



Universidad de Valparaíso  
Escuela de Química y Farmacia  
Laboratorio de Toxicología

## **Evaluación del efecto agudo de aceite de palta y fitoesteroles en un modelo roedor de menopausia**

Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico

**CATALINA DEL CARMEN SOLÍS GUERRA**

**Directora de Tesis:** María Fernanda Cavieres Fernández, PhD.

**2016**

*Dedicado a...*

*Mis padres, por su apoyo y confianza constantes,  
a mi familia, y a mi pololo Sebastián por darme  
su apoyo incondicional en esta etapa de mi vida.*

## Agradecimientos

En primer lugar agradezco a mi Directora de tesis, María Fernanda Cavieres, por permitirme ser parte del laboratorio de toxicología y darme las herramientas necesarias para desarrollar mi trabajo en esta área tan bonita de nuestra profesión.

También quiero agradecer el apoyo, amistad y cariño de mis compañeros de laboratorio: Camilo Fuentes, María Jesús Abello, Denis Olivares, Sabina Reyes, Pablo Olivares, y especialmente a Alejandra Vozmediano y Valesca Medina que formamos un gran equipo de trabajo, y por las inolvidables tardes de inclusión y tinción.

Agradezco al equipo y laboratorio Farmacopea Chilena por su gran ayuda y por los incontables cafecitos, especialmente a Dani, Don Denis (“hombrecito”) y a Víctor (“el niño”).

Al personal auxiliar y secretarias de la Escuela de Farmacia, que su buena disposición en todo momento.

Para finalizar, quiero agradecer nuevamente a mis padres y familia por estar conmigo, a mi pololo Sebastián Olivares por su apoyo en todo momento. También a mi familia de corazón, mis amigos, tanto mis amigos de la u como de vida: Ale, Aylihn, Vale, Jesu, Camilito, Clau, Carito, JC, Victor, Silvana, Andrea, Maripa, Angélica, las Clo, y a todos los que estuvieron conmigo en esta etapa. Y espero que estas personas tan lindas continúen en los próximos pasos de mi vida.

**INDICE**

<b>I.RESUMEN</b>	iv
<b>II.ABSTRACT</b>	vi
<b>III.INTRODUCCION</b>	1
Eje hipotálamo-hipófisis-ovario	3
Estrógenos	6
Receptor de estrógeno	7
Terapia de reemplazo hormonal	9
Modelo roedor de menopausia	10
Aceite de palta	13
Fitoesteroles	15
Antecedentes de tesis	17
<b>IV.HIPÓTESIS</b>	18
<b>V.OBJETIVOS</b>	20
<b>VI.METODOLOGÍA</b>	22
Animales de experimentación	23
Generación de modelo de menopausia	23
Ensayo uterotróico	24
Recolección de muestras	24
Evaluación histológica	24
Análisis estadístico	25
<b>VII.RESULTADOS</b>	26
Ensayo preliminar	28
Estudio en modelo roedor de menopausia	29
Consumo de alimento y agua	29
Variación de peso corporal	31
Efecto uterotrópico	33
Ciclo estral	34
Histología de útero y vagina	
Circunferencia de lumen uterino	37
Grosor epitelial	38
Grosor endometrial	39
Grosor miometrial	40
Cuantificación glándulas uterina	41
Grosor epitelio vaginal	43
<b>VIII.DISCUSIÓN</b>	45
<b>IX.CONCLUSIONES</b>	54
<b>X.REFERENCIAS</b>	56
<b>XI. ANEXOS</b>	65



Durante el periodo perimenopáusico se produce una disminución progresiva, tanto de la síntesis como de la secreción de estradiol, como resultado del cese paulatino de la función ovárica. Esta deficiencia conlleva a la aparición de una serie de síntomas que caracterizan la perimenopausia, en los que se incluyen síntomas vasomotores, atrofia/dispareunia vulvovaginal, sequedad vaginal, alteraciones del sueño y del estado de ánimo, y se propicia el desarrollo de patologías cardiovasculares, óseas y aceleramiento del envejecimiento cutáneo. La terapia farmacológica de primera línea corresponde a la terapia de reemplazo hormonal basada en la administración de hormonas sexuales exógenas. El uso de esta terapia ha sido controversial debido a que estaría asociada al aumento de riesgo de cáncer estrógeno dependiente. Por lo anterior, adquiere importancia la investigación y desarrollo de nuevas alternativas al tratamiento de la sintomatología asociada a la disfunción ovárica. Estudios previos en el Laboratorio de Toxicología de la Escuela de Química y Farmacia de la Universidad de Valparaíso han determinado que el aceite de palta es capaz de inducir una respuesta estrogénica la cual se ha hipotetizado que depende de la presencia de fitoesteroles en su composición. Para poner a prueba esa hipótesis, en este estudio se utilizó un modelo roedor de menopausia al cual se administró tanto aceite de palta como una mezcla de fitoesteroles en forma aguda, determinándose la dosis a utilizar con un ensayo uterotrópico. Tanto el aceite de palta como los fitoesteroles no indujeron un efecto uterotrópico evidente. A pesar de esto, se obtuvieron resultados estadísticamente significativos en la morfometría histológica de útero y vagina y en la citología vaginal. De esta manera, se puede concluir que el aceite de palta y los fitoesteroles presentan actividad estrogénica aguda en el modelo roedor de menopausia.



The climacteric period is characterized by a progressive decrease of both synthesis and secretion of estradiol as a result from the cease of ovarian function. The hormonal deficiency leads to a series of clinical manifestations including vasomotor symptoms, vulvovaginal atrophy and dyspareunia, vaginal dryness, sleep and emotional disturbances, an increased risk for cardiovascular and bone disease and enhancement of skin aging. Hormonal replacement therapy is the standard pharmacological therapy, which is based on the administration of exogenous sexual hormones although the use of this therapy is controversial because it has been associated to an increase of cancer risk. Hence the need for research and development of new alternatives for the treatment of symptoms associated to ovarian dysfunction. Previous studies in the Toxicology Laboratory at the University of Valparaíso have shown that avocado oil is capable of inducing an estrogenic response which is hypothesized to occur because of the presence of phytoestrogens. In order to test this hypothesis, a rodent menopause model was acutely administered both avocado oil and phytoestrogens with the phytoestrogen dose being previously determined in an uterotrophic assay using immature rodents. Neither avocado oil nor phytoestrogens induced an evident uterotrophic response in the main study. However, statistically significant results were observed in uterine and vaginal morphology as well as in vaginal cytology leading to the conclusion that both avocado oil and phytoestrogens are estrogenic when they are acutely administered to a rodent model of menopause.



El envejecimiento reproductivo corresponde a un proceso continuo durante el cual ocurre una depleción de ovocitos debido a una disminución constante de éstos a través de procesos atrésicos o la ovulación (Soules y col., 2001). Por su parte, la menopausia se define como el cese permanente de la menstruación como resultado de la pérdida de la actividad ovárica, determinándose el periodo menstrual final (PMF) luego de al menos 12 meses de amenorrea (World Health Organization, 1996). La perimenopausia (conocida como transición menopaúsica o climaterio), es el intervalo de tiempo en el cual la mujer presenta ciclos irregulares de ovulación y menstruación previo a la menopausia. Todos los procesos y mecanismos involucrados en la génesis y desarrollo de la menopausia, podrían llevar a un deterioro de la salud, repercutiendo directamente en la calidad de vida de las mujeres.

Según los datos del Censo 2002, Chile se encuentra en una transición demográfica hacia el envejecimiento de la población. El índice de vejez femenina ha evolucionado desde un 26,1% en el año 1992 a un 36% en el año 2002, reafirmando lo anteriormente mencionado (Gutiérrez y col., 2006). Por otro lado, es importante considerar que el 26% de la población femenina (más de 2 millones de mujeres) se encuentra entre los 40 y 64 años de edad (INE, 2002), lo que sumando al aumento en la esperanza de vida, lleva a considerar que las mujeres pasan más de un tercio de su vida en el periodo perimenopáusico.

El envejecimiento reproductivo abarca principalmente tres periodos: un periodo inicial en donde cambios compensatorios en hipotálamo, hipófisis y ovario ayudan a mantener la capacidad reproductiva y la secreción hormonal gonadal; una fase intermedia caracterizada por una marcada variabilidad en el desarrollo folicular, secreción ovárica y la subsecuente sintomatología que conducen al periodo menstrual final y un último periodo de secreción hormonal ovárica estable y en bajas concentraciones (Hall, 2015), tal como se ilustra en la tabla 1.

	Periodo reproductivo		Transición menopáusica		Post-menopausia		
	Peak	Tardío	Temprano	Tardío	Temprano	Tardía	
<b>Criterio principal</b>							
<b>Ciclo menstrual</b>	Regular	Cambios sutiles	Duración variable	Intervalos de amenorrea ≥ 60 días	-	-	-
<b>Criterios adicionales</b>							
<b>Endocrino</b>	-				-	-	-
<b>FSH</b>	Bajo	Variable	Muy variable	Alto > 25UI/L	Muy variable	Estable	-
<b>AMH</b>	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Muy variable	-
<b>Inhibina B</b>	-	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Muy bajo	-
<b>Folículos antrales</b>	Bajo	Bajo	Bajo	Bajo	Muy bajo	Muy bajo	-
<b>Estradiol</b>	Normal	Normal	Normal	Muy variable	Estable	Bajo, estable	-

**Tabla 1:** Cambios en la vida reproductiva de la mujer (modificado de Hall, 2015)

Durante la transición menopáusica o perimenopausia, la mujer comienza a experimentar cambios en la duración de sus ciclos o intermitencia de estos. Algunas mujeres, en la fase tardía, comienzan a presentar sintomatología característica de cambios hormonales. La postmenopausia adquiere significancia debido a que es el momento en que las hormonas ováricas evidencian una mayor disminución con fluctuaciones intermitentes (Butler y col., 2001). El aumento y la fluctuación de los niveles de la hormona folículo estimulante (FSH) repercuten directamente en los niveles de estradiol, lo que se evidencia a partir de la transición menopáusica. Estos niveles fluctuantes llevarían a las manifestaciones clínicas que incluyen síntomas vasomotores, atrofia/dispareunia vulvovaginal, sequedad vaginal, alteraciones del sueño y del estado de ánimo (Gold y col., 2006; Bromberger y col., 2010). La deficiencia crónica de esteroides sexuales también lleva a aumentar el riesgo de desarrollar patologías cardiovasculares, óseas y envejecimiento de la piel (Miquel y col., 2006).

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

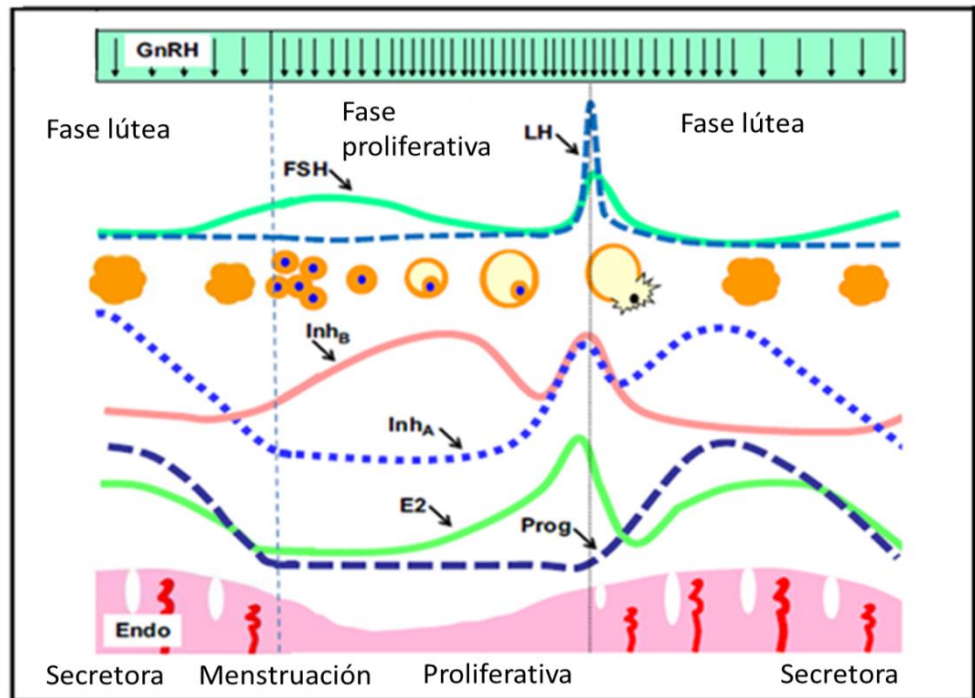
El funcionamiento normal del ciclo menstrual requiere una interacción integrada entre hipotálamo, hipófisis y ovario. La hormona liberadora de gonadotropinas (GnRh),

corresponde a un decapeptido, secretado y liberado desde el hipotálamo de forma pulsátil, que actúa sobre la adenohipófisis estimulando la liberación de FSH y la hormona luteinizante (LH), las cuales tienen sus blancos a nivel ovárico. Específicamente, la FSH actúa sobre las células de la granulosa y la LH tanto sobre las células de la teca como de la granulosa. Las células de la teca sintetizan principalmente andrógenos, los cuales son convertidos en estrógenos en las células de la granulosa, las que además sintetizan progestágenos (Guyton y Hall, 2011).

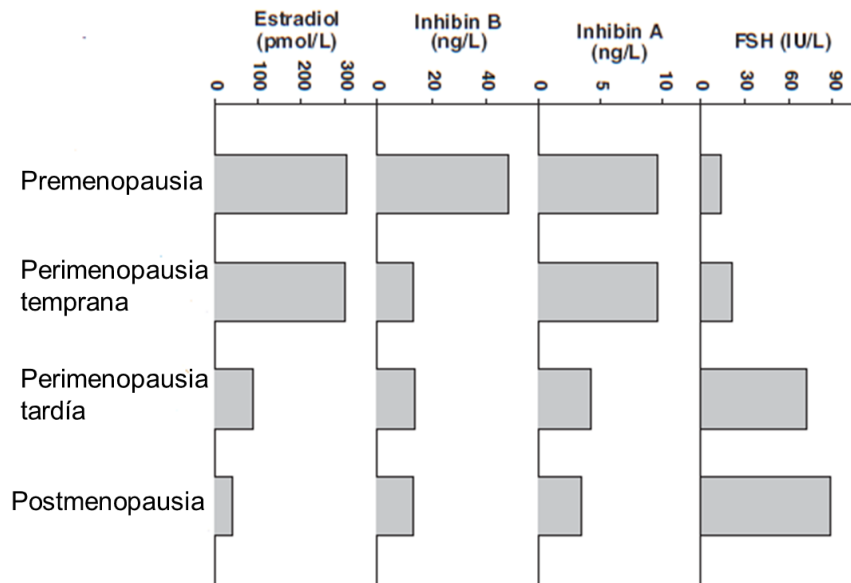
Al inicio de cada ciclo menstrual son necesarios niveles elevados de FSH para el reclutamiento de una nueva cohorte de folículos, mientras que la restricción de FSH asegura que sólo un folículo alcance el estado preovulatorio. La secreción de estradiol por parte de los folículos en desarrollo contribuye al control de retroalimentación negativa de FSH, actuando a nivel de hipotálamo y en menor grado sobre la hipófisis. La secreción ovárica de inhibina A y B provee un control adicional a través de una inhibición selectiva de FSH en hipófisis. Además, los crecientes niveles de estradiol en la fase folicular permiten la secreción de la hormona LH preovulatoria, necesaria para la ovulación (Hall, 2013). La secreción de progesterona por parte del cuerpo lúteo es mantenida por la secreción de LH e inhibida por la secreción pulsátil de GnRH (Filicori y col., 1984; Soules y col., 1984). En la fase lútea, la pérdida de la retroalimentación negativa del cuerpo lúteo resulta en un aumento preferencial de FSH por sobre LH (Hall y col., 1992). El incremento hipotalámico de la secreción de GnRH conduce a la pérdida del control por retroalimentación negativa de progesterona y estradiol, permitiendo alcanzar los niveles de FSH adecuados para el siguiente reclutamiento folicular (Welt y col., 1997). Lo anterior se grafica en la figura 1.

La evidencia hormonal temprana del envejecimiento ovárico es el incremento selectivo de FSH debido a la disminución de inhibina B el cual es marcador de la cantidad de células de la granulosa (Gill y col., 2002). Además, la disminución de los niveles de estradiol permiten el incremento tanto de GnRH (Gill y col., 2002) como de gonadotrofinas que responden a la acción de GnRH (Shaw y col., 2010). Finalmente, en mujeres postmenopáusicas, la vida media de eliminación de LH y FSH es mayor, como resultado de alteraciones en la composición de carbohidratos de sus isoformas, predominando formas más ácidas provocando que su permanencia en plasma sea mayor a consecuencia de la pérdida de la retroalimentación por parte de las hormonas gonadales

(Sharpless y col., 1999; Wide y col., 2009). Las fluctuaciones hormonales se reflejan en la figura 2.



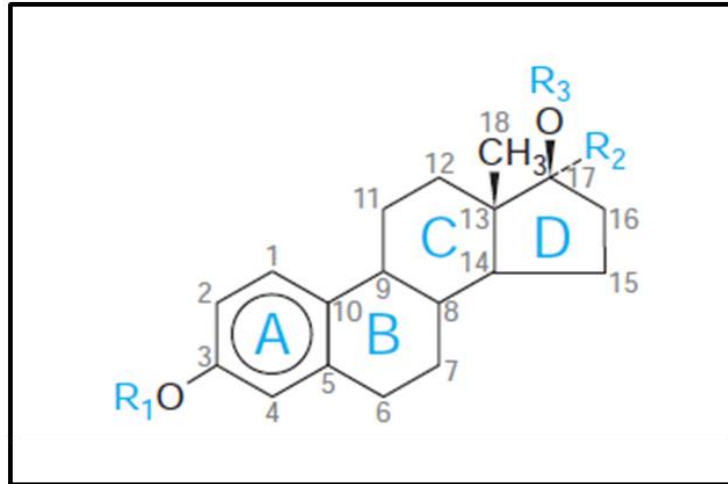
**Figura 1:** Ciclo hormonal femenino (modificado de Hall, 2015).



**Figura 2:** Fluctuaciones hormonales de FSH, inhibina B e inhibina A y estradiol en los periodos: premenopáusicos, perimenopáusicos temprano y tardío, y postmenopáusicos (Modificado de Hall, 2004).

## Estrógenos

Los principales estrógenos son estrona, estriol y  $\beta$ - estradiol, siendo este último el más potente. Cada compuesto contiene un anillo fenólico A con un grupo hidroxilo en el carbono 3 y un grupo  $\beta$  -OH o cetónico en posición 17 del anillo D (Figura 3).

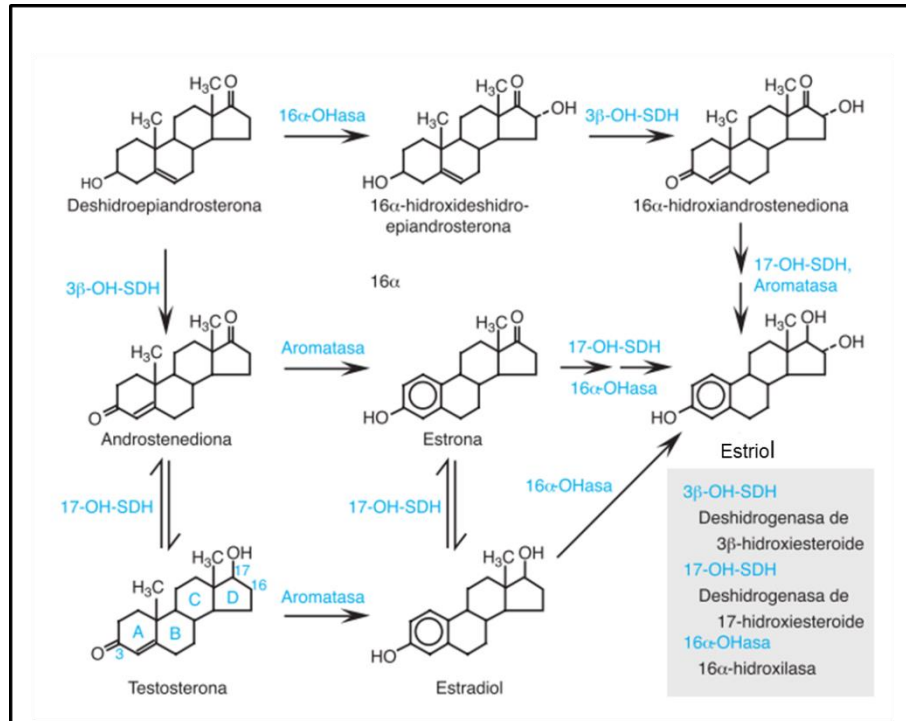


**Figura 3:** Estructura base de las hormonas esteroidales (Loose y Stancel, 2007)

Los estrógenos provienen de la androstenediona o de la testosterona, por medio de la aromatización del anillo A. La reacción es catalizada por un complejo enzimático de monooxigenasa de citocromo P450 (Cit P450 19a, aromatasa 19a). Siendo también esencial una flavoproteína de amplísima distribución, la reductasa de NADPH/citocromo P450. Ambas proteínas se localizan dentro del retículo endoplásmico de las células de la granulosa en ovario, las células de Sertoli y Leydig de testículos, en estroma adiposo, en los sincitiotrofblastos placentarios, en blastocistos previos a la implantación, tejido óseo, en diversas regiones encefálicas y entre otros tejidos blancos (Simpson y col., 2002).

Los ovarios son la fuente principal de estrógenos circulantes en las mujeres premenopáusicas, en tanto que el estradiol constituye el producto de síntesis más importante. Además contienen una forma de la deshidrogenasa de  $17\beta$  -hidroxiesteroide (tipo I) que facilita la producción de testosterona y de estradiol a partir de la androstenediona y la estrona, respectivamente. Sin embargo, en hígado, se encuentra otra forma de dicha enzima (tipo II) que facilita la oxidación de estradiol circulante hasta la forma de estrona (Peltoketo y col., 1999) y posteriormente estos dos esteroides son

transformados en estríol (Figura 4). Los tres estrógenos mencionados se excretan en la orina junto con sus conjugados con glucurónido y sulfato. En las mujeres posmenopáusicas la fuente principal de estrógeno circulante es el estroma de tejido adiposo, en el cual se sintetiza estrona a partir de la deshidroepiandrosterona secretada por las glándulas suprarrenales. A partir de lo anterior, se concluye que los niveles de estrógeno son regulados en parte por la disponibilidad de precursores androgénicos (Simpson, 2003).



**Figura 4:** Biosíntesis de estradiol (Loose y Stancel, 2007).

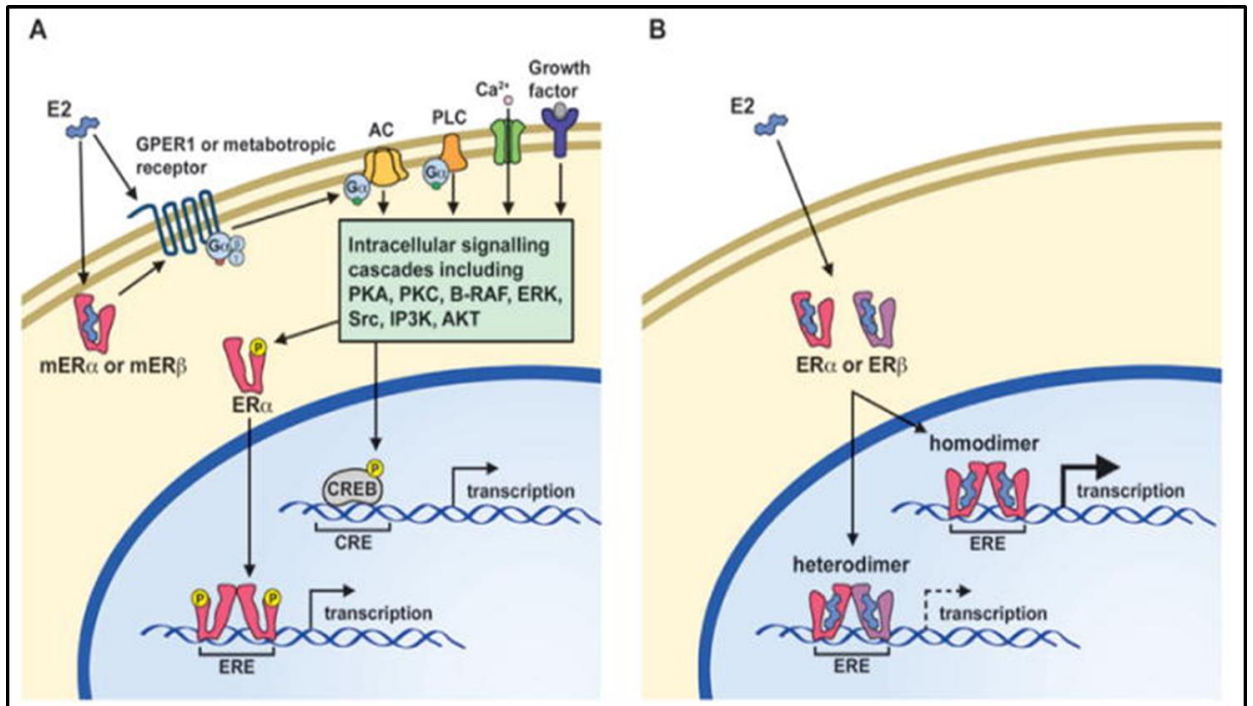
### Receptor de estrógeno

Los receptores de estrógeno (ER<sub>S</sub>) pertenecen a la superfamilia de receptores nucleares que se ubican en el compartimento citoplasmático y modulan la expresión de genes específicos (Lee y col., 2001; Rosenfeld y col., 2001). Existen dos tipos de ER<sub>S</sub>: ER $\alpha$  y ER $\beta$  (Heldring y col., 2007). Estos no corresponden a distintas isoformas, sino que a dos diferentes proteínas codificadas por dos distintos genes: ESR<sub>1</sub> y ESR<sub>2</sub>. Sin embargo, exhiben una gran similitud estructural tanto en su composición aminoacídica

como en sus dominios de unión al ADN y de activación de factores de transcripción (Grandien y col., 1997).

El ER $\alpha$ , el primero en ser descubierto, se expresa más abundantemente en el aparato reproductor femenino, en particular en útero, vagina y ovarios, y también en la glándula mamaria, el hipotálamo, células endoteliales y músculo liso de vasos. El receptor  $\beta$  se expresa predominantemente en la próstata y los ovarios, y su expresión es menor en pulmones, encéfalo, huesos y vasos. Muchas células expresan los dos tipos de receptores ( $\alpha$  y  $\beta$ ) y así se pueden formar homodímeros o heterómeros (Hall y McDonnell, 1999).

Ambos receptores de estrógeno (ER) corresponden a factores de transcripción activados por ligandos que aumentan o disminuyen la transcripción de genes diana. Una vez que penetran al interior de la célula por difusión pasiva a través de la membrana plasmática, la hormona se liga a un ER en el núcleo. Este existe en la forma de monómero inactivo unido a proteínas de choque térmico, y una vez que se liga al estrógeno, el cambio conformacional del receptor disocia las proteínas del choque térmico y ocasiona dimerización del receptor, lo cual intensifica la afinidad y la rapidez de unión del receptor al ADN (Cheskis et al., 1997). En la figura 5 se diagraman los dos tipos de respuestas que se pueden generar a partir de la unión del ligando y que pueden dividirse en dos categorías: la primera de ellas corresponde a respuestas genómicas, caracterizadas por cambios en la transcripción de genes y ocurren en el plazo de horas a días luego de que el estrógeno se ha unido a sus receptores nucleares; el otro tipo de respuesta que se puede generar corresponden a eventos de señalización rápidos no genómicos, los que ocurren en un lapso de segundos a minutos luego de la estimulación celular producida por la unión de estrógeno al receptor de estrógeno asociado a proteína G (GPER), el que se localiza en el retículo endoplásmico, el cual involucra la acción de segundos mensajeros (Nadal y col., 2000; Revankar y col., 2005).



**Figura 5:** Esquema de mecanismo de acción de estradiol. **A:** Respuestas no genómicas rápidas. **B:** Respuestas genómicas (Bean y col, 2014)

El estradiol participa en procesos que incluyen desarrollo de características sexuales secundarias, crecimiento mamario y maduración urogenital, principalmente durante la pubertad (Ciocca y col., 1995). Específicamente a nivel vaginal permite el cambio de epitelio cúbico a estratificado, el que es más resistente a traumatismos o infecciones; en las trompas de Falopio induce la proliferación de tejidos granulares aumentando el número de células epiteliales ciliadas y en estructuras óseas, los estrógenos inhiben la actividad osteoclástica debido a su efecto estimulador de la osteoprotegerina, llamado factor inhibidor de la osteoclastogenia, que inhibe la resorción ósea (Guyton y Hall, 2011). Estas actividades fisiológicas podrían explicar en parte los síntomas perimenopáusicos asociados al descenso de síntesis y liberación de estradiol.

### Terapia de reemplazo hormonal

Para tratar la sintomatología asociada a la disfunción ovárica, y prevenir las comorbilidades asociadas al climaterio, se dispone como tratamiento de primera línea la terapia de reemplazo hormonal (TRH) la que se define como la administración de

hormonas a mujeres con deficiencia estrogénica, sintomáticas y durante la transición a la menopausia y la postmenopausia (Figuroa y col., 2005). La TRH está basada en la sustitución hormonal mediante el uso de estrógenos y/o asociados a progestágenos. El uso de esta terapia durante los últimos años se ha envuelto en controversias debido a publicaciones que la asocian a un aumento de riesgo de cáncer estrógeno dependiente (Million Women Study Collaborators, 2003; Schairer y col., 2004), aumentando la no-adherencia a ésta por parte de las pacientes.

The Study of Women's Health Across the Nation (SWAN), un estudio longitudinal de menopausia en Estados Unidos, estableció que el uso de medicina complementaria y alternativa para tratar la sintomatología menopaúsica ha aumentado dramáticamente la última década. Las tasas de uso se intensificaron desde 48,5% a 51%, 52,7% y 80% en los años 2002, 2005, 2007 y 2008, respectivamente (Bair y col., 2002; Bair y col., 2005; Gold y col., 2007; Bair y col., 2008).

### **Modelo roedor de menopausia**

Para evaluar el efecto estrogénico de una molécula o sustancia, con una potencial capacidad coadyuvante en la TRH, se puede utilizar el modelo roedor de menopausia, adaptado por el Laboratorio de Toxicología, en el cual se utilizan ratas hembras de la cepa Sprague Dawley de  $11 \pm 2$  semanas de edad (peso aproximado de 250 g), las que son sometidas a ovariectomización bilateral, induciendo un estado menopaúsico. La elección de esta metodología por sobre la utilización de un modelo envejecido de ratas de 9 - 10 meses de edad, que representaría a una mujer en etapa perimenopaúsica (Kermath y col, 2012), es debido a que modelo ovariectomizado conserva la integridad del eje hipotálamo-hipófisis, esencial en la evaluación de una molécula con posible efecto estrogénico, a diferencia del modelo envejecido en el que no solo hay alteración de este eje sino que también secreción basal de estrógenos ováricos.

Se ha comprobado que en el modelo roedor de menopausia la resorción ósea excede su formación, provocando la pérdida del hueso, en especial en la parte proximal de la metáfisis tibial (Levolas y col, 2008) y que también se produce una atrofia de los tejidos uterino y vaginal (Zaid y col, 2010), ambos fenómenos que ocurren en la mujer perimenopaúsica, evidenciando los efectos de la deficiencia de estrógenos. El modelo

elegido imita lo que sucede en las mujeres menopaúsicas por lo que se hace necesario conocer qué ocurre en el ciclo sexual de las hembras roedores y los efectos que se visualizan a nivel histológico de los principales órganos blancos estrogénicos en esta especie.

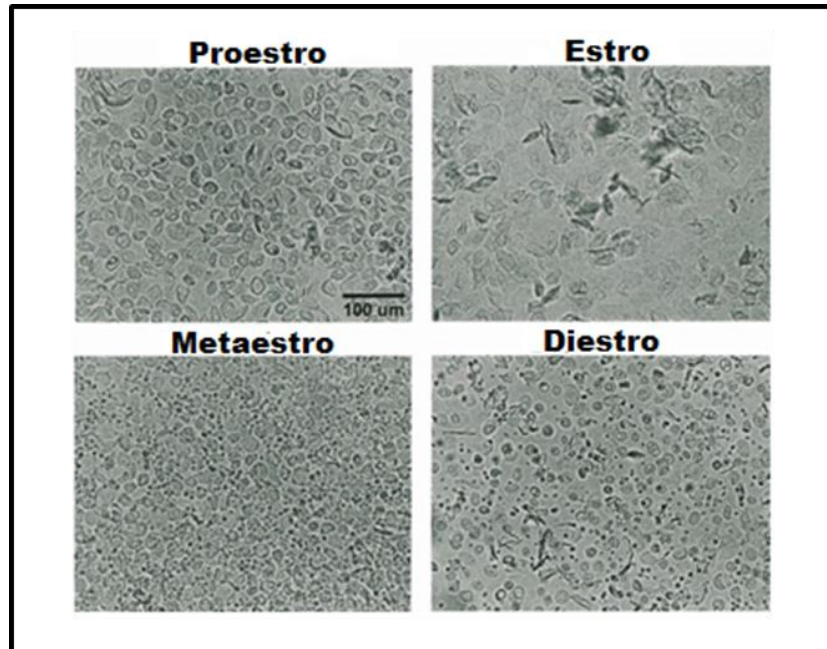
Las hembras roedoras son poliéstricas, es decir, presentan ovulaciones espontáneas además de sucesivos y regulares ciclos sexuales. El ciclo estral está compuesto principalmente por cuatro etapas: proestro, estro, metaestro y diestro, las cuales tienen una duración media de al menos 4 a 5 días (Feder, 1981). Éstas están influenciadas por los ciclos luz-oscuridad, temporada del año y por condiciones de alojamiento pero en condiciones ambientales controladas de laboratorio los ciclos no se ven influenciados por la época del año (Lohmiller y Swing, 2006). Cada etapa es identificada de acuerdo a los tipos celulares observados en los frotis vaginales, como también éstas se caracterizan por determinados cambios morfológicos en ovarios, útero y vagina (Goldman y col., 2007), los cuales serán explicados a continuación.

Cada etapa del ciclo estral se puede determinar a través de frotis vaginales, observándolos bajo microscopio óptico, en los cuales se obtienen células desde la superficie del epitelio vaginal (Feder, 1981; Freeman, 1994). Las diferencias cíclicas en la citología vaginal ocurren en respuesta a los cambios morfológicos del epitelio vaginal como las células cornificadas, características de la etapa estro (Figura 6).

El proestro (12-14 horas) se caracteriza por la presencia de células nucleadas circulares de tamaño uniforme. En la siguiente etapa, el estro (25-27 horas), se visualizan células anucleadas de apariencia irregular. En el metaestro (6-8 horas), la infiltración de leucocitos adelgaza el epitelio vaginal debido a la disminución de la secreción de estrógeno, la secreción vaginal se torna a una apariencia opaca y blanca. Finalmente durante el diestro (55-57 horas) el epitelio alcanza su nivel más delgado, y durante esta fase se detiene la degeneración del epitelio y comienza a engrosar nuevamente debido a los procesos de mitosis (Freeman, 1994; Long y Evans, 1922; Montes y Luque, 1988).

<b>Órgano Blanco</b>	<b>Proestro</b>	<b>Estro</b>	<b>Metaestro</b>	<b>Diestro</b>
<b>Vagina</b>	Figuras mitóticas presentes. Ocasionalmente polimorfos. Escasa degeneración o descamación. Comienzo de formación de estrato granuloso y progresivamente, capa de estrato mucoide y estrato córneo. Al final de esta etapa, se encuentra completamente cornificada y la capa mucosa evidencia cierta descamación.	Progresivo recambio de capa superficial mucoide y cornificada. Reducción del grosor del epitelio. Presencia de restos celulares. Ausencia de figuras mitóticas. Progresiva infiltración de leucocitos.	Su inicio está marcado por una completa descamación de la lámina cornificada (generalmente hay residuos en el lumen). Continúa la descamación con pérdida del estrato granuloso e infiltración de leucocitos en el germinativo superior.	Su inicio se identifica por el epitelio reducido a su menor expresión con variable infiltración leucocitaria. Luego ocurre una proliferación epitelial y engrosamiento (no se visualiza estrato granuloso) con una menor infiltración leucocitaria.
<b>Útero</b>	Cambio de epitelio cuboidal a columnar. Mitosis presente en células epiteliales y pudiendo existir o no degeneración celular, y leve infiltración de células inflamatorias. Dilatación hacia el final de esta fase.	El inicio del estro está definido por una notable degeneración/necrosis de las células epiteliales, generalmente primero se produce en glándulas. Pérdida de la actividad mitótica. Infiltración de leucocitos. Dilatación puede persistir hasta el final de esta etapa.	Continúa la degeneración de células epiteliales endometriales. Se recupera la actividad mitótica, por lo que se ve de manera concomitante actividad mitótica y degeneración.	Pequeño, avascular. Epitelio columnar lineal y Delgado. Al inicio poca mitosis, pero aumenta a lo largo de esta etapa. Ocasional degeneración celular y visualización de edema hacia el final de esta etapa.
<b>Ovario</b>	Cuerpo lúteo frecuentemente degenerado. Vacuolas citoplasmáticas generalmente presentes. Proliferación de tejido fibroso en cavidad central	Cuerpo lúteo degenerado, frecuentemente presente. Algunos cuerpos lúteos pequeños con células con citoplasma basófilo, cavidad central llena de fluido, y no hay presencia de tejido fibroso.	Cavidad de cuerpo lúteo todavía puede contener fluido. Más pequeño que en diestro. Poca presencia de células basófilas. Generalmente sin tejido fibroso.	Cuerpo lúteo grande, vacuolado y formación de tejido fibroso en cavidad central.

**Tabla 2:** Resumen de características histológicas del tracto reproductiva de rata hembra durante su ciclo estral (Modificada de Westwood, 2008).



**Figura 6:** Frotis vaginales de rata que representan las etapas de: proestro, estro, metaestro y diestro (Hubscher y col, 2005).

### **Aceite de palta**

Los lípidos constituyen una parte fundamental de la alimentación. Durante las últimas dos décadas se ha producido un aumento de la disponibilidad como también en el consumo total de grasas (Albala y col., 2003), experimentándose cambios tanto en la cantidad y calidad de aceites. La palta (*Persea Americana Mill*), es una planta que pertenece a la familia Lauraceae; corresponde a un fruto en forma de drupa con una delgada cáscara brillante y generalmente de color verde (Sampaio y Leonel, 2008). Su fruto tiene un contenido oleoso extremadamente alto, siendo el componente mayoritario de su peso seco. La pulpa fresca también provee aceite de alta calidad siendo una excelente fuente de ácidos grasos monoinsaturados, ácidos grasos poliinsaturados, ácido oleico, ácido linoleico y ácido linolénico (Nayak y col., 2008; Tango y col., 2004), que pueden presentar potenciales efectos benéficos sobre la salud. Las proporciones de lípidos tanto en el fruto como en el aceite se evidencian en las tablas 3 y 4, respectivamente.

Fitoquímico	Cantidad/100g
Ácidos grasos saturados totales (g)	2,13
16:0	2,08
Ácidos grasos monoinsaturados totales (g)	9,80
18:1 (g)	9,07
Ácidos grasos poliinsaturados totales (g)	1,82
18:2 (g)	1,67
18:3 (g)	0,13
Colesterol (mg)	0
Stigmasterol (mg)	2,0
Campesterol (mg)	5,0
Beta-sitosterol (mg)	76,0

**Tabla 3:** Composición del fruto *Persea americana* (modificado USDA, 2011)

Análisis		Ácidos grasos (%)	
Ácidos grasos libre (%)	0,14-0,4	C14:0 Ácido mirístico	0,03-0,07
Índice de peróxidos (meq/Kg)	2-5	C16:0 ácido palmítico	9-18
Peso específico (25°C)	0,91-0,92	C16:1 ácido palmitoleico	3-9
Índice de yodo (%)	84-90	C17:0 ácido heptadecánico	-
Fitosterol (%)	0,43	C17:1 ácido heptadecanoico	-
B-sitosterol (%)	0,32	C18:0 ácido esteárico	0,4-1,0
Clorofila (ppm)	-	C18:1 ácido oleico	56-74
Vitamina E (%)	292	C18:2 ácido linoleico	8-19
A Tocoferol (ppm)	292	C18:3 ácido $\alpha$ linolénico	0-2
$\beta/\gamma$ – tocoferol (ppm)	0	C20:0 ácido araquidónico	0-1,05
Cobre (ppm)	-	C20:1 ácido gadoleico	-

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

Estudios en sujetos hipercolesterolémicos han demostrado que el consumo de dietas enriquecidas en este fruto produce mejorías en el perfil lipídico sanguíneo: disminución de LDL colesterol y triglicéridos. Además de incrementar los niveles de HDL colesterol, todos los efectos anteriores llevan a una disminución del riesgo de enfermedades ateroscleróticas cardiovasculares (Colquhoun y col., 1992; Alvizouri-Munoz

y col., 1992; Carranza y col., 1997). Las investigaciones centradas en el aceite de palta se basan principalmente en los beneficios sobre el perfil lipídico, dado principalmente por su alto contenido de ácidos grasos mono y poliinsaturados. Lo anterior se condice con la evidencia de que dietas ricas en grasas insaturadas y fitoesteroles ayudan a la reducción de las concentraciones de colesterol plasmático (Lottenberg y col., 2002; Salgado y col., 2008), disminuyendo significativamente el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Hu, 2003), particularmente, el  $\beta$ -sitosterol contribuye a la reducción de colesterol por un bloqueo en la absorción intestinal de colesterol dietario (Heinemann y col., 1993) Además su ingesta podría ser parcialmente responsable de la menor incidencia de cáncer de próstata, colon y mama entre vegetarianos, hombres y mujeres, de países asiáticos por su mayor consumo, en comparación a la población occidental.

A partir de los beneficios citados anteriormente surge la necesidad de continuar investigando con respecto a otras propiedades que pudiesen exhibir los fitoesteroles, ya que cabe destacar que su estructura posee una gran similitud a las hormonas esteroidales, por lo que se podría presumir una potencial actividad estrogénica pudiendo ser útil como coadyuvante en el tratamiento sintomático de las mujeres climatéricas.

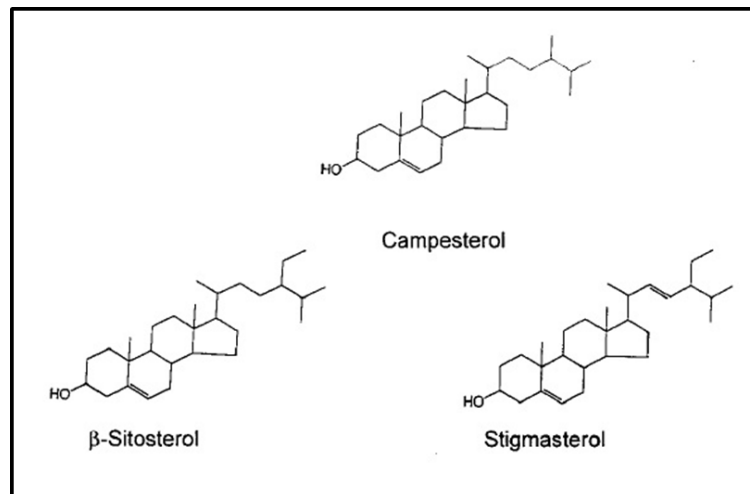
### **Fitoesteroles**

Los fitoesteroles corresponden a un grupo de esteroides producidos por las plantas y comprenden el mayor componente de la dieta humana (Moreau y col., 2001; Ostlund, 2002).

La mayor fuente de fitoesteroles de la dieta proviene de aceites vegetales (Moreau y col., 2001), como el de *Persea Americana*. Tanto el fruto como el aceite de palta poseen una gran cantidad de fitoesteroles, principalmente son 3 los que se presentan en mayor proporción: stigmasterol, campesterol y  $\beta$ -sitosterol ( $\beta$ SS), siendo este último el que tiene mayor abundancia, tanto bajo la forma  $\beta$ SS como de glucósido ( $\beta$ SSG) Figura 7.

En humanos, menos del 10% del total de  $\beta$ SS consumido en la dieta es absorbido en el intestino (Heinemann y col., 1991), mientras que en ratas, aproximadamente el 4% de  $\beta$ SS es absorbido (Sanders y col., 2000). La ingesta de fitoesteroles mediante la dieta en humanos se encuentra dentro de los rangos de 40 a 400 mg al día (Moghadasian,

2000; Vuoristo y col., 1994), aunque en dietas occidentales la ingesta de fitoesteroles es baja y se aproxima a los 80 mg/día (Moghsdasian, 2000).



**Figura 7:** Estructura de  $\beta$ -sitosterol, campesterol y stigmasterol (modificado de Awad y Fink, 2000).

Los fitoesteroles poseen similitud estructural con el colesterol a excepción de la posición del  $C_{24}$  en la cadena lateral del esterol. Algunos estudios sugieren que los fitoesteroles afectan el sistema reproductivo de animales ya que tendrían efectos estrogénicos (Malini y col., 1992; Rosenblun y col., 1993). El  $\beta$ SS sería agonista débil del receptor de estrógenos ( $ER_s$ )  $\alpha$  y  $\beta$ , preferentemente del receptor  $\beta$  (Gutendorf y col., 2001). Por lo tanto, los fitoesteroles serían potenciales disruptores endocrinos en animales.

Extractos de efluentes de ríos de la zona central de Chile, que reciben los residuos de industrias papeleras (los cuales son ricos en fitoesteroles) evidenciaron efectos estrogénicos, como el aumento de la vitelogenina circulante en trucha arcoíris circulante, incremento de CYP19a (Citocromo P450 aromatasa 19a) y de los niveles de  $17\beta$ -estradiol (Orrego y col., 2010). Otros estudios reportan que el  $\beta$ SS se acumula en animales de laboratorio (Sugano y col., 1978; Awad y col., 1997) y alteran los niveles de esteroides sexuales en humanos (Moghadasian, 2000), animales (Nieminen y col., 2003) y peces (Mellanen y col., 1996; Nakari y col., 2003). También este fitoesterol ha exhibido propiedades antiinflamatorias y analgésicas, anticancerígena, inmunomoduladoras, antiateroscleróticas (Ambavade y col., 2014).

### **Antecedentes de tesis**

Las investigaciones que se refieren al efecto estrogénico del  $\beta$ SS concuerdan con investigaciones previas en el Laboratorio de Toxicología de la Escuela de Química y Farmacia de la Universidad de Valparaíso, donde se evidenció un efecto estrogénico del aceite de palta en ratas, mediante los ensayos Allen – Doisy y uterotrópico (ambos modelos desprovistos de estradiol: por ovariectomización en Allen-Doisy y por inmadurez sexual en uterotrópico). En los animales tratados con el aceite de palta hubo una inducción y persistencia de etapa estro, lo que indica que este aceite tiene propiedades estrogénicas, ya que el estro se induce en respuesta al aumento de la concentración de estradiol. Por otro lado, en el ensayo uterotrópico, se indujo un aumento significativo del peso uterino del 232% en comparación a animales sin tratamiento, teniendo una potencia similar al bisfenol A (sustancia sintética de actividad estrogénica comprobada) (León y Peña, 2012).

En otro estudio se realizó la evaluación del aceite mediante vía oral en el modelo roedor de menopausia, obteniendo efectos estrogénicos en tejido vaginal (cornificación del epitelio y células esporádicas en frotis) y uterino, aunque en este último tejido no hubo efectos uterotrópicos evidentes (Vozmediano, 2013).

El presente trabajo tiene por objeto evaluar el efecto de los fitoesteroles más abundantes del aceite de palta:  $\beta$ SS, campesterol y stigmasterol, para determinar si la estrogenicidad del aceite puede ser atribuida a estos compuestos. Se utilizó un modelo de administración aguda para verificar si los efectos estrogénicos del aceite de palta se observan también a nivel temprano.



El efecto estrogénico agudo asociado al aceite de palta se atribuye a la presencia de  $\beta$ -sitosterol, campesterol y stigmasterol en su composición.



Objetivo general:

- Evaluar efecto estrogénico agudo de aceite de palta y fitoesteroles en el modelo roedor de menopausia.

Objetivos específicos:

- Evaluar el efecto de la administración aguda de aceite de palta y fitoesteroles sobre el peso corporal.
- Evaluar cambios morfométricos en tejido uterino, en respuesta a la administración aguda de aceite de palta y fitoesteroles.
- Evaluar cambios en cornificación de epitelio vaginal en respuesta a la administración aguda de aceite de palta y fitoesteroles.



### **Animales de experimentación**

Se seleccionaron 18 ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley del Laboratorio de Toxicología de la Escuela de Química y Farmacia. Los animales empleados tenían un peso mínimo de 250 g y fueron mantenidos bajo condiciones controladas de ciclos de luz/oscuridad de 12/12 horas (luz 6AM-6PM), temperatura a  $21^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$  y acceso *ad libitum* a alimento (Lab Rat Diet, Champion®) y agua potable. Los procedimientos fueron sometidos a certificación de bioética para manejo y uso de roedores de experimentación por el Comité Institucional de bioética para la Investigación con Animales de la Universidad de Valparaíso.

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

Se realizó un seguimiento de al menos dos ciclos estrales estables consecutivos determinados por frotis vaginales los que se observaron al microscopio óptico bajo un aumento de 10x o 40x. Una vez confirmada la ciclicidad normal del animal, las ratas fueron anestesiadas con ketamina al 10% y xilacina al 2% en dosis de 90 y 10 mg/kg respectivamente, y posteriormente se llevó a cabo la ovariectomización bilateral, como se describe en las Guías de la Organización para la Cooperación Económica y el Desarrollo (OECD, 2007). Posteriormente, se realizó un seguimiento de cuatro semanas del ciclo estral hasta la mantención de la etapa diestro. De manera adicional se monitorizó la ingesta diaria de alimento y agua más observaciones conductuales, y semanalmente el peso corporal.

Para la administración, los animales se distribuyeron aleatoriamente en cuatro grupos, para control negativo y positivo de 3 animales cada uno y los grupos de estudio (fitoesteroles y aceite de palta) de 6 animales cada uno. El grupo control negativo será tratado vía gavage, por 3 días con suero fisiológico: 2 mL/día; el grupo control positivo, estradiol (Sigma, N°CAS 50-28-2): 50 µg/kg vía subcutánea (Castillo, 2010); aceite de palta: 2 mL/Kg/día vía gavage y fitoesteroles 10,0 mg/Kg/día (NDS N-25 compuesta por un 70-80% de  $\beta$ -sitosterol, 15% Campesterol y 2% de stigmasterol, donado por la empresa NUTRARTIS).

### **Ensayo uterotrópico**

La dosis de fitoesteroles por kilogramo de peso administrados a los animales de experimentación se determinó a partir de la realización de un estudio preliminar, el que evaluó efecto uterotrópico a distintas concentraciones de  $\beta$ -sitosterol en hembras juveniles según las guías de procedimiento de OECD 440 (2007). Para ello, se utilizaron ratas hembras de la cepa Sprague Dawley de 18 días post-natales. La sustancia de estudio correspondió a  $\beta$ SS y a una suspensión dispersable de fitoesteroles, ambos administrados vía subcutánea durante 3 días consecutivos, el primero a 3 grupos de ensayo: 2,5; 5,0 y 7,5 mg/kg, y el segundo, a 2 grupos de estudio: 6,6 mg/kg (contiene 5,0 mg/kg de  $\beta$ SS) y 10mg/kg (contiene 7,5 mg/kg de  $\beta$ SS), además de un grupo control negativo (cada grupo consta de 5 animales). Una vez finalizada la administración, los animales fueron necropsiados, para luego extraer los úteros y registrar sus pesos tanto húmedos como secos. Por otro lado, se monitorizó diariamente el peso corporal de cada animal.

### **Recolección de muestras**

La recolección de muestras se realizó al término del periodo de exposición. La eutanasia se llevó a cabo por asfixia con CO<sub>2</sub>. Se recolectaron cuidadosamente los órganos reproductores (útero y vagina), los cuales fueron pesados y fijados en paraformaldehído al 4%.

### **Evaluación histológica**

Las muestras fueron incluidas en parafina, de acuerdo a procedimientos de rutina. Se cortaron secciones histológicas de 5 micrómetros las que fueron teñidas con hematoxilina y eosina posteriormente se examinaron por microscopía óptica. Las imágenes fueron procesadas con el programa Micrometrics SE Premium 4.0 para la evaluación morfológica tanto en secciones de tejido uterino como en tejido vaginal.

Se analizaron 4 secciones histológicas por cada animal de cada grupo experimental, y así se determinaron los siguientes parámetros de evaluación: grosor del epitelio uterino, endometrio y miometrio, cuantificación de glándulas uterinas y circunferencia de lumen uterino. En tejido vaginal, se evaluó el grosor del epitelio.

### **Análisis estadístico**

Se utilizó el análisis ANOVA de mediciones repetidas de dos vías para consumo de agua, alimento y variación de peso corporal. Y para la evaluación de los resultados morfométricos se utilizó el análisis de varianza ANOVA de una vía ( $p < 0,05$ ).

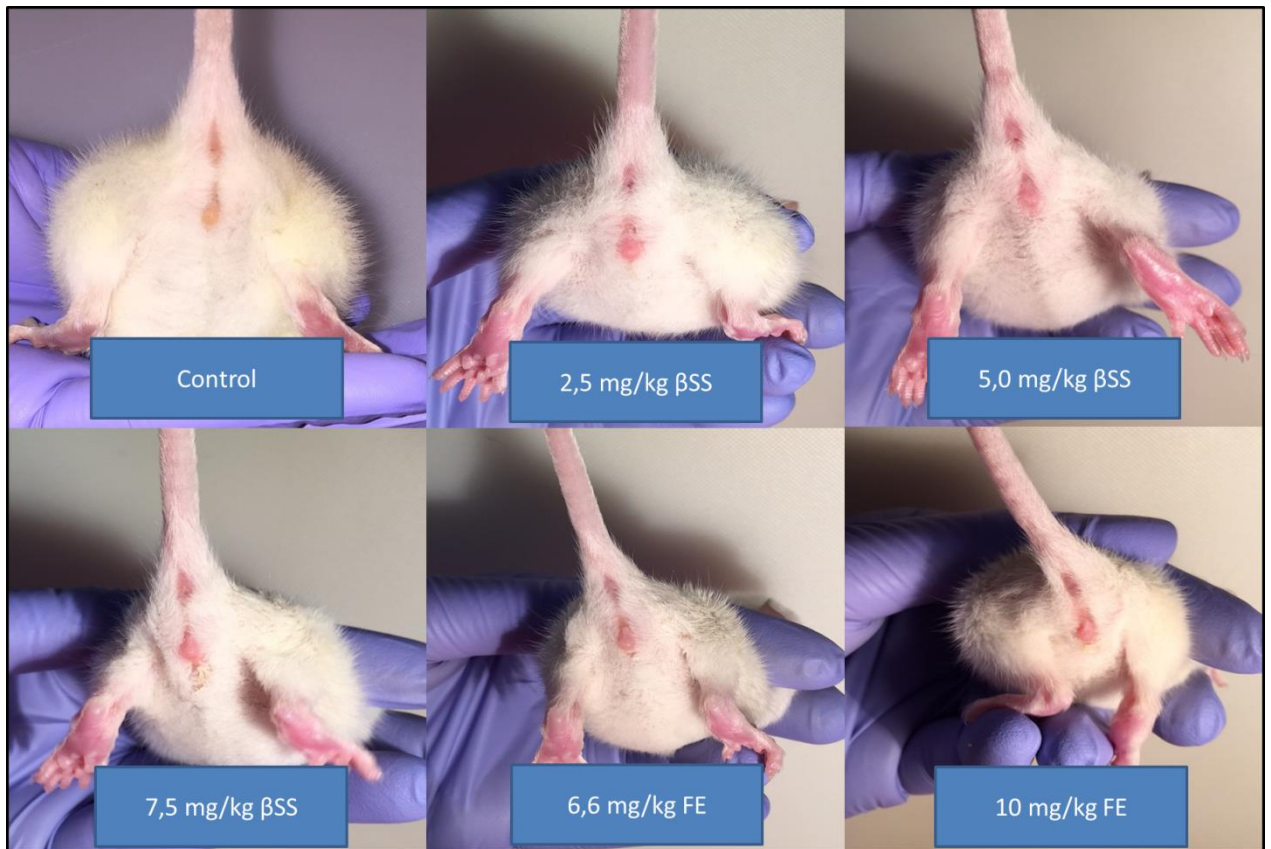


A continuación se presentan, en primer lugar, los resultados del estudio preliminar realizado para determinar la concentración de fitoesteroles a utilizar en el modelo roedor de menopausia. Posteriormente se entregan los resultados de los parámetros elegidos para la evaluación de estrogenicidad en el modelo roedor de menopausia anteriormente mencionado, los que corresponden a consumo de alimento y agua, variación de peso corporal, efecto uterotrópico, citología vaginal y evaluación morfométrica. Esta última incluye las siguientes mediciones: circunferencia de lumen uterino, grosor epitelial, grosor endometrial y miometrial, cuantificación de glándulas uterinas y grosor de epitelio vaginal. Las abreviaciones utilizadas para presentar los resultados son: S, E, AP y FE, las que corresponden a suero, estradiol, aceite de palta y fitoesteroles, respectivamente.

### Ensayo preliminar

Las ratas pre-púber (18 días) recibieron vía subcutánea 6 tipos de tratamientos: grupo control negativo; 2,5 mg/kg  $\beta$ SS; 5,0 mg/kg  $\beta$ SS; 7,5 mg/kg  $\beta$ SS; 6,6 mg/kg de FE y 10 mg/kg de FE.

En la figura 8 se observa, a modo cualitativo, una pequeña variación en la tonalidad del área genital con respecto al grupo control. Los genitales externos se aprecian con un tono rosado más pronunciado, además se observa mayor tamaño y turgencia del área genital.



**Figura 8:** Genitales externos representativos de cada grupo de estudio.

En la tabla 5 se presentan los resultados del ensayo preliminar. En cuanto al peso corporal y a la variación de éste, no se encontraron diferencias significativas entre los grupos de estudio (ANOVA de dos vías, mediciones repetidas,  $p < 0,05$ ). Para la relación

peso uterino/peso corporal, tampoco se hallaron diferencias estadísticamente significativas entre los grupos experimentales (ANOVA de una vía, Test de Dunnett,  $p=0,0761$ ).

Tratamiento	Peso corporal final	Variación de peso corporal	Peso útero húmedo	Peso útero seco	Peso útero húmedo/peso corporal	Peso útero seco/peso corporal
Suero	39,0 ±1,0	4,0 ± 1,0	0,0232 ± 0,0006	0,0214 ± 0,0004	6,0e-4 ± 2,4e-5	5,5e-4 ± 2,0e-5
2,5 mg/kg βSS	38,0 ±3,7	8,0 ± 2,5	0,0285 ± 0,0014	0,0232 ± 0,0013	7,7e-4 ± 7,8e-5	6,4e-4 ± 8,7e-5
5,0 mg/kg βSS	34,0 ± 2,9	5,0 ± 2,2	0,0259 ± 0,0005	0,0219 ± 0,0005	7,8e-4 ± 5,8e-5	6,6e-4 ± 5,1e-5
7,5 mg/kg βSS	34,0 ± 2,7	3,0 ± 3,0	0,0239 ± 0,0003	0,0206 ± 0,0003	7,4e-4 ± 8,4e-5	6,4e-4 ± 6,4e-5
6,6 mg/kg FE	48,0 ± 1,2	6,0 ± 1,0	0,0270 ± 0,0003	0,0238 ± 0,0003	5,6e-4 ± 1,6e-5	5,0e-4 ± 1,7e-5
10 mg/kg FE	52,0 ±1,2	4,0 ±1,2	0,0309 ± 0,0013	0,0272 ± 0,001	5,9e-4 ± 3,8e-5	5,2e-5 ± 3,0e-5

**Tabla 5:** Pesos corporales iniciales y finales de cada grupo durante el tiempo de estudio, con su respectiva variación, peso uterino y relación peso uterino/peso corporal. Los resultados se presentan como promedio ± error estándar.

La escasa literatura con respecto a la toxicidad de estas sustancias señala que a dosis de 10 mg/kg administrada vía subcutánea a roedores, se genera una moderada proliferación fibroblástica alrededor de los lóbulos hepático, debido a lo cual los conductos biliares aparecen obliterados a la vez que disminuyen marcadamente las proteínas séricas (Malini y Vanithakumari, 1990). Por este motivo, se decidió administrar la dosis de 10 mg/kg de FE al grupo experimental en el modelo roedor de menopausia.

### **Estudio en modelo roedor de menopausia**

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

En todo estudio en que se utilicen animales de experimentación es necesario monitorizar en consumo de alimento y agua, éste se realizó durante todo el periodo de

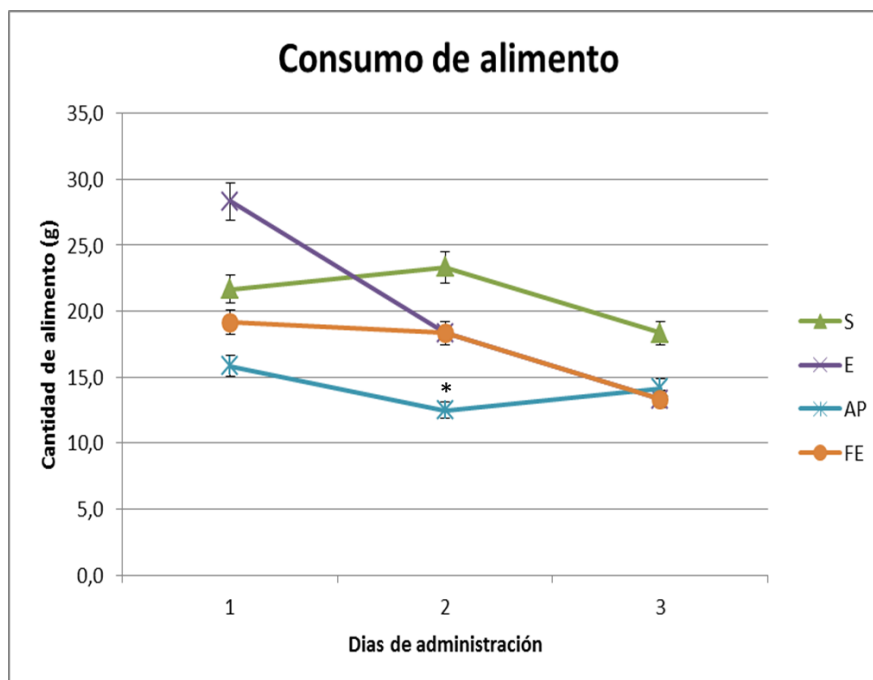
administración. En la tabla 6 y en la figura 9 se presentan los resultados correspondientes al seguimiento de consumo de agua y comida respectivamente, para los 4 grupos de estudio.

En cuanto al consumo de agua, se observa que fue similar entre los grupos durante los 3 días de administración. Sólo hubo diferencia de leve significancia el día 2 de administración entre el grupo de suero y el de aceite de palta (ANOVA de dos vías, múltiples comparaciones,  $p < 0,05$ ).

Tratamiento	Consumo de agua
S	21,67 $\pm$ 1,93
E	18,90 $\pm$ 1,47
AP	15,53 $\pm$ 1,47
FE	20,80 $\pm$ 1,44

**Tabla 6:** Consumo de agua por cada grupo experimental, expresado como promedio  $\pm$  error estándar. S: suero, E: estradiol, AP: aceite de palta, FE: fitoesteroles.

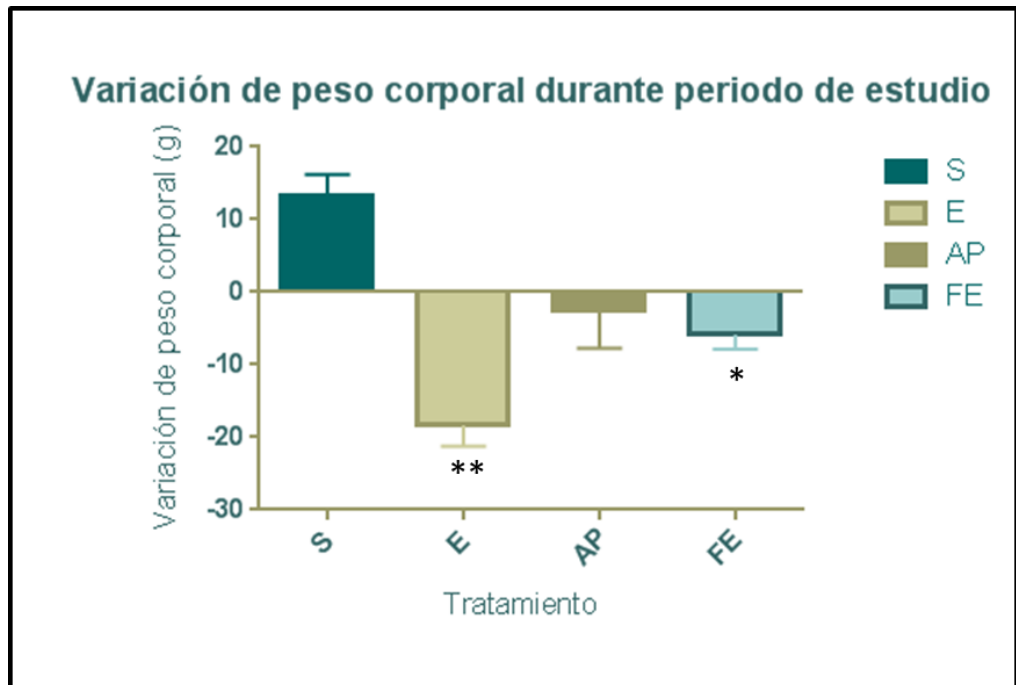
Con respecto a la ingesta de alimento, fue similar en todos los grupos durante los 3 días de administración, no hubo diferencias significativas entre estos, sólo hubo diferencias el segundo día de administración entre el grupo S y AP (ANOVA de dos vías, múltiples comparaciones,  $p < 0,05$ ).



**Figura 9:** Consumo diario de alimento, expresado como promedio  $\pm$  error estándar de los grupos de experimentación. S: suero, E: estradiol, AP: aceite de palta, FE: fitoesteroides. \*Diferencias significativas (ANOVA de dos vías, múltiples comparaciones,  $p < 0,05$ ).

### Variación de peso corporal

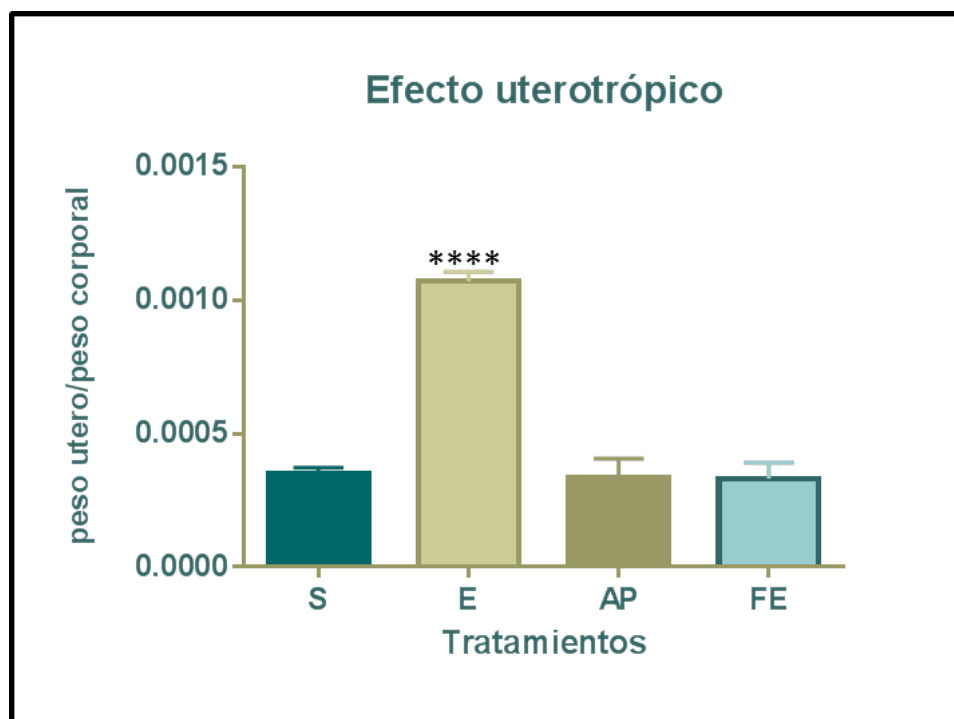
No hubo cambios significativos en la variación día a día entre los grupos durante el periodo de administración. El análisis de estos resultados permitió detectar cambios significativos de variación de peso sólo entre el día final y el día inicial del estudio. Esta diferencia significativa se presenta entre el grupo S y E, también hay significancia estadística entre los grupos S y FE pero de menor magnitud (ANOVA de dos vías, múltiples comparaciones,  $p < 0,05$ , Figura 10).



**Figura 10:** Variación de peso corporal durante los días de estudio de cada uno de los grupos de experimentación. Se presentan los datos promedio de cada grupo. \*, \*\* Diferencias significativas (ANOVA de dos vías, múltiples comparaciones,  $p < 0,05$ ).

### Efecto uterotrópico

Una vez finalizado el estudio, se recolectaron las muestras de úteros de cada animal, estos valores se normalizaron según el peso corporal. Esta relación de peso uterino por peso corporal se expone en el siguiente gráfico para cada grupo de ensayo. Sólo se evidencia una respuesta significativa entre los grupos de suero y estradiol (ANOVA de una vía, test de Dunnett,  $p < 0,0001$ ). En los animales correspondientes a los grupos de AP y FE no hubo diferencias estadísticamente significativas. En la tabla 7 se adjuntan datos de variación de peso corporal, peso útero húmedo y seco, además de sus respectivas relaciones con el peso corporal.



**Figura 11:** Relación de peso uterino según peso corporal. S: suero, E: estradiol, AP: aceite de palta, FE: fitosteroles. \*\*\*\* Diferencia estadísticamente significativa, en comparación con el grupo control (ANOVA de una vía, test de Dunnett,  $p < 0,0001$ ). Los valores se expresan como promedio  $\pm$  error estándar.

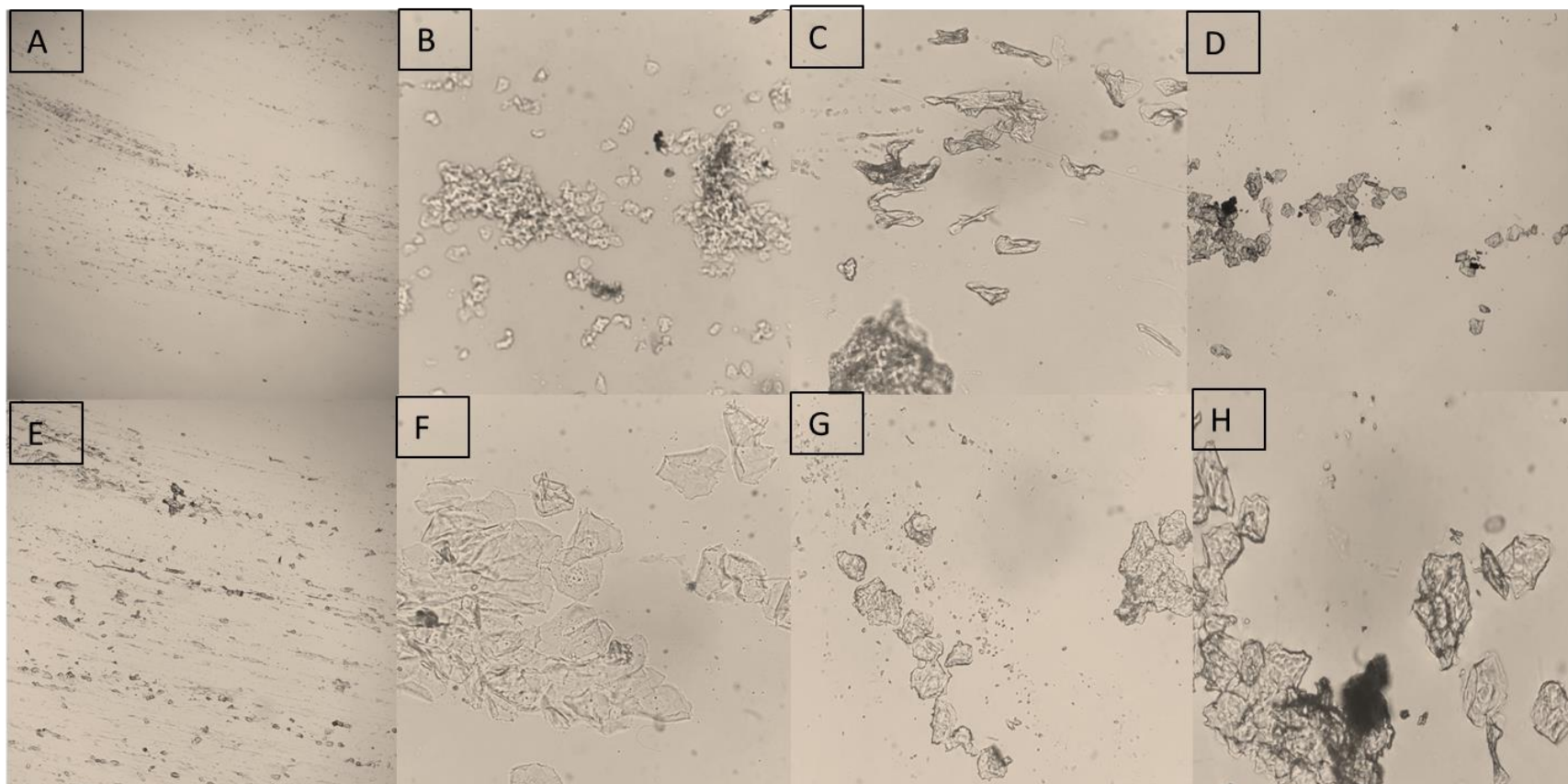
Tratamiento	Variación de peso corporal	Peso útero húmedo	Peso útero seco	Peso útero húmedo/peso corporal	Peso útero seco/peso corporal
Suero	13,3 ± 1,7	0,1231 ± 0,0071	0,1075 ± 0,0063	3,5e-4 ± 2,3e-5	3,0e-4 ± 2,1e-5
E	-18,3 ± 1,7	0,3794 ± 0,0056	0,2278 ± 0,0127	1,1e-3 ± 2,1e-5	6,4e-4 ± 4,1e-5
AP	-2,5 ± 2,1	0,1255 ± 0,0110	0,1143 ± 0,0089	3,3e-4 ± 3,0e-5	3,0e-4 ± 2,7e-5
FE	-5,8 ± 0,8	0,1266 ± 0,009	0,1107 ± 0,0055	3,3e-4 ± 2,5e-5	2,9e-4 ± 2,2e-5

**Tabla 7:** Pesos corporales iniciales y finales de cada grupo durante el tiempo de estudio, con su respectiva variación, peso uterino y relación peso uterino/peso corporal. Los resultados se presentan como promedio ± error estándar.

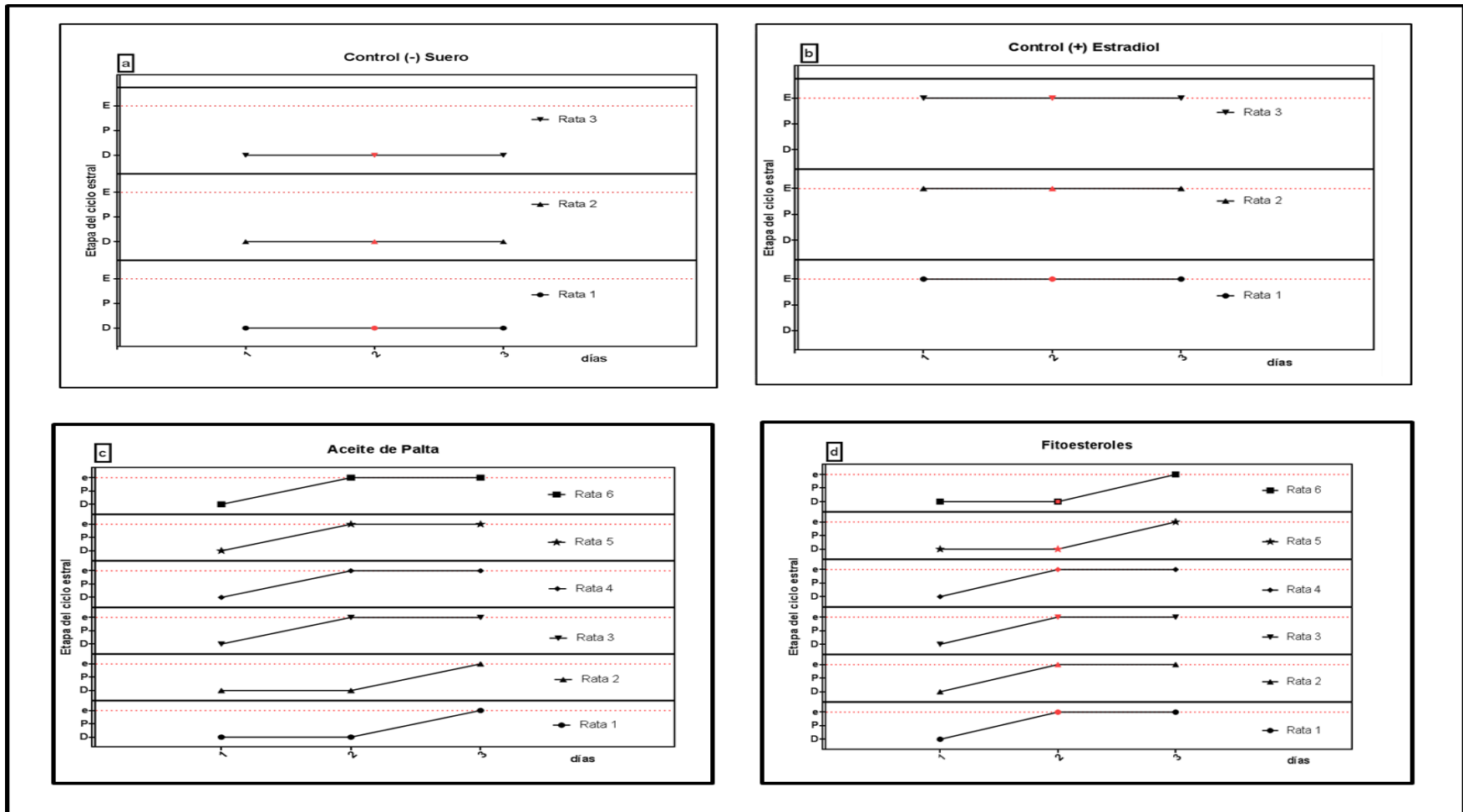
### **Ciclo estral**

La citología vaginal se monitorizó durante los 3 días de administración para cada grupo de estudio. Tanto para el grupo S como para el grupo E se tuvieron los resultados esperados, que fue la mantención de la etapa diestro (figura 12a y 12e) y la inducción y mantención de la etapa estro (figura 12b y 12f), respectivamente.

En los grupos de AP y de FE, se observaron claramente células cornificadas en los frotis vaginales. La presencia de estas células fue a partir del segundo día de administración, y en algunos animales se registró una mayor densidad en los campos de observación, por lo que se denominó pseudo-estro a la presencia, lo que se evidencia en las figuras 12c y g, y 12d y h, para los grupos aceite de palta y fitoesteroles respectivamente. En la figura 13 se presenta el seguimiento de la citología vaginal de cada animal.



**Figura 12:** Frotis vaginales representativos de cada grupo de estudio, obtenidos del día 3 de administración. a (10x) y e (40x) grupo S, b (10x) y f (40x) grupo E, c (10x) y g(40x) grupo AP, d (10x) y h (40x) grupo FE.



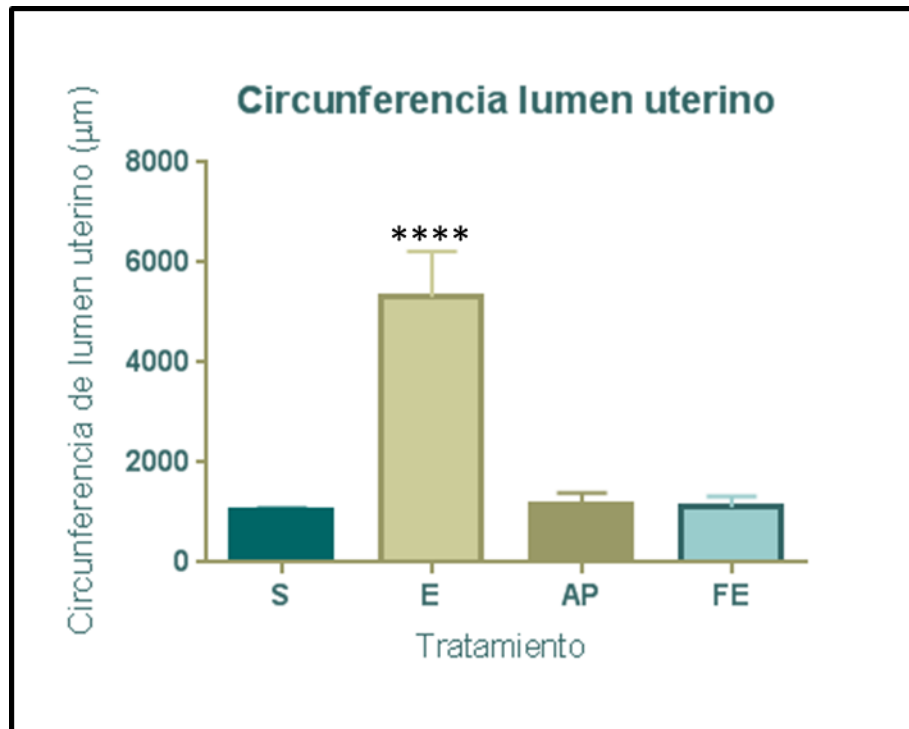
**Figura 13:** Seguimiento de ciclo estral. a) grupo S, b) grupo E, c) grupo AP y d) FE. Las siglas utilizadas en el eje Y, D corresponde a la etapa diestro, P a la etapa proestro, E a la etapa estro y e corresponde a un pseudo-estro donde hubo presencia de células cornificadas esporádicas

## Histología de útero y vagina

A continuación se presentan los resultados de los estudios histológicos de las muestras recolectadas, tanto de útero como de vagina. Los parámetros morfométricos evaluados corresponden a: circunferencia de lumen uterino, grosor epitelial tanto de útero como de vagina, grosor endometrial y de miometrio, además de cuantificación de glándulas uterinas.

### Circunferencia de lumen uterino

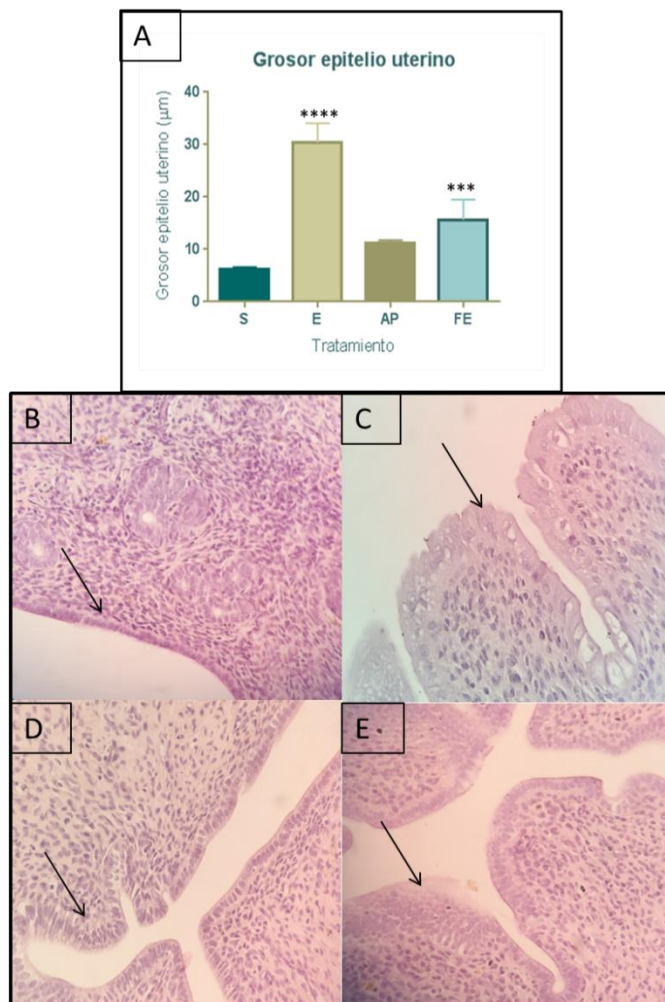
Se observaron diferencias extremadamente significativas entre los grupos de S y E (ANOVA de una vía, Test de Dunnett,  $p < 0,0001$ , figura 14). Entre los grupos de estudio correspondientes a AP y FE en relación al control negativo no presentan diferencias significativas de este parámetro evaluado.



**Figura 14:** Circunferencia de lumen uterino ( $\mu\text{m}$ ) de los grupos S, E, AP y FE. Resultados expresados como promedio  $\pm$  error estándar. \*\*\*\*Diferencias estadísticamente significativas (ANOVA de una vía, Test de Dunnett,  $p < 0,0001$ ).

### Grosor epitelial

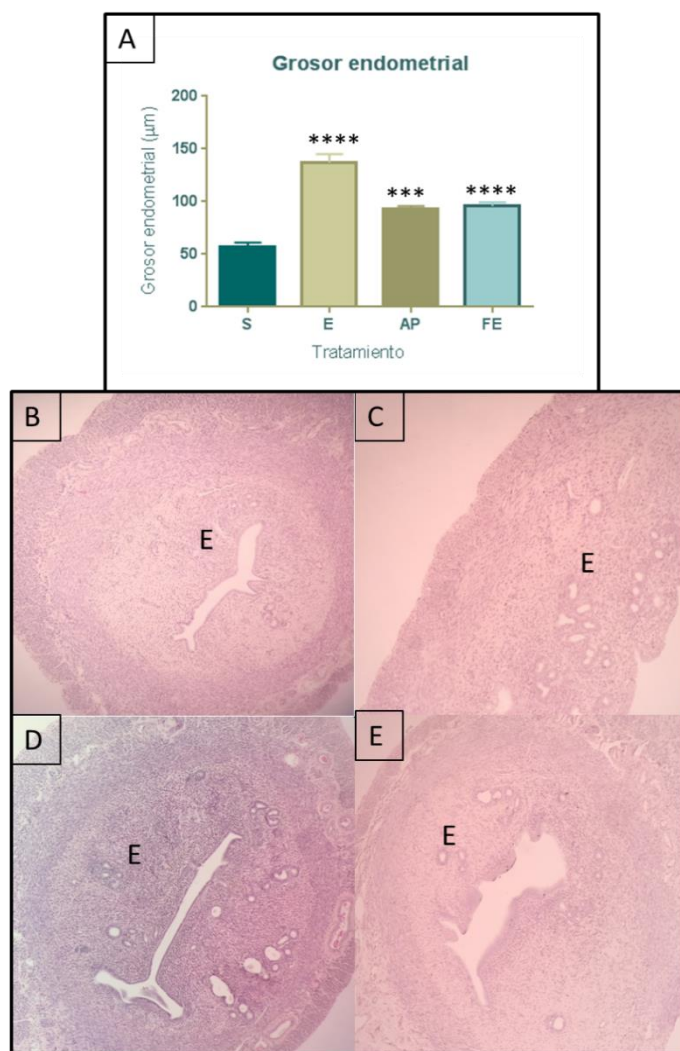
En relación a este parámetro morfométrico, se encontraron diferencias significativas entre los grupos S y E, como también entre S y FE, aunque estas últimas con una menor significancia (ANOVA de una vía, Test de Dunnett,  $p < 0,0001$ ). No hubo diferencias significativas entre los grupos S y AP. Lo anterior se grafica en la figura 15 A. Con respecto a las imágenes B, C, D y E de la figura, se puede apreciar la diferencia de tamaño de los epitelios de cada grupo experimental. La imagen B que corresponde al grupo S, donde se ve un epitelio delgado y cuboidal, a diferencia de las otras imágenes en donde se aprecia un epitelio más grueso y las células adquieren una forma columnar, siendo mayor en los grupos E y FE, en las imágenes C y E, respectivamente.



**Figura 15:** Gráfico (imagen A) muestra grosor epitelio uterino ( $\mu\text{m}$ ), valores presentados como promedio  $\pm$  error estándar por cada grupo de estudio. \*\*\*,\*\*\*\* Diferencias significativas (ANOVA de una vía, Test Dunnett,  $p < 0,0001$ ). Imágenes B, C, D y E, correspondiente a las grupo S, E, AP y FE respectivamente, flechas negras indican epitelio uterino.

### Grosor endometrial

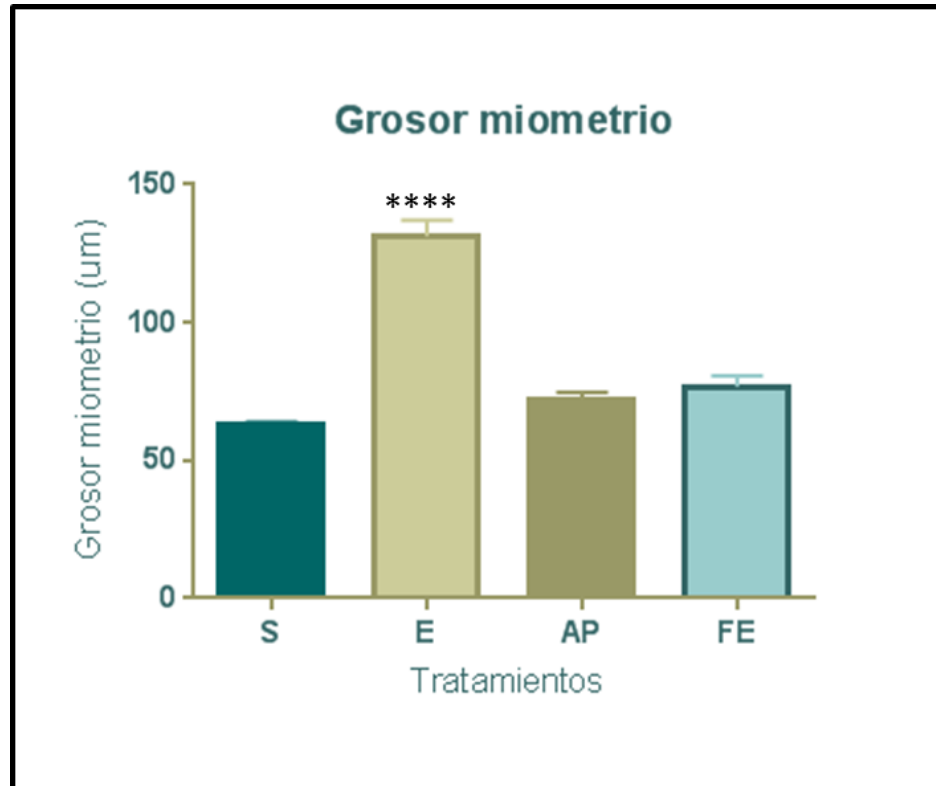
Con respecto al grosor endometrial, hubo diferencias extremadamente significativas entre el grupo suero con el grupo de estradiol, al igual que al compararlo con el grupo de fitoesteroles. En cuanto al grupo de aceite de palta, las diferencias encontradas también son significativas pero de menos magnitud (ANOVA de una vía, Test de Dunnett,  $p < 0,0001$ ). Lo anterior se representa en la figura 16. La diferencia de grosor endometrial es evidente en las fotografías de la figura 16, en donde se aprecia el notorio cambio de tamaño en los grupos E, AP y FE, en las imágenes C, D y E, respectivamente.



**Figura 16:** Grosor de endometrio uterino para cada grupo de estudio, valores presentados como promedio  $\pm$  error estándar. \*\*\*, \*\*\*\* Diferencias significativas (ANOVA de una vía, Test de Dunnett,  $p < 0,0001$ ). Imágenes corresponden a secciones histológicas representativas de cada grupo. B, C, D y E representan a los grupo S, E, AP y FE, respectivamente. La letra **E** indica endometrio uterino.

### Grosor miometrial

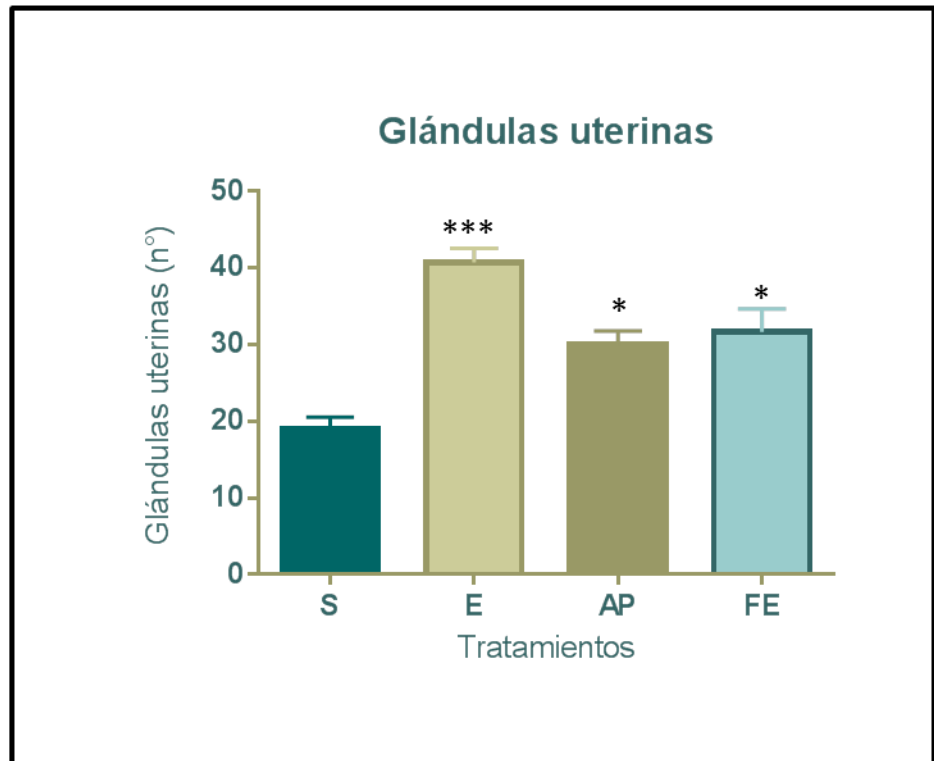
El grosor de miometrio uterino de los diferentes grupos de experimentación, fue estadísticamente distinto entre los grupos S y E, y no fue significativo al compararlo con los grupos AP y FE, aunque se evidencia una leve tendencia de éstos a tener un mayor grosor (ANOVA de una vía, Test de Dunnett,  $p < 0,0001$ , Figura 17).



**Figura 17:** Grosor de miometrio uterino de cada grupo de experimentación. Los valores se representan como promedio  $\pm$  error estándar. \*\*\*\* Diferencias significativas (ANOVA de una vía, Test de Dunnett,  $p < 0,0001$ ).

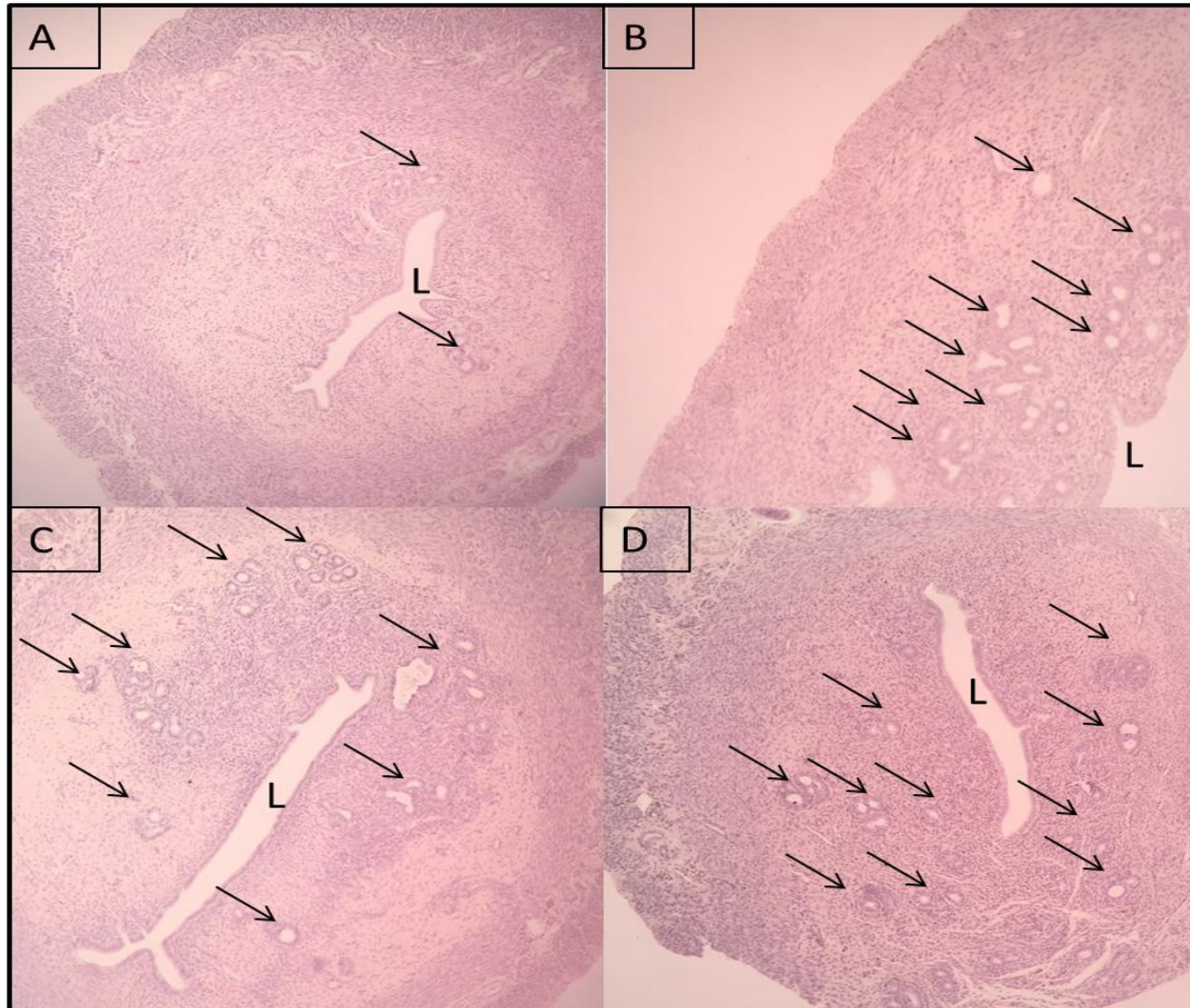
### Cuantificación glándulas uterinas

En relación a este parámetro de evaluación, se obtuvieron resultados estadísticamente significativos para los grupos E, AP y FE al compararlos con el grupo control negativo. Las diferencias de mayor magnitud corresponde al grupo E, y para el grupo AP y FE, es de menor magnitud pero igual para ambos (ANOVA de una vía, Test de Dunnett,  $p=0,0018$ ). Figura 18.



**Figura 18:** Cuantificación de glándulas uterinas de cada grupo de experimentación. Resultados se expresan como promedio  $\pm$  error estándar. \*,\*\*\* Diferencias significativas (ANOVA de una vía, Test de Dunnett,  $p=0,0018$ ).

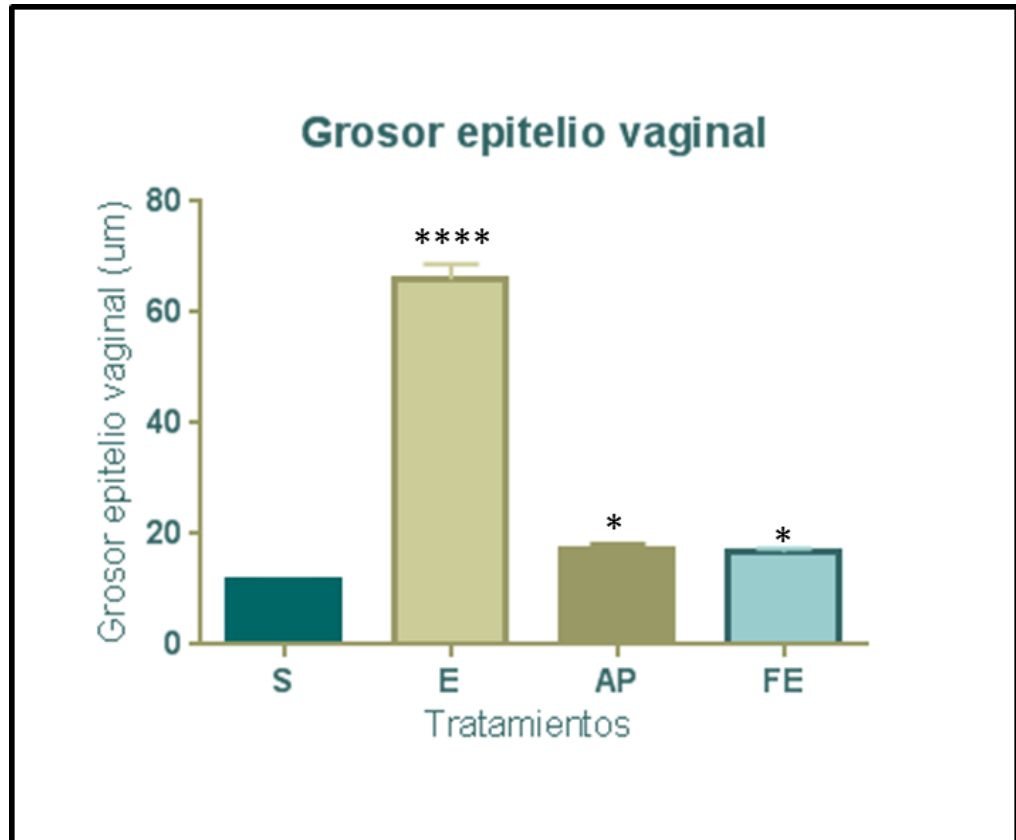
En la figura 19, se presentan imágenes representativas de cada grupo experimental, las flechas negras indican presencia de glándulas uterinas y la sigla L, lumen uterino.



**Figura 19:** Secciones histológicas representativas de cada grupo experimental. A, B, C y D, corresponden a los grupos S, E, AP y FE, respectivamente. Aumento 40x.

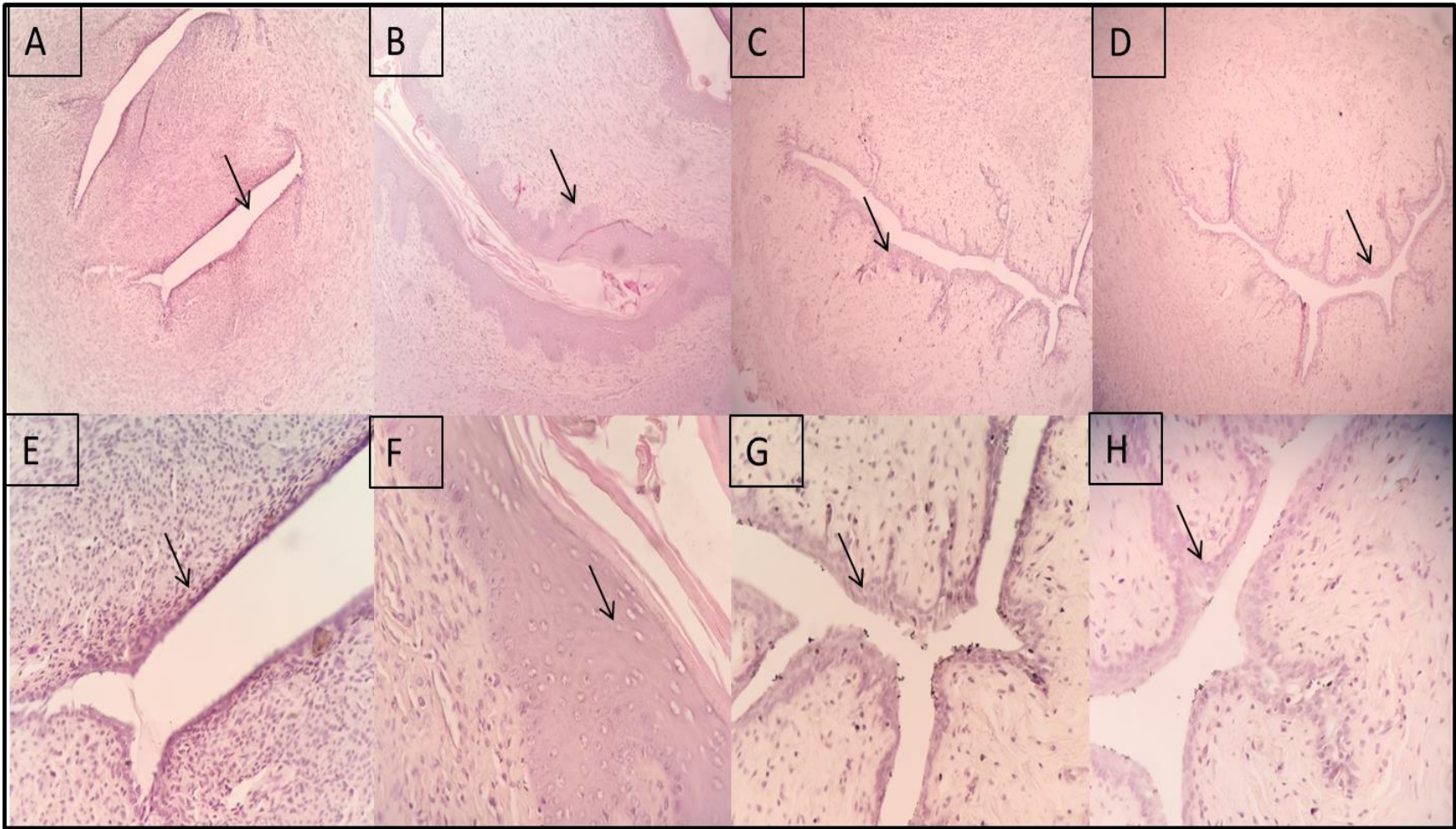
### Grosor epitelio vaginal

En cuanto al grosor del epitelio vaginal, se obtuvieron resultados estadísticamente significativos para los grupos E, AP y FE al compararlos con el grupo S. Las diferencias significativas halladas fueron mayor en el grupo E y en menor grado en los de AP y FE (ANOVA de una vía, Test de Dunnett,  $p < 0,0001$ ). Lo anterior se representa en la figura 20.



**Figura 20:** Resultados de grosor epitelio vaginal para cada grupo de experimentación. Se representan como promedio  $\pm$  error estándar. \*,\*\*\*\* Diferencias significativas (ANOVA de una vía, Test de Dunnett,  $p < 0,0001$ ).

A continuación, en figura 21 se puede apreciar distintas secciones histológicas de vagina, representativas de cada grupo.



**Figura 21:** Distintas secciones histológicas de vagina, representativas de cada grupo experimental. Las imágenes A, B, C y D, se presenta aumento 10x; las imágenes E, F, G y H, se presenta aumento 40x. Flechas negras indican epitelio vaginal. Las imágenes A y E corresponden al grupo S, las imágenes B y F al grupo E, las imágenes C y G al grupo AP y finalmente las imágenes D y H al grupo FE.



Este trabajo de tesis continua la línea de investigación de estrogenicidad del Laboratorio de Toxicología de la Escuela de Química y Farmacia de la Universidad de Valparaíso. Los estudios previos que confirmaron la estrogenicidad del aceite de palta corresponden a Castillo (2010), León y Peña (2012) y Vozmediano (2013). En estos no solo se confirmó que el aceite de palta es estrogénico sino que además se terminó por validar un modelo y periodo de administración para el estudio del posible uso terapéutico de esta sustancia estrogénica. En cuanto a la investigación realizada por Vozmediano (2013), se evaluó el efecto en el mismo modelo roedor de menopausia pero durante una administración subcrónica. En este trabajo también se demostró el efecto estrogénico, evidenciándose resultados a nivel tisular, donde se encontró atenuación de la atrofia uterina y vaginal consecuencia de la privación de estradiol, además hubo hallazgo de células cornificadas esporádicas en los frotis vaginales, lo que se debería a la cornificación del epitelio vaginal. Sin embargo, no hubo manifestaciones uterótropicas evidentes

Los resultados obtenidos en este estudio se discuten a continuación y están en amplia concordancia con los resultados anteriormente mencionados.

### **Estudio preliminar**

El objetivo de realizar el estudio preliminar, fue la determinación de la curva dosis respuesta de  $\beta$ SS y FE, y a partir de estos resultados poder establecer la dosis de FE a utilizar en el estudio en el modelo roedor de menopausia.

Se utilizaron tres dosis de  $\beta$ SS: 2,5; 5,0 y 7,5 mg/kg y dos dosis de FE: 6,6 y 10 mg/kg (correspondientes a 5,0 y 7,5 mg/kg de  $\beta$ SS, respectivamente). La escasa literatura con respecto a la toxicidad de estas sustancias señala que a dosis de 10 mg/kg administrada vía subcutánea a roedores, se genera una moderada proliferación fibroblástica alrededor de los lóbulos hepático, debido a lo cual los conductos biliares aparecen obliterados a la vez que disminuyen marcadamente las proteínas séricas (Malini y Vanithakumari, 1990). Por este motivo, no se utilizó la dosis más baja de FE, debido a que los resultados ya obtenidos no justificaban su uso por resguardos bioéticos en el uso racional de animales de experimentación.

En cuanto al efecto uterotrópico evaluado en ratas pre-púberes, no se observaron efectos estadísticamente significativos. Probablemente, la falta de efectos evidentes en este modelo se deba principalmente a la baja potencia del  $\beta$ SS y de los FE. Por lo cual, se determinó utilizar la mayor dosis de FE en el modelo roedor de menopausia. Se optó por la utilización de los FE, debido a que como se señala en la parte introductoria de este trabajo, las principales fuentes de fitoesteroles son los aceites vegetales y en estos se presentan principalmente 3: Campesterol, Stigmasterol y  $\beta$ -sitosterol, siendo este último el de mayor abundancia (Moreau y col, 2001), proporciones que se mantienen en la dispersión utilizada, por lo cual sería adecuada su utilización en el ensayo de modelo roedor de menopausia, ya que los resultados de la administración de ésta se podrían contrastar con los resultados obtenidos de la administración de aceite de palta, abundante en estos fitoesteroles (tabla 3).

Cabe señalar que resultados negativos en cuanto al peso uterino no implica que no haya cambios morfológicos y morfométricos en tejidos blancos.

A continuación se presentan los resultados del estudio en el modelo roedor de menopausia.

### **Estudio en el modelo roedor de menopausia**

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

Con respecto al consumo de agua, no hubo diferencias estadísticamente significativas entre los grupos de estudio. En cuanto al consumo de alimento, al igual que el parámetro anterior, no se encontraron diferencias estadísticamente significativas durante el periodo de ensayo entre los diferentes grupos, sólo en el segundo día de administración hubo diferencias levemente significativas entre el grupo S y E. A pesar de estos resultados, si se pudo establecer que durante el tiempo de estudio el comportamiento de consumo diario de alimento tendió a disminuir en los grupos E, AP y FE, y a mantenerse bajo el consumo promedio del grupo S. Lo señalado anteriormente se explicaría a que es reconocido que los estrógenos disminuyen el apetito en modelos animales roedores y primates (Butera y col, 1984; Czaja y col, 1974; Dubuc y col, 1985; Johnson y col, 1994; Palmer y col, 1986). En ratas, agonistas del  $RE\alpha$ , disminuyen la

ingesta de alimento y el tamaño de las porciones de alimento ingeridas, mientras que agonistas del RE $\beta$  no exhiben este efecto, en contraposición, en que ratones en los que se ha bloqueado RE $\alpha$  se evidencia hiperfagia, obesidad e intolerancia a la glucosa (Musatov y col, 2007). En conejillos de india el estradiol también disminuye la cantidad y frecuencia de la ingesta de alimentos, por lo tanto, el estradiol tiene propiedades moduladoras del apetito (Roepke y col, 2010). En mujeres, la ingesta disminuye en la fase periovulatoria, cuando los niveles de estrógeno alcanzan su máximo, y la ingesta es mayor durante la fase lutea. Estos cambios cíclicos están asociados con la disminución del consumo de carbohidratos cercano a la ovulación, y el incremento de consumo de grasas durante la fase lutea (Johnson y col, 1994).

En el caso del grupo AP, se le atribuye la tendencia de menos consumo de alimento a su efecto estrogénico, pero además debido a que en su composición encontramos una importante cantidad de ácidos grasos. La presencia de ácidos grasos en la dieta estimula la producción de colecistokinina (CCK), péptido YY y péptido similar al glucagón (GLP-1), los dos primeros provocan una disminución del apetito además de un retraso del vaciamiento gástrico, y mientras que GLP-1 realiza una retroalimentación negativa con el vaciamiento gástrico (Camilleri, 2009; Hellstrom, 2006). Además, un componente importante del aceite de palta es el ácido oleico, que cuando es administrado mediante infusión intestinal conduce a una reducción de hasta un 80% en el vaciamiento gástrico (Covasa y Ritter, 2000).

Estos resultados, concordarían con los obtenidos por Vozmediano (2013), donde se evidenció disminución significativa de la ingesta de alimento de los grupos de estudio.

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

La variación de peso de los grupos experimentales durante el periodo de tratamiento arrojó que no existen diferencias estadísticamente significativas, si se comparan las variaciones diarias, entre los grupos S, E, AP y FE. Sólo se encontraron diferencias en los grupos E y FE en relación al grupo S, al comparar el peso inicial y final de los animales (figura 10).

Las diferencias halladas en los grupos E y FE corresponderían a que el efecto estrogénico exhibe un comportamiento anorexígeno debido a la inhibición del apetito, lo cual se refleja en una disminución de peso con respecto al grupo control. También se señala anteriormente que el aceite de palta tendría propiedades estrogénicas, pero esto no se refleja en la variación de peso corporal, y obedecería a que el aceite es una buena fuente energética, por lo que las calorías ingeridas a través de éste compensarían la disminución de consumo de alimento reflejando una menor variación de peso corporal, compensación que no ocurre en los primeros dos grupos, ya que no hubo reemplazo de calorías en los grupos restantes. El grupo S evidenció una variación de peso corporal positiva durante el estudio, debido a que la ovariectomización produce un estado resultado de una deprivación de estradiol endógeno luego de este procedimiento.

Sin embargo, aun cuando estas variaciones no son significativas, y por su magnitud no representan importancia biológica, debido al corto periodo de administración (3 días), sí es estadísticamente significativo y adquiere importancia biológica cuando el periodo de administración es más extenso, como en el estudio previo de Vozmediano (2013) en donde la duración abarcaba un periodo de 28 días y este efecto se vio reflejado en la disminución de peso corporal en los grupo experimentales.

### **Efecto de la administración de aceite de palta y fitoesteroles sobre útero**

El ensayo uterotrópico en ratas ovariectomizadas es el método aceptado y validado por la comunidad científica y organismos regulatorios internacionales que permite evaluar la actividad estrogénica *in vivo* de diversas sustancias químicas, incluidos los compuestos naturales. Este ensayo aprovecha en el hecho de que el útero es un órgano blanco para sustancias estrogénicas, debido a que expresa RE  $\alpha$  y  $\beta$ , de esta forma el ligando es capaz de unirse a éstos, lo cual desencadenará eventos celulares, moleculares y mitóticos que se verán reflejados en un aumento del peso uterino (OECD, 2007).

El incremento de peso uterino es la culminación de una cascada de complejos eventos iniciada por la transcripción de genes, esta cascada se divide en dos fases: temprana (0-6 horas luego de la administración inicial) y una fase tardía (12-24 horas desde la administración inicial). En esta última se hacen evidentes eventos mitóticos

celulares necesarios para el crecimiento uterino, como la hiperplasia e hipertrofia celular. (Clark y Markaverich, 1983; Clark y Peck, 1979).

Los cambios histológicos inducidos por la presencia de actividad estrogénica corresponden a una notable y marcada degeneración vacuolar y epitelial con células del epitelio endometrial que se aprecian columnares y con marcada infiltración de polimorfonucleares en lámina propia y glándulas endometriales (OCDE, 2007).

En cuanto al efecto uterotrópico evaluado en nuestro estudio, sólo se encontraron diferencias significativas entre los grupos S y E. En donde se evidencia el aumento de peso uterino en relación al peso corporal, por el efecto de la administración de E. Al comparar los grupos AP y FE con el grupo control no se hallaron diferencias significativas en este parámetro (figura 11), lo cual concuerda con el estudio de Vozmediano en 2013 (administración oral, periodo subcrónico), en donde el grupo AP no tuvo efecto uterotrópico, no obstante se obtuvieron cambios histológicos cualitativos a los que se hará referencia más adelante.

Al evaluar la circunferencia de lumen uterino, también se obtuvo diferencias significativas sólo en el grupo E (figura 14). Lo que se explicaría por el hecho de que en este grupo hubo un aumento importante del peso uterino, debido a un incremento en la cantidad de fluido luminal, reflejándose en estos dos parámetros (Naguib y col, 2013). Sin embargo, en grosor epitelial uterino si hubo diferencias significativas en los grupos E y FE al compararlos con el grupo S, teniendo mayor significancia estadística el primero. Para el grupo AP no hubo resultados estadísticamente significativos, aunque tal como se evidencia en figura 15 si existe transición de células cuboidales a columnares, variando su longitud y pudiendo apreciarse cualitativamente la relación citoplasma:núcleo, lo que sería una evidencia temprana de infiltración de fluido o edema.

En relación al grosor endometrial, se evidencian diferencias significativas tanto en el grupo E como en los grupos AP y FE, siendo de menor significancia AP. Los grupos E y FE tienen la misma significancia, teniendo resultados de mayor magnitud el primero. Tanto este parámetro como el mencionado en el párrafo anterior, indicarían actividad estrogénica en los 3 grupos tal como se esperaba. En la figura 16 se aprecian los cambios en este estrato uterino, así como la génesis y desarrollo de procesos hiperplásicos e hipertróficos, siendo más evidentes en la imagen 16C.

En el grosor de miometrio uterino, hubo diferencias significativas para el grupo E, una vez más esto se explicaría por la baja potencia estrogénica de las sustancias evaluadas, que inducirían cambios histológicos como los ya mencionados, pero en este estrato no son evidentes.

El último parámetro evaluado en este tejido fue presencia de glándulas endometriales, en donde el análisis demuestra que hay significancia estadística para los grupos E, AP y FE, siendo menor en los últimos dos. La mayor cantidad de glándulas epiteliales se encuentran en los úteros de los animales tratados con E, al tener menor potencia AP y FE su aumento es menor, lo que coincide con los parámetros anteriores, cambios morfológicos resultado de una sustancia estrogénica. Que ocurran cambios en el número de glándulas endometriales y en el grosor del epitelio uterino pero sin un incremento significativo del peso uterino, se debería a que serían resultados de la activación de diferentes vías de transducción de señales. Algunas sustancias estimularían el crecimiento celular y su interacción con el receptor de estrógeno conduciría a un aumento del peso uterino, y mientras que otras interactuarían con otros subtipos del receptor de estrógeno que estimularían procesos de diferenciación celular (Jefferson y col, 2002), con lo cual se podría revertir en algún grado la atrofia uterina provocada por la ausencia de estradiol endógeno.

Además se evidencia que la acumulación de fluido en la cavidad uterina es menor en los grupos AP y FE, conclusión que se obtiene al analizar las variaciones entre peso uterino húmedo y seco. Esta menor acumulación de fluido en la cavidad uterina sería beneficioso, ya que en mujeres post-menopaúsicas estaría asociado a malignidad endometrial (Zalel y col, 1996) y estenosis cervical (Goldstein, 1997).

### **Efectos de la administración de AP y FE sobre vagina**

Como se explica detalladamente en la sección introductoria, el ciclo estral se caracteriza por cambios morfológicos tanto a nivel ovárico como a nivel uterino y vaginal. Se caracteriza principalmente por cuatro etapas: proestro, estro, metaestro y diestro. Tiene una duración promedio de 4 a 5 días, y se encuentra regulado por el eje hipotálamo- hipófisis- ovario. Una molécula con actividad estrogénica induciría la etapa estro, caracterizada por la presencia de células cornificadas (Goldman, 2007), lo cual se puede apreciar mediante la observación de la citología vaginal.

Los cambios que se registraron en el ciclo estral de los animales de experimentación se exponen en la figura 12 y 13. En la primera se aprecian imágenes de frotis vaginales representativos de cada grupo de estudio, en los que se identifica la presencia de células cornificadas en los grupos E, AP y FE. En el grupo E la densidad celular es mucho mayor a los otros dos grupos, y estas acumulaciones de células cornificadas se ven a lo largo de todo el frotis. En los grupos AP y FE también se hallaron células cornificadas esporádicas distribuidas homogéneamente en el frotis y sólo en algunos campos microscópicos.

La presencia de células cornificadas en la citología vaginal es resultado de la cornificación del epitelio vaginal en la etapa proestro y posterior descamación tanto del epitelio mucoide como cornificado en la etapa estro. Debido a la densidad celular hallada en los frotis vaginales, para efectos de registro y presentación de resultados en la figura 13 se registra la etapa e (pseudo-estro), que no alcanza la magnitud de una etapa estro pero que si manifiesta la presencia de células esporádicas mencionadas con anterioridad. La inducción y posterior mantención de la etapa estro en el grupo E fue durante los 3 días, a diferencia de los grupos AP y FE, que se visualizó en su gran mayoría entre los días 2 y 3.

Por otro lado el grosor del epitelio vaginal, fue estadísticamente significativos en los grupos E, AP y FE al compararlos con el grupo control. Los grupos AP y FE, tuvieron menor significancia estadística que el grupo E (figura 20). Estos resultados explicarían las diferencias encontradas en la citología vaginal. Y al asociar estos resultados junto a los resultados obtenidos en tejido uterino, se explicaría que las respuestas obtenidas reafirman la presencia de propiedades estrogénicas en AP y FE, pero la potencia de ésta es mucho menor al compararla con E. La diferencia en las respuestas proliferativas entre los epitelios uterinos glandulares y luminales, y del epitelio vaginal como resultado a la exposición a compuestos estrogénicos, se debería a un retraso en las respuestas mitóticas en el epitelio glandular (Finn y Martin, 1973). Milligan y col (2002) observaron un incremento del índice mitótico en tejido vaginal pero no en útero, que presentaría un perfil similar a los resultados obtenidos.

Tanto la cornificación, como la proliferación acompañada de acumulación de fluido en el epitelio vaginal, respuestas características a una sustancia estrogénica, podría ser de utilidad en la prevención de la sequedad vaginal experimentada por las mujeres

menopáusicas, la cual va acompañada de picazón, ardor y dolor, manifestaciones que generan molestias y afectan la calidad de vida de las mujeres.



- El aceite de palta y los fitoesteroles no tuvieron efectos anorexígenos significativos, ni tampoco en la variación del peso corporal debido al corto periodo de administración durante el estudio.
- En útero, el aceite de palta y los fitoesteroles indujeron efectos estrogénicos de baja potencia manifestados como cambios en: epitelio, endometrio y glándulas uterinas, lo que podría revertir la atrofia generada por la privación de estradiol endógeno.
- En vagina, se manifestaron cambios en la citología vaginal y en el grosor del epitelio. Debido a que el aceite de palta y los fitoesteroles indujeron cornificación y descamación del epitelio.
- Tanto el aceite de palta como los fitoesteroles exhiben un efecto estrogénico agudo en el modelo roedor de menopausia.

## **X.REFERENCIAS**

---

- Albala C., Vio F., Kain J. y col. 2003. Nutrition transition in Chile: determinants and consequences. *Public Health Nutr.* 5:123-128.
- Alvizouri M., Carranza J., Herrera J. y col. 1992. Effects of avocado as a source of monounsaturated fatty acids on plasma lipid levels. *Arch Med Res.* 23:163–167.
- Ambavade S., Misar A., Ambavade P. 2014. Pharmacological, nutritional, and analytical aspects of  $\beta$ -sitosterol: a review. *Orient Pharm Exp Med.*14:193-211
- Awad A., Garcia M., Fink, C. 1997. Effect of dietary phytosterols on rat tissue lipids. *Nutr Cancer.* 29:212–216.
- Awad A., Fink M. 2000. Phytosterols as anticancer dietary components: evidence and mechanism of action. *J Nutr.* 130:2127-2130.
- Bair Y., Gold E., Greendale G. 2002 Ethnic differences in use of complementary and alternative medicine at midlife: longitudinal results from SWAN participants. *Am J Public Health.* 92:1832–1835.
- Bair Y., Gold E., Azari R. 2005. Use of conventional and complementary health-care during the transition to menopause: longitudinal results from the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN). *Menopause.* 12:31–39.
- Bair Y., Gold E., Zhang G. 2008. Use of complementary and alternative medicine during the menopause transition: longitudinal results from the Study of Women's Health Across the Nation. *Menopause.* 15:32–43.
- Bean L., Lanov L., Foster T. 2014. Estrogen receptor, the hippocampus, and memory. *Neuroscientist.* 20:534-545.
- Bromberger J., Schott L., Kravitz H. y col. 2010. Longitudinal change in reproductive hormones and depressive symptoms across the menopausal transition: results from the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN). *Arch Gen Psychiatry.* 67:598–607.
- Butera P., Czaja J. 1984. Intracranial estradiol in ovariectomized guinea pigs: effects on ingestive behaviors and body weight. *Brain research.* 322:41–48.
- Butler L., Santoro N. 2011. The reproductive endocrinology of menopause. *National Institute of Health.* 76:627-635.
- Camilleri M. 2009. Peripheral mechanisms in the control of appetite and related experimental therapies in obesity. *Regul Pept.* 156:24-27.
- Carranza J., Herrera J., Alvarez M. y col. 1997. Effects of a vegetarian diet vs. a vegetarian diet enriched with avocado in hyper-cholesterolemic patients. *Arch Med Res.* 28:537–541.

- Castillo R. 2010 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.
- Cheskis B., Karathanasis S., Lyttle C. 1997. Estrogen receptor ligands modulate its interaction with DNA. *J Biol Chem.* 272:11384–11391.
- Ciocca D., Roig L. 1995. Estrogen receptors in human nontarget tissues: biological and clinical implications. *Endocrine Rev.* 16:35-62.
- Clark J., Markaverich B. 1983. The agonistic and antagonistic effects of short acting estrogens: A review. *Pharmac. Ther.* 21:429–453.
- Clark J., Peck E. 1979. Female Sex Steroids: Receptors and Function. *Monographs of Endocrinol.* 14:245.
- Colquhoun D., Moores D., Somerset S. y col. 1992. Comparison of the effects on lipoproteins and apolipoproteins of a diet high in monounsaturated fatty acids, enriched with avocado, and a high-carbohydrate diet. *Am J Clin Nutr.* 56:671–677.
- Covasa 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.* 278:166-170.
- Czaja J., Goldfoot D., Karavolas H. 1974. Comparative facilitation and inhibition of lordosis in the guinea pig with progesterone, 5-alpha-pregnane-3,2-dione, or 3-alpha-hydroxy-5-alpha-pregnan-20-one. *Hormones Behav.* 5:261–274.
- Dubuc P. 1985. Effects of estrogen on food intake, body weight, and temperature of male and female obese mice. *Proceed Soc Exper Biol Med Soc Exper Biol Med.* 180:468–473.
- Feder H. 1981. Estrous cyclicity in mammals. In: *Neuroendocrinology of Reproduction.* Adler NT. Ed. Plenum Press, New York. 279.
- Figuroa P., Siseles N., Chada E. y col. 2005. Posición Latinoamericana en Relación con el Estado Actual de la Terapia Hormonal. *Ginecol Obstet Mex.* 73: 205-211.
- Filicori M., Butler J., Crowley W. 1984. Evidence for pulsatile progesterone secretion. Neuroendocrine regulation of the corpus luteum in the human. *J Clin Invest.* 6:1638–1647.
- Finn C., Martin L. 1973. Endocrine control of gland proliferation in the mouse uterus, *Biol Reprod.* 8:585–588.
- Freeman M. 1994. The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat. En: *The Physiology of Reproduction,* Knobil E., Neill J., Ed. Raven Press, New York. 613-658.
- Gill S., Lavoie H., Bo-Abbas Y. A. 2002. Negative feedback effects of gonadal steroids are preserved with aging in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 87:2297–2302.

Gill S., Sharpless J., Rado K. **B.** 2002. Evidence that GnRH decreases with gonadal steroid feedback but increases with age in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 87:2290–2296.

Gold E., Colvin A., Avis N. y col. 2006. Longitudinal analysis of the association between vasomotor symptoms and race/ethnicity across the menopausal transition: study of women's health across the nation. *Am J Public Health.* 96:1226–1235.

Gold E., Bair Y., Zhang G. 2007. Cross-sectional analysis of specific complementary and alternative medicine (CAM) use by racial/ethnic group and menopausal status: the Study of Women's Health Across the Nation (SWAN). *Menopause.* 14:612–623.

Goldman J., Murr A., Cooper R. 2007. The rodent estrous cycle: characterization of vaginal cytology and its utility in toxicological studies. *Birth Defects Res B Dev Reprod Toxicol.* 80:84-97.

Goldstein S. 1997. The presence of endometrial fluid in asymptomatic postmenopausal women is associated with clinically relevant cervical stenosis. *J Ultrasound Med.* 16:208.

Grandien K., Berkenstam A., Gustafsson J. 1997. The estrogen receptor gene: promoter, organization and expression. *Int J Biochem Cell Biol.* 29: 1343–1369.

Gutiérrez A., Urrutia M., Cabieses B. 2006. Climaterio y menopausia: aspectos educativos a considerar según la etapa del periodo. *Cienc Enferm.* 12:19-27.

Guyton A., Hall J. 2011. Fisiología femenina antes de la gestación y hormonas femeninas. *Tratado de Fisiología Médica.* 12° ed. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México 81: 987-991.

Hall J., Schoenfeld D., Martin K. 1992. Hypothalamic gonadotropin-releasing hormone secretion and follicle-stimulating hormone dynamics during the lutealfollicular transition. *J Clin Endocrinol Metab.* 74:600–607.

Hall J., McDonnell D. 1999. The estrogen receptor  $\beta$ -isoform (ER $\beta$ ) of the human estrogen receptor modulates ER $\alpha$  transcriptional activity and is a key regulator of the cellular response to estrogens and antiestrogens. *Endocrinology.* 140:5566-5578.

Hall J. 2004. Neuroendocrine physiology of the early and late menopause. *Endocrinol Metab Clin N Am.* 33:637-659.

Hall J. 2013. Neuroendocrine control of the menstrual cycle. In: Strauss JF, Barbieri RL, editors. *Yen and Jaffe's reproductive endocrinology.* 7th edition. Philadelphia: Elsevier Publishing. 141–156.

Hall J. 2015. Endocrinology of the menopause. *Endocrinol Metab Clin N Am.* 44:485-496.

Heinemann T., Axtman G., von Bergmann K. 1993. Comparison of intestinal absorption of cholesterol with different plant sterols in man. *Eur J Clin Invest.* 23:827–831.

Heinemann T., Kullak-Ublick G., Pietruck B. y col. 1991. Mechanisms of action of plant sterols on inhibition of cholesterol absorption. Comparison of sitosterol and sitostanol. *Eur J Clin Pharmacol.* 40:59–63.

Heldring N., Pike A., Andersson S. y col. 2007. Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. *Physiol Rev.* 87:905–931.

Hellström P., Grybäck P., Jacobsson H. 2006. The physiology of gastric emptying. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 20:397-407.

Hu F. 2003. Plant-based foods and prevention of cardiovascular disease: an overview. *Am J Clin Nutr.* 78:544–551.

Hubscher C., Brooks D., Johnson J. 2005. A quantitative method for assessing stages of the rat estrous cycle. *Biotechnic and Histochemistry.* 80:79-87.

INE, Instituto Nacional de estadísticas. Censo 2002. Disponible en <http://www.ine.cl/cd2002/index.php>. (última visita: 17 de diciembre 2015).

Jefferson W., Doerge D., Padilla-Banks E. y col. 2009. Oral exposure to genistin, the glycosylated form of genistein, during neonatal life adversely affects the female reproductive system. *Environ Health Perspect.* 117:1883–1889.

Johnson W., Corrigan S., Lemmon C. y col. 1994. Energy regulation over the menstrual cycle. *Physiol Behav.* 56:523–527.

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

Lee K., Kraus W. 2001. Nuclear receptors, coactivators and chromatin, new approaches, new insights. *Trends Endocrinol Metab.* 12:191–197.

León J., 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. y col. 2008. The laboratory rat as an animal model for osteoporosis research. *Comparative Med.* 58: 424 - 430.

Lohmiller J., Swing S. 2006. Reproduction and breeding. In: Suckow MA, Weisbroth SH, Franklin CL (Ed.). *The Laboratory Rat.* 2° ed. New York, NY: Academic Press. 147-162.

Long J., Evans H. 1922. The oestrous cycle in the rat and its associated phenomena. *Men Univ Calif.* 6:1-148.

Loose D., Stancel G. 2006. Estrógenos y progestágenos. En: Goodman y Gilman (eds): *Las bases farmacológicas de la terapéutica.* 11° ed. Editorial McGraw-Hill Interamericana. México DF. 57:1541-1572.

- Lottenberg A. 2002. Eficiência dos ésteres de fitoesteróis alimentares na redução dos lípidos plasmáticos em hipercolesterolêmicos moderados. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*. 79:139-142.
- Mallini T., Vanithakumari G. 1992. Comparative study of  $\beta$ -sitosterol, stradiol and progesterone on selected biochemical parameters of the uterus of ovariectomized rats. *J Ethnopharmacol*. 36:51-55.
- Malini T., Vanithakumari G. 1990. Rat toxicity studies with  $\beta$ -sitosterol. *J of Ethnopharmacol*. 28:221-234.
- Mellanen P., Petanen T., Lehtimaki J. y col. 1996. Wood-derived estrogens: studies *in vitro* with breast cancer cell lines and *in vivo* in trout. *Toxicol Appl Pharmacol*. 136:381–388.
- Milligan S., Kalita J., Pocock V. y col. 2002. Oestrogenic activity of the hop phyto-oestrogen, 8-prenylnaringenin. *Reproduction*. 123:235–242.
- Million Women Study Collaborators. 2003. Breast cancer and hormone replacement therapy in the Million Women Study. *Lancet*. 362:419-427.
- Miquel J., Ramírez A., Ramírez J. y col. 2006. Menopause: a review on the role of oxygen stress and favorable effects of dietary antioxidants. *Arch Gerontol Geriatr*. 42: 289–306.
- Moghadasian M. 2000. Pharmacological properties of plant sterols *in vivo* and *in vitro* observations. *Life Sci*. 67:605–615.
- Montes G., Luque E. 1988. Effects of ovarian steroids on vaginal smears in the rat. *Acta Anat*. 133:192-199.
- Moreau R., Singh V., Hicks K., 2001. Comparison of oil and phytosterol levels in germplasm accessions of corn, teosinte, and Job's tears. *J Agric Food Chem*. 49:3793–3795.
- Musatov S., Chen W., Pfaff D. y col. 2007. Silencing of estrogen receptor alpha in the ventromedial nucleus of hypothalamus leads to metabolic syndrome. *Proceed Nat Acad Sci*. 104:2501–2506.
- Nadal A. 2000. Nongenomic actions of estrogens and xenoestrogens by binding at a plasma membrane receptor unrelated to estrogen receptor  $\alpha$  and estrogen receptor  $\beta$ . *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97:11603–11608.
- Naguib S., Mohd H., Kasim F., y col. 2013. Isoflavone genistein induces fluid secretion and morphological changes in the uteri of pos-pubertal rats. *Int J Med Sci*. 10:665-675.
- Nakari T., Erkomaa K. 2003. Effects of phytosterols on zebrafish reproduction in multigeneration test. *Environ Pollut*. 123:267–273.
- Nayak B., Raju S., Chalapathi R. 2008. Wound healing activity of *Persea Americana* (avocado) fruit: a preclinical study on rats. *J Wound Care*. 17:123–126.

- Nieminen P., Mustonen A., Lindstrom-Seppa P. y col. 2003. Phytosterols affect endocrinology and metabolism of the field vole (*Microtus agrestis*). *Exp Biol Med.* 228:188–193.
- Palmer K., Gray J. 1986. Central vs. peripheral effects of estrogen on food intake and lipoprotein lipase activity in ovariectomized rats. *Physiol Behav.* 37:187–189.
- Peltoketo, H., Vihko, P., Vihko, R. 1999. Regulation of estrogen action: role of 17  $\beta$  - hydroxysteroid dehydrogenases. *Vitam Horm.* 55:353–398.
- 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.
- Orrego R., McMaster M., Van Der Kraak G. y col. 2010. Effects of pulp and paper mill effluent extractives on aromatase CYP19a gene expression and sex steroid levels in juvenile triploid rainbow trout. *Aquatic Toxicology.* 97:453-360.
- Ostlund R. 2002. Phytosterols in human nutrition. *Annu Rev Nutr.* 22:533-549.
- Peltoketo H., Vihko P., Vihko R. 1999. Regulation of estrogen action: role of 17  $\beta$  - hydroxysteroid dehydrogenases. *Vitam Horm.* 55:353–398.
- Revankar C. 2005. A transmembrane intracellular estrogen receptor mediates rapid cell signaling. *Science.* 307:1625–1630.
- Roepke T., Bosch M., Rick E. y col. 2010. Contribution of a membrane estrogen receptor to the estrogenic regulation of body temperature and energy homeostasis. *Endocrinol.* 151:4926–4937
- Rosenblum E., Stauber R., Van Thiel D. y col. 1993. Assessment of the estrogenic activity of phytoestrogens isolated from bourbon and beer. *Alcohol Clin Exp Res.* 17:1207–1209.
- Rosenfeld M., Glass C. 2001. Coregulator codes of transcriptional regulation by nuclear receptors. *J Biol Chem.* 276:36865–36868.
- Salgado J., Bin C., Mansi D., Souza A. 2008. Efeito do abacate (*Persea americana Mill*) variedade Hass na lipidemia de ratos hipercolesterolemicos. *Cienc Tecnol Aliment.* 28:922-928.
- Sampaio A., Leonel S. 2008. Abacate: aspectos técnicos da producao. Universidade Estadual Paulista. Cultura Academica Editora. Sao Paulo. 37-64.

- Sanders D., Minter H., Howes D., y col. 2000. The safety evaluation of phytosterol esters. Part 6. The comparative absorption and tissue distribution of phytosterols in the rat. *Food Chem Toxicol.* 38:485–491.
- Schairer C., Lubin J., Troisi R. y col. 2004. Estrogen progestin replacement and risk of breast cancer. *JAMA.* 284:691-694.
- Sharpless J., Supko J., Martin K. 1999. Disappearance of endogenous luteinizing hormone is prolonged in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 84:688–694.
- Shaw N., Histed S., Srouji S. 2010. Estrogen negative feedback on gonadotropin secretion: evidence for a direct pituitary effect in women. *J Clin Endocrinol Metab.* 95:1955–1961.
- Simpson E., Clyne C., Rubin G. 2002. Aromatase-A brief overview. *Annu Rev Physiol.* 64:93–127.
- Simpson E. 2003. Sources of estrogen and their importance. *J Steroid Bio- chem Mol Biol.* 86:225–230.
- Soules M., Steiner R., Clifton D. 1984. Progesterone modulation of pulsatile luteinizing hormone secretion in normal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 58:378–383.
- Soules M., Sherman S., Parrott E. 2001. Executive summary: Stages of reproductive Aging Workshop (STRAW). *Fertil Steril.* 76: 874-878.
- Sugano M., Morioka H., Kida Y. y col. 1978. The distribution of dietary plant sterols in serum lipoproteins and liver subcellular fractions of rats. *Lipids.* 13:427–432.
- Tango J., Carvalho C., Soares N. 2004. Caracterização física e química de frutos de abacate visando a seu potencial para extração de óleo. *Rev Bras Frutic.* 26:17–23.
- USDA (U.S. Department of Agriculture). 2011. Avocado, almond, pistachio and walnut Composition. Nutrient Data Laboratory. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 24. U.S. Department of Agriculture. Washington, DC.
- Vozmediano A. 2013. Evaluación de efecto subcrónico de 28 días de aceite de palta en un modelo roedor de menopausia. Internado para optar al título profesional Químico Farmacéutico. Universidad de Valparaíso.
- Vuoristo M., Miettinen T. 1994. Absorption, metabolism, and serum concentrations of cholesterol in vegetarians: effects of cholesterol feeding. *Am J Clin Nutr.* 59:1325–1331.
- Welt C., Martin K, Taylor A. 1997. Frequency modulation of follicle-stimulating hormone (FSH) during the luteal-follicular transition: evidence for FSH control of inhibin B in normal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 82:2645–2652.
- Westwood R. 2008. The female rat reproductive cycle: a practical histological guide to staging. *Toxicologic Pathology.* 36:375-384.

Wide L., Eriksson K., Sluss P. 2009. Serum half-life of pituitary gonadotropins is decreased by sulfonation and increased by sialylation in women. *J Clin Endocrinol Metab.* 94:958–964.

World Health Organizatin. 1996. Research on the menopause in the 1990s. Technical Report Series 866.

Zaid S., Sulaiman S., Sirajudeen K. y col. 2010. The effects of tualang honey on female reproductive organs, tibia bone and hormonal profile in ovariectomised rats - animal model for menopause. *BMC Complement Alternat Med.* 82:1–7.

Zalel Y., Tepper R., Cohen I., y col. 1996. Clinical significance of endometrial fluid collections in asymptomatic postmenopausal women. *J Ultrasound Med.* 15:513-155.

