazo aumentando la formación del óxido nítrico y de la prostaciclina en células endoteliales, lo que además del aumento del flujo sanguíneo uterino y de los mecanismos propuestos por Tchernitchin y cols., (1985, 1989) que explican el edema uterino inducido por estrógeno, contribuiría a una mayor permeabilidad vascular generando finalmente un aumento de edema uterino, entre otros efectos (Kim y cols., 1999).

Las respuestas no-genómicas se caracterizan por ser insensibles a inhibidores de la transcripción o de la síntesis proteica y fundamentalmente por su tiempo de latencia, no mayor a 5 minutos (Falkenstein y cols., 2000).

Respuestas no-genómicas: Son aquellas que no involucran un cambio en la expresión génica. **Edema:** Corresponde al aumento de líquido en el espacio extracelular.

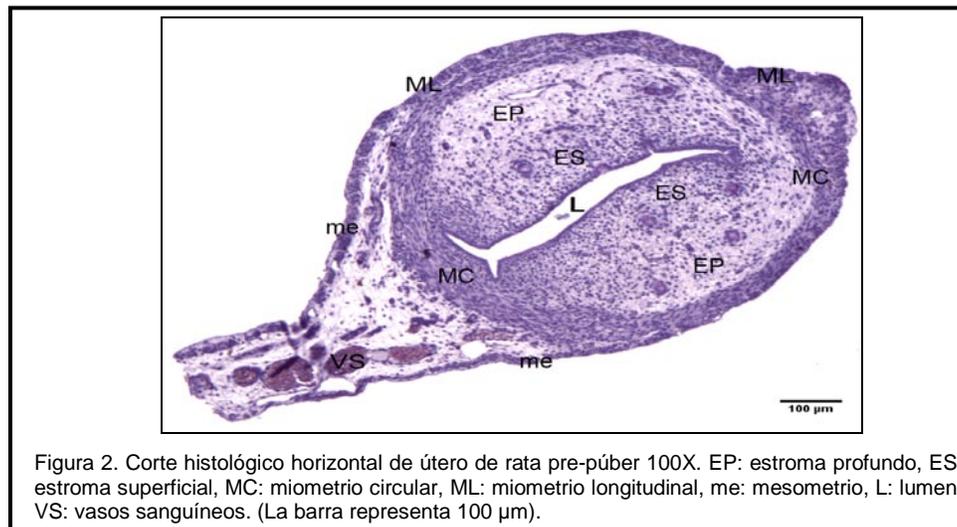


Figura 2. Corte histológico horizontal de útero de rata pre-púber 100X. EP: estroma profundo, ES: estroma superficial, MC: miometrio circular, ML: miometrio longitudinal, me: mesometrio, L: lumen, VS: vasos sanguíneos. (La barra representa 100 μ m).

2.2.- Fitoestrógenos.

La divulgación científica sobre fitoestrógenos, data de comienzos del siglo 20 (Allen y cols., 1923) (Loewe y cols., 1927). No fue sino hasta 1946, cuando se identifican compuestos de origen vegetal con actividad estrogénica (fitoestrógenos), observando la relación entre la infertilidad de un grupo de ovejas australianas y una dieta basada en un trébol llamado *trifolium subterraneum*. La infertilidad de estos animales se revertía al suspender la dieta rica en este trébol (Bennetts y cols., 1946). Este ejemplo de infertilidad solo se ha podido replicar en leopardos criados en cautiverio y en codornices de California en temporadas de sequía, donde aumenta la concentración de fitoestrógenos en vegetales que conforman su dieta (Leopold y cols., 1976).

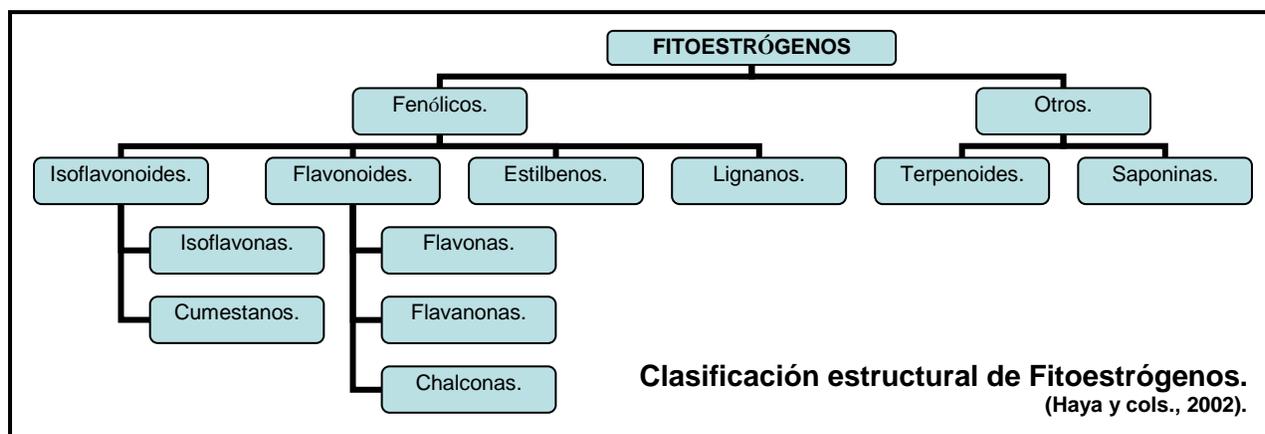
La relación entre fitoestrógenos y beneficios para la salud humana data de la década de los ochenta, cuando Axelson y cols. (1982), identificaron isoflavonas (grupo de fitoestrógenos, presentes en altas concentraciones en la soya) en orina humana. Con este hallazgo se inician los estudios epidemiológicos, experimentales y clínicos para esclarecer los efectos de los fitoestrógenos en la protección de la salud humana.

Gran parte de los estudios epidemiológicos comparan poblaciones que consumen habitualmente, y en altas cantidades fitoestrógenos provenientes de la soya (Japón: 200mg/día; otros países asiáticos: 40-50 mg/día) y aquellas que presentan un consumo menor (países de occidente: 5 mg/día) (Murkies y cols., 1998). Es así como los fitoestrógenos se relacionan con un menor riesgo de padecer enfermedades cardiovasculares y algunas patologías neoplásicas que afectan la mama, próstata y colon (Haya y cols., 2002). Los síntomas del climaterio son otro tema que se ha estudiado epidemiológicamente y que muestran diferencias con el consumo de fitoestrógenos en la sintomatología ligada al climaterio (inestabilidad vasomotora, sequedad y atrofia vaginal, etc.).

Existe en la actualidad gran interés mundial por el estudio de fitoestrógenos, y se han centrado grandes expectativas en estos compuestos naturales, por su potencial utilización en la prevención de algunas patologías y protección de la salud.

Como ya se definió, los fitoestrógenos son moléculas de origen vegetal con varias propiedades biológicas, entre las más importantes encontramos una débil actividad estrogénica y fuerte actividad antioxidante. De hecho, la actividad estrogénica es la que le da el nombre a estas sustancias y se ha utilizado como sinónimo de fitoestrógenos el término «polifenoles». Este término hace referencia a la estructura química de estas moléculas, las que presentan varios anillos fenólicos, que por otro lado parecen ser los responsables de gran parte de sus propiedades biológicas, en especial de la actividad antioxidante (Haya y cols, 2002). La inmensa mayoría de los fitoestrógenos tiene una estructura química tipo 2-fenil cromona, semejante estructuralmente al 17 β -estradiol (E₂) (Fig. 4), lo que les permitiría interactuar con receptores estrogénicos del tipo α y β .

Estos compuestos se pueden encontrar en las distintas estructuras de plantas, sean estas hojas, tallo, semillas, etc. Una planta puede tener más de una clase de fitoestrógenos, por lo tanto, diferentes plantas pueden contener proporciones y tipos distintos de fitoestrógenos (Murkies y cols., 1998). Los fitoestrógenos se clasifican de acuerdo a su estructura molecular como sigue (ver también Fig. 3):



De los diferentes fitoestrógenos el grupo más estudiado y analizado, es el de las isoflavonas, entre ellas genisteína y daidzeína, debido a que se encuentran en altas concentraciones en la soya, alimento base en dietas orientales.

Los fitoestrógenos actúan sobre los dos RE, α y β uniéndose a sus distintos dominios específicos, esto permite que puedan tener papeles transcripcionales distintos. Así, ambos receptores regularían la actividad de genes distintos con efectos clínicos distintos (Benvenuto y cols., 2002). Las Isoflavonas tienen afinidad mucho mayor, 7-30 veces (Navarro y cols., 2005), por el receptor RE β que por el RE α . La acción sobre el RE α parece ser activadora (agonista) y sobre el RE β represora (antagonista), lo que permitiría acciones selectivas en hueso, cerebro, sistema cardiovascular y ovario (Benvenuto y cols., 2002).

La similitud en estructura que tienen los fitoestrógenos con los estrógenos humanos (Fig.4), es determinante en la capacidad que tienen de actuar, dependiendo del tejido, sus concentraciones y receptor involucrado, como agonista o antagonista (Moutsatsou y cols., 2007).

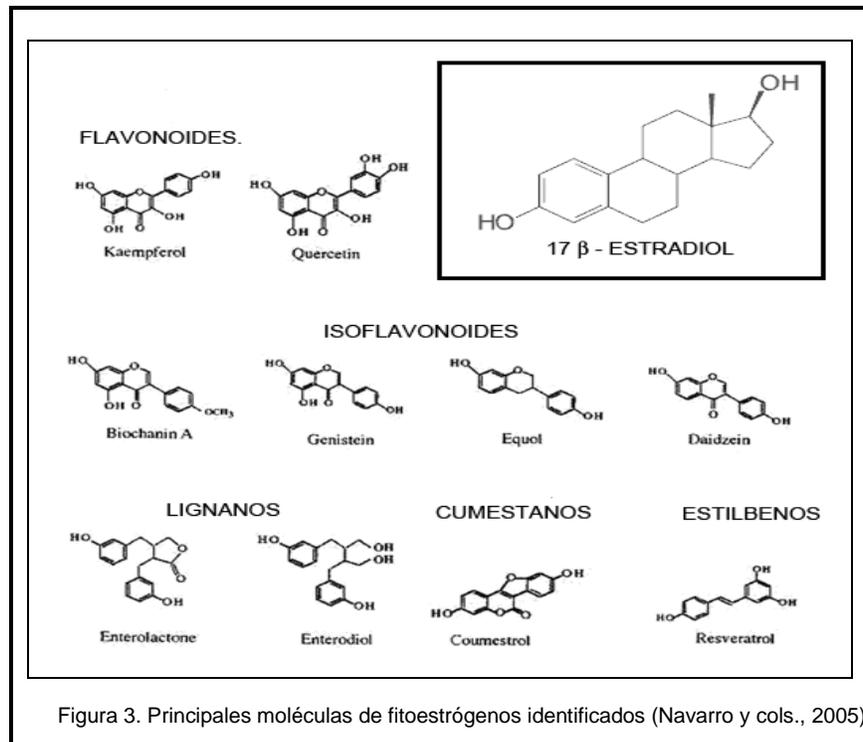
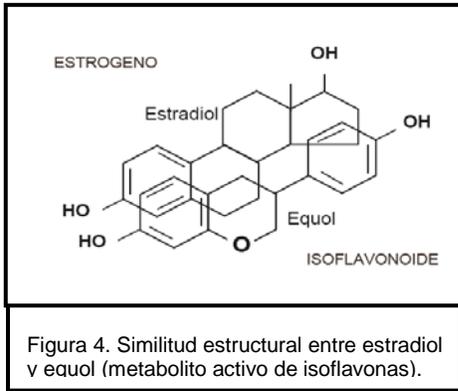


Figura 3. Principales moléculas de fitoestrógenos identificados (Navarro y cols., 2005)



Al parecer la actividad estrogénica agonista o antagonista de las isoflavonas depende de la cantidad de estrógenos endógenos, de manera que actuarían como agonista a concentraciones bajas de estrógenos y de antagonistas a concentraciones elevadas (Hwang y cols., 2006).

Es importante destacar también que los fitoestrógenos modulan diferentes receptores nucleares, mecanismo por el cual pueden ejercer diversas funciones fisiológicas. Las isoflavonas, especialmente la genisteína, modulan la expresión de los receptores nucleares: ER (receptor de estrógenos), PR (receptor de progesterona), AR (receptor de andrógenos), VDR (receptor de la vitamina D) y RAR (receptor del ácido retinoico) (Xiao y cols., 2006).

Por lo tanto, dado su perfil farmacológico los fitoestrógenos se consideran en la actualidad como moduladores selectivos de los receptores estrogénicos o SERM (Selective Estrogen Receptor Modulators), es decir, se unirían a RE induciendo o antagonizando una o más respuestas estrogénicas. Un ejemplo de SERM sintéticos son los fármacos tamoxifeno y raloxifeno, que son empleados para el bloqueo o antagonismo selectivo de los RE (Lewis y Jordan., 2005).

Se procederá a describir brevemente algunas de las propiedades biológicas de los fitoestrógenos, principalmente las del grupo de las isoflavonas, debido a tener mayor cantidad de estudios y a ser consumidas en gran medida en dietas ricas en soya:

2.2.1.- Efectos sobre los síntomas del síndrome climatérico.

En Europa, del 70 al 80% de las mujeres menopausicas experimentan sofocos (bochornos), cifra que es del 57% en Malasia, del 18% en China y del 14% en Singapur (Murkies y cols., 1998). La razón de estas diferencias se atribuye al consumo de isoflavonas de soya, entre otras cosas, existiendo una relación inversa entre éste y los síntomas climatéricos, analizada mediante diferentes estudios epidemiológicos (Khaodhiar y cols., 2008). En cuanto a los ensayos clínicos sobre el tema, existe contradicción, algunos de ellos concluyen que los fitoestrógenos no mejoran los sofocos ni otros síntomas del climaterio (Krebs y cols., 2004) (Nelson y cols., 2006); en cambio otros, consideran a los extractos de soya (ricos en fitoestrógenos) como efectivos para combatir los sofocos y otros síntomas propios del climaterio (Cassidy y cols., 2006b) (Bryant y cols., 2005) (Usui T., 2006).

2.2.2.- Efecto sobre densidad ósea y otras patologías óseas.

Arjmandi y cols. (2003), reportaron que, en mujeres post-menopausicas, el grupo tratado con proteína de soya mostró una reducción significativa en la excreción urinaria de deoxipiridinolina (un bio-marcador específico de resorción ósea), pero no mostró variación en la excreción de calcio, al compararlas con las mujeres tratadas con proteínas de leche.

Otro estudio a doble ciego, comparó la administración por 12 meses de 54 mg/día de genisteína v/s con placebo. Como resultado se obtuvo un incremento significativo en la densidad mineral ósea de fémur y un aumento en osteocalcina y fosfatasa alcalina específica de hueso en mujeres sometidas al consumo de genisteína. Estos marcadores aumentan significativamente con 17β -estradiol (Morabito y cols. 2002).

Existen además varios estudios epidemiológicos que dan cuenta de la menor incidencia de fracturas en mujeres orientales en edad climatérica, comparadas con mujeres occidentales (Cornwell y cols. 2004), demostrando de esta forma, los efectos protectores

que tienen los fitoestrógenos al disminuir la resorción ósea y retrasar la osteopenia, producto de los menores niveles plasmáticos de estrógenos endógenos, lo que se asocia finalmente a un aumento en la incidencia de fracturas con dietas occidentales.

2.2.3.- Efecto sobre la patología cardiovascular.

Los estrógenos cumplen un rol protector contra procesos ateroscleróticos y la menopausia pasa a ser un factor de riesgo para enfermedades cardiovasculares. Las enfermedades cardiovasculares son la principal causa de muerte en países desarrollados (Murphy S.L. 2000).

Los fitoestrógenos disminuyen el riesgo cardiovascular por diferentes mecanismos, los que dependen de: las modificaciones en el perfil lipídico, su actividad antioxidante, sus efectos directos a nivel de la pared vascular, entre otros (Haya y cols. 2002).

Es posible que el efecto antioxidante de las isoflavonas ejerza un efecto protector de la pared arterial, inhibiendo la formación de radicales libres, peróxido de hidrógeno y aniones superóxido. En este sentido, el equol inhibe la expresión de la NADPH oxidasa provocando un descenso de la producción de radical peroxinitrilo, lo que determina una disminución en la oxidación de las LDL limitando la formación de ateromas. Se ha descrito que la genisteína también aumenta la actividad de varias enzimas antioxidantes provocando un efecto de disminución, similar al del equol, de especies oxigenadas y nitrogenadas (Navarro, 2005).

Otro efecto de las isoflavonas, es la inhibición de la agregación plaquetaria y trombogénesis, la que puede deberse a su actividad inhibidora de las tirosinquinazas, a la inhibición competitiva de la unión del tromboxano A₂ a su receptor plaquetario o a un mecanismo de bloqueo de los canales de calcio (Montalbán y cols. 2005) (Committee on Toxicity, 2003).

2.2.4.- Protección frente a cáncer.

Hay una gran cantidad de estudios epidemiológicos que demuestran que el consumo de una alta cantidad de isoflavonas en la dieta, se asocia a menor riesgo de padecer varios procesos neoplásicos incluyendo cáncer de mama, ovario, próstata y colon (Committee on Toxicity, 2003). La incidencia de estos es menor en Asia y Europa del Este que en países occidentales. Los emigrantes asiáticos, que mantienen su dieta tradicional, tienen menos procesos neoplásicos, pero cuando adoptan los cambios dietarios típicos del país donde viven aumenta el riesgo de estas enfermedades (Usui T. 2006).

Se ha visto una menor incidencia de cáncer de mama en países orientales, donde el consumo de fitoestrógenos es alto, y también una menor tasa de mortalidad atribuida a esta enfermedad. El consumo de fitoestrógenos se asocia a un menor riesgo de padecer cáncer de mama, debido específicamente a altos niveles de genisteína en plasma (Iwasaki y cols. 2008). Los mecanismos de acción, por los cuales los fitoestrógenos pueden disminuir el riesgo de cáncer de mama, son varios. En primer lugar, se cree que tienen una acción competitiva con el estradiol por el RE y debido a su escasa potencia, pueden actuar como antiestrógenos en la mama, cuando el cáncer es hormona-dependiente. Por otro lado, actúan como inhibidores de las enzimas que controlan el proceso mitótico y aumentan los niveles de SHBG, lo que produce una disminución de la cantidad de hormona libre, que es la fracción biológicamente activa. Los estudios *in vitro*, han confirmado que la enterolactona, el enterodiol y los derivados sintéticos de los lignanos, logran inhibir en un 18% la proliferación en líneas celulares humanas del cáncer de mama (Kumar y cols. 2002).

Algunos estudios han establecido una relación inversamente proporcional entre la síntesis de equol, metabolito de la daidzeína, y la incidencia de cáncer de próstata (informe AESAN 2007). Un estudio reciente, evaluó los efectos de la genisteína, daidzeína y otros

metabolitos, sobre células neoplásicas de próstata, determinando su grado de diferenciación y proliferación, así como la integridad de su ADN. Los resultados obtenidos permiten concluir que las isoflavonas no provocan daños en el ADN, no fomentan la proliferación de dichas células, y algunas de ellas podrían incluso inhibir la proliferación de las mismas (Raschke y cols., 2006).

En cuanto al cáncer de colon, Campbell y Thomson demostraron que el receptor estrogénico β (RE β) es predominante en el colon humano y que la disminución de éste, se asocia a un incremento de cáncer de colon en mujeres. Teniendo en cuenta que los fitoestrógenos tienen una acción preferencial sobre el RE β , su acción protectora en cuanto al cáncer de colon se podría asociar a la presencia de éstos receptores a nivel del epitelio colónico. Esto se corroboró en un estudio de casos y controles donde se evaluó la asociación entre dieta rica en fitoestrógenos y menor riesgo de cáncer colo-rectal, encontrándose una disminución significativa del riesgo, especialmente con fitoestrógenos del tipo lignanos (Cotterchio y cols. 2006).

2.2.5.- Otros efectos:

Los fitoestrógenos provenientes de trébol rojo (daidzeína y genisteína) actuarían como antiinflamatorios y agentes antiaterogénicos en células endoteliales humanas, utilizando como mecanismo la reducción de la expresión de moléculas de adhesión leucocitaria (Simoncini y cols. 2008).

Las isoflavonas, por otro lado, tienen una acción fotoprotectora muy efectiva, por lo que podrían ser utilizadas como ingrediente en productos dermatológicos de protección contra daño ultravioleta (Lin y cols. 2008).

III. HIPÓTESIS

Hipótesis Nula (H₀):

La exposición aguda de ratas pre-púberes al extracto, **no** genera disociación de respuestas estrogénicas en útero.

Hipótesis Alternativa (H₁):

La exposición aguda de ratas pre-púberes al extracto, genera disociación de respuestas estrogénicas en útero.

IV. OBJETIVOS:

Objetivo general:

Evaluar dos respuestas de tipo estrogénico de un extracto vegetal en útero de rata pre-púber, en relación con las respuestas de 17β-estradiol.

Objetivos específicos:

- ✓ Realizar el montaje de los tejidos expuestos a las diferentes condiciones experimentales.
- ✓ Comparar las variaciones en el edema uterino influenciadas por la exposición a extracto, estradiol y extracto-estradiol en estroma de útero de rata.
- ✓ Medir el grado de hipertrofia celular en miometrio circular tras exposición a las condiciones en estudio.
- ✓ Cualificar y cuantificar aquellos patrones de fitoestrógenos disponibles que presente nuestro extracto.
- ✓ Observar respuestas estrogénicas genómica (hipertrofia celular) y no-genómica (edema).

V. MATERIALES Y EQUIPOS.

5.1.- Equipos:

- Microscopio óptico Leica CME x10x100 binocular. EUA.
- Micrótopo de rotación Leica RM 2125 RT. EUA.
- Estufa Precisión Scientific CO, 4-C-11, EUA.
- Bañera de Flotación Lipshaw MFG 375, EUA.
- Balanza Ohaus SC 4010, EEUU.

5.2.- Instrumental:

- Micropipetas de 100 y 1000 μL . Hirschmann, Alemania.
- Material de vidrio Pirex, EUA.
- Papel filtro Whatman 42.
- Jeringas de 1ml. Nipro, Japón.
- Arsenal quirúrgico Hartmann, Alemania.
- Porta y cubre objetos esmerilados Marienfeld, Alemania
- Planillas de registro de variables.
- Mica transparente que define área constante de visión igual a $1.075 \mu\text{m}^2$
(Área de VRDC).
- Los datos fueron tabulados a través de Microsoft Office Excel 2003. (Microsoft Office Professional Edition 2003, Oregon, EE.UU).

5.3.- Reactivos generales:

- 17 β - estradiol. Laboratorio SIGMA, St Louis, Missouri, EUA.
- Aceite de inmersión, Bálsamo de Canadá, Buffer fosfato, Etanol absoluto, Éter Etilico, Formalina, Parafina Histosec[®] y Xilol, de Laboratorio Merck, Chile.
- Albúmina y agua destilada (Elaborados en LEEPA, Facultad de Medicina, Universidad de Chile).
- Eosina Y* acuosa al 1%.
- Hematoxilina acidificada de Harris.
- Solución de Carbonato de Litio. Laboratorio Meck, Chile.
- Solución de NaCl 0.9%, (SS). Laboratorio Biosano, Santiago, Chile.
- Extracto vegetal nativo 81a obtenido en LEEPA (24/07/2007).

5.4.- Análisis Estadístico:

- Como medio de comparación entre las diferentes condiciones experimentales se ocupó el valor recíproco de densidad celular (VRDC), valor que representa la densidad celular en todo el tejido estudiado de un determinado órgano. Este valor se ha ocupado por más de 40 años en el LEEPA (Tchernitchin y cols., 1967-1995).
- Se utilizó ANOVA para el análisis de varianza de entrada simple.
- Para el análisis de los datos y nivel de significancia estadística, se usó el test de las mínimas diferencias significativas *a posteriori* (LSD)

VI. MÉTODO DE TRABAJO.

6.1.- Diseño del estudio.

Estudio Experimental doble ciego.

6.2.- Área de estudio.

El proceso experimental de la investigación se realizó en el Laboratorio de Endocrinología Experimental y Patología Ambiental (LEEPA), que se encuentra en las dependencias de la Facultad de Medicina, ubicada en Independencia # 1027. Además se ocuparon las dependencias de Laboratorio de Botánica y Fitoquímica de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, ubicada en Vicuña Mackenna 20, Santiago, Chile. Ambos laboratorios de la Universidad de Chile.

6.3.- Modelo de estudio.

El presente estudio se realizó sobre ratas hembra pre-púberes de la cepa Sprague-Dawley de 21 días de vida, según lo recomienda por la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo, al realizar algún test de estrogenicidad (Kanno y cols. 2001), con un rango de peso de 40 a 50 g; criadas y mantenidas bajo condiciones controladas de luz, temperatura y alimentación ad-libitum, en el vivero del bioterio del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Facultad de Medicina, Sede Norte, de la Universidad de Chile.

Justificación: Se ocupó este modelo de estudio, debido a que en el estadio pre-púber, las ratas nos proporcionan un campo de observación libre de efectos apreciables a hormonas estrogénicas endógenas. Asimismo, los diferentes tipos de receptores estrogénicos se encuentran funcionales y por lo tanto, las respuestas observadas en los tejidos estudiados, serían propias de la administración de los compuestos. Finalmente, este modelo simula las condiciones fisiológicas producidas en mujeres bajo la influencia o ausencia de estrógenos.

6.4.- Obtención de controles y extracto vegetal.

Control negativo: se empleó solución de NaCl 0,9% a pH 7,5, inyectado 0,3 mL.

Control positivo: la concentración para la máxima respuesta de 17β -estradiol (E_2) en útero de rata pre-púber fue de 300 ($\mu\text{g}/\text{Kg}$ p.c.) (Tchernitchin y cols., 1983). Se dispuso de una solución de 500 ($\mu\text{g}/\text{mL}$) de E_2 , que se disolvió en solución de NaCl 0,9% en relación 1:9 lo que da una equivalencia de 50 ($\mu\text{g}/\text{mL}$), de esta solución se inyectó, a las ratas con esta condición experimental, 0,3 mL con lo cual la dosis administrada fue igual a 300 ($\mu\text{g}/\text{Kg}$ p.c.) de E_2 .

Extracto: La planta fue recolectada el 01/01/2007 en el Valle de la Engorda, cercano al Cajón del Maipo, R.M., entre 2500 a 3000 metros de altura. Según los conocimientos etno-medicinales que se tiene de la planta, esta ha sido ocupada con fines abortivos y para regular el flujo menstrual femenino.

No se comunica la identificación de la especie vegetal, debido a un compromiso de confidencialidad con representantes de pueblos originarios y por la posibilidad de patentación de los compuestos (y/o) extractos activos de dicha especie vegetal

Se recolectaron las sumidades floridas de la planta y se guardó un testigo en el LEEPA; 28,0 g de sumidades floridas fueron extraídas con 100 mL de etanol absoluto Merck por 200 días, luego se procedió a filtrar con papel Whatman 42, obteniéndose el extracto "Le81a", que para el desarrollo práctico se denominó "81a". Este extracto se diluyó en suero fisiológico salino, en proporciones de 1:9, inyectándose finalmente 0,3 mL a cada rata con esta condición.

6.5.- Preparación de muestras.

A un total de 84 ratas que cumplieron los criterios antes descritos, fueron divididas en 8 grupos. Cada grupo fue expuesto a diferentes condiciones experimentales que se describen a continuación:

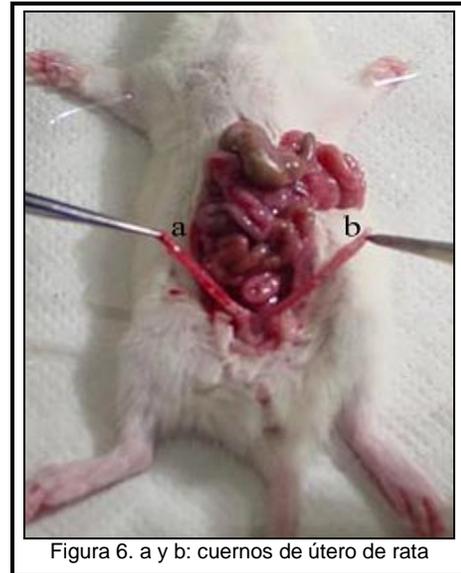
Grupos Experimentales.	Condición Experimental.	Duración de Efecto.
Control negativo SS (n=19)	0,3 mL NaCl 0,9% (SS)	6 y 24 horas.
Grupo positivo E6 (n=10)	0,3 mL E ₂ de 300 µg/Kg p.c	6 horas.
Grupo positivo E24 (n=11)	0,3 mL E ₂ de 300 µg/Kg p.c	24 horas.
Grupo 81a6 (n=12)	0,3 mL Ext. Vegetal 81a.	6 horas.
Grupo 81a24 (n=10)	0,3 mL Ext. Vegetal 81a.	24 horas.
Grupo 81aE6 (n=10)	0,3 mL solución 81a + E ₂	5/81a y 6/E ₂ horas.
Grupo 81aE24 (n=12)	0,3 mL solución 81a + E ₂	23/81a y 24/E ₂ horas.

Las ratas fueron inyectadas por vía subcutánea a nivel dorsal con jeringa de 1mL (Fig.5). En los grupos 81aE6 y 81aE24, extracto y estradiol, se inyectaron con una hora de desfase respectivamente.

6.6.- Obtención y montaje de cortes histológicos de útero de rata.

Una vez transcurridas las horas post-administración, según cada condición, se extrajeron ambos cuernos uterinos de cada rata bajo anestesia etérea, luego de lo cual fueron eutanasiadas por exceso de anestésico. Los cuernos uterinos fueron fijados por 24 horas en formalina tamponada al 10% en buffer fosfato a pH 7.4 (Fig.6). Posteriormente, cada cuerno fue seccionado en 3 partes iguales, definiendo las áreas proximal, medial y distal en relación al cuerpo uterino.

Las secciones uterinas fueron deshidratadas en una gradiente ascendente de etanol (75%, 95% y 100%), luego pasaron por líquido de polaridad intermedia (xilol), para asegurar la correcta impregnación con parafina líquida. La impregnación se realizó en una batería de tres parafinas líquidas (Histosec[®]) en una estufa a 60° C por 15 a 20 minutos cada una, a objeto de eliminar los residuos de xilol y asegurar la correcta impregnación. Posteriormente, se incluyeron en parafina, conformando de éste modo los moldes de inclusión. Una vez obtenidos los bloques de parafina con los cuernos uterinos fijados en su interior fueron tomados para realizar cortes del tejido uterino de un espesor de 5 µm. en Micrótopo de rotación Leica RM 2125 RT.



Los cortes histológicos fueron sometidos a baño de flotación en agua a 40° C aprox., e inmediatamente adheridos a portaobjetos previamente tratados con albúmina y secados en estufa a 37° C. Se utilizó como colorantes Hematoxilina y Eosina (H&E), para lo cual, se realizó el siguiente proceso de tinción:

6.7.- Proceso de Tinción Histológico.

Desparafinación y Rehidratación: Se mantuvieron los portaobjetos con los cortes uterinos de 5 a 10 minutos en cada recipiente de 250 mL, con los solventes enunciados más abajo, con el fin de retirar completamente la parafina de los tejidos y luego, con líquidos de polaridad ascendente rehidratarlos, permitiendo de este modo el ingreso de los colorantes a los tejidos, según la siguiente secuencia (Fig. 7):

- I. Xilol (3 recipientes diferentes).
- II. Etanol 100% (2 recipientes).
- III. Etanol 95 % (2 recipientes).
- IV. Etanol 70% (1 recipiente).
- V. Agua destilada.

Coloración: Los portaobjetos con los tejidos uterinos fueron sumergidos entre 20 a 30 segundos en cada recipiente, logrando la coloración de los tejidos al seguir la secuencia que procede:

- I. Hematoxilina de Harris acidificada (filtrada previamente).
- II. Agua corriente.
- III. Solución de Carbonato de Litio concentrado.
- IV. Agua Destilada.
- V. Eosina Y acuosa al 1%.

Deshidratación y Aclaramiento: con los tejidos coloreados se deshidrató el medio al sumergir los portaobjetos secuencialmente en líquidos de polaridad descendente y luego aclarados en líquido intermedio, según la secuencia siguiente:

- I. Etanol 70% (1 recipiente).
- II. Etanol 95% (2 recipientes).
- III. Etanol 100% (2 recipientes).
- IV. Xilol (3 recipientes).

Finalmente el montaje definitivo de los portaobjetos se efectuó con Bálsamo de Canadá, para posteriormente proceder a analizar microscópicamente los tejidos uterinos montados y fijados en los portaobjetos (Fig.8).



Figura 7. Batería de Tinción de H&E

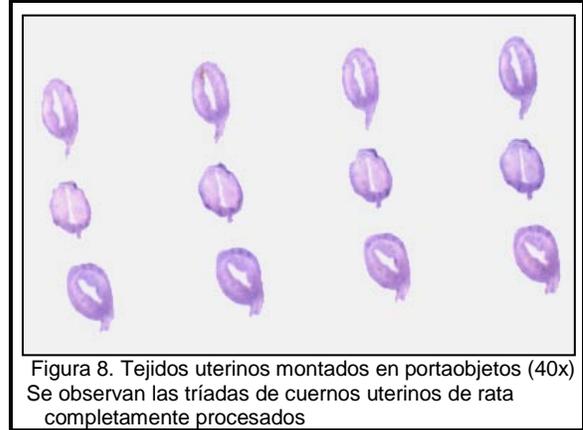


Figura 8. Tejidos uterinos montados en portaobjetos (40x)
Se observan las tríadas de cuernos uterinos de rata completamente procesados

VII. METODOLOGIA DIFERENCIAL HISTOLÓGICA Y ESTADÍSTICA

7.1.- Parámetros a evaluar y procedimientos específicos que serán utilizados.

Se cuantificó una de las respuestas inducidas por estrógenos de tipo genómica (RG) (hipertrofia de miometrio circular) y una respuesta no-genómica inducida por estrógenos (RNG) (edema endometrial), que produjeron las diferentes condiciones experimentales, evaluando finalmente los siguientes parámetros:

- 7.1.1.- Edema en estroma superficial y estroma profundo (RNG).

Las RNG deberían ocurrir transcurrido minutos de haber expuesto los tejidos a compuestos con actividad estrogénica, por lo cual comúnmente se miden a 6 horas luego de la exposición (Tchernitchin y cols., 1974). Además se realizaron mediciones 24 horas post-administración, para observar variaciones en la intensidad de la respuesta.

En tejido humano, el efecto estrogénico no-genómico se produce en el endometrio uterino en mayor medida. En forma homóloga este tejido está presente en las ratas y se subdivide en estroma superficial (ES) y estroma profundo (EP) (Fig. 11).

El edema en ambos estratos uterinos se debe a la masiva migración de eosinófilos (EOS) frente al estímulo estrogénico, así como también, el aumento de la permeabilidad vascular y el aumento del oxido nítrico son factores que influyen para que se genere edema en el ES y EP. La infiltración de líquido en el intersticio produce un distanciamiento entre las fibras presentes en la matriz extracelular, con el consiguiente aumento del espacio intercelular, razón por la cual el número de células para un área constante disminuye (Fig.9 y 10) (Tchernitchin y cols., 1984).

Modo de evaluación: La cuantificación experimental se realizó por microscopía óptica (1000x) con aceite de inmersión, para lo cual se escogieron 3 tríadas representativas de los cortes histológicos considerando las zonas medias y extremas en cuanto a la disposición en el portaobjeto. En cada corte se contabilizó el número de núcleos en un área constante de $1.075 \mu\text{m}^2$, delimitada por un círculo dispuesto en uno de los oculares.

Del ES se consideraron 4 áreas distanciadas entre si y muy cercanas al epitelio luminal, en el EP también se contemplaron 4 áreas colindantes al miometrio circular uterino (MC). En ambos casos no se tomaron en cuenta los polos del corte histológicos (mesometrial y anti-mesometrial), debido a que en esa zona se pierde la forma y el endometrio superficial suele confundirse con el endometrio profundo.

Para cuantificar el edema se dividió el número de células presentes en un área constante (cel/área), para luego calcular el inverso de este valor y obtener el valor recíproco de densidad celular (VRDC).

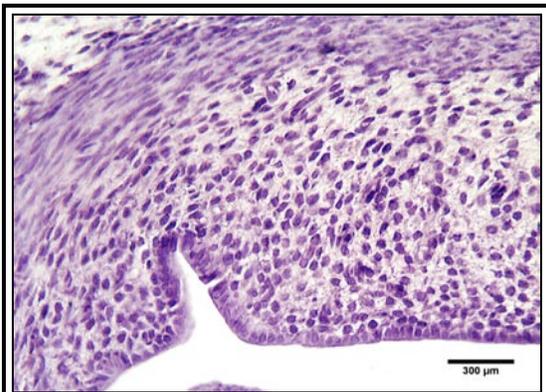


Figura 9: corte de cuernos uterinos de rata 100x. El tejido fue expuesto a control negativo, por lo que no presenta edema en estroma ni hipertrofia celular en el miometrio circular. (La barra indica $300 \mu\text{m}$.)

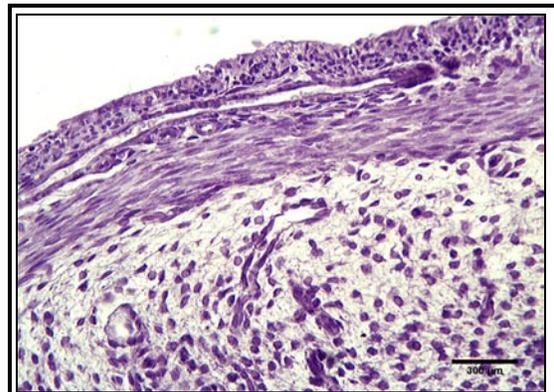


Figura 10: Corte de cuernos uterinos de rata 100x. Tejido expuesto a estradiol, por lo que se observa edema en estroma profundo. Se observa una menor cantidad de células por área. (La barra indica $300 \mu\text{m}$.)

- 7.1.2.-Hipertrofia en el miometrio circular de cuernos uterinos (RG).

Las respuestas genómicas descritas por Jensen y cols.(1972) involucra receptores citosólico-nucleares y se pueden evaluar mediante la medición de hipertrofia de los distintos tipos celulares uterinos, síntesis de proteínas específicas, respuestas de proliferación para diversos tipos celulares, entre otras (Beato y Klug, 2000).

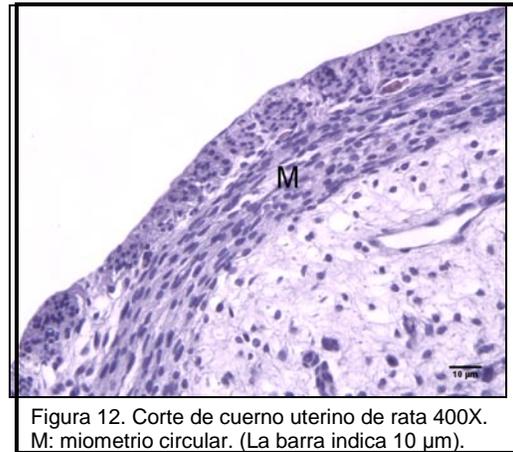
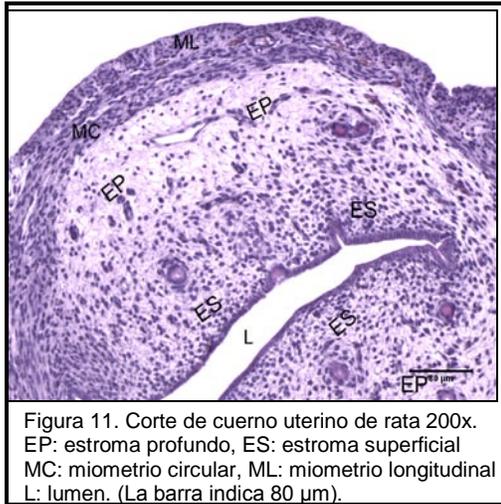
Es necesario mencionar que la hipertrofia del MC, se observó mediante una disminución de células por campo, por lo que el VRDC disminuirá en forma directa al crecimiento celular. Es elegido este tejido ya que es difícil que se produzca edema en tejido muscular debido a que, el área de corte ocupado por espacio extracelular, es mínimo e insignificante como para causar un alejamiento medible de las células en caso de producirse edema (extracelular). Además existen fuertes uniones intercelulares y poca cantidad de fibras colágenas.

Las RG suelen tardar varias horas y su medición correcta suele realizarse a las 24 horas de inyectadas las condiciones. Veremos como comienza el efecto hipertrófico además a las 6 horas. (Tchernitchin y cols. 1974).

Modo de evaluación: Se analizaron por cada placa 3 triadas (9 cortes), de un total de 20 triadas por placa, elegidas al azar. Las triadas analizadas se seleccionaron de la misma forma que lo descrito para la evaluación de edema. Para determinar hipertrofia se observaron 4 campos ópticos en los que se cuantificó el número de células por campo mediante la observación y cuantificación de los núcleos de los miocitos, en el MC (Fig.12).

Cada corte seleccionado fue cuantificado a través de un recuento óptico, en microscopio Leica CME bajo aumento 1000x con aceite de inmersión, del número de núcleos visibles en un área constante de $1.075 \mu\text{m}^2$, proporcionada por un círculo cortado en una mica plástica, introducida en el ocular derecho del microscopio. Esta área se colocará en 4 porciones distintas del MC, alejadas de los polos del corte (zona difusa).

El número promedio de células por campo en cada placa, se dividió por el área del campo (cel/área), para luego calcular el inverso de este valor y obtener el valor recíproco de densidad celular (VRDC). Los núcleos al aumentar su volumen ocuparan una mayor área, generando que menor cantidad de células caigan dentro del área constante.



7.2.- Análisis estadístico.

El procesamiento estadístico de los datos obtenidos, se hizo aplicando a los parámetros medidos, dos pruebas estadísticas que nos señalaron si alguna de las condiciones administradas generaron respuestas y en que magnitud se produjeron estas.

Se trabajó con los promedios geométricos con su desviación estándar (DS), para cada condición experimental, considerando el promedio observado para el control negativo (SS) como 0% de respuesta de tipo estrogénica y el promedio entregado por el control positivo (E_2) a las 24 horas post-administración como el 100% de respuesta de tipo estrogénica.

- Análisis de varianza ANOVA.

Esta prueba estadística permite hacer un análisis entre los parámetros medidos y detectar si hay diferencias significativas entre ellos. Para este test se considera un grado de significancia del 5%, o sea, un nivel de confianza del 95%.

En aquellas comparaciones en las cuales ANOVA mostró diferencias significativas, se procedió a aplicar el test de LSD *a posteriori* o de las mínimas diferencias significativas.

- Test de las mínimas diferencias significativas *a posteriori* (LSD) de dos entradas.

Se trata de una prueba que realiza comparaciones múltiples entre los parámetros cuantificables, y así determinar entre cual de las condiciones experimentales, existen diferencias y poder evaluar su magnitud. Al igual que en la prueba de ANOVA, se consideró un grado de confianza mínimo del 95% y 2 grados de libertad.

VIII. METODOLOGÍA PARA ANÁLISIS POR HPLC.

8.1.- Descripciones del equipo utilizado.

- HPLC Shimadzu LC10A - 10AVP.

Bomba Isocrática LC10 AT VP.

Detector UV-VIS SPD-10AV VP.

Detector Fluorescencia RF-10A XL.

Modulo de Control SCL-10A VP.

Desgasificador DGU-14A.

Sistema de Gradiente Cuaternaria FCV-10AL VP.

Autoinyector SIL-10AD VP.

Válvula Conmutadora de Horno Para Columna CTO-10AS VP.

Software Class-VP.

8.2.- Reactivos para HPLC.

- Genisteína (4',5,7-Trihidroxiisoflavona), PM: 270.2, Catálogo Sigma: G6645.
- Genistina (Genisteína-7-O-β-D-glucopiranosida), PM: 432.4, Catálogo Sigma: G0897.
- Daidzeína (4',7-Dihidroxiisoflavona), PM: 254.2, Catálogo Sigma: D7802.
- Metanol de Laboratorio Merck, Chile

8.3.- Identificación y valoración de compuestos con actividad estrogénica en “81a” mediante Cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

Se realizó Cromatografía Líquida de Alta Resolución (HPLC) con detección ultravioleta para muestras con niveles sobre los 100 ng/mL de concentración de estrógenos.

Se cualificó y cuantificó tres estándares; dos de estos fitoestrógenos en forma aglicona o desconjugada, genisteína y daidzeína, y genistina que es la forma conjugada de genisteína (derivado glicosilado). Para la identificación de los patrones de fitoestrógenos de genistina, genisteína y daidzeína se ocupó el Método de Careri y cols. (2001) de HPLC. Las condiciones cromatográficas para realizar el estudio preliminar fueron las siguientes: fase móvil estuvo constituida por metanol/agua en una relación 70/30, se utilizó una columna Shimpack C₁₈ 250 x 46 mm, 5 µm. El flujo utilizado fue de 0,2 mL/min y volumen de inyección 50 µL (Ver detalle en Materiales y equipamiento).

Se realizó un análisis cromatográfico de 81a, buscando concentraciones superiores a los 100 ng/mL de los patrones que se disponían. Los fitoestrógenos ocupados como patrón son aquellos que más han sido estudiados debido a la alta concentración que es posible encontrar en soya y sus derivados, destacándose la genisteína (aglicona) y la genistina (glicósido de la genisteína), esta última en mayor abundancia (Kelly y cols., 1995).

Esta técnica nos permite identificar la existencia de los patrones que posea el extracto alcohólico de la planta 81a y sus concentraciones, para finalmente atribuir a estas concentraciones las respuestas de tipo estrogénicas que pudiese presentar el extracto.

IX. RESULTADOS

9.1.- Resultados estadísticos de análisis histológico.

9.1.1.- Edema en estroma endometrial, medido a través de VRDC

Después de haber inyectado solución de NaCl 0,9% (SS), 17 β -estradiol de concentración 300 μ g/Kg p.c (E₂ = E), extracto vegetal alcohólico (81a), extracto vegetal alcohólico 81a y 17 β -estradiol (81aE), se midieron diferentes parámetros en forma temprana (6 horas de post-administración) y tardía (24 horas de post-administración).

Para describir las condiciones experimentales en los gráficos E representa a 17 β -estradiol, a diferencia de lo que se observa en el texto donde 17 β -estradiol es representado por E₂. Los siguientes son los gráficos para edema en EP y ES.

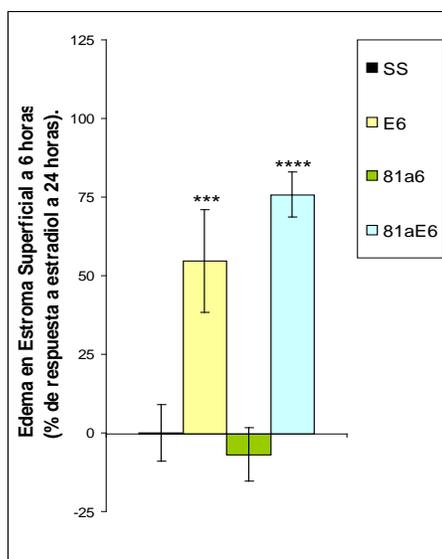


Gráfico 9.1.1a: Medición de VRDC (valor recíproco de densidad celular) en el ES de útero de ratas pre-púberes, que fueron expuestas en forma aguda a una de las 4 condiciones: solución de NaCl 0,9% (SS), 17 β -estradiol (E), extracto vegetal (81a) y 17 β -estradiol+extracto vegetal (81aE). Los cuernos uterinos fueron extirpados trascurridas 6 horas de post-administración (n=51). (***) = p<0,001; (****) = p<0,0001; En comparación a la condición sin E.

Gráfico 9.1.1a Edema en Estroma Superficial a 6 horas: Es posible observar que “81a” no presenta efecto estrogénico en el ES al ser administrado, y se observa que al combinar 81a y E (81aE) no se detectó una potenciación de la RNG de tipo estrogénica del E por parte del extracto. Esta condición fue medida en forma temprana.

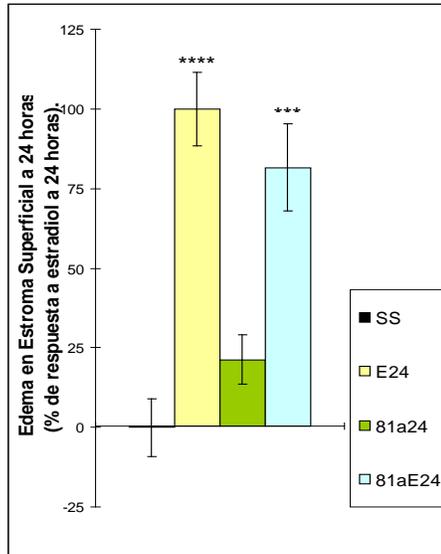


Gráfico 9.1.1b: Medición de VRDC (valor recíproco de densidad celular) en el ES de útero de ratas pre-púberes, que fueron expuestas en forma aguda a una de las 4 condiciones: solución de NaCl 0,9% (SS), 17β-estradiol (E), extracto vegetal (81a) y 17β-estradiol y extracto vegetal (81aE). Los cuernos uterinos fueron extirpados trascurridas 24 horas post-administración (n=52). (****) = $p < 0,0001$; (***) = $p < 0,001$; En comparación a la condición sin E.

Gráfico 9.1.1b *Edema en Estroma Superficial a 24 horas:* Se observó que en forma tardía, la máxima expresión de RNG producida por E (100%), traducida en edema en ES tras la exposición a E.

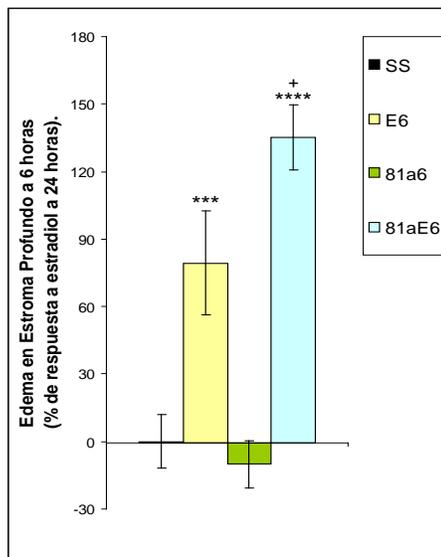


Gráfico 9.1.1c: Medición de VRDC (valor recíproco de densidad celular) en el EP de útero de ratas pre-púberes, que fueron expuestas en forma aguda a una de las 4 condiciones: solución de NaCl 0,9% (SS), 17β-estradiol (E), extracto vegetal (81a) y 17β-estradiol+extracto vegetal (81aE). Los cuernos uterinos fueron extirpados trascurridas 6 horas post-administración (n=51). (***) = $p < 0,001$; (****) = $p < 0,0001$; En comparación a la condición sin E. (+) = $p < 0,05$; En comparación a la condición sin extracto 81a.

Gráfico 9.1.1c *Edema en Estroma Profundo a 6 horas:* Se produce edema en EP por efecto de E, además la respuesta es la misma (SS) que en ES a las 6 horas de inyectadas las condiciones. La potenciación del efecto estrogénico en la condición 81aE muestra una diferencia significativa, con un $p < 0,05$; comparado con el efecto producido por E.

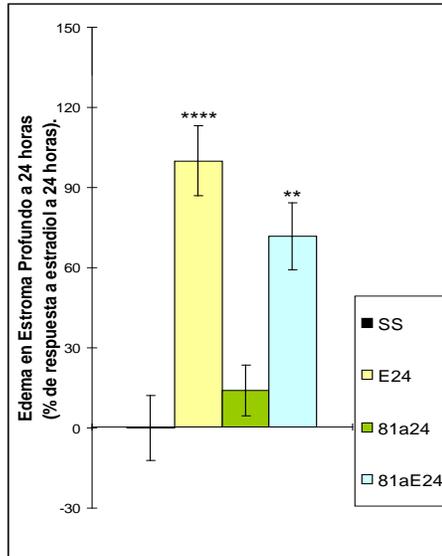


Grafico 9.1.1d: Medición de VRDC (valor recíproco de densidad celular) en el EP de útero de ratas pre-púberes, que fueron expuestas en forma aguda a una de las 4 condiciones: solución de NaCl 0,9% (SS), 17β-estradiol (E), extracto vegetal (81a) y 17β-estradiol+extracto vegetal (81aE). Los cuernos uterinos fueron extirpados trascurridas 24 horas post-administración (n=52). (****) = p<0,0001; (**) = p<0,01.

Grafico 9.1.1d *Edema en Estroma Profundo a 24 horas:* E produjo edema en EP, como RNG. Iguales condiciones que las observadas en ES sin encontrar diferencias significativas en las diferentes respuestas estrogénicas a 24 horas. Se observó un máximo de respuesta por parte de E a las 24 horas para RNG.

9.1.2.- Hipertrofia celular en el miometrio circular.

Respuesta medida en útero de rata pre-púber tras haber inyectado las condiciones experimentales (CCEE). Este parámetro se refiere a la hipertrofia celular tras el efecto estrogénico genómico.

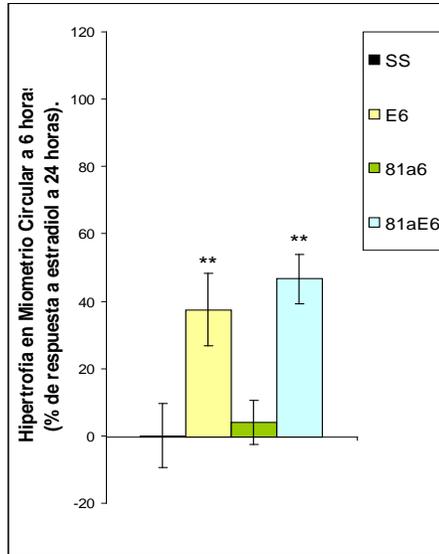


Grafico 9.1.2a: Medición de la hipertrofia celular en el MC de útero de ratas pre-púberes, que fueron expuestas en forma aguda a una de las 4 condiciones: solución de NaCl 0,9% (SS), 17β-estradiol (E), extracto vegetal (81a) y 17β-estradiol+extracto vegetal (81aE). Los cuernos uterinos fueron extirpados trascurridas 6 horas post-administración (n=51). (**)= p<0,01; En comparación a la condición sin E.

Grafico 9.1.2a *Hipertrofia en Miometrio Circular a 6 horas:* La hipertrofia celular producida a las 6 horas producida por E es menor que las que se pudiesen observar a las 24 hrs, debido a que esta respuesta tarda más en desarrollarse por involucrar mecanismos citosólicos-nucleares. El extracto 81a no demuestra actividad estrogénica.

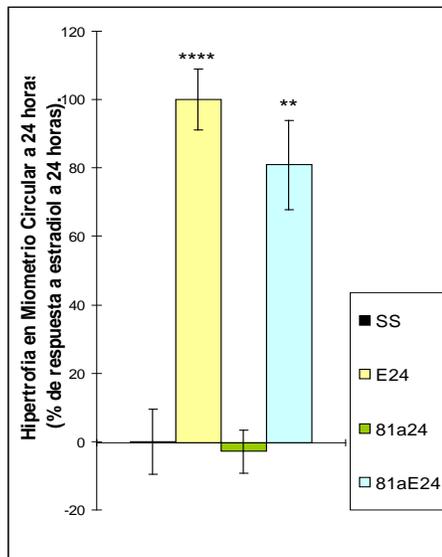


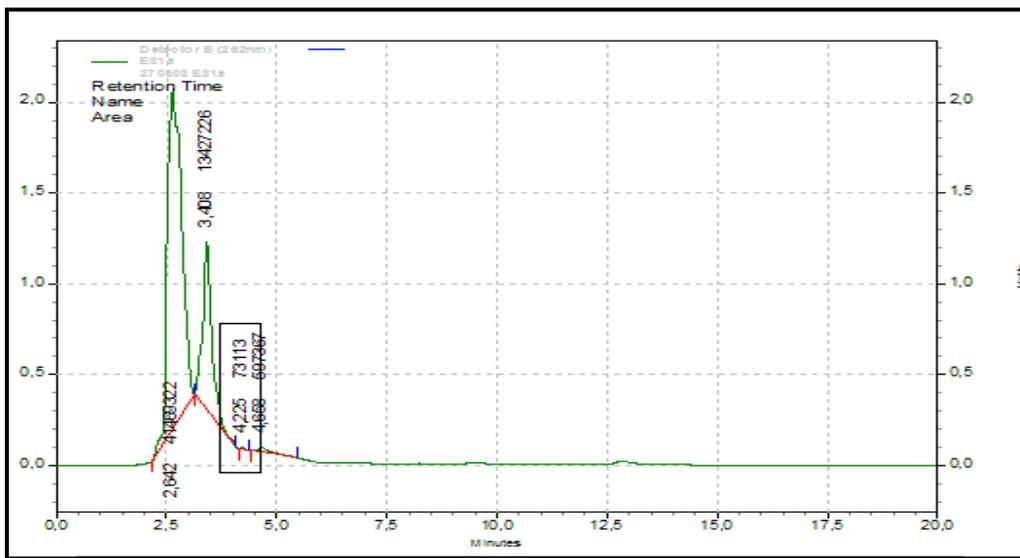
Grafico 9.1.2b: Medición de la hipertrofia celular en el MC de útero de ratas pre-púberes, que fueron expuestas en forma aguda a una de las 4 condiciones: solución de NaCl 0,9% (SS), 17 β -estradiol (E), extracto vegetal (81a) y 17 β -estradiol+extracto vegetal (81aE). Los cuernos uterinos fueron extirpados trascurridas 24 horas post-administración (n=52). (****) = p<0,0001; (**) = p<0,01; En comparación a la condición sin E.

Grafico 9.1.2b *Hipertrfia en Miometrio Circular a 24 horas:* La respuesta estrogénica de E concuerda con la literatura científica, presentando un máximo de respuesta a las 24 horas de inyectado E con un 100% de respuesta. Concordante con los datos obtenidos en forma temprana no se observó efecto estrogénico por parte de 81a a las 24 horas post-administración, ni se detectó una modificación significativa de la respuesta a E por efecto de 81a.

9.2.- Resultado para análisis por HPLC.

Perfil cromatográfico para extracto vegetal nativo "81a".

Muestra 81a: Detección y cuantificación de isoflavonas.



Analito	T _r	Área	Concentración
- Genistina	4,255	73.113	± 1 µg/mL
- Daidzeína	-	-	ND.
- Genisteína	-	-	ND.

81a no presentó niveles detectable (sobre 100ng/mL) de los fitoestrógenos utilizados como patrón (Daidzeína y/o Genisteína). Si se observó una concentración equivalente a ± 1 µg/mL del derivado glicosilado de Genisteína (Genistina). No descartamos la existencia de algún otro fitoestrógeno y/o su derivado glicosilado en nuestro extracto, el cual no es posible identificar mediante esta técnica al no contar con los patrones puros para calibrar el equipo. De existir algún otro compuesto con actividades estrogénicas en el extracto se observará efectos en tejidos uterinos.

X. DISCUSIÓN

De acuerdo con los resultados obtenidos, la asociación de extracto vegetal y 17β -estradiol, inyectados con una hora de desfase, produjo un aumento del edema en el estroma profundo (RNG), cuantificado a las 6 horas post-exposición. Por otra parte, el mismo extracto no mostró diferencias estadísticamente significativas, en la inducción de hipertrofia en el miometrio circular (RG), en comparación con el control negativo (suero salino o fisiológico). Esto nos permite deducir, que hubo disociación de respuestas estrogénicas mediadas por el extracto 81a, puesto que, aumentó el edema sin aumento en la hipertrofia, cambios que se observan en conjunto, en respuesta normal a la exposición a 17β -estradiol.

Para comprender las razones por las cuales se produce este efecto diferencial en las respuestas, debemos analizar por separado cada condición y con esto proponer algunos mecanismos que pudieran explicar cada suceso.

Edema.

- El edema uterino inducido por el estrógeno se ha correlacionado, entre otros factores, con la presencia de eosinófilos en el útero y su degranulación en estos tejidos. La migración de éstos al útero, en presencia de estrógenos, ha sido reportada en la literatura como respuesta no-genómica (Tchernitchin A. 1979; Tchernitchin A. y cols., 1989).

El extracto estudiado, no presentó actividad estrogénica significativa por sí solo, ya que no se observó edema uterino en los animales expuestos a él, pero sí potenció el efecto del estradiol incrementando significativamente la generación de edema en los animales expuestos a la asociación extracto y estradiol. Esto podría explicarse por

un aumento de la migración de eosinófilos al útero o bien, por un aumento en la degranulación de los mismos. De acuerdo con lo expuesto anteriormente, el extracto podría provocar un aumento de la degranulación de eosinófilos en otros tejidos, además del uterino, pero es necesario exponer a los eosinófilos a estradiol para producir su migración al útero y así observar su degranulación potenciada por el extracto. Finalmente los compuestos liberados por los eosinófilos tras la degranulación, producen una degradación de la matriz extracelular, favoreciendo la difusión de agua a los diferentes estratos uterinos, gracias al aumento de gradiente osmótica, aumentando el edema.

- Otro probable mecanismo que explicaría la potenciación del edema producido por la asociación estradiol y extracto, sería la participación del óxido nítrico (NO) potente vasodilatador, que actuaría aumentando el edema uterino al provocar la relajación de la musculatura lisa de los vasos uterinos, con el consiguiente aumento de permeabilidad vascular (Chaves y cols., 1993). De esta forma, el extracto podría producir precursores de NO, tales como L-arginina, el cual se transformaría en NO tras la exposición a estradiol.
- Otros autores han descrito el aumento de la expresión de aquaporinas - familia de proteínas que se constituyen como canales de agua - en los distintos tejidos uterinos como respuesta a la estimulación con estradiol (Hildenbrand y cols., 2006), traducándose finalmente, la presencia de ellas, en un aumento del edema. Una posible explicación para esto, es que la presencia de aquaporinas facilite el ingreso de algún componente del extracto para su posterior interacción con algún receptor citosólico-nuclear y de esta forma potenciar el edema, por ejemplo, a través del aumento de expresión de aquaporinas.

- Pueden existir algunos compuestos que se expresan al ser expuestos a estradiol y que el extracto provoque un aumento de esta expresión. Estos compuestos pueden ser activados después de alcanzar una concentración y/o potencia determinada por estradiol y que el extracto no sería capaz de activar, debido probablemente a su baja potencia estrogénica.
- Algunos de estos mecanismos pueden ser validados al revisar los datos obtenidos en el laboratorio, en forma conjunta para eosinofilia uterina (RNG) en las mismas condiciones experimentales y además revisar los datos obtenidos en investigaciones anteriores (Tchernitchin A. 1979; Tchernitchin A. y cols., 1989).
- Para los resultados producidos por estradiol, se observó iguales respuestas descritas en investigaciones anteriores (Leyton y Medina., LEEPA 2007), donde estradiol presenta una RNG de rápido comienzo y que se traducen en un aumento del edema en el tejido uterino. Estas respuestas son significativas en todos los estratos analizados al compararlas con el control negativo.

Hipertrofia.

Los resultados obtenidos para el proceso hipertrófico en el miometrio circular demuestran, para el extracto vegetal, una respuesta genómica similar a la del control negativo (0% de respuesta), lo que indica que el extracto no tiene efecto estrogénico genómico en este estrato uterino.

Al exponer a los animales a la asociación extracto - estradiol, no se observaron diferencias significativas en comparación con la respuesta producida por estradiol en cuanto a hipertrofia celular del miometrio circular (a 6 y 24 horas post-exposición), lo que corrobora, la ausencia de respuestas de tipo genómicas para este extracto.

Los grupos expuestos a estradiol entregan iguales respuestas a las observadas en investigaciones previas, donde el aumento de la hipertrofia celular (RG) se desarrolla con un mayor tiempo de latencia, comparada con edema uterino (RNG), siendo cuantificables en su totalidad a las 24 horas post-exposición a estradiol. Por lo tanto, el modelo experimental empleado en este estudio reproduce, adecuadamente, los efectos característicos y conocidos que se atribuyen a los estrógenos, validando de esta forma los datos observados hace décadas (Jensen y De Sombre, 1972).

Del análisis de cada variable inferimos entonces, que nuestro extracto interfiere con el edema uterino, por lo que puede ser extrapolado a condiciones fisiológicas donde el edema endometrial juega un rol fundamental en la anidación del blastocisto, permitiendo una implantación adecuada, así como también, en la mantención de la vitalidad de los tejidos del sistema genital femenino. Podría ser entonces, el extracto, una herramienta útil en procesos reproductivos de mujeres con alteraciones de la fertilidad.

Otra posible proyección es la utilización de los compuestos presentes en nuestro extracto, que presenten respuestas estrogénicas, en mujeres climatéricas que sufran de atrofia genito-urinaria, ya que el extracto podría potenciar los efectos de las pequeñas cantidades de estrógenos séricos circulantes, impidiendo procesos degenerativos sobre el aparato genital femenino que afecten e incomoden la vida sexual femenina.

Queda clara la necesidad de profundizar en la caracterización de los posibles fitoestrógenos que presente este extracto, sus mecanismos propuestos y sus proyecciones farmacológicas y terapéuticas, para posteriormente ser utilizados en patologías ginecológicas, como alternativas terapéuticas libres de efectos colaterales.

Identificación y Cuantificación a través de HPLC para Extracto.

Los resultados de estos análisis, no muestran concentraciones significativas (sobre 100ng/mL) de genisteína y daidzeína. Sí se detectó la presencia de genistina, a concentraciones de ± 1 ug/mL en el extracto 81a, pero por su carácter de glicósido de la molécula activa (genisteína), no es posible atribuir estrictamente el aumento del edema en el estroma profundo a ella. Existe la posibilidad de que existiesen en el extracto, algún(os) otro(s) compuesto(s) que estaría(n) ejerciendo actividad estrogénica.

Finalmente analizando otras variables y analizando además los diferentes tipos de repuestas estrogénicas en órganos blanco de estas hormonas, para el caso del análisis histológico de los tejidos, y la identificación, a través de HPLC, para el extracto de otros fitoestrógenos descritos (cumestanos y/o lignanos), serian útiles para reproducir los efectos producidos por el extracto que se observaron en este trabajo. Se hace necesario identificar cual es o son los compuestos responsables de las respuestas observadas.

XI. CONCLUSIÓN

Se concluye finalmente de los datos obtenidos, que el extracto 81a al ser administrado en forma aguda, produce una potenciación de efecto estrogénico de tipo no-genómico, como es el edema endometrial. Este efecto se manifiesta al observar un aumento del edema post-administración de la asociación extracto y estradiol. Hemos propuesto posibles explicaciones para el efecto potenciador del extracto, las que deberían ser evaluadas en trabajos sucesivos.

El extracto 81a no produce efecto significativo, sobre la hipertrofia celular, en ninguna de las condiciones experimentales.

De acuerdo con lo expuesto anteriormente, hemos obtenido una disociación de las respuestas estrogénicas con el extracto 81a, lo que nos sugiere una actividad de tipo SERMs, de alguno de los componentes de este extracto.

Es necesario entonces, por un lado, determinar y/o identificar cual es el componente de este extracto que ejerce esta actividad de tipo SERM, y por otro lado, analizar los efectos de este extracto sobre otras respuestas estrogénicas no solo en el sistema genital femenino sino también en todos los tejidos blancos de este tipo de hormonas.

Tomando la información etno-botánica de la planta nativa que fue analizada, se puede concluir que la utilización de ésta, tiene una base experimental, en relación a su actividad estrogénica y no solo una base empírica, lo que valida a este conocimiento etno-medicinal como fuente de información para la obtención de nuevos principios activos.

XII. REFERENCIAS

- ADLERCREUTZ H. Western diet and western diseases: some hormonal and biochemical mechanism and associations. Scand J Clin Lab Invest. 50(Suppl 210):3-23. 1990.
- ALLEN E, DOISY EA. An ovarian hormone. Preliminary report on its localization, extraction and purification, and action in test animals. JAMA 81;819-821. 1923.
- ALONSO R., Jorge. Tratado de Fitomedicina. Bases clínicas y farmacológicas. ISIS Ed. Argentina: 17-35, 124. 1998.
- ALVAREZ Coya, Ricardo Andrés. 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, 2001.
- ARJMANDI HB., KHALIL DA., SMITH BJ., LUCAS EA., JUMA S, PAYTON ME, WILD RA. Soy protein has a greater effect on bone in postmenopausal women not on hormone replacement therapy, as evidenced by reducing bone resorption and urinary calcium excretion. J Clin Endocrinol Metab 88: 1048-1054. 2003.
- BEATO, M. KLUG, J. Steroid hormones receptor: an update. Hum Report Update 81: 240-251. 2000.
- BENNETTS HW, UNDERWOOD EJ, SHUIER FL. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. Aust Vet J. 22;2-12. 1946.
- BENVENUTO R., GARAY J. Los fitoestrógenos: ¿alternativa a la THR en el climaterio?. Fronteras en Obstetricia y Ginecología 2(1): 49-60. 2002.
- BERNE, Robert M. y Levy, Matthew N. Fisiología. 2º ed. Madrid, Harcourt Brace, pp 697-717. 1999.
- BONNIE J., KORACH, Deroo and Kenneth S. Estrogen receptors and human disease. The Journal of Clinical Investigation 116(3): 561–570, March 1 2006.
- BRYANT, M. y cols. Effect of consumption of soy isoflavones on behavioural, somatic and affective symptoms in women with premenstrual syndrome. Br. J. Nutr 93(5); 731-739. 2005.
- BRUNETON, Jean. Farmacognosia. Fitoquímica plantas medicinales. 2ª ed. Zaragoza, Acribia, 2001. pp 343-347.
- CARERI M, Elviri L y MANGIA A. Validation of a High-Performance Liquid Chromatographic Method for Determination of Isoflavonoids in Soybeans. Study of the Extraction Procedure by Experimental Design. Chromatographia 54: 45-50. 2001.
- CASSIDY, A. y cols. Critical review of health effects of soyabean phytoestrogens in post-menopausal women. Proc Nutr Soc 65(1); 76-92. 2006.
- CHAVES M., RIBEIRO R., RAO V. possible involvement of nitric oxide in estrogen-induced uterine edema in the immature rat. Braz J Med Biol Res 26: 853-857. 1993.
- CHEVIACOFF S., LEONTIC E. Ovarios en endocrinología y metabolismo. Pumarino, H.2 Edición. Santiago Andrés Bello, 667-771. 1984.
- CORNWELL T., COHICK W., RASKIN I. Dietary phytoestrogens and health. Phytochemistry 65; 995-1016. 2004.
- COTTERCHIO M., y cols. Dietary Phytoestrogen Intake Is Associated with Reduced Colorectal Cancer Risk. J Nutr 136(12): 3046–3053. 2006 December.

- ERDMAN JW Jr. AHA Science Advisory: Soy protein and cardiovascular disease: A statement for of the AHA. *Circulation* 102: 2555-2559. 2000.
- FALKENSTEIN, E., TILLMAN H., MICHAEL C., FEURING M., WEHLING M., Multiple actions of steroid Hormones-A focus on rapid, non genomic effects. *Pharmacological Review*. 52: 513-555. 2000.
- FARMAKADILIS. J; HATCOOK, MURPHY, P. Oestrogenic potency of genistin and daidzin in mice. *Fd chem. Toxic* 23; 741-745. 1984.
- GARRIDO G. Argelia, y cols. Potencial health benefits of phytoestrogens. *Rev. Med Chile* 131: 1321-1328. 2003.
- GIEMBYCZ Mark A., LINDSAY Mark A. Pharmacology of the Eosinophil. *Pharmacological Reviews* 51(2), 213-340, June 1999.
- GREEN S. y cols. Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression and homology to v-erb-A. *Nature* 320: 134-139. 1986.
- GREENE GL. y cols. Sequence and expression of human estrogen receptor complementary DNA. *Science* 231: 1150-1154, 1986.
- GRODIN JM., SITERI PK., MAC DONALD PC. Sources of estrogen production in post-menopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 36: 207-214, 1973.
- GRUBER J.G. y cols. Production and Actions of Estrogens. *N Engl J Med* 346(5). January 31, 2002.
- GRUNERT G, PORCIA M, TCHERNITCHIN AN. Differential potency of oestradiol-17 β and diethylstilboestrol on seprated groups of responses in the rat uterus. *J. Endocrinol* 110, 103-114. 1986
- GUYTON, Arthur C. y Hall, John E. Tratado de Fisiologia medica. 11° ed. Madrid, Elsevier, 2006. Cap. 81, pp 1011-1025.
- HALL M., Julie, COURSE F., John, KORACH S., Kenneth. The Multifaceted Mechanisms of Estradiol and Estrogen Receptor Signaling. *The Journal of Biological Chemistry* 276(40): 36869-36872, 2001.
- HAYA, J., CAMIL CASTELO-BRANCO, C., PÉREZ-MEDINA, T. Fitoestrógenos: conocimientos básicos y utilidad clínica. *Toko-Gin Pract.* 61(6):337-363. 2002.
- HILDENBRAND A. y cols. Expression of aquaporin 2 in human endometrium. *Fertil Steril* 86(5):1452-8. 2006.
- HWANG, C.S. y cols. Isoflavone metabolites and their in vitro dual functions: they can act as an estrogenic agonist or antagonist depending on the estrogen concentration.. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 101 (4-5); 246-253. 2006.
- Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación con las consecuencias asociadas al consumo de isoflavonas. Andreu Palou Oliver (Coordinador). Ministerio Español de Sanidad y Consumo 27/02/2007.
- JENSEN EV., DESOMBRE ER. Mechanism of action of the sex hormones. *Annu Rev. Biochem.* 41: 203-223. 1972.
- KASPER L., DENIS y cols. HARRISON Principios de Medicina Interna. 16° Ed. Online. XIV (327): 11608-11622, 11567-11578.
- KELLY, G.E., JOANNOU, A.Y., REEDER, C.N. y WARING, M.A. The variable metabolic response to dietary isoflavones in humans. *Proc Soc Exp Biol Med.* 208: 40-43. 1995.
- KHAODHIAR, L. y cols. Daidzein-rich isoflavone aglycones are potentially effective in reducing hot flashes in menopausal women. *Menopause* 15(1):125-32. 2008.
- KUIPER GG, y cols. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 5925-5930, 1996.

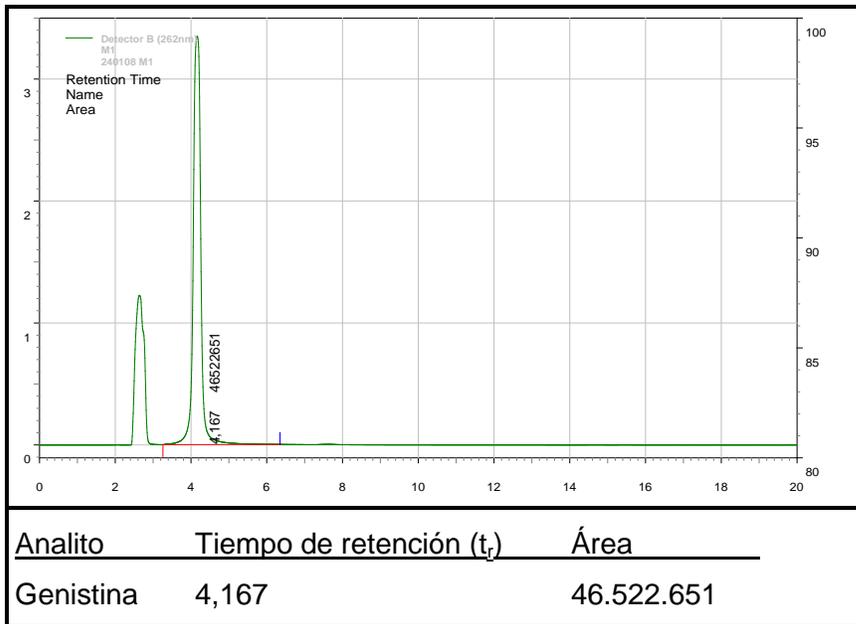
- KREBS, E.E. y cols. Phytoestrogens for treatment of menopausal symptoms: a systematic review. *Obstet. Gynecol.*, vol 104 (4), pp: 824-836. 2004.
- KIM H.P. y cols. Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor a localized in caveolae. *Biochem Biophys Res Commun* 263:257-62. 1999.
- KUMAR NB, CANTOR A, AILEN K, RICARDI D, COX CE. The specific role of isoflavones on estrogen metabolism in premenopausal women. *Cancer* 94 (4): 116-34. Feb 2002.
- LASTRA Peñaloza, Diego Guillermo. Efectos de fitoestrógenos en útero de rata y potenciales aplicaciones terapéuticas respuestas estrogénicas no-genómicas. Memoria (Título de Químico Farmacéutico). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2001.
- LEOPOLD AS, ERWIN M, OH J, BROWNING B. Phytoestrogens: adverse effects on reproduction in California quail. *Science* 191: 98-100. 1976.
- LEYTON N.T. y MEDINA T.G. Exposición prenatal a cadmio y sus efectos diferidos en el útero de rata durante la edad pre-puberal. Tesis para optar al Título Profesional de Matrona. Santiago, Chile 2007. Universidad De Chile. Facultad De Medicina Norte. Escuela de Obstetricia y Puericultura.
- LIN, J.Y. y cols. Topical isoflavones provide effective photoprotection to skin. *Photodermatol Photoimmunol Photomed* 24(2):61-6. 2008 Apr.
- LOEWE S, LANGE F, SPOHR E. Uber weiliche sexual hormone (Thelytropine). *Biochem Zeitschr* 180:1-26. 1927.
- MESSINA M. Soy intake and cancer risk: a review of the in Vitro and in vivo data. *Nutr Cancer*. 21:113-131. 1994.
- MONTALBÁN, E. Isoflavonas y riesgo cardiovascular en la menopausia. *Ginecol. Obstet. Clín.* 6 (4); 221-229. 2005.
- MORABITO, N. y cols. Effect of genistein and hormone-replacement therapy on bone loss in early post-menopausal women: a randomized double-blind placebo-controlled study. *J. Bone Miner. Res.* 17, 1904-1912. 2002.
- MOUTSATSOU P. The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge is expanding. *HORMONES* 6(3):173-193. 2007.
- NILSSON S. y cols. Mechanisms of Estrogen Action. *Physiological Reviews*, 81(4), pp. 1535-1565, October 2001.
- MURKIES AL, WILCOX G, DAVIS SR. Clinical review 92: Phytoestrogens. *J Clin Endocrinol Metab* ;83:297-303. 1998.
- NAVARRO MOLL, M^a. C. Mecanismo de acción de las isoflavonas. *Ginecol. Obstet. Clín* 6(3); 159-165. 2005.
- NELSON, H.D. y cols. Nonhormonal therapies for menopausal hot flashes: systematic review and meta-analysis. *JAMA*, vol 295(17), pp: 2057-71. 2006.
- WASAKI M. y cols. Plasma isoflavone level and subsequent risk of breast cancer among Japanese women: a nested case-control study from the Japan Public Health Center-based prospective study group. *J Clin Oncol.* 26(10):1677-83. Epub 2008.
- RASCHKE, M., WAHALA, K., BEATRICE, L. Reduced isoflavone metabolites formed by the human gut microflora suppress growth but do not affect DNA integrity of human prostate cancer cells. *Br. J. Nutr.* 96(3); 426-434. 2006.
- RIMOLDI G., CHRISTOFFEL J., SEIDLOVA-WUTTKE D., JARRY H., WUTTKE W. Effects of chronic genistein treatment in mammary gland, uterus and vagina. *Environmental Health Perspectives*. 115: supplement 1. December 2007.

- SIMONCINI, T. y cols. Effects of phytoestrogens derived from red clover on atherogenic adhesion molecules in human endothelial cells. Menopause 15(3):542-550. 2008 May-Jun.
- TAUCHER, Erika. Bioestadística. 2º Ed. Editorial Unievrstaria. Chile. Cap. 18-19.
- TCHERNITCHIN, Andrei N. Histología. 1ª ed. Santiago , Chile, Mediterraneo, 1995. pp 425-440.
- TCHERNITCHIN A. Autoradiografic study of (6,7)-3H oestradiol-17 β incorporation into rat uterus. Steroids. 10: 661-668. 1967.
- TCHERNITCHIN AN. Fine structure of rat uterine eosinophils and the possible role of eosinophils in the mechanism of estrogen action. J. Steroid Biochem. 4. 277-282. 1973.
- TCHERNITCHIN A. y cols. Dramatic early increase in uterine eosinophils after oestrogen administration. Nature 248(444):142-143. Mar 8, 1974.
- TCHERNITCHIN A., TCHERNITCHIN X. Characterization of the estrogen receptors in the uterine and blood eosinophil leukocytes. Experientia. 32: 1240-1242. 1976a.
- TCHERNITCHIN A., The role of eosinophil receptors in the non-genomic responde to oestrogens in the uterus. Journal of Steroid Biochemistry. 11: 417-424, 1979.
- TCHERNITCHIN, A. N; GALAND, P. Oestrogen levels in the blood, not in uterus determine uterine eosinophilia and edema. J. Endocrinol. 99:123-130. 1983.
- TCHERNITCHIN AN., MENA MA., RODRIGUEZ A., MATURANA M. 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. Vol 1. Experimental Systems, Pertschuk LP, Lee SH, Eds. CRC Press, Boca Raton, Florida, U.S.A., pp. 5-37. 1985b
- TCHERNIRCHIN AN., MENA MA., SOTO J., UNDA C. The role of eosinophils in the action of estrogens and other hormones. Med Sci Res. 17: 5-10. 1989
- TCHERNITCHIN A., KATTAN F., TCHERNITCHIN N. Dose-response of estradiol 17- β on uterine luminal and glandular epithelial hypertrophy, evaluated morfophometrically. Med Sci Res. 23: 81-83. 1995.
- TCHERNITCHIN y cols. ¿Es posible encontrar un fitoestrógeno para la terapia de reemplazo hormonal, que disminuya el riesgo de cáncer?. Cuadernos Médicos Sociales. 46 (3): 205 – 211. 2007.
- USUI Takeshi. Pharmaceutical Prospects of Phytoestrogens. Endocrine Journal 2006, 53(1); 7-20.
- XIAO, C.W., WOOD, C., GILANI, G.S. Nuclear receptors: potential biomarkers for assessing physiological functions of soy proteins and phytoestrogens. J. AOAC Int. 89(4); 1207-1214. 2006.
- http://www.nhlbi.nih.gov/health/women/q_a.htm (Estudio on-line Women's Health Initiative (07-02-2008).
- <http://www.whi.org/> (12-12-2007).
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Revisión constante de literatura publicada. (mayo/2007- junio/2008).
- http://www.cdc.gov/nchs/data/nvsr/nvsr48/nvs48_11.pdf. Murphy SL., y cols (14/06/2008).

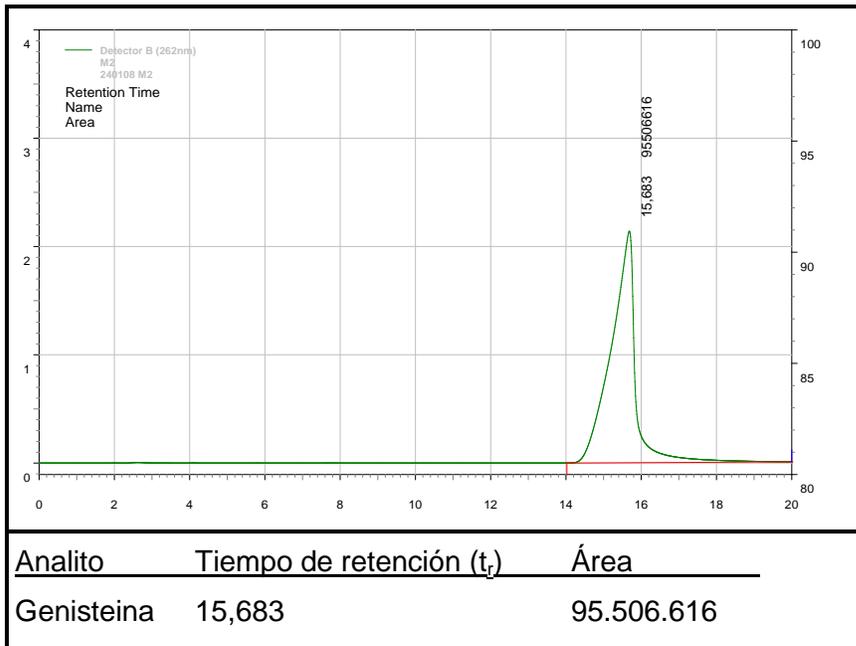
XIII. ANEXOS

13.1.- Perfiles cromatográficos para estándares.

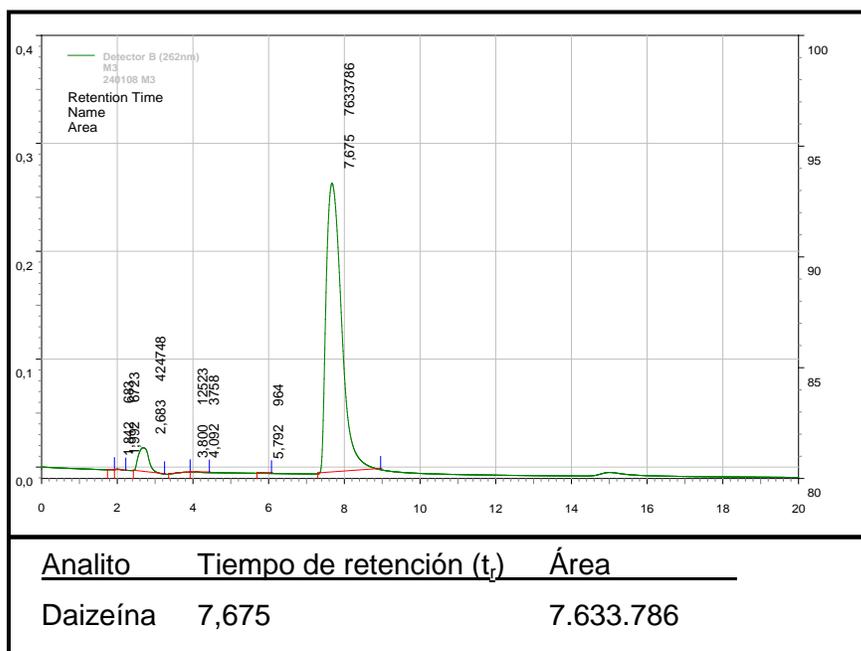
A) GENISTINA, 750 µg/mL



B) GENISTEINA, 750 µg/mL



C) DAIDZEÍNA, 100 µg/mL



13.2.- Tablas numérica de datos histológicos.

Las siguientes tablas entregan los datos obtenidos mediante el análisis histológicos de los cortes uterinos de ratas pre-púberes, dividida cada tabla según la condición experimental inyectada a cada grupo de ratas y según el tiempo post-administración de las condiciones.

Abreviaturas: ES: estroma superficial, EP: estroma profundo, MC: miometrio circular, VRDC: valor recíproco de densidad celular (1/N° de núcleos), X: promedio geométrico, DS: desviación estándar, SEM: error estándar de la media, E: 17β-estradiol, 81a: extracto alcohólico de planta analizado, 81aE: extracto vegetal + 17β-estradiol, SS: solución de NaCl 0,9%.

- Tabla de administración de 17β-estradiol, úteros extirpados a las 6 horas.

Condición Exper.	E6	ES N° de núcleos	ES VRDC	ES cel/área	EP N° de núcleos	EP VRDC	EP cel/área	MC N° de núcleos	ES VRDC	ES cel/área
E6	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	X	30,47	0,034583636	36,46	22,58	0,04908474	51,74	34,21	0,029734732	31,35
	DS	8,23	0,007427989	7,83	8,84	0,014180434	14,95	4,96	0,0039123	4,12
	SEM	2,6	0,002348937	2,48	2,79	0,004484247	4,73	1,57	0,001237178	1,3

- Tabla de administración de extracto vegetal 81a, úteros extirpados a las 6 horas.

Condición Exper.	81a6	ES N° de núcleos	ES VRDC	ES cel/área	EP N° de núcleos	EP VRDC	EP cel/área	MC N° de núcleos	ES VRDC	ES cel/área
81a6	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	X	39,76	0,025780931	27,18	32,92	0,031741217	33,46	38,98	0,02590565	27,31
	DS	6,62	0,004156972	4,38	7,06	0,007043868	7,43	4,11	0,002616838	2,76
	SEM	1,91	0,001200014	1,27	2,04	0,00203339	2,14	1,19	0,000755416	0,79

- Tabla de administración de extracto 81a y 17β-estradiol, úteros extirpados a las 6 horas.

Condición Exper.	81aE6	ES N° de núcleos	ES VRDC	ES cel/área	EP N° de núcleos	EP VRDC	EP cel/área	MC N° de núcleos	ES VRDC	ES cel/área
81aE6	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	X	26,78	0,037590716	39,63	17,06	0,059928416	63,18	32,71	0,030768859	32,44
	DS	2,33	0,003252475	3,43	2,83	0,008788911	9,27	2,67	0,002635985	2,78
	SEM	0,74	0,001028523	1,083	0,89	0,002779298	2,93	0,84	0,000833572	0,88

- Tabla de administración de 17β-estradiol, úteros extirpados a las 24 horas.

Condición Exper.	E24	ES N° de núcleos	ES VRDC	ES cel/área	EP N° de núcleos	EP VRDC	EP cel/área	MC N° de núcleos	ES VRDC	ES cel/área
E24	N	11	11	11	11	11	11	11	11	11
	X	24,74	0,041068431	43,29	19,24	0,053093245	55,97	27,33	0,0368593	38,86
	DS	3,26	0,005468602	5,76	2,87	0,008402456	8,86	2,44	0,003395919	3,58
	SEM	0,98	0,001648845	1,74	0,87	0,002533436	2,67	0,73	0,001023908	1,08

- Tabla de administración de extracto vegetal 81a, úteros extirpados a las 24 horas.

Condición Exper.	81a24	ES N° de núcleos	ES VRDC	ES cel/área	EP N° de núcleos	EP VRDC	EP cel/área	MC N° de núcleos	ES VRDC	ES cel/área
81a24	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10
	X	33,94	0,0297951	31,41	27,98	0,036406661	38,38	40,09	0,025124148	26,49
	DS	3,63	0,003513355	3,7	3,55	0,005872708	6,19	3,53	0,002292646	2,42
	SEM	1,15	0,001111102	1,17	1,12	0,001857113	1,96	1,12	0,000724998	0,76

- Tabla de administración de extracto 81a y 17β-estradiol, úteros extirpados a las 24 horas.

Condición Exper.	81aE24	ES N° de núcleos	ES VRDC	ES cel/área	EP N° de núcleos	EP VRDC	EP cel/área	MC N° de núcleos	ES VRDC	ES cel/área
81aE24	N	12	12	12	12	12	12	12	12	12
	X	26,64	0,038440225	40,52	21,52	0,047597066	50,18	29,33	0,034683059	36,56
	DS	3,85	0,00681907	7,19	3,17	0,008445481	8,9	3,66	0,005121035	5,4
	SEM	1,11	0,001968496	2,08	0,92	0,002438	2,57	1,06	0,001478315	1,56

- Tabla de administración de solución de NaCl 0,9% (control negativo), úteros extirpados a 6 y 24 horas.

Condición Exper.	SS	ES N° de núcleos	ES VRDC	ES cel/área	EP N° de núcleos	EP VRDC	EP cel/área	MC N° de núcleos	ES VRDC	ES cel/área
SS	n	19	19	19	19	19	19	19	19	19
	X	39,01	0,026759258	28,21	32,08	0,033693859	35,52	40,49	0,025455444	26,83
	DS	8,34	0,005664866	5,97	8,85	0,01013519	10,68	6,94	0,004719459	4,98
	SEM	1,91	0,001299609	1,37	2,03	0,002325172	2,45	1,59	0,001082718	1,14