



FACULTAD DE FARMACIA
ESCUELA DE NUTRICIÓN Y DIETÉTICA

**EFFECTO DE FITOESTEROLES SOBRE LA DESCALCIFICACIÓN OSEA EN
UN MODELO ROEDOR DE MENOPAUSIA**

**Tesis para optar al Grado Académico de Licenciado en Nutrición y
Dietética y al Título de Nutricionista**

**ELIO MAIKO MONTIEL MONTIEL
DANIELA MÓNICA PINTO CAMILO**

Director de Tesis: María Fernanda Cavieres Fernández, PhD

Co-director de Tesis: Alejandra Soledad Vozmediano Arriagada, MCs

2017

Agradecimientos

Primeramente, queremos agradecer a nuestra directora de tesis, María Fernanda Cavieres por darnos la oportunidad de ser parte del laboratorio de Toxicología y confiar en nuestro trabajo y darnos el ánimo y paciencia cuando las situaciones se veían adversas.

Queremos agradecer a nuestra codirectora de tesis Alejandra Vozmediano, por la comprensión, por la ayuda y por las decenas de fin de semana que tuvo que apoyarnos en nuestra tesis.

A Juan Luis Urrea por entregarnos conocimientos y ayudarnos a rescatar nuestra tesis. A Camilo Fuentes por el apoyo incondicional, sin necesidad de pedírselo, siempre estuvo aportando con nosotros.

A nuestras compañeras de laboratorio: María José Olivares, Dennis Olivares y Antonia Cavieres por estar presentes en nuestro proceso y queremos dedicarles ánimo y valor para sus proyectos.

A la Farmacopea Chilena, por facilitar sus espacios para el desarrollo de nuestra tesis, especialmente a don Desiderio y Daniela, por la buena onda entregada cada vez que íbamos a trabajar los “mojoncitos”.

Por parte mía, Daniela, quiero agradecer a mi madre Luisa, hermana Paula y sobrino Pablo por apoyarme en todos estos años, por los buenos momentos que hemos tenido y que seguirán y por cada consejo que me dieron. También quiero agradecer a mis amigos que aun mantengo su amistad, a mis amigas del colegio y a mis amigos de universidad que hicieron de cada momento uno mejor e inolvidable.

De la misma forma, yo Elio Montiel, quiero agradecer a mi madre Valery y mi a toda familia por el apoyo brindado en estos años de estudio, por cosas cotidianas como un rico almuerzo, un paseo, una palabra de aliento, que hicieron mi trabajo más alegre. También quiero agradecer a Lucas por la enorme paciencia que me ha tenido estos últimos meses y por estar ahí en mis momentos más angustiantes. Los quiero mucho.

Finalmente, queremos agradecer a nuestro grupo de amigos por toda la paciencia y apoyo eterno que nos dieron, por ausentarnos en carretes y actividades por tener que ir los fines de semana a la U, o por tener que estar lúcidos para el otro día: Seba Paredes, Seba Harris, Raúl, Pipe Matías, Pipe Josué, Juan Diego, Catalina, Pablo.

¡Muchas gracias!

ÍNDICE

Agradecimientos	2
RESUMEN.....	5
ABSTRACT	7
I. MARCO TEÓRICO	9
Menopausia	10
Modelo roedor de menopausia	12
Ciclo estral	14
Eje hipotálamo-hipófisis-ovario.....	15
Estrógenos	16
Respuesta estrogénica	17
Masa ósea.....	18
Tejido óseo	20
Osteopenia y osteoporosis.....	21
Fitoestrógenos	22
Fitoesteroles	23
Antecedentes de investigación	26
II. HIPÓTESIS	28
III. OBJETIVOS	30
Objetivo general	31
Objetivos específicos	31
IV. METODOLOGÍA	32
Condiciones generales.....	33
Animales de experimentación	33
Modelo de menopausia.....	33
Grupos de tratamiento	34
Preparación de alimento	35
Seguimiento de animales de experimentación durante el tratamiento y recolección de muestras	35
Control de calidad interno	36

Histología	36
Análisis morfométrico.....	37
Análisis estadístico.....	37
V. RESULTADOS	38
Seguimiento de animales de experimentación durante el tratamiento	39
Consumo de agua y alimento	39
Variación de peso corporal.....	40
Evaluación de estrogenicidad del aceite de palta y fitoesteroles.....	42
Efecto uterotrópico.....	42
Ciclo estral	43
Histología de vagina y útero.....	45
Morfometría ósea	47
VI. DISCUSIÓN	49
Efecto de la administración de aceite de palta y fitoesterol sobre el consumo de agua y alimento	50
Efecto de la administración de aceite de palta y fitoesterol sobre el peso corporal	51
Efecto de la administración de aceite de palta y fitoesterol sobre el hueso.....	52
Efecto estrogénico de la administración de fitoesteroles	53
Hipercolesterolemia y resorción ósea	54
Nutrición: aceite de palta, fitoesteroles y la salud ósea	56
VII. CONCLUSIONES	57
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	59
IX. ANEXOS	71

RESUMEN

La menopausia corresponde a un hecho fisiológico inevitable que manifiesta el cese definitivo de la actividad ovárica con disminución de los niveles hormonales de estrógeno. Como consecuencia, se ven afectados principalmente y progresivamente los sistemas reproductivo, cardiovascular y óseo, ocurriendo en este último un incremento en la remodelación ósea y pérdida de masa ósea que podría desencadenar una osteopenia u osteoporosis. En estudios previos en el Laboratorio de Toxicología de la Universidad de Valparaíso se evidenció la estrogenicidad del aceite de palta y fitoesteroles en vagina y útero de un modelo roedor de menopausia. Dado que el estado óseo se deteriora durante la menopausia, en esta tesis se planteó evaluar si el efecto estrogénico del aceite de palta y de los fitoesteroles ayuda a preservar la masa ósea en el modelo roedor de menopausia. Con este fin, se utilizaron 24 hembras ovariectomizadas de la cepa Sprague-Dawley divididas en los siguientes 4 grupos de tratamiento: solución salina (control negativo), estradiol (control positivo), aceite de palta y fitoesteroles. Los tratamientos fueron administrados durante 35 días. Se realizaron diversas observaciones incluyendo consumo de alimento y agua y peso corporal durante el tratamiento. Al término del período de administración, los animales fueron eutanizados para las observaciones histológicas de útero, ovario y hueso. En cuanto al consumo de alimento, se observó efecto anorexígeno en los animales tratados con estradiol y aceite de palta. Por otro lado, se observó cornificación y aumento de grosor del epitelio vaginal en los grupos estradiol, aceite de palta y fitoesteroles, aunque solo el grupo estradiol demostró efecto uterotrópico estadísticamente significativo. Finalmente, se observó un aumento del espesor cortical de la tibia en los grupos estradiol y aceite de palta, pero no en fitoesteroles. En conclusión, el aceite de palta demostró tener efectos estrogénicos demostrables en un modelo roedor de menopausia.

ABSTRACT

Menopause is an inevitable physiological event brought about by a decrease in the level of estrogen after the cessation of ovarian activity. As a consequence, the reproductive, cardiovascular and osseous systems are progressively affected. In the latter, there is an increase in bone remodeling and loss of bone mass which could trigger osteopenia or osteoporosis. Previous studies in the Laboratory of Toxicology of the University of Valparaíso showed that avocado oil has estrogenic properties on vagina and uterus of a rodent menopause model. Since bone health declines during menopause, in this thesis we studied if the estrogenic properties of avocado oil and phytosterols help preserve bone health in the rodent model of menopause. In order to do this, twenty-four ovariectomized Sprague-Dawley females were divided into 4 treatment groups: saline solution (negative control), estradiol (positive control), avocado oil and phytosterols. Observations included water and food consumption and body weight during treatment. At the end of administration, all animals were euthanized for histology of uterus, ovaries and bone. As for food consumption, animals treated with estradiol and avocado oil showed anorexigenic effect. On the other hand, cornification and increased thickness of the vaginal and uterine epithelium were observed after avocado oil and and phytosterols. However, only estradiol induced a statistically significant uterotrophic effect. Finally, an increase in cortical thickness of the tibia was seen in both the estradiol and in the avocado oil group. In conclusion, avocado oil was shown to have estrogenic effects in a rodent model of menopause.

I.

MARCO TEÓRICO

Menopausia

La menopausia corresponde a un hecho fisiológico inevitable que manifiesta el cese definitivo de la actividad ovárica con disminución de los niveles de estrógeno y que por consecuencia da término a la etapa fértil de la mujer. La menopausia suele aparecer después de los 40, con un promedio de edad de 51 años en la población mundial (Baffet y col., 2015). En Chile, se estima una población de mujeres de 45 años o más de alrededor de 3 millones, aproximadamente un 17,2 % de la población total, la cual estaría dentro del rango de la etapa menopáusica (INE, 2012).

El periodo del climaterio (**Figura 1**) es un proceso natural en la vida de la mujer que comienza con el inicio del envejecimiento ovárico y culmina en la senectud. La premenopausia engloba todos los fenómenos que ocurren entre 3 a 5 años antes de la menopausia mientras que la perimenopausia es un periodo justo antes de la menopausia y hasta 1 o 2 años después. La premenopausia consta de un periodo de irregularidades en las menstruaciones y es un periodo que está condicionado por la disminución de la producción de estrógenos en los folículos ováricos. En esta etapa, se presentan los primeros síntomas menopáusicos y vasomotores, como sofocos e hipersudoraciones. La menopausia se confirma en el momento en que se cumplen 12 meses sin menstruación. Al continuar este descenso hormonal, la mujer entra en la etapa posmenopáusica que comprende todos los años siguientes hasta el término de la vida (Ambrojo, 2012)

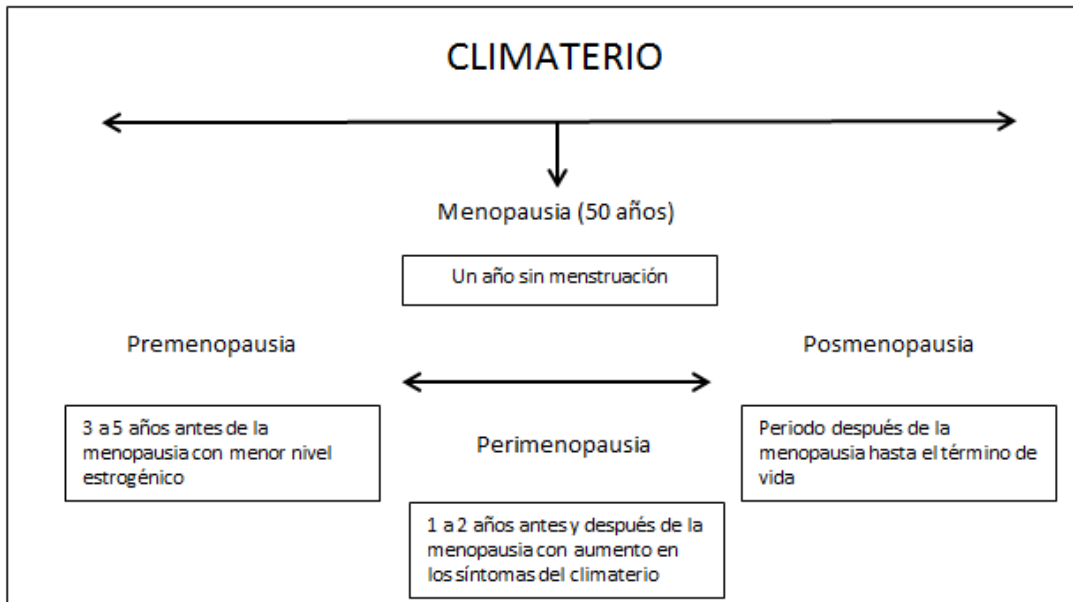


Figura 1. Etapas del climaterio (modificado de Ambrojo, 2012).

Como consecuencia de la menopausia se ven afectados progresivamente los sistemas reproductivo, cardiovascular y óseo, principalmente. Dentro de estos cambios se incluyen las siguientes manifestaciones clínicas: la sequedad de las mucosas urogenitales, que conlleva una alteración en la sexualidad de las mujeres; a nivel metabólico se reflejará una menor respuesta a la tolerancia a la glucosa y cambios negativos en el perfil lipídico, aumentando el riesgo cardiovascular; y un incremento en la resorción ósea y pérdida de masa ósea que podría desencadenar una osteopenia u osteoporosis (Baffet y col, 2015).

Para abordar el manejo de los cambios clínicos y sintomatológicos, es de elección la terapia de reemplazo hormonal (TRH) (MINSAL, 2014). El manejo del climaterio y menopausia con TRH ha sido cuestionado luego de la publicación del estudio *Women's Health Initiative* en el que se demostraba que la administración conjunta de estrógenos y progestágenos aumentaba el riesgo de enfermedades coronarias y cáncer mamario (Rossouw y col., 2002). La publicación de este estudio levantó una señal de alarma tanto para médicos como para

pacientes quienes rechazaron el uso de la TRH. Es por tanto, importante la masificación de la TRH, así como la indagación de nuevas alternativas complementarias a este tratamiento, tales como compuestos naturales que se administren como nutracéuticos o directamente a través de los alimentos (Thakur y col, 2016).

Modelo roedor de menopausia

El estudio de la menopausia en humanos está condicionado a las variaciones heterogéneas de muchos factores, tales como la edad, la paridad, la dieta, el nivel socioeconómico, las exposiciones ambientales y genéticas. Esta amplia versatilidad puede hacer compleja la tarea de dividir los factores específicos asociados con el envejecimiento y la menopausia. La evaluación de los efectos de hormonas gonadales en distintos sistemas corporales en modelos animales es favorable dado que proporciona una población más homogénea para estudiar en el laboratorio en comparación con los humanos. Existen modelos animales con características fisiológicas similares a las humanas, entre ellos los primates no humanos y roedores. Estos últimos, en particular ratas y ratones, son particularmente útiles debido a que sus procesos de envejecimiento han sido bien estudiados y que también tienen una vida útil de 2 a 3 años, lo que facilita su uso como modelos biológicos (Koebele, 2016).

De manera similar a las mujeres, los roedores experimentan ciclos regulares reproductivos en la edad adulta, así como la desregulación relacionada con la edad de este ciclo y el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal (HHG), cambios ováricos y las fluctuaciones de hormonas gonadales. Existen tres tipos de modelos roedores de menopausia: hembras ovario-intactas, ovariectomizadas (OVX) y aquellas en las que se induce disfunción ovárica con 4-vinilciclohexeno diepóxido (**Figura 2**). Estos modelos conforman la base para realizar

ensayos pre-clínicos que ayuden a la comprensión de cambios que se producen con las perturbaciones y alteraciones del sistema reproductor.

La ovariectomización es el procedimiento estándar más exacto para modelar la menopausia humana, ya que al eliminar completamente la producción de estrógenos en los folículos ováricos se excluye la influencia de las hormonas gonadales del animal. Consiste en la extirpación quirúrgica de ambos ovarios y oviductos (correspondientes a trompas de Falopio en mujeres). La completa recuperación del animal OVX se alcanza en alrededor de una semana luego de la cual el modelo roedor queda propicio para evaluar los efectos de la privación de hormonas gonadales y también para realizar ensayos de administración exógena de 17- β -estradiol, progesterona o algún modulador estrogénico, o incluso una combinación de estos. (Koebele, 2016).

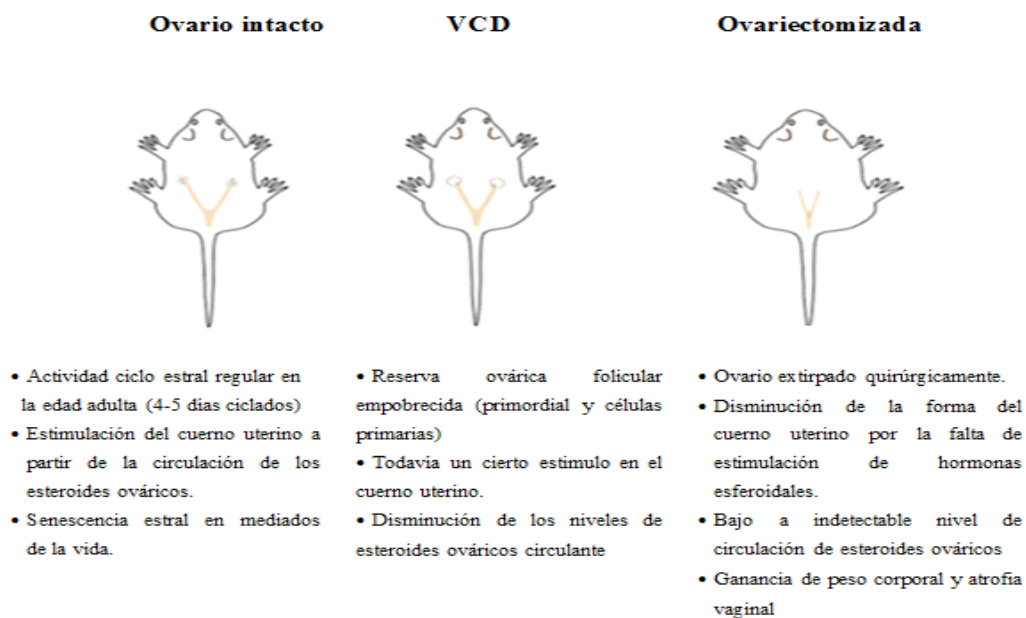


Figura 2: modelos roedores de menopausia (Modificado de Koebele, 2016).

Ciclo estral

El ciclo estral de los roedores es el equivalente al ciclo menstrual en primates, diferenciándose entre ellos en que el primero tiene una duración de aproximadamente 4 a 5 días. Consiste en cuatro fases: proestro, estro, metaestro y diestro, las que se pueden determinar por un seguimiento diario de los tipos de células que aparecen en el frotis vaginal observados bajo microscopio:

-Proestro: se caracteriza por el predominio de células epiteliales nucleadas. Estas células son evidentemente circulares con núcleo visible y aparecen en racimos a la altura del proestro. De vez en cuando pueden aparecer algunas células epiteliales escamosas.

-Estro: En el día siguiente, el estro, la célula dominante es el epitelio escamoso estratificado queratinizado. Esta célula no tiene núcleo observable y contiene un citoplasma altamente granular y de forma irregular. Éstas también aparecen en grandes grupos o racimos.

-Metaestro (Diestro I): Existe aparición de células leucocitarias con restos de células nucleadas y cornificadas. Los leucocitos son pequeñas, con citoplasma granular y, si se examina con una lupa más alto, por lo general contienen un núcleo vesicular.

-Diestro (Diestro II): el tipo de célula predominante es el de leucocitos y escasas cantidades de células epiteliales nucleadas y cornificadas.

En relación a la duración de 5 días del ciclo, puede aparecer como un día adicional de cornificación (estro) o un día adicional de la infiltración de leucocitos (diestro) (Knobil y Neill's, 2015).

Eje hipotálamo-hipófisis-ovario

El hipotálamo, la hipófisis y el ovario constituyen un eje neuroendocrino que controla el ciclo menstrual de la mujer (**Figura 3**). El hipotálamo sintetiza la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), la que a su vez estimula a la hipófisis, donde promueve la secreción de la hormona folículo estimulante (FSH) y de la hormona luteinizante (LH), las que actúan sobre receptores específicos del ovario y producen estradiol y progesterona. Los estrógenos producidos por el ovario son capaces de regular este eje de manera negativa ya que, en caso de generarse un aumento de estradiol, éste tiene un efecto inhibitorio de la secreción tanto de la GnRH a nivel hipotalámico como de FSH y LH a nivel hipofisario, provocando un feedback negativo, regulando los niveles de estradiol (Tresguerres y Castillo, 2010).

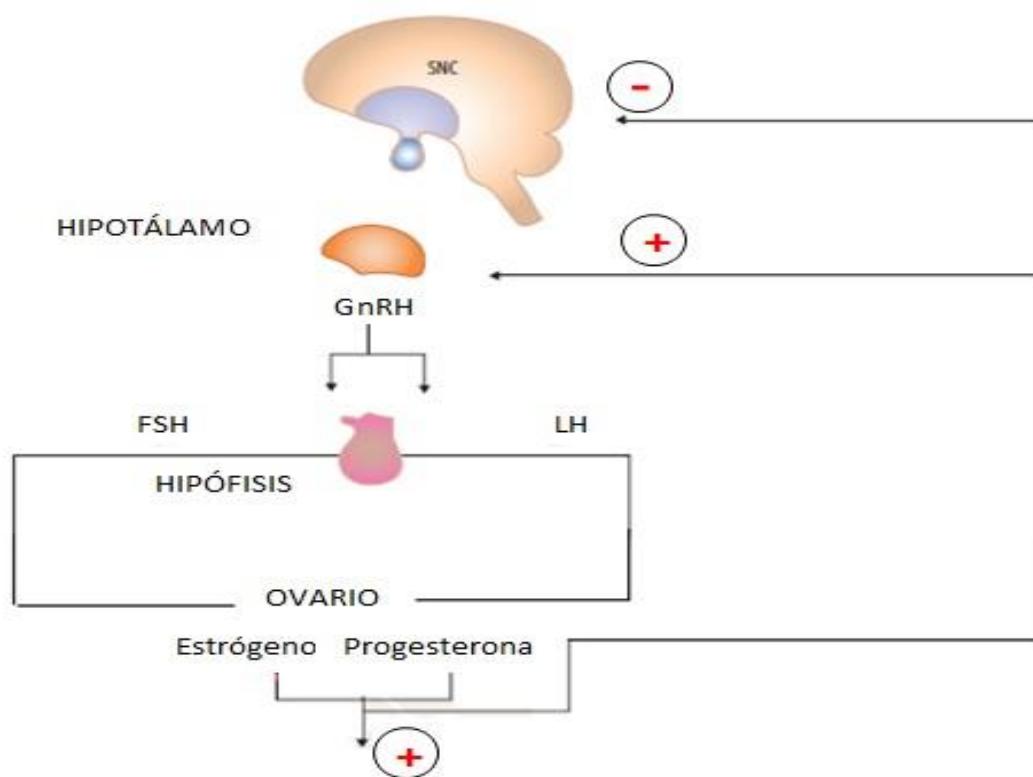


Figura 3. Eje hipotálamo-hipófisis-ovario (Modificado de Tresguerres y Castillo, 2010).

Estrógenos

Los estrógenos son compuestos de 18 átomos de carbono con presencia de un anillo A aromatizado con un grupo hidroxilo en el carbono 3 y un grupo hidroxilo adicional o cetónico (**Figura 4**). El estrógeno más potente secretado por el ovario es el 17- β -estradiol, aunque también se secretan la estrona que procede del tejido periférico y el estriol, que es el estrógeno más importante en la orina y resulta del metabolismo de la estrona y del estradiol (Tresguerres y Castillo, 2010).

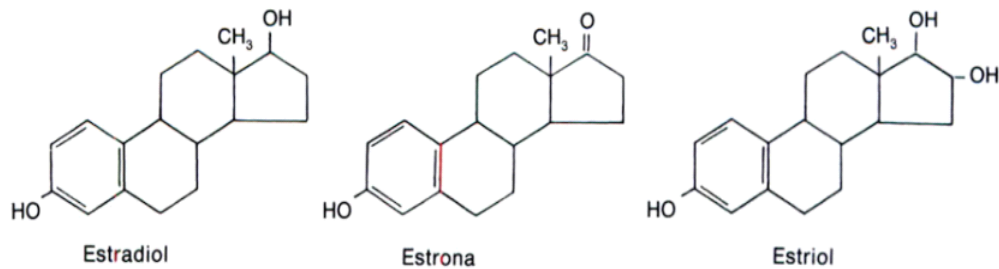


Figura 4. Estructura de estrógenos endógenos

Los estrógenos son los que ocasionan los cambios puberales en niñas y la aparición de características sexuales secundarias. Estimulan el crecimiento y el desarrollo de la vagina, el útero y las trompas de Falopio y contribuyen al aumento de mamas. Por otro lado, actúan sobre el metabolismo de lípidos, aumentando los niveles de HDL y reduciendo levemente los niveles séricos de colesterol total. Pueden también contribuir a la formación del esqueleto y al crecimiento puberal que se observa en huesos largos y el cierre de epífisis gracias a su efecto principal de disminuir el número y la actividad de los osteoclastos, favoreciendo la remodelación ósea (Lawrence, 2003).

La reducción de estrógenos durante la menopausia y postmenopausia es gradual e incluso en algunas mujeres se mantienen niveles aceptables de estrona aunque no así de estradiol.

La estrona se produce principalmente en las glándulas suprarrenales y su conversión se realiza en tejido muscular y adiposo. Por esta razón resulta ser una hormona importante en función de la edad y porcentaje de grasa corporal (Botella, 1995).

Al progresar la disminución de estrógenos en el tiempo se alteran varios metabolismos, incluido el óseo, generando un deterioro progresivo en la microestructura del hueso, conduciendo a un aumento de riesgo de fractura y en algunos casos a una osteoporosis. El déficit estrogénico induce una disminución en la actividad osteoblástica (Calderón, 2005).

El estradiol ejerce estos efectos conductuales y fisiológicos uniéndose a dos tipos de receptores de estrógeno ($RE\alpha$ y $RE\beta$). Ambos receptores se expresan ampliamente en los órganos periféricos y en el cerebro. La unión del ligando al receptor de estrógeno conduce a cambios conformacionales que regulan la actividad del receptor, y su interacción con otras proteínas y ADN (Diez-Pérez, 2006).

Respuesta estrogénica

La señalización dependiente de estrógeno puede dividirse en genómica y no genómica, se basa en el resultado de eventos celulares, por ejemplo, modulación de la expresión génica o activación de cascadas de señalización, respectivamente (Heldring, 2007).

La vía de señalización genómica se considera como el mecanismo tradicional de señalización de estrógeno. La unión de 17- β -estradiol a $RE\alpha$ o $RE\beta$ en el citoplasma de células diana provoca cambios conformacionales que permiten la dimerización del receptor la translocación al núcleo y la unión a los elementos de respuesta a estrógenos situados en o cerca de los promotores de genes diana. La unión del ligando al receptor también desencadena el reclutamiento de una variedad de correguladores en un complejo que altera

la estructura de la cromatina y facilita el reclutamiento de la maquinaria de transcripción de ARN polimerasa II. De esta manera, el complejo estrógeno-RE actúa como un activador transcripcional que promueve la expresión génica (Vrtacnik, 2014).

Las acciones no genómicas son comunes a las hormonas esteroides y suelen asociarse con la activación de diversas cascadas de proteína-quinasa que eventualmente pueden conducir a cambios indirectos en la expresión génica debido a la fosforilación de factores de transcripción. La señalización de estrógenos no genómica está más frecuentemente asociada con un subconjunto de RE unida a membrana (Heldring, 2007).

Se ha evidenciado una respuesta temprana en el transcurso de minutos después de la exposición del ligando con su respectivo receptor. En el caso del útero, se produce una migración de eosinófilos que provoca un edema, aumento de la permeabilidad vascular y liberación de histaminas. Este tipo de respuesta es de tipo no genómica. Y por otro lado hay una respuesta estrogénica tardía que corresponde a aquellas respuestas que abarcan desde las primeras horas hasta los siguientes días de la exposición al ligando (Tchernitchin, 1982). En el útero corresponden a mitosis e hipertrofia del órgano, que además de las respuestas anteriores provocan un aumento en el peso uterino, haciéndose evidente entre 8 a 24 horas posteriores a la estimulación del ligando y son consideradas como respuesta genómica debido a que son afectadas por el bloqueo de la síntesis de ARNm (Tchernitchin, 1973).

Masa ósea

El hueso corresponde a un soporte del cuerpo altamente especializado, caracterizado por su rigidez, dureza y su capacidad de regenerarse y repararse. Protege a los órganos vitales y

actúa como un depósito mineral de calcio. El hueso sufre de constante remodelaciones a lo largo de la vida, de manera que puede adaptarse a cambios físicos, fisiológicos y etarios, reparando daños en la microestructura al reemplazarla por una nueva con el fin de preservar la resistencia ósea. Esto se realiza mediante una adaptación a cargo de dos células: los osteoclastos, encargados de la resorción ósea y los osteoblastos encargados de la formación ósea. Ambas células son parte de un proceso de equilibrio en la remodelación ósea (Fogelman y col, 2012).

La interacción entre los osteoclastos y osteoblastos es regulada por el sistema OPG/RANK/ligando RANK (RANKL), como se muestra en la **Figura 5**. El RANK (receptor activador del factor nuclear κ B) es un receptor expresado en la superficie de los osteoclastos que se activa cuando es ocupado por el RANKL (ligando de receptor activador para el factor nuclear κ B), que corresponde a una proteína expresada en la superficie de los osteoblastos, de manera de favorecer a la diferenciación osteoclástica. Sin embargo, los osteoblastos secretan también otro receptor llamado OPG (osteoprotegerina) que se une al RANKL y antagoniza al sistema RANK/RANKL inhibiendo la actividad osteoclástica (Neyro y col, 2011).

El estrógeno desempeña un papel importante en el funcionamiento y mantenimiento del esqueleto regulando la producción de varias citoquinas como la IL1, IL6 y reduciendo los números de osteoclastos. Este último mecanismo lo realiza incrementando la producción de OPG e inhibiendo la actividad de RANKL. Por lo tanto, las concentraciones de estrógeno juegan un papel fundamental para la prevención y tratamiento de futuras fracturas y enfermedades óseas (Kostenuik y col. 2005).

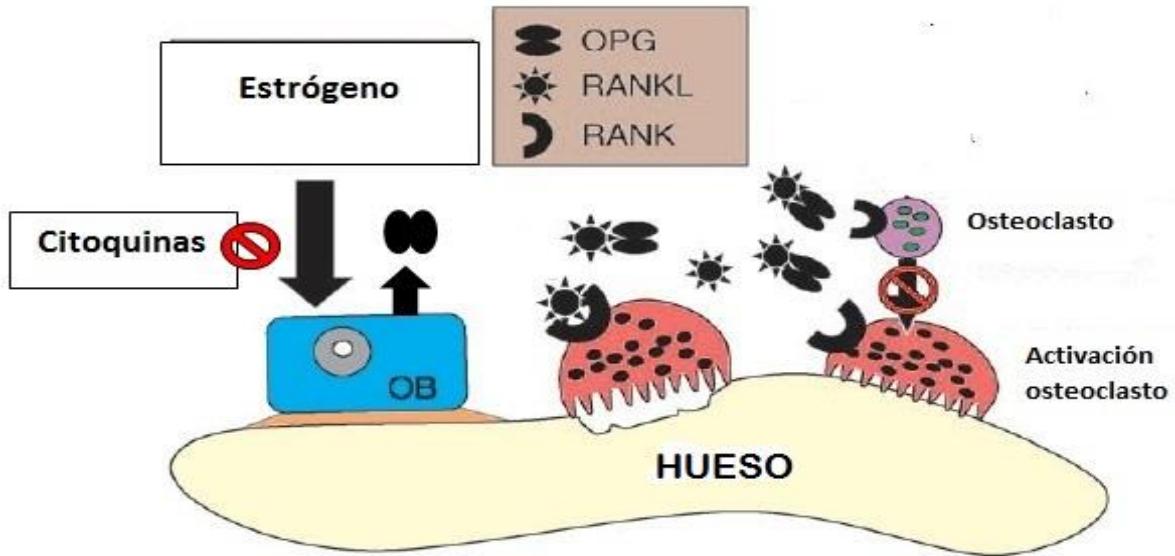


Figura 5. Sistema OPG/RANK/RANKL (Modificado de Kostenuik, 2005). Los estrógenos desempeñan un papel importante en la diferencia y activación de los osteoclastos, regulado por el sistema OPG/RANK/RANKL. Los osteoclastos tienen un receptor RANK que se activa cuando es ocupado por el RANKL, fomentando a la activación osteoclástica y a la resorción ósea. Sin embargo, los osteoclastos también secretan un receptor, la proteína OPG, que se une al RANKL antagonizando al sistema RANK/RANKL, permitiendo la formación ósea.

Tejido óseo

El tejido óseo es un tejido conectivo altamente especializado en el soporte esquelético, siendo su característica principal la composición de su matriz ósea, la cual consiste en depósitos de sales de calcio. Estos depósitos sirven para la mantención de la integridad del hueso y ejercer una función metabólica central, tal como lo es el proceso de contracción muscular. Además, en el tejido óseo se almacena fósforo, magnesio, sodio y otros minerales (Welsh y Sobotta, 2010).

La estructura del hueso se divide en dos compartimentos: (1) hueso esponjoso o trabecular y (2) hueso cortical o compacto.

El primero se presenta como una red tridimensional de trabéculas ósea finas y ramificadas en el interior de un hueso. Entre las trabéculas quedan espacios dispuestos para tejido de la médula ósea o tejido adiposo. Principalmente, se encuentran en las epífisis de los huesos largos, como la tibia.

El segundo, el hueso compacto, se encuentra como una masa sólida y dura en la parte externa del tejido óseo dando lugar al periostio, y hacia el interior se sitúa el endostio. Principalmente forma la diáfisis de los huesos, dando la rigidez y elasticidad a estos.

La composición histológica del tejido óseo para ambos compartimentos se denomina hueso laminillar. Son unidades estructurales funcionales de 3 a 7 micrómetros de espesor (laminillas especiales) que en las zonas de tejido compacto forman sistemas tubulares finos, llamados osteonas o sistemas harvesianos, siendo estas las unidades formadoras de hueso. Los conductos de Havers se disponen longitudinalmente y los conductos de Volkmann atraviesan el hueso de manera transversal conectando los conductos harvesianos. Por ambos conductos, trascurren terminaciones nerviosas y vasos sanguíneos (Welsh y Sobotta, 2010).

Osteopenia y osteoporosis

Una pérdida gradual de masa ósea causa osteopenia y osteoporosis. La osteopenia es un término que se refiere a una reducida masa ósea caracterizado por una disminución en la densidad mineral ósea (DMO) menor que en osteoporosis (Karaguzel y col., 2010). La osteoporosis (OP) se caracteriza por una mayor disminución en la DMO y masa ósea, aumentando la probabilidad de fracturas (Couto y col., 2011).

La OP es una enfermedad que afecta al sistema esquelético y tiene como causal un deterioro progresivo de la microestructura del tejido óseo, siendo su prevalencia alta en

mujeres posmenopáusicas en la etapa de la vejez. Existe fuerte evidencia científica que asocia la disminución del estrógeno endógeno al término de la etapa reproductiva con el aumento del riesgo de fracturas por debilitamiento del hueso. Clínicamente, una baja DMO se ha relacionado principalmente con fractura muñecas, caderas y vertebrales dolorosas (Couto y col., 2011).

El Instituto Nacional de Salud de los Estados Unidos (INS, 2000) de los Estados Unidos, clasifica la osteoporosis tipo I como posmenopáusica, la cual afecta a un subgrupo de mujeres entre 51 a 75 años y que se caracteriza por una remodelación ósea acelerada y en la que frecuentemente se observan fracturas de la zona vertebral y de la porción distal del radio. La TRH es el tratamiento farmacológico que retarda las manifestaciones óseas de la menopausia (MINSAL, 2014). En Chile, según la encuesta nacional de salud 2009-2010, la prevalencia de riesgo de fracturas en la mujer a lo largo de la vida es en promedio 13,7%, lo cual se agrava después de los 65 años cuando alcanza un 30,5% (MINSAL, 2010).

Fitoestrógenos

Los fitoestrógenos son de origen natural y representan un grupo diverso de productos no esteroideos, con actividad estrogénicas debido a su similitud estructural. La exposición a estos compuestos es principalmente a través de la dieta y diariamente estamos expuestos a su consumo. Los principales fitoestrógenos que se encuentran en la dieta son las isoflavonas, que se encuentra en la soja y legumbres; lignanos, que se distribuyen en semillas, granos enteros, frutas y verduras; y cumestanos, que se encuentran en brócoli y brotes (Poluzzi y col, 2014).

Los fitoestrógenos ejercen sus efectos mediante la unión a receptores de estrógeno α y β , debido a su estructura similar al 17- β -estradiol, aunque muchos fitoestrógenos muestran mayor afinidad por el RE β . Los receptores de estrógenos están asociados a distintos tejidos, uno de esos tejidos es el óseo, donde actúa inhibiendo los procesos de degradación del hueso, mediante la disminución de la resorción ósea al actuar en el sistema RANK/RANKL (Pankova y Tsvetkova, 2015).

Fitoesteroles

Los fitoesteroles (FER) son compuestos de origen vegetal que cumplen, en las plantas, una función análoga al colesterol humano. Se encuentran en las membranas de las células vegetales en forma de esteroides en conjunto con la forma saturada de los fitoestanoles.

Los principales tipos de esteroides son estigmasterol, campesterol y β -sitosterol, siendo este último el más abundante (Merino y col., 2014). Son utilizados por sus propiedades hipocolesteromiantes disminuyendo la absorción de colesterol y regulando los niveles de LDL (Fernández y col., 2003). En estudios en ratas se ha visto una dependencia significativa en la disminución del colesterol después de la administración de β -sitosterol (Malini y Vanithakumari, 1990).

Los fitoesteroides en general, y el β -sitosterol en particular, se consideran agentes antiinflamatorios potentes con actividad antioxidante y analgésica. Extractos de esteroides de diferentes fuentes de plantas indican su amplia distribución así como ensayos en animales demuestran su potencia antiinflamatoria (Shi y col., 2013).

En otros estudios, realizados en ratas OVX se observó que el β -sitosterol puede actuar como un eficaz agonista similar al estrógeno (Malini y Vanithakumari, 1992), afectando al sistema reproductivo de animales y alterando los niveles de esteroides en humanos. Esto se debería a que el β -sitosterol es capaz de unirse a receptores de estrógeno (RE) α y β , aunque con preferencia se une a ER β (Ju y col., 2004).

En una investigación clínica realizada a mujeres posmenopáusicas se estudió el efecto de los fitoesteroles y la β -criptoxantina sobre la disminución de riesgo cardiovascular y la desmineralización ósea. Los autores concluyeron que ambos en conjunto tienen un efecto anabólico sobre el hueso. La administración de la mezcla demostró una disminución significativa en el colesterol total, HDL-TC, LDL-C y los marcadores de recambio óseo (Granado y col, 2014).

En 1951 se reportó por primera vez el beneficio de la disminución de lípidos por el consumo de fitoesteroles y es la base para la recomendación para adultos a consumir 2 g de fitoesteroles diariamente para reducir el colesterol LDL y el riesgo de enfermedad cardiovascular (Peterson, 1951).

En Occidente, la ingesta diaria de β -sitosterol es de aproximadamente 150 a 350 mg. Los vegetarianos consumen alrededor de 325 mg/día de sitosterol y unos 60 mg/día de campesterol. Por lo tanto, la ingesta diaria habitual de esteroles y estanoles vegetales oscila entre 150 y 400 mg /día (Katan y col., 2003)

Aceite de palta

El aceite de palta es un aceite vegetal, compuesto de ácidos grasos de la palta (*Persea americana*). Su principal ácido graso es ácido oleico (56%), seguido de linoleico (8%), palmítico (9%) y palmitoleico (3%), trazas de linolénico y también de esteárico. Además, tiene un alto contenido de compuestos bioactivos tales como los fitosteroles (0,43%), principalmente β -sitosterol (0,32%), y tocoferoles (Olaeta y col., 1999).

Tabla 1: Composición del aceite de palta (Olaeta y col., 1999)

Ácidos grasos (%)	
C14:0 Ácido mirístico	0,03-0,07
C16:0 Ácido palmítico	9-18
C16:1 ácido palmitoleico	3-9
C18:0 ácido esteárico	0,4-1,0
C18:1 ácido oleico	56-74
C18:2 ácido linoleico	8-14
C18:3 ácido linolénico	0-2
C20:1 ácido araquidónico	0- 1,05
Fitoquímicos (%)	
Fitoesteroles	0,43
B-sitosterol	0,32

Se ha evidenciado en individuos con altos niveles de triglicéridos sanguíneos, que una dieta rica en ácidos grasos monoinsaturados (AGMI) y ácidos grasos polinsaturados (AGPL) de cadena n-3, corrige el perfil lípido sanguíneo aterogénico. De hecho, una serie de ensayos dietéticos indica que las dietas altas en AGMI disminuyen el riesgo de enfermedad cardiovascular (ECV), en algunos casos, con mayor eficacia que las dietas estándar bajas en

grasa. De esta manera, las dietas enriquecidas con aceite de palta son tan efectivas para reducir colesterol total, colesterol LDL y aumentar el HDL como aquellas que contienen aceites de maíz, soya o de girasol. Una dieta enriquecida con aceite de palta puede mejorar el perfil de lípidos en pacientes con hipercolesterolemia moderada y en pacientes con diabetes mellitus no dependiente de la insulina, en quienes además mantiene un adecuado control glucémico (Pérez y col., 2005).

Antecedentes de investigación

En investigaciones realizadas anteriormente en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso, se ha evidenciado que el aceite de palta dosificado en un periodo agudo de 5 días vía subcutánea (300 µg) posee efectos estrogénicos al inducir estrógeno (entre 1 a 2 días) en ratas OVX, así como un aumento del peso uterino húmedo y seco (232%) en ratas prepúberes (León y Peña, 2012). En otro ensayo utilizando el mismo modelo OVX, pero administrando en un periodo subcrónico de 28 días vía oral (gavage), se demostró efectos anorexígenos en el grupo administrado con aceite de palta (aunque sin variación del peso corporal), aparición de células cornificadas y engrosamiento del epitelio endometrial (Vozmediano, 2013). Asimismo, en otros estudios en los que se evaluó el efecto de los fitoesteroles presentes en el aceite de palta, tanto agudo como subcrónico, por vía oral, se demostró la presencia de células cornificadas en cantidad regular en el frotis vaginal, aumento del grosor del epitelio uterino y vaginal, endometrio y aparición de glándulas uterinas (Medina, 2016; Solis, 2016).

Considerando todos estos estudios, resulta importante indagar más allá sobre la posibilidad de que el aceite de palta, o sus componentes como los fitoesteroles, podrían actuar frente a la microestructura en los huesos de manera de mantener su composición y disminuir las complicaciones óseas que tan comúnmente ocurren en el periodo de menopausia. Por lo mismo, en esta tesis, se estudiaron los efectos de la administración oral subcrónica del aceite de palta y los fitoesteroles sobre la descalcificación ósea.

II.

HIPÓTESIS

Si los fitoesteroles son estrogénicos, estos tienen un efecto atenuador en el proceso de resorción ósea en un modelo roedor de menopausia, cuando se los administra en el alimento por un período de 35 días.

Objetivo general

Evaluar el efecto de fitosteroles y del aceite de palta en el proceso de descalcificación ósea en un modelo roedor de menopausia.

Objetivos específicos

- Evaluar el efecto de la administración de fitosteroles y del aceite de palta sobre el peso corporal, consumo de agua y alimento.
- Valorar la descalcificación ósea en la tibia de ratas ovariectomizadas tratadas con fitosteroles y aceite de palta, mediante histología.

Condiciones generales

La utilización de animales se llevó a cabo bajo procedimientos estándares (Guide for the care and use of laboratory animals, 2011) y a los Aspectos bioéticos de la experimentación animal de Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica de Chile (CONICYT, 2009). La investigación contó con certificación bioética del Comité de Bioética de la Facultad de Farmacia (**Anexo 1**).

Animales de experimentación

Para generar el modelo roedor de menopausia se utilizaron 24 ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley, de una edad media entre 10 a 12 semanas, mantenidas en el Bioterio del Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso. Las condiciones ambientales en el Bioterio fueron: ciclos de luz/oscuridad de 12:12 (6AM-6PM), humedad relativa ambiental entre 30%-70%, temperatura de $21^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ y acceso ad libitum a alimento (Lab Rat Diet, Champion®) y agua potable.

Modelo de menopausia

Se escogieron aquellas ratas con ciclo estral estable, y que estuvieran sobre 260 g de peso corporal. El procedimiento de ovariectomización se realizó bajo protocolo descrito OECD 440 y por un equipo veterinario de cirujano y anestesista. De manera de validar la efectividad de la operación se procedió al seguimiento del ciclo estral por al menos 5 días y se confirmó el mantenimiento del anestro. Para comprobar la mantención del eje HHG que permite la respuesta estrogénica en los animales que mantienen anestro, se administró una

dosis única de 1µg de estradiol. Finalizada la respuesta estrogénica, aproximadamente luego de 5 días, los animales se asignaron aleatoriamente a los grupos de tratamiento.

Grupos de tratamiento

Luego de cumplirse 2 meses después de la OVX, período en el cual se evidencia disminución de la densidad ósea producto del descenso de estradiol (Esteves y col., 2015), se comenzó con la administración subcrónica de 35 días. Los animales fueron asignados aleatoriamente a los grupos de tratamiento según la siguiente distribución:

Tabla 2. Grupos experimentales

Grupo	(1) S	(2) E	(3) FE	(4) AP
n° animales	6	6	6	6
tratamiento	sin tratamiento	estradiol	fitoesteroles	aceite de palta

Grupo 1: control negativo (S).

Grupo 2: control positivo (E): inyección subcutánea de estradiol (Sigma) de 50 µg/kg/cada 5 días (Castillo, 2010).

Grupo 3: fitoesteroles (FE): administración diaria vía oral a través del pellet, en base a 8,6 mg de esteroides líquidos NDS N-25 (80% β-sitosterol, 15% campesterol y 2% de stigmasterol) donados por la empresa NUTRARTIS. La dosis corresponde a la cantidad de fitoesteroides contenida en 2 mL de aceite de palta de acuerdo a literatura (Olaeta y cols, 1999).

Grupo 4: aceite de palta (AP): dosificación diaria (2 mL) vía oral a través del pellet, la cual se adquirió en un supermercado local. El volumen corresponde al volumen

máximo que puede ser administrado a un animal adulto por vía oral (Semler y col, 1992).

Preparación de alimento

Se utilizó el alimento Champion Nutrición Animal, para la preparación de los siguientes tratamientos: (a) Aceite de palta (2 mL/d) y (b) Fitoesteroles (8,6mg/d). Los compuestos fueron unidos al alimento previamente triturado, con una razón 1:2 de agua destilada. Se homogenizó y se rearmó el alimento con ayuda de una jeringa. Se consideró un 20% de pérdida para cada uno de los tratamientos. Posteriormente, se llevaron a estufa al vacío (40°C) durante 48 horas.

Seguimiento de animales de experimentación durante el tratamiento y recolección de muestras

Durante el período de administración se observó el consumo de alimento, agua y variación de peso corporal. Una vez finalizado este período, los animales fueron eutanizados por inhalación de dióxido de carbono en cámara de eutanasia y posterior dislocación cervical para asegurar la muerte. Se recolectaron útero, vagina y tibias, los cuales fueron pesados y sometidos a procedimientos de rutina histológica. Las muestras de útero y vagina se utilizaron para control de calidad interno, según se especifica más abajo. En el caso de las tibias, se realizó morfometría para determinar el grosor del hueso compacto según Potu y col. 2010.

Control de calidad interno

La histología de vagina y útero fue utilizada como control positivo interno para asegurar la estrogenicidad inducida por fitoesteroles y aceite de palta. Con este mismo fin, se hizo un seguimiento del ciclo estral para confirmar la estrogenicidad inducida por estos productos y que históricamente se ha observado en estudios previos de este Laboratorio (Vozmediano 2012; Solis 2016; Medina 2016).

Histología

Los huesos de la tibia se fijaron en solución PFA (paraformaldehído al 2%) durante 48 horas. Las muestras se lavaron durante 15 minutos con cada una de las siguientes soluciones de PBS (0,01 M; pH 7,2); (a) PBS con glicerol 5%; (b) PBS con glicerol 10%; y (c) PBS con glicerol 15%. Los tejidos óseos fueron descalcificados en una solución de EDTA-glicerol (14,5g EDTA + 1,25g hidróxido de sodio + 15 mL glicerol; pH 7,2) dentro de un tubo Falcon de 50 mL. Al cabo de 28 días, las muestras fueron retiradas de solución EDTA-glicerol y lavadas con: (a) PBS con 15% sacarosa y 15% glicerol por 3 horas a T° ambiente; (b) PBS con 20% sacarosa y 10% glicerol por 30 minutos; (c) PBS con 20% sacarosa y 5% glicerol por 30 minutos. Para retirar el exceso de glicerol, las muestras se lavaron con solución PBS con 20% sacarosa por 30 minutos. Todos los procedimientos anteriormente descritos fueron realizados a temperatura ambiente (Mori, 1988). Posteriormente, las muestras fueron deshidratadas en una batería con gradientes de alcohol y embebidas en parafina previo a realizar cortes longitudinales de 5 µm de espesor en un micrótopo rotatorio. Las muestras fueron teñidas con eosina-hematoxilina y luego puestas en un medio de montaje con resina Consul- Mount (Thermo Scientific).

Análisis morfométrico

Para determinar grosor de hueso cortical, las secciones de hueso fueron examinadas por microscopía óptica (Olympus CX-21) bajo aumentos de 4X y 10X. Se seleccionaron 3 regiones distintas por cada muestra y posteriormente se capturaron las imágenes mediante la cámara Moticam 2000. El grosor de hueso se midió en la región corticales (desde el periostio al endostio) con, el software Microcapture Pro versión 2.2,

Análisis estadístico

El consumo de agua, alimento, peso corporal fue analizado con ANOVA de dos vías para determinar posibles diferencias entre tratamientos. El efecto de los tratamientos sobre tamaño de útero y sobre grosor de hueso fue analizado con análisis de varianza ANOVA con Test de Tukey. Ambos análisis se realizaron con el programa Graph Pad Prism.

V.

RESULTADOS

Seguimiento de animales de experimentación durante el tratamiento

Consumo de agua y alimento

Se monitorizó la ingesta diaria de agua y alimento durante todo el período de administración, lo cual se muestra en la **Figura 6 y 7**.

El consumo de agua fue semejante entre todos los grupos de administración, sin diferencias significativas entre el grupo control negativo (S) y los otros tratamientos ($p < 0,05$).

Con respecto al consumo de alimento, se observó mayor ingesta en el grupo FE, mientras que para el grupo E y AP, se cuantificó un menor consumo de comida, existiendo para estos últimos, una diferencia significativa respecto al control S (ANOVA de dos vías, múltiples comparaciones, $p < 0,0001$).

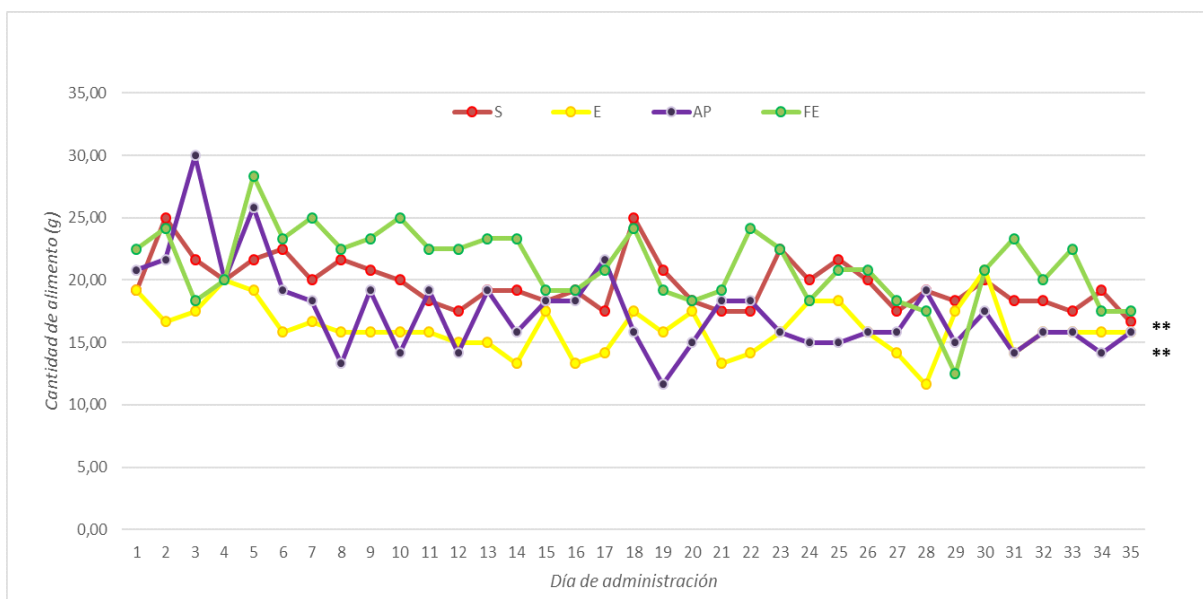


Figura 6. Consumo de alimento según día y tratamiento. Cada punto representa el promedio de consumo de alimento para ese grupo de tratamiento. No se muestran las desviaciones estándar para la mejor comprensión de la gráfica. E: estradiol; AP: aceite de palta; FE: fitoesteroles. ** Diferencias significativas (ANOVA de dos vías, múltiples comparaciones, $p < 0,0001$)

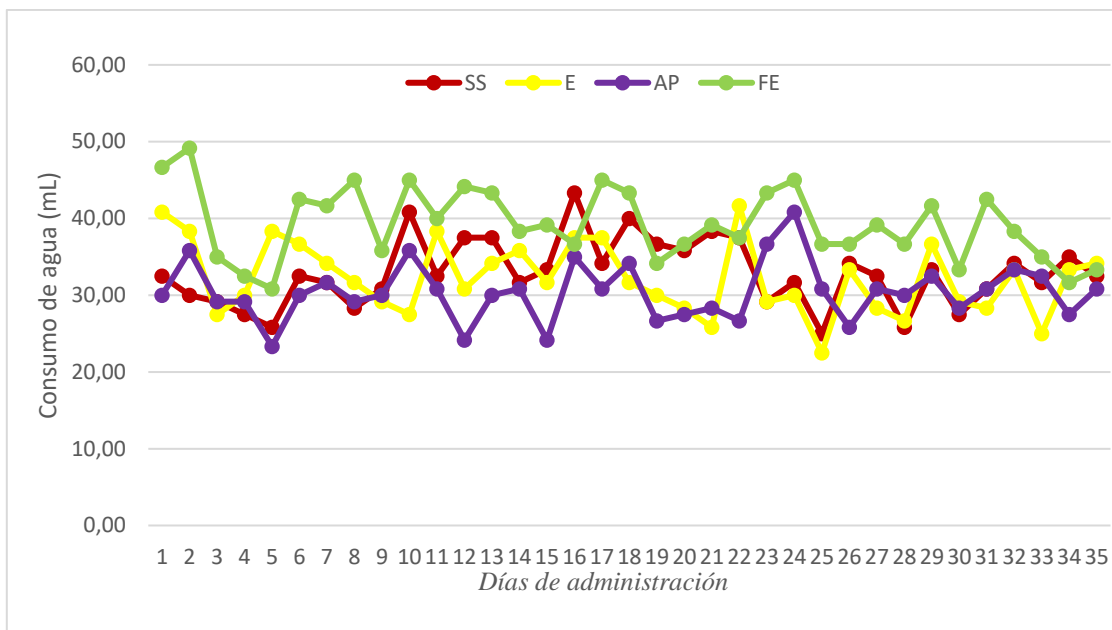


Figura 7: Consumo diario de agua según tratamiento, expresado como promedio. No se muestran las desviaciones estándar para la mejor comprensión de la gráfica. S: sin tratamiento; E: estradiol; AP: aceite de palta; FE: fitosteroles. Sin diferencias significativas para ningún grupo.

Variación de peso corporal

Se observó una pérdida estadísticamente significativa de peso corporal entre el inicio y el final del tratamiento, solo en el grupo E (**Figura 8**). A diferencia de los otros grupos, los animales tratados con estradiol experimentaron una disminución de peso corporal durante todo el periodo de administración (**Figura 9**).

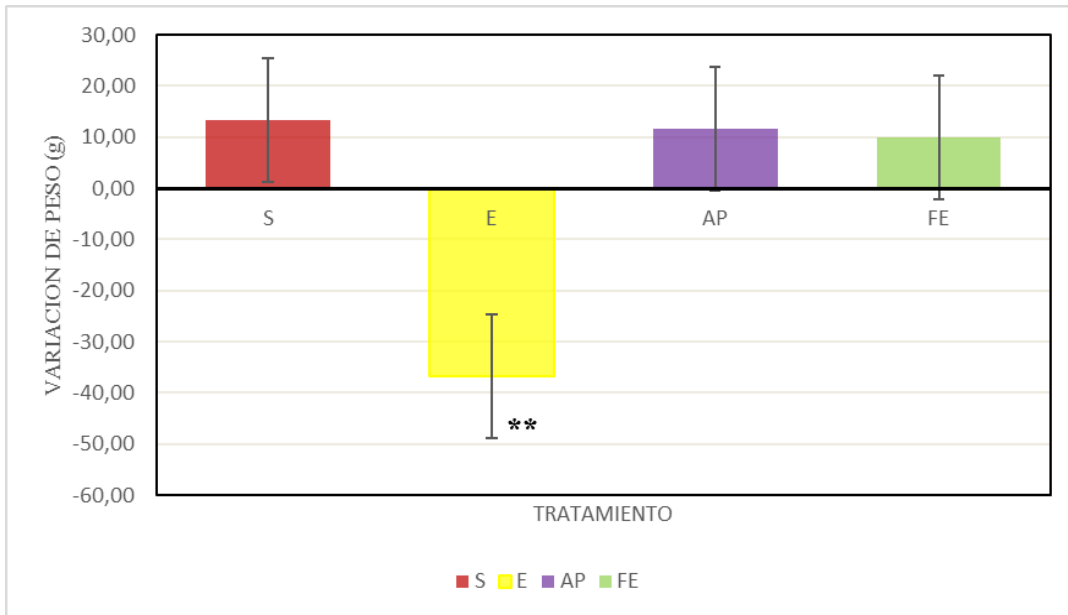


Figura 8: Variación de peso entre el peso inicial y el peso final en todos los grupos de tratamiento, expresado como el promedio ± DE. ** Diferencias significativas (ANOVA, de dos vías, múltiples comparaciones, $p < 0,01$).

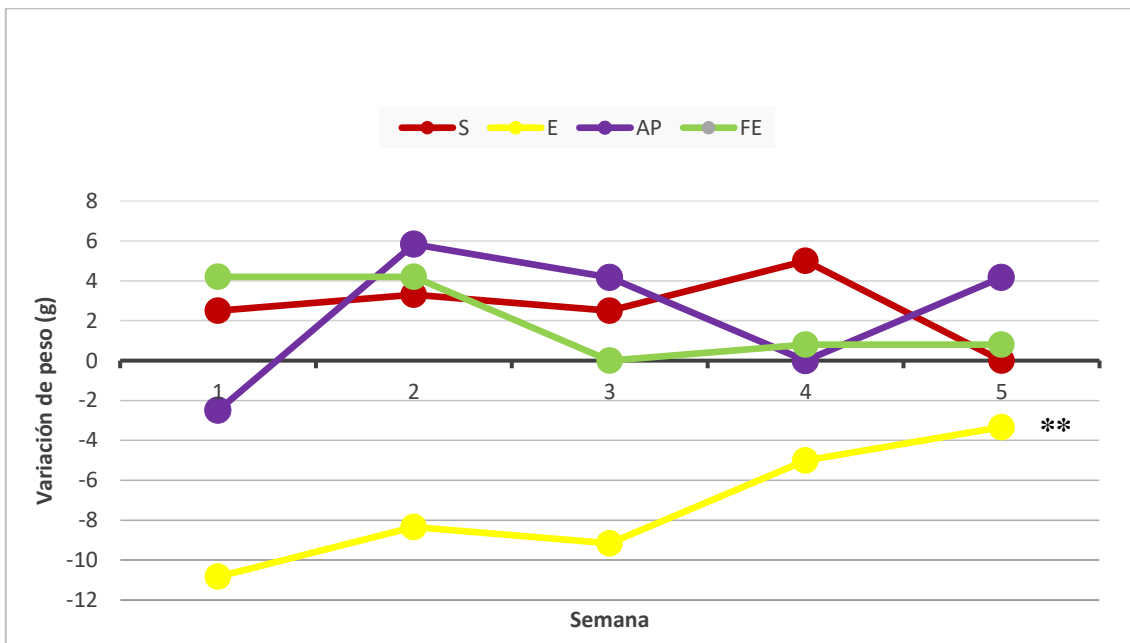


Figura 9: variación de peso corporal por semana en los grupos de tratamiento, expresado como el promedio. ** Diferencias significativas (ANOVA, de dos vías, múltiples comparaciones, $p < 0,01$).

Evaluación de estrogenicidad del aceite de palta y fitoesteroles

A continuación, se presentan observaciones de estrogenicidad (efecto uterotrópico, ciclo estral e histología de útero y vagina) que aseguran que fitoesteroles y aceite de palta producen este efecto en el modelo roedor de menopausia

Efecto uterotrópico

La **Figura 10** muestra el peso seco del útero normalizado según el peso corporal final. Solo los animales administrados con estradiol tuvieron un efecto uterotrópico.

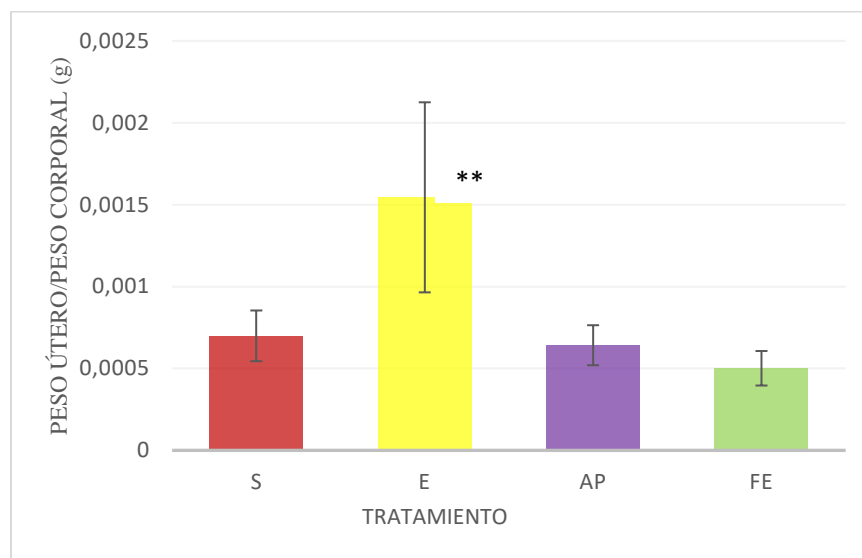


Figura 10. Relación de peso uterino según peso corporal. S: sin tratamiento, E: estradiol, AP: aceite de palta, FE: fitoesteroles. ** Diferencia estadísticamente significativa en comparación con el grupo control S (ANOVA de una vía, test de Dunnett, $p < 0,0001$). Los valores se expresan como promedio \pm DE.

Ciclo estral

Se monitorizó la evolución y cambios en la citología vaginal durante los 35 días de administración. Para el control negativo, S, se obtuvieron los resultados esperados: mantención del diestro (**Figura 11-S**); para el grupo E se vio la inducción de la etapa estro (**Figura 11-E**) y una seguidilla de ciclos estrales completos de entre 5 a 6 días.

Para los grupos AP y FE se visualizó la presencia de células cornificadas esporádicas en los frotis vaginales, de baja aglomeración y menor abundancia de una etapa estro, por lo que se les denominó como una etapa pseudo-estro (**Figura 11-AP-FE**), las cuales se evidenciaron bajo microscopio óptico desde el día 4 en grupo AP y día 3 para FE.

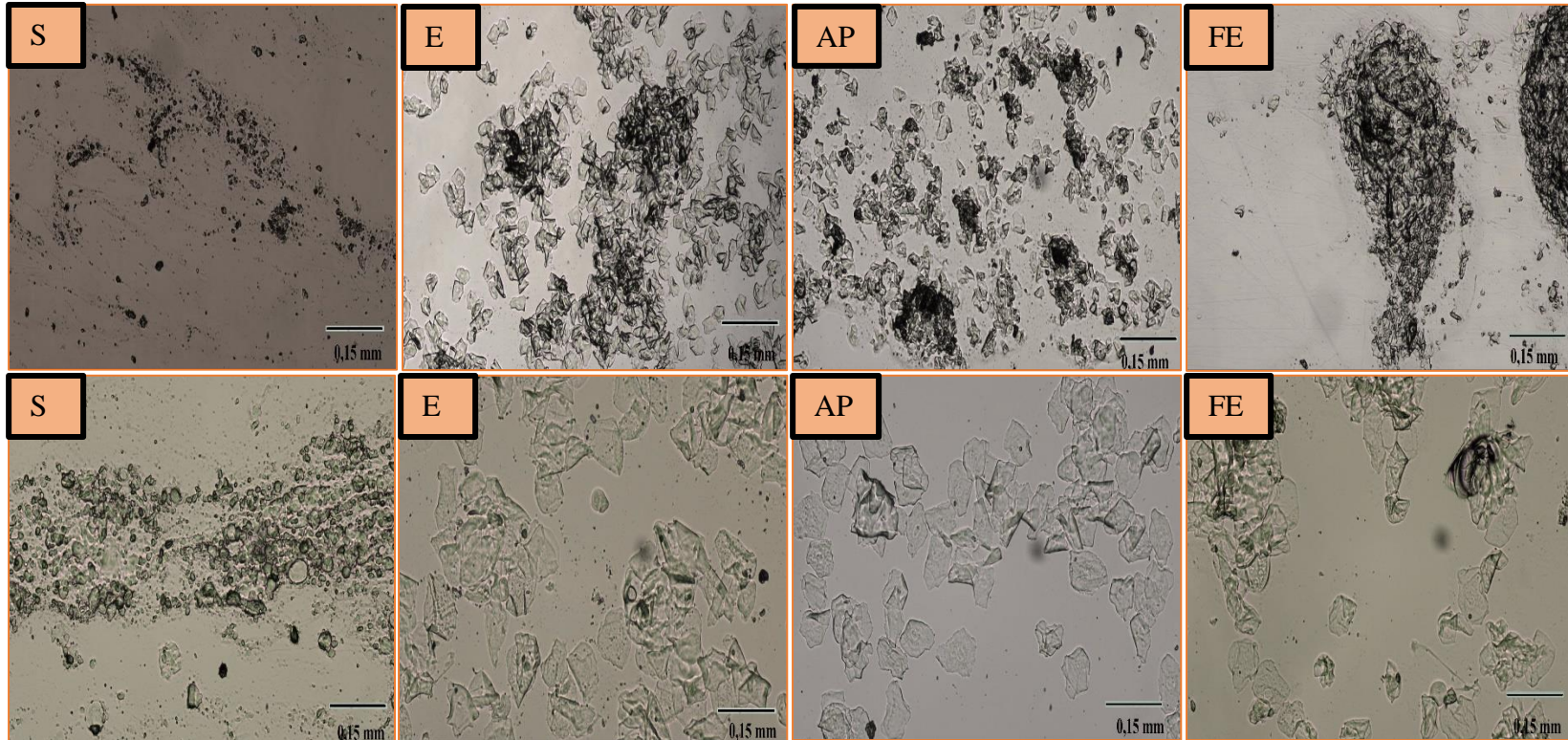


Figura 11: Frotis vaginales representativos (en 4x y 10x) de las etapas observadas en los grupos de tratamiento; S) etapa diestro; E) etapa estro, grupo E; AP) etapa pseudo-estro y FE) etapa pseudo-estro.

Histología de vagina y útero

A modo de control interno, se realizó un ensayo cualitativo para asegurar los resultados de la evaluación del efecto estrogénico de los tratamientos, especialmente para comparar del control negativo S con el control positivo E.

En el caso de útero (**Figura 12**), se evidencia un claro aumento de circunferencia de lumen uterino y grosor epitelial en el grupo E respecto al control, lo cual se puede verificar con aumento 4x y 10x, respectivamente. Así mismo, para este tratamiento, no se consiguió una imagen completa en el mínimo aumento (4X), dado el tamaño mayor al campo microscópico. En vagina se nota un grosor del epitelio que tiende a ser mayor en vagina de animales tratados con E en comparación con S; para los grupos AP Y FE, ambos muestran un mayor tamaño del grosor epitelial respecto al control, pero menor al grupo E (**Figura 13**).

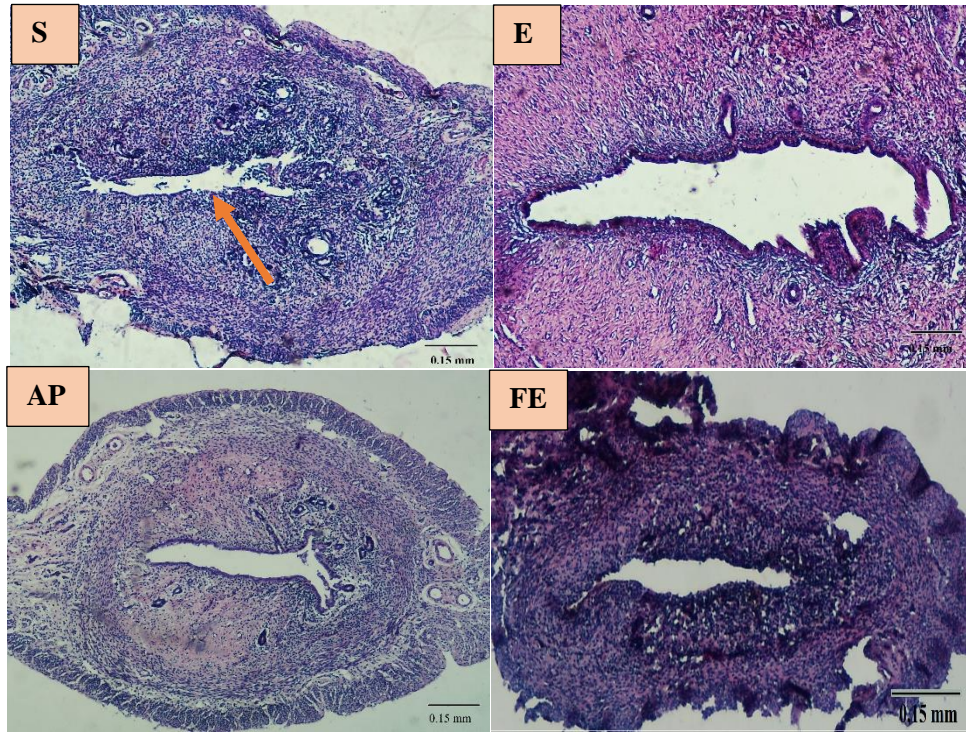


Figura 12: imágenes de tejido uterino en aumento 4X sacadas con el mismo zoom. S) Sin tratamiento; E) estradiol; AP) aceite de palta; FE) fitoesteroles.

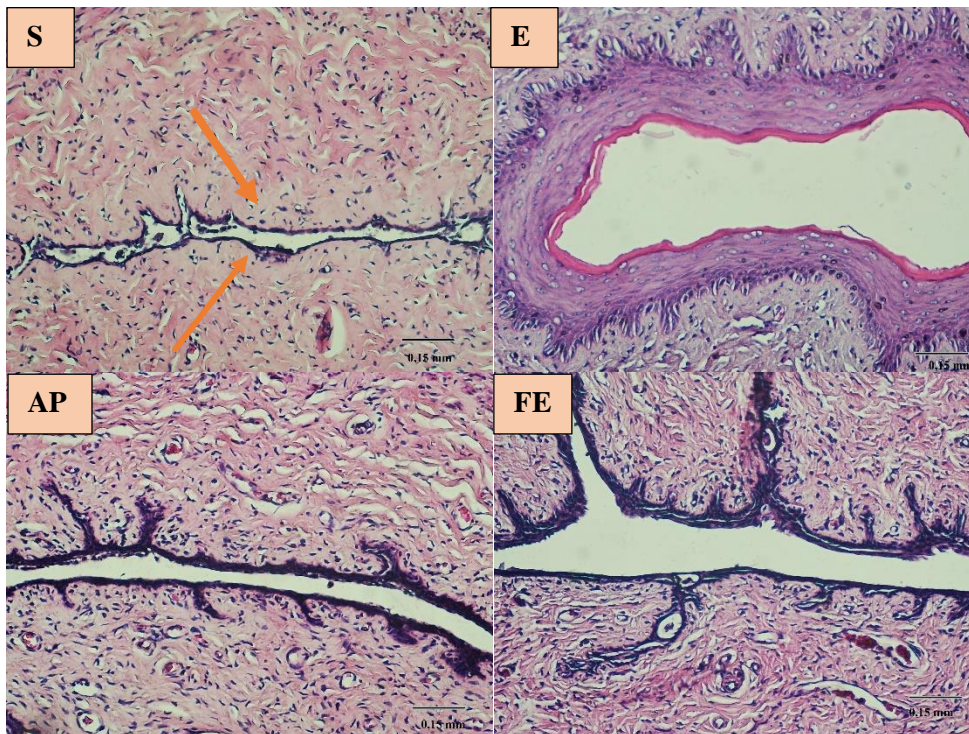


Figura 13: imágenes de tejido vaginal, zona de grosor del epitelio vaginal en aumento 10X sacadas con el mismo zoom. S) Sin tratamiento; E) estradiol; AP) aceite de palta; FE) fitoesteroles

Morfometría ósea

Los resultados morfométricos de la tibia corresponden a las cortes longitudinales de esta. En la **Figura 14**, se muestran el grosor o espesor cortical de la tibia izquierda proximal. Se observó un efecto estadísticamente significativo para E ($p<0,01$) y AP ($p<0,05$) con un mayor espesor cortical respecto al control S. En el tratamiento FE, se observó un aumento del grosor cortical, pero este no alcanza a ser estadísticamente significativo.

En la **figura 15** se muestran cortes longitudinales comparativos de los tratamientos, observándose las diferencias en espesor cortical antes mencionadas.

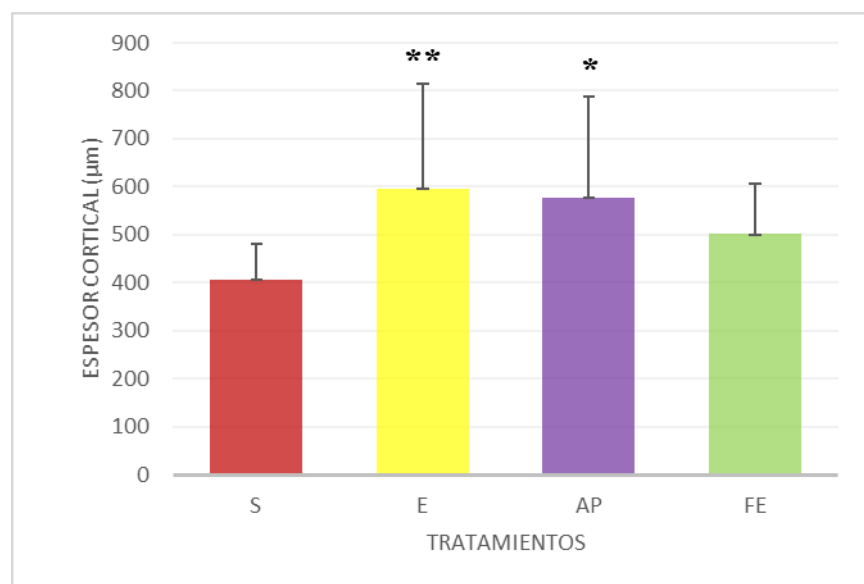


Figura 14: Morfometría del hueso de la tibia, expresado como promedio \pm DE. Los resultados arrojan diferencia significativa para grupo estradiol ($p<0,01$) y aceite de palta ($p<0,05$). (ANOVA de una vía, test de Tukey). S: sin tratamiento, E: estradiol, AP: aceite de palta, FE: fitoesteroles.

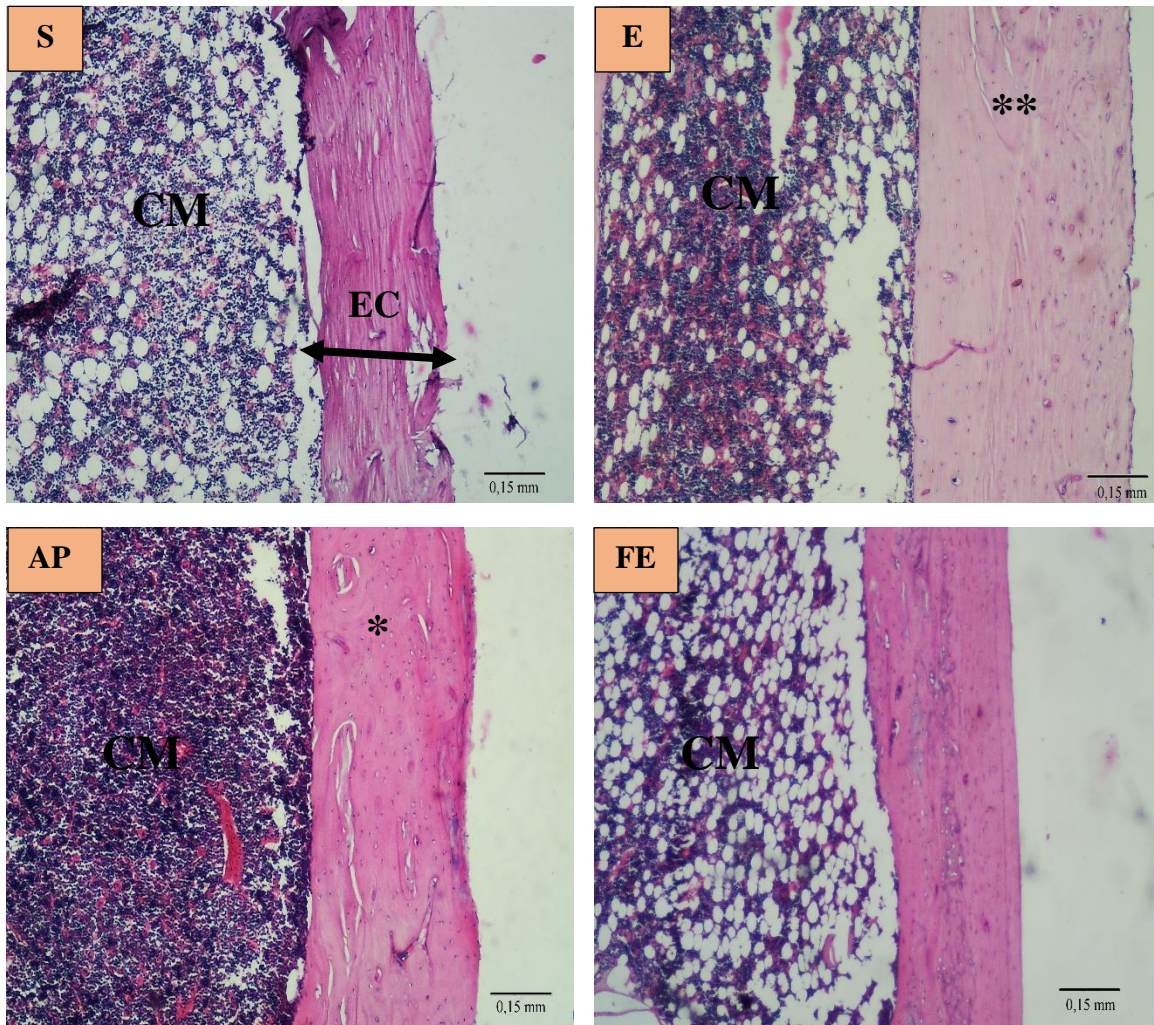


Figura 15: imágenes del corte longitudinal de tejido óseo correspondiente a una sección de la tibia proximal en 4X al mismo zoom. S) Sin tratamiento; E) Estradiol; AP) Aceite de palta; FE) Fitoesteroides. Diferencias significativa ** ($p < 0,01$); * ($p < 0,05$). La cavidad medular (CM) representa el interior del tejido, mientras que el espesor cortical (EC) representa el grosor de la medición desde el periostio (exterior) al endostio (interior).

Este trabajo de tesis continúa la línea de investigación de estrogénicidad del Laboratorio de Toxicología de la Escuela de Química y Farmacia de la Universidad de Valparaíso. Nuestros resultados concuerdan y contribuyen a las observaciones de estudios previos sobre la estrogénicidad del aceite de palta (Castillo, 2010; León y Peña, 2012; Vozmediano, 2013; Solis, 2016; Medina, 2016). En específico, en esta tesis se investigó el efecto del aceite de palta y fitoesteroles sobre el hueso cuando es administrado a través del alimento en un modelo roedor de menopausia. En todos los trabajos de estrogénicidad del laboratorio y en el nuestro, no solo se ha confirmado que el aceite de palta es estrogénico sino que además se ha validado un modelo y periodo de administración para el estudio del posible uso terapéutico de este aceite estrogénico. A continuación, se discuten las observaciones realizadas en esta investigación.

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

En relación con el consumo de agua, no hubo diferencias estadísticamente significativas en los grupos de estudio. Por otro lado, el consumo de alimento en los grupos de tratamiento E y AP fue estadísticamente distinto respecto del control, mientras que el grupo que recibió FE no demostró cambios significativos en el consumo del alimento. Esto se explica por la propiedad anorexígena que tiene el estradiol y que ha sido observada en una variedad de especies, incluida la rata. Se postula que el aumento preovulatorio en la secreción de estradiol en rata hembras se asocia a una disminución en la ingesta alimentaria durante el

estro (Santollo, 2010). Debido a que el estradiol actúa como un factor de transcripción inducido por un ligando, el estradiol mediante la activación de ER α puede disminuir la señalización de MCH (hormona concentradora de melanina), péptido orexígeno encargado de la regulación alimentaria, y de su receptor MCHR1. Una disminución en la expresión de MCH podría resultar en la disminución de la liberación sináptica de MCH, y se ha asociado que un aumento de niveles de estradiol podría inhibir las poblaciones neuronales postsinápticas y, por lo tanto, disminuir el número de MCHR1 (MCH receptor) dentro de las regiones del cerebro que controlan la ingesta de alimentos (Santollo, 2010). El efecto en el grupo AP es concordante con datos previos de este Laboratorio, en los que se ha comprobado el efecto anorexígeno de AP (Vozmediano, 2013; Medina, 2016).

Efecto de la administración de aceite de palta y fitoesterol sobre el peso corporal

En cuanto al peso corporal, sólo hubo diferencias estadísticamente significativas en el grupo E, siendo consistente con estudios previos de este Laboratorio y de otros en los que se expuso a ratas a estradiol. Una explicación es que la disminución en la ingesta de alimentos lleva a la normalización y disminución de peso (Asarian y Geary, 2002).

Por otro lado, el efecto sobre el peso corporal observado en el grupo AP es concordante con datos previos de este Laboratorio, por cuanto AP tendría efecto anorexígeno que no lleva necesariamente a una disminución del peso corporal. Esto puede ocurrir por las calorías otorgadas por los ácidos grasos del AP al alimento de los animales. Como ejemplo, una dieta comercial tipo para ratas aporta aproximadamente 3,0 kcal/g. Aunque desconocemos

el aporte calórico exacto de la dieta comercial utilizada en el estudio, podemos inferir que el consumo de alimento de 22,5 g, en los grupos S y FE, otorgan 67.5 kcal/día, mientras que el consumo de 17,5 g de alimento del grupo E otorga 52,5 kcal/d. En el caso del AP, la suplementación de los pellets con aceite otorga 18 kcal extra por día. De esta manera, aunque los animales AP consuman igual cantidad de alimento que el grupo E, están consumiendo 70,5 kcal por día, una energía similar a la de los grupos S y FE, de ahí que el peso corporal sea similar en esos tres grupos.

Efecto de la administración de aceite de palta y fitoesterol sobre el hueso

Se observó un aumento en el espesor del hueso cortical, estadísticamente significativo para los grupos E y AP, en comparación con el grupo control. Este efecto es característico del estrógeno, debido a que juega un papel importante en el mantenimiento de la estructura ósea, por efectos mediados por receptores de estrógeno. Estos receptores expresados en los osteoblastos, permiten la activación de la proteína OPG, potente inhibidor de la diferenciación osteoclástica, impidiendo que se active el receptor RANKL, inhibiendo la activación osteoclástica, y lo que mejora el funcionamiento y mantenimiento de la masa ósea (Neyro y col, 2011). Tanto OPG como RANKL son reguladores de la resorción ósea. Hormonas, citoquinas y factores de crecimiento median la relación entre OPG y RANKL. Esta relación también altera enfermedades óseas ya que por un lado RANKL estimula la formación y supervivencia de los osteoclastos, mientras que OPG suprime la resorción ósea y aumenta la densidad, área y fuerza del hueso esponjoso y cortical (Kostenuik, 2005). En cuanto al efecto del AP sobre el espesor del hueso cortical esto se podría relacionar con su efecto estrogénico (Vozmediano, 2013 y 2016; Solis, 2016; Medina; 2016). Hipotetizamos que el efecto del AP sobre los huesos se relaciona con una activación de receptores

estrogénicos en la masa ósea. En el modelo ovariectomizado, los componentes estrogénicos del AP reemplazarían al estrógeno endógeno, optimizando la microestructura del hueso.

No hubo cambios estadísticamente significativos en el grupo FE en comparación con el grupo S, a pesar de presentar un aumento en el espesor del hueso cortical. Puede deberse a un efecto de menor potencia en comparación con los tratamientos E y AP.

Efecto estrogénico de la administración de fitoesteroles

La administración de fitoesteroles en este estudio no presentó diferencias significativas en cuanto a efecto anorexígeno y grosor cortical de hueso, lo cual contradice lo esperado pues en los estudios anteriores de este Laboratorio se había demostrado sus efectos anoréxicos.

La dosis de fitoesteroles totales que se administró fue calculada a partir de lo descrito por Olaeta (1999) en el aceite de palta, es decir, un 0,43%. Otro autor (Dutta, 2003), describe que el contenido de fitoesteroles en el aceite de pata oscila entre el 1-2% por lo que la dosis de fitoesteroles administrados pudo haber sido más baja que lo necesario para ver efectos más contundentes en el grupo FE. Por otro lado, se conoce la baja biodisponibilidad de fitoesteroles (Di Battista y col., 2015). Por tanto, se puede presumir que la administración de una mayor dosis podría inducir mayor efecto, lo cual concuerda con que una dosis de 10 mg/kg de fitoesteroles indujo efecto anorexígeno en ratas ovariectomizadas con administración de 28 días (Medina, 2016).

Hipercolesterolemia y resorción ósea

Se ha descrito que, a mayor edad, la mujer tiene más probabilidad de sufrir hipercolesterolemia, la cual se ha establecido como un factor de riesgo para fracturas óseas provocadas en mujeres posmenopáusicas con osteoporosis. El 27-OH-colesterol, un metabolito principal de la biotransformación del colesterol que se produce por su hidroxilación, ejerce una función como un modulador endógeno selectivo de receptores de estrógenos (MSRE) ya que actúa como antagonista del 17- β -estradiol (Rocha y col, 2016).

Si bien en este estudio no se determinó el colesterol sanguíneo pre o post ovariectomización, un estudio señala hipercolesterolemia en ratas sedentarias de la cepa Sprague-Dawley luego de 8 semanas del procedimiento quirúrgico, comparadas con ratas operadas simuladamente (Ngo, 2014). La dosificación de animales en este trabajo comenzó aproximadamente a la semana número 9 post ovariectomización, por lo que se hipotetiza que podrían haber presentado un importante nivel de colesterol sanguíneo.

Se ha visto que la administración de 27-OH-colesterol a ratas induce un menor grosor de hueso trabecular y cortical (Dusell y cols, 2010), efecto revertido al administrar 17- β -estradiol, indicando que los receptores estrogénicos α y β en hueso podrían ser diana del efecto osteoporótico del 27-OH-colesterol sobre el hueso. 27HC inhibe la proliferación de osteoblastos y la actividad de genes asociados a su diferenciación. El mecanismo sería la interacción de 27HC con el receptor de estrógenos y la posterior activación de la proteína LXR, resultando en la inducción de TNF α y RANKL ARNm lo que conduciría a un aumento de la osteoclastogénesis (Nelson y col. 2013).

La función protectora de los estrógenos y en especial del 17β -estradiol así como de otros agonistas de esta molécula, se pueden deber a la capacidad de estimular la expresión de la proteína SHP, la cual regula negativamente la transcripción de factores mediados por el heterodímero LXR / RXR, implicado en la osteoclastogénesis. El metabolito del colesterol, 27-hidroxicolesterol puede unirse al receptor de estrógenos e inhibir la expresión de SHP, activando a las proteínas de LXR/RXR, con consiguiente aumento de la diferenciación osteoclástica y resorción ósea (**Figura 16**).

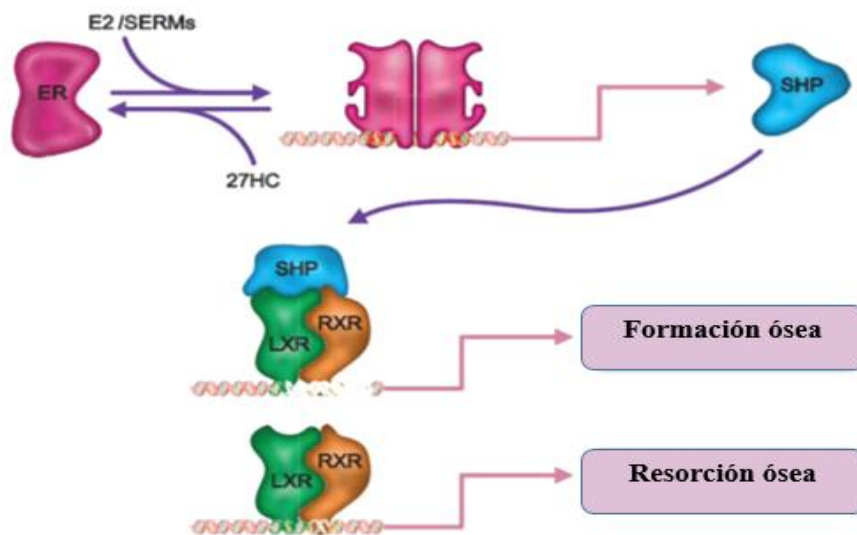


Figura 16. Mecanismo de acción del 27HC en la resorción ósea (Modificado de Nelson y col., 2013)

Nutrición: aceite de palta, fitoesteroles y la salud ósea

No existe literatura sobre estudios clínicos del efecto del aceite de palta y los fitoesteroles sobre el tejido óseo. En un ensayo de 38 mujeres posmenopáusicas que no recibían TRH ni fármacos hipocolesterolemiantes como las estatinas, fueron suplementadas con 1,5 g de fitoesteroles por día vía oral en una bebida de fruta con leche descremada. Debían tomar este suplemento (250 mL) por 28 días. Los resultados en el hueso no fueron estadísticamente significativos para marcadores óseos que disminuirían la resorción mediada por osteoclastos (Granado-Lorencio, 2014). Es necesario realizar más ensayos en humanos con respecto administración de fitoesteroles, sean estos incorporados directamente a la dieta o como nutracéuticos, para determinar la concentración estándar que se podrían ver beneficios en la salud ósea.

1. El aceite de palta presentó efectos anorexígenos, pero sin disminución del peso corporal. Los fitoesteroles no presentaron estos efectos.

2. El aceite de palta mostró tener efecto estrogénico en hueso cortical de la tibia al disminuir la resorción ósea en un modelo roedor de menopausia. Los fitoesteroles resultaron con un aumento en el espesor cortical, pero sin diferencias significativas.

1. Ambrojo R. (2012). Manual CTO: cuidados a las mujeres en el climaterio (pp 1 – 11). Madrid, España: CTO editorial.
2. Arbués J, Escalante JM, Hernández JM, Cabrera T (2005). Fitoestrógenos –isoflavonas– y menopausia. *Matronas Profesión*, 6(1), 5–10.
3. Asarian L Geary N. (2002). Cyclic estradiol treatment normalizes body weight and restores physiological patterns of spontaneous feeding and sexual receptivity in ovariectomized rats. *Hormones and Behavior*, 42(4), 461-471
4. Axelson M, Kirk DN, Farrant RD, Cooley G, Lawson AM, Setchell KDR (1982). The identification of the weak oestrogen equol (7-hydroxy- 3[hydroxyphenyl] chroman) in human urine. *Biochem Journal*, 201(2), 353-357.
5. Baffet H, Robin G, Letombe B. (2015). Menopausia. *EMC Ginecología-Obstetricia*, 51(3), 1–18.
6. Bu DX, Griffin G, Lichtman AH (2011). Mechanisms for the anti-inflammatory effects of statins. *Curr Opin Lipidol.* , 22(3), 165-70.
7. Calderón AM (2005). Los estrógenos y el hueso: revisión de la evidencia. *Progresos de Obstetricia y Ginecología*, 48(2), 79–90.

8. 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, Valparaíso, Chile.
9. Christophersen P, Yang M, Mu H (2016). Encapsulation and controlled release technologies in food systems (pp 309-332). Barcelona, España: Editorial Willey Blackwell
10. Comisión Nacional de Investigación Científica y Tecnológica de Chile (CONICYT). (2009). Aspectos bioéticos de la experimentación animal, 4to taller de bioética.
11. Couto D, Napoles D, Deulofeu I. (2011) Postmenopausal osteoporosis according to bone densitometry. *Medisan*, 15(12), 1765-1774.
12. Di Battista C, Constenla D, Ramirez-Rigo MV, Piña J (2015). The use of Arabic gum maltodextrin and surfactants in the microencapsulation of phytosterols by spray drying. *Powder Technology*, 286(1), 193-201
13. Diez-Perez A. (2006). Selective estrogen receptor modulators (SERMS). *Arq Bra Endocrinol Metab*, 50(4): 720-734.
14. Dusell CD, Nelson ER, Wang X, Abdo J, Modder UI, Umetani M, Gesty-Palmer D, Javitt NB, Khosla S, McDonnell DP (2010). The endogenous selective estrogen receptor modulator 27- hydroxycholesterol is a negative regulator of bone homeostasis. *Endocrinology*, 151(8), 3675– 3685.

15. Dutta P (2003). Phytosterols as Functional Food Components and Nutraceuticals. *Nutraceutical Science and Technology* (pp 328-329). Uppsala, Sweden: Editorial Marcel Dekker.
16. Esteves CM, Moraes RM, Gomes FC, Marcondes MS, Lima GMG, Anbinder AL (2015). Ovariectomy-associated changes in interradicular septum and in tibia metaphysis in different observation periods in rats. *Pathology Research and Practice*, 211(2), 125–129.
17. Factors R (1991). Consensus development conference: prophylaxis and treatment of osteoporosis. *The American Journal of Medicine*, 90(1), 107–110.
18. Fernández C, Martín M, Gómez D, Lasunción MA (2003). Efecto de los fitosteroles sobre la biosíntesis de colesterol y la proliferación en células humanas. *Clínica e Investigación en Arteriosclerosis*, 15(5), 75–183.
19. Fogelman I, Van Der Wall H, Gnanasegaran G (2012). Physiology of bone formation, remodeling and metabolism. En Kini U, Nandeesh B.N. (Ed.). *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging* (pp 29-31). Bangalore, India: Springer Editorial
20. Granado-Lorencio F, Lagarda MJ, Garcia FJ, Sanchez LM, Blanco I, Alegria, Barber R (2014). Effect of beta-cryptoxanthin plus phytosterols on cardiovascular risk and bone turnover markers in post-menopausal women: a randomized crossover trial. *Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases*, 24(10), 1090–1096.

21. Heldring N, Pike A, Andersson S, Matthews J, Cheng G. (2007). Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets, *Physiol Rev*, 87(3), 905-931
22. Hermoso T (2003). Clasificación de la osteoporosis. Factores de riesgo. Clínica y diagnóstico diferencial. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 26 (3), 29-52.
23. Instituto Nacional de Estadística, (INE). Anuario de estadísticas vitales 2012. Disponible en: <http://www.ine.cl/estadisticas/demograficas-y-vitales>. Último acceso: 27 de junio del 2017.
24. Instituto Nacional de Salud USA (2000). Conferencia de consenso sobre prevención, diagnóstico y tratamiento de la osteoporosis. *Rev Española Enfermedad Metabólicas Óseas*, 9(1), 231-239.
25. Ju YH, Clausen LM, Allred KF, Almada AL, Helferich WG (2004). Beta-sitosterol, beta-sitosterol glucoside, and a mixture of beta-sitosterol and beta-sitosterol glucoside modulate the growth of estrogen-responsive breast cancer cells in vitro and in ovariectomized athymic mice. *The Journal of Nutrition*, 134(5), 1145–1151.
26. Karaguzel G, Holick M (2010). Diagnosis and treatment of osteopenia. *Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders*, 11(4), 237–251.

27. Katan MB, Grundy SM, Jones P, Law M, Miettinen T, Paoletti R (2003). Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels. Elsevier In Mayo Clinic Proceedings, 78(8), 965-978.
28. Koebele SV, Bimonte HA (2016) Modeling menopause: the utility of rodents in translational behavioral endocrinology research. Maturitas, 87(1), 5-17.
29. Kohli SS, Kohli VS. (2011). Role of RANKL-RANK/osteoprotegerin molecular complex in bone remodeling and its immunopathologic implications. Indian J Endocr Metab. 15(3), 175-81
30. Knobil and Neill's (2015). Physiology of Reproduction. Neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat (pp 1199-1256). Alabama, USA: Elsevier
31. Kostenuik P (2005). Osteoprotegerin and RANKL regulate bone resorption, density, geometry and strength. 5(6), 618-625.
32. Lawrence B. (2003). Estrogenos y progesterona. En Gillman A, Hardman JG, Limbird LE (eds). Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica (pp 1541–1548). Mexico DF: McGraw-Hill Editorial
33. 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, Valparaíso, Chile.

34. Malini T, Vanithakumari G (1990). Rat toxicity studies with beta-sitosterol. *Journal of Ethnopharmacology*, 28(2), 221–234.
35. Malini T, Vanithakumari G (1992). Comparative progesterone study of the effects of beta-sitosterol, estradiol selected biochemical parameters of the uterus of ovariectomized rats, 36(1), 51–55.
36. Medina V. (2016). Evaluación del efecto subcrónico de aceite de palta y fitoesteroles en un modelo roedor de menopausia. Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile.
37. Merino J, Masana L, Guijarro C, Ascaso J, Lagares M (2014). Recomendaciones para la utilización clínica de los alimentos enriquecidos con fitoesteroles y fitoestanoles en el manejo de la hipercolesterolemia. *Clínica e Investigación en Arterioesclerosis*, 26(3), 147-158.
38. Ministerio de salud (MINSAL, 2010). Encuesta nacional de salud ENS 2009-2010. Chile.
39. Ministerio de Salud (MINSAL, 2014). Orientaciones técnicas para la atención integral de la mujer en edad de climaterio en el nivel primario de la red de salud (APS).

40. Mori S, Sawai T, Teshima T, Kyogoku M (1988). A new decalcifying technique for immunohistochemical studies of calcified tissue, especially applicable to cell surface marker demonstration. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 56(1),111–114.
41. National Research Council (US). (2011). Committee for the update of the guide for the care and use of laboratory animals. *Guide for the care and use of laboratory animals*.
42. Nelson ER, Wardell SE, McDonnell DP (2013). The molecular mechanisms underlying the pharmacological actions of estrogens, SERMs and oxysterols; Implications for the treatment and prevention of osteoporosis. *Bone* 2013, 53(1), 42-50.
43. Neyro J, Cano A; Palacios S. (2011). Regulación del metabolismo óseo a través del sistema RANK-RANKL-OPG. *Revista de Osteoporosis y Metabolismo Mineral*, 3(2), 105-112
44. Ngo ET, Chapados NA, Lavoie J-M (2014). LDL receptor and Pcsk9 transcripts are decreased in liver of ovariectomized rats: Effects of exercise training. *Horm Metab Res*, 46(8), 550–555
45. 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(1), 117-122.

46. Organization for Economic Co-operation and development (2007). A short-term screening test for estrogenic properties. OECD guidelines for the testing of chemicals 440.
47. Pankova S, Tsvetkova D (2015). Role of phytoestrogens in prevention of osteoporosis. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*. 7(2),1-6.
48. Pérez R, Villanueva S, Cosío R (2005). El aceite de aguacate y sus propiedades nutricionales. *E-Gnosis*. 3(10), 0–11.
49. Peterson DW. (1951). Effect of soybean sterols in the diet on plasma and liver cholesterol in chicks. *Proc Soc Exp Biol Med*. 78(1), 143–7.
50. Poluzzi E, Piccini C, Raschi E, Rampa A, Recanatini M, Ponti F. (2014). Phytoestrogens in postmenopause: The state of the art from a chemical, pharmacological and regulatory perspective. *21 (4)*, 417-436.
51. Potu BK, Rao MS, Nampurath GK, Chamallamudi MR, Nayak SR, Thomas H (2010). Anti-osteoporotic activity of the petroleum ether extract of *Cissus quadrangularis* Linn. in ovariectomized Wistar rats. *Chang Gung Medical Journal*, 33(3), 252–257.
52. Rocha G, Sierralta W, Valladares L (2016). 27- Hydroxycholesterol reverses estradiol induced inhibition of platelet aggregation in postmenopausal women. *Revista médica de Chile*. 144(11), 1377-1381.

53. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML y col. (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results from the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA*, 288(3), 321-333.
54. Santollo, J. (2010). Estradiol, mch and food intake. Florida state university. Florida, EEUU.
55. Semler DE, Cox S, Chengelis CP. (1992). The Rat. En: Cox S y Chengel CP (eds), *Animal Models in Toxicology*. Marcel Dekker, New York.
56. Shi C, Wu F, Zhu X y Xu J (2013). Incorporation of β -sitosterol into the membrane increases resistance to oxidative stress and lipid peroxidation via estrogen receptor-mediated PI3K/GSK3 β signaling. *Biochimica et Biophysica Acta General Subjects*, 1830(3), 2538–2544.
57. Solis C. (2016). Evaluación del efecto agudo de aceite de palta y fitoesteroles en un modelo roedor de menopausia. Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile.
58. Swischer H (1988). Avocado oil from food use to skin care. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 65(1), 1704–1706.

59. Tchernitchen AN. (1973). Fine structure of rat uterine eosinophils and the possible role of eosinophils in the mechanisms of estrogen action *J Steroid Biochem.* 4(3), 277-82.
60. Tchernitchen AN & Galand P. (1982). Dissociation of separate mechanisms of estrogen action by actinomycin D. *Experientia*, 38(4), 511-3.
61. Thakur A, Mandal S, Banerjee S (2016). Compounds of natural origin and acupuncture for the treatment of diseases caused by estrogen deficiency. *Journal of Acupuncture and Meridian Studies*, 9(3), 1-9.
62. Tresguerres J.A.F. (1995). Biosíntesis de las hormonas sexuales en el ovario. En Botella J (Ed), *Ovario: fisiología y patología* (pp. 49–55). Madrid, España: Editorial Díaz de Santos.
63. Tresguerres J, Castillo C (2010). Fisiología humana: fisiología del eje-hipotálamo-hipófisis-ovárico. (pp 1008-1022). Barcelona, España: McGraw-Hill Editorial.
64. Velásquez N. (2011). El papel de los esteroides sexuales en la distribución de la grasa corporal y su relación con la obesidad del síndrome de ovario poliquístico. *Revista de Obstetricia y Ginecología de Venezuela*, 71(1), 49-64.
65. Vozmediano A. (2013). Evaluación del efecto subcrónico de 28 días, del aceite de palta en un modelo roedor de menopausia. Internado para optar al título de Químico Farmacéutico, Universidad de Valparaíso, Valparaíso, Chile.

66. Vrtacnik P, Ostanek B, Mencej S, Marc J (2014). The many faces of estrigen signaling. 24(3), 329-342.

67. Welsh U, Sobotta J (2010). Histología: tejidos. (pp 131-146). Munich: Editorial panamericana.

Anexo 1.



CBI – Facultad de Farmacia

ACTA DE EVALUACIÓN 010/2016

El Comité de Bioética para la Investigación (CBI) de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso, constituido por Sergio Blaimont, Asesor Jurídico externo y los académicos de la Facultad de Farmacia, Prof. Rafael Jiménez (Presidente del CBI), Prof. Raúl Vinet (Secretario del CBI), Prof. Claudia Vega (Miembro del CBI) y Prof. Marcela Escobar (Miembro del CBI) declara haber evaluado el protocolo experimental del proyecto "EFECTO DE FITOESTEROLES EN LA DESCALCIFICACIÓN ÓSEA EN UN MODELO ROEDOR DE MENOPAUSIA" presentado por los estudiantes Daniela Pinto y Elio Montiel y dirigido por la Prof. María Fernanda Cavieres.

Para su evaluación, el CBI revisó los antecedentes contenidos en la "SOLICITUD PARA LA APROBACIÓN DE INVESTIGACIÓN QUE INVOLUCRE A ANIMALES COMO SUJETOS DE INVESTIGACION (Versión Julio 2015). La solicitud incluye como anexos: (1) Protocolo de supervisión de animales y (2) CV de Prof. María Fernanda Cavieres.

Objetivo del Estudio. El estudio plantea como objetivo general el efecto de fitoesteroles y del aceite de palta en el proceso de descalcificación ósea en un modelo roedor de menopausia.

Metodología. Para generar el modelo roedor de menopausia se utilizan 24 ratas hembras Sprague-Dawley (10-12 semanas) con ciclo estral estable. El procedimiento de anestesia y ovariectomización se realiza bajo protocolo OECD-440. Para validar la efectividad de la operación se sigue el ciclo estral por al menos 5 días y se confirma el mantenimiento del anestro. Finalizada la respuesta estrogénica los animales se asignan aleatoriamente a los grupos de tratamiento respectivo.

Acta CBI 010/2016

- I. El CBI considera que los objetivos del proyecto han sido bien definidos y que la metodología asociada a sus logros se ha establecido adecuadamente.
- II. En la valoración bioética del proyecto, el CBI no objetó otro aspecto que pudiera estar relacionado con el proyecto.
- III. Por lo anterior, el CBI de la Facultad de Farmacia APRUEBA el protocolo experimental, tal y cual se señala en el proyecto.

Firman el Acta los miembros del Comité:



Marcela Escobar



Claudia Vega



Sergio Blaimont



Rafael Jiménez



Raúl Vinet

Valparaíso, 09 de septiembre de 2016

