



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.

EFFECTO ESTROGÉNICO EN ÚTERO DE RATA PRE-PÚBER Y ESTUDIO TOXICOLÓGICO EN RATAS ADULTAS DE UNA PLANTA MEDICINAL CHILENA

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

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

Memoria para optar al Título Profesional de Químico Farmacéutico

JUAN ENRIQUE GUTIÉRREZ DE LA PARRA

Santiago de Chile

2010

Dedicado con mucho cariño a mis padres y hermanos por su comprensión y consejo durante todos estos años. Con mucho amor para mi querida polola Paty por su apoyo incondicional y amor entregado cuando más lo necesité. A todos agradezco por brindarme estabilidad económica y emocional para llevar a cabo este gran logro que no hubiese podido realizar sin ustedes. Los quiero y los valoro.

AGRADECIMIENTOS

La finalización de esta tesis representa la culminación de largos años de esfuerzo y dedicación. Son tantas las personas a quienes debo agradecer por haber contribuido a mi formación personal y profesional que no puedo nombrarlas a todas.

Agradezco a mis estimados profesores directores de memoria Dr. Leonardo Gaete y Dr. Rodrigo Bustamante por el tiempo y dedicación empleados en el desarrollo de esta investigación y también por sus valiosos consejos y amistad brindada.

Doy las gracias también al Sr. QF. Igor Lemus por haber confiado en mí para realizar esta memoria y al honorable Dr. Andrei Tchernitchin por permitir desarrollarla en su laboratorio.

Mis retribuciones también están dirigidas para el personal del LEEPA y mis compañeros de tesis por su colaboración y amistad compartida durante mi estadía en el laboratorio.

Mis gratitudes van hacia mis amigos, compañeros y equipo de fútbol por los buenos momentos compartidos en el transcurso de todos estos años, los recordaré siempre.

Finalmente, doy "Gracias a la vida que me ha dado tanto".

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

ABREVIATURAS

CREB	cAMP response element- binding
E1	Estrona
E2	17 β -Estradiol
E3	Estriol
EG	Epitelio glandular
EL	Epitelio luminal
ES	Estroma superficial
EP	Estroma profundo
EREs	Elementos de respuesta a estrógenos
FE	Fitoestrógenos
LEEPA	Laboratorio de endocrinología experimental y patología ambiental
MC	Miometrio circular
Me	Mesometrio
ML	Miometrio longitudinal
NADP	Nicotinamida adenina dinucleótido difosfato
RE	Receptor estrogénico
RE α	Receptor estrogénico alfa
RE β	Receptor estrogénico beta
SERMs	Moduladores selectivos de receptores estrogénicos
SHFG	Globulinas de unión a hormonas sexuales
TRH	Terapia de reemplazo hormonal
TR	Tiempo de retención

CONTENIDO

Portada	Pág. I
Dedicatoria	Pág. II
Agradecimientos	Pág. III
Abreviaturas	Pág. IV
Contenido	Pág. V
Índice de Figuras	Pág. VII
Índice de Tablas	Pág. VIII
Resumen	Pág. IX
Abstract	Pág. XI
I. INTRODUCCIÓN	Pág. 1
Hipótesis	Pág. 15
Objetivos	Pág. 15
Objetivo General.....	Pág. 15
Objetivos Específicos.....	Pág. 15
II. MATERIALES Y MÉTODOS	Pág. 17
Reactivos	Pág. 17
Animales de experimentación	Pág. 17
Métodos	Pág. 17
Recolección y preparación del material vegetal	Pág. 17
Reactivos utilizados para el reconocimiento cualitativo de metabolitos secundarios	Pág. 18
Alcaloides.....	Pág. 18
Terpenos y esteroides.....	Pág. 18
Antraquinonas.....	Pág. 18
Flavonoides y cumarinas.....	Pág. 18

Taninos.....	Pág. 19
Saponinas.....	Pág. 19
Evaluación de respuestas estrogénicas.....	Pág. 19
Control negativo.....	Pág. 20
Control positivo.....	Pág. 20
Fracción 179ax.....	Pág. 20
Fracción 179ax+E ₂	Pág. 20
Ensayo de toxicidad aguda por vía oral en ratas adultas.....	Pág. 21
Análisis estadístico	Pág. 24
III. RESULTADOS.....	Pág. 24
Estudio químico-cualitativo de la planta.....	Pág. 24
Análisis mediante HPLC.....	Pág. 26
Respuestas estrogénicas generadas por la fracción 179ax	Pág. 27
Estudio toxicológico.....	Pág. 31
Análisis histopatológico.....	Pág. 31
IV. DISCUSIÓN.....	Pág. 33
V. CONCLUSIONES.....	Pág. 39
VI. REFERENCIAS.....	Pág. 41
VII. ANEXO.....	Pág. 48

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA	TÍTULO DE LA FIGURA	PÁGINA
1	Modelo clásico de la acción estrogénica.	
2	Compuestos que presentan actividad estrogénica.	
3	Biosíntesis de los estrógenos.	
4	Clasificación de los FE.	
5	Principales FE y comparación estructural con E2.	
6	Cromatograma de la fracción 179ax.	
7	Número de eosinófilos encontrados en el endometrio.	
8	Número de mitosis encontradas en el endometrio.	
9	Estimación de edema en estroma profundo.	
10	Estimación de hipertrofia en miometrio celular.	

ÍNDICE DE TABLAS

TABLA	TITULO DE TABLA	PÁGINA
1	Distribución de RE en tejidos humanos.	
2	Efectos de los estrógenos.	
3	Afinidad y transactivación de compuestos estrogénicos, FE y Disruptores endocrinos en comparación con el E2.	
4	División de grupos experimentales.	
5	Grupo experimental dosificados con 5000mg de extracto 179a por Kg de peso corporal	
6	Grupo control dosificados con 5000 mg de almidon por Kg de peso corporal.	
7	Identificación de metabolitos secundarios mediante CCF.	
8	Estudio comparativo de los esteroles encontrados con los patrones de B-sitosterol y lupeol.	
9	Estudio comparativo de los flavonoides encontrados con los siguientes patrones.	
10	Peso corporal de las hembras que recibieron el extracto 179a.	
11	Peso corporal de las hembras del grupo control.	
12	Toxicidad celular en el grupo tratado con extracto 179a.	
13	Toxicidad celular en el grupo control.	
14	Nº de peak, tiempos de retención y áreas generadas por la fracción 179ax.	

RESUMEN

Los estrógenos ejercen diversas acciones biológicas que incluyen proliferación y diferenciación de un gran número de células. Las actividades biológicas de los estrógenos son mediadas a través de dos receptores estrogénicos (RE) distintos, RE α y RE β , los que son miembros de una superfamilia de receptores nucleares. El mecanismo de acción de los estrógenos involucra su unión al RE seguido de la dimerización de éste y unión a elementos de respuesta a estrógenos (EREs) ubicados en los promotores de los genes blanco.

Los dos RE exhiben distintos patrones de distribución en los tejidos y tienen la capacidad de unirse a diferentes ligandos con diversas propiedades de transactivación. Estas diferencias pueden contribuir a la acción selectiva de los agonistas y antagonistas de RE en diferentes tejidos. Los RE pueden ser blancos farmacéuticos para mejorar la terapia de reemplazo hormonal (TRH) en mujeres post-menopáusicas y para nuevas drogas de quimioterapia en cánceres hormono-dependientes. La TRH puede restaurar los niveles de estrógeno pero incrementa en la mujer los riesgos de enfermedades cardiovasculares, demencia y cáncer de mamas. Algunos estudios señalan que el RE α está involucrado en la proliferación de células en cáncer de mamas, mientras que se ha demostrado que el RE β actúa en la supresión de tumores.

Entre los compuestos que pueden unirse a los RE, se encuentran los moduladores selectivos de RE (SERMs) que tiene la habilidad de actuar como agonistas o antagonistas dependiendo del contexto celular o la isoforma de RE involucrado. Algunos SERMs como raloxifeno y tamoxifeno son usados en clínica para el tratamiento de osteoporosis y cáncer de mamas estrógeno dependiente.

Los fitoestrógenos (FE) son compuestos derivados de plantas que pueden imitar o modular la acción que producen los estrógenos endógenos por unión a los RE. Estos grupos de compuestos incluyen flavonoides, cumestanos y lignanos.

Las características estructurales de los FE permiten su unión a RE y pueden exhibir actividad estrogénica o antiestrogénica. La mayor parte de los FE usados en TRH activa ambos sub-tipos de RE. Los FE presentan distinta afinidad por las diferentes isoformas de los RE, por lo que podríamos obtener de ellos las respuestas beneficiosas deseables y evitar las de riesgo. La búsqueda de nuevos principios activos o de compuestos con actividad estrogénica que sean inocuos para el ser humano representa una buena estrategia para contribuir a la TRH.

ABSTRACT

ESTROGENIC EFFECTS IN PREPUBERTAL RAT UTERUS AND TOXICOLOGICAL STUDIES IN ADULTS RATS OF A MEDICINAL CHILEAN PLANT

Estrogens have diverse biological actions including proliferation and differentiation of a number of cells. Biological activities of estrogen are mediated through two distinct and functional estrogen receptors (ER), ER- α and ER- β , which are members of a large superfamily of nuclear receptors. The mechanism of ER action involves estrogen binding intracellular ERs followed by dimerization of receptor and binding to specific estrogen response elements (EREs) located in the promoters of target genes.

Two ERs exhibit distinct tissue distribution patterns, different ligand-binding ability and trans-activational properties. This difference could contribute to the selective action of ER agonists and antagonists in different tissues. ER has been a pharmaceutical target for hormonal therapy (HT) in menopausal women and for chemotherapeutic drugs against reproductive cancers. HT can restore estrogen levels but increases the women's risk of heart disease, dementia and breast cancer. ER- α has been known to cause proliferation of breast cancer cells, while ER- β has been demonstrated to be a tumor suppressor.

Among the compounds that can bind to ERs, selective ER modulators (SERMs) have the ability to act as agonists or antagonists depending on the cellular context and ER isoforms involved. The well known SERMs, raloxifene and tamoxifen are used clinically in the treatment of osteoporosis and estrogen dependent breast cancer.

Phytoestrogens are plant derived compounds that can mimic or modulate the actions of endogenously produced estrogens by binding to ERs. These groups of compounds include flavonoids, stilbenes and lignans. The structural features of them confer ability to bind ERs and can exert estrogenic or anti-estrogenic activity. Most of the phytoestrogens used in HT activate both subtypes of ERs.

Phytoestrogens that selectively activate ER- α or ER- β might exert some of the beneficial effects, avoiding the adverse side effects. The search for new active compounds with estrogenic activity that are safe for humans is a good strategy to contribute to HRT.

I. INTRODUCCIÓN

Los estrógenos son compuestos de naturaleza esteroidea, importantes para el desarrollo y función del sistema reproductivo, son reguladores claves para el metabolismo de tejido óseo y tienen efectos cardioprotectores. También modulan la función del sistema nervioso central y controlan el comportamiento sexual (Jordan 2001). La mayor parte de las respuestas estrogénicas son mediadas por los RE α y β (Green y cols., 1986) los que pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares de factores de transcripción inducibles por ligando (Mangelsdorf y cols., 1995), aunque algunas respuestas estrogénicas también pueden ser mediadas por otros receptores de membrana (Watson y Gametchu, 1999).

Los RE pueden estar ubicados tanto en la membrana plasmática, como en los compartimentos nucleares y citoplasmático. La presencia del receptor de estrógeno en la membrana plasmática fue descrito por primera vez por Pietras y Szego, 1977. El modelo clásico de la acción del RE, ubica a éste en localización principalmente nuclear (Gasc y Baulieu, 1986). Este modelo señala que en ausencia de la hormona, el RE forma monómeros asociados con complejos inactivos, compuestos por proteínas heat-shock e inmunofilinas, entre otros. La unión del estrógeno provoca la dimerización del RE y su unión a secuencias específicas de regiones regulatorias de genes blanco como se ilustra en la Figura 1 (Ylikomi y cols., 1998).

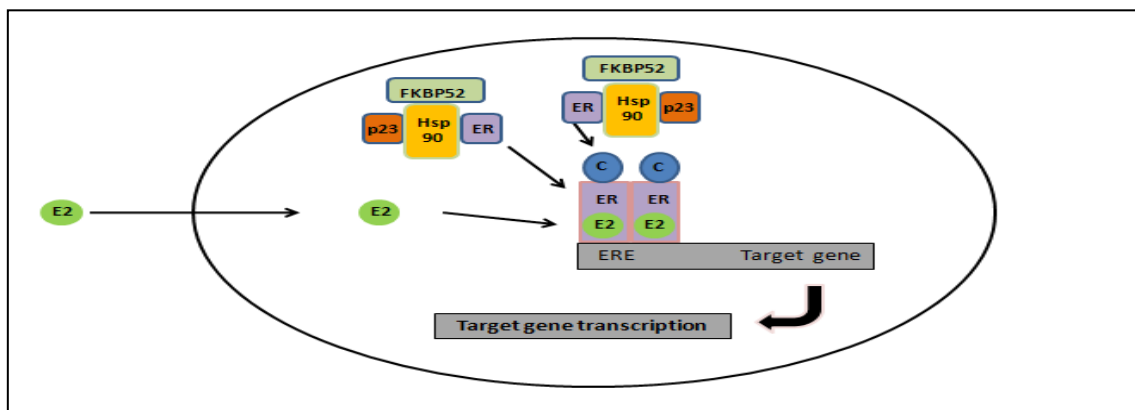


Figura 1. Modelo clásico de la acción estrogénica. Figura adaptada de Ylikomi y cols., 1998.

Estudios de inmunoprecipitación de cromatina, han confirmado que la asociación de RE α con promotores de genes blanco es inducida por estrógenos (Shang y cols., 2000). Al unirse los RE dimerizados con el ADN, modulan la expresión de genes mediante la interacción con factores conocidos como coactivadores, tales como, P160 o proteínas unidas a CREB (cAMP response element-binding). El complejo RE-coactivador puede modular la estructura de la cromatina, facilitando el acceso de la maquinaria transcripcional al ADN (Robyr y cols., 2000).

Además de la vía antes definida, otros mecanismos de acción estrogénica han sido caracterizados recientemente. Entre ellos, la regulación por parte de los RE de la transcripción de genes a través de interacciones proteína-proteína con otros factores de transcripción o bien, al interactuar con componentes de otras cascadas de señalización. De esta forma se generan vías de señalización cruzadas lo que añade mayor complejidad a la regulación transcripcional a través de los RE.

Un avance importante en la caracterización de la acción de los estrógenos y sus receptores, fue la clonación del RE β (Kuiper y cols., 1996). Con la clonación de este RE y del conocimiento parcial de su complejo mecanismo de acción, se incrementó exponencialmente el conocimiento de los diversos efectos fisiológicos de los estrógenos. Aún cuando no hay consenso, se suele aceptar que los estrógenos generan dos tipos de respuestas estrogénicas, las tardías y las tempranas (antes denominadas genómicas y no genómicas, respectivamente), en función del tiempo transcurrido hasta la aparición del efecto.

La disociación de las respuestas a estrógenos en grupos separados, que puedan ser selectivamente estimuladas, inhibidas o completamente bloqueadas, sugirió la existencia de múltiples mecanismos de acción estrogénica en el útero de rata pre-púber (Tchernitchin y Galand, 1983).

Los estrógenos generan dos tipos de respuestas: respuestas tardías y tempranas.

Respuestas tardías: Éstas presentan su máxima intensidad a las 24 hrs después de la administración de estradiol y tienen una duración que alcanza horas y hasta días. Se caracterizan por involucrar transcripción génica, la que concluye en la expresión de proteínas. Algunas de las consecuencias de estas respuestas son: aumento del volumen celular (hipertrofia), incremento en la proliferación de diversos tipos celulares uterinos y disminución de apoptosis celular, entre otras (Luconi y cols., 2002).

Respuestas tempranas: Éstas son de desencadenamiento rápido y corta duración (generalmente, minutos) (Luconi y cols., 2002). Son provocadas por ciertos ligandos y se producen luego de la interacción entre éstos con receptores ubicados a nivel de membrana (Gruber y cols., 2002). Son mediadas por señalizaciones intracelulares rápidas. Los efectos incluyen: eosinofilia uterina, aumento de líquido en el espacio extracelular (edema), incremento en la permeabilidad vascular y aumento de histamina (Tchernitchin y Galand, 1983), además tienen un efecto sobre los osteoblastos, modificando a través de su membrana, la apoptosis, proliferación y diferenciación de éstos (Nilsson y cols., 2001).

La activación de los RE puede derivar tanto en respuestas citoplasmáticas como en regulación génica y en tal caso, se aprecia una sobreposición con las ya citadas respuestas tardías (Marino y cols., 2006).

Como ya se señaló, existen dos tipos de receptores estrogénicos bien caracterizados, RE α y RE β , la distribución de sus RNAm fue estudiada en tejidos de rata mediante técnicas de RT-PCR (Kuiper y cols., 1997), y se determinó que su expresión en los tejidos es similar a la observada en seres humanos (Taylor y Al-Azzawi, 2000).

La ubicación selectiva de los RE se resume en la Tabla 1.

Tabla 1.- Distribución de receptores estrogénicos en tejidos humanos.

Receptores	Ubicación	Acción
RE α	Hígado, testículos, glándula pituitaria, epidídimo, útero y riñón.	En hígado estimulan producción de SHBG; incrementan concentración de sales biliares.
RE β	Tracto gastrointestinal, músculo, piel, ovario y glándula prostática.	Incrementan las concentraciones de agua y ácido hialurónico y alteran el metabolismo del colágeno.
RE α y β	Ovario, útero, Mama, Sistema cardiovascular, tracto urogenital, hueso.	Presentan efecto protector cardiovascular y participan en el desarrollo de órganos sexuales femeninos

Adaptado de Ruggier y Link, 2002.

Propiedades químicas de los estrógenos: Muchos compuestos esteroideos y no esteroideos, algunos de los cuales se muestran en la Figura 2, tienen actividad estrogénica. Los estrógenos son estructuras de 18 carbonos que contienen un anillo fenólico A, (un anillo aromático con un grupo hidroxilo en el carbono 3), y un grupo β -Hidroxilo o cetona en la posición 17 del anillo D. El anillo A es la principal característica estructural, de la cual depende la unión selectiva y de alta afinidad a los RE (Hu y Aizawa, 2003). Casi todas las sustituciones alquilo en ese anillo alteran esa unión, pero las sustituciones en el anillo C o D pueden tolerarse. Por otro lado, las sustituciones etinilo en la posición 17 incrementan la potencia por vía oral al inhibir el metabolismo hepático de primer paso.

STEROIDAL ESTROGENS				NONSTEROIDAL COMPOUNDS WITH ESTROGENIC ACTIVITY
<i>Derivative</i>	R_1	R_2	R_3	
Estradiol	—H	—H	—H	p, p'-DDT
Estradiol valerate	—H	—H	$\text{—C(=O)(CH}_2\text{)}_3\text{CH}_3$	
Estradiol cypionate	—H	—H	$\text{—C(=O)(CH}_2\text{)}_2\text{—}$	
Ethinyl estradiol	—H	—C≡CH	—H	Bisphenol A
Mestranol	—CH ₃	—C≡CH	—H	
Quinestrol		—C≡CH	—H	
Estrone	—H	—*	—O*	Genistein
Estrone sulfate	—SO ₃ H	—*	—O*	
Equilin†	—H	—*	—O*	

*Designates C 17 ketone.

†Also contains 7, 8 double bond.

Figura 2. Compuestos que presentan actividad estrogénica. Loose-Mitchell D, Stancel GM. Estrogens and progestins. En: Hardman JG, Limbird LE. Goodman & Gilman's The Pharmacological basis of Therapeutics. 10° ed. New York: Mc-Graw-Hill Company; 2001. pp.1598.

Biosíntesis de estrógenos: Los estrógenos esteroidales se forman a partir de androstenediona o testosterona como precursores inmediatos (ver Figura 3). La reacción comprende aromatización del anillo A, y ésta es catalizada en tres pasos por un complejo de la enzima monooxigenasa de citocromo P450 (aromatasa o CYP19) que utiliza la forma reducida del NADPH y oxígeno molecular como sustratos. En el primer paso de esta reacción, el C19 sufre hidroxilación y posteriormente una segunda hidroxilación elimina el grupo C19 hidroximetil recién formado, una hidroxilación final de C2 forma un intermediario inestable que se reordena para formar el anillo fenólico A. La reacción completa consume tres moléculas de oxígeno y tres de NADPH.

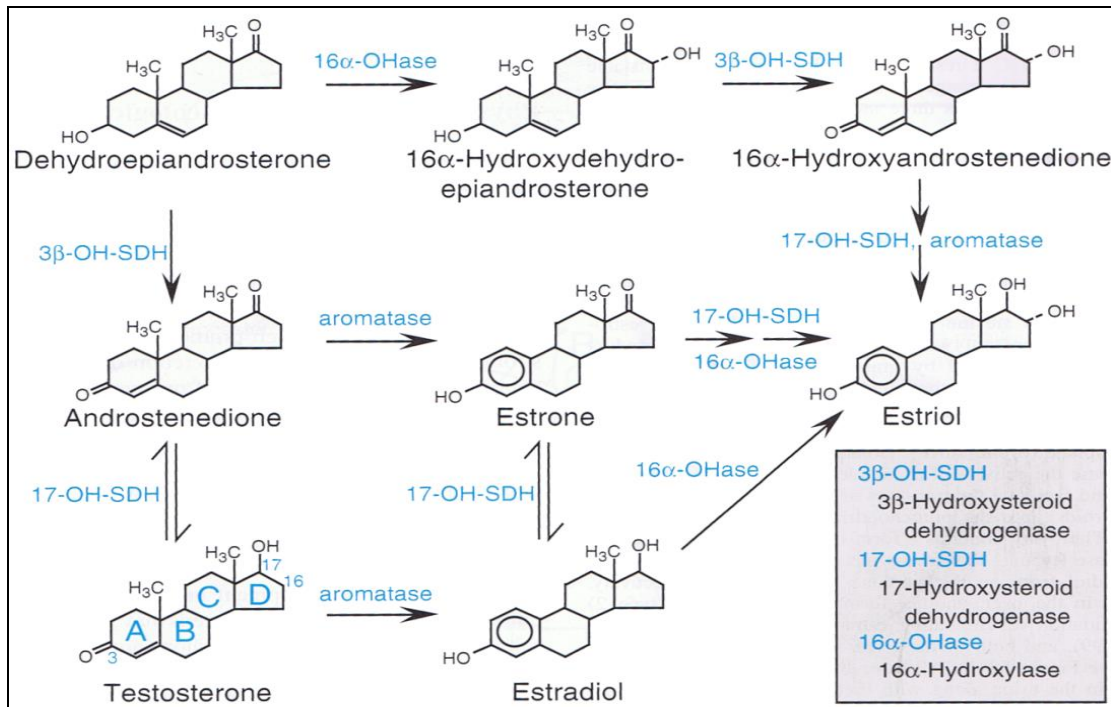


Figura 3. Biosíntesis de los estrógenos. Loose-Mitchell D, Stancel GM. Estrogens and progestins. En: Hardman JG, Limbird LE. Goodman & Gilman's The Pharmacological basis of Therapeutics. 10^o ed. New York: Mc-Graw-Hill Company; 2001. pp.1599.

Estrógenos endógenos: Durante la vida fértil de una mujer el ovario secreta estrógenos y gestágenos, estas hormonas regulan distintas funciones en el organismo femenino: los estrógenos promueven la proliferación y desarrollo de tejidos específicos, proceso responsable de la aparición de los caracteres sexuales secundarios de la mujer, por otro lado, la función principal de la progesterona (gestágeno principal) consiste en preparar al útero para la gestación y a las mamas para la lactancia (Guyton y Hall, 2006). En la mujer normal no gestante, solo los ovarios secretan cantidades importantes de estrógenos, aunque también son producidos en pequeñas cantidades por las glándulas suprarrenales. Los tres estrógenos presentes en cantidades significativas en el plasma de la mujer son 17β-Estradiol (E2), Estrona (E1) y Estriol (E3), de estos tres el más importante, ya que se encuentra en mayor concentración es el E2 (Ruggiero y Likis, 2002). Su potencia es 12 veces la de E1 y 80 veces la de E3. Por lo tanto, su efecto estrogénico es muchas veces mayor que el de los otros estrógenos juntos (Guyton y Hall, 2006).

Función de los estrógenos en el Metabolismo: Estudios en humanos y en roedores han descrito que los RE son importantes mediadores de la acción del estrógeno sobre el metabolismo de lípidos y glucosa. Se ha informado que los estrógenos influyen directamente sobre la cantidad de tejido adiposo, modulando la lipogénesis, lipólisis y adipogénesis, o indirectamente al regular el apetito o el gasto de energía (Cooke y Nazz, 2004). El concepto de que los estrógenos intervienen en el metabolismo, deriva de la observación del desarrollo de obesidad y resistencia a la insulina en mujeres post menopáusicas, como resultado de bajas concentraciones de estrógenos. Es interesante resaltar que la TRH normaliza estos síntomas (Ahmed-Sorour y Bailey, 1980). En la tabla 2 se presenta un resumen de los principales efectos atribuidos a los estrógenos.

Tabla 2.- Efectos de los estrógenos

Benéficos
<ul style="list-style-type: none"> • Incrementan la concentración del factor de crecimiento de fibroblastos
<ul style="list-style-type: none"> • Inhiben la actividad osteoclastica en los huesos y, por tanto, disminuyen la resorción ósea
<ul style="list-style-type: none"> • Mantienen bajos los niveles de colesterol y estimulan la producción de colesterol HDL
<ul style="list-style-type: none"> • Previenen el deterioro cognitivo y disminuyen el riesgo de fractura en mujeres post menopáusicas
<ul style="list-style-type: none"> • Mejoran los síntomas climatéricos (sofocos, trastornos del ánimo y dispareunia)
<ul style="list-style-type: none"> • Previenen el desarrollo de osteoporosis.
Deletéreos
<ul style="list-style-type: none"> • Aumentan el riesgo de cáncer de mama y endometrial en TRH.
<ul style="list-style-type: none"> • Incrementan el riesgo de eventos tromboembólicos en usuarias de anticonceptivos orales (ACO).

Adaptada de: Ruggier y Link, 2002.

Estrógenos y función ósea: Los estrógenos cumplen una importante función en la homeostasis y metabolismo del hueso. Al inicio de la pubertad inician su desarrollo, y más tarde limitan el crecimiento longitudinal al inducir el cierre de la placa epifisaria. En adultos, varios esteroides influyen directamente en la remodelación del hueso. E2, en particular, es crucial para mantener la masa ósea en mujeres (Migliaccio y cols., 1996), esto se evidencia con la rápida pérdida de hueso trabecular y desarrollo de osteoporosis, que ocurre después de una ovariectomía o en el transcurso del climaterio (Turner, 1999).

La inhibición de la resorción ósea osteoclástica y la estimulación de la formación ósea osteoblástica, forman la base de la preservación del hueso mediada por E2. Estas acciones son mediadas a través de los RE α y β presentes en el hueso. En humanos y roedores, ambos RE han sido identificados en osteoblastos y osteocitos (Hoyland y cols., 1997), así como en condrocitos de las placas de crecimiento epifisarias (Nilsson y cols., 1999). Sin embargo, la presencia de los RE en osteoclastos maduros es aún controversial (Huang y cols., 1998).

Estrógenos y Terapia de Reemplazo Hormonal (TRH): Un volumen creciente de información confirma que la estrogenoterapia permite reducir o eliminar en forma significativa las complicaciones relacionadas con el climaterio. Particular atención clínica merecen el alivio de los síntomas climatéricos y las manifestaciones de la atrofia urogenital (Udoff y cols., 1995). Estudios epidemiológicos confirman una disminución del riesgo de morbimortalidad cardiovascular (Busch y cols., 1987), y protección contra la pérdida de masa ósea entre las mujeres usuarias de estrógenos comparados con las no usuarias (Ettinger y cols., 1985).

En la mujer postmenopáusica las dosis mínimas de estrógenos necesarias para lograr estos objetivos, invariablemente van a estimular el endometrio, induciendo diversos grados de proliferación, los que se pueden traducir en la aparición de metrorragia de diferentes características. La administración prolongada de estrógenos se asocia con un incremento en el riesgo de hiperplasia y carcinoma endometrial (Whitehead y cols., 1979).

El agregado secuencial de progestina logra una efectiva oposición de esta excesiva proliferación endometrial al frenar las mitosis uterinas, inducir transformación secretora y promover la descamación periódica de un endometrio maduro. Para evitar la hiperplasia, la dosis y duración de la administración del progestágeno son críticas (Gambrell, 1976). La protección endometrial resulta ser la única razón bien demostrada para agregar una progestina a la estrogenoterapia (Whitehead, 1982).

En la actualidad el foco del problema se centra en determinar y evaluar mejores esquemas de TRH. Cada vez resulta más evidente que para lograr los máximos beneficios, el tratamiento debe ser por periodos prolongados, sin embargo, menos del 20% de las mujeres menopáusicas en Norteamérica cumple a largo o mediano plazo con esa indicación (Udoff y cols., 1995).

Fitoestrógenos: Los FE son compuestos polifenólicos no-esteroidales, presentes en diversas plantas (Nilsson y cols., 2001). Su estructura química es muy similar al E2 y también a otros estrógenos sintéticos (Burton y Wells, 2002). Existen 3 subclases de estos compuestos: los cumestanos, los lignanos y flavonoides, siendo estas últimas las más estudiadas (Nilsson y cols., 2001). Los FE se encuentran en alimentos de consumo habitual, tales como, granos de cereal, leguminosas, frutos secos, soya, etc. (Allué, 2001).

En plantas, la síntesis de FE, generalmente coincide con periodos de estrés tales como infecciones por plagas, sequías o disminución de nutrientes (Howitz y Sinclair, 2008). Recientemente se ha sugerido que las concentraciones de FE sintetizados en las plantas regulan la resistencia al estrés en los animales. Este fenómeno, denominado “xenohormesis”, propone que a través de señales químicas por parte de los autótrofos (plantas), se pueda advertir a los heterótrofos (mamíferos) de posibles cambios ambientales desfavorables (Howitz and Sinclair, 2008).

Esta teoría ha sido adoptada para explicar los beneficios a la salud que conlleva el consumo de fitoquímicos inducidos por stress, como fitofenoles, estilbenos (resveratrol encontrado en el vino tinto), catequinas (epigallocatequina en té verde), antocianinas y la más relevante de todas, las isoflavonas. Se sabe que éstas últimas, dada su estructura química, poseen gran afinidad por los RE y que una dieta rica en FE puede prevenir fenómenos asociados al climaterio, tales como, osteoporosis y enfermedades cardiovasculares (Kostelac y cols., 2003). El interés en los FE, particularmente los que se encuentran en la soya, se fundamenta en estudios epidemiológicos que demuestran una baja incidencia de cáncer de mama en países con alto consumo, estudios in vivo e in vitro demuestran su potencial rol en la prevención de esta neoplasia (Limer y Speirs, 2004). El cambio en la dieta es señalado como uno de los pocos factores de riesgo modificable para prevenir el cáncer de mama, el cual representa la segunda causa de muerte por cáncer en la mujer. Por lo tanto, incluso una débil función de protección de estos compuestos puede tener importantes implicancias en la salud pública.

Clasificación de los FE: Los FE se clasifican en distintos grupos de acuerdo a su estructura química:

1) Isoflavonas: encontrados en la soya, lentejas y otras legumbres, los componentes activos principales son la genisteína y la daidzeína.

2) Lignan: encontrados en linaza y otras semillas aceitosas, los compuestos activos son el enterodiol y la enterolactona, ambos metabolitos originados por la flora bacteriana intestinal.

3) Cumestanos: encontrados en el trébol rojo, semillas de girasol y brotes de soya; el compuesto activo principal es el cumestrol (Ruggiero y Likis, 2002).

En la figura 4 se observa la clasificación general de los FE más relevantes.

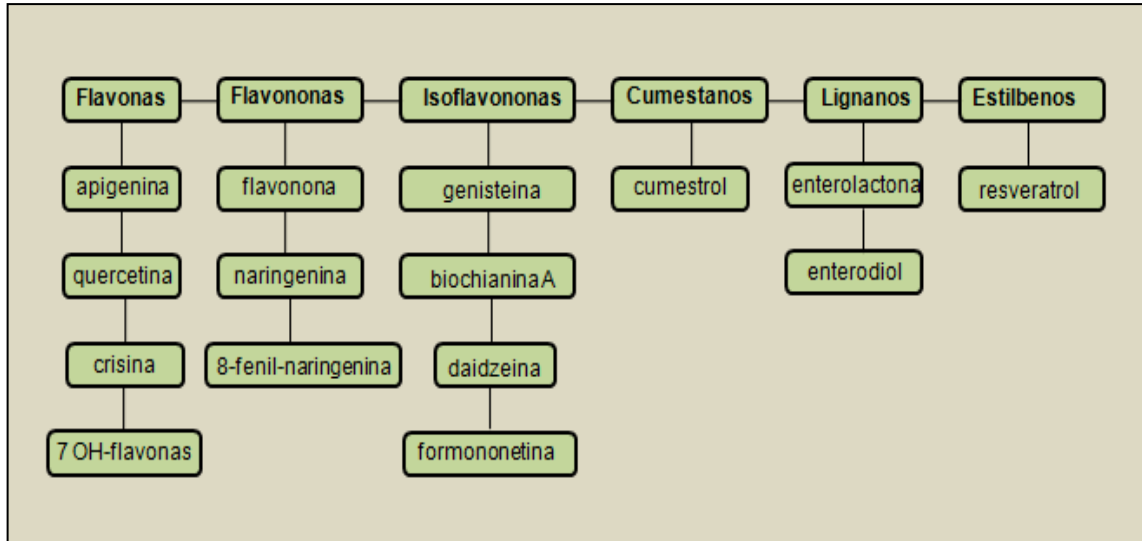


Figura 4. Clasificación de los FE. Adaptada de Rice and Whithead, 2006.

Estructuras de FE comparadas con E2: Sabiendo que la estructura de los FE es similar a la de los estrógenos, es posible suponer también su capacidad de unirse al receptor de estrógeno de membrana o bien, de ingresar a la célula, generando una respuesta de tipo estrogénica. En la capacidad de unión de cualquier ligando a los RE, son importantes, la presencia de un anillo aromático y de grupos hidroxilo, así como el carácter hidrofóbico de la estructura (Hu y Aizawa, 2003). El E2 contiene dos grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 17 de un esqueleto esteroideo de carácter hidrofóbico, a una distancia aproximada entre sí de 1,2 nm (12 Å).

Como puede apreciarse en la Figura 5, existen notables similitudes estructurales de los FE con el E2, que se traducen en la capacidad de unión de los mismos al RE, si bien con diferente grado de afinidad según el compuesto de que se trate. Un FE ideal sería aquel que mediante esta unión tenga la capacidad de inducir respuestas favorables y no las de riesgo.

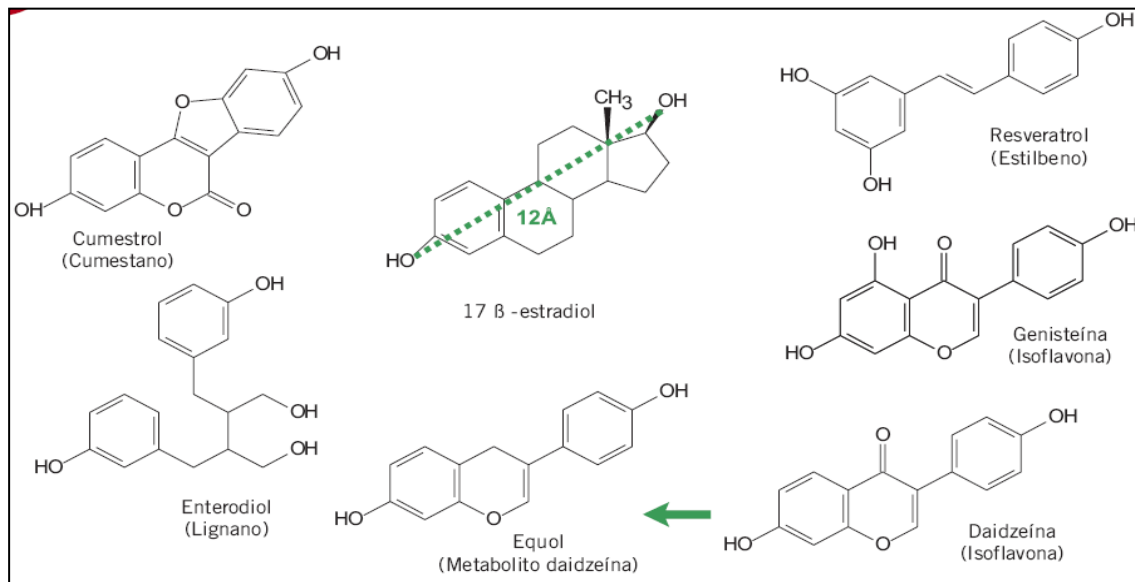


Fig 5. Principales FE y comparación estructural con E2.

Afinidad de FE y transactivación de RE: La afinidad de los FE por los RE causa cambios en un gran número de sistemas regulados por estrógenos, tales como, el cardiovascular, metabólico, reproductivo, esquelético y sistema nervioso central (SNC). Una característica importante de los FE, particularmente genisteína y daidzeína, es la capacidad de unirse a ambos RE (Kuiper y cols., 1996; Kuiper y cols., 1997), con preferencia de la primera por el RE β . En la tabla 3 se muestra la afinidad y transactivación de FE y otros compuestos estrogénicos.

La afinidad específica de los FE por los RE puede generar tanto una respuesta estrogénica como antiestrogénica, lo cual depende del tejido en que se ubique el receptor o la concentración de E2 circulante. Por ejemplo, en varias líneas celulares, con la presencia de niveles fisiológicos (1nM) de E2, la genisteína actúa como antagonista estrogénico, mientras que en mujeres postmenopáusicas en donde el nivel de E2 es de (0,01nM), se comporta como agonista (Hwang y cols., 2006).

Tabla 3. Afinidad y transactivación de compuestos estrogénicos, FE y Disruptores endocrinos en comparación con el 17 β -estradiol.

Compuestos		Afinidad			
		transactivación		RE α	RE β
		RE α	RE β	RE α	RE β
Compuestos estrogénicos	17 β -estradiol	100	100	100	100
	Dietilestilbestrol(DES)	236	221	116	69
	Tamoxifeno	4	3	6	2
FE	Genisteína	4	87	198	182
	Daizeína	0,1	0,5	97	80
	Formononetína	< 0,01	< 0,01	6	2
	Biochanina A	< 0,01	< 0,01	36	53
	Ipriflavona	< 0,01	< 0,01	11	3
	Cumestrol	20	140	102	98
Disruptores endocrinos	Bifenol A	0,01	0,01	50	41
	O,P-DDT	0,01	0,02	54	10
	Nonifenol	0,05	0,09	62	34
	Metoxicloro	< 0,01	< 0,01	9	2

Adaptada de: Kuiper et al.1998. La afinidad y transactivación del 17 β -estradiol se estableció arbitrariamente como 100.

FE y prevención de osteoporosis: La incidencia de fracturas relacionadas con osteoporosis es mucho más baja en Asia que en occidente (Tobais y cols., 1994). Distintos estudios en animales han demostrado efectos óseos favorables con isoflavonas (Reginster, 1993). Un estudio encontró aumentos significativos en la densidad mineral ósea, luego de 6 meses, en mujeres postmenopáusicas que consumieron proteína de soya vs controles que consumieron caseína. En otro ensayo se evaluaron con densitometrías anuales por 3 años a 132 mujeres que se agruparon en 4 grupos de acuerdo al nivel de ingesta de FE, en éstas se logro mantener la masa ósea, con efecto dosis dependiente (Ho y cols., 2001).

FE y síntomas del climaterio: En Asia, únicamente el 10 a 20% de mujeres postmenopáusicas experimenta sofocos comparados con el 70 a 80% de mujeres que viven en países occidentales (Tang, 1994). Esta diferencia se explica porque las isoflavonas en la soya, alimento tradicional en la dieta asiática, influyen sobre los cambios de los niveles hormonales durante el climaterio (Adlercreutz, 1990). En un estudio randomizado y doble ciego, se evaluó el efecto de la ingesta diaria por 12 semanas con proteína de soya vs placebo (caseína) en 104 mujeres postmenopáusicas que sufrían bochornos. Las pacientes que consumieron soya presentaron una reducción del 45% en los bochornos diarios.

Por los antecedentes expuestos, los estrógenos cumplen una importante función biológica. Una vez que su producción disminuye, se generan una serie de alteraciones metabólicas. La TRH ha buscado reponer los niveles de estrógenos para lo cual se ha recurrido a una serie de compuestos sintéticos. Aún cuando se ha reportado una mejoría para una serie de síntomas, lamentablemente se ha informado una serie de efectos adversos tales como cáncer de endometrio y de mamas. La búsqueda del estrógeno ideal, aquel que genere los efectos favorables atribuidos a los estrógenos, pero que no genere efectos deletéreos, ha conducido a buscar en los FE, nuevos principios activos susceptibles de ser utilizados con o sin modificaciones químicas.

En el presente estudio se analizó el potencial estrogénico de una planta medicinal endémica que ha sido utilizada con fines medicinales por culturas altiplánicas. Para ello se colectó la planta en la XV región del país a 2500 metros de altura y se sometió a fraccionamiento con solventes de polaridad creciente. Los posibles efectos estrogénicos de una de las fracciones fueron comparados con los del estradiol, mediante la evaluación de edema, hipertrofia, mitosis y eosinofilia, utilizando el modelo de útero de rata pre-púber. Además, el extracto etanólico de la planta fue sometido a un estudio de toxicidad en ratas adultas mediante el procedimiento de dosis fijas, administrando una dosis de 5000 mg/Kg de peso fraccionada en el transcurso de 8 horas de acuerdo al protocolo establecido por la Guía N° 420 de la OECD.

HIPÓTESIS

Hipótesis Nula (H_0):

- I. La fracción 179ax no tiene efecto estrogénico en útero de rata pre-púber.
- II. El extracto 179a no es letal ni genera signos de toxicidad al ser administrado a ratas adultas en dosis de 5000 mg/Kg.

Hipótesis Alternativa (H_1):

- I. La fracción 179ax tiene efecto estrogénico en útero de rata pre-púber.
- II. El extracto 179a es letal y/o genera signos de toxicidad al ser administrado a ratas adultas en dosis de 5000 mg/Kg.

OBJETIVOS

Generales

- Evaluar la actividad estrogénica y toxicidad de una planta endémica usada con fines ginecoterapéuticos por pueblos originarios.

Específicos

- Preparar el extracto alcohólico de la planta en estudio.
- Fraccionar el extracto con solventes de polaridad creciente.
- Caracterizar cualitativamente el extracto y sus fracciones, mediante comparación con estándares de FE utilizando cromatografía en capa fina.
- Cuantificar respuestas estrogénicas en úteros de ratas pre-púberes mediante la extracción de cuernos uterinos y análisis morfométricos utilizando técnicas histológicas convencionales, apoyadas por microscopía.
- Evaluar mitosis, eosinofilia, hipertrofia y edema, generadas por la fracción 179ax y por el E2.

- Comparar las respuestas estrogénicas inducidas por la fracción 179ax y por E2, mediante el test de Wilcoxon con 5% de nivel de significancia estadística.
- Conducir un estudio de toxicidad aguda por vía oral en ratas, utilizando un protocolo internacionalmente validado.
- Evaluar el potencial tóxico del extracto 179 a, utilizando una dosis de 5000mg/Kg de peso, mediante el procedimiento de dosis fraccionada en el transcurso de 8 horas.
- Eutanasia de los animales con exceso de anestésico, necropsia y obtención de órganos (hígado, riñón y cerebro) para su fijación.
- Identificar signos de toxicidad en hígado, riñón y cerebro mediante análisis histopatológico (objetivo que será asumido por un experto en esta área).

II. MATERIALES Y MÉTODOS

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

Animales de experimentación. Se utilizaron ratas hembras pre-púber (21días) y adultas (2,5 meses) de la cepa Sprague Dawley. Estos animales se obtuvieron del Bioterio Central de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile. Los animales se mantuvieron con una dieta normal de *pellet*, agua *ad libitum*, ciclos de luz y oscuridad, y a una temperatura ambiental de 21°C. Todos los procedimientos se desarrollaron de acuerdo a los protocolos aprobados por el Comité Ético Institucional de la misma Facultad.

Métodos

Recolección y preparación del material vegetal. La planta fue recolectada en Parinacota XV región, a 2500 m de altura en el mes de noviembre del año 2008. La planta fue secada a temperatura ambiente durante 4 semanas y luego fue sometida a molienda en trituradora moulinex. Se dispuso 500g de la planta en botella de vidrio color ámbar y sobre ella se agregaron 1000mL de etanol absoluto. Dos veces por semana la botella se sometía a agitación; a este extracto se le denominó 179a.

Un Kg de la planta mantenida en etanol como se mencionó anteriormente, se llevó a sequedad. Luego el polvo seco se fraccionó hasta agotamiento con dos solventes, diclorometano, el cual originó la fracción 179ay y con etanol, el cual originó la fracción 179ax.

En el marco del proyecto anillo ACT-07, el extracto 179a y las dos fracciones obtenidas (179ax y 179ay) fueron analizadas por su capacidad de inhibir el crecimiento de dos líneas celulares en cultivo: MCF-7 Y MDA-MB-231(células de cáncer de mama con y sin receptor de estrógeno respectivamente). Los resultados obtenidos por el grupo de investigación liderado por el Dr. Juan Villena, indicaron que la fracción más promisoría era la 179ax. Por lo anteriormente expuesto, en esta tesis de pregrado se evaluó el potencial toxicológico del extracto 179a y la actividad estrogénica de la fracción 179ax.

Reactivos utilizados para el reconocimiento cualitativo de metabolitos secundarios:

Alcaloides: La presencia de estos metabolitos se reconoce mediante el Reactivo de Dragendorff, el cual está constituido por yoduro doble de bismuto y potasio, y permite la detección de alcaloides y aminas cuaternarias.

Terpenos y esteroides. Estos metabolitos se reconocen mediante el Reactivo de Liebermann-Burchard: Se emplea para la observación de distintos compuestos orgánicos como, por ejemplo, triterpenos, (al revelar presentan color morado) y esteroides, cuya coloración varía en el tiempo desde el color rosado al verde y posteriormente al pardo, entre otros. El reactivo está constituido por partes iguales de anhídrido acético y de ácido sulfúrico.

Antraquinonas: El Reactivo de Börntrager se emplea para investigar la presencia de grupos antraquinónicos, especialmente los oxidados. Consiste en agregar un reactivo alcalino (NH_3 o solución de NaOH o KOH). La aparición de una coloración roja indica la presencia de este tipo de compuestos.

Flavonoides y cumarinas: Los Vapores de NH_3 permiten identificar flavonoides y cumarinas, que se caracterizan por presentar fluorescencia a la luz UV a 366 nm. Al exponer los flavonoides a los vapores de amoníaco, dan una coloración amarilla al visible y su fluorescencia se intensifica o varia, al exponerlos a la luz UV.

Taninos: El Reactivo de FeCl_3 al 1% se utiliza para identificar compuestos que poseen en su estructura una función fenólica, como los taninos. Según la naturaleza química del tanino se observan coloraciones que varían desde el azul (taninos pirogálicos), hasta el verde (taninos catéquicos). Otros compuestos fenólicos, como los flavonoides, también presentan coloración verde. La identificación de taninos se realizó agregando una o dos gotas de FeCl_3 al extracto y sus fracciones.

Saponinas: El índice de espuma se utiliza para detectar la presencia de saponinas (sustancias con propiedades tensoactivas), a través de la formación de espuma persistente durante 15 minutos, usando 1g de extracto vegetal seco, en un volumen apropiado de agua destilada.

Para complementar la información obtenida mediante CCF, se analizó la fracción 179ax en un equipo HPLC Shimadzu LC10A - 10AVP, utilizando una mezcla de solventes de composición variable (metanol/agua), detector de luz ultravioleta de longitud variable, flujos entre 0,2 y 1mL por minuto y como fase estacionaria se empleó una columna Bondapack C-18 (Merck) de 250 x 4,6 mm y 5 μm de tamaño de partícula. Se utilizó un inyector Reodhyme de 20 μL .

Evaluación de respuestas estrogénicas: Se realizó un estudio experimental doble ciego: estudio con muestra de tipo probabilística, en donde los elementos investigados tuvieron la misma probabilidad de ser seleccionados dentro del conjunto total.

Para el estudio de respuestas tempranas y tardías se utilizaron 80 ratas hembra Sprague-Dawley de 21 días de edad pre-púber, cuyos pesos fluctuaron entre 40 y 50g. Se utilizaron ratas pre-púberes ya que a esta edad los animales tienen desarrollado su sistema de receptores hormonales y de transducción de señales, pero aún no se sintetizan los estrógenos endógenos en cantidades fisiológicamente considerables.

Los animales en estudio fueron divididos en distintos grupos (ver tabla 4). Se establecieron 2 grupos experimentales, al primero se le administró por vía subcutánea la fracción 179 ax y al segundo se le administró esta fracción más E2.

Posteriormente se extrajeron los úteros bajo anestesia (30mg/Kg de soletil 50®) a las 6 y 24 hrs para evaluar la respuesta estrogénica ocurrida en cada grupo, para más tarde compararlas con un control negativo (suero fisiológico) y un control positivo (E2). Luego las ratas fueron eutanasiadas con exceso de anestesia (sobredosis de soletil 50®) para obtener los cortes de cuernos uterinos que fueron fijados en una solución de formalina al 10% tamponada con buffer fosfato 0,1M pH 7,4. Posteriormente cada cuerno se lavaba y seccionaba en tres partes iguales, representando sus áreas proximal, medial y distal, para su posterior tinción de Hematoxilina-Eosina y Giemsa (Sheehan and Hrapchak, 1980).

Tabla 4. División de grupos experimentales

Condición experimental	Respuesta temprana (6 hrs)	Respuesta tardía (24 hrs)
Inyección de NaCl 0,9%	10 ratas	10 ratas
Inyección de E2	10 ratas	10 ratas
Inyección de 179 ax	10 ratas	10 ratas
Inyección de 179 ax + E2	10 ratas	10 ratas
Total	80 ratas hembras pre-púber de la cepa Sprague-Dawley	

Las ratas fueron inyectadas con 4 soluciones distintas de acuerdo a su condición experimental:

Control negativo: Se empleó una solución de etanol absoluto y NaCl 0,9% (PH 7,5) en proporción 1:9, inyectándose 0,3 mL.

Control positivo: una solución de 500 µg/mL de E2 disuelto en etanol absoluto y posteriormente diluido en suero fisiológico (NaCl 0,9% p/v) en proporción 1:9, respectivamente; de esta solución se inyectó 0,3 mL equivalentes a una dosis final de 300 µg/Kg de E2. Esta dosis fue obtenida de Tchernitchin y cols., 1983.

Fracción 179 ax: una solución de 0,025 g/mL se diluyó con suero fisiológico en proporción 1:9 respectivamente y de esta solución se inyectaron 0,3 mL.

Fracción 179 ax+E2: se inyectaron las dosis antes señaladas con una hora de diferencia.

Ensayo de toxicidad aguda por vía oral en ratas adultas. La rata como modelo roedor es la especie más utilizada en los estudios de toxicidad, aunque otros roedores también pueden ser usados. Normalmente las hembras son más utilizadas ya que la literatura señala que son más sensibles de analizar y tienen menos variaciones toxicológicas y toxico-cinéticas (Lipnick y cols, 1995). Este estudio se realizó para proveer información sobre los peligros de una exposición accidental por vía oral. Según las características fisicoquímicas de la sustancia de prueba, la utilización de la aguja para empapuzar (sonda orogástrica) es la mejor alternativa para asegurar la ingesta completa de la dosificación requerida.

El ensayo toxicológico se realizó mediante el procedimiento de dosis fija, administrando el extracto en una dosis de 5000mg/Kg de peso, fraccionada en el transcurso de 8 horas de acuerdo al protocolo establecido por la Guía N°420 de la OECD. Luego de la administración de la dosis se hizo seguimiento clínico a los animales durante 14 días. El estudio se realizó con 10 ratas hembras Sprague-Dawley de 8 a 10 semanas de edad y con un rango de peso entre 227 ± 17 g. Las ratas fueron mantenidas bajo condiciones controladas de luz (ciclos de luz-oscuridad de 12 horas diarias), temperatura ($22 \pm 3^\circ\text{C}$), y alimentación *ad-libitum*, en el vivero del Bioterio Central de la Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

Cinco días antes de iniciar el estudio, los animales fueron distribuidos al azar en diferentes jaulas, a fin de aclimatarlos a las nuevas condiciones de mantenimiento y para observar posibles alteraciones en su comportamiento; cada animal fue identificado en su cola con una marca única. Las jaulas fueron identificadas con tarjetas que contenían la siguiente información: nombre del estudio, sustancia de prueba, sexo y las fechas de inicio y término del estudio. Se aplicaron las normas vigentes del NIH (National Institute of Health, USA) para el mantenimiento adecuado de animales de laboratorio. Se ubicaron 5 animales del mismo sexo por cada jaula, cubiertas con una tapa de acero inoxidable con porta-bebedero y separador de alimento.

A todos los animales seleccionados para el estudio se les retiró la comida la noche previa al inicio del estudio (aproximadamente 12 horas antes de administrar la sustancia de prueba). La sustancia de prueba fue suministrada por vía oral, mediante aguja para empapuzar (sonda orogástrica) rígida de punta de balón.

El volumen de la sustancia de prueba fue medida a través de jeringas volumétricas. Para realizar el sondeo orogástrico, el animal fue inmovilizado, pero sin ejercer presión en las cavidades torácica o abdominal. La sonda se introdujo suavemente por el lado izquierdo de la boca (entre los incisivos y molares) en dirección caudal. Una vez que la sonda supero el esfínter del cardias, se administró el volumen de solución requerido, presionando lentamente el embolo de la jeringa (ver fotos en anexo 1). Luego de efectuado el procedimiento de sondeo, el animal se monitoreó visualmente para asegurar que no se produjeran efectos adversos (vómitos y/o dificultad respiratoria). El suministro de comida se restableció 4 horas después de la dosificación.

Se administraron dosis fraccionadas del extracto etanólico 179a (Ver métodos), en el transcurso de 8 horas, a un grupo experimental de 5 ratas hembras. Se utilizaron otras 5 ratas hembras de similares características como grupo control, para evaluar el efecto del excipiente y el procedimiento de sondeo orogástrico. El extracto 179a fue adsorbido en almidón (en proporción 1:2) y reconstituido en agua destilada para mejorar solubilidad y absorción. Posteriormente, la dosis de 5000 mg/Kg de peso corporal se administró en forma fraccionada en el transcurso de 8 horas. Los controles fueron tratados con almidón disuelto en agua, en igual proporción y fraccionado en los mismos tiempos (Tablas 5 y 6).

Tabla 5. Grupo experimental dosificados con 5000 mg de extracto 179a por Kg de peso corporal.

N° animal	Peso día 0 (gr)	Extracto (mg)
1	250	1250
2	246	1230
3	232	1160
4	226	1130
5	236	1180

Tabla 6. Grupo control dosificados con 5000mg de almidón por Kg de peso corporal.

N° animal	Peso día 0 (gr)	Almidón (mg)
1	212	1060
2	218	1090
3	238	1190
4	194	970
5	224	1120

Las ratas fueron observadas diariamente, durante 14 días post-administración, buscando signos de toxicidad y mortalidad, de acuerdo con el protocolo 420/OECD. El peso corporal se registró diariamente desde el inicio del tratamiento. Además, todos los días se realizaron inspecciones visuales del consumo de agua y alimento para registrar cualquier disminución en comparación con los grupos controles.

Para el estudio de daño tisular, transcurridos 14 días post administración de la dosis indicada, las ratas fueron eutanasiadas con exceso de anestesia (sobredosis de Soletil 50®) y se obtuvieron muestras de hígado, riñón y cerebro. Los tejidos fueron fijados en formalina tamponada al 10% en PBS 0,15M, pH 7,4. Estas muestras fueron derivadas al laboratorio BIOCYT para los análisis de toxicidad celular que incluían hiperemia, hemorragia, edema, fibrosis, inflamación, hiperplasia, atrofia, necrosis, degeneración grasa, licuefacción a nivel tisular, vacuolización y binucleación a nivel celular.

Análisis estadístico. Los datos fueron analizados utilizando GraphPad Prism versión 5.0 y Microsoft Office Excel versión 2003. El análisis de diferencia de rangos o de medias se realizó mediante la prueba de Wilcoxon de entrada simple, respectivamente, con un nivel de significancia del 5%.

III. RESULTADOS

Estudio químico-cualitativo de la planta. Para investigar la presencia de metabolitos secundarios en el extracto 179a y sus fracciones 179ax y 179ay, se realizó un screening cromatográfico en capa fina (CCF), empleando cromatofolios de gel de sílice G tipo 60 con indicador de fluorescencia (N° 5554 Merck). Las fases móviles utilizadas fueron diclorometano:acetato de etilo (8:2 y 6:4), con las cuales se logró la mejor separación, lo que permitió identificar los grupos químicos presentes. Las cromatografías fueron reveladas con diferentes reactivos cromogénicos y después visualizadas por fluorescencia bajo luz UV a las longitudes de onda de 254 y 366 nm.

Los resultados del screening realizado al extracto 179a y sus fracciones 179ax y 179ay, se representan en las tabla 7.

Tabla 7. Identificación de metabolitos secundarios mediante CCF.

metabolito	179a	179ax	179ay
Alcaloides	-	-	-
Esteroles y/o triterpenos	+	+	-
Antraquinonas	-	-	-
Flavonoides	+	+	-
Cumarinas	-	-	-
Taninos	+	-	-
Saponinas	-	-	-

Con un símbolo + o -, se indica la presencia o ausencia de metabolitos. Para detalles de los reactivos utilizados, ver MÉTODOS.

A objeto de identificar los esteroides presentes en el extracto y sus fracciones, se procedió a realizar CCF comparando la distancia de migración de estándares conocidos con los observados en la planta. Estos resultados se muestran en la tabla 8.

Tabla 8. Estudio comparativo de los esteroides encontrados con los patrones β -sitosterol y lupeol.

Patrón	179a	179ax	179ay
β - Sitosterol	+	+	-
Lupeol	+	+	-

Con un símbolo + o -, se indica la coincidencia o no con la distancia de migración del patrón de esteroides utilizados. Para esto, las placas cromatográficas fueron expuestas a luz UV ($\lambda=254-366\text{nm}$). Una vez determinado el RF de los patrones, éste se comparó con los RF que arrojaban las distintas fracciones de la planta.

Es importante señalar que se intentó identificar los flavonoides detectados tanto en el extracto 179a como en la fracción 179ax. Utilizando patrones de canferol, quercetina y daidzeina; no se logró identificar ningún componente en la planta o la fracción cuyo RF fuese coincidente con el de los patrones citados. Sin embargo, se observó que la genisteina, formononetina y biochanina A presentaron RF de 5,6; 6,3 y 8,1 respectivamente. En tanto en el extracto total y su fracción 179ax se evidenciaron grupos reactivos con RF de 5,5; 6,2 y 8,3 los cuales son compatibles con la presencia de los estándares considerados. Por otro lado, también se sugiere la presencia de cumestrol y apigenina. Estos resultados se muestran en la tabla 9.

Tabla 9. Estudio comparativo de los flavonoides encontrados con los patrones de cumestrol, genisteína, formononetina, biochanina y apigenina.

Patrón	179a	179ax	179ay
Genisteína	+	+	-
Formononetina	+	+	-
Cumestrol	+	+	-
Biochanina A	+	+	-
Apigenina	+	+	-

Con un símbolo + o -, se indica la coincidencia o no con la distancia de migración del patrón de flavonoides utilizados. Para esto, las placas cromatográficas fueron expuestas a luz UV ($\lambda=254-366\text{nm}$). Una vez determinado el RF de los patrones, éste se comparó con los RF que arrojaban las distintas fracciones de la planta.

Pese a que en el screening no se encontraron cumarinas, se intentó confirmar este resultado comparando dirigidamente con un patrón de escopoletina en donde se confirmó el análisis inicial, por lo que se descarta que el preparado 179a contenga cumarinas.

Análisis mediante HPLC:

Un grupo de investigadores de la Universidad de Valparaíso, pertenecientes al centro 3 del proyecto anillo ACT-07, analizó la fracción 179ax obtenida tal y como se indica en Métodos.

Se determinó que las condiciones cromatográficas que permitieron la mejor separación de los compuestos contenidos en la fracción 179ax fueron:

Fase móvil: metanol: agua (70:30)

Flujo: 1mL/min

Columna: RP-18

Longitud de onda: 260nm

T: 30°C.

Empleando estas condiciones se estableció que la fracción 179ax contenía al menos 6 peaks significativos, cada uno con distintos tiempos de retención, que probablemente pertenecen a compuestos responsables de la actividad estrogénica. Los tiempos de retención (TR) de los picos cromatográficos fueron compatibles con algunos estándares analizados y el informe entregado indica la probable presencia de genisteína, formononetina y biochanina A. Estos resultados muestran coincidencia con los obtenidos mediante la técnica de cromatografía en placa fina.

Respuestas estrogénicas generadas por la fracción 179ax. Después de haber inyectado a los animales las distintas soluciones de acuerdo a su condición experimental, los parámetros eosinofilia, mitosis, edema e hipertrofia fueron analizados a las 6 y 24 horas post-administración

En la figura 7 se observa que la eosinofilia generada por estradiol a 6 y 24 hrs post-tratamiento es significativa si la comparamos con el control salino ($p < 0,05$). Por otro lado, la fracción 179ax no induce eosinofilia ni a 6 ni a 24 horas post-tratamiento. La menor eosinofilia observada al administrar la fracción 179ax previo al tratamiento con estradiol, sugiere un efecto antagónico de la fracción tanto a 6 como a 24 hrs.

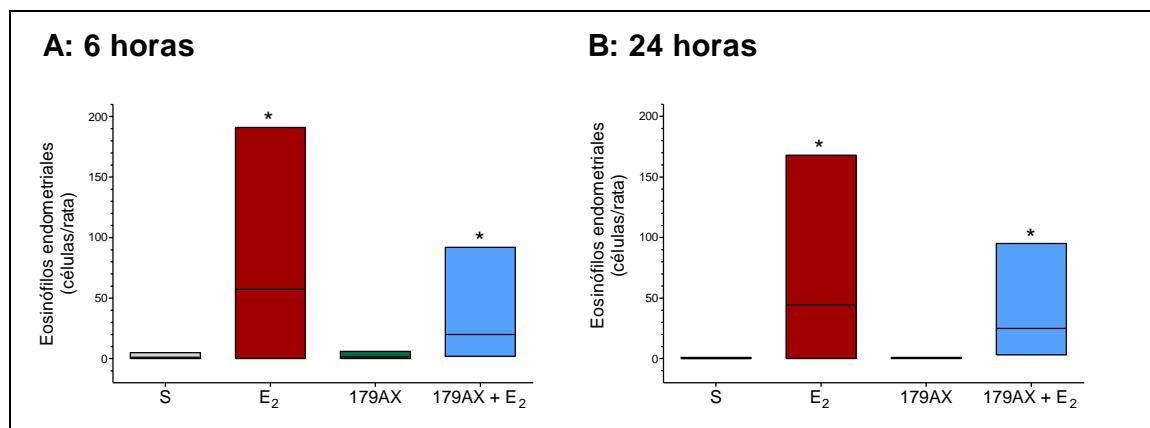


Figura 7: Número de eosinófilos encontrados en el endometrio.

El conteo se realizó en úteros de rata pre-púber a las 6 hrs (A) y a las 24 hrs (B) después de la administración de los distintos tratamientos (S: suero salino; E₂: Estradiol; 179AX: extracto; 179AX + E₂; extracto + estradiol). Se presentan los rangos de mínimo a máximo para cada población y la línea horizontal dentro de cada barra representa la mediana de los datos. * $p < 0,05$ comparado con el grupo control (S), según la prueba de Wilcoxon.

En la Figura 8 se observa que la respuesta mitótica generada tanto por estradiol como por la fracción 179ax es significativa al compararla con el control salino después de 6 hrs post-tratamiento ($p<0,05$). Probablemente la fracción 179ax tiene la capacidad de antagonizar levemente las mitosis inducidas por estradiol a las 6 hrs.

Por otro lado, al evaluar la respuesta que se genera después de 24 hrs post-tratamiento, observamos que las mitosis aumentan considerablemente en respuesta al estradiol ($p<0,05$) y que la fracción 179ax presenta una respuesta significativamente menor si la comparamos con el control salino a 24 hrs ($p<0,05$). La menor respuesta mitótica observada al administrar la fracción 179ax previo al tratamiento con estradiol, sugiere un efecto antagónico de la fracción a las 24 hrs.

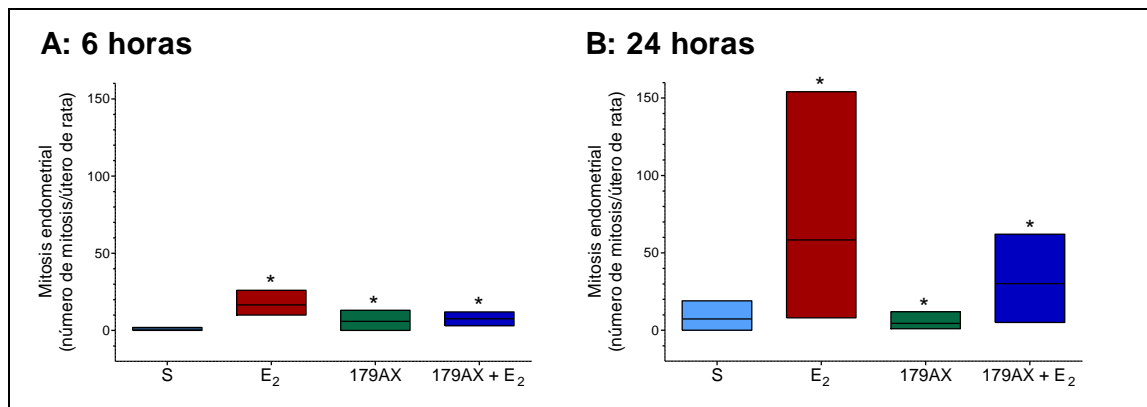


Figura 8: Número de mitosis encontradas en el endometrio.

El conteo se realizó en úteros de rata pre-púber a las 6 hrs (A) y a las 24 hrs (B) después de la administración de los distintos tratamientos (S: suero salino; E₂: Estradiol; 179AX: extracto; 179AX + E₂; extracto + estradiol). Se presentan los rangos de mínimo a máximo para cada población y la línea horizontal dentro de cada barra representa la mediana de los datos. * $p<0,05$ comparado con el grupo control (S), según la prueba de Wilcoxon.

A continuación se evalúa el edema generado por las distintas condiciones experimentales. Cabe señalar que esta respuesta se evidencia por una disminución en el número de células contadas por placa. En la figura 9 se observa que la respuesta generada por estradiol es significativa al compararla con suero salino tanto a 6 como a 24 hrs post-tratamiento ($p < 0,05$). Se muestra además que la fracción 179ax produce una respuesta estrogénica significativa si lo comparamos con el suero salino después de 6 hrs ($p < 0,05$). Sin embargo, a las 24 hrs la respuesta disminuye significativamente si la comparamos con el control salino ($p < 0,05$). Por otro lado, se observa que la fracción 179ax no influye significativamente en el edema que genera el estradiol a las 6 hrs después de inyectado el tratamiento. Diferente respuesta se observa a las 24 hrs, en donde la fracción 179ax probablemente potencia la respuesta generada por estradiol.

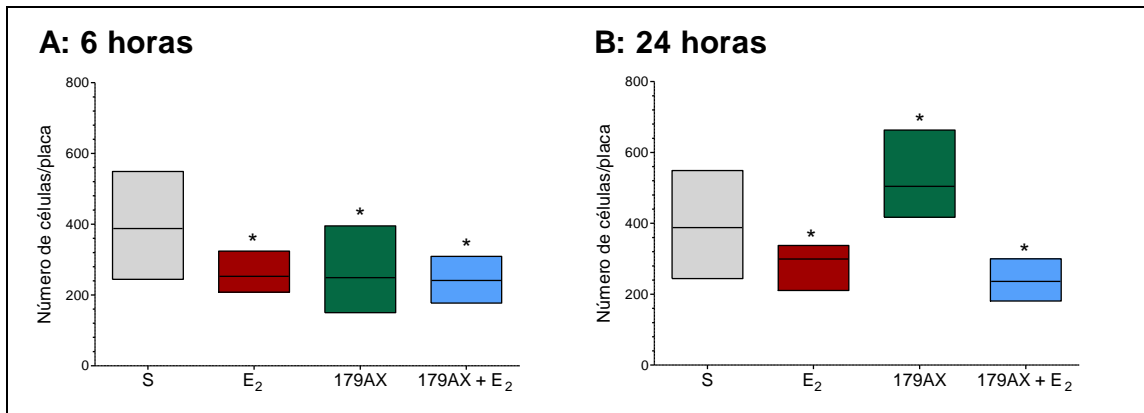


Figura 9: Estimación de edema en estroma profundo.

El conteo de células se realizó en cortes de tejido endometrial de rata pre-púber a las 6 hrs (A) y a las 24 hrs (B) después de la administración de los distintos tratamientos (S: suero salino; E₂: Estradiol; 179AX: extracto; 179AX + E₂; extracto + estradiol). Se presentan los rangos de mínimo a máximo para cada población y la línea horizontal dentro de cada barra representa la mediana de los datos. * $p < 0,05$ comparado con el grupo control (S), según la prueba de Wilcoxon.

En la Figura 10 se muestran los resultados para hipertrofia, cabe señalar que esta respuesta se evidencia por un menor número de células contadas por placa. Al analizar los resultados se observa que el estradiol produce una atrofia significativa a las 6 hrs post-tratamiento ($p < 0,05$), por el contrario, al evaluar la respuesta a las 24 hrs se observa una hipertrofia que se manifiesta significativamente en comparación con el control salino ($p < 0,05$). La fracción 179ax no genera hipertrofia a las 6 hrs post-tratamiento, pero a las 24 hrs se observó una respuesta significativa, compatible con la disminución del tamaño celular (atrofia). Por otro lado, la asociación de la fracción 179ax con estradiol posiblemente genera una disminución de la respuesta atrófica observada al administrar estradiol a las 6 hrs. Por el contrario, al analizar la respuesta a las 24 hrs, el extracto 179ax probablemente inhibe la respuesta hipertrófica.

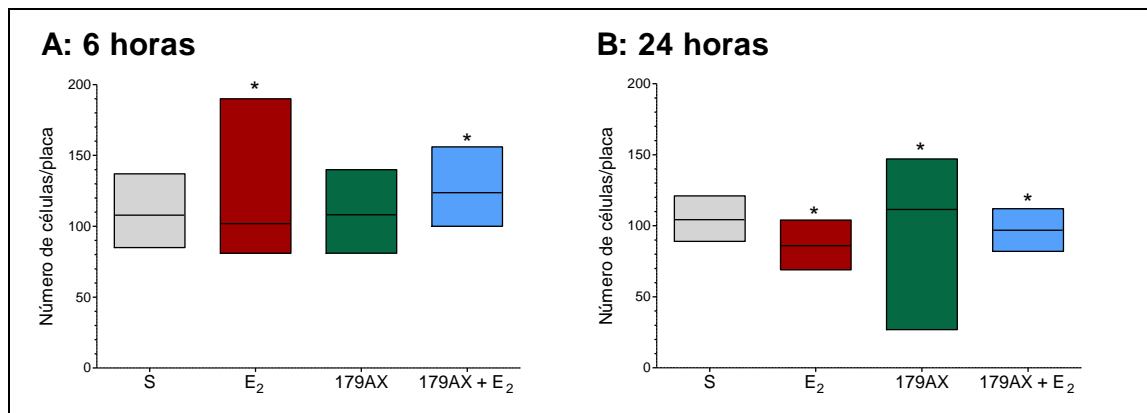


Figura 10: Estimación de hipertrofia en miometrio celular.

El conteo de células se realizó en cortes de tejido endometrial de rata pre-púber a las 6 hrs (A) y a las 24 hrs (B) después de la administración de los distintos tratamientos (S: suero salino; E₂: Estradiol; 179AX: extracto; 179AX + E₂; extracto + estradiol). Se presentan los rangos de mínimo a máximo para cada población y la línea horizontal dentro de cada barra representa la mediana de los datos. * $p < 0,05$ comparado con el grupo control (S), según la prueba de Wilcoxon.

Estudio toxicológico. No se registró la muerte de ningún animal tratado con el extracto 179a ni en los tratados con almidón (grupo control), en el transcurso de los 14 días que duró el estudio.

En ambos grupos de animales se registraron variaciones de peso, el que en general tendió a aumentar de manera significativa respecto del día de inicio del estudio, pero no se registraron diferencias significativas entre ambos grupos (Tablas 10 y 11). Tampoco se registraron variaciones conductuales ni signos de patologías externamente visibles en ninguno de los grupos.

Tabla 10. Peso corporal (en gramos) de las hembras que recibieron el extracto 179a.

N° de animal	Peso día 0	Peso día 7	Diferencia Semana 1	Peso día 14	Diferencia semana 2
1	250	270	20	286	16
2	246	286	30	292	6
3	232	256	24	282	26
4	226	242	16	260	18
5	232	248	16	278	30

Tabla 11. Peso corporal (en gramos) de las hembras del grupo control.

N° de animal	Peso día 0	Peso día 7	Diferencia semana 1	Peso día 14	Diferencia semana 2
1	212	234	22	244	10
2	218	240	22	262	22
3	238	286	48	300	14
4	194	234	44	256	22
5	224	242	18	266	24

Análisis histopatológico. Los órganos obtenidos de las ratas tratadas con el extracto 179a, revelaron un leve grado de vacuolización intersticial en cerebro e hiperemia en riñón. Sin embargo, esta variación no fue significativa en comparación con los tejidos obtenidos de las ratas control. Por otro lado, el tejido hepático mostró una histología dentro de los rangos de normalidad.

En las Tablas 12 y 13 se muestran los resultados de los parámetros de toxicidad celular evaluados en el grupo experimental y en el grupo control respectivamente. C: Cerebro; H: Hígado; R: Riñón. Los rangos 0 -1 significan ausencia de anormalidad y 2-3, leve anormalidad.

Tabla 12. Toxicidad celular en el grupo tratado con extracto 179a.

Parámetros de toxicidad celular	Rata 1			Rata 2			Rata 3			Rata 4			Rata 5		
	C	H	R	C	H	R	C	H	R	C	H	R	C	H	R
Hiperemia	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1
Hemorragia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Edema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Fibrosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Inflamación	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hiperplasia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Atrofia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Degeneración grasa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Necrosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Binucleación celular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vacuolización intersticial	1	0	0	0	0	0	1	0	0	2	0	0	0	0	0
Licuefacción tisular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Tabla 13. Toxicidad celular en el grupo control.

Parámetros de toxicidad celular	Control 1			Control 2			Control 3			control 4			control 5		
	C	H	R	C	H	R	C	H	R	C	H	R	C	H	R
Hiperemia	0	0	1	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1
Hemorragia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Edema	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0
Fibrosis	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Inflamación	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Hiperplasia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Atrofia	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Deg.grasa	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Necrosis	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
Binucleación celular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Vacuolización intersticial	0	0	0	0	0	0	0	1	0	3	0	0	1	0	0
Licuefacción tisular	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0

IV. DISCUSIÓN

El reino vegetal ha representado desde hace mucho una muy buena fuente para proveer al ser humano de moléculas naturales, las que pueden ser modificadas o no, para su uso con fines terapéuticos. Habida consideración de las restricciones que la investigación en seres humanos conlleva, se ha recurrido al uso de diversos modelos animales de experimentación. Uno de ellos es el modelo de útero de rata pre-púber que presenta como ventajas la homogeneidad de la muestra, permite disponer de un adecuado número de animales, condiciones de alimentación controladas y de un escaso nivel hormonal. A partir de este modelo se puede trabajar con altas dosis de hormonas, que evidencien la máxima intensidad de una respuesta, medir los resultados mediante metodologías validadas e interpretar y proponer cómo sería esta respuesta en seres humanos. Debido a lo anterior toda generalización o extrapolación debe hacerse con cautela y considerando siempre que no necesariamente se obtendrán las mismas respuestas.

La búsqueda de moléculas con actividad estrogénica o antiestrogénica, es también un tópico de interés considerando la cantidad de procesos fisiológicos y fisiopatológicos en que participan los estrógenos. A este respecto conviene tener presente que si bien la administración de estrógenos a mujeres post-menopáusicas, mejoró significativamente algunos aspectos de su calidad de vida, se ha establecido que aumentaba la incidencia de cáncer de mamas.

La administración de estrógenos gatilla una serie de cambios morfofuncionales que se evidencian a las 6 hrs tras la administración de la hormona y se mantienen hasta las 24 hrs y por más tiempo (Luconi, 2002). Por su parte, el modelo de útero de rata pre-púber ha demostrado ser un modelo experimental válido para evaluar y/o caracterizar la respuesta estrogénica (Tchernitchin y Galand, 1983). Usando este modelo, demostramos que la mayor actividad estrogénica de una planta medicinal radicaba en la fracción polar (179ax) obtenida luego de la extracción con etanol.

Se ha descrito que la eosinofilia uterina, la inducción de mitosis, el desarrollo de hipertrofia y de edema uterinos, son típicas respuestas estrogénicas (Kim y cols., 1999). La eosinofilia uterina se manifiesta y alcanza un valor máximo a las 6 hrs post administración de estradiol (Jensen y De Sombre, 1972). En nuestros resultados, analizando el número de eosinófilos endometriales, encontramos concordancia con la literatura, ya que en la figura 7 se observa que la eosinofilia se presenta con mayor intensidad a las 6 hrs post-tratamiento, disminuyendo la magnitud de la respuesta a las 24 hrs. Cabe señalar que ambas respuestas a 6 y 24 hrs son estadísticamente significativas al compararlas con el control salino. La fracción 179ax no indujo eosinofilia ni a 6 ni a 24 hrs después de administrado el tratamiento. De acuerdo a esta observación, la fracción no tendría actividad estrogénica. Una observación importante, es el probable antagonismo que se manifiesta cuando la fracción 179ax se administra antes que el estradiol. Esto es válido tanto a 6 como a 24 hrs y para explicar la respuesta observada, se sugiere la presencia de moléculas en la fracción capaces de competir con el estradiol por la ocupación del RE, sin gatillar su activación.

Con respecto a la respuesta estrogénica, que involucra el aumento de células en mitosis, el estradiol generó la acción esperada en el endometrio. La respuesta analizada se manifestó a las 6 hrs alcanzando su máxima intensidad a las 24 horas post- administración hormonal. De esta forma, se corrobora la información obtenida de la literatura científica, la que señala que las mitosis obedecen a los mecanismos que involucran una respuesta tardía (genómica), que se manifiesta en mayor magnitud a las 24 hrs. Por otro lado, la administración de la fracción 179ax generó una respuesta estrogénica que se evidenció a las 6 hrs, y fue significativa en comparación con el control salino. Sin embargo, después de 24 hrs la fracción 179ax presenta una respuesta significativamente menor, incluso si se compara con el suero salino.

De lo anterior podemos señalar que las mitosis que genera el suero a las 24 hrs, se pueden explicar por el aumento de la tasa de división celular que presentan las ratas pre-púberes, ya que se encuentran en constante crecimiento y renovación de tejidos, condición que podría ser antagonizada por la fracción 179ax a las 24 hrs después del tratamiento.

El resultado más llamativo se presentó a las 24 hrs cuando la fracción 179ax fue administrada 1 hora antes del estradiol, ya que se observó una disminución en las mitosis endometriales. Este hecho evidencia que la fracción 179ax podría actuar como antagonista estrogénico al disminuir las mitosis uterinas generadas por estradiol (ver figura 8). El efecto analizado en este tejido puede deberse a la presencia de un subtipo de receptor con mayor afinidad por el compuesto antagónico presente en la fracción. También se puede especular que el extracto podría interferir con algunas de las vías de transducción de la acción estrogénica. Lo antes señalado constituye un hecho relevante y se debe considerar en futuras investigaciones con el extracto, sobre todo si consideramos que a nivel de miometrio y endometrio se inicia primariamente la hiperplasia uterina.

El edema generado por la inyección de estradiol en estroma profundo (EP), se evidenció a las 6 y 24 hrs (ver figura 9). En el mismo contexto, la fracción 179ax produce edema a las 6 hrs, pero esta respuesta disminuye significativamente a las 24 hrs post-tratamiento. Esta actividad estrogénica que desaparece rápidamente, es compatible con la acción de los FE y su menor vida media.

Por otro lado, al administrar la fracción 179ax junto a estradiol, se genera edema a las 6 hrs que alcanza una magnitud similar a la observada con estradiol. A 24 hrs post-tratamiento, el edema es mayor que el generado por estradiol; lo sorprendente es que la magnitud del edema sigue siendo igual que a las 6 hrs. Estos resultados indican que la fracción 179ax aumenta el efecto del estradiol al prolongar por más tiempo la intensidad de la respuesta. Esto se podría explicar por el aumento de concentración de compuestos que tienen efecto estrogénico o porque algunos compuestos presentes en el extracto actúan como inhibidores de enzimas hepáticas que se encargan del metabolismo estrogénico, alargando de esta forma la vida media del estradiol. La explicación anterior no descarta la posibilidad de que sea el estradiol el que inhibe la metabolización de los compuestos presentes en la fracción.

Al analizar la presencia de hipertrofia en miometrio circular (MC) observados en la figura 10, los resultados muestran que a las 6 hrs post-exposición a estradiol, se genera una respuesta atrófica probablemente debido a un error de procedimiento o a deshidratación de los tejidos analizados. A las 24 hrs después de administrar el estradiol aparece la respuesta hipertrófica que alcanza niveles significativos si los comparamos con el control salino. Estos resultados coinciden con los controles que se realizan en forma regular en nuestro laboratorio y que consideran a la hipertrofia como una respuesta tardía (o genómica). La fracción 179ax no genera hipertrofia a las 6 hrs post-tratamiento, pero a las 24 hrs se observó una respuesta significativa, compatible con la disminución del tamaño celular (atrofia). Notablemente, la fracción administrada junto con estradiol inhibió la generación de atrofia después de 6 hrs, registrándose valores incluso menores que los generados por el control salino. Es importante considerar que la respuesta atrófica también fue observada a las 24 hrs después de administrar la fracción 179ax. Por otro lado, se puede sugerir que la fracción antagoniza la hipertrofia inducida por estradiol a las 24 hrs post-tratamiento.

Una explicación posible para el efecto observado proviene de la presencia de proteínas que constituyen canales de agua (aquaporinas) y/o la alteración de su función normal por FE. En este sentido, se ha descrito por ejemplo que los estrógenos regulan la expresión de estas proteínas (Jablonski y cols., 2003), lo que constituye una posibilidad de alterar el flujo de agua entre diversos tejidos uterinos, tales como el MC. De esta forma se podría explicar la salida de agua desde las células uterinas provocando atrofia en estos tejidos. Por otra parte, es ampliamente sabido que los estrógenos producen vasodilatación al mediar la síntesis de óxido nítrico (NO), un potente vasodilatador (Stefano y cols, 1999). Teniendo en cuenta que la fracción 179ax podría presentar acción antiestrogénica sobre la respuesta hipertrófica, podríamos especular que la interacción de sus componentes con el estradiol disminuye la producción de NO generando una falta de irrigación celular que explicaría la atrofia observada.

De acuerdo con los resultados obtenidos, la fracción 179ax se podría clasificar como modulador selectivo de la respuesta estrogénica, ya que presenta tanto actividad estrogénica como antiestrogénica. Una probable explicación a esta observación podría deberse a los distintos tipos de receptores presentes en los distintos tejidos uterinos, que gatillan las respuestas estrogénicas. A este respecto, se ha descrito la presencia de receptores α y β en el útero de rata y no se descarta la presencia de otros receptores que diesen cuenta de la actividad estrogénica (Mangelsdorf y Cols., 1995).

En relación con el estudio toxicológico que se realizó al extracto etanólico completo, podemos señalar que la supervivencia de los animales de experimentación fue de un 100 por ciento, estos resultados indican que la dosis toxica del extracto 179a por vía oral es superior a 5000 mg/Kg de peso corporal. El peso corporal constituye uno de los principales indicadores de posibles trastornos orgánicos en los estudios de toxicidad. En nuestro estudio no se observaron variaciones en el aumento del peso corporal en los animales a la dosis de 5000mg/kg. El seguimiento que se hizo durante 14 días para observar los diferentes signos clínicos -ojos y membranas mucosas, piel y pelos, sistema cardiovascular, respiratorio y nervioso, así como temblores, convulsiones, salivación, sedación, somnolencia, diarrea, muerte u otras afectaciones y su comportamiento - , mostró que en los animales tratados, a la dosis evaluada, no se produjeron alteraciones clínicamente relevantes.

El análisis anatomopatológico de los órganos de los animales de experimentación (realizado por un profesional competente en este tema) mostró leves alteraciones histopatológicas en cerebro y riñón (vacuolización e hiperemia respectivamente), las que se encontraron tanto en el grupo experimental como en el grupo control, lo que sugiere que éstas pueden haber sido provocadas por el procedimiento histológico estándar y no a daño generado por la administración del extracto.

Luego de mostrar que la administración del extracto 179a no generó signos de toxicidad y luego de fraccionar este extracto y obtener la fracción 179ax, se demostró que ésta exhibió tanto actividad estrogénica como antiestrogénica. La explicación requerida para entender el porqué de una u otra respuesta, demanda considerar el tipo de tejido expuesto así como el tipo de RE presentes y/o de la vía por la cual se gatilló la respuesta estrogénica.

Todas las explicaciones planteadas que dan cuenta de la mayor parte de los resultados de la presente tesis y de la respuesta estrogénica observada, pasan por caracterizar, identificar y valorar el contenido de FE presentes en la fracción 179ax.

Debido a razones de patentabilidad, el nombre científico de la planta utilizada en este estudio no puede ser revelado todavía. Pese a ello, en esta tesis se intentó caracterizar químicamente el contenido de probables principios activos que diesen cuenta de la actividad estrogénica encontrada y del uso medicinal que esta planta ha tenido.

Nuestros resultados indican que en la planta 179a probablemente se encuentran esteroides como β -sitosterol y lupeol, flavonoides como cumestrol, genisteína, formononetina, biochanina y apigenina.

El estudio realizado mediante HPLC, indicó que se trata de una fracción bastante limpia, en la que destaca la presencia de al menos seis picos cromatográficos. El análisis de patrones de FE ya conocidos utilizando la misma metodología y las mismas condiciones cromatográficas permitió la búsqueda de los FE en base a su tiempo de retención (TR). De esta forma se sugiere la presencia de genisteína, formononetina y biochanina A en la fracción 179ax. Éstos resultados coinciden con los obtenidos mediante la técnica de CCF. Por otro lado, es importante señalar que el equol, daidzeína y canferol también presentaron TR que revelan su probable presencia, sin embargo, esto puede ser un factor confundente ya que sus TR se superponen con el de otros FE que ya fueron confirmados por CCF.

V. CONCLUSIONES

- En la planta 179a y su fracción 179ax se sugiere la presencia de esteroides como β -sitosterol y lupeol, y de flavonoides como cumestrol, genisteína, formononetina, biochanina y apigenina.
- El informe de HPLC indica la probable presencia de genisteína, formononetina y biochanina A en la fracción 179ax, resultados que coinciden con los obtenidos mediante la técnica de CCF.
- Después de administrar la fracción 179ax en útero de rata pre-púber no se observa eosinofilia significativa ni a 6 ni a 24 hrs. La fracción podría actuar como antagonista estrogénico ya que inhibe la respuesta generada por estradiol.
- La fracción 179ax genera una respuesta mitótica significativa a las 6 hrs si la comparamos con la de suero salino. En el mismo contexto, la fracción presenta una respuesta significativamente menor si la comparamos con el control salino a 24 hrs. Por otro lado, nuevamente se manifiesta una probable acción antiestrogénica al asociar la fracción 179ax con estradiol, ya que aparece una disminución de las mitosis en endometrio a las 6 y 24 hrs después del tratamiento.
- La fracción 179ax produce edema a las 6 hrs por lo que tendría una actividad estrogénica similar al estradiol. Sin embargo, a las 24 hrs el edema disminuye significativamente si la comparamos con el control salino. Por otro lado, se sugiere que la fracción 179ax aumenta el efecto del estradiol al prolongar el edema por más tiempo.
- La fracción 179ax no genera hipertrofia a las 6 hrs post-tratamiento, pero genera atrofia a las 24 hrs. Por otro lado, la asociación de la fracción 179ax con estradiol posiblemente genera una disminución de la respuesta atrófica observada al administrar estradiol a las 6 hrs. Por el contrario, al analizar la respuesta a las 24 hrs, el extracto 179ax probablemente inhibe la respuesta hipertrófica.

- La fracción 179ax podría clasificarse como modulador selectivo de la respuesta estrogénica (SERMs).
- El extracto 179a no genera toxicidad oral aguda, en una dosis de 5000mg/kg peso corporal según el protocolo 420 de OECD/OCDE, ni produce alteraciones patológicas en posibles órganos blanco de daños asociados al consumo de sustancias o fármacos.
- Se valida el modelo de útero de rata pre-púber para analizar respuestas estrogénicas inducidas por plantas medicinales chilenas, cuya información fue recabada de conocimientos etno-botánicos de pueblos originarios.
- Los resultados presentados aquí, justifican la necesidad de avanzar en la identificación de los principios activos contenidos en la planta estudiada, utilizando otras tecnologías tales como HPLC-Masa-Masa, entre otras.

VI. REFERENCIAS

- Adlercreutz, H. Western diet and western diseases: some hormonal and biochemical mechanism and associations. *Scand J Clin Lab Invest.* 50(201): 3-23. 1990.
- Ahmed-Sorour H, Bailey CJ. Role of ovarian hormones in the long-term control of glucose homeostasis. Interaction with insulin, glucagon and epinephrine. *Horm, Res.*13, 396-403. 1980.
- Allué, J. Fitoestrógenos: biología vegetal y biología animal. *Ginecología Clínica y Quirúrgica* 3: 163-165,2001.
- Arriaza CA, Mena MA, Tchernitchin AN. Prenatal androgenization selectively modifies some responses to oestrogens in the prepuberal rat uterus. *JEndocrinol* 120: 379-384. 1989.
- Burton, J.L., Wells, M. The effect of phytoestrogens on the female genital tract. *J. Clin. Pathol*55: 401-407. (2002).
- Busch T-L, Barret-Connor E, Cowan LD et al., Cardiovascular mortality and noncontraceptive use of estrogen in women. *Circulation* 75: 1102-7. 1987.
- Chen H, Lin RJ, Xie W, Wilpitz D, Evans RM. Regulation of hormone-induced histone hyperacetylation and gene activation via acetylation of an acetylase. *Cell*; 98:675-686. 1999.
- Chlebowski, R.T; Hendrix, S.L; Langer, R.D, Stefanick, M.L; Gass, M; Lane, D; Rodabough, R.J; Guilligan, M.A; Cyr. M.G; Thompson, C.A; Khandekar , J; Petrovitch, H; McTiernan, A; *JAMA*, 289, 3242. 2003.
- Cooke PS, Naaz A. Role of estrogens in adipocyte development and function. *Exp. Biol. Med* (Maywood) 229: 1127-1135. 2004.
- Dipascuale L, Wallace H. Acute toxicity and eye irritancy. En: *Principles and Methods of toxicology.* 4ed. Philadelphia: Taylor and Francis, 4a: 853-917, 2001.
- Dodds, E. C., and Lawson W. Synthetic estrogenic agents without the phenantrene nucleus. *Nature* 137: 996. 1936.

- Ettinger B , Genank HK, Cann CE. Long-term estrogen replacement therapy prevents bone loss an fractures. *Ann int med* 102: 319-24. 1985.
- Fujimoto, W.Y, Leonetty, D.L, Kinyoung, J.L, Newell Morris, L, Shuman, W.P, Stolov W.C, Wahl. P.W. Prevalence of diabetes mellitus and impaired glucose tolerance among second-generation Japanese-american men. *Diabetes* 36:721-729. 1987.
- Gambrell RD. The prevention of endometrial cancer in postmenopausal women with progestogens. *Maturitas.* 8 :159-62, 1976.
- Gasc J-M, Baulieu E-E. Steroid hormone receptors: intracelular distribution. *Biology of the cell*; 56:1-6. 1986.
- Gorski, J., Toft, D., Shymala, G., Smith, D., and Notides, A. Hormone receptors: studies on the interaction of estrogen with the uterus. *Recent Progr. Horm. Res.* 24: 45-80. 1968.
- Godsland IF. Oestrogen and insulin secretion. *Diabetología.*48:2213-2220. 2005.
- Green S, walter P, Kumar V, Krust A, Bornert J-M, Argos P, Chambon P, Human oestrogen receptor cDNA: sequence, expression, and homology to v-erbA. *Nature* 83:835-839. 1986.
- Gruber, C.J; Tschugguel, W., Schneeberger, C; Huber,J.C.N.engj.med.346,340. 2002.
- Guyton, A.C. y Hall, J.E. *Tratado de Fisiología Médica.* 11^o edición. Madrid, España. Elsevier.1016p, 1022p. 2006.
- Ho SC, Chan SG, Yi Q, Wong E, Leung PC. *J Bone Miner Res*Jul;16(7):1363-9. Abstract 2001.
- Hoyland JA, Mee AP, Baird P, Braidman IP, Mawer EB, and Freemont AJ. Demostration of estrogen receptor mRNA in bone use in situ reverse-transcriptase polymerase chain reaction. *Bone* 20: 87-92. 1997.
- Howitz KT, Sinclair DA. Xenohormesis: sensing the chemical cues of other species.*cell*; 133(3), p: 91-387. 2008.
- Huang WH, Lau AT, Daniels LL, Fujii H, Seydel U, Wood DJ, Papadimitriou JM, and Zheng MH. Detection of estrogen receptor α , carbonic anhydrase II and tartrate-resistant acid phosphatase mRNA in putative mononuclear osteoclast precursors cells of neonatal rats by fluorescence in situ hybridization. *J Mol Endocrinol* 20: 211-219, 1998.

- Hu JY, Aizawa T. Quantitative structure-activity relationships for estrogen receptor binding affinity of phenolic chemicals. *Water Res*;37:1213-22. 2003.
- Hwang CS, Kwak HS, Lee SH, Kang YS, Choe TB, Hur HG, Han KO. Isoflavones metabolites and their in vitro dual functions: they can act as an estrogenic agonist or antagonist depending on the estrogen concentration. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 101, 246-253. 2006.
- Jablonski, McConnell, Hughes, Huet-Hudson. Estrogen Regulation of Aquaporins in the Mouse Uterus: Potential roles in Uterine Water Movement. Department of Biology, University of north Carolina at Charlotte, Charlotte, North Caroline.69,1481-1487,2003.
- Jordan VC. Estrogen, selective receptor modulation, and coronary heart disease: something or nothing. *J Natl Canc Inst.* 93: 2-4. 2001.
- Jensen, E.V. y DeSombre, E. Mechanisms of action of the female sex hormones. *A. Rew. Biochem.* 41: 203-230. 1972.
- Jimi E, Akiyama S, Tsurukai T, Okahashi N, Kobayashi K, Udagawa N, Nishihara T, Takahashi NN, and Suda T. Osteoclast differentiation factor acts as a multifunctional regulator in murine osteoclast differentiation and function. *J Immunol* 163: 434-442, 1999.
- Key TJ, Chen J, Wang DY, et al. Sex hormones in women in rural China and in Britain. *Br J Cancer* 62: 631-636. 1990.
- Kim H. and cols. Nongenomic stimulation of nitric oxide release by estrogen is mediated by estrogen receptor a localized in caveolae. *Biochem Biophys Res Commun* 263:257-262, 1999.
- Kostelac, D., Rechkemmer, G., Briviba, K. Phytoestrogens modulate binding response to estrogen receptors α and β to the estrogen response element. *J.Agric. Food Chem.* 51 (26: 7632 – 7635).2003.
- KP Jonnes, Estrogens and Progestin: What to use and how to use it. *Clin Obstet Gynecol.* 32; 871-883:1992.
- Kuiper, GG; Carlsson, B; Grandien, K; Enmark, E; Haggblad, J; Nilsson, S; Gustafsson, J. A. *Endocrinology*,138,863. 1996.
- Kuiper, GG Carlsson, B; Grandien, K, et al. Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology*;138:863-70. 1997.

- Lamartinieri CA, Moore JB, Brown NM, Thompson R, Hardin MJ, Barnes S. Genistein suppresses mammary cancer in rats. *Carcinogenesis* 16: 2833-2840, 1995.
- Lamartinieri CA, Moore JB, Holland M, Barnes S. Neonatal genisteina chemo prevents mammary cancer. *Proc Soc Exp Biol* 208: 120-133, 1995.
- Limer JL, Speirs V. Phyto-oestrogen and breast cancer chemoprevention. *Breast Cancer Res* 6:119-127. 2004.
- Lipnick, R.L., Cotruvo, J.A., Hill, R.N., Bruce, R.D., Stitzel, K.A., Walker, A.P., Chu, I., Goddard, M., Segal, L., Springer, J.A. and Myers, R.C. Comparison of the Up-and-Down, Conventional LD50, and Fixed-Dose Acute Toxicity Procedures. *Fd. Chem. Toxicol.* 33, 223-231. 1995.
- Loose-Mitchell D, Stancel GM. Estrogens and progestins. En: Hardman JG, Limbird LE. Goodman & Gilman's *The Pharmacological basis of Therapeutics*. 10^o ed. New York: Mc-Graw-Hill Company; p.1598-1599. 2001.
- Luconi M, Forti G, Baldi E. Genomic and nongenomic effects of estrogens: Molecular mechanism of action and clinical implications for male reproduction. *J steroid biochem mol boil*, 80 (4-5): 369-81. 2002.
- Mangelsdorf DJ, Thummel C, Beato M, Herrlich P, Schütz G, Umesono K, Blumberg B, Kastner P, Mark M, Chambon P, Evans RM. The nuclear receptor family: the second decade. *Cell* 83: 835-839. 1995.
- Marino M, Galluzzo P, Ascenzi P. Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Curr Genomics*. 7(8): 497-508. 2006.
- McEwens BS. Clinical review 108. The molecular and neuroanatomical basis for estrogen effects in the central nervous system. *J Clin Endocrinol Metab* 84:1790-1797. 1999.
- Migliaccio S, Newbold RR, Bullock BC, Jefferson WJ, Sutton FG, McLachlan JA, and Korach KS. Alterations of maternal estrogen levels during gestation affect the skeleton of female offspring. *Endocrinology* 137: 2118-2125. 1996.
- Nilsson, S; Makela,S; Treuter, E; Tujague, M; Thomsen, J; Andersson, G; Enmark,. E; Pettersson, K; Warner, M; Gustafsson,J. A. *Physiol. Rev.*,81,1535. 2001.
- Nilsson LO, Boman A, Savendhal L, Grigelioniene G, Ohlsson C, Ritzen EM, and Wroblewski JJ. Demonstration of estrogen receptor- β immunoreactivity in human growth plate cartilage. *J Clin Endocrinology Metab* 84: 370-373. 1999.
- OECD Guideline for testing of chemicals, 420 adopted 17 December 2001.

- Paech, K; Webb P, Kuiper, G.G, Nilsson, S. Gustafsson J, Kushner, P.J, Scalan, and T.S. *Science*: 277-1508. 1997.
- Paruthiyil, S; Parmar, H; Kerekatte, V; Cunha, G.R; Firestone, G.L; Leitman, D.C; *Cancer Res.*64,423. 2004.
- Peterson, G. Evaluation of the biochemical targets of genistein in tumor cells. *J Nutr.* 125: 784-789. 1995.
- Pietras, R J, and Szego, C. M. *Nature* 265(5589), 69-72, 1977.
- Reginster JY. *Bone Miner*;23:223-232. Abstract.1993.
- Rice S, Whitehead SA. Phytoestrogens and breast cancer- promoters or protectors? *Endocr Relat Cancer.* Dec13(4):995-1015. Review. 2006.
- Robyr D, Wolffe A, Wahli W. Nuclear hormone receptor coregulator in action: diversity for shared tasks. *Mol Endocrinol*; 14:329-346. 2000.
- Ruggiero, R.J. y Likis, F.E. Estrogen: Physiology, pharmacology, and formulations for replacement therapy. *J Midwifery Womens Health.* 47: 130-138. 2002.
- Shang Y, Hu X, DiRenzo J, Lazar MA, Brown M. Cofactor dynamics and sufficiency in estrogen receptor-regulated transcription. *Cell*; 103. 843852. 2000.
- Setchell KDR, Brown NM, Desai P, Zimmer-Nechemias L, Wolfe EB, Brashear WT et al. Bioavailability of pure isoflavones in healthy humans and analysis of commercial soy isoflavone supplements. *J Nutr* ; 131: 1362S-75S, 2001.
- Sheehan, Dezna; Hrapchak, Barbara. *Theory and practice of Histotechnology*, 2 Ed. edición, The C.V. Mosby Company, 1980.
- Stefano GB, Cadet P, Breton C, Goumon Y, Prevot V, Dessaint JP, Beauvillain JC, Roumier AS, Welters I, Salzet M. Estradiol stimulated nitric oxide released in human granulocytes is dependent on intracellular calcium transients: evidence of a cell surface estrogen receptor. *Blood* 95:3951-3958, 2000.
- Suman Rice and Saffron A Whitehead. Phytoestrogens and breast cancer-promoters or protectors. *Endocrine-Related Cancer*; 13: 995-1015. 2006.
- Taylor AHA, Al-Azzawi F. Immunolocalisation of oestrogen receptor beta in humans tissues. *J Mol Endocrinol*; 24:144-55. 2000.
- Tang, G.W. The climateric of Chinese factory workers. *Maturitas.* 19: 177-182. 1994.

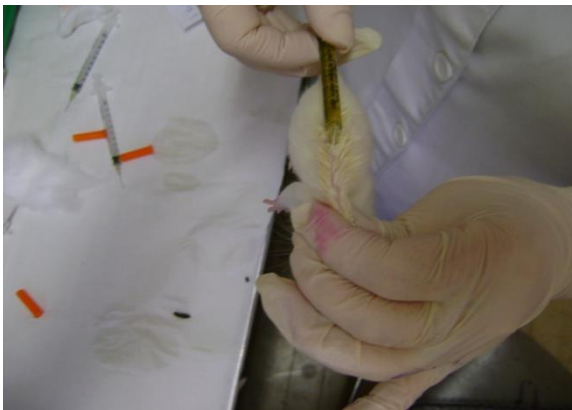
- Tchernitchin AN. Perinatal exposure to chemical agents: delayed effects by the mechanism of imprinting (cell programming). *ARBS Ann Rev Biomed Sci* 7:68-126, 2005.
- Tchernitchin, AN, Radioautographic study of the effect of estradiol-17 β , estrone, estriol, progesterone, testosterone and corticosterone 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., 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. Dose-response of estradiol-17- β on uterine luminal and glandular epithelial hypertrophy, evaluated morphometrically. *Med Sci Res*; 23: 81-83. 1995.
- 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.
- Tobais H, Cook D, Chambers T, DalzellIN. *Clin Sci*;87:587-591 Abstract.1994.
- Turner RT. Mice, estrogen and postmenopausal osteoporosis. *J bone Miner res* 14: 187- 191. 1999.
- Turner RT, Wakley GK, and Hannon KS. Differential effects of androgens on cortical bone histomorphometry in gonadectomized male and female rats. *J Orthop Res* 8: 612-617. 1990.
- Udoff L, Langenberg P, Adashi EY. Combined continous replacement therapy. A critical review. *Obstet Gynecol*. 86: 306-16. 1995.
- Watson CS, Gametchu B, Membrane initiated steroid actions and the proteins that mediate them. *Proc soc exp boil med*; 220: 9-19. 1999.
- Whitehead MI, King RJB, McQueen J et al.,Endometial histology and biochemistry in climacteric women during estrogen and estrogen/progestogen therapy. *JR Soc Med*.72: 322-29. 1979.
- Whitehead MI. The effects of various types of progestagens on the postmenopausal endometrium. *J Reprod Med*. 27: 539-44. 1982.

- Xu L, Glass CK, Rosenfeld MG. Coactivator and corepressor complexes in nuclear receptor function. *Curr Opin Genet Dev*;9:140-147. 1999.
- Ylikomi T, Wurtz J, Syvala H, Passinen S, Pekki A, Haverinen M, Blauer M, Tuohimaa P, Gronemeyer H, Reappraisal of the role of heat shock proteins as regulators of steroid receptor activity. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*; 33:437-466. 1998.

VII. ANEXO

Fotografías de los procedimientos realizados.

Respuesta estrogénica



1. Inyección vía subcutánea de los tratamientos de acuerdo a su condición experimental.



2. Preparación de las ratas mediante anestesia y posterior extracción de los úteros después de 6 y 24 hrs de aplicado los tratamientos.



3. Cuerno uterino seccionado en tres partes iguales y posteriormente fijados en una solución de formalina (10%).



4. Cortes de tejido uterino sometidos a baño de flotación a 40°C.



5. Batería de tinción para cuernos de útero de rata insertados en portaobjetos.



6. Análisis Microscópico de los cuernos uterinos montados en

Ensayo toxicológico



7. Extractos obtenidos de distintas plantas. estudio toxicológico.



8. Preparación de la dosis del extracto administrado en el



9. Jeringa con sonda orogástrica utilizada en la administración de las dosis.



10. Procedimiento de administración del extracto en estudio.