



**Universidad  
de Valparaíso**  
CHILE

FACULTAD DE FARMACIA  
QUIMICA Y FARMACIA  
LABORATORIO DE TOXICOLOGIA

**EVALUACION DEL EFECTO SUBCRONICO DE 28 DIAS  
DEL ACEITE DE PALTA EN UN  
MODELO ROEDOR DE MENOPAUSIA**

Internado para optar al título de Químico Farmacéutico

**ALEJANDRA SOLEDAD VOZMEDIANO ARRIAGADA**

**Directora de Internado:** María Fernanda Cavieres Fernández, PhD

**2013**

*Dedicado a ....*

*Mis padres Alejandro y Margarita, ya que gracias a ellos  
soy lo que soy ..... y a mis hermanos Yennifer y Rodrigo,  
que me han apoyado incondicionalmente....*

*LOS AMO ¡!!!*

## *AGRADEZCO ...*

*Al Centro Regional de Estudios en Alimentos Saludables, CONICYT-REGIONAL, GORE REGIÓN DE VALPARAÍSO, R12C1001”, ya que este proyecto contó con su financiamiento.*

*A mi directora de tesis María Fernanda Cavieres que me dio la posibilidad de conocer el camino con el que me identifiqué profesionalmente, el área científica, gracias por su apoyo, comprensión y cariño.*

*A mis compañeros de Laboratorio de Toxicología con los que compartí tan lindos momentos y en especial a Julieta y Fernanda que siempre estuvieron dispuestas a ayudarme y a Patricio que me apoyó en gran parte del estudio.*

*A Claudia Delgado y Rubén por su ayuda y por aguantar todas las molestias y llamadas.*

*A Claudia Hernández y Claudia Santibañez, por estar siempre ahí y darme el consejo correcto.*

*Al personal auxiliar y secretaria de la Facultad de Farmacia que siempre tenían disposición para lo que les pidiera.*

*Finalmente, quiero agradecer a cada uno de los integrantes de mi familia que durante este largo camino han contribuido a que pueda ser una mujer hecha y derecha y ahora una profesional... Gracias a mis padres, a mis hermanos, a mis tías, tíos y primos; a mí Peyí y Álvaro Corona Cordano; y como dejar de mencionar a la otra parte de mi familia que son mis amigos incondicionales de la “U” .... Maripa, Camí, Mila, Nicolás, Lidý, Romy, Angélica, Andrea, Sílvana, Daniel, Jose, Aylíhn, Rod, Agustín; a todos los que componen el grupo de los miércoles del terror y en especial a mis tres fantásticos: Víctor, Juan Carlos y Catita...*

<b>I.RESUMEN</b>	iv
<b>II.ABSTRACT</b>	vi
<b>III.INTRODUCCION</b>	1
Eje hipotálamo-hipófisis-ovario	3
Estrógenos	5
Tratamiento manifestaciones menopausia	8
Modelo roedor de menopausia	10
Ciclo estral	11
Aceite de palta	13
Antecedentes de la propuesta de internado	13
<b>IV.OBJETIVOS</b>	17
<b>V.MATERIALES Y METODOS</b>	19
Animales de experimentación	20
Generación de modelo de menopausia	20
Administración de aceite de palta	21
Recolección de muestras	22
Histología	22
Método estadístico	22
<b>VI.RESULTADOS</b>	23
Consumo de alimento y agua	24
Variación de peso corporal	26
Efecto uterotrópico	27
Ciclo estral	28
Histología útero, vagina y aorta	31
<b>VII.DISCUSIÓN</b>	38
<b>VIII.CONCLUSIONES</b>	48
<b>IX.BIBLIOGRAFIA</b>	50
<b>X.ANEXOS</b>	55



La función reproductiva de la mujer está controlada principalmente por el estradiol, por lo que cuando la función ovárica decae, los niveles plasmáticos de esta hormona disminuyen, originando el climaterio durante el cual se generan una serie de manifestaciones clínicas que llevan a disminuir la calidad de vida de la mujer, entre las que se encuentran: aumento de peso, fatiga, síntomas vasomotores, problemas cardiovasculares y osteoporosis. La terapia farmacológica estándar es la terapia de reemplazo hormonal, que no ha estado exenta de polémicas en cuanto a su uso, dosis y prolongación, debido a los riesgos de cáncer y alteraciones cardiovasculares asociadas a ella. De esta forma, se hace imprescindible desarrollar nuevas opciones para el alivio de las manifestaciones climatéricas. Estudios previos en el Laboratorio de Toxicología de la Universidad de Valparaíso han determinado que el aceite de palta es capaz de inducir una respuesta estrogénica en exposición aguda en ratas. En este internado se realizó un estudio exploratorio para evaluar los efectos subcrónicos de 28 días, del aceite de palta por vía oral, utilizando un modelo roedor de menopausia, en el cual se simulan las manifestaciones propias del climaterio. Se evaluaron los efectos de este aceite sobre el peso corporal, el consumo de agua y alimento, efecto uterotrópico y ciclo estral y se realizó un estudio histológico cualitativo para evidenciar la actividad estrogénica del aceite de palta en útero, vagina y aorta. El aceite de palta no indujo efecto uterotrópico, aunque sí indujo modificaciones histológicas y citológicas compatibles con respuesta estrogénica. Por otro lado, las observaciones permiten inferir un posible sinergismo entre el aceite de palta y el estradiol, lo que permite concluir, que en este modelo, el aceite posee propiedades estrogénicas.



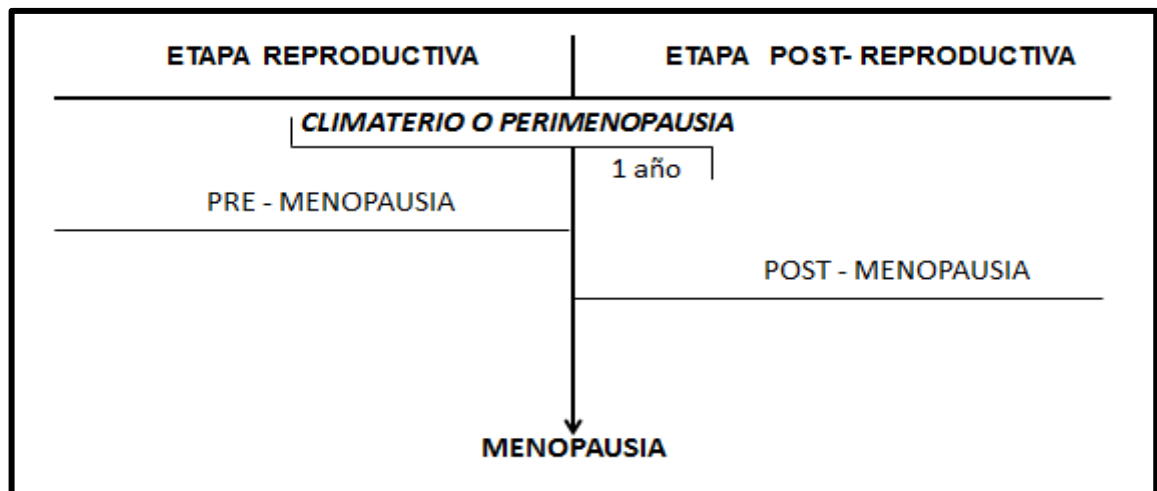
Reproductive function in women is mainly controlled by estradiol. When ovarian function decays and hormonal plasma levels decrease, giving rise to the climacteric stage, a series of clinical manifestations including an increase in body weight, fatigue, vasomotor symptoms, cardiovascular disease and osteoporosis, among others, may lead to a lower quality of life. Hormonal replacement therapy is the standard pharmacological therapy, although controversial, due to dose and extent of time requirements and association with risk of cancer and cardiovascular diseases. Thus, it is imperative to develop new therapeutic options for the relief of climacteric symptoms. Previous studies in the Toxicology Laboratory at the University of Valparaíso have shown that avocado oil is capable of inducing an estrogenic response after acute exposure in rats. The goal of this internship was to use a rodent model of menopause to study the sub chronic effects of avocado oil administered by gavage during 28 days. Body weight, water and food consumption, uterotrophic effect and estral cycle were evaluated as well as qualitative histology to assess estrogenic activity of avocado oil on uterus, vagina and aorta. Avocado oil did not induce an uterotrophic response although it did produce histological and cytological modifications which could be related to an estrogenic response. On the other hand, observations support a possible synergism between avocado oil and estradiol. Avocado oil does have estrogenic properties in this rodent model.

### **III. INTRODUCCION**

---

La menopausia es un evento natural e inevitable que marca el inicio del período post-reproductivo de la mujer y ocurre por una disminución de la función ovárica, confirmada por 12 meses continuos de amenorrea (International Menopause Society, 2013; Canto, 2006). Cerca del 10% de la población del mundo son mujeres en período postmenopáusicas y son aproximadamente 25 millones de mujeres en el mundo las que entran en este período cada año (Parra, 1998). El promedio de edad en el que comienza la menopausia en Chile es de 49 años (Blümel y col., 2002). Si se considera que más de 2 millones de mujeres se encuentran entre los 40 y 64 años (INE, 2002), se puede suponer que la fase post-reproductiva se extiende por casi un tercio de la vida de la mujer chilena.

La figura 1 muestra un esquema con las fases de la transición a la etapa no reproductiva. La menopausia está precedida por la pre-menopausia, lo que hace referencia a la etapa reproductiva previa al último período menstrual. Por su parte, el climaterio o peri-menopausia es el periodo de transición desde la fase reproductiva a la no reproductiva, cuyo comienzo es marcado por la disminución en la función ovárica y se extiende durante el año posterior a la menopausia. Finalmente, la etapa comprendida desde el último periodo menstrual hasta la senectud se conoce como post – menopausia.



**Figura 1:** Etapas involucradas en fases reproductiva y post – reproductiva de la mujer.

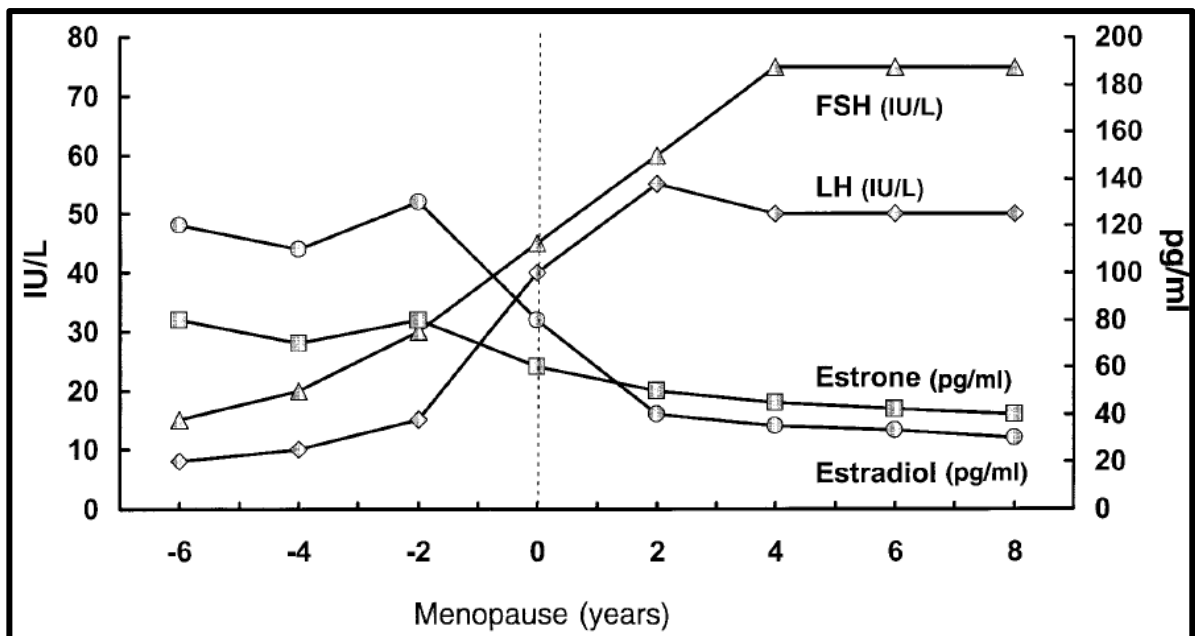
Durante la post-menopausia se pueden diagnosticar enfermedades más complejas como por ejemplo, alteraciones cardiovasculares entre las que se encuentra el infarto agudo al miocardio, y del tejido óseo, como la osteoporosis (Arriagada y col., 2005; International Menopause Society, 2013). El climaterio trae consigo atrofia folicular, la que produce una disminución de la cantidad de folículos funcionales y la pérdida de la función reproductiva (Wu y col., 2005). Es ocasionado por una disminución de los niveles hormonales sanguíneos de estradiol (E) e inhibina (I), a diferencia de los de las hormonas folículo estimulante (FSH) y luteinizante (LH) que se incrementan, aunque esta última en menor proporción (Shifren y Schiff, 2000). El cambio hormonal ocasiona las dismenorreas y amenorreas junto con una serie de manifestaciones clínicas como bochornos, insomnio, cambios emocionales, ganancia de peso, dolor y fatiga generalizada (Arriagada y col., 2005).

### **Eje hipotálamo – hipófisis – ovario**

En general, la función reproductora de la mujer se encuentra regulada por el eje hipotálamo – hipófisis – gonadal, el cual a través de la liberación de una variedad de hormonas, controla el ciclo menstrual. El hipotálamo libera la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), la que estimula a la hipófisis a secretar las gonadotropinas, FSH y LH, las que actúan sobre el ovario. La FSH induce el desarrollo folicular, la aromatización estrogénica y la síntesis de inhibina. Actúa también sobre receptores de la capa granulosa del ovario induciendo el desarrollo folicular y la síntesis de E. Por su parte, la LH actúa sobre el folículo maduro generando una serie de eventos que permitirán la ovulación, luego de este proceso las células foliculares sufren una transformación lo que da lugar al cuerpo lúteo el que es estimulado por LH para secretar estrógenos y sobretodo

progesterona (P). Por último, los estrógenos en pequeñas cantidades ejercen un efecto inhibitorio en la síntesis y liberación de gonadotrofinas por la hipófisis lo que se potencia cuando está disponible la progesterona (Guyton y Hall, 2001).

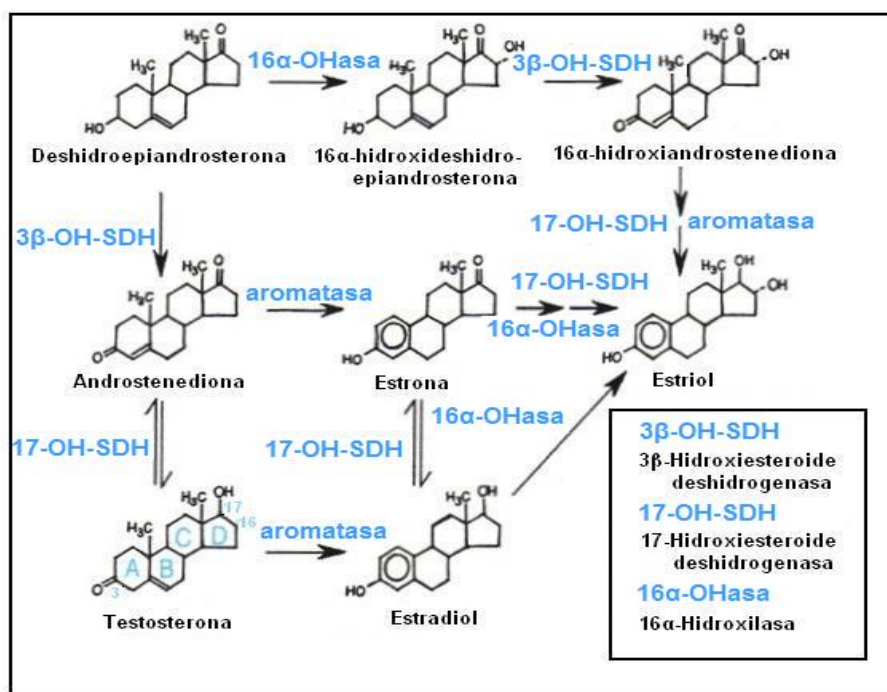
Durante la transición de la etapa reproductiva a la no reproductiva suceden varios eventos antes de que se detecten las variaciones de E, las que se resumen en la figura 2. Se elevan las hormonas FSH y LH, esta última en menor proporción que la primera, y disminuyen los de progesterona (P) (Canto y col., 1996). En este período los ciclos son irregulares con anovulación intermitente, lo que puede provocar amenorrea con valores de FSH y LH elevados, que vuelven a niveles normales cuando existe ovulación. Finalmente, los folículos ováricos dejan de responder a FSH y LH; E y estrona descienden definitivamente por lo que hay cese de la menstruación (Shifren y Schiff, 2000).



**Figura 2:** Niveles séricos de hormonas ováricas e hipofisarias durante la transición hacia la menopausia de la mujer (modificado de Shifren y Schiff, 2000).

## Estrógenos

Los estrógenos son un grupo de hormonas esteroidales, entre los que se encuentran el 17  $\beta$ -estradiol y sus metabolitos estrona y estriol, siendo el estradiol el de mayor potencia en seres humanos. Cada una de estas moléculas es un esteroide de 18 carbonos con un anillo fenólico que contiene uno o más grupos hidroxilos del cual depende la unión selectiva y alta afinidad a los receptores de estrógenos. En la especie humana y en otros vertebrados, los estrógenos se producen fundamentalmente en el ovario aunque también existe producción en testículos, placenta, glándulas suprarrenales, hígado y mamas. Además, existe producción de estrógenos provenientes del estroma del tejido adiposo, donde se sintetiza estrona a partir de deshidroepiandrosterona secretada por la corteza suprarrenal. Estas fuentes secundarias son especialmente importantes en mujeres post-menopáusicas (Loose y Stancel, 2006).

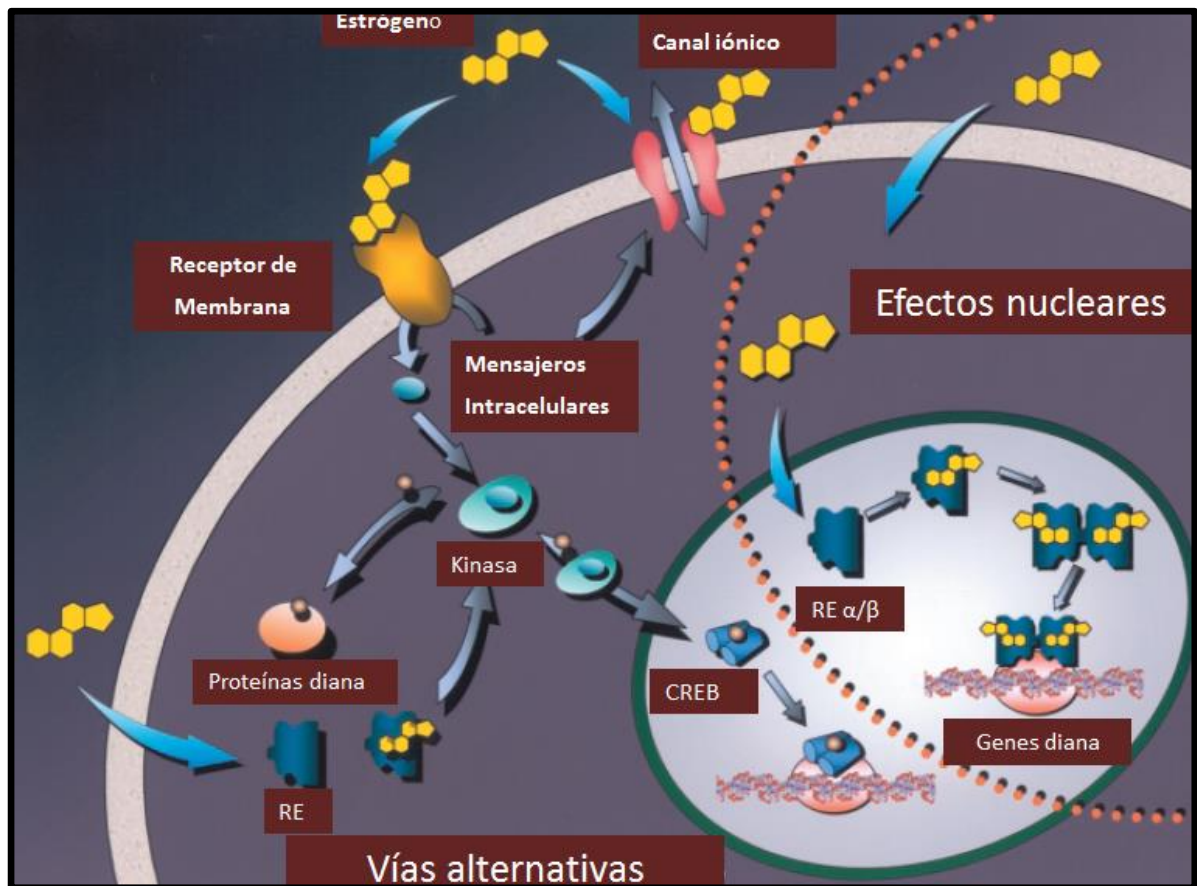


**Figura 3:** Biosíntesis de estrógenos (modificado de Loose y Stancel, 2006).

La figura 3 muestra la síntesis de estrógenos a partir de testosterona y androstenediona. La reacción involucra la aromatización del anillo A catalizada por la aromatasa. En el primer paso, se hidroxila el C19, luego hay una segunda hidroxilación que elimina el C19 hidroximetil recién formado obteniéndose un intermediario inestable que se reordena para formar el anillo A. El estradiol secretado se oxida reversiblemente para generar estrona mediante la 17-hidroxiesteroide y estriol por la acción de 16 $\alpha$ -hidroxilasa (Loose y Stancel, 2006).

Los estrógenos son transportados en la sangre ligados principalmente a albúmina y a globulinas específicas transportadoras de estrógeno y, dada su naturaleza lipofílica, difunden a través de la membrana plasmática en forma pasiva. En el citoplasma se unen a los receptores de estrógeno (RE)  $\alpha$  y  $\beta$  para formar el complejo hormona – receptor que difunde al núcleo, se dimeriza y se une a los elementos de respuesta a estrógenos (EREs), ubicados en los promotores de genes diana. La transcripción y transducción ribosomal posterior lleva a la síntesis de proteínas específicas que tendrán participación en acciones biológicas como el desarrollo de los caracteres secundarios, control de la ovulación y preparación cíclica del aparato reproductor para la fecundación e implantación (figura 4; Falkenstein y col., 2000; Nadal y col., 2001; Björnström y Sjöberg, 2005).

Además de los receptores genómicos, existen receptores estrogénicos “no genómicos” expresados en la membrana celular y que permiten ejercer efectos rápidos (figura 4). Los receptores de membrana generan una cascada de segundos mensajeros, como estimulación de la formación de AMPc, (adenosin monofosfato cíclico), fosforilación de CREB (elemento de respuesta a AMPc), formación de IP<sub>3</sub> (inositol 1,4,5-trifosfato), activación de las vías de las MAP-kinasas, incremento de calcio intracelular, entre otras.



**Figura 4:** Mecanismos de acción de estrógenos. Vía genómica y vías no genómicas del estradiol. RE: Receptor de estrógeno (modificado de Nadal y col., 2001).

Las respuestas no genómicas del E y en general de todas las hormonas esteroidales ocurren rápidamente, en unos pocos segundos o minutos ya que no requieren de los procesos de transducción y de síntesis de proteínas para producir su efecto (Falkenstein y col., 2000; Nadal y col., 2001).

Durante la menopausia, la disminución de los niveles de E genera una serie de manifestaciones que pueden no solo disminuir la calidad de vida de la mujer sino que también generar condiciones patológicas. Dentro de las más comunes, se encuentran los bochornos, los que se cree ocurren por una alteración de la actividad neurotransmisora en

el centro termorregulador a nivel central. El E ejerce un efecto neuromodulador a ese nivel, en especial sobre los sistemas serotoninérgicos y noradrenérgicos, de manera que puede afectar la expresión, modificar la producción, liberación y recaptación de estos neurotransmisores, lo que a su vez altera la capacidad de respuesta a las variaciones de temperatura (Rossmanith y Wiebke, 2009).

Los síntomas vasomotores también pueden manifestarse por una pérdida en la sensibilidad del sistema vascular periférico lo que provocaría cambios en el umbral de vasodilatación cutánea, ya que los bajos niveles de estradiol del periodo perimenopáusico pueden disminuir la elasticidad de los vasos sanguíneos y generar patrones de vasodilatación retardada, lo que contribuye a la disfunción termorreguladora, originando calor acompañado de sudoración y escalofríos (Rossmanith y Wiebke, 2009).

Otro síntoma usual es la alteración del estado de ánimo, manifestado como cambios de humor, angustia, ansiedad, irritabilidad, dificultad para concentrarse y trastornos del sueño, pero su asociación con la disminución de estrógenos no es consistente (Canto y Polanco, 1996). Además, se presentan síntomas urinarios, como el aumento de frecuencia de micción e incontinencia urinaria, debido a que los tejidos se encuentran debilitados, lo que se relaciona con otro de los síntomas característicos como es la atrofia vaginal. Clínicamente el epitelio vaginal se encuentra delgado, pálido y seco; la vagina se estrecha, pierde rugosidad y se acorta. Esto involucra sequedad, prurito, vaginitis y dispareunia (Canto, 2006).

### **Tratamiento de manifestaciones de la menopausia**

La terapia de reemplazo hormonal es un tratamiento con hormonas, ya sea estrógeno solo o en combinación con progesterona y otros esteroides sintéticos, que se

administran con el fin de elevar sus niveles, a través de las vías transdérmica, vaginal u oral, que es la más usada (Parra, 1998). Este tratamiento ha sido una práctica común y frecuente en la mayoría de los países occidentales durante los últimos treinta años y se ha comprobado que permite evitar las complicaciones propias de la deficiencia hormonal, como la osteoporosis, enfermedad coronaria y otras manifestaciones características del climaterio y de la post-menopausia (Knowlton, 2012).

El uso de la terapia de reemplazo hormonal (TRH) fue cuestionado después de la publicación del estudio Women's Health Initiative (Rossouw y col., 2002) en el que se mostró que el uso combinado de estrógenos y progestágenos aumentaba el riesgo de padecer infarto al miocardio y cáncer de mama, lo que inmediatamente alertó a las pacientes provocando un rechazo colectivo al uso de este tratamiento. En respuesta, las sociedades médicas y paneles de expertos mundiales, ajustaron los criterios de prescripción de la TRH. No obstante, en la actualidad existen todavía autores que afirman que el uso de esta terapia aumenta el riesgo de una serie de eventos adversos para la salud como el cáncer de mama estrógeno-dependiente (Beral y col., 2010) y la promoción de la aterosclerosis, pudiendo incluso desencadenar eventos cardíacos agudos (Yildirim, 2010). Sin embargo actualmente, la comunidad médica propone que la TRH debe utilizarse en base a las manifestaciones de cada paciente escogiendo diferentes dosis, y vías de administración, ya sea oral, vaginal o transdérmica. En Chile se debe evaluar cada caso en particular y debe restringirse cuando existan mujeres con riesgo cardiovascular preexistente (Sociedad Chilena de Climaterio, 2009).

En este contexto, sería beneficioso encontrar alternativas o complementos a la terapia hormonal que pudieran ejercer acciones específicas, como por ejemplo, aliviar los bochornos, mejorar la densidad ósea, evitar la sequedad vaginal y disminuir la ganancia de peso, sin que aumente el riesgo de padecer cáncer u otro tipo de patologías. Por lo

que en este internado, se propone estudiar el efecto estrogénico del aceite de palta en un modelo roedor para la menopausia, el cual se describe a continuación.

### **Modelo roedor para menopausia**

Aproximadamente a los 10 meses de edad, las ratas hembras sufren una falla reproductiva que se aproxima a lo que sucede en el climaterio humano. No obstante, esta falla no se debe a una insuficiencia ovárica sino que a una alteración de la retroalimentación de los esteroides sexuales al hipotálamo, lo que se traduce en una disminución de la señalización de estimulación a este nivel (Kermath y Gore, 2012). En cambio, tal como ya se mencionó, en las mujeres peri-menopáusicas existe disminución tanto de folículos ováricos como de la calidad de los ovocitos, lo que conlleva a disminución en las concentraciones séricas de hormonas, sin que esto afecte la retroalimentación a nivel hipotalámico. Esta diferencia limita a la rata envejecida como modelo para la menopausia.

Sin embargo, es posible utilizar hembras más jóvenes, aunque en etapa adulta (alrededor de las 8 a 10 semanas), para inducir un estado de menopausia a través de la ovariectomización. Una vez extirpados los ovarios, la rata comienza a manifestar paulatina y progresivamente los efectos de la disminución del E endógeno lo que se puede igualar a una mujer que pierde la función ovárica folicular y hormonal (Kermath y Gore, 2012). En este modelo, la resorción ósea excede su formación, provocando la disminución de la masa ósea (Levolas y col., 2008). Con este procedimiento, también se produce una atrofia de los tejidos uterino (Zaid y col., 2010) y disminución del tejido biomecánico de la vagina y de sus propiedades de distensión, haciendo el tejido más débil y menos resistente (Moalli y col., 2008). Todos estos fenómenos concuerdan con lo que le

sucede a la mujer climatérica. Sin embargo, es necesario conocer lo que ocurre a nivel endocrino en el roedor para dejar de manifiesto que es un modelo que puede ser utilizado para mimificar la menopausia en la mujer, lo cual se describe a continuación.

### **Ciclo estral**

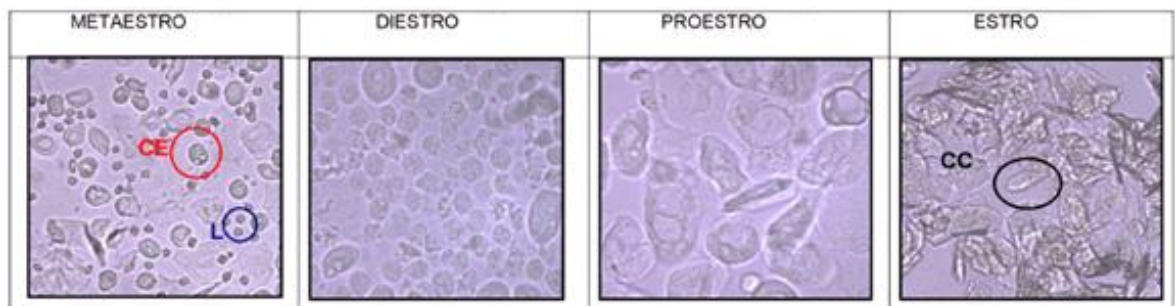
Los mamíferos tienen un ciclo sexual, denominado ciclo estral, excepto por los primates que poseen ciclo menstrual. A nivel endocrino no existen muchas diferencias, ya que en todos los mamíferos el ciclo sexual, está regulado por el eje hipotálamo – hipófisis – gonadal e involucra a las hormonas FSH, LH, E y P.

En las ratas, el ciclo estral dura entre 4 a 5 días y está compuesto por cuatro etapas: proestro (12 a 14 horas), estro (25 a 38 horas), metaestro (5 a 8 horas) y diestro (53 a 59 horas) (Westwood, 2008). La FSH estimula la síntesis y liberación de E y P en las etapas diestro y proestro, generando una concentración moderada y constante de estradiol circulante que ejerce un efecto de retroalimentación negativa sobre la secreción de GnRH, y por ende sobre la secreción de LH, manteniendo sus niveles bajos desde el estro hasta la mitad del proestro (fase folicular). Luego, se produce un aumento en las concentraciones de E por parte del ovario, lo que incrementa la producción de FSH y LH, generando el peak de estas hormonas y originando la preovulación. Posteriormente, se produce el incremento de secreción de estrógenos y P en el ovario, dando lugar a la ovulación y generando la receptividad del macho por parte de la hembra en lo que se conoce como estro.

En la etapa estro, la concentración plasmática de estrógeno desciende rápidamente, a diferencia de la progesterona que disminuye paulatinamente si el animal se ha apareado. Esto produce retroalimentación negativa a nivel de hipófisis e hipotálamo, lo que provoca que los niveles hormonales sean normales, de manera que se inicie un nuevo ciclo (Freeman, 2006).

Cada una de las etapas del ciclo presenta diferencias en las células que componen la mucosa vaginal, que se observan mediante citología vaginal al microscopio las que se presentan en la figura 5 y se describen a continuación:

- **Metaestro (M):** existe presencia de gran cantidad de leucocitos y en menor porcentaje células epiteliales grandes, cornificadas y nucleadas.
- **Diestro (D):** se observan leucocitos principalmente y en menor proporción células epiteliales nucleadas.
- **Proestro (P):** esta etapa se caracteriza por presentar principalmente células epiteliales en grupo con núcleo redondo perceptible.
- **Estro (E):** en esta etapa se pueden observar gran cantidad de células epiteliales escamosas cornificadas, de gran tamaño, de forma irregular, anucleadas y agrupadas en forma de racimo. Esta etapa se presenta después de la ovulación y es inducida por un aumento sustantivo en la concentración de estradiol, lo que permite a la hembra ser receptiva al macho. Es fácil de identificar puesto que en el portaobjetos se notan a simple vista unas fibras blancas (Freeman, 2006).



**Figura 5:** Características citológicas del epitelio vaginal durante el ciclo estral de la rata. CE: Célula epitelial; L: Leucocito; CC: Célula cornificada (adaptado de Castillo R, 2010).

### **Aceite de palta**

Los lípidos forman parte de la dieta habitual de los seres humanos. En Chile, en las últimas dos décadas se ha producido un incremento tanto en la disponibilidad como en la ingesta total de grasas (Albala y col., 2003), por lo que se ha experimentado variaciones importantes en el consumo de aceites, tanto en cantidad como en calidad.

El aceite de palta posee principalmente ácidos grasos monoinsaturados, siendo el ácido oleico el de mayor proporción. Se extrae del fruto de la especie *Persea americana* Mill. Debido a su alto punto de humo (271°C) permite conservar su composición nutricional y sus características organolépticas aun siendo sometido a altas temperaturas (Olaeta y col., 1999).

Existe evidencia de que los extractos acuosos y alcohólicos de las hojas han evidenciado poseer efecto analgésico, anti-inflamatorio y vasodilatador en ratas y ratones (Yassir y col., 2010). Si bien es cierto que las propiedades de este aceite no han sido investigadas en profundidad, se ha demostrado que el consumo de este fruto y sus derivados ejercen efectos benéficos sobre el perfil lipídico, disminuyendo el colesterol total, los triglicéridos y aumentando el HDL colesterol (Anderson y col., 2009; Dreher y Davenport, 2013). Sin embargo, la actividad biológica del aceite no ha sido descrita.

### **Antecedentes de la propuesta de internado**

En el transcurso de una investigación realizada en el Laboratorio de Toxicología, se observó que el aceite de palta induce respuesta estrogénica en ratas (León y Peña, 2012). Específicamente, en ese trabajo se utilizaron los ensayos Allen-Doisy y uterotrópico, los que permiten observar respuestas a estímulos estrogénicos en ausencia de estradiol (por ovariectomización en Allen-Doisy y por inmadurez sexual en

uterotrópico). En la hembra ovariectomizada, la inducción y persistencia del estro en respuesta a la exposición a una sustancia química, indica que esta sustancia tiene propiedades estrogénicas, es decir, imita la acción del E.

La tabla 1 muestra el efecto estrogénico del aceite de palta, en comparación con el E y el bisfenol A, una sustancia sintética reconocida estrogénica. La administración del aceite indujo cornificación del epitelio vaginal, propia de la fase de estro de forma menos sostenida que el bisfenol A, indicando un efecto estrogénico positivo aunque de menor potencia que la molécula sintética, para inducir cornificación del epitelio vaginal. En la tabla 1 también se muestra el efecto de la administración del aceite de palta sobre el peso uterino, en el ensayo uterotrópico. En este ensayo, se mide la respuesta a una estimulación estrogénica mediante un aumento de peso uterino debido al crecimiento estrógeno-dependiente de este órgano. El ensayo utiliza al animal lactante, por su inmadurez reproductiva (es decir no tiene secreción endógena de estradiol). En el caso del aceite de palta, su administración causó un incremento de 232 % en el peso uterino, con una potencia similar a la del bisfenol A.

**Tabla 1.** Efecto de la administración del aceite de palta sobre la duración de la etapa estro (ensayo Allen Doisy) y el incremento del peso uterino ( ensayo uterotrópico)<sup>a</sup>.

	Sin tratamiento	Estradiol 50 µg/kg	Bisfenol A 60 µg/kg	Aceite de palta (300 µL)
<b>Duración del estro (días) (Ensayo Allen-Doisy)</b>	NO	4,8 ± 0,4	2,7 ± 0,5	1,5 ± 0,5
<b>Porcentaje de aumento de peso uterino (Ensayo uterotrópico)</b>	NO	488	225	232

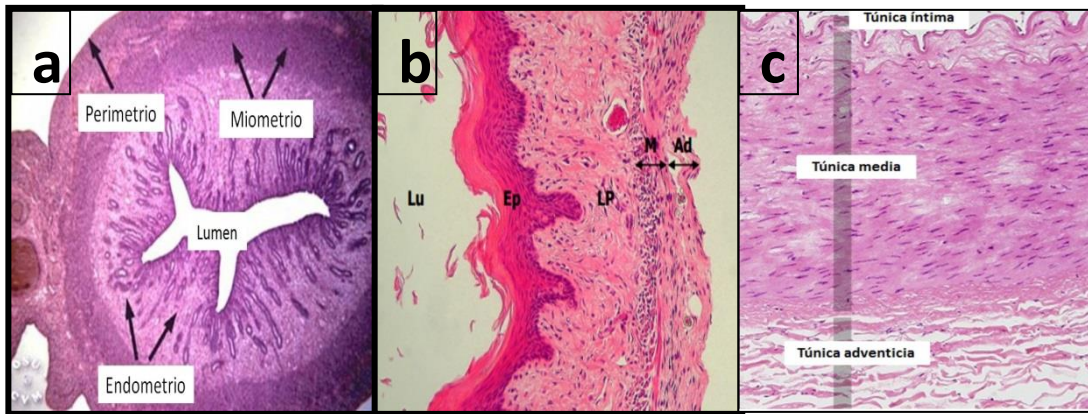
<sup>a</sup> Estradiol y bisfenol A corresponden a controles positivos, <sup>b</sup> En ambos ensayos, los tratamientos fueron administrados durante dos días, la primera dosis, la tarde del primer día y las dosis restantes en la mañana y en la tarde del segundo día. NO: no observado

Las observaciones llevan a proponer que este efecto podría mantenerse en la administración crónica y ser útil como terapia complementaria en la menopausia. De hecho, estudios preliminares permitieron observar la aparición esporádica de células cornificadas en frotis vaginales de hembras ovariectomizadas a las que se administró 1 mL/día de aceite de palta vía gavage (observaciones personales, datos no publicados). En base a los antecedentes presentados, en esta investigación se propone realizar una evaluación exploratoria que permita valorar si el aceite de palta podría ser un potencial coadyuvante en el tratamiento de la menopausia, para lo cual se utilizará a la rata ovariectomizada como modelo roedor de la menopausia; se evaluará histología de órganos reproductores (útero y vagina) y la aorta. Cabe destacar que para el análisis de los resultados, en este estudio exploratorio, se decidió hacer un estudio cualitativo comparando distintas estructuras en los tejidos estudiados. De esta forma, en el útero se evaluó la presencia de edema, eosinófilos y aumento del tamaño del epitelio endometrial. En cuanto a la vagina, se comparó la cornificación del epitelio vaginal mientras que para la aorta se evaluó la deposición de lípidos.

Para comprender los resultados obtenidos, a continuación se muestra la figura 6 con las principales estructuras presentes en los cortes histológicos de los órganos de rata estudiados. En el panel a se presenta un corte de útero en el que se observa la capa externa o perimetrio, una capa muscular media o miometrio compuesto por dos capas de células musculares, la exterior longitudinal y la interna circular, por último la capa epitelial interna llamada endometrio, la que posee una capa columnar de células epiteliales desde la superficie luminal.

En el panel b, se presenta un corte transversal de vagina en el que se aprecia una capa adventicia exterior delgada compuesta por tejido conjuntivo; una capa muscular media, formada por capas de músculo liso circulares y longitudinales menos evidentes que en tejido uterino y una capa mucosa formada por epitelio escamoso estratificado.

El panel c, presenta un corte transversal de aorta en el que se observan la capa externa o túnica adventicia que está formada por tejido conjuntivo irregular y rodea al vaso sanguíneo; la túnica media que contiene abundantes fibras elásticas que se anastomosan para formar un fenestrado o membrana y además posee fibras de músculo liso entre las redes de las fibras elásticas. Hacia el interior se encuentra la túnica íntima que se compone de una sola capa de células endoteliales.



**Figura 6:** Cortes histológicos de útero, vagina y aorta (a,b,c; respectivamente). Lu: lumen; Ep: epitelio vaginal; LP: lámina propia; M: capa muscular; Ad: capa adventicia. 10 X H&E (modificado de OCDE, 2007).

## **IV. OBJETIVOS**

---

Objetivo general:

- Valorar si el aceite de palta es un potencial coadyuvante en el tratamiento de la menopausia.

Objetivos específicos:

- Evaluar el efecto de la administración de aceite de palta sobre el peso corporal.
- Evaluar atenuación de la atrofia de los órganos reproductores, mediante histología, en respuesta a la administración de aceite de palta.
- Evaluar la disminución de la deposición de lípidos en aorta, mediante histología, en respuesta a la administración de aceite de palta.

## **V. MATERIALES Y METODOS**

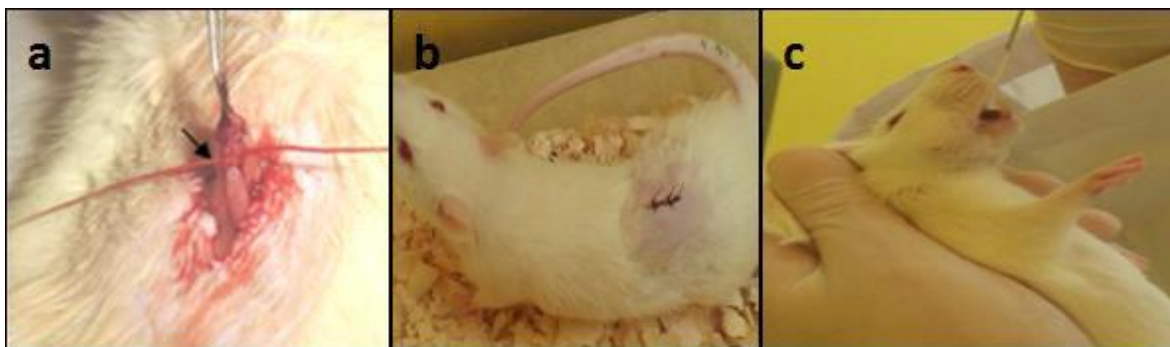
---

### **Animales de experimentación**

Se utilizaron 24 ratas hembras de nueve semanas de edad, de la cepa Sprague-Dawley del Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Farmacia. Los animales debían tener un peso mínimo de 150 g y fueron mantenidos bajo condiciones controladas de ciclos de luz/oscuridad de 12:12 hrs (6AM-6PM), humedad relativa ambiental entre 40 y 70 %, temperatura de  $21\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 3\text{ }^{\circ}\text{C}$  y acceso *ad libitum* a alimento (Lab Rat Diet, Champion<sup>®</sup>) y agua potable.

### **Generación de modelo de menopausia**

Se conoce que el ciclo estral puede ser estudiado mediante frotis vaginal y que para realizar la ovariectomización es necesario confirmar que los animales tiene un ciclo estral normal, por lo que se realizó un seguimiento de al menos dos ciclos estrales estables consecutivos. Las muestras se obtuvieron diariamente en las mañanas, mediante tórula embebida en suero fisiológico, depositando el fluido en un porta objeto para su observación al microscopio óptico (Olympus CX- 21) bajo un aumento de 10x o 40x. Una vez confirmada la ciclicidad normal, las ratas se anestesiaron con ketamina al 10% y xilacina al 2% en dosis de 90 y 10 mg/kg respectivamente y fueron ovariectomizadas como se describe en las Guías de la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OECD, 2007). Los ovarios de las ratas fueron expuestos y ligados a nivel de los oviductos, para proceder a su extirpación por encima de esta ligadura (figura 7a y b). Para confirmar el éxito de la operación, se realizó un seguimiento del ciclo estral hasta la mantención de anestro. Los animales que presentaron días esporádicos de cornificación del epitelio vaginal, fueron retirados del ensayo. Una vez establecido el anestro, los animales fueron administrados con una dosis única de 1 µg de estradiol, para comprobar respuesta estrogénica. 5 días después, cuando dicha respuesta estrogénica había finalizado, los animales se asignaron aleatoriamente a los grupos respectivos.



**Figura 7:** Rata hembra adulta en procedimiento quirúrgico de extirpación de ovarios. **a.** Exposición y ligadura de ovario. **b.** Incisión lumbar post ovariectomización. **c.** Técnica de administración gavage

### **Administración de aceite de palta**

Los animales se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos de 6 animales cada uno, los que fueron dosificados durante 28 días según:

- Suero fisiológico: 2 mL/día, vía oral por gavage (figura 7c)
- Estradiol (Sigma, N° CAS 50-28-2): 50 µg/kg vía subcutánea, cada cinco días + 2 mL de solución salina, vía oral por gavage
- Aceite de palta: 2 mL/día, vía oral por gavage
- Aceite de palta: 2 mL/día, vía oral por gavage + Estradiol (Sigma, N° CAS 50-28-2) 25 µg/kg vía subcutánea cada cinco días

La dosis de E fue establecida en estudios previos (Castillo, 2010; León y Peña, 2012). Asimismo, se utilizó como vehículo aceite de pepita de uva ya que en los mismos estudios anteriores demostró no poseer actividad estrogénica. El aceite de palta fue adquirido en un supermercado local.

Se monitorizó la ingesta diaria de alimento y agua, citología vaginal diaria, pero corporal semanalmente y se supervisó a los animales de acuerdo al protocolo de supervisión del Bioterio de la Universidad de Valparaíso. (Anexo 1)

### **Recolección de muestras**

Al término del periodo de exposición, las ratas fueron eutanizadas por inhalación de dióxido de carbono y posterior dislocación cervical, para confirmación de muerte. Se recolectaron cuidadosamente los órganos reproductores sensibles a E (útero y vagina), los cuales fueron pesados y fijados en paraformaldehído al 4%. Adicionalmente se recolectó la aorta abdominal también sensible a E, la que fue fijada en paraformaldehído al 4%.

### **Histología**

Las muestras fueron tratadas de acuerdo a procedimientos de rutina utilizados en el Laboratorio de Toxicología, se incluyeron en parafina y posteriormente se cortaron secciones histológicas de 5 micrómetros las que fueron teñidas con hematoxilina y eosina y examinadas por microscopía óptica (Olympus CX- 21) bajo un aumento de 4 x, 10x y 40x. Las imágenes fueron capturadas mediante cámara micro imaging CMOS 3.2 Mp, la cual utiliza el software Micrometrics SE Premium, standard edition 2000-2009.

### **Método estadístico:**

Los análisis estadísticos fueron realizados el programa Graphpad Prism versión 5.0. Se utilizó un análisis ANOVA de mediciones repetidas de dos vías para el consumo de agua y alimento y peso corporal mientras que el efecto uterotrópico fue analizado por ANOVA y un post-test de Dunnett. Los valores se representan como promedio  $\pm$  error estándar.

## **VI. RESULTADOS**

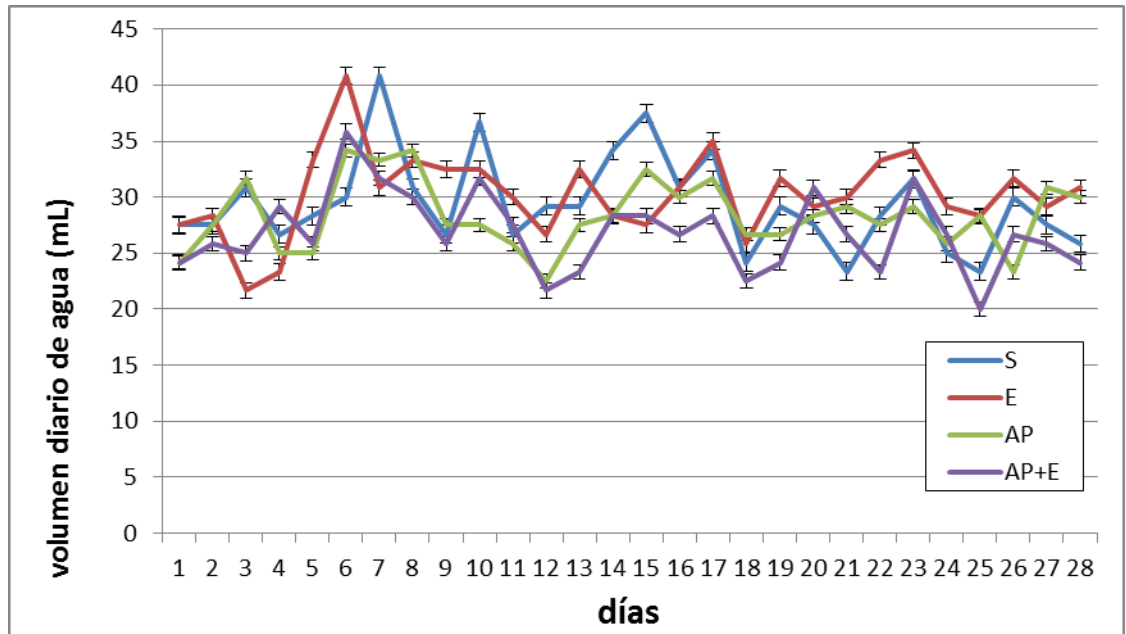
---

Este internado continua un estudio previo en el que se confirmó actividad estrogénica de aceite de palta en administración aguda a ratas (León y Peña, 2012). Se propuso realizar una investigación utilizando un modelo roedor de menopausia para explorar un posible efecto sobre la atenuación de las manifestaciones de la menopausia y por tanto el uso del aceite como complemento en la terapia de reemplazo hormonal. La generación del modelo de menopausia así como el periodo de administración fueron exitosos, en cuanto a que no se detectó cambios conductuales o fisiológicos (pérdida de peso, aspecto, comportamiento espontáneo y comportamiento a la manipulación) que pudieran afectar el desarrollo del estudio. Los resultados que se presentan a continuación se dividen en las siguientes secciones: consumo de alimento y agua, variación de peso corporal, efecto uterotrópico, citología vaginal e histología de vagina, útero y aorta. Se utilizan las siglas S, E, AP y AP+E para nombrar los grupos de estudio Solución Salina, Estradiol, Aceite de Palta y Aceite de Palta + Estradiol, respectivamente.

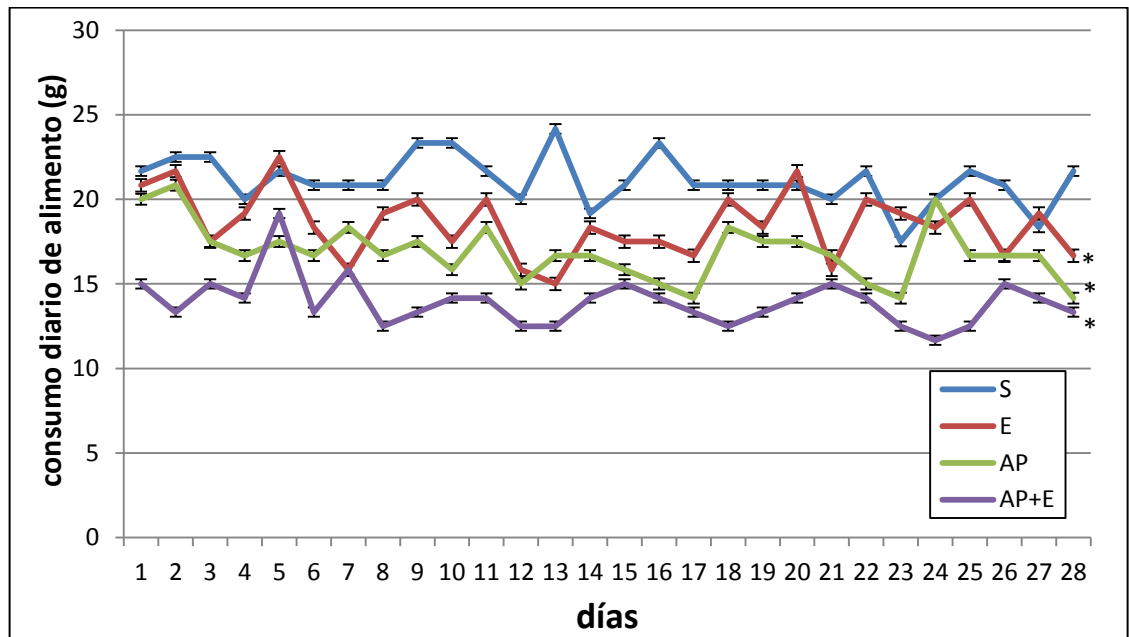
### **Consumo de agua y alimento**

Un requerimiento básico de cualquier estudio con animales de experimentación es controlar la normal ingesta de agua y alimento durante el periodo de estudio, con este objeto se monitoreó diariamente su consumo. En las figuras 8 y 9 se presenta el consumo diario de agua y alimento, respectivamente, de los diferentes grupos de estudio durante los 28 días de tratamiento. En relación al consumo de agua, se observa que fue similar en todos los grupos (2-way ANOVA, mediciones repetidas,  $p > 0,05$ ).

En cuanto a la ingesta diaria de alimento, el grupo en el que se observó mayor consumo fue el S, mientras que la ingesta disminuyó según E, AP y AP + E, existiendo diferencias estadísticamente significativas en estos tres grupos en relación al grupo control S (2-way ANOVA, mediciones repetidas  $p < 0,0001$ ).



**Figura 8:** Consumo diario de agua expresado como promedio  $\pm$  error estándar de los diferentes tratamientos. S: suero; E: estradiol; AP: aceite de palta; AP+E: aceite de palta + estradiol.



**Figura 9:** Consumo diario de alimento expresado como promedio  $\pm$  error estándar de los diferentes tratamientos. S: suero; E: estradiol; AP: aceite de palta; AP+E: aceite de palta + estradiol. \* Diferencia estadísticamente significativa en relación al grupo control (2-way ANOVA, mediciones repetidas  $p < 0,0001$ ).

### Variación de peso corporal

La tabla 2 presenta el peso corporal de los animales determinado semanalmente durante el estudio. Se observó que los animales de los grupos E y AP+E tendieron a mantener el mismo peso corporal que tenían en la semana previa al comienzo de la administración de los tratamientos (columna semana 0 de la tabla 2), mientras que los animales de los grupos S y AP mostraron un similar aumento de peso corporal durante el estudio. De esta forma, los grupos S y AP aumentaron, en promedio, un 14 % de su peso inicial, mientras que los grupos E y AP+E, aumentaron un 2 y un 4 %, respectivamente. No obstante, el análisis estadístico no demostró un efecto total significativo de los tratamientos sobre el peso corporal ( $p= 0,0767$ ), a excepción del grupo AP+E en la semana 3, que se diferenció estadísticamente del grupo S ( $p < 0,0001$ ). Sin embargo, cuando se analiza la variación de peso de una semana a otra, el análisis estadístico permite determinar una diferencia extremadamente significativa ( $p < 0,0001$ ), entre las semanas 1 y 2, para el grupo E, y entre los pesos corporales inicial y final de los grupos S y AP versus los grupos E y AP+E (columnas 2-1 y 4-0, respectivamente, de la tabla 3).

**Tabla 2:** Peso corporal semanal (g), según tratamiento<sup>a</sup>

TRATAMIENTO	SEMANA				
	0	1	2	3	4
<b>S</b>	322 ± 10	336 ± 10	350 ± 11	359 ± 11	367 ± 13
<b>E</b>	324 ± 12	337 ± 9	322 ± 10	326 ± 11	329 ± 12
<b>AP</b>	339 ± 16	358 ± 15	372 ± 15	376 ± 15	388 ± 16
<b>AP + E</b>	318 ± 17	322 ± 17	323 ± 18	323 ± 18 *	331 ± 19

<sup>a</sup> Valor representa promedio ± error estándar; \*diferencia estadísticamente significativa con el grupo control

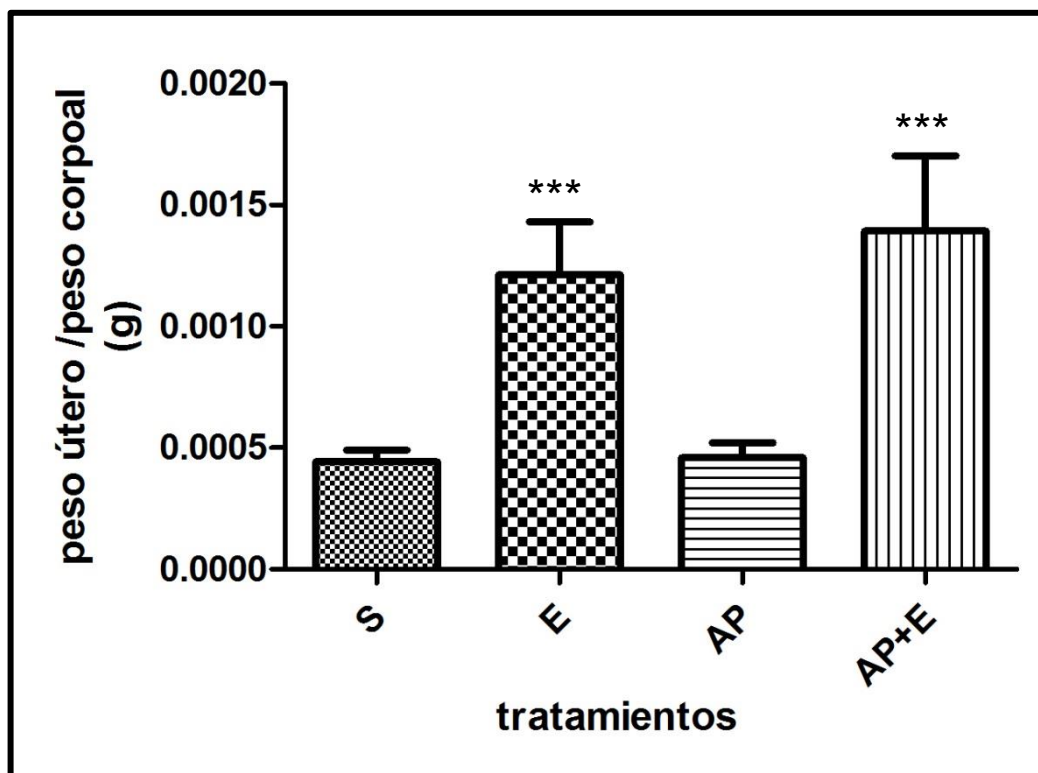
**Tabla3:** Modificación del peso corporal (g) durante el período de tratamiento <sup>a</sup>

TRATAMIENTO	SEMANA				
	1-0	2-1	3-2	4-3	4-0
<b>S</b>	14 ± 4	14 ± 4	9 ± 2	8 ± 5	40 ± 14
<b>E</b>	13 ± 6	12 ± 10*	4 ± 2	3 ± 2	5 ± 12*
<b>AP</b>	18 ± 3	14 ± 2	5 ± 2	12 ± 3	49 ± 5
<b>AP + E</b>	3 ± 2	3 ± 3	1 ± 4	8 ± 3	13 ± 3*

<sup>a</sup> Cada columna representa la diferencia de peso corporal entre las semanas indicadas, <sup>b</sup> Valor representa promedio ± error estándar, \*diferencia estadísticamente significativa con el grupo control.

### Efecto uterotrópico

La figura 10 muestra el peso del útero, recolectado al término del estudio, en relación al peso corporal, para todos los grupos de estudio. Se observó una diferencia estadísticamente significativa en los grupos E y AP + E en relación al grupo control al que se administró solución salina (ANOVA, Dunnett's  $p < 0.0005$ ), mientras que en los animales a los que se administró AP no se observó el efecto uterotrópico, es decir el aceite no produjo un incremento del peso uterino.



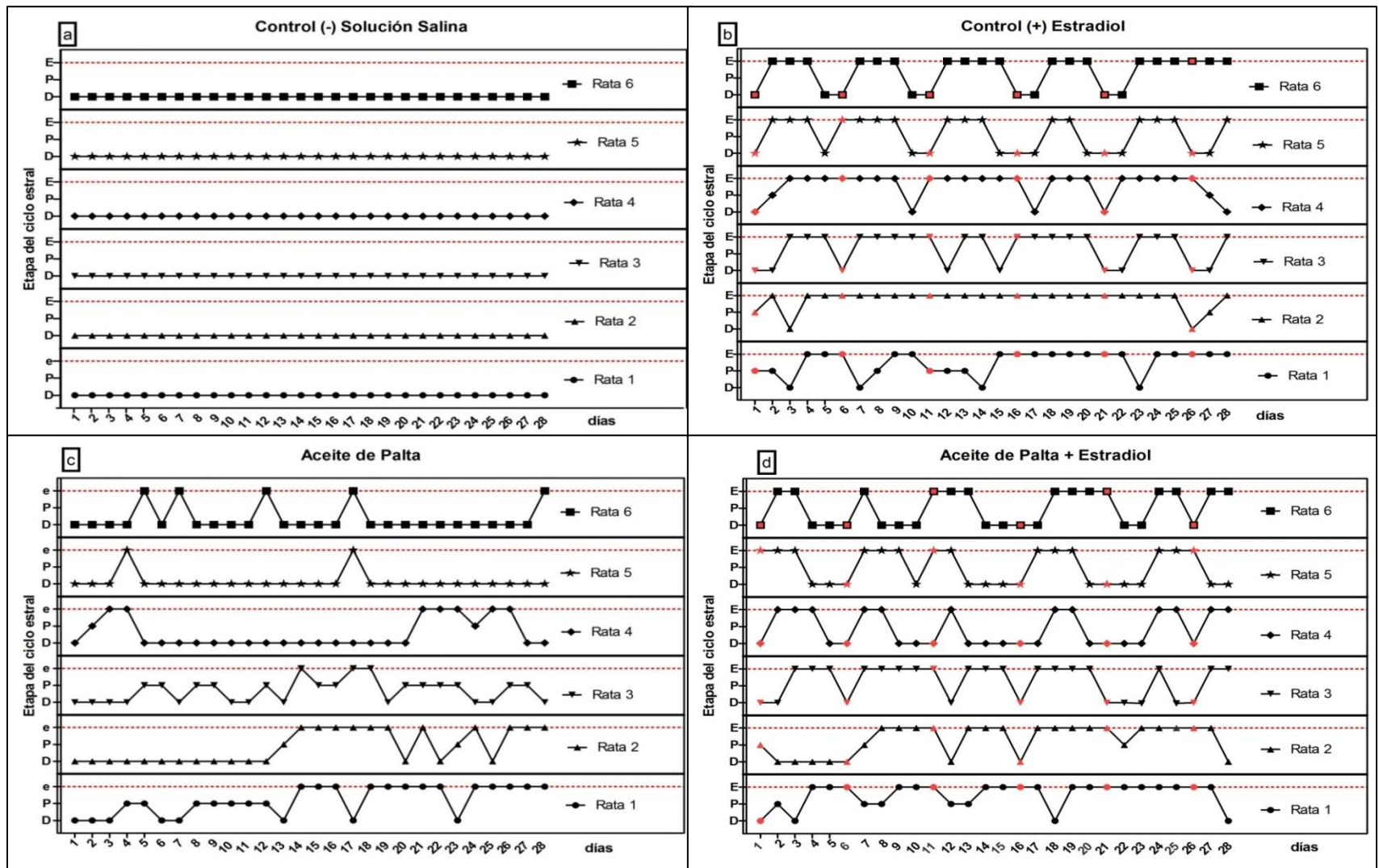
**Figura 10:** Peso de útero recolectado al término del estudio en relación al peso corporal.. S: Solución salina; E: Estradiol; AP: Aceite de Palta; AP + E: Aceite de Palta + Estradiol. \*\*\* Diferencia estadísticamente significativa en relación al grupo control. ( $p < 0.0005$ , ANOVA - Dunnett's).

### **Ciclo estral**

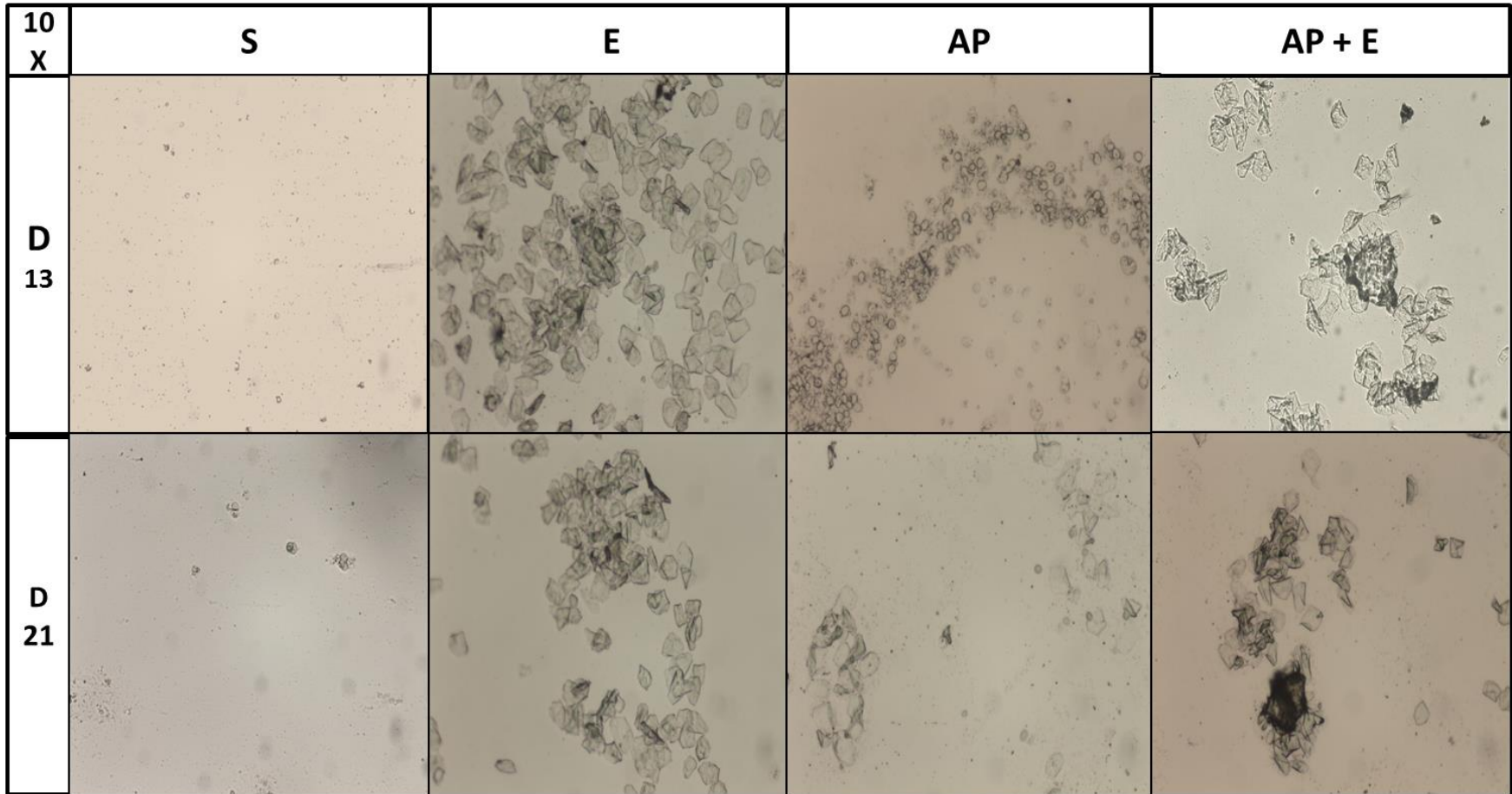
La citología vaginal se supervisó durante los 28 días de tratamiento. Tal como se esperaba todos los animales del grupo control, al que se administró suero fisiológico, permanecieron en etapa diestro (figura 11 a). Por el contrario, en el grupo control positivo, se observó no solo la inducción de estro sino que en la mayoría de los casos se pudo apreciar también ciclicidad, probablemente debido a la administración de la hormona cada cinco días (figura 11 b). Lo mismo se observó en el grupo AP + E (figura 11 d).

En el grupo AP se distinguieron claramente células cornificadas tanto individuales como agrupadas, aunque no en la magnitud observada en los grupos tratados con E o AP+E. Dado que en los animales se observó un proestro previo a la observación de las células cornificadas así como un diestro luego de su desaparición, es que con fines de presentación de estos resultados, se designó la presencia de estas células como un pseudo – estro (e) (figura 11 c).

En la figura 12 se presentan muestras de citología vaginal representativas, obtenidas los días 13 y 21 de tratamiento. Se destaca el tratamiento AP con una muestra en proestro y una en pseudo-estro los días 13 y 21 de tratamiento, respectivamente.



**Figura 11:** Seguimiento citología vaginal diaria, durante período de administración para cada control y grupos de tratamiento. En color rojo se presenta el día de administración de E. D: Diestro; P: proestro; E: estro; e: pseudo – estro.



**Figura 12:** Frotis vaginal representativo de cada grupo de tratamiento, obtenido los días 13 y 21 de tratamiento. Aumento 10X.

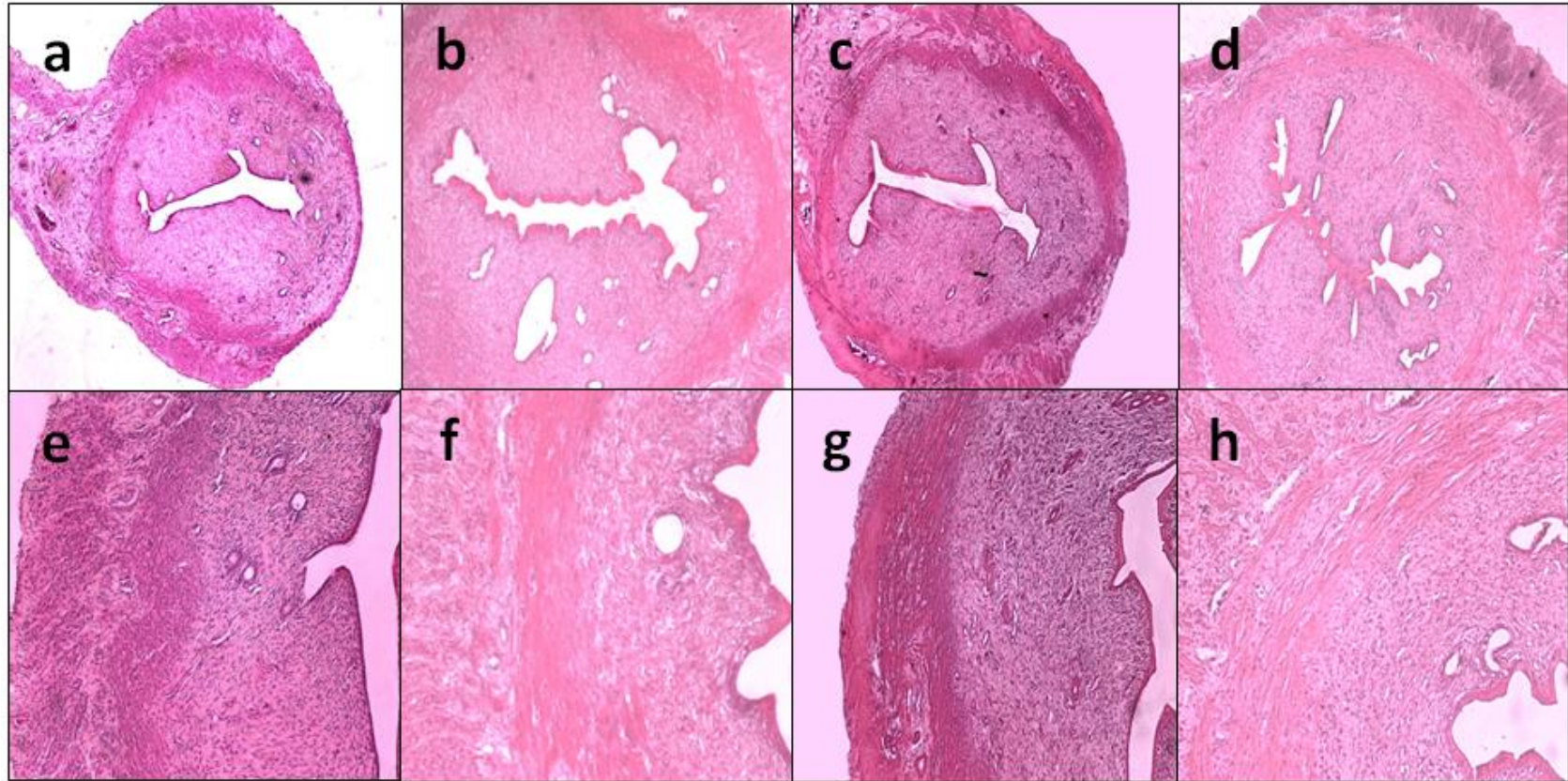
### **Histología de útero, vagina y aorta**

En la figura 13 se muestran cortes histológicos de útero observados con aumentos 4X y 10X, para cada grupo de tratamiento. Se observó que para los grupos E (figura 13 b-f) y AP+E (figura 13 d-h) el tejido se apreció de mayor tamaño ya que con el mismo aumento no se pudo obtener una imagen del corte histológico completo en el campo visual disponible. Por el contrario para los grupos S (figura 13 a-e) y AP (figura 13 c-g), el campo visual permitió la observación del corte histológico completo y se puede notar que ambos grupos de tratamiento presentan un tamaño similar para el tejido uterino, lo que concuerda con la falta de efecto uterotrópico de estos tratamientos. En la figura 14 las imágenes se obtuvieron con aumento 40X, para cada grupo de tratamiento: S, E, AP y AP+E designados con las letras a, b, c y d, respectivamente. Con flechas rojas se indica infiltración de eosinófilos y con flechas negras se muestra el epitelio endometrial.

En la figura 15 se presentan cortes histológicos de vagina observados con aumentos 4X y 10X para cada grupo de tratamiento. Se observa presencia de células cornificadas en los grupos E (figura 15 b-f) y AP+E (figura 15 d-h). En cuanto al grupo AP se observó cornificación del epitelio vaginal en menor proporción en relación a los tratamientos E y AP+E, mientras que en el grupo S no se aprecia tal efecto. En la figura 16 las imágenes y con mayor aumento (40X), se muestra cada grupo de tratamiento: S, E, AP y AP+E designados con las letras a, b, c y d, respectivamente. Con flechas rojas se presenta cornificación del epitelio vaginal y con flechas negras se indica descamación de células cornificadas que corresponde a las células que se obtienen cuando se realiza un frotis vaginal.

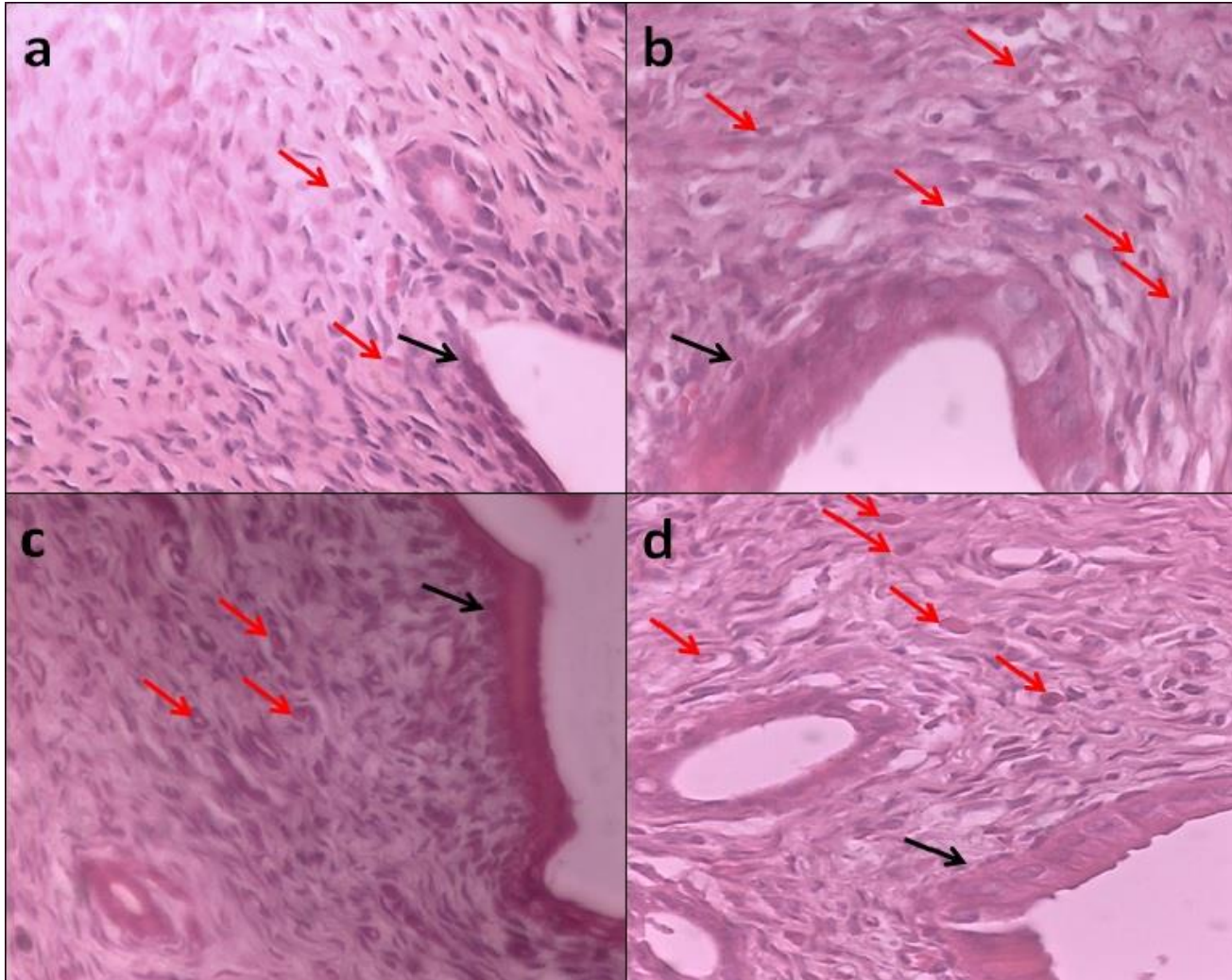
En la figura 17 se muestran cortes histológicos de aorta obtenidos con aumento 10X y 40X para cada grupo de tratamiento. En cuanto a los grupos E (figura 17 c-d) y

AP+E (figura 17 g-h) se observó que las fibras musculares se presentan similares y menos distendidas que las aortas de los grupos S (figura 17 a-b) y AP (figura 17 e-f). No se evidenció depósito de lípidos para ningún grupo de tratamiento.



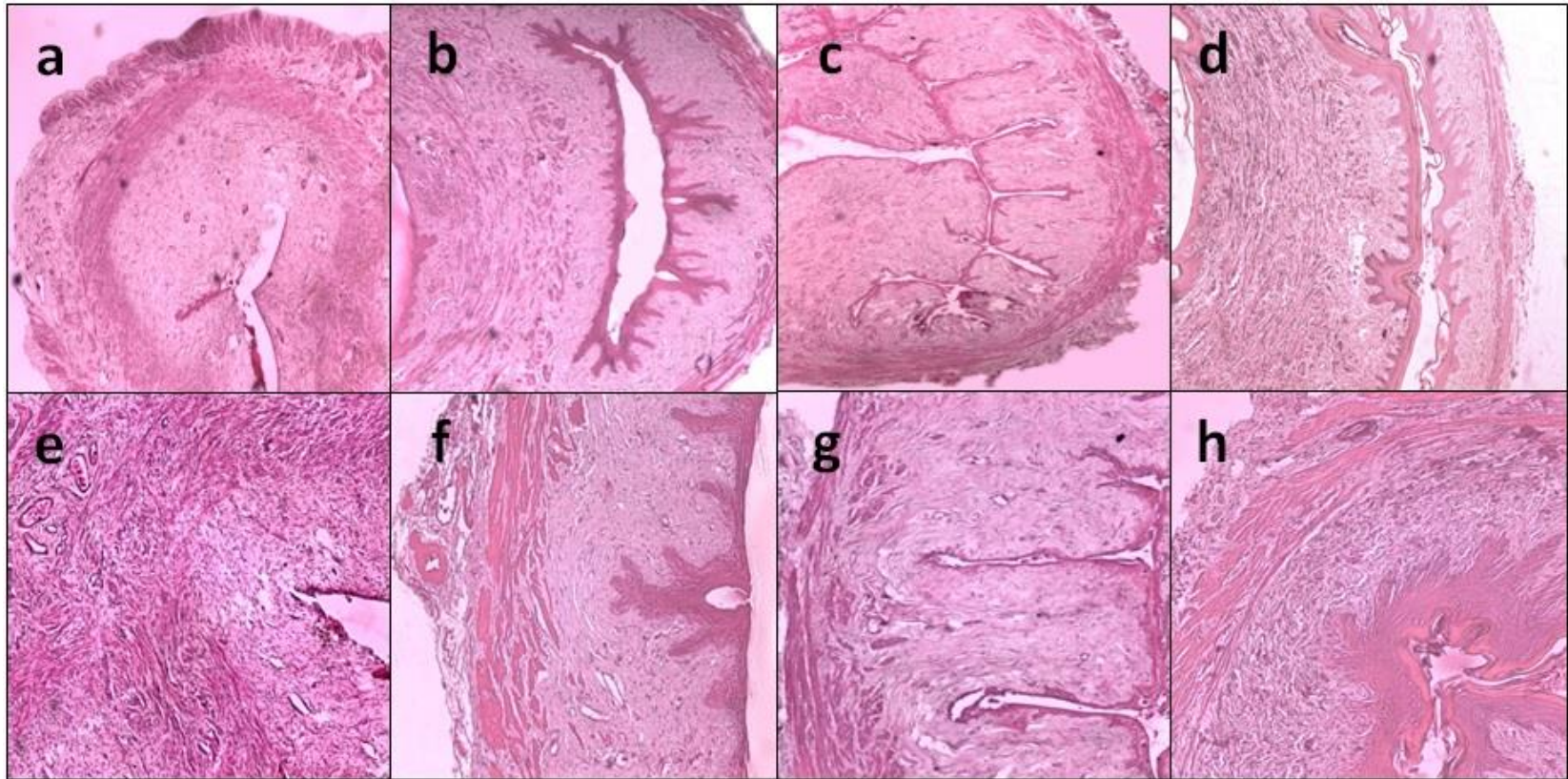
**Figura 13:** Cortes histológicos de útero para cada tratamiento: a: S; b: E; c: AP, d: AP+E. Aumento: 4X. e: S; f: E; g: AP, h: AP+E.

Aumento: 10X. H&E



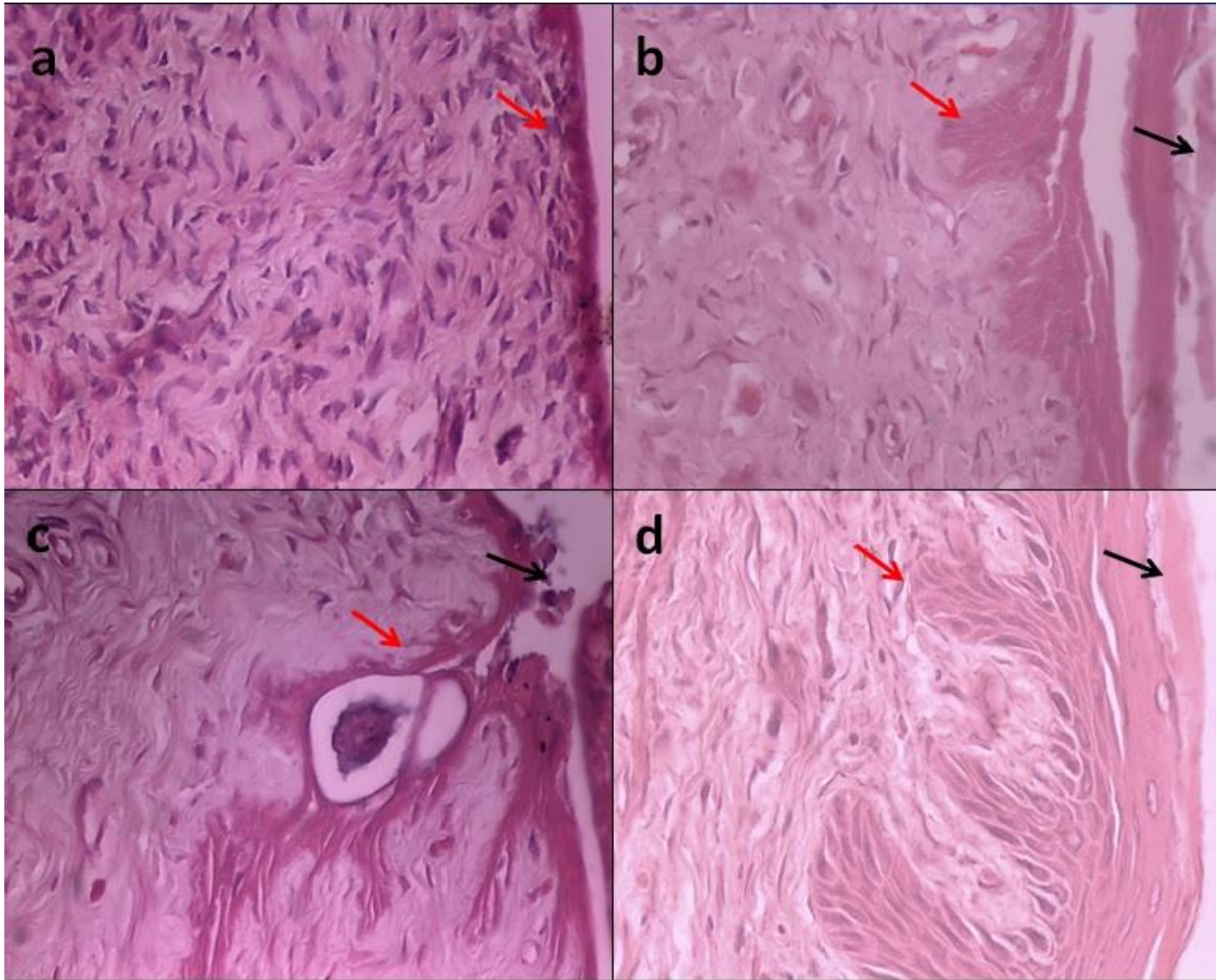
**Figura 14:** Cortes histológicos de útero para cada tratamiento: a: S; b: E; c: AP, d: AP+E. Aumento: 40X. H&E .

Nótese el grosor del epitelio luminal (flechas negras) y la presencia de eosinófilos (flechas rojas)



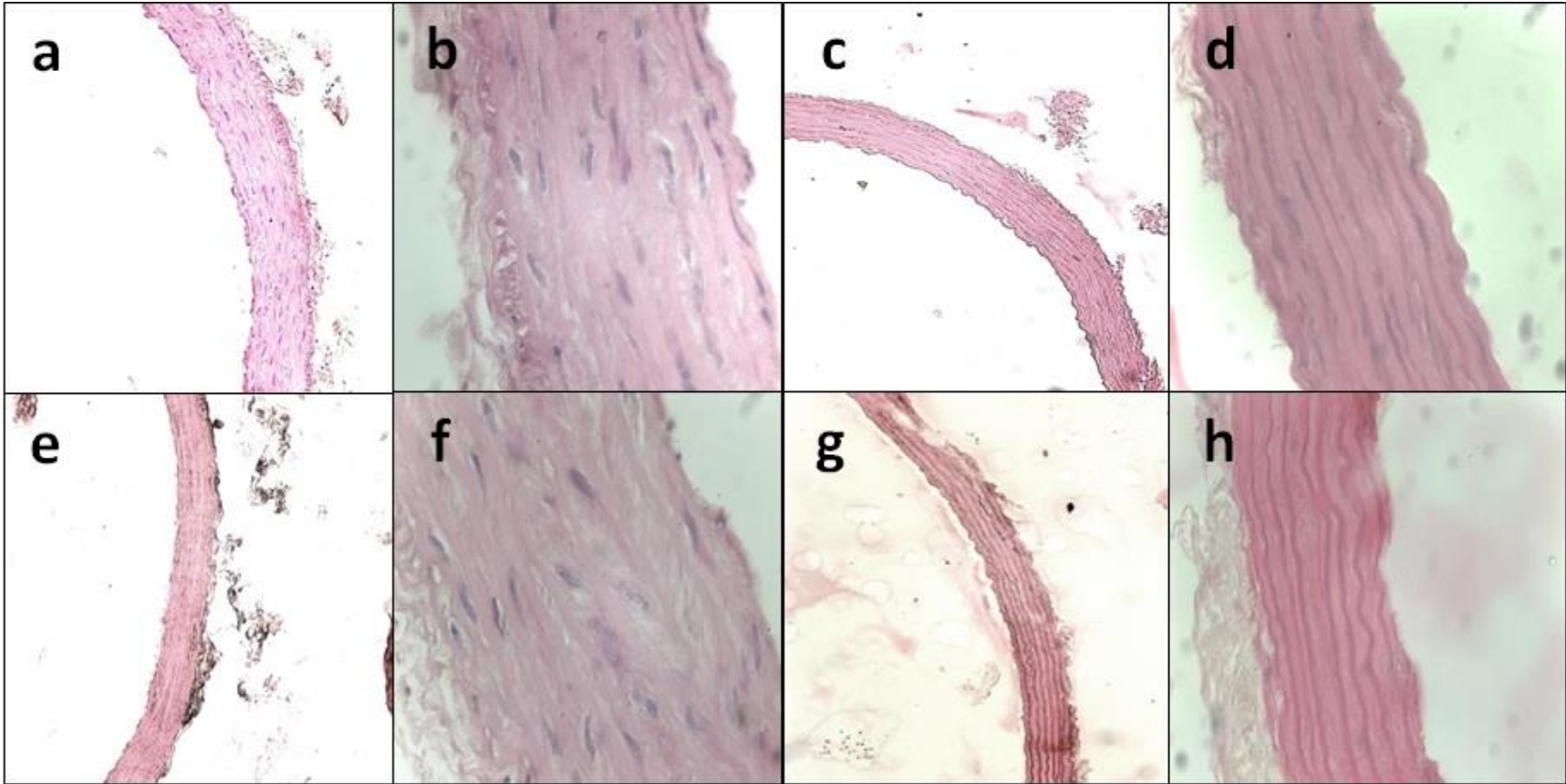
**Figura 15:** Cortes histológicos de vagina para cada tratamiento: a: S; b: E; c: AP, d: AP+E. Aumento: 4X. e: S; f: E; g: AP, h: AP+E.

Aumento: 10X. H&E



**Figura 16:** Cortes histológicos de vagina para cada tratamiento: a: S; b: E; c: AP, d: AP+E. Aumento: 40X. H&E.

Nótese la cornificación del epitelio (flechas rojas) y descamación de células cornificadas (flechas negras).



**Figura 17:** Cortes histológicos de aorta para cada tratamiento.: a: S; c: E; e: AP, g: AP+E. Aumento: 10X. b: S; d: E; f: AP, h: AP+E.  
Aumento: 40X.H&E

## **VII. DISCUSSION**

---

Este trabajo continúa una propuesta anterior en la que se evaluó la estrogenicidad de aceites con distinta composición de ácido linoléico y se comprobó la actividad estrogénica del aceite de palta mediante los ensayos Allen – Doisy y uterotrópico (León y Peña, 2012). Para darle una utilidad clínica a estos resultados, se propuso el presente estudio exploratorio, en el que se administró aceite de palta durante 28 días a ratas ovariectomizadas, utilizadas como modelo roedor de menopausia.

### **Modelo roedor para menopausia**

Como se explicó en la introducción, la falla reproductiva que se produce en las ratas a medida que envejecen, no es generada por una insuficiencia ovárica como sucede en la mujer. Al contrario, el ovario continúa con la síntesis de hormonas, aunque la retroalimentación a nivel hipotalámico en relación a los esteroides sexuales plasmáticos está alterada (Kermath y Gore, 2012). Esta diferencia limita la utilización de la rata envejecida para estudiar el efecto de sustancias con posible actividad estrogénica. Con estos antecedentes se hacía necesario utilizar un modelo que simulara los efectos producidos por la disminución drástica del estradiol y que permitiera estudiar una posible aplicación terapéutica a la actividad estrogénica del aceite de palta.

En este estudio, se utilizaron hembras de 9 semanas de edad, a las que se les practicó ovariectomía bilateral para inducir el modelo menopáusico previo a la administración subcrónica por 28 días de aceite de palta. Para que el modelo fuera comparable con la especie humana, se utilizó la vía oral una de las vías de administración más usadas en la actualidad por su conveniencia y comodidad para el paciente y que ha sido demostrada como buena vía de administración para modelos roedores de terapia de reemplazo hormonal (Isakkson y col, 2011). Se ha demostrado que en el modelo de rata ovariectomizada se produce atrofia de los tejidos uterino y vaginal (Zaid y col., 2010), por

lo que se puede inferir que sería un buen modelo para evaluar los efectos estrogénicos de una sustancia. Asimismo, este modelo ha sido utilizado para evidenciar efectos sobre la aorta (Siti y col., 2009).

### **Efecto de la administración de aceite de palta sobre el consumo de agua y alimento**

El consumo de agua no fue afectado por ninguno de los tratamientos. No obstante, el consumo de alimento fue notoriamente afectado, en relación al control, disminuyendo la ingesta según E, AP y AP + E, existiendo diferencias estadísticamente significativas en estos tres grupos en relación al grupo control S (figura 9). El patrón de consumo de alimento en los grupos E y AP+ E, es atribuido al efecto anorexígeno que posee el estradiol en ratas (Butera, 2010). Asarian y Geary (2002) describieron cómo la administración subcutánea de estradiol cada cuatro días llevaba a la disminución de la ingesta alimentaria también cada cinco días, lo que dejó de manifiesto la actividad inhibitoria del estradiol en el apetito de los animales. Se cree que la ingesta alimentaria en esta especie disminuye en la etapa estro del ciclo estral, luego del peak de secreción de E pre-ovulatorio, para aumentar la actividad locomotora y sexual en el estro (Eckel, 2011). La actividad anorexígena del estradiol estaría mediada por la interacción directa e indirecta con péptidos y neurotransmisores tales como colecistoquinina, glucagón y serotonina, implicados en el control de la ingesta a nivel central y que la activación selectiva del RE $\alpha$  sería suficiente y necesaria para producir este efecto (Eckel, 2011).

En cuanto a la disminución de consumo de alimento en el aceite de palta, este pudiera deberse a su efecto estrogénico. Sin embargo, también podría atribuirse a un enlentecimiento del vaciamiento gástrico. Covasa y Ritter (2000) demostraron que el ácido oleico (5 ml de infusión intestinal, 0,48 ml/minutos por 20 min), componente importante del aceite de palta, disminuye hasta en un 80 % el vaciamiento gástrico. Por otro lado,

Ramirez y Friedman (1983) demostraron que ratas a las que se administró 1,5 ml de aceite de maíz (58 % ácido linoleico y 28 % ácido oleico) provocaban un retardo en la ingesta de alimentos de hasta 6 horas.

### **Efecto de la administración de aceite de palta sobre la variación de peso corporal**

En general, la variación de peso corporal a lo largo del estudio no demostró diferencias estadísticamente significativas entre los distintos tratamientos. No obstante, la diferencia del peso corporal entre el inicio y el término del estudio fue distinta para los grupos S y AP versus los grupos E y AP+E (tabla 3). En otras palabras, los animales a los que se administró AP ganaron igual peso que los del grupo control y más peso que aquellos animales a los que se administró E, tanto solo como con aceite de palta.

El efecto anorexígeno del E puede explicar el que los animales que recibieron la hormona no aumentaran de peso. Sin embargo, esto se contradice con el hecho de que el aceite de palta también demostró efecto anorexígeno pero no influyó sobre la ganancia de peso corporal.

Algunos estudios clínicos demuestran que la palta es un alimento que no tan solo contribuye a una dieta saludable sino que también puede formar parte de una dieta restrictiva en calorías para personas con sobrepeso, en las que la palta reemplaza otras fuentes de energía y aporta nutrientes importantes (Dreher y Davenport, 2013). En este diseño experimental, no hubo reemplazo de calorías de grasas por las calorías del aceite de palta, por lo que se pudiera inferir, que aún cuando los animales comían menos, de todas maneras recibían más calorías de grasas que los animales que recibieron hormonas.

La curva de crecimiento de hembras Sprague-Dawley indica que a las 12 semanas los animales pesan aproximadamente 260 g (Pettersen y col., 1996). Dada la

ovariectomización y la resultante hiperfagia (aumento del consumo de alimento), al comienzo del estudio todos los animales pesaban alrededor de 320 g. En ese aspecto, destaca que la falta de reemplazo de calorías de grasas no permitió observar un efecto adelgazante del aceite de palta en las ratas, a diferencia del estradiol, que sí causó ese efecto.

Por último es interesante que en el grupo AP+E sí se observa un efecto anorexígeno y adelgazante, a pesar del consumo de las calorías extras del aceite, lo cual podría indicar que existe algún tipo de sinergismo entre el aceite de palta y el estradiol.

### **Efecto de la administración de aceite de palta sobre el útero**

El ensayo uterotrópico es un método *in vivo* que forma parte de las estrategias para evaluar sustancias con actividad estrogénica de la Comunidad Europea (OECD, 2007) y de Estados Unidos (EPA, 2010). Se basa en el hecho de que el útero expresa RE tanto  $\alpha$  como  $\beta$ , a los que se unen ligandos que desencadenan eventos celulares, moleculares y mitóticos que culminan con un aumento manifiesto de peso uterino (OECD, 2007).

Se considera que en el útero de rata predomina el RE  $\alpha$  y se ha comprobado que su proporción varía con la etapa del ciclo estral, siendo más alta durante el proestro y el estro (Li y Davis, 2007). Los genes que induce el E en el útero incluyen al factor de crecimiento epidérmico y al factor de crecimiento vascular endotelial, proteínas que durante la etapa estro producen un aumento de volumen y presencia de infiltrados inflamatorios, principalmente eosinófilos, que preparan al útero para una posible implantación (Li y Davis, 2007).

En cuanto a las observaciones histológicas cualitativas de este estudio (figuras 13 y 14), se puede mencionar que en los grupos E y AP+E, en cuanto al epitelio endometrial

se puede observar que es de un grosor mayor y que existe edema, mientras que en el grupo AP el epitelio endometrial ocupa un área menor en el campo visual al de los grupos E y AP+E, aunque tiende a ser más grueso y con mayor edema que en el grupo S. Sucede lo mismo en relación a la presencia de eosinófilos, la que es más notoria en los grupos E, AP+E y AP y menor en el grupo S.

El que el AP no haya tenido efecto uterotrópico, es decir que no se observó un aumento en el peso del útero, contrasta con un estudio previo de este Laboratorio (León y Peña, 2012) en el que el AP administrado vía subcutánea causó un incremento sobre el 200 % del peso uterino (tabla 1). No obstante, la presencia de eosinófilos y el aumento del grosor del epitelio luminal (figuras 13 c y g y 14 c) pueden indicar que los componentes del aceite de palta no fueron lo suficientemente potentes como para inducir un efecto uterotrópico notorio, lo cual lleva a hipotetizar que los componentes del AP a los que se puede atribuir el efecto uterotrópico pudieran ser menos biodisponibles cuando se los administra vía oral y por 28 días que cuando se dan en el esquema de administración subcutáneo y agudo. Más adelante en esta discusión se hará mención a los componentes del aceite a los que se puede atribuir la estrogenicidad.

### **Efecto de la administración de aceite de palta sobre la citología vaginal**

El estudio de los cambios en la estructura celular del epitelio vaginal se utiliza en el laboratorio como un método de rutina para monitorear el ciclo reproductivo de las ratas. Este ciclo dura entre 4 a 5 días y es caracterizado por las etapas metaestro, diestro, proestro y estro, las que ocurren debido a las fluctuaciones hormonales del eje hipotálamo-hipófisis-ovario. La fase de estro, se caracteriza por la presencia de células cornificadas en el frotis vaginal, es inducida por un aumento sustantivo en la concentración de estradiol y permite a la hembra ser receptiva al macho. En la hembra

ovariectomizada, la inducción y persistencia del estro en respuesta a la exposición a una sustancia química, indica que esta sustancia tiene propiedades estrogénicas, es decir, imita la acción del estradiol (Goldman y col., 2007).

A diferencia del útero, el AP sí tuvo efecto estrogénico sobre la vagina, manifestado a través de cambios en la citología e histología, tal como también lo hicieron los tratamientos E y AP + E. El grupo S no manifestó cambios y se mantuvo en diestro durante todo el tratamiento. La citología y la histología (figuras 12,15 y 16) son coincidentes en demostrar el efecto estrogénico. Tanto los grupos E como AP y AP + E demostraron cornificación epitelial y presencia de células cornificadas en el frotis vaginal. No obstante, en el caso del tratamiento AP, la presencia de células cornificadas fue más bien esporádica lo que, al igual que en el caso del útero, se considera que es debido a una menor potencia estrogénica de los componentes activos del AP.

### **Efecto de la administración de aceite de palta sobre la deposición de lípidos en la aorta**

Es bien conocido el efecto cardioprotector del estradiol, entre cuyas acciones se encuentra la vasodilatación y la inhibición de la deposición de grasa en las paredes vasculares, fenómeno mediado por las vías no-genómicas de la hormona (Farhat y col., 1996; Kim y Bender, 2009). En este estudio no se observaron cambios aparentes entre los distintos grupos de tratamiento. Probablemente, la duración del estudio y la dieta no rica en grasas evitaron la aparición de efectos vasculares (figura 17).

### **Componentes del aceite de palta con actividad estrogénica**

La tabla 4 presenta la composición del aceite de palta. En ella destaca la proporción de ácido oleico y ácido linoleico en un 56-74 % y 8-19 %, respectivamente y

0,32 % de  $\beta$ -sitosterol, todos componentes que estarían involucrados en la actividad estrogénica.

**Tabla 4:** Composición del aceite de palta (modificado de Olaeta y col., 1999)

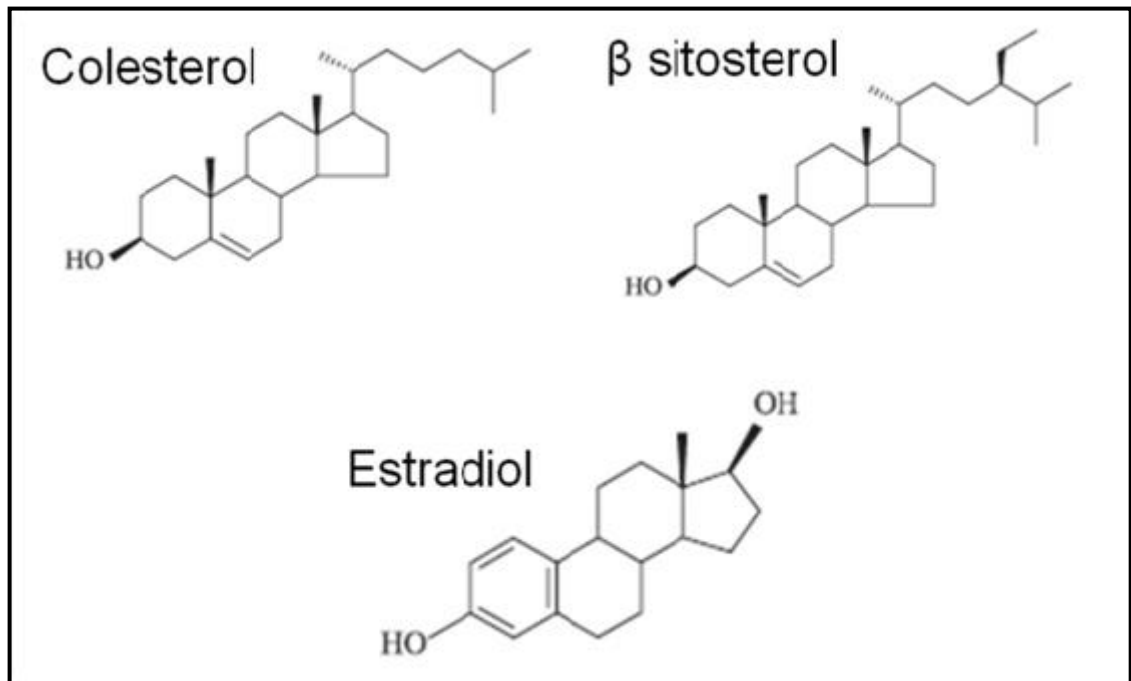
Análisis		Acidos grasos (%)	
AGL <sup>a</sup> (%)	0,14-0,4	C14:0 Acido mirístico	0,03-0,07
Índice de peróxidos (meq/kg)	2-5	C16:0 Acido palmítico	9-18
Peso específico (25°C)	0,91-0,92	C16:1 Acido palmitoleico	3-9
Índice de yodo (%)	84-90	C17:0 Acido heptadecánico	-
Fitosterol (%)	0,43	C17:1 Acido heptadecanioco	-
$\beta$ -sitosterol (%)	0,32	C18:0 Acido esteárico	0,4-1,0
Clorofila (ppm)	-	C18:1 Acido oleico	56-74
Vitamina E (%)	292	C18:2 Acido linoleico	8-19
$\alpha$ tocoferol (ppm)	292	C18:3 Acido $\alpha$ linolénico	0-2
$\beta/\gamma$ – tocoferol (ppm)	0	C20:0 Acido araquidónico	0-1,05
Cobre (ppm)	-	C20:1 Acido gadoleico	-
Pesticidas	-		

<sup>a</sup> AGL: Acidos grasos libres

Una propuesta es que, en este modelo, la actividad estrogénica del aceite de palta podría atribuirse al ácido linoleico, el cual ha sido demostrado que se une *in vitro* a RE  $\alpha$  y  $\beta$  provocando inducción de genes que estarían involucrados en la síntesis de estradiol (Liu y col., 2004). Además, este ácido graso genera como metabolito prostaglandina E2, la que estimula la aromatasa ovárica que cataliza la conversión de androstenediona en estradiol (Noble y col., 1997).

Una hipótesis de nuestro Laboratorio es que el ácido oléico contribuiría indirectamente a la estrogenicidad del ácido linoléico, debido a que en la degradación de los ácidos grasos poli-insaturados participa la enzima  $\Delta$ -desaturasa, por la cual el ácido oleico tiene mayor afinidad que el linoleico. Dado que en el aceite de palta, el ácido oleico está presente en mayor concentración, su gran afinidad por la enzima biotransformadora impediría la metabolización del ácido linoleico quedando éste disponible para su unión al RE y/o generación de prostaglandina.

Por otro lado, la estrogenicidad podría deberse también a los fitoesteros del aceite de palta, como el  $\beta$ -sitosterol, el que tiene una estructura similar al colesterol, diferenciándose solo porque este último posee un grupo etilo en el C24 (figura 18) y podría actuar como un precursor de hormonas esteroidales al unirse a la proteína reguladora aguda esteroidogénica (StAR) que facilita el paso de colesterol desde la membrana externas a la interna de la mitocondria para su bioconversión a pregnenolona. Esta proteína es incapaz de distinguir entre el colesterol y  $\beta$ -sitosterol (Kallen y col., 1998). No obstante, no se encuentra en la literatura científica ninguna referencia a la biotransformación de  $\beta$ -sitosterol a pregnenolona, por lo que se requiere de más estudios para explorar este mecanismo de acción.



**Figura 18:** Estructura química de Colesterol (modificado de Ryfkkynen y col., 2005)

Es importante destacar que en el estudio anterior en que se evaluó actividad estrogénica de AP hubo resultados positivos en el ensayo uterotrópico y en la citología vaginal, observándose un estro similar al estro inducido por el E, a diferencia de lo ocurrido en este estudio, en que se observaron células cornificadas en forma esporádica. A diferencia del presente estudio, la administración del aceite en la investigación anterior fue por vía subcutánea, implicando diferencias farmacocinéticas en la disparidad de resultados. Dada la similitud estructural de  $\beta$ -sitosterol con el colesterol, estas moléculas compiten por el mismo transportador para el proceso de absorción intestinal. No obstante, a diferencia del colesterol que se incorpora a un quilomicrón para su absorción, gran parte del  $\beta$ -sitosterol es eliminado del enterocito hacia el lumen intestinal donde luego se elimina por las heces. De esta forma, su biodisponibilidad es bajísima y alcanza solo un 5 % en roedores (Ling y Jones, 1995) y un 0,5 % en humanos (Duchateau y col., 2012). Por el contrario en la administración subcutánea, la biodisponibilidad del compuesto aumenta dado que en el tejido subcutáneo estaría como esteroles libres absorbiéndose rápida y completamente.

En resumen, el aceite de palta tiene propiedades estrogénicas verificables en este modelo roedor de menopausia. No obstante, surgen numerosas hipótesis en relación a sus componentes activos, biodisponibilidad y potencia estrogénica, las cuales deben ser puestas a prueba para avanzar hacia estudios que demuestren su utilidad clínica.

## **VIII. CONCLUSIONES**

---

- El aceite de palta tuvo efectos anorexígenos pero no modificó el peso corporal.
- El aceite de palta no tuvo efectos uterotrópicos evidentes. Sin embargo, a nivel histológico, atenuó los efectos tisulares de la privación de estradiol.
- El aceite de palta indujo cornificación del epitelio vaginal, lo cual se manifestó con presencia de células cornificadas esporádicas en frotis vaginales.
- El aceite de palta no indujo cambios observables en la aorta, probablemente debido al corto periodo de estudio y a una dieta de laboratorio no rica en grasas.
- El aceite de palta es estrogénico en este modelo roedor de menopausia.

## **IX. BIBLIOGRAFÍA**

---

- Albala C, Vio F, Kain J, Uauy R. 2003. Nutrition transition in Chile: determinants and consequences. *Public Health Nutr.* 5:123-128.
- Anderson V, Hazel E, Cabrer S, Lozano R, González F, Coromoto L. 2009. Efecto del consumo de aguacate (*Persea Americana Mill*) sobre perfil lipídico en adultos con dislipidemia. *Anal Venezol Nut.* 22:84-89.
- Arriagada M, Artega E, Bianchi M, Brantes S, Montañó R, Osorio F y col. 2005. Recomendaciones de tratamiento en la menopausia. *Rev Chil Obstet Ginecol.* 70:340-345.
- Asarian L y Geary N. 2002 Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity in ovariectomized rats. *Horm Behav.* 42:461-471.
- Baker V, Hepburn P, Kennedy S, Jones P, Lea L, Sumpter J y col. 1999. Safety evaluation of phytosterol esters. Part 1. Assessment of oestrogenicity using a combination of in vivo and in vitro assays. *Food Chem Toxicol.* 37: 13-22.
- Beral V, Reeb G, Bull D, Green J. 2010. Breast cancer risk in relation to the interval between menopause and starting hormone therapy. *JNCI.* 103:296-305.
- Björnström L y Sjöberg M. 2005. Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol Endocrinol.* 19:833-842.
- Blümel J, Castelo-Branco C, Riquelme R, Araya H, Jaramillo P, Tacla X y col. 2002. Use of hormone replacement therapy among Chilean women: a comparison between socioeconomic levels. *Menopause.* 9: 377-380.
- Borgström B. 1968. Quantitative aspects of the intestinal absorption and metabolism of cholesterol and B-sitosterol in the rat. *J Lipid Res.* 9:473-481.
- Butera P. 2010. Estradiol and the control of food intake. *Physiol Behav.* 99:175-180.
- Canto T. 2006. Los síntomas en la menopausia. *Rev Endocrinol Nutr.* 14:141-148.
- Canto T y Polanco L. 1996. Climaterio y menopausia. Las consecuencias biológicas y clínicas del fallo ovárico. *Rev Biomed.* 7:227-236.
- Castillo R. Propuesta de un método alternativo para la detección de sustancias con actividad estrogénica mediante la inducción de pubertad anticipada en ratas. Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico. Universidad de Valparaíso, 2010.
- Covasa M y Ritter R. 2000. Adaptation to high-fat diet reduces inhibition of gastric emptying by CCK and intestinal oleate. *Am J Physiol Regulat Integrat Comp Physiol.* 278: R166–R170.
- Dreher M y Davenport AJ. 2013. Hass avocado composition and potential health effects. *Crit Rev Food Sci Nutr.* 53: 738-750.
- Duchateau G, Cochrane B, Windebank S, Herudzinska J, Sanghera D, Burian A y col. 2012. Absolute oral bioavailability and metabolic turnover of  $\beta$ -sitosterol in healthy subjects. *Drug Metabol Dispos.* 40:2026-2030.

EPA. Environmental Protection Agency, United States. 2010. Endocrine Disruptor Screening Program. Disponible en: [www.epa.gov/endo/index.htm](http://www.epa.gov/endo/index.htm).

Eckel. 2011. The ovarian hormone estradiol plays a crucial role in the control of food intake in females. *Physiol Behav.* 104(4): 517–524.

Falkenstein E, Tillmann H, Chris M, Feuring M, Wehling M. 2000. Multiple actions of steroid hormones. A focus on rapid, nongenomic effects. *Pharmacol Rev.* 52: 513-555.

Farhat MY, Lavigne MC, Ramwell PW. 1996. The vascular protective effects of estrogen. *FASEB J.* 10:615-624.

Freeman ME. 2006. Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En: Knobil E y Nell JD (eds). *The physiology of reproduction*. Tercera edición, Editorial Elsevier, St Louis. pp 2328-2388.

Goldman JM, Murr AS, Cooper RL. 2007. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Def Res (Part B).* 80:84-97.

Guyton AC y Hall JE. Fisiología femenina antes de la gestación y hormonas femeninas. En: Guyton AC (ed). *Tratado de Fisiología Médica*. 10ma ed. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México. 2001. 81: 1117-1125.

Hong-Fang , Ying D, Long-De W, Zhi-Feng T, Xiao Qunig Q, Ying-Fu Z y col. 2013. Effects of estrogen and phytoestrogens on endometrial leakage in ovariectomized rats and the related mechanisms. *Acta Physiol Sin.* 65(1): 8–18.

Hong W, Eriksson H, Sahlin L. 2000. Estrogen receptors  $\alpha$  and  $\beta$  in the female reproductive tract of the rat during the estrous cycle. *Biology of reproduction* 63, 1331–1340.

International Menopause Society, 2013. Menopause Terminology. [http://www.imsociety.org/menopause\\_terminology.php](http://www.imsociety.org/menopause_terminology.php). Página visitada 3 de Agosto de 2013.

INE, Instituto Nacional de Estadísticas. Censo 2002. Disponible en: <http://www.ine.cl/cd2002/index.php>.

Jiang J, Sacco S, Ward W. 2008. Ovariectomy-induced hyperphagia does not modulate bone mineral density or bone strength in rats. *The Journal of Nutrition*. falta revista 2106 – 2110.

Kallen C, Billheimer J, Summers S, Stayrook S, Lewin M, Strauss J. 1998. Steroidogenic acute regulatory protein (StAR) is a sterol transfer protein. *J Biol Chem* 273: 26285-26288.

Kim EY, Baek I, Rhyu MR. 2011. Cardioprotective effects of aqueous *Schizandra chinensis* fruit extract on ovariectomized and balloon-induced carotid artery injury rat models: effects on serum lipid profiles and blood pressure. *Jour Ethnopharmacol.* 134: 668–675

Knowlton A. 2012. Estrogen and cardiovascular disease: aging and estrogen loss at the heart of the matter?. *Future Cardiol.* 8:9-12.

Kermath A y Gore A. 2012. Neuroendocrine control of the transition to reproductive senescence: lessons learned from the female rodent model. *Neuroendocrinol.* 96:1-12.

León J y Peña F. 2012. Evaluación de la estrogenicidad de aceites con distinta composición de ácido linoléico utilizando ensayos *in vivo* en ratas. Tesis para optar al título profesional de Nutricionista. Universidad de Valparaíso.

Levolas P, Xanthos T, Thoma S, Lyritis G, Dontas I. 2008. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comparative Med.* 58:424-430.

Li S y Davis B. 2007. Evaluating rodent vaginal and uterine histology in toxicity studies. *Birth Def Res (Part B)*. 80:246–25.

Ling W y Jones P. 1995. Minireview dietary phytosterols: a review of metabolism, benefits and side effects. *Life Sci* . 57:195-206.

Liu J, Burdette J, Sun Y, Deng S, Schlecht S, Zheng W y col. 2004. Isolation of linoleic acid as an estrogenic compound from the fruits of *Vitex agnus-castus* L. (chaste-berry). *Phytomed.* 11: 18-23.

Loose D y Stancel G. Estrógenos y progestágenos. En: Goodman y Gilman A (eds). *Las bases farmacológicas de la terapéutica*. Undécima edición. Editorial Mc Graw – Hill. Mexico DF. 2006. 57:1541-1551.

Moalli P, Debes K, Meyn L, Howden S, Abramowitch S. 2008. Hormones restore biomechanical properties of the vagina and supportive tissues after surgical menopause in young rats. *Am J Obstet Gynecol*. 199:161.e1-161.e8.

Nadal A, Díaz M, Valverde M. 2001. The estrogen trinity: membrane, cytosolic and nuclear effects. *News Physiol Sci*. 16:251-255.

Noble L, Takayama K, Zeitoun K, Putman J, Johns D, Hinshelwood M y col. 1997. Prostaglandin E<sub>2</sub> stimulates aromatase expression in endometriosis-derived stromal cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 82:600-606.

Olaeta J, Undurraga P, Schwartz M. 1999. Determinación de la evolución y caracterización de los aceites en paltas (*Persea americana Mill*). Cvs. Fuerte y Hass cultivados en Chile. *Rev. Chapingo Serie Horticultura*. 5:117-122.

Organization for Economic Co-operation and Development. 2007. Uterotrophic bioassay in rodent: A short-term screening test for oestrogenic properties. *OECD Guidelines for the testing of chemicals*. 440.

Parra M. 1998. Menopausia en Chile y Latinoamérica. En: Gonzales O, Arteaga E, Contreras P (eds). *Menopausia y patologías asociadas*. Editora Bywaters, Santiago de Chile pp 85-91.

Pettersen J, Morrisey R, Saunders D, Pavkov K, Luermper L, Turner J y col. 1996. A 2-Year Comparison Study of Crl:CD BR and Hsd:Sprague-Dawley SD Rats. *Fund Appl Toxicol*. 33:196-211.

Ramirez I y Friedman M. 1983. Food intake and blood fuels after oil consumption: Differential effects in normal and diabetic rats. *Physiol Behavior*. 31:847-885.

Rossmann W y Wiebke R. 2009. What causes hot flushes?. The neuroendocrine origin of vasomotor symptoms in the menopause. *Gynecol Endocrinol*. 25:303-314.

- Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML y col. 2002. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*. 288: 321-333,
- Ryfkynen A, Nieminen P, MustonenAM, Pyykfnen T, Asikainen J, Hänninen S, y col. 2005. Phytoestrogens alter the reproductive organ development in the mink (*Mustela vison*). *Toxicol and App Pharmacol*. 202: 132–139.
- Shifren J y Schiff M. 2000. The aging ovary. *J Women Health Gend Based Med* 9 Suppl. 1:S3-S7.
- Siti A, Srijit D, Kamsiah J. 2009. A detailed microscopic study of the changes in the aorta of experimental model of postmenopausal rats fed with repeatedly heated palm oil. *Int Exp Path*. 90:321–327.
- Sociedad Chilena de Climaterio. Posición oficial de la Sociedad Chilena de Climaterio para el manejo clínico de la mujer climaterica. 2009. Disponible en <http://www.climaterio.cl/files/PosicionOficialSochiclim.pdf>
- Simoncini T. 2010. Mecanismos de acción de los receptores de estrógenos en células vasculares: relevancia para la menopausia y el envejecimiento. *Rev Clim*. 13:41–47.
- Westwood F. 2008. The female rat reproductive cycle: A practical histological guide to staging. *Toxicol Pathol*. 36:375-384.
- Wu JM, Zelinski MB, Ingram DK, Ottinger MAM. 2005. Ovarian aging and menopause: concurrent theories, hypotheses, and research models. *Exp Biol Med*. 230:818-828.
- Yassir M, Das S, Kharya MD. 2010. The phytochemical and pharmacological profile of *Persea americana* Mill. *Pharmacogn Rev*. 4: 77–84.
- Yildirim A. 2010. Postmenopausal hormone replacement therapy and cardiovascular system. *Soc Cardiol*. 38:32-40.
- Zaid S, Sulaiman S, Sirajudeen K, Othman N. 2010. The effects of tualang honey on female reproductive organs, tibia bone and hormonal profile in ovariectomized rats - animal model for menopause. *BMC Complement Alternat Med*. 82:1-7.



 <b>Universidad de Valparaíso</b> CHILE Dirección de Investigación	<b>Protocolo de Supervisión</b>	<b>Código:</b>
		<b>Fecha:05.03.2013</b>
		<b>Cambio:</b>
		<b>Revisión:</b>
		<b>Aprobación:</b>
		<b>Página: 1</b>

### PROTOCOLO DE SUPERVISIÓN

En todos los procedimientos experimentales de severidad moderada o alta, debe realizarse un protocolo de supervisión de animales que permita aplicar medidas paliativas al dolor, como analgesia o eutanasia. Uno de los protocolos más utilizados es el propuesto por Morton y Griffinths que permite cuantificar el dolor causado por un procedimiento. Se consideran 4 variables y a cada una de éstas se les asigna una puntuación (de 0 a 3).

	<b>Variables a considerar y puntuación</b>	
<b>Pérdida de peso (de 0 a 3)</b>	Normal (no hay pérdida de peso en el animal y crece normalmente).	<b>0</b>
	Pérdida de peso inferior a 10%.	<b>1</b>
	Pérdida de peso entre 10 y 20% (posible alteración en la cantidad y aspecto de las heces).	<b>2</b>
	Pérdida de peso superior al 20% (el animal no consume ni agua ni alimento).	<b>3</b>
<b>Aspecto (de 0 a 3)</b>	Normal.	<b>0</b>
	Pelo en mal estado.	<b>1</b>
	Pelo en mal estado y/o presencia de secreciones nasales y oculares.	<b>2</b>
	Postura anormal.	<b>3</b>
<b>Comportamiento espontáneo (de 0 a 3)</b>	Normal.	<b>0</b>
	Pequeños cambios.	<b>1</b>
	Inactividad.	<b>2</b>
	Auto mutilación, vocalizaciones, animales muy inquietos o inmóviles.	<b>3</b>
<b>Comportamiento a la manipulación (de 0 a 3)</b>	Normal.	<b>0</b>
	Pequeños cambios.	<b>1</b>
	Cambios moderados.	<b>2</b>
	Animal agresivo o comatoso	<b>3</b>
<b>TOTAL</b>		

**Nota:** Cuando un animal obtiene puntuación 3 en más de un parámetro, todos aquellos en los que se obtenga igual puntaje (3), se pasan a 4.

Las principales medidas correctoras sugeridas en función al puntaje obtenido para cada animal son las siguientes:


**0-3:** normal.

**4-8:** Requiere supervisión cuidadosa y se evaluará el uso de analgésicos.

**9-12:** Sufrimiento intenso, requiere analgésicos y se evaluará su muerte por eutanasia.

**13-16:** Suprimir el procedimiento y someter a eutanasia.

Este protocolo se aplica por animal y por procedimiento. La frecuencia de observación de los animales será determinada por el investigador y dependerá de la severidad del tratamiento y/o procedimiento. Siempre la misma persona debe ser la responsable de observar los animales durante todo el protocolo experimental.

 <b>Universidad de Valparaíso</b> <small>CHILE</small> <b>Dirección de Investigación</b>	<b>Protocolo de Supervisión</b>	<b>Código:</b>
		<b>Fecha:05.03.2013</b>
		<b>Cambio:</b>
		<b>Revisión:</b>
		<b>Aprobación:</b>
		<b>Página: 2</b>

PROTOCOLO:

DURACIÓN:

INVESTIGADOR:

FECHA DE INICIO:

IDENTIFICACIÓN ANIMAL:

RESPONSABLE SUPERVISIÓN:

<b>Variable</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>	<b>Día</b>
Pérdida de peso					
Aspecto					
Comportamiento espontáneo					
Comportamiento a la manipulación					
TOTAL					
OBSERVACIONES					

Firma: .....

