



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. Sede Norte

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

Directores de Memoria
Dr. Andrei Tchernitchin V.
BQ. Leonardo Gaete G.
Programa de Fisiopatología.
LEEPA. Facultad de Medicina.
Universidad de Chile.

DISOCIACIÓN DE RESPUESTAS ESTROGÉNICAS EN PRESENCIA DE UN EXTRACTO ALCOHÓLICO DE PLANTA CHILENA, EVALUADAS EN ÚTERO DE RATA PRE-PÚBER

**Memoria para optar al Título Profesional de Químico
Farmacéutico**

ALEXIS IGOR CEPEDA VALENCIA

Santiago, Chile. 2008

AGRADECIMIENTOS

En primera instancia deseo agradecer a la Universidad de Chile, en especial a la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas por ser mi segundo hogar durante los últimos años y haberme formado como un profesional íntegro, también quiero agradecer a la Facultad de Medicina por proporcionarme los medios para desarrollar la presente tesis.

Agradezco a mi profesor tutor el Sr. QF. Igor Lemus por sus magistrales clases durante mi carrera y por su permanente preocupación en el desarrollo de mi tesis, mis gratitudes también los son para mis profesores directores de tesis, el Sr. Dr. Andrei Tchernitchin y el Sr. BQ. Leonardo Gaete, por que junto al docente el Sr. Dr. Rodrigo Bustamante fueron un constante apoyo en la ejecución de esta investigación.

Mi agradecimiento también está dirigido al personal para-docente del Laboratorio de Endocrinología Experimental y Patología Ambiental del Programa de Fisiopatología de la Universidad de Chile, al igual que a mis compañeros de investigación del mismo laboratorio.

Gracias a mi familia, amigos y compañeros por su incondicional apoyo y ayuda.

Deseo agradecer de manera especial a mi motivación permanente y alegría constante, la Srta. Sofía Cepeda, mi hija.

ÍNDICE

	Página
INTRODUCCION.....	1
CAPÍTULO I	
MARCO TEORICO.....	4
Fitoestrógenos.....	4
Clasificación y metabolismo de la mayoría de los fitoestrógenos.....	5
Receptores de fitoestrógenos.....	7
Potencia y efectos biológicos.....	7
Actividad estrogénica y antiestrogénica.....	8
Mujer premenopáusica.....	8
Mujer posmenopáusica.....	9
Fitoestrógenos y sistema óseo.....	10
Fitoestrógenos y protección en cáncer.....	10
Fitoestrógenos y el sistema cardiovascular.....	12
Efecto de los estrógenos.....	13
Estrógenos endógenos.....	13
Receptores de estrógenos.....	15
Metabolismo de estrógenos.....	16
Circulación enterohepática.....	16
Efecto de primer paso.....	17
Estrógenos y terapia de reemplazo hormonal (TRH).....	17
Estrógenos en el útero.....	19
CAPÍTULO II	
HIPÓTESIS.....	21
OBEJETIVO GENERAL.....	21
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	21
CAPÍTULO III	
MATODOLOGÍA DE TRABAJO.....	22
Diseño del estudio.....	22
Muestreo.....	22
Población estudiada.....	22
Equipos.....	22
Instrumentos.....	23
Reactivos.....	23
Caracterización y preparación del extracto estudiado.....	23
Procedimiento.....	24
Justificación de la edad de las ratas.....	26

PARÁMETROS DE EVALUACIÓN.....	26
Recuento del número de eosinófilos en los distintos estratos uterinos.....	26
Degranulación de eosinófilos uterinos.....	26
Recuento del número de células en mitosis.....	27
DETERMINACIÓN CUANTITATIVA Y CUALITATIVAMENTE DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO.....	27
Objetivo.....	27
Equipo.....	27
Reactivos.....	28
Metodología.....	28
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	29
CAPÍTULO IV	
RESULTADOS.....	30
Eosinófilos localizados en útero.....	30
Células en mitosis localizadas en útero.....	31
Eosinófilos localizados en distintos estratos uterinos.....	33
Eosinófilos uterinos degranulados e intactos.....	34
Análisis del extracto alcohólico vegetal.....	34
DISCUSIÓN.....	36
CONCLUSIÓN.....	40
REFERENCIAS.....	41
ANEXO.....	47
Anexo 1: Fotografías del procedimiento.....	47
Anexo 2: Perfiles cromatográficos de estándares utilizados.....	49
Anexo 3: Tablas con los datos obtenidos en el recuento de eosinófilos y de células en mitosis.....	50

RESUMEN

Gran relevancia durante las últimas décadas han tenido los productos derivados de vegetales, esto por su fácil acceso y los grandes beneficios para la población que algunos tendrían. Dentro de este grupo de sustancias uno de los más destacados es el de los fitoestrógenos, compuestos que por sus características moleculares similares a los estrógenos endógenos inducen respuestas biológicas que imitan o modulan la actividad estrogénica.

Sabido es que mujeres orientales consumen en su dieta grandes cantidades de soya, alimento con una alta concentración de fitoestrógenos, esto les proporciona menores complicaciones en el periodo de pre y post menopausia. Esta respuesta a los fitoestrógenos es de importancia si se considera que en la etapa posmenopáusica se necesita reemplazar el estradiol prácticamente ausente. De esta forma nace la inquietud de encontrar compuestos, como los fitoestrógenos, que puedan ser utilizados en las terapias de reemplazo hormonal, pero que no presenten los perjudiciales efectos secundarios que producen las terapias actuales.

En base a esto, el presente estudio investigó la posible actividad fitoestrógenica de un extracto alcohólico vegetal nativo, para ello se consideró las potenciales respuestas estrogénicas genómicas (mitosis) y no genómicas (eosinofilia) del extracto en estudio en útero de rata pre-púber, estas fueron comparadas con las respuestas generadas por el 17β -estradiol bajo las mismas condiciones. El extracto alcohólico vegetal generó un aumento en la eosinofilia uterina y una disminución de la mitosis uterina en miometrio circular, datos de interés que quedan expuestos para futuras investigaciones y proyecciones sobre los potenciales beneficios que pudiese desarrollar esta planta.

SUMMARY

DISSOCIATION OF RESPONSES TO ESTROGEN UNDER THE EFFECT OF A CHILEAN PLANT EXTRACT, IN THE PREPUBERTAL RAT UTERUS

In recent decades, products derived from plants have received great attention in part for its easy accessibility and potential benefits that its consumption could report to human health. Within this group of substances one of the most outstanding is that of phytoestrogens, which are structurally similar to endogenous estrogen and thereby induces biological responses that mimic estrogen or modulates its activity.

Estrogens, produced in the ovaries and testis, have many biological effects in the body beyond the reproductive system. It is well known that Eastern women consume large amounts of soy products, which have high concentrations of phytoestrogens, mainly isoflavones. It was speculated that they might be responsible for the "Japanese Phenomenon". Women in fear of diseases related to postmenopausal estrogen deficiency such as osteoporosis or arteriosclerosis could also receive the benefits of phytoestrogen's consumption.

The estrogen receptors (ER) are localized in the nucleus and form dimers when bound to an estrogen. The dimers then interact with the estrogen response element (ERE), which regulates transcription of estrogen responsive genes, this is known as the genomic response. A small percentage of ER are located on the cell membrane and contribute to non genomic effects of estrogen.

In this study, the possible estrogen like's activity of a native plant extract was evaluated, analyzing a genomic (mitosis) and a non-genomic (eosinophilia) response by using the pre-pubertal rat uterus model. These two responses were compared with those generated by 17- β estradiol under the same conditions. The plant extract generated an increase in uterine eosinophilia and a decrease of mitosis in the circular myometrium induced by 17- β estradiol, data of interest that are exposed to future research and projections on the potential benefits that could develop this plant.

INTRODUCCIÓN

El interés en la fisiología y el rol farmacológico de compuestos bioactivos presentes en plantas ha incrementado notablemente sobre las últimas décadas (Usui, 2006). La importancia de una dieta basada en vegetales es evidente, actualmente las recientes recomendaciones dietarias enfatizan un incremento en la proporción y en la variedad de frutas y verduras que deberían ser consumidas.

Aunque la interpretación del rol de los componentes individuales de la dieta es difícil desde el punto de vista de estudios epidemiológicos y dietarios, es reconocido que hay muchos compuestos que no son nutrientes, pero que son bioactivos y derivados de plantas que pueden conferir importantes beneficios para la salud (Setchell, 1998).

De particular interés en relación a la salud humana son la clase de compuestos conocidos como fitoestrógenos, los cuales incorporan muchos grupos con características moleculares similares a los estrógenos endógenos (Usui, 2006). La mayor clase de fitoestrógenos de reciente interés, desde la perspectiva nutricional y de salud, son los lignanos y las isoflavonas, ambos ampliamente distribuidos en la naturaleza (Price *et al.*, 1985; Setchell, 1985). Estos fitoestrógenos y sus metabolitos tienen actividad hormonal y no hormonal muy potente, lo cual explicaría algunos de los efectos biológicos de las dietas ricas en fitoestrógenos (Setchell, 1998).

El impacto dietario de los fitoestrógenos en procesos biológicos normales fue conocido por primera vez en ovejas. Observaciones realizadas en ovejas criadas en pastizales ricos en trébol y chitas alimentándose de una dieta alta en soya en zoológicos, sugirieron que flavonoides y fitoquímicos relacionados a los alimentos, pueden afectar la salud de mamíferos (Usui, 2006).

De esta forma, ¿Qué importancia tendría que compuestos, como los fitoestrógenos, tuviesen actividad estrogénica similar?

La importancia de los estrógenos radica en la regulación homeostática de muchos eventos celulares y bioquímicos, esto es bien ilustrado por los cambios fisiopatológicos que ocurren con la deficiencia de éstos (Setchell, 1998). Estos estrógenos endógenos tienen un importante rol no sólo en el eje hipotálamo-hipófisis-gónadas, sino también en varios sistemas no gonadales, como en el sistema cardiovascular, huesos, sistema nervioso central y metabolismo de lípidos.

De hecho, los estrógenos son utilizados para tratar varias enfermedades como síndrome posmenopáusico y osteoporosis. Además, antagonistas estrogénicos son usados para el tratamiento del cáncer de mama. Recientemente los moduladores selectivos para receptores de estrógenos (*selective estrogen receptor modulators, SERMs*) han llegado a estar disponibles para el tratamiento de osteoporosis, enfermedades cardiovasculares y cáncer de mama (Usui, 2006).

Un alto porcentaje de las enfermedades en poblaciones occidentales son dependientes de hormonas, datos epidemiológicos han mostrado una fuerte asociación entre sus incidencias y la dieta (Setchell, 1998). Así, datos indican que la gente en Asia tiene menos fracturas por osteoporosis, menor incidencias de enfermedades cardiovasculares, menos síntomas posmenopáusicos y ciertamente menores tasas de cánceres que las poblaciones occidentales. Estas ventajas de salud son notablemente reducidas cuando asiáticos adoptan un estilo de vida occidental y su hábito alimenticio se hace similar (Adlercreutz *et al.*, 1997).

El uso de estrógenos en la terapia de reemplazo hormonal (TRH) ha sido recientemente cuestionado debido al aumento de la incidencia de cáncer de mama (Beral, 2003; Chlebowsky *et al.*, 2003), enfermedad coronaria, trombosis y tromboembolismo venoso. Debido a lo anterior, la TRH para el tratamiento de mujeres posmenopáusicas ya no es considerada “segura” o “libre de riesgos” (Hickey *et al.*, 2005). Consecuentemente, en varios países se ha reportado la disminución de la prescripción de estrógenos conjugados de equino y progestágenos (Kim *et al.*, 2005; Usher *et al.*, 2006). Lo anterior también puede explicar el aumento en el uso de “terapias naturales” y productos derivados de plantas conteniendo fitoestrógenos.

Es evidente que existiría una relación positiva en el uso de fitoestrógenos en terapias donde se necesitan estrógenos, como por ejemplo en la TRH en mujeres posmenopáusicas, de esta forma sería de gran relevancia dilucidar una alternativa terapéutica con menores efectos adversos que las actuales, por sobre todo los efectos cancerígenos, que pueda ser utilizada en casos como el recién descrito.

En el presente trabajo se estudió una vía alternativa de acción de los estrógenos en útero distinta a la ya conocida, en la cual el esteroide se une al receptor citosólico nuclear, ejerciendo una expresión activadora o represora de genes, que se traduce en un cambio morfológico, bioquímico y funcional (Jensen *et al.*, 1972).

Los efectos producidos por los estrógenos en los tejidos blanco involucran 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 *et al.*, 1983).

La interacción de la hormona con receptores de membrana que se localizan en la superficie de los leucocitos eosinófilos provoca la migración por parte de ellos al espacio extravascular uterino y la degranulación de eosinófilos (Tchernitchin *et al.*, 1985).

Otra acción del estrógeno y eventualmente la de un compuesto con acción agonista es provocar la proliferación de las células que se encuentran en el útero mediante la inducción de mitosis. De esta forma, utilizando el extracto en estudio y un patrón de 17β -estradiol se evaluaron las siguientes respuestas estrogénicas: recuento de eosinófilos, degranulación de eosinófilos y mitosis de células uterinas

CAPÍTULO I

MARCO TEORICO

Fitoestrógenos

Los fitoestrógenos son compuestos de plantas con actividad biológica estrogénica. El uso de ciertas plantas en la medicina tradicional y en el folklore debe ser atribuido a sus propiedades estrogénicas (Price *et al.*, 1985).

Los primeros extractos de plantas fueron reportados por exhibir actividad estrogénica en 1926 (Loewe *et al.*, 1927). Para 1975, cientos de plantas habían sido encontradas con actividad estrogénica o conteniendo compuestos estrogénicamente activos (Farnsworth *et al.*, 1975). En los años 40s se asumió la importancia biológica y económica de los fitoestrógenos, con el brote de infertilidad en ovejas que se alimentaban en pastizales ricos en trébol en el occidente australiano, conocida después como “Enfermedad del Trébol” (Bennetts *et al.*, 1946).

Se han identificado fitoestrógenos en orina de primates (Setchell *et al.*, 1979) y en humana (Axelson *et al.*, 1982; Setchell *et al.*, 1984). Estudios epidemiológicos sugieren que el consumo de una dieta rica en fitoestrógenos, como ha sido tradicional en sociedades asiáticas, se relaciona con un bajo riesgo de la supuesta enfermedad “occidental”, por ejemplo cáncer de mama o próstata y enfermedades cardiovasculares (Adlercreutz, 1990).

La actividad estrogénica ha sido encontrada en compuestos producidos por animales, plantas y microorganismos, así como productos químicos, industrialmente manufacturados y sus productos intermediarios (Duax *et al.*, 1985). Pesticidas e insecticidas, incluyendo DDT, también contienen compuestos con actividad estrogénica y son ahora clasificados como xenoestrógenos (Davis *et al.*, 1995). Poco es conocido de los efectos a largo plazo de los xenoestrógenos, sin embargo hay una preocupación sustancial al mirar sus efectos potencialmente deletéreos (Murkies *et al.*, 1998).

Clasificación y metabolismo de la mayoría de los fitoestrógenos

Los fitoestrógenos pueden ser clasificados en tres grupos: 1) Isoflavonas: encontrados en la soya, lentejas y otras legumbres, los componentes activos principales son la genisteína y la daidzeína; 2) Lignanos: encontrados en linaza y otras semillas aceitosas, los compuestos activos son el enterodiol y la enterolactona, ambos metabolitos originados en la flora bacteriana intestinal; y 3) Cumestanos: encontrados en el trébol rojo, semillas de girasol y brotes de soya, el compuesto activo principal es el cumestrol (Ruggiero *et al.*, 2002) (Fig. 1).

Una sola planta contiene a menudo más de una sola clase de fitoestrógenos. Por ejemplo, el poroto de soya es rico en isoflavonas, mientras que el brote de la soya es una potente fuente de cumestanos (Price *et al.*, 1985). Genisteína y daidzeína comúnmente existen glucosiladas (Axelson *et al.*, 1984). Ellas también son derivadas de precursores, biochanina A y formononetina, cuales son convertidos a genisteína y daidzeína respectivamente, así como secoisolariciresinol y metaresinol son los precursores de enterodiol y enterolactona respectivamente (Adlercreutz, 1990; Setchell *et al.*, 1988). Después la estructura de cada uno es alterada por glucosidasas intestinales (Setchell *et al.*, 1988). Daidzeína es parcialmente metabolizada a equol y O-desmetilangiolensina (O-DMA).

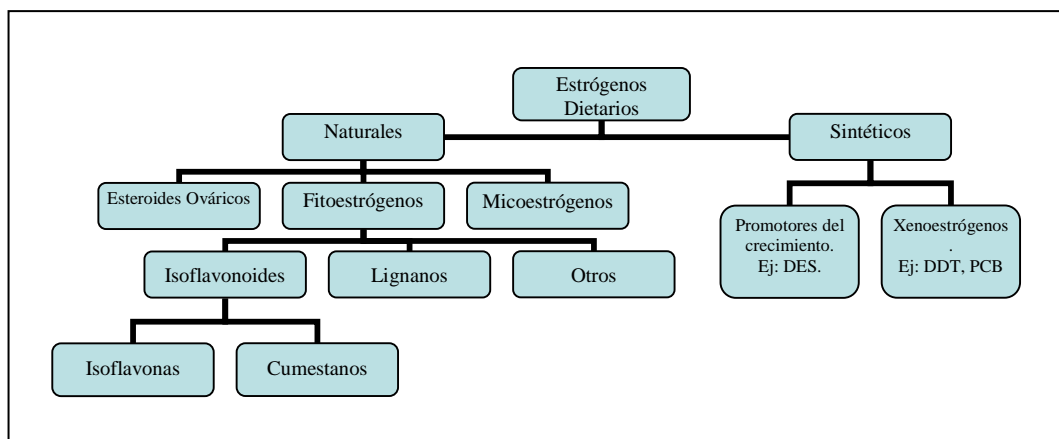


Figura 1: Origen y clasificación de los estrógenos dietarios (Murkies *et al.*, 1998)

En el tracto gastrointestinal de humanos, luego del consumo de lignanos e isoflavonas, se generan reacciones metabólicas mediadas por enzimas, resultando de esto la formación de fenoles heterocíclicos con una gran similitud a la estructura de estrógenos (Setchell *et al.*, 1979) (Fig. 2). Los metabolitos de fitoestrógenos experimentan absorción vía circulación enterohepática y son excretados en la bilis (Axelson *et al.*, 1981). Estos son desconjugados por la flora bacteriana intestinal, reabsorbidos, reconjugados por el hígado y excretados por la orina (Adlercreutz *et al.*, 1986). Lignanos e isoflavonas pueden ser medidos en la orina, plasma, fecas, semen, bilis y leche materna (Adlercreutz *et al.*, 1995). Las concentraciones de los diferentes metabolitos de fitoestrógenos varían ampliamente entre los individuos, incluso cuando una cantidad controlada de isoflavonas o lignanos es administrada como suplemento. El metabolismo de fitoestrógenos dietarios es predominantemente determinado por la flora bacteriana gastrointestinal, uso de antibióticos o enfermedades gástricas (Adlercreutz *et al.*, 1987; Kelly *et al.*, 1995; Kirkman *et al.*, 1995; Setchell *et al.*, 1984).

En particular factores como dietas altamente fibrosas, producto de vegetales y frutas, y la duración de la exposición, ejercen una mayor influencia en el metabolismo de lignanos e isoflavonas (Hutchins *et al.*, 1995; Lu *et al.*, 1996; Tew *et al.*, 1996).

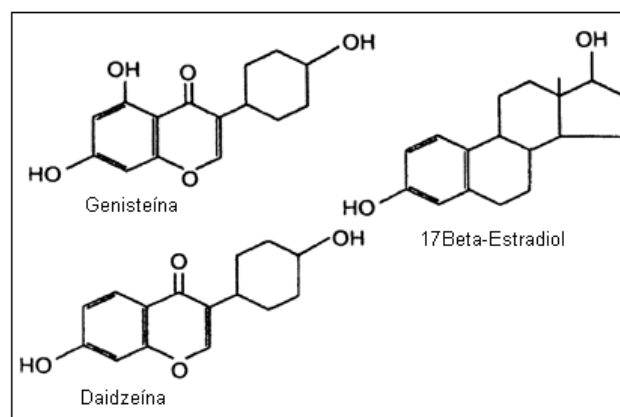


Figura 2: Estructuras químicas de fitoestrógenos comparadas con estradiol.

Receptores de fitoestrógenos

Los fitoestrógenos clásicos, como la genisteína y la daidzeína tienen una mayor afinidad por el receptor de estrógenos (RE) beta que por el receptor alfa. RE β es fuertemente expresado en ovarios, útero, cerebro, vejiga, testículos, próstata y pulmones. La expresión del RE β parece ser en sitios diferentes al cerebro, no así el RE α (Kuiper *et al.*, 1997). Por otra parte, el RE β es también expresado en huesos y sistema cardiovascular (Makela *et al.*, 1999). Aunque el significado fisiológico del RE β no es completamente conocido, la acción agonista en el RE β y la débil activación del RE α es benéfica en osteoporosis, protección cardiovascular, metabolismo de lípidos y cáncer de mama. Además, los estrógenos pueden actuar vía receptores no nucleares que interactúan con los REs vía sistema de segundo mensajero. Hay evidencia *in vitro* que el estradiol modula funciones de células neuronales y vasculares vía acciones no genómicas (Ise *et al.*, 2005). Por lo tanto, efectos genómicos y no genómicos deben ser considerados en la acción estrogénica.

Potencia y efectos biológicos

La potencia biológica de los fitoestrógenos varía. Gran cantidad de estos compuestos no son esteroideos en su estructura y su potencia es sumamente menor a los estrógenos sintéticos (10^{-3} a 10^{-5}), ella varía entre especies y rutas de administración (Price *et al.*, 1985). La potencia relativa, determinada mediante pruebas biológicas en células humanas (comparada con estradiol, al cual se le dio un valor arbitrario de 100) es cumestrol: 0.202, genisteína: 0.084, equol: 0.061, daidzeína: 0.013 y formononetina: 0.0006 (Adlercreutz, 1990; Markiewicz *et al.*, 1993).

Actividad estrogénica y antiestrogénica

Los fitoestrógenos son de interés biológico porque ellos exhiben tanto *in vitro* e *in vivo* actividad estrogénica y antiestrogénica. (Price *et al.*, 1985).

El efecto estrogénico de los fitoestrógenos fue observado por primera vez en problemas reproductivos en ovejas (Bennetts *et al.*, 1946). Las isoflavonas estimulan la hipertrofia uterina en animales de laboratorio, exhibiendo acción estrogénica (Drane *et al.*, 1980; Price *et al.*, 1985). Cuando se administró con estradiol, la genisteína deprimió los niveles de estradiol uterino por competencia por sus receptores. Las isoflavonas exhibieron actividad anticarcinogénica *in vivo*. Animales de laboratorio fueron alimentados con una dieta fortificada en soya, teniendo predominantemente menor proliferación en tumor de mama, después del estímulo directo e indirecto con agentes inductores de tumor (Messina, 1994).

La genisteína ha sido el fitoestrógeno de mayor interés en el presente y, *in vitro*, se ha demostrado que ejerce efectos proliferativos (estrogénicos) y antiproliferativos (antiestrogénicos) en células humanas (Sathyamoorthy *et al.*, 1994; Wang *et al.*, 1996).

Las isoflavonas además de exhibir las propiedades mencionadas presentan actividad anticarcinogénica, reportan inhibición de la angiogénesis (Fotsis *et al.*, 1993) y de la progresión en el ciclo celular (Traganos *et al.*, 1992). Otros efectos incluyen inhibición de la enzima aromatasa (Adlercreutz *et al.*, 1993; Campbell *et al.*, 1993) y propiedades antioxidantes (Wei *et al.*, 1993).

Mujer premenopáusica

La intervención dietaria con 60 g de proteína de soya diariamente ha reportado un incremento en la duración de la fase folicular. Estos efectos fueron asociados con la supresión de la descarga en medio del ciclo de FSH y LH (Cassidy *et al.*, 1994). Una dosis de 340 g de leche de soya, tres veces al día, decrecen el 17 β -estradiol sérico y

en la fase lutea disminuye la progesterona sérica en mujeres de 22 a 29 años de edad (Lu *et al.*, 1996). En contraste, el suplemento de 10 g diariamente de semilla de linaza incrementa la duración de la fase lutea, pero no hay diferencia en el tiempo de la fase folicular en el ciclo normal de una mujer (Phipps *et al.*, 1993).

Mujer posmenopáusica

En Asia, sólo del 10% al 20% de las mujeres posmenopáusicas presentan bochornos, comparadas con el 70% a 80% de las mujeres en países occidentales (Boulet *et al.*, 1994; Lock, 1991 y 1994; Tang, 1994). Una popular hipótesis para explicar esta diferencia es que isoflavonas se encuentran en la soya, elemento tradicional en la dieta asiática, ésta influiría en la respuesta del cuerpo e incluso en los cambios de nivel hormonal (Adlercreutz, 1990).

Hay variaciones en las respuestas dentro de los estudios y no es clara la correlación de la respuesta estrogénica de fitoestrógenos con los cambios en la citología vaginal y los efectos en los sofocos. Esto se ilustra en lo difícil de hacer objetivos los parámetros en estudio de sofocos. Las variaciones en las respuestas dependen de la población estudiada, productos utilizados y el diseño del estudio, particularmente con respecto a la duración de la exposición, variabilidad en la respuesta y la no respuesta en algunas mujeres posmenopáusicas al suplemento de fitoestrógenos (Lu *et al.*, 1996).

Suplementos dietarios provenientes de la soya son ampliamente distribuidos para síntomas menopáusicos y su uso ha incrementado por mujeres como una alternativa al uso de estrógenos, sin embargo es difícil hacer recomendaciones específicas de formulación y dosis.

Fitoestrógenos y sistema óseo

Muchos estudio epidemiológicos han examinado el nexo entre los fitoestrógenos y la masa ósea, dando como resultado que los fitoestrógenos de la soya son benéficos para el mantenimiento o para dar una mejor masa ósea en la mujer posmenopáusica (Greendale *et al.*, 2002; Horiuchi *et al.*, 2000; Mei *et al.*, 2001). Algunos estudios han revelado que los fitoestrógenos de la proteína de soya tienen un modesto efecto en retardar la pérdida de hueso en la mujer perimenopáusica (Alekel *et al.*, 2000) y posmenopáusica (Potter *et al.*, 1998; Clifton-Bligh *et al.*, 2001). Se ha reportado que en la mujer posmenopáusica el consumo de la proteína de soya ha significado una reducción en la excreción urinaria de deoxipiridinolina (un biomarcador específico de la resorción del hueso) y en la excreción de calcio, situación que no ocurre con las proteínas de la leche (Arjmandi *et al.*, 2003). Existe un aumento, con el efecto de las isoflavonas de soya, de la síntesis del factor de crecimiento insulínico 1 (IGF-1), la concentración de IGF-1 está relacionada positivamente con la masa ósea femenina. En la población China, las isoflavonas de soya tienen un tenue, pero significativo efecto en el mantenimiento de la concentración mineral de la cadera en la mujer posmenopáusica con una masa ósea disminuida (Chen *et al.*, 2003). Ipriflavona (7 isopropoxi-isoflavona), un flavonoide sintético, inhibe el reclutamiento de osteoclastos y su función, 600 mg/día han prevenido pérdida de hueso en el radio distal en una mujer posmenopáusica con osteoporosis (Agnusdei *et al.*, 1992).

A pesar de todo, la hipótesis de los efectos benéficos de la soya en el hueso es aun especulativa, un estudio acabado del impacto de los fitoestrógenos en fracturas proporcionaría respuestas consideradas con respecto a los fitoestrógenos y su valor como posible alternativa de tratamiento farmacológico (Usui, 2006).

Fitoestrógenos y protección en cáncer

En países occidentales el cáncer de mama es una de las mayores causas de muerte en mujeres. Se piensa que este cáncer tiene causas multifactoriales que van

desde la información genética, la dieta, el estilo de vida y mutaciones. El rol de los estrógenos endógenos en el riesgo de cáncer de mama es ampliamente reconocido. De diferentes formas el metabolismo de estrógenos forma estrógenos endógenos mutagénicos o da como resultado radicales libres carcinogénicos (Usui, 2006). Existen numerosos estudios *in vitro* que muestran a la genisteína (pocas investigaciones muestran a la daidzeína) inhibir el crecimiento de un amplio rango de células que son dependientes de hormonas e independientes de éstas. De esta forma los fitoestrógenos estarían actuando como antioxidantes y/o inhibiendo el crecimiento de vasos sanguíneos, hecho esencial en la expansión de un tumor (Fotsis *et al.*, 1993; Peterson, 1995). El rol de la dieta y estilo de vida en la etiología del cáncer de mama se puede apreciar en la mujer japonesa que en su patria presenta cáncer de mama, ella presenta un alto número de tumores *in situ* con escasa metástasis y ésta metástasis tiene poca extensión, esto comparado con mujeres con cáncer de mama en Estados Unidos o Gran Bretaña (Knight *et al.*, 1996).

El desarrollo de cáncer endometrial está ampliamente relacionado con la exposición prolongada a estrógenos. Por lo tanto, los productos de fitoestrógenos deberían influenciar en la incidencia de cáncer endometrial. Sin embargo, en contraste al cáncer de mama, los resultados sobre los efectos de fitoestrógenos en cáncer endometrial son limitados. En una población multiétnica como la de Hawai, el gran consumo sólo de tofu o en combinación con otros productos de soya, fue asociado a la reducción del 50% en el riesgo de cáncer endometrial. La reducción del riesgo se notó fuertemente entre mujeres que nunca habían dado a luz y las que nunca habían usado terapia de reemplazo hormonal (Goodman *et al.*, 1997). El consumo de isoflavonas y lignanos por parte de mujeres no asiáticas en la Bahía de San Francisco fue relacionado inversamente al riesgo de cáncer endometrial. Aquí se concluyó que algunos compuestos fitoestrogénicos, al nivel de consumo en la dieta americana, están asociados con la reducción del riesgo de cáncer endometrial (Horn-Ross *et al.*, 2003).

Fitoestrógenos y el sistema cardiovascular

Es bien conocido que la menopausia es un importante factor de riesgo en enfermedades cardiovasculares por que el estrógeno tiene un rol de protección en contra de la aterosclerosis. *In vitro*, la genisteína inhibe la proliferación de células vasculares e inhibe la angiogénesis, proceso importante en la aterosclerosis (Raines *et al.*, 1995). La neovascularización está asociada con lesiones avanzadas y la genisteína inhibe esta función en células endoteliales cultivadas (Fotsis *et al.*, 1993 y 1995). Los RE α y β se expresan en endotelio vascular, en células de la musculatura lisa y células miocárdicas (Venkov *et al.*, 1996). Interesantemente, en la arteria carótida de la rata, el RE α es expresado en bajos niveles, mientras la expresión del RE β es mucho más alto (Makela *et al.*, 1999). Se ha reportado que ratones deficientes de RE β tienen una anormal función vascular e hipertensión (Zhu *et al.*, 2002). Un estudio en donde el consumo de una dieta rica en soya por parte de monos machos y hembras entregó valores de lipoproteínas de baja densidad (LDL) y lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL) menores que los controles, 30% a 40% menos, por el contrario las lipoproteínas de alta densidad (HDL) incrementaron en un 50% en hembras y un 20% en machos (Anthony *et al.*, 1995). Estos resultados sugieren que el ligando específico del RE β debe ser protector cardiovascular (Usui, 2006).

Una variedad de ensayos clínicos demostraron que el consumo de 25 g a 50 g de proteína de soya por día es seguro y efectivo en reducir el colesterol LDL en aproximadamente 4% a 8%. Los efectos benéficos de la soya son proporcionales en gente con mayor hipercolesterolemia (Anderson *et al.*, 1995). La sustitución de la proteína animal por soya puede dar como resultado la baja de grasas saturadas y colesterol, de tal modo resultaría un nivel favorable de colesterol sanguíneo y potencialmente la reducción del riesgo de una enfermedad coronaria (Lichtenstein, 1998). Otras propiedades reportadas, como la inhibición de la agregación plaquetaria y los efectos antioxidantes, también deben ser consideradas importantes (Wilcox *et al.*, 1995).

Efecto de los estrógenos

Los dos tipos de hormonas sexuales ováricas son los estrógenos y los gestágenos. El estrógeno más importante es la hormona estradiol y el gestágeno más importante es la progesterona. Los estrógenos promueven principalmente la proliferación y el crecimiento de células específicas del cuerpo que son responsables del desarrollo de la mayoría de los caracteres sexuales secundarios de la mujer. La función principal de los gestágenos consiste en preparar al útero para la gestación y a las mamas para la lactancia (Guyton y Hall, 2006).

La respuesta biológica producida por los estrógenos no está limitada a los efectos en la reproducción y es quizás mejor entender su efecto en el contexto de la acción general de las hormonas. Las hormonas son agentes producidas en una glándula que son transportadas a través de la circulación sanguínea hacia el órgano en el cual van a producir un estímulo, vía acción química funcionan en otra parte del cuerpo. Los estrógenos son moléculas de tipo esteroidal y son producidos por la corteza adrenal, ovarios y por conversión periférica de la androstenediona.

Todos los esteroides son derivados del colesterol. Pequeños cambios en la molécula de colesterol produce tres diferentes tipos de esteroides: 1) mineralocorticoides, como la aldosterona, que actúa en el balance mineral; 2) glucocorticoides, como el cortisol, que actúa en el metabolismo de glucosa; y 3) esteroides sexuales, como estrógenos, progesterona y testosterona, que son agrupados como una familia porque su efecto mutuo está involucrado en la función reproductiva (Ruggiero *et al.*, 2002).

Estrógenos endógenos

En la mujer normal no gestante, sólo los ovarios secretan cantidades importantes de estrógenos, aunque también las cortezas suprarrenales producen

pequeñas cantidades. Durante la segunda mitad del embarazo, prácticamente reemplazando al ovario, la placenta es la encargada de producir estrógenos (Guyton y Hall, 2006).

En el plasma de la mujer sólo hay cantidades significativas de tres estrógenos: β -estradiol, estrona y estriol (Guyton y Hall, 2006). En la mujer premenopáusicas el 17β -estradiol (estradiol o E_2) es producido por el ovario, este es el estrógeno en mayor proporción. El estradiol es el más potente porque tiene una alta afinidad por los receptores de estrógeno. En la mujer premenopáusicas los niveles de circulación de estradiol fluctúan entre los 40 a 200-400 pg/mL a través del ciclo menstrual (North American Menopause Society, 2000). Después de la menopausia los niveles de estradiol caen a menos de 20 pg/mL (Jones, 1992). La estrona (E_1) es menos potente que el estradiol y también es un metabolito del estradiol. La estrona es producida vía conversión de la androstenediona en el tejido adiposo. En la mujer posmenopáusicas el ovario cesa en la producción de estradiol, pero la glándula adrenal continúa generando androstenediona, el inmediato precursor de estrona, los niveles de estrona permanecen sin cambiar, pero los niveles de estradiol caen significativamente. El tercer estrógeno endógeno, estriol (E_3), es también un metabolito del estradiol en la periferia. El estriol es el principal estrógeno producido por la placenta durante el embarazo, pero es encontrado en menores cantidades que el estradiol o la estrona en una mujer no embarazada (Ruggiero *et al.*, 2002).

La potencia estrogénica del estradiol es, para las respuestas genómicas, 12 veces la de la estrona y 80 veces la del estriol (Guyton y Hall, 2006). Para las respuestas no genómicas mediadas por eosinófilos, el estriol es más potente que el estradiol, hecho que va en paralelo con la mayor afinidad que presenta el estriol por los receptores estrogénicos de los eosinófilos, en comparación con el 17β -estradiol (Tchernitchin, 1972; Tchernitchin *et al.*, 1976). Considerando estas potencias relativas, puede verse que el efecto estrogénico del estradiol es (para las respuestas genómicas), por lo general, muchas veces mayor que el de los otros estrógenos juntos. Por esta razón, se considera que el estradiol es el estrógeno principal, aunque los

efectos estrogénicos de la estrona están lejos de ser despreciables (Guyton y Hall, 2006).

Los estrógenos, como todos los esteroides, son altamente liposolubles y por lo tanto, una vez producidos, difunden fácilmente a través de las membranas celulares hacia el torrente sanguíneo. En el órgano blanco los estrógenos difunden dentro de la célula y por la membrana nuclear. Dentro del núcleo se unen a un receptor de estrógeno. El complejo receptor-ligando se une al ADN e inicia la transcripción génica, de tal modo se producen las proteínas específicas que participan en la acción fisiológica de los estrógenos en el tejido blanco (Clark, 1992). Por ejemplo, los estrógenos estimulan la producción de mucus en las células del cervix y la producción de globulina que une esteroides en hepatocitos.

En la circulación sanguínea muchos de los estrógenos están ligados a una proteína llamada globulina acopladora de hormonas sexuales. Aproximadamente el 2% de los estrógenos en el plasma está libre. Solamente el estrógeno libre está biológicamente activo y disponible a entrar a las células. Más de 400 acciones celulares diferentes de los estrógenos han sido descritas (Sarrel *et al.*, 1994).

Receptores de estrógenos

Desde el aislamiento de la estrona en 1929, entendemos como los estrógenos realizan funciones que cautivan el interés de muchos científicos e investigadores clínicos. Los primeros postulados mostraban la actuación del estrógeno como un cofactor metabólico, esto fue disipado con el descubrimiento de las proteínas del receptor de estrógeno (Jensen *et al.*, 1960). De este campo emergió la investigación nuclear del receptor de la hormona. Estudios subsecuentes por varios investigadores han indicado que las proteínas del RE, cuales son factores de transcripción localizados en el núcleo, afectan la expresión de los genes blanco. Sin embargo, investigaciones actuales sugieren que este no debe ser solo el mecanismo de acción estrogénica. De

esta forma, los estrógenos deben activar diversos caminos, algunos de los cuales son independientes de los receptores “clásicos” de estrógenos (Hewitt *et al.*, 2005).

Dos tipos de receptores estrogénicos han sido identificados (RE α y RE β) en machos y hembras (Gustafsson, 1999; Warner *et al.*, 1999). Estos receptores tienen diferente distribución en los tejidos. El RE α es expresado en los tejidos del útero, hígado, mamas y riñón. El RE β es encontrado más bien en los tejidos reproductivos, pero también existe en muchos tejidos de áreas no reproductivas, esto incluye cerebro, huesos, tracto urinario y sistema vascular.

Los ovarios, útero, mamas, sistema cardiovascular y cerebro contienen tanto RE α como RE β . La complejidad de esta distribución se convierte en importante cuando se utiliza a moduladores sintéticos del receptor de estrógeno, que pueden unirse a RE α o RE β , para causar acciones agonistas o antagonistas en el sitio del receptor. Las funciones moleculares de los receptores en órganos específicos aun no son bien conocidas (Jordan, 1998).

Metabolismo de estrógenos

El estrógeno es metabolizado a formas menos activas o inactivas vía dos mecanismos: 1) conjugación a metabolitos hidrosolubles y metabolitos no biológicamente activos para la excreción y 2) conversión en estrona o estriol, cuales son biológicamente activos, pero aproximadamente diez veces menos potentes que el estradiol (Ruggiero *et al.*, 2002).

Circulación enterohepática

Los estrógenos son conjugados o hechos hidrosolubles en el hígado, en donde son alterados y adquieren una estructura similar a los ácidos biliares. Después ellos

son excretados en el tracto gastrointestinal vía los ductos biliares. En el intestino la flora bacteriana normal desconjuga al estrógeno, haciéndolo nuevamente liposoluble. Esta forma liposoluble y biológicamente activa es reabsorbida desde el intestino hacia el hígado vía circulación enterohepática, de tal modo, nuevamente en el hígado, es transformada a un metabolito inactivo que es devuelto a la circulación (Dickinson *et al.*, 2001).

Efecto de primer paso

Los estrógenos ingeridos (vía oral) son metabolizados rápidamente a estrona en el intestino y en el hígado (en donde se conjugan) antes de alcanzar la circulación general. El efecto de primer paso disminuye significativamente la cantidad de estrógeno disponible para la circulación. Además, el primer paso a través del hígado afecta a otras funciones hepáticas y se presume ser una de las razones por lo cual las diversas rutas de administración tienen diferente impacto en los perfiles lipídicos (Hammond, 2000).

Estrógenos y terapia de reemplazo hormonal (TRH)

Entre los 40 y los 50 años, los ciclos sexuales suelen hacerse irregulares y en muchos de ellos no se produce ovulación. Transcurridos algunos meses o años, los ciclos cesan. Este período, durante el cual los ciclos cesan y las hormonas sexuales femeninas disminuyen casi hasta cero, se denomina menopausia (Guyton y Hall, 2006). El fin de la TRH es reemplazar el estrógeno, para de esta forma aliviar los síntomas de la menopausia (Ruggiero *et al.*, 2002).

La causa de la menopausia es el “agotamiento” de los ovarios. A lo largo de toda la vida reproductora de la mujer, unos 400 folículos primordiales crecen para formar folículos vesiculares y ovular, mientras que cientos de miles de ovocitos degeneran. A la edad aproximada de 45 años sólo quedan unos pocos folículos

primordiales capaces de responder a la estimulación de la FSH y la LH y la producción de estrógenos por el ovario decrece a medida que el número de folículos primordiales se aproxima a cero. Cuando la producción de estrógenos desciende por debajo de un valor crítico, los estrógenos ya no pueden inhibir la producción de las gonadotropinas FSH y LH. Por el contrario, la FSH y la LH (principalmente la FSH) se producen tras la menopausia en grandes cantidades y de forma continua, pero a medida que se atresian los folículos primordiales aún existentes, la producción ovárica de estrógenos cae casi a cero.

Es frecuente que la pérdida de los estrógenos provoque notables alteraciones fisiológicas en la función del organismo, como: 1) sofocos, caracterizados por una rubefacción extrema de la piel; 2) sensaciones psicológicas de disnea; 3) irritabilidad; 4) fatiga; 5) ansiedad; 6) a veces, diversos trastornos psicóticos, y 7) disminución de la resistencia y de la calcificación de los huesos de todo el cuerpo (Guyton y Hall, 2006).

De esta forma, la TRH busca prevenir el desarrollo de osteoporosis, disminuir el riesgo de enfermedades cardíacas y mejorar las capacidades cognitivas, sin incrementar el riesgo de cáncer uterino, cáncer de mama, cáncer de ovario o problemas a la vesícula biliar (Ansbacher, 2001).

El desafío es encontrar una preparación de estrógenos que sea selectiva para los receptores de estrógenos responsables de las respuestas buscadas, pero no aquellos de respuestas indeseadas o de riesgo. Ninguna de las formulaciones farmacológicas en el mercado son lo bastante selectivas. Por lo tanto, el “dilema del estrógeno” o la controversia riesgo/beneficio sobre el uso de la TRH es de constante preocupación. Las prescripciones de medicamentos y el uso de éstos deben ser revisados cuidadosamente antes de iniciar la terapia, el mecanismo de acción, efectos adversos, contraindicaciones y el potencial riesgo son de gran importancia al momento de considerar los medicamentos a utilizar (Rousseau, 2001).

Estrógenos en el útero

Bajo estimulación estrogénica el útero experimenta diversos cambios como son: crecimiento, proliferación de glándulas endometriales, hiperemia e hipertrofia del miometrio (Tchernitchin *et al.*, 1995). Para explicar los cambios que experimenta el útero bajo la influencia de los estrógenos, se han postulado a lo menos dos mecanismos de acción desde el punto de vista de los receptores involucrados (Tchernitchin *et al.*, 1976).

En el primer mecanismo la acción del estradiol en el útero es mediada por el receptor citosólico nuclear (Jensen *et al.*, 1972). Este mecanismo es responsable de las respuestas genómicas en el útero e involucra un aumento de la mitosis en las células uterinas.

Existen dos teorías con respecto a este tipo de mecanismo de acción de los estrógenos en células uterinas, en la primera el estrógeno se une al receptor citoplasmático que forma un dímero, el cual se trasloca al núcleo celular y se dedimeriza, de tal manera que la porción del receptor ligante del estrógeno interactúa con la cromatina en donde finalmente se produce la acción genómica (Jensen *et al.*, 1972). La otra teoría se refiere a que los esteroides por su naturaleza lipofílica ingresan a la célula por simple difusión, los receptores para la hormona se encuentran asociados a proteínas chaperonas en estado inactivo formando complejos no estables y con gran afinidad por las hormonas esteroidales, luego el complejo hormona-receptor se desliga de la proteína y migra hacia el núcleo en donde ejerce la acción (Pratt *et al.*, 1997). Este tipo de proteínas son conocidas como proteínas de shock térmico o HSP (Pratt *et al.*, 1997).

El segundo mecanismo es mediado por los leucocitos eosinófilos, clásicamente involucrados en procesos alérgicos, enfermedades parasitarias y reacciones inflamatorias, los que frente a un estímulo estrogénico migran al útero dependiente de los niveles de estrógeno en la sangre y no en el útero (Tchernitchin *et al.*, 1983).

La interacción de la hormona con receptores estrogénicos ubicados en la superficie de los eosinófilos presenta gran afinidad y especificidad a bajas concentraciones de hormona (Tchernitchin *et al.*, 1985).

El complejo hormona-receptor es reconocido por receptores específicos ubicados sólo en la pared del endotelio vascular uterino y de esta forma el eosinófilo se adhiere a los pequeños vasos sanguíneos ubicados en el mesometrio. Una vez que los eosinófilos traspasan el endotelio vascular por diapédesis migran desde el mesometrio hacia el miometrio y endometrio. Por efecto estrogénico los eosinófilos se degranulan, liberando enzimas contenidas en los gránulos al espacio extravascular uterino (Lastra, 2000).

CAPÍTULO II

HIPÓTESIS

H₀: La administración de una dosis de extracto alcohólico de fitoestrógenos, a ratas pre-púberes, no genera respuestas estrogénicas a nivel de útero.

H₁: La administración de una dosis de extracto alcohólico de fitoestrógenos, a ratas pre-púberes, genera respuestas estrogénicas a nivel de útero

OBJETIVO GENERAL

Evaluar, con respecto al patrón 17 β -estradiol, la acción estrogénica de un extracto alcohólico vegetal en útero de ratas pre-púberes.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar el extracto alcohólico vegetal en estudio.
- Cuantificar eosinófilos en los distintos estratos uterinos.
- Determinar eosinófilos uterinos degranulados e intactos.
- Observar distribución de eosinófilos en los distintos estratos uterinos.
- Contabilizar células uterinas en mitosis de epitelio luminal, epitelio glandular y miometrio circular.
- Caracterizar cualitativa y cuantitativamente el extracto alcohólico vegetal en estudio.
- Evaluar respuesta genómica (mitosis uterina) y no genómica (eosinofilia uterina).

CAPÍTULO III

METODOLOGÍA DE TRABAJO

Estudio morfológico e histológico de cortes de útero de rata en presencia del extracto en estudio

Diseño del estudio

Estudio experimental doble ciego.

Muestreo

Estudio con muestra de tipo probabilística, en donde los elementos investigados tuvieron la misma probabilidad de ser seleccionados dentro del conjunto total.

Población estudiada

Se utilizaron un total de 84 ratas hembra Sprague-Dawley de 21 días de edad, 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 Central del ICBM de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Equipos

- Microscopio óptico Leica CME binocular 1000 x, EEUU.
- Micrótopo Leica RM 2125 RT, EEUU.
- Estufa Precision Scientific CO. 4-C-11, EEUU.
- Bañera de Flotación Lipshaw MFG 375, EEUU.
- Balanza Ohaus SC 4010, EEUU.

Instrumentos

- Micropipetas de 100 – 1000 μ l. Hirschmann, Alemania.
- Material de vidrio Pirex, EEUU.
- Jeringas de 1ml. Nipro, Japón.
- Arsenal quirúrgico Hartmann, Alemania.
- Porta y cubre objetos esmerilados Marienfeld, Alemania.

Reactivos

- 17β -estradiol. Laboratorio SIGMA (E8875), EEUU.
- NaCl 0.9%. Laboratorio Biosano, Chile.
- Extracto alcohólico de fitoestrógenos (denominado arbitrariamente 81a).
- Bálsamo Canadá, Éter dietílico, Xileno, Aceite de inmersión, Etanol absoluto, Parafina Histosec[®], Formalina y Buffer fosfato. Laboratorio Merck, Alemania.
- Hematoxilina, Eosina Y acuosa Harris. Chile.
- Albúmina y agua destilada (Elaborados en el Laboratorio de Endocrinología Experimental y Patología Ambiental de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile).

Caracterización y preparación del extracto estudiado

A modo de antecedente esta planta se utilizaba folklóricamente por los pueblos indígenas para efectuar abortos.

Para este estudio la planta fue recolectada el primero de enero del 2007 en el Valle de la Engorda, aproximadamente a 2500 o 3000 m de altura.

Se recolectaron sumidades floridas de planta; 28 g de sumidades floridas fueron extraídas con 100 mL de etanol absoluto Merck por 200 días, luego se procedió a filtrar obteniéndose el extracto 81a.

Procedimiento

Las ratas escogidas fueron las de 21 días de vida y las que luego de ser pesadas se encontraban entre el rango de 40 y 50 g.

Las ratas en estudio fueron divididas en 8 grupos, utilizándose 4 grupos para la observación de respuesta no genómica a las 6 hrs. y los otros 4 grupos para la observación de respuesta genómica a las 24 hrs.

Las ratas fueron inyectadas con 3 soluciones de diferente naturaleza: 17 β -estradiol 0,5 mg/ml etanol, solución alcohólica de extracto de fitoestrógenos y un patrón de NaCl 0,9% usado como vehículo para la solución (Tabla 1).

Grupo	Soluciones		
	NaCl 0,9%	17 β -estradiol 0,5 mg/ml etanol	Extracto alcohólico de Fitoestrógenos
R _{1(6 h)} , R _{1'(24 h)}	✓	X	X
R _{2(6 h)} , R _{2'(24 h)}	✓	✓	X
R _{3(6 h)} , R _{3'(24 h)}	✓	X	✓
R _{4(6 h)} , R _{4'(24 h)}	✓	✓	✓

Tabla 1: La tabla muestra los 8 grupos de ratas (indicando el tiempo para cada grupo en que fue observada la respuesta) y la solución con que fueron inyectados cada uno. La letra y número para cada grupo es de elección arbitraria.

A cada rata se le inyectó vía subcutánea 0,3 ml de la solución señalada en relación 1:9; una parte de la respectiva solución alcohólica diluida en 9 partes de suero fisiológico.

Transcurridas 6 o 24 h de la inyección, se extrajeron los cuernos uterinos bajo anestesia etérea, las ratas fueron eutanasiadas por exceso de anestesia; posteriormente los cuernos se fijaron en una solución de formalina al 10% tamponada con buffer fosfato 0,1 M pH 7,3 - 7,4.

Sobre los cuernos extraídos se realizaron los siguientes procedimientos histológicos: deshidratación, inclusión en parafina y corte en micrótopo de 5 μ m.

Todos los fragmentos fueron deshidratados en una escala ascendente de etanol y aclarados en xileno, para luego proceder con la impregnación.

La impregnación se llevó a cabo en 3 cambios de parafina en estufa a 60°C. La inclusión definitiva (construcción de los bloques de inclusión) se realizó en parafina y dispuestos sobre parafina líquida; luego se dejó solidificar la parafina líquida, la cual solidificó a temperatura ambiente.

Los cortes histológicos uterinos, denominados triadas, representan las 3 porciones del cuerno uterino: proximal al cervix, parte media del cuerno y distal cercana al oviducto.

Los cortes se sometieron a baño de flotación (37-40°C) y luego se dispusieron en un portaobjetos embebido en albúmina. Se insertaron los respectivos cortes en forma de triadas consecutivos, el orden de las porciones uterinas es al azar (fotografías en Anexo 1).

Las muestras se tiñeron con colorante hematoxilina-eosina, colorante que tiñe de color violeta los núcleos de todas las células uterinas y de color rojo a los gránulos de los leucocitos-eosinófilos por los que posee una gran afinidad, por otra parte además permite identificar su localización y estado de degranulación dentro de las diversas capas histológicas uterinas. Los cortes se deshidrataron, aclararon y montaron con bálsamo de Canadá sobre los respectivos portaobjetos.

Justificación de la edad de las ratas

Se determinó para los ejemplares en estudio la edad de 21 días, es decir ratas pre-púberes, dado que para ese momento éstas aún no presentan niveles apreciables de estrógenos endógenos, motivo por el cual, no se observan respuestas a la hormona. Además, a esta edad los diversos tipos de receptores estrogénicos, así como también los mecanismos de acción de dicha hormona, se encuentran completamente desarrollados, pudiendo por tanto encontrar la misma respuesta estrogénica que en animales adultos. De esta manera, se puede asegurar que todos los efectos estrogénicos observados son generados producto de la administración de la hormona exógena y de las condiciones experimentales.

PARÁMETROS DE EVALUACIÓN

Recuento del número de eosinófilos en los distintos estratos uterinos

El recuento de eosinófilos se realizó por microscopia óptica (1.000 x). En 10 triadas se contabilizó los eosinófilos que migran a los distintos estratos uterinos (Mesometrio, Miometrio longitudinal, Miometrio circular, Estroma profundo y Estroma superficial), además se evaluó el estado en que se encuentran; intactos o degranulados y si estaban adheridos o no a vasos sanguíneos.

Para cada condición experimental; se calculó el número total de eosinófilos encontrados en cada estrato uterino y el total por cada triada.

Degranulación de eosinófilos uterinos

Debido a que el eosinófilo esta involucrado en la mediación de respuestas en útero y considerando la acción degranulatoria en sangre y en útero del 17β -estradiol

(Tchernitchin, et al., 1985). Se evalúa la degranulación de eosinófilos uterinos inducida por 17β -estradiol en forma comparativa con el extracto alcohólico que contiene fitoestrógenos.

Recuento del número de células en mitosis

El recuento de células en mitosis se realizó por microscopía óptica (1.000 x). Se contabilizó las células en mitosis en 3 triadas al azar. Se utilizaron tres estratos uterinos (Miometrio circular, Epitelio glandular y Epitelio luminal).

Para cada condición experimental; se calculó el número total de células en mitosis en cada estrato uterino señalado y el número total por cada triada.

DETERMINACIÓN CUANTITATIVA Y CUALITATIVAMENTE DEL EXTRACTO ALCOHÓLICO

Objetivo

Analizar el extracto alcohólico de fitoestrógenos, determinando sus componentes y cantidad de cada uno de ellos.

Equipo

- HPLC Shimadzu LC10A - 10AVP.

Reactivos

- 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.
- β-estradiol (17β-estradiol), PM: 270.2, Catálogo SIGMA: E8875.
- Extracto alcohólico de fitoestrógenos (81a).

Metodología

El análisis cualitativo y cuantitativo fue obtenido vía cromatografía líquida de alta resolución con detección de fluorescencia (HPLC) para detectar niveles sobre los 100 ng/mL de concentración, también se utilizó paralelamente cromatografía líquida de ultra resolución con detección por espectrometría masa-masa (ULPC-MS/MS) que detecta concentraciones menores a 200 pg/mL.

Para la detección de daidzeína y genisteína se utilizó el método de Careri y colaboradores (Careri *et al.*, 2001) de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (Tabla 2).

Condiciones Cromatográficas				
Fase móvil	Columna	Flujo	Volumen de inyección	Tiempo de retención
metanol/agua (70/30)	Shimpack C ₁₈ 250 x 46 mm, 5 μm	0,2 mL/min	50 μL	10,2 minutos

Tabla 2: Condiciones cromatográficas para realizar la detección de daidzeína y genisteína en el extracto alcohólico de fitoestrógenos estudiado.

Para la detección de estradiol se utilizó el método de Novakova y colaboradores (Novakova *et al.*, 2004) de Cromatografía Líquida de Alta Resolución (Tabla 3).

Condiciones Cromatográficas				
Fase móvil	Columna	Flujo	Volumen de inyección	Tiempo de retención
acetonitrilo/metanol/ agua (23/24/53)	Shimpack C ₁₈ 250 x 46 mm, 5 µm	1,0 mL/min	50 µL	12,7 minutos

Tabla 3: Condiciones cromatográficas para realizar la detección de estradiol en el extracto alcohólico de fitoestrógenos estudiado.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

- Los datos fueron tabulados mediante Microsoft Office Excel 2003. (Microsoft Office Professional Edition 2003, Oregon, EE.UU).
- Se utilizó ANOVA para el análisis de varianza de entrada simple.
- Se usó la prueba de χ^2 como test estadístico de proporciones de eosinófilos en las diversas localizaciones en el útero y para proporciones de eosinófilos uterinos intactos y degranulados.
- Para el análisis de los datos y nivel de significancia estadística para las demás respuestas estrogénicas evaluadas, se usó el test de la Mínima Diferencia Significativa a posteriori (LSD a.p.).

CAPÍTULO IV

RESULTADOS

Los valores obtenidos fueron tabulados y graficados mediante el programa computacional Microsoft Excel. Los datos simples obtenidos en primera instancia se transformaron a valores porcentuales que indican la respuesta encontrada, estos porcentajes se graficaron con su respectivo error estándar.

Se consideró 0% al control negativo y el 100% a la respuesta máxima encontrada con 17β -estradiol a las 6 o 24 hrs. para el estudio de eosinofilia (respuesta no genómica). Lo mismo se consideró para el estudio de mitosis (respuesta genómica), pero sólo a 24 hrs (tablas en Anexo 3).

Eosinófilos localizados en útero

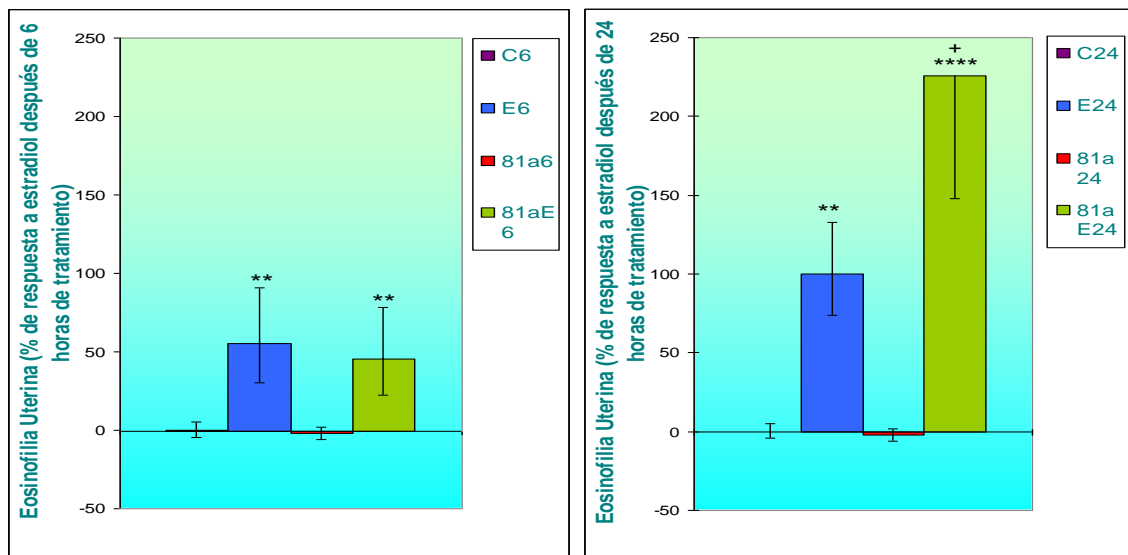


Gráfico 1A (izquierda): Porcentaje de eosinófilos encontrados en útero de rata pre-púber luego de 6 hrs de inyectado las distintas condiciones.

Gráfico 1B (derecha): Porcentaje de eosinófilos encontrados en útero de rata pre-púber luego de 24 hrs de inyectado las distintas condiciones.

En ambos gráficos cada barra corresponde al promedio geométrico \pm su error estándar y representan respectivamente a C: control salino, E: estradiol, 81a: extracto vegetal y 81aE: extracto vegetal más estradiol. El número 6 o 24 corresponde a las hrs. (**) = $p < 0,01$; (****) = $p < 0,0001$; (+) = $p < 0,05$.

En el gráfico 1A se muestra que la respuesta a E6 es estadísticamente significativa (en comparación con el control) y que la respuesta a 81aE6 es significativa con respecto a la del extracto solo (**).

En el gráfico 1B se muestra que la respuesta a E24 es significativa con respecto a la del control (**) y que la respuesta a 81aE24 es muy significativa con respecto a la del extracto solo (****). Respuesta a 81aE24 es significativamente mayor que la inducida con E24 (+).

Células en mitosis localizadas en útero

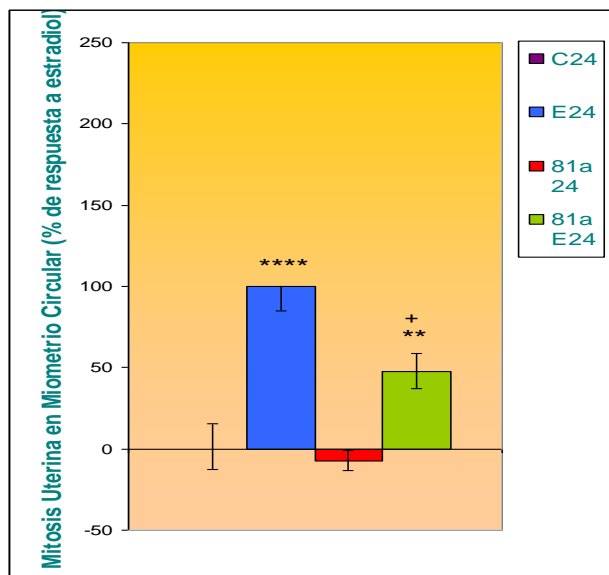


Gráfico 2A: Número de células en mitosis encontradas en el miometrio circular de útero de rata pre-púber luego de 24 hrs de inyectado las distintas condiciones. Cada barra corresponde al promedio geométrico \pm su error estándar y representan respectivamente a C24: control salino, E24: estradiol, 81a24: extracto vegetal y 81aE24: extracto vegetal más estradiol. (**) = $p < 0,01$; (****) = $p < 0,0001$; (+) = $p < 0,05$.

Este gráfico (2A) muestra que la respuesta a E24 es estadísticamente muy significativa (en comparación con el control) (****) y que la respuesta a 81aE24 es significativa con respecto a la del extracto solo (**). Respuesta a 81aE24 es significativamente menor que la inducida con E24 (+).

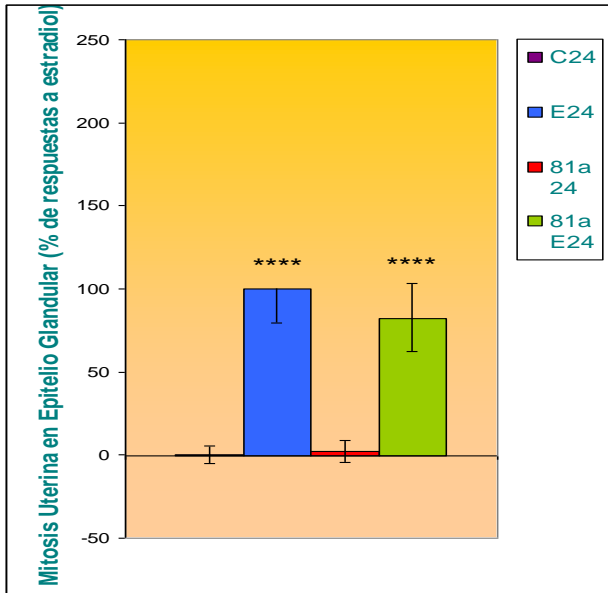


Gráfico 2B: Número de células en mitosis encontradas en el epitelio glandular de útero de rata pre-púber luego de 24 hrs de inyectado las distintas condiciones. Cada barra corresponde al promedio geométrico \pm su error estándar y representan respectivamente a C24: control salino, E24: estradiol, 81a24: extracto vegetal y 81aE24: extracto vegetal más estradiol. (****) = $p < 0,0001$.

En el gráfico 2B se muestra que la respuesta a E24 es estadísticamente muy significativa (en comparación con el control) y que la respuesta a 81aE24 también es estadísticamente muy significativa con respecto a la del extracto solo (****).

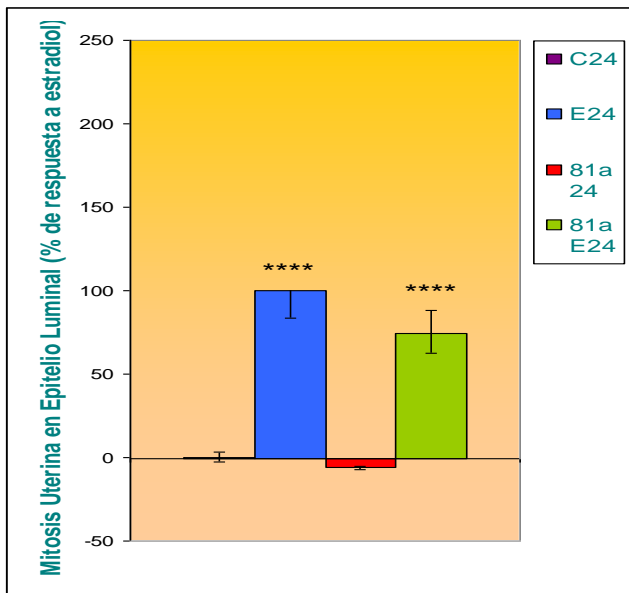


Gráfico 2C: Número de células en mitosis encontradas en el epitelio luminal de útero de rata pre-púber luego de 24 hrs de inyectado las distintas condiciones. Cada barra corresponde al promedio geométrico \pm su error estándar y representan respectivamente a C24: control salino, E24: estradiol, 81a24: extracto vegetal y 81aE24: extracto vegetal más estradiol. (****) = $p < 0,0001$.

El gráfico 2C muestra que la respuesta a E24 es estadísticamente muy significativa (en comparación con el control) y que la respuesta a 81aE24 también es estadísticamente muy significativa con respecto a la del extracto solo (****).

Eosinófilos localizados en distintos estratos uterinos

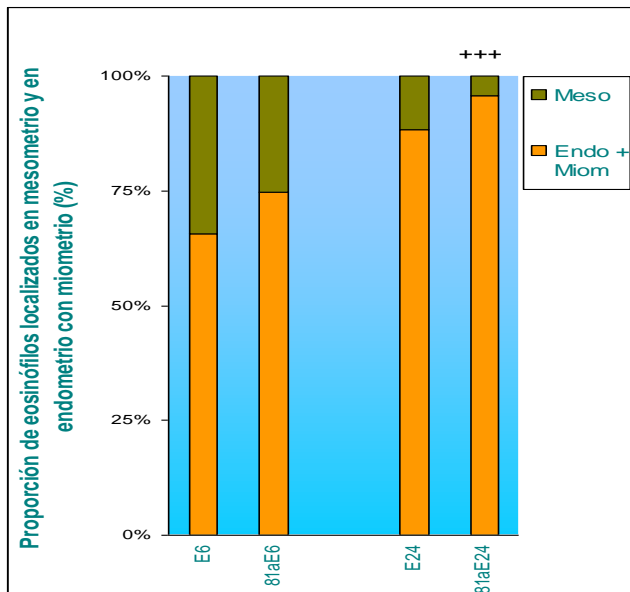


Gráfico 3: Porcentaje de eosinófilos localizados en mesometrio (Meso) con respecto a los localizados en endometrio con miometrio (Endo + Miom) en útero de rata pre-púber. Esta respuesta se observó en las horas posteriores a la inyección de estradiol (E) o de extracto vegetal más estradiol (81aE), el número 6 o 24 corresponde a las horas. (+++) = $p < 0,001$.

En el gráfico 3 se muestra que el porcentaje de eosinófilos en endometrio más miometrio, posterior a la inyección de 81aE24, es estadísticamente muy significativa con respecto a E24.

Eosinófilos uterinos degranulados e intactos

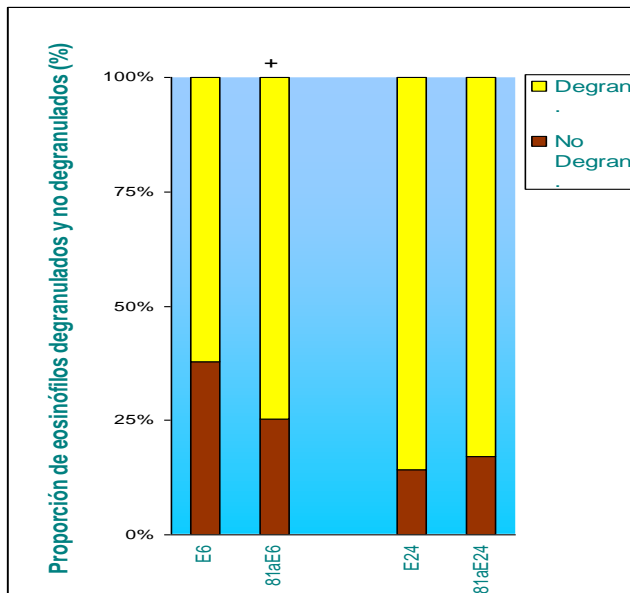


Gráfico 4: Porcentaje de eosinófilos degranulados (Degran) y no degranulados (No Degran) localizados en útero de rata pre-púber. Esta respuesta se observó en las horas posteriores a la inyección de estradiol (E) o de extracto vegetal más estradiol (81aE), el número 6 o 24 corresponde a las horas. (+) = $p < 0,05$.

En el gráfico 4 se muestra que el porcentaje de eosinófilos degranulados, posterior a la inyección de 81aE6, es estadísticamente significativa con respecto a E6.

Análisis del extracto alcohólico vegetal

Con respecto al análisis cualitativo y cuantitativo del extracto en estudio se procedió en primera instancia a realizar un análisis cuantitativo de estándares con objeto de la posterior identificación en los extractos. Los estándares utilizados fueron los de genistina, genisteína, daidzeína y 17β -estradiol, este análisis se puede apreciar en los perfiles cromatográficos adjuntados en el Anexo 2.

A continuación se describe el resultado del análisis del extracto alcohólico vegetal mediante las metodologías ya identificadas anteriormente en este informe.

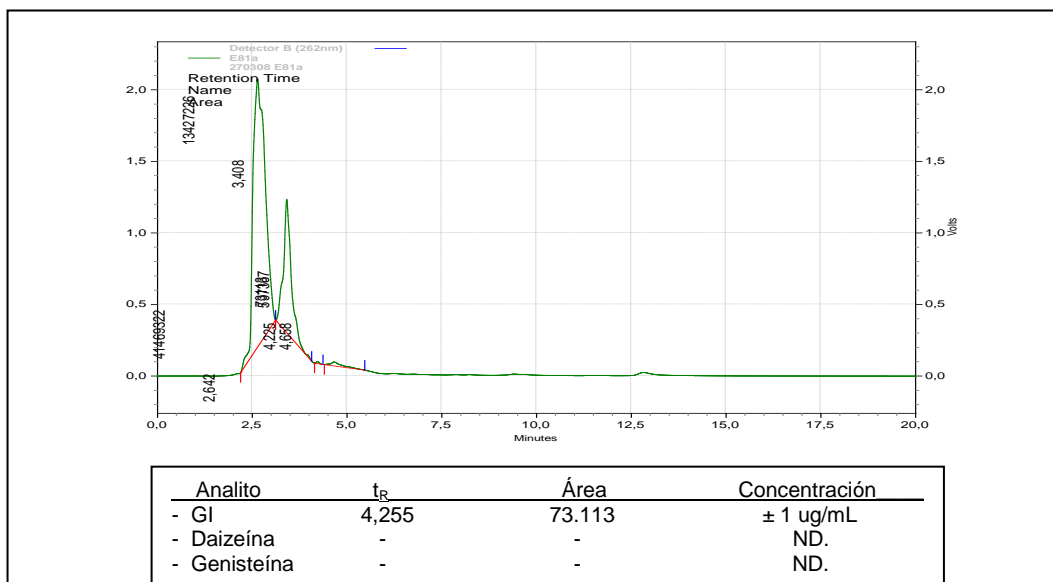


Gráfico 5: Detección y cuantificación de isoflavonas. Se entiende por GI: glicósido de isoflavona (daizeína y/o genisteína); t_R: tiempo de retención y ND: no detectado. La muestra no presenta niveles detectables de daidzeína y/o genisteína. Se observaron niveles muy bajos del derivado glicosilado.

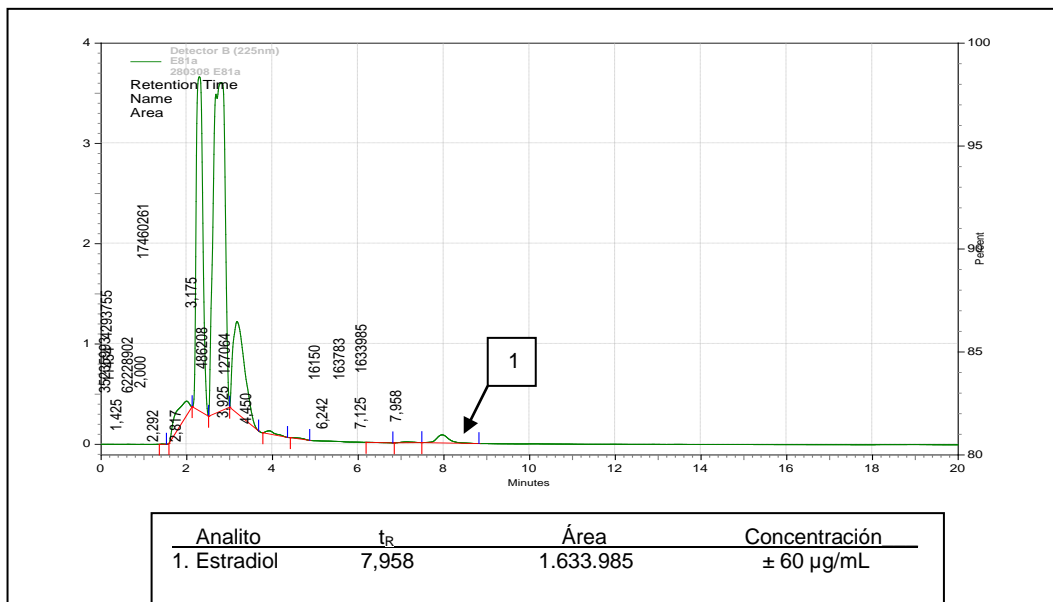


Gráfico 6: Detección y cuantificación de estradiol. Se entiende por t_R: tiempo de retención. La muestra presenta niveles considerables de estradiol, los que alcanzaron a una cifra aproximada de 60 µg/mL.

DISCUSIÓN

Con respecto a la eosinofilia, en nuestro modelo experimental el 100% de respuesta fue determinado por la acción no genómica del 17β -estradiol a las 24 horas, esto se estableció ya que la respuesta máxima al patrón se dio luego de 24 horas de la inyección en la rata. El valor de 0% fue asignado a la respuesta del control salino tanto a las 6 horas como a las 24 hrs. Este hecho no concuerda con el efecto de los estrógenos propuesto por Jensen y De Sombre (Jensen y De Sombre, 1972), en el cual se postula que la respuesta estrogénica no genómica (eosinofilia) alcanza un valor máximo a las 6 hrs. Este hecho, descrito en el presente trabajo, ya había sido observado en 1974 (Tchernitchin *et al.*, 1974) y se ha repetido en varios trabajos del mismo grupo de investigación (Cruz y Garrido, 2008).

La respuesta no genómica, evidenciada mediante la eosinofilia (gráfico 1A y 1B) entrega valores significativos en la respuesta, post-administración, de estradiol con respecto al control salino para 6 y 24 hrs., lo mismo ocurre con el estradiol más el extracto alcohólico vegetal en relación a la respuesta observada después de administrar el extracto solo. Esto puede ser fundamentado por la acción del estradiol sobre los eosinófilos, lo cual se correlaciona con los efectos atribuidos a los estrógenos.

Uno de los hallazgos más relevantes del presente trabajo de investigación lo constituye el dramático aumento de eosinófilos en útero de rata, observado luego de 24 horas de administrar en forma conjunta estradiol y el extracto alcohólico vegetal. Los datos obtenidos indican que los valores de eosinofilia encontrados en el corte transversal de útero de rata fluctuaron desde 1 (suero fisiológico), 20 (estradiol) y se incrementaron hasta 67 con la administración del estradiol más el extracto alcohólico vegetal. Por su parte, el extracto solo casi no tuvo efecto sobre la eosinofilia (gráfico 1B). De acuerdo a estos resultados, el aumento ostensible del número de eosinófilos presentes en el útero, es posible que el extracto alcohólico vegetal analizado ejerza un efecto potenciador sobre la respuesta inducida por estradiol.

Hechos de importancia con respecto a la acción de los tratamientos en estudio, sobre el útero de rata pre-púber, los proporcionan la ubicación y degranulación de eosinófilos (gráfico 3 y 4). La ubicación de eosinófilos es considerablemente mayor a nivel de endometrio junto al miometrio comparados con los localizados en mesometrio; esta diferencia se nota a las 6 horas luego de inyectado solo estradiol y estradiol junto al extracto alcohólico vegetal, esta diferencia es más notable luego de 24 horas de haber aplicado los mismos tratamientos.

La mayor cantidad de eosinófilos se encuentra en endometrio más miometrio en respuesta a la previa administración, 24 horas antes, de estradiol más el extracto alcohólico vegetal (gráfico 3). Se observó que el 96% de los eosinófilos hallados se ubicaba en este sector, valor que fue estadísticamente muy significativo con respecto al 88% de localización que arrojó la acción del estradiol solo. De esto se infiere que existe una mayor migración de eosinófilos con la acción conjunta del estradiol más el extracto alcohólico vegetal en estudio (desde mesometrio hacia endometrio), esta posible acción potenciadora del extracto se correlaciona con la mayor cantidad de eosinófilos encontrados bajo este tratamiento (gráfico 1B).

Como respaldo a la hipótesis de la acción potenciadora, los datos del gráfico 4, indican que la mayoría de los eosinófilos localizados se encontraban degranulados, incrementando este porcentaje los ubicados a las 24 horas en comparación a los hallados a las 6 horas. La acción del estradiol más el extracto estudiado es estadísticamente significativa ya a las 6 horas con respecto al estradiol solo. En este caso la acción del extracto alcohólico vegetal también podría ser considerada como potenciadora.

La importancia de que exista una alta proporción de eosinófilos degranulados radica en que se vincula con los resultados vistos en el gráfico 3, ya que al degranularse los eosinófilos liberan al medio sustancias que le permiten mayor movilidad y por ende aumenta su migración desde el mesometrio hacia el endometrio.

Con respecto a la respuesta genómica, evidenciada mediante el número de células en mitosis, el estradiol generó la acción esperada en los distintos estratos uterinos en estudio luego de 24 horas de su administración, de esta forma se vio un incremento de las células en mitosis en estas zonas. El extracto en estudio no generó acción considerable en el aumento de división celular (gráfico 2A, 2B y 2C).

La acción conjunta del estradiol más el extracto alcohólico vegetal no generó una respuesta distinta a la respuesta del estradiol solo, esto se consideró en epitelio luminal o en epitelio glandular (gráfico 2B y 2C), esto da entender que posiblemente la acción del extracto en estudio no sería de mayor relevancia en estos estratos uterinos.

Notable es la disminución de la división celular en miometrio circular, provocada por la administración de estradiol en forma conjunta con el extracto alcohólico vegetal luego de 24 hrs. De esta manera en el gráfico 2A se puede apreciar que la respuesta a esta condición es casi un 35% menor que la respuesta generada solo por el estradiol. Los datos obtenidos indican que los valores de las células miometriales en mitosis halladas en el corte transversal de útero de rata fluctuaron desde 31 (suero fisiológico), 69 (estradiol), 22 con el extracto alcohólico vegetal y disminuyeron hasta 46 con la administración del estradiol más el extracto alcohólico vegetal. Este suceso podría explicarse asumiendo que el extracto alcohólico vegetal ejerce una acción atenuante sobre el estradiol a este nivel uterino. Si bien es cierto, con los experimentos realizados en este estudio no es posible explicar este hecho con certeza, puede especularse que el extracto interferiría con alguna de las vías de transducción de la acción estrogénica. Lo anterior constituye un hecho relevante y a considerar en posibles investigaciones futuras sobre el extracto, sobre todo si consideramos que a nivel de miometrio circular y endometrio se inicia primariamente la hiperplasia uterina.

A pesar que los miomas uterinos son considerados como tumores benignos y que muchas mujeres con miomas son asintomáticas, se han registrado sangramientos uterinos, dolor pélvico o complicaciones en el embarazo de algunas mujeres afectadas. Uno de los factores que puede producir la miomatosis uterina es la prolongada

exposición a estrógeno, lo que a su vez, puede influir en el aumento de la concentración de sus receptores en el miometrio (Cheng *et al.*, 2008).

La opción de medicamentos como terapia para la mujer que no desea la intervención quirúrgica (extirpación de los miomas uterinos) y de esta forma disminuir los miomas, es una posibilidad que podría entregar el extracto alcohólico vegetal. Los resultados obtenidos abren la posibilidad, digna de explorar en el futuro, del tratamiento de la miomatosis uterina con un compuesto activo presente en el extracto alcohólico vegetal estudiado.

La caracterización cuantitativa y cualitativa no entregó resultados que ayuden a identificar los principios activos presentes en el extracto alcohólico vegetal en estudio (gráfico 5 y 6); en la cromatografía realizada no se detecta presencia de las isoflavonas daidzeína y/o genisteína, sólo se encontró una concentración muy baja de los glicosidos de estas sustancias ($\pm 1 \mu\text{g/mL}$), no se descarta la presencia de otras isoflavonas en el extracto analizado. Se detectó presencia de estradiol en una concentración de $60 \mu\text{g/mL}$, situación que genera dudas al momento del análisis, por ende se presume que lo encontrado no sería estradiol como se informa.

Por los resultados obtenidos, ya discutidos, es posible que el extracto contenga algún producto fitoestrogénico, que al no utilizar su patrón en el HPLC no fue identificado. No obstante a lo anterior, se han descrito en algunas especies vegetales la presencia de esteroides sexuales, incluidos 17α -estradiol, estrona y estrol (Farnsworth *et al.*, 1975).

CONCLUSIÓN

Se valida el método utilizado para observar respuestas genómica (mitosis uterina) y no genómica (eosinofilia uterina) inducidas por la acción del estradiol y/o por sustancias de acción estrogénica.

La administración en forma aguda del extracto alcohólico de planta medicinal chilena estudiada ejerce una alteración en la respuesta no genómica (aumenta el número de eosinófilos uterinos). Este extracto alcohólico de planta medicinal chilena también desarrolla una alteración de la respuesta genómica a nivel de miometrio circular (disminuye células uterinas en mitosis).

El extracto alcohólico vegetal estudiado produciría una potenciación de la respuesta que se genera por la acción del 17β -estradiol, manifestado en el aumento de eosinófilos uterinos luego de 24 horas de haber sido inyectado el extracto alcohólico de planta medicinal nativa junto al 17β -estradiol.

La acción del extracto alcohólico vegetal en presencia de 17β -estradiol provoca un aumento en la degranulación de eosinófilos uterinos y la consiguiente migración de estos eosinófilos, desplazándose desde el mesometrio hacia el endometrio.

El extracto alcohólico de planta medicinal chilena disminuyó la mitosis de células uterinas miometriales inducidas por la presencia de 17β -estradiol.

Las posibles propiedades descritas que presenta el extracto alcohólico vegetal estudiado sugiere como probable aplicación terapéutica el tratamiento de miomas uterinos. De esta forma se podría reducir la proliferación de células uterinas en presencia del estradiol.

REFERENCIAS

- Adlercreutz, H., Fotsis, T., Bannwart, C., et al. Determination of urinary lignans and phytoestrogen metabolites, potential antiestrogens and anticarcinogens, in urine of women on various habitual diets. J Steroid Biochem. 25: 791-797. 1986.
- Adlercreutz, H., Hockerstedt, K., Bannwart, C., et al. Effect of dietary components, including lignans and phytoestrogens, on enterohepatic circulation and liver metabolism of estrogens and on sex hormone binding globulin (SHBG). J Steroid Biochem. 27: 4-6; 1135-1144. 1987.
- Adlercreutz, H. Western diet and western diseases: some hormonal and biochemical mechanism and associations. Scand J Clin Lab Invest. 50(201): 3-23. 1990.
- Adlercreutz, H., Bannwart, C., Wahala, K. Inhibition of Human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens. J Steroid Biochem Mol Biol. 44(2): 147-153. 1993.
- Adlercreutz, H., Goldin, B., Gorbach, S. Soybean phytoestrogens intake and cancer risk. J Nutr. 125: 757-770. 1995.
- Adlercreutz, H. y Mazur, W. Phyto-oestrogens and Western diseases. Ann Med. 29: 95-120. 1997.
- Agnusdei, D., Adami, S., Cervetti, R., et al. Effect of isoflavone on bone mass and calcium metabolism in postmenopausal osteoporosis. Bone Miner. 19: 43-48. 1992.
- Alekel, D.L., Germain, A.S., Peterson, C.T., et al. Isoflavone-rich soy protein isolate attenuates bone loss in the lumbar spine of perimenopausal women. Am J Clin Nutr. 72: 844-852. 2000.
- Anderson, J.W., Johnstone, B.M., Cook-Newell, M.E. Meta-analysis of the effects of soy protein intake on serum lipids. N Engl J Med. 333: 276-282. 1995.
- Ansbacher, R. The pharmacokinetics and efficacy of different estrogens are not equivalent. Am J Obstet Gynecol. 184: 255-263. 2001.
- Anthony, M.S., Clarkson, T.B., Weddle, D.L. Effects of soy protein phytoestrogens on cardiovascular risk factors in rhesus monkeys. Suppl. Abstract. J Nutr. 125: 803-804. 1995.
- Arjmandi, B.H., Khalil, D.A., Smith, B.J., et al. 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.
- Axelson, M. y Setchell, K.D.R. The excretion of lignans in rats- Evidence for an intestinal bacterial source for this new group of compounds. FEBS Lett. 123: 337-342. 1981.
- Axelson, M., Kirk, D.N., Farrant, R.D., et al. The identification of the weak oestrogen equol [7-hidroxi-3-(7-hidroxiifenil)cromano] in human urine. Biochem J. 201: 353-357. 1982.
- Axelson, M., Sjøvall, J., Gustafsson, B.E. Soya – a dietary source of the nonsteroidal estrogen equol in man and animals. J Endocr. 102: 49-56. 1984.

- Bennetts, H.W., Underwood, E.J., Sheir, F.L. A specific breeding problem of sheep on subterranean clover pastures in Western Australia. Aust Vet J. 22: 2-12. 1946.
- Beral, V. and Million women collaborators. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. Lancet. 362: 419-427. 2003.
- Boulet, M.J., Oddens, B.J., Lehert, P., et al. Climateric and menopause in seven South-east Asian countries. Maturitas 19: 157-176. 1994.
- Campbell, D.R. y Kurzer, M.S. Flavonoid inhibition of aromatase enzyme activity in human preadipocytes. J Steroid Biochem Mol Biol. 46: 381-388. 1993.
- Careri, M., Elviri, L., 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., Bingham, S., Setchell, K.D.R. Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women. Am J Clin Nutr. 60: 333-340. 1994.
- Chen, Y.M., Ho, S.C., Lam, S.S., et al. Soy isoflavones have a favorable effect on bone loss in Chinese postmenopausal women with lower bone mass: a double-blind, randomized, controlled trial. J Clin Endocrinol Metab. 88: 4740-4747. 2003.
- Cheng, M., Chao, H. y Wang, P. Medical treatment for uterine myomas. Taiwan J Obstet Gynecol. 47: 18-23. 2008.
- Chlebowski, R.T., Hendrix, S.L., Langer, R.D., et al. Influence of oestrogen plus progestin on breast cancer and mammography in healthy postmenopausal women: the Women's Health Initiative Randomized Trial. J American Med Assoc. 289: 3242-3253. 2003.
- Clark, J.H. Mechanism of action of steroid hormones and antagonists. Infertil Reprod Med Clin North Am. 3: 7-19. 1992.
- Clifton-Bligh, P.B., Baber, R.J., Fulcher, G.R., et al. The effect of isoflavones extracted from red clover (Rimostil) on lipid and bone metabolism. Menopause. 8: 259-265. 2001.
- Cruz Catalán, Carolina y Garrido Marín, Paulina. Efectos de la exposición aguda a cadmio sobre la respuesta a estrógenos en útero de ratas pre-púberes. Tesis (Título de Obstetra). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Medicina Norte, 2008.
- Davis, D.L. y Bradlow, H. Can environmental estrogens cause breast cancer? Scientific American. Oct:144-149. 1995.
- Dickinson, B.D., Altman, R.D., Nielsen, N.H., et al. Drug interactions between oral contraceptives and antibiotics. Obstet Gynecol. 98: 853-860. 2001.
- Drane, H.M., Patterson, D.S.P., Roberts, B.A. Oestrogenic activity of soyabean products. Food Cosmetics Toxicol. 18: 425-427. 1980.
- Duax, W.L. y Griffin, J.F. Structure-activity relationships of estrogenic chemicals. Proceedings of the Second Symposium on estrogens in the environment Raleigh, North Carolina, April. 10-12. 1985.
- Farnsworth, N.R., Bingel, A.S., Cordell, G.A., et al. Potential value of plants as sources of new antifertility agents II. J Pharm Sci. 64: 717-754. 1975.

- Fotsis, T., Pepper, M., Adlercreutz, H., et al. Genistein, a dietary derived inhibitor of *in vitro* angiogenesis. Proc Natl Acad Sci USA. 90: 2690-2694. 1993.
- Fotsis, T., Pepper, M., Adlercreutz, H., et al. Genistein, a dietary ingested isoflavonoid, inhibits cell proliferation and in vitro angiogenesis. J Nutr. 125: 790-797. 1995.
- Goodman, M.T., Wilkens, L.R., Hankin, J.H., et al. Association of soy and fiber consumption with the risk of endometrial cancer. Am J Epidemiol. 146: 294-306. 1997.
- Greendale, G.A., FitzGerald, G., Huang, M.H., et al. Dietary soy isoflavones and bone mineral density: results from the study of women's health across the nation. Am J Epidemiol. 155: 746-754. 2002.
- Gustafsson, J.A. Estrogen receptor β : a new dimension in estrogen mechanism of action. J Endocrinol. 163: 379-383. 1999.
- Guyton, A.C. y Hall, J.E. Tratado de Fisiología Médica. 11^o edición. Madrid, España. Elsevier. 2006. 1016p, 1022p.
- Hammond, C. Therapeutic options for menopausal health. Duke University School of Medicine, Office of Continuing Medical Education. Monograph vol. 2, 2000.
- Hewitt, S.C., Deroo, B.J., Korach, K.S. A new mediator for an old hormone? Science. 307: 1572-1573. 2005.
- Horiuchi, T., Onouchi, T., Takahashi, M., et al. Effect of soy protein on bone metabolism in postmenopausal Japanese women. Osteoporos Int. 11: 721-724. 2000.
- Horn-Ross, P.L., John, E.M., Canchola, A.J., et al. Phytoestrogen intake and endometrial cancer risk. J Natl Cancer Inst. 95: 1158-1164. 2003.
- Hickey, M., Saunders, C.N., Stuckey, B.G. Management of menopausal symptoms in patients with breast cancer: an evidence based approach. Lancet Oncology. 6: 687-695. 2005.
- Hutchins, A.M., Lampe, J.W., Martini, M.C., et al. Vegetables fruits and legumes: effects on urinary isoflavonoid phytoestrogen and lignan excretion. J Am Diet Assoc. 95: 769-774. 1995.
- Ise, R., Han, D., Takahashi, Y., et al. Expression profiling of the estrogen responsive genes in response to phytoestrogens using a customized DNA microarray. FEBS Lett. 579: 1732-1740. 2005.
- Jensen, E.V. y Jacobson H.I. Biological Activities of Steroids in Relation to Cancer. Eds. Academic Press, New York. pp.161-174. 1960.
- Jensen, E.V. y DeSombre, E. Mechanisms of action of the female sex hormones. A. Rew. Biochem. 41: 203-230. 1972.
- Jones, K.P. Estrogen and progestins: what to use and how to use it. Clin Obstet Gynecol. 32: 871-883. 1992.
- Jordan, V.C. Designer estrogens. Sci Am. 279: 60-67. 1998.
- Kelly, G.E., Joannou, G.E., Reeder, A.Y., et al. The variable metabolic response to dietary isoflavones in humans. Proc Soc Exp Biol Med. 208: 40-43. 1995.
- Kim, N., Gross, C., Curtis, J., et al. The impact of clinical trials on the use of hormone replacement therapy. A population-based study. J General Internal Med. 20: 1026-1031. 2005.

- Kirkman, L.M., Lampe, J.W., Campbell, D.R., et al. Urinary lignan and isoflavone excretion in men and women consuming vegetable and soy diets. Nutr Cancer. 24: 1-12. 1995.
- Knight, D.C. y Eden, J.A. A review of the clinical effects of phytoestrogens. Obstet Gynecol. 87: 897-904. 1996.
- Kuiper, G.G., Carlsson, B., Grandien, K., et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. Endocrinology. 138: 863-870. 1997.
- Lastra Peñaloza, Diego Guillermo. Efectos de fitoestrógenos en útero de rata y potenciales aplicaciones terapéuticas. Respuestas estrogénicas no-genómicas. Tesis (Título de Químico Farmacéutico). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas, 2001.
- Leyton Naranjo, Tania Gloria y Medina Tapia, Gabriela del Pilar. Exposición prenatal a cadmio y sus efectos diferidos en el útero de rata durante la edad prepuberal. Tesis (Título de Matrona). Santiago, Chile. Universidad de Chile, Facultad de Medicina Norte, 2007.
- Lichtenstein, A.H. Soy protein, isoflavones and cardiovascular disease risk. J Nutr. 128: 1589-1592. 1998.
- Lock, M. Contested meaning of the menopause. Lancet. 337: 1270-1272. 1991.
- Lock, M. Menopause in cultural context. Exp Gerontol. 29: 307-317. 1994.
- Loewe, S., Lange, F., Spohr, E. Über weibliche Sexual hormone (Thelytropine). Biochem Zeitscher. 180: 1-26. 1927.
- Lu, L.J., Andersson, K.E., Grady, J. Effects of soya consumption for one month on steroid hormones in premenopausal women: implications for breast cancer risk reduction. Cancer epidem. Biomarkers prevention. 5: 63-70. 1996.
- Lu, L.J., Lin, S.N., Grady, J.J., et al. Altered kinetics and extent of urinary diadzein and genistein excretion in women during chronic soy exposure. Nutr Cancer. 26: 289-302. 1996.
- Makela, S., Savolainen, H., Aavik, E., et al. Differentiation between vasculoprotective and uterotrophic effects of ligands with different binding affinities to estrogen receptors alpha and beta. Proc Natl Acad Sci USA. 96: 7077-7082. 1999.
- Markiewicz, L., Garey, J., Adlercreutz, H., et al. *In vitro* bioassays of nonsteroidal phytoestrogens. J Steroid Biochem Molec Biol. 45: 399-405. 1993.
- Mei, J., Yeung, S.S., Kung, A.W. High dietary phytoestrogen intake is associated with higher bone mineral density in postmenopausal but not premenopausal women. J Clin Endocrinol Metab. 86: 5217-5221. 2001.
- Messina, M. Soy intake and cancer risk: a review of the *in vitro* and *in vivo* data. Nutr Cancer. 21: 113-131. 1994.
- Murkies, A., Wilcox, G., Davis, S. Phitoestrogens, Clinical review 92. J. Clin Endocrinol Metab. 83: 297-303. 1998.
- North American Menopause Society. Menopause core curriculum study guide. Cleveland (OH): North American Menopause Society, 2000.
- Novakova L.L., Solich, P., Matysova, et al. HPLC determination of estradiol, its degradation product, and preservatives in new topical formulation Estrogel HBF. Anal Bioanal Chem. 379 : 781–787. 2004.

- Peterson, G. Evaluation of the biochemical targets of genistein in tumor cells. J Nutr. 125: 784-789. 1995.
- Phipps, W.R., Martini, M.C., Lampe, J.W. Effect of flaxseed ingestion on the menstrual cycle. J Clin Endocrinol Metab. 77: 1215-1219. 1993.
- Potter, S.M., Baum, J.A., Teng, H., et al. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in post-menopausal women. Am J Clin Nutr. 68: 1375-1379. 1998.
- Pratt, W. y Toft, D. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. Endocr rev. 18: 306-360. 1997.
- Price, K.R. y Fenwick, G.R. Naturally occurring oestrogens in foods: a review. Food Addit Contam. 2: 73-106. 1985.
- Raines, E.W. y Ross, R. Biology of atherosclerotic plaque formation: possible role growth factors in lesion development and the potential impact of soy. J Nutr. 125: 624-630. 1995.
- Rousseau, M.E. Evidence-based practice in women's health: hormone therapy for women at menopause. J Midwifery Womens Health. 46: 167-180. 2001.
- Ruggiero, R.J. y Likis, F.E. Estrogen: Physiology, pharmacology, and formulations for replacement therapy. J Midwifery Womens Health. 47: 130-138. 2002.
- Sarrel, P.M., Lufkin, E.G., Oursler, M.J., et al. Estrogen actions in arteries, bone and brain. Sci Med. 44-53. 1994.
- Sathyamoorthy, N., Wang, T.T.Y., Phang, J.M. Stimulation of pS2 expression by diet-derived compounds. Cancer Res. 54: 957-961. 1994.
- Setchell, K.D.R. y Aldercreutz, H. The excretion of two new phenolic compounds (180/442 and 180/410) during the menstrual cycle and in pregnancy. J Steroid Biochem. 11:xv. 1979.
- Setchell, K.D.R., Borriello, S.P., Kirk, D.N., et al. Non-steroidal estrogens of dietary origin: possible roles I hormone dependent disease. Am J Clin Nutr. 40: 569-578. 1984.
- Setchell, K.D.R. Naturally occurring non-steroidal estrogens of dietary origin. In: McLachlan J, ed. Estrogens in the environment: influence on development. New York: Elsevier, 69-85. 1985.
- Setchell, K.D.R. y Aldercreutz, H. Mammalian lignans and phytoestrogens. Recent studies on their formation, metabolism, and biological role in health and disease. In: Rowland I, ed. Role of the gut flora in toxicity and cancer. London: Academic Press. 315-345. 1988.
- Setchell, D.R.K. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. Am J Clin Nutr. 68: 1333-1346. 1998.
- Tang, G.W. The climateric of Chinese factory workers. Maturitas. 19: 177-182. 1994.
- Tchernitchin, A., Radioautographic study of the effect of estradiol-17 β , estrone, estriol, progesterone, testosterone and corticosterone on the in vitro uptake of 2,4,6,7-3H estradio-17 β by uterine eosinophils of the rat. Steroids. 19:575-586. 1972.
- Tchernitchin, A., Roorijck, J., Tchernitchin, X., et al. Dramatic early increase in uterine eosinophils after oestrogen administration. Nature. 248: 142-143. 1974.

- Tchernitchin, A.N., Tchernitchin, N., Galand, P. New concepts on the action of estrogen in the uterus and the role of the eosinophil receptor system. Differentiation. 5: 145-150. 1976.
- Tchernitchin, A.N. y Galand, P. Oestrogen levels in the blood, not in uterus determine uterine eosinophilia and edema. J. Endocrinol. 99: 123-130. 1983.
- Tchernitchin, A.N., Barrera, J., Arroyo, P., et al. Degranulatory action of estradiol on blood eosinophil leucocytes in vivo and in vitro. Agents and action. Experientia 17: 60-66. 1985.
- Tchernitchin, A.N., Kattan, F., Tchernitchin, N. Dose-response of estradiol-17- β on uterine luminal and glandular epithelial hypertrophy, evaluated morphometrically. Med Sci Res. 23: 81-83. 1995.
- Tew, B.Y., Xu, X., Wang, H-J., et al. A diet high in wheat fiber decreases the bioavailability of soybean isoflavones in a single meal fed to women. J Nutr. 126: 871-877. 1996.
- Traganos, F., Ardelt, B., Halko, N., et al. Effects of genistein on the growth and cell cycle progression of normal human lymphocytes and human leukaemic MOLT-4 m and HL-60 cells. Cancer Res. 52: 6200-6208. 1992.
- Usher, C., Teeling, M., Bennett, K., et al. Effect of clinical trial publicity on HRT prescribing in Ireland. Europ J Clin Pharmacol. 24: 1-4. 2006.
- Usui, T. Pharmaceutical Prospects of Phytoestrogens. Endoc J. 53: 7-20. 2006.
- Venkov, C.D., Rankin, A.B., Vaughan, D.E. Identification of authentic estrogen receptor in cultured endothelial cells. A potential mechanism for steroid hormone regulation of endothelial function. Circulation 94: 727-733. 1996.
- Wang, T.T.Y., Sathyamoorthy, N., Phang, J.M. Molecular effects of genistein on estrogen receptor mediated pathways. Carcinogenesis. 17: 271-275. 1996.
- Warner, M., Nilsson, S., Gustafsson, J.A. The estrogen receptor family. Curr Opin Obstet Gynecol. 11: 249-254. 1999.
- Wei, H.C., Wei, L.H., Frenkel, K., et al. Inhibition of tumour promoter-induced hydrogen peroxide formation vitro and *in vivo* by genistein. Nutr Cancer. 20: 1-12. 1993.
- Wilcox, J.N. y Blumenthal, B.F. Thrombotic mechanisms in atherosclerosis: potential impact of soy proteins. J Nutr. 125: 631-638. 1995.
- Zhu, Y., Bian, Z., Lu, P., et al. Abnormal vascular function and hypertension in mice deficient in estrogen receptor beta. Science. 295: 505-508. 2002.

ANEXO

Anexo 1: Fotografías del procedimiento.



1- Inyección vía subcutánea de los distintos tratamientos a estudiar.



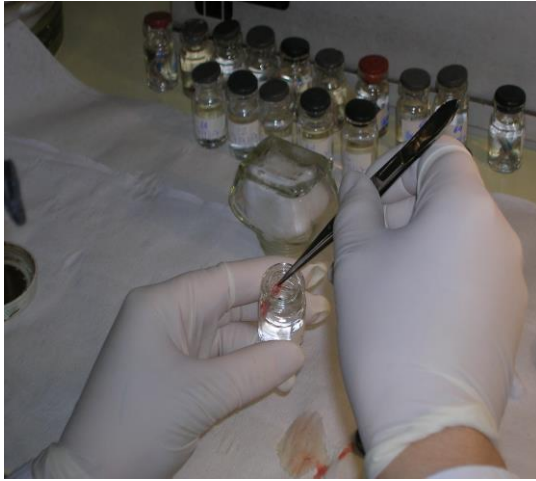
2- Anestesia antes de realizar el procedimiento.



3- Extracción de úteros luego de 6 o 24 horas de aplicado los tratamientos.



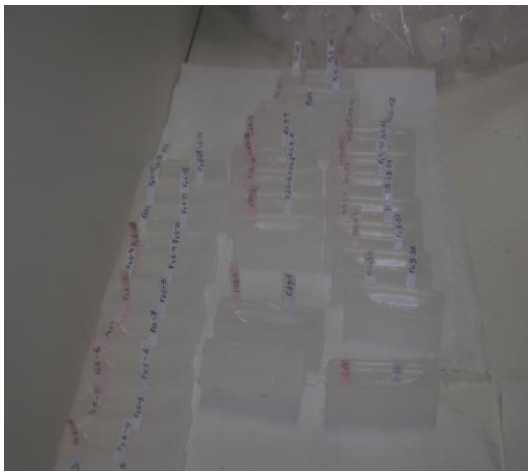
4- Cada cuerno de útero fue cortado en tres partes (triada).



5- Úteros fijados en formalina tamponada.



6- Cortes dispuestos en parafina líquida.

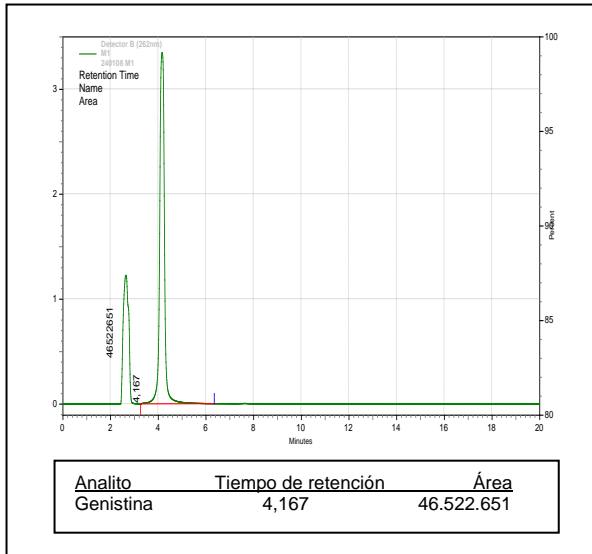


7- Cortes en cubos de parafina sólida.

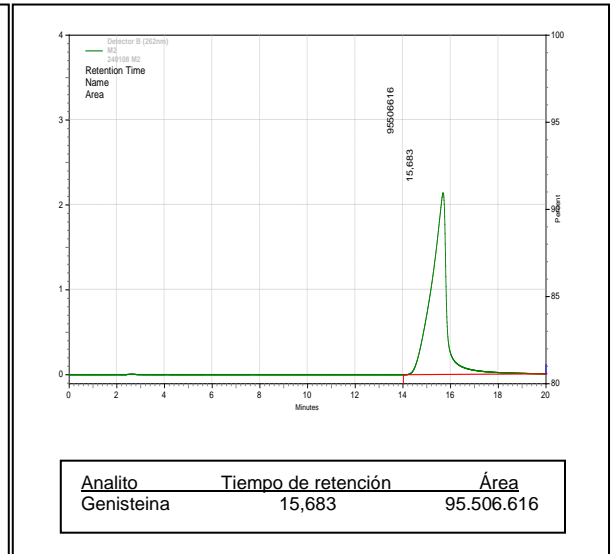


8- Baño de flotación (37-40°C), luego de realizados los cortes de 5 μ .

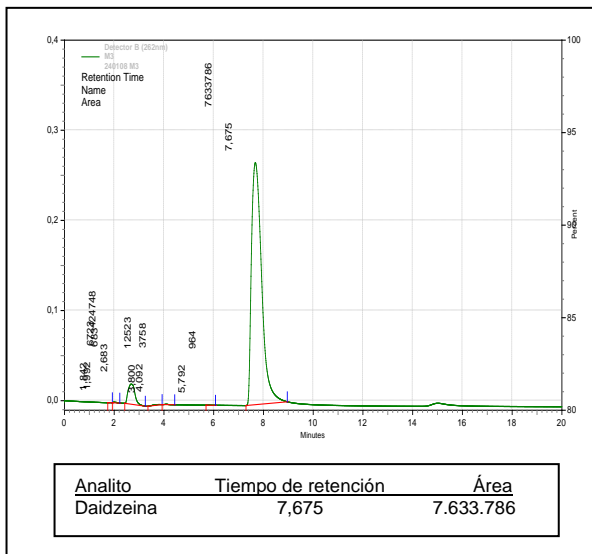
Anexo 2: Perfiles cromatográficos de estándares utilizados.



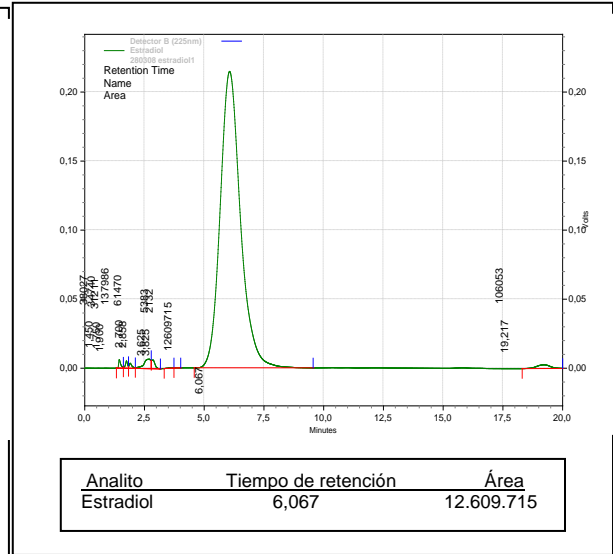
Genistina, 750 µg/mL.



Genisteína, 750 µg/mL.



Daidzeína, 100 µg/mL.



17β-estradiol, 500 µg/mL.

Anexo 3: Tablas con los datos obtenidos en el recuento de eosinófilos y de células en mitosis.

Las siguientes tablas muestran los eosinófilos encontrados luego de 6 horas de ser inyectado los distintos tratamientos. R: número de rata; ES: estroma superficial; EP: estroma profundo; MC: miometrio circular; ML: miometrio longitudinal; Me: mesometrio; A: adheridos a vasos; No A: no adheridos a vasos; D: degranulados; T: total.

Control salino a las 6 hrs.									
R	ES	EP	MC	ML	Me	A	No A	D	T
70	0	1	0	3	1	0	0	5	5
71	2	3	0	2	5	0	0	12	12
72	0	2	2	0	0	0	0	4	4
73	0	7	0	1	3	0	0	7	11
74	2	0	0	0	2	0	0	3	4
75	0	1	0	0	0	0	0	0	1
76	0	2	1	1	1	0	0	2	5
77	0	0	0	0	2	0	0	1	2
78	0	0	0	0	1	0	0	1	1

Estradiol a las 6 hrs.									
R	ES	EP	MC	ML	Me	A	No A	D	T
7	0	4	1	18	12	5	0	15	35
8	0	7	10	7	18	2	0	21	42
9	0	0	1	5	2	0	0	4	8
10	1	7	13	21	16	0	0	47	58
36	0	0	0	0	1	0	0	1	1
37	0	0	0		1	0	0	0	1
38	0	1	2	0	3	0	0	3	6
39	0	1	4	1	1	0	0	5	7
40	0	1	0	1	1	0	0	2	3
41	0	1	1	1	2	0	0	5	5

Extracto vegetal a las 6 hrs.									
R	ES	EP	MC	ML	Me	A	No A	D	T
1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	0	2	0	1	4	0	0	0	7
3	1	1	0	5	6	1	2	5	14
4	0	0	0	0	0	0	0	0	0
5	0	0	0	0	0	0	0	0	0
6	0	5	1	1	2	0	0	2	9
25	0	0	0	0	2	0	0	2	2
26	0	1	0	0	4	0	0	1	5
27	0	0	0	0	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0	0	0	0	0
29	1	0	0	2	2	0	0	1	5
30	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Estradiol más el extracto vegetal a las 6 hrs.									
R	ES	EP	MC	ML	Me	A	No A	D	T
56	0	2	4	1	4	2	0	8	11
57	0	0	0	0	3	0	0	1	3
58	0	2	10	6	0	1	0	16	18
59	0	0	0	0	1	0	0	0	1
60	0	0	0	0	0	0	0	0	0
61	0	1	5	1	4	0	0	9	11
62	0	2	4	5	6	0	0	14	17
63	0	26	19	19	14	3	1	60	78
64	0	0	0	0	1	0	0	0	1
65	0	1	5	2	6	0	1	7	14

Las siguientes tablas muestran los eosinófilos encontrados luego de 24 horas de ser inyectado los distintos tratamientos. R: número de rata; ES: estroma superficial; EP: estroma profundo; MC: miometrio circular; ML: miometrio longitudinal; Me: mesometrio; A: adheridos a vasos; No A: no adheridos a vasos; D: degranulados; T: total.

Control salino a las 24 hrs.									
R	ES	EP	MC	ML	Me	A	No A	D	T
21	0	0	0	0	7	0	0	6	7
22	0	0	0	0	0	0	0	0	0
23	0	0	0	0	1	0	0	0	1
24	0	0	0	0	0	0	0	0	0
66	0	0	0	1	0	0	0	1	1
67	0	0	0	0	0	0	0	0	0
68	0	0	0	0	0	0	0	0	0
69	0	0	0	0	0	0	0	0	0
79	0	0	0	0	0	0	0	0	0
80	0	0	0	0	1	1	0	0	1

Estradiol a las 24 hrs.									
R	ES	EP	MC	ML	Me	A	No A	D	T
15	0	9	4	4	1	0	0	11	18
16	0	4	11	0	2	0	0	12	17
17	0	4	4	1	5	0	0	9	14
18	0	16	18	8	10	0	0	47	52
19	0	5	4	1	2	0	0	11	12
20	0	5	4	1	1	0	0	9	11
35	0	7	3	0	1	0	0	9	11
44	0	0	1	1	0	0	0	2	2
53	0	3	5	0	1	0	0	8	9
54	0	27	24	2	2	0	0	53	55
55	0	2	7	2	0	0	0	11	11

Extracto vegetal a las 24 hrs.									
R	ES	EP	MC	ML	Me	A	No A	D	T
11	0	1	0	0	0	0	0	1	1
12	0	0	0	0	1	0	0	1	1
13	0	0	0	0	3	0	0	1	3
14	0	0	0	0	0	0	0	0	0
31	0	0	0	0	1	0	0	0	0
32	0	0	0	0	0	0	0	0	0
33	0	0	0	0	2	0	0	0	2
34	0	1	0	0	2	0	0	3	3
42	0	1	0	0	2	0	0	3	3
43	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Estradiol más extracto vegetal a las 24 hrs.									
R	ES	EP	MC	ML	Me	A	No A	D	T
45	0	6	9	0	1	0	0	13	16
46	0	7	12	0	1	0	0	18	20
47	0	43	22	1	1	0	0	46	67
48	0	32	41	9	11	0	0	76	93
49	0	39	56	7	2	0	0	78	104
50	0	107	165	10	2	0	0	255	284
51	0	5	6	1	4	0	0	13	16
52	0	17	22	2	2	0	0	36	43
81	0	7	6	8	2	0	0	17	23
82	0	5	8	2	5	0	0	16	20
83	0	4	11	3	0	1	0	15	18
84	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Las siguientes tablas muestran las células en mitosis encontradas luego de 24 horas de ser inyectado los distintos tratamientos. R: número de rata; EL: epitelio luminal; EG: epitelio glandular; MC: miometrio circular; T: total.

Control salino a las 24 hrs.				
R	EL	EG	MC	T
21	1	0	35	36
22	1	0	9	10
23	4	0	36	40
24	1	0	15	16
66	12	2	101	115
67	4	0	26	30
68	5	1	43	49
69	1	0	12	13
79	23	0	17	40
80	11	1	11	23

Estradiol a las 24 hrs.				
R	EL	EG	MC	T
15	98	8	68	174
16	61	6	83	150
17	72	5	88	157
18	68	4	63	135
19	62	2	54	118
20	11	1	54	66
35	65	3	52	120
44	58	3	36	97
53	64	2	58	124
54	94	11	122	227
55	80	6	78	164

Extracto vegetal a las 24 hrs.				
R	EL	EG	MC	T
11	1	0	34	35
12	2	2	23	27
13	3	0	32	35
14	7	0	24	31
31	0	2	30	32
32	0	0	9	9
33	0	0	18	18
34	2	0	22	24
42	1	1	14	16
43	1	0	17	18

Estradiol más extracto vegetal a las 24 hrs.				
R	EL	EG	MC	T
45	21	2	29	52
46	41	3	39	83
47	44	3	41	88
48	31	1	36	68
49	30	6	58	94
50	23	11	49	83
51	44	2	72	118
52	55	2	74	131
81	65	3	25	93
82	79	4	27	110
83	89	1	54	144
84	106	10	51	167