

**EVALUACIÓN DE PARÁMETROS REDOX EN TEJIDO ÓSEO EN UN  
MODELO ROEDOR MENOPAÚSICO**

**SEMINARIO DE TÍTULO PARA OPTAR AL GRADO DE LICENCIADO EN  
KINESIOLOGÍA**

**Autores:   ANGÉLICA CONTRERAS ALBORNOZ  
                  MARÍA JOSÉ HERNÁNDEZ VELIS**

**Directora de Tesis:       Marilyn Paz Araos. MSc**

**Co-Director:               Carlos Jara Gutiérrez. MSc**

**Escuela de Kinesiología  
Facultad de Medicina  
Universidad de Valparaíso**

Valparaíso – Chile 2017



## DEDICATORIA

*“A mi madre Marcela Ivonne Velis por el amor y apoyo incondicional de toda la vida; a mis hermanas y pololo por creer en mí, entregándome el cariño y paciencia suficiente en esta hermosa etapa; y por último a mi padre José Luis Hernández por entregarme el rigor, fuerza y a la vez serenidad para poder enfrentar los obstáculos que la vida depone. La compañía de Dios en este camino llamado vida”.*

María José Hernández Velis

*“A Dios por sus muchas bendiciones; a mi madre Ma. Angélica Albornoz por ser un pilar fundamental para mi vida y acompañarme en cada paso que doy; a mi padre Raúl Contreras por creer en mis sueños y darme las fuerzas para seguir a pesar de las dificultades; a mis hermanos y amigos/as por el cariño y apoyo entregado durante todo este maravilloso proceso; y por último a aquellos profesores/as que no sólo me han ayudado en mi formación profesional, sino que también me han enseñado a ser una mejor persona”.*

Angélica Contreras Albornoz

## **AGRADECIMIENTOS**

Agradecer a la profesora Fernanda Cavieres y a su equipo de nutricionistas del Laboratorio de Toxicología de la Facultad de farmacia de la Universidad de Valparaíso, por permitirnos colaborar en su proyecto de investigación, aportando con evidencia científica respecto a los parámetros REDOX en su modelo experimental.

Gracias infinitas a nuestra directora de tesis Marilyn Paz Araos y a nuestro co-director Carlos Jara Gutiérrez, quienes además de cumplir el rol de docentes, fueron una familia para nosotras en esta etapa. En donde aceptaron el compromiso de trabajar en conjunto, creyendo en nosotras y en nuestras capacidades, permitiéndonos ser parte de esta hermosa experiencia, lo cual abrió las puertas de un camino poco conocido para nosotras. A su vez, siempre nos brindaron su incondicional compañía, apoyo, aprendizaje, responsabilidad, dedicación y paciencia, como también el humor especial que los caracteriza, haciéndonos sentir acogidas y pertenecientes a este maravilloso mundo de la investigación. Le agradecemos el habernos enseñado a disfrutar lo que se está haciendo, el seguir adelante a pesar de las adversidades, el preocuparse por nosotras con detalles que enriquecen el alma dándonos siempre una palabra de aliento cuando las cosas parecían difíciles. Agradecemos también, el cariño

fraterno demostrado durante este largo, pero lindo proceso, y el estar siempre presentes ayudándonos en cada momento. Finalmente les agradecemos por cada consejo y palabra sabia lo cual nos ha ayudado a crecer, fortaleciendo nuestras debilidades, tanto como personas y como futuras profesionales.

Agradecer también, a los profesores que nos apoyaron y contribuyeron de alguna u otra forma a que el proyecto de investigación se llevara a cabo.

Por último, gracias a nuestras familias y a Dios por acompañarnos en este arduo camino, con su apoyo incondicional, paciencia y cariño infinito en todo momento, siempre empujándonos y ayudándonos a concretar nuestras metas.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS .....	X
ABREVIATURAS Y/O SIGLAS .....	XII
ABSTRACT .....	XVI
RESUMEN .....	XVII
1. INTRODUCCIÓN .....	1
2. MARCO TEÓRICO .....	5
2.1 MENOPAUSIA.....	6
2.1.1 Definición.....	6
2.1.2 Descripción.....	7
2.1.3 Menopausia Precoz.....	7
2.1.4 Incidencia .....	8
2.1.5 Importancia.....	10
2.1.6 Efectos Hormonales .....	11
2.1.7 Fisiología .....	13
2.1.8 Efecto Sistémico.....	15
2.1.8.1 A Nivel Cardiovascular.....	15
2.1.8.2 A Nivel Vasomotor.....	16

2.1.8.3 A Nivel del Endometrio y el Tracto Urogenital.....	17
2.1.8.4 A Nivel de Hueso.....	18
2.1.9 Envejecimiento .....	21
2.1.10 Osteoporosis / Fracturas .....	22
2.2 ESTRÉS OXIDATIVO.....	23
2.2.1 Definición.....	23
2.2.2 Radicales Libres .....	23
2.2.3 Especies reactivas del Oxígeno (ROS) y Nitrógeno (RNS) .....	25
2.2.4 Fuentes de ROS Y RNS.....	28
2.2.5 Sistemas Antioxidantes .....	30
2.3 MENOPAUSIA Y ESTRÉS OXIDATIVO.....	34
2.3.1 Rol del Estradiol.....	34
2.3.1.1 Sistema Nervioso Central.....	35
2.3.1.2 Sistema Cardiovascular.....	35
2.3.1.3 Tejido Óseo.....	36
2.4 TRATAMIENTOS ESTROGÉNICOS.....	42
2.4.1 Fitoestrógenos.....	42
2.4.2 Fitoesteroles.....	43
2.4.3 Aceite de Palta .....	44
3. HIPOTESIS.....	46

4. OBJETIVOS.....	46
4.1 Objetivo General.....	46
4.2 Objetivos Específicos .....	46
5. MATERIALES .....	47
5.1 Determinación de Parámetros REDOX .....	47
6. MÉTODOLÓGÍA .....	49
6.1 Condiciones Generales .....	49
6.2 Animales de Experimentación .....	49
6.3 Generación de Modelo Menopáusico .....	50
6.4 Grupos de Tratamientos .....	51
6.5 Preparación de Alimento .....	53
6.6 Recolección de Muestras .....	53
6.7 Variables medidas .....	54
6.8 Determinación de Biomarcadores REDOX.....	55
6.9 Análisis de Biomarcadores REDOX.....	56
6.9.1 Determinación de Daño Oxidativo .....	56
6.9.1.1 Ensayo TBARS.....	56
6.9.2 Determinación de Defensa Antioxidante .....	57
6.9.2.1 Actividad de Catalasa.....	57



6.9.2.2 Proteínas Totales.....	57
6.9.2.3 Capacidad Antioxidante Total.....	58
6.10 Análisis Estadístico.....	59
7. RESULTADOS.....	60
7.1 MORFOMETRÍA ÓSEA.....	61
7.2 DAÑO OXIDATIVO.....	63
7.2.1 Lipoperoxidación.....	63
7.3 CAPACIDAD DE DEFENSA ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS.....	65
7.3.1 Actividad de Catalasa.....	65
7.4 CAPACIDAD DE DEFENSA ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICA.....	67
7.4.1 Capacidad Antioxidante Total.....	67
8. DISCUSIÓN.....	69
8.1 RELEVANCIA CLÍNICA.....	78
9. CONCLUSIÓN.....	81
10. REFERENCIAS.....	82
11. ANEXOS.....	90

## ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS

### Índice de Tablas.

Tabla 1. Resumen Estadístico de Mujeres en Edad Menopáusica en el Mundo por Regiones, 1990 a 2030.....	9
Tabla 2. Composición del aceite de palta.....	44
Tabla 3. Reactivos para determinar parámetros REDOX.....	48
Tabla 4. Distribución de Grupos de Tratamiento.....	52
Tabla 5. Variables de Estudio.....	54
Tabla 6. Abreviaturas de grupos de estudio.....	60

## Índice de Figuras

Figura 1. Fisiología del proceso de menopausia.....	14
Figura 2. Resorción ósea y la relación osteoclasto/osteoblasto.....	20
Figura 3. Fuentes generadoras de $O_2^{\bullet-}$ .....	29
Figura 4. Rol del estrés oxidativo en la mineralización ósea.....	37
Figura 5. Rol del estrés oxidativo en la mineralización ósea.....	38
Figura 6. Histología del corte longitudinal de tejido óseo.....	62
Figura 7. Lipoperoxidación en macerado de tejido óseo correspondiente a una sección de la tibia proximal.....	64
Figura 8. Actividad de CAT.....	66
Figura 9. Capacidad antioxidante total medida.....	68

## **ABREVIATURAS Y/O SIGLAS**

**ABAP:** 2,2'-azobis (2-amidinopropano).

**ABTS:** 2,2'-azinobi (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico).

**ADN:** Ácido Desoxirribonucleico.

**AMH:** Hormona Anti-Müllerian.

**AOX:** Antioxidantes.

**AP:** Aceite de Palta.

**AR:** Androstanolona.

**AT-II:** Receptor de Angiotensina II.

**βSSG:** β-sitosterol.

**CA:** Anhidrasa Carbónica.

**CaK:** Catepsina K.

**CAT:** Catalasa.

**CM:** Cavidad Medular.

**Cu:** Cobre.

**DHT:** Dihidrotosterona.

**e-:** Electrón.

**E2:** 17-β-estradiol.

**EC:** Espesor Cortical.

**ERK:** Quinasas Reguladas por Señales Extracelulares.

**ERs:** Receptores de Estrógeno.

**FasL:** Fas ligando.

**FE:** Fitoesterol.

**Fe<sup>2+</sup>:** Ion Ferroso 2.

**Fe<sup>3+</sup>:** Ion Ferroso 3.

**Fig.:** Figura

**FOXO:** Proteínas Forkhead.

**FSH:** Hormona Folículo Estimulante.

**GnRH:** Gonadotropina.

**GPx:** Glutación Peroxidasa.

**GR:** Glutación Reductasa.

**GSH:** Glutación Reducido.

**GSSH:** Reducción del Glutación Oxidado.

**H<sup>+</sup>:** Hidrogenión.

**HDL:** Lipoproteína de Alta Densidad.

**HIF1 $\alpha$ :** Factor 1 Inducible por Hipoxia.

**4-HNE:** 4-hidroxinonenal.

**H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>:** Peróxido de Hidrógeno.

**IL:** Interleuquina.

**INE:** Instituto Nacional de Estadística.

**IOF:** Fundación Internacional de Osteoporosis.

**LDL:** Lipoproteína de Baja Densidad.

**LEF:** Factor de Potenciación Linfoide.

**LH:** Hormona Luteinizante.

**MDA:** Malondialdehido.

**Mn:** Magnesio.

**NADH:** Nicotinamina Adenina Dinucleótido Deshidrogenasa.

**NADPH:** Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato.

**NF- $\kappa$ B:** Factor Nuclear Potenciador de las Cadenas Ligeras kappa de las Células B Activadas.

**Nrf2:** Factor Nuclear Eritroide 2 Relacionado con el Factor 2.

**O<sub>2</sub>:** Oxígeno.

**O<sub>2</sub><sup>•-</sup>:** Anión Superóxido.

**OH<sup>•</sup>:** Radical de Hidroxilo.

**OMS:** Organización Mundial de la Salud.

**ON:** Óxido Nítrico.

**ONOO:** Peroxinitrito.

**OPG:** Osteoprogenitora.

**OVX:** Ovarioectomización.

**pH:** Potencial de Hidrógeno.

**PKC $\beta$ :** Proteína Kinasa $\beta$ .

**PPAR $\gamma$ :** Factor Proliferador de Peroxisomas Gamma.

**PTH:** Paratohormona.

**RANK:** Receptor Activador del Factor Nuclear kappa Beta.

**RANKL:** Receptor Activador del Factor Nuclear kappa Beta Ligando.

**RCA:** Reactivo Cobre Alcalino.

**REDOX:** Reacción de Reducción-Oxidación.

**RNS:** Especies Reactivas de Nitrógeno.

**ROS:** Especies Reactivas del Oxígeno.

**SOD:** Superóxido Dismutasa.

**TBA:** Ácido Tiobarbitúrico.

**TBARS:** Sustancias Reactivas al Ácido Tiobarbitúrico.

**TCA:** Ácido Tricloroacético.

**TCF:** Factores de Transcripción del Factor de Células T.

**TEAC:** Capacidad Antioxidante Equivalente a Trolox.

**TNF- $\alpha$ :** Factor de Necrosis Tumoral Alfa.

**TRAP:** Total Radical Peroxyl Trapping.

**Zn:** Zinc.

## ABSTRACT

**Introduction.** Menopause is defined as a normal physiological process in women, where there is a cessation of ovarian follicular activity and with it the menstrual cycle, which leads to a decrease in the synthesis and secretion of estradiol, which exerts its function in the cardiovascular, central nervous and bone systems. This decrease will affect the REDOX regulation and balance, increasing the oxidative damage in different tissues. This is the case of bone tissue, where oxidative damage is involved in decreasing its density. To counteract the negative effect of the REDOX imbalance, there are certain foods that possess estrogenic capacity, in addition to antioxidants that could regulate and avoid processes such as osteoporosis. Therefore, we have decided to evaluate the REDOX parameters in bone tissue in the menopausal rodent model with estrogenic treatments.

**Material and method.** The use of animals was carried out under standard bioethics procedures (Guide for the care and use of laboratory animals, 2011) (bioethics certificate Acta 010/2016). For the rodent model of menopause, 20 females were selected from the Sprague-Dawley strain, which were ovariectomized (OVX) (protocol OECD 440, 2007), using another 5 rats as NO OVX control. 2 months after the OVX, estrogenic treatments were administered for 35 days. The groups were randomly assigned according to the following distribution: G0: NO OVX; G1: OVX; G2: OVX + estradiol; G3: OVX + Vegetable oil; G4: OVX + Phytosterols. After this time, REDOX parameters (antioxidant defense CAT and TRAP, oxidative damage TBARS) were determined in the bone tissue of each study group (section of the proximal tibia).

**Results and Discussion.** There are significant differences in the REDOX parameters when G0 is compared with the rest of the experimental groups. The latter have a high level of oxidative damage and low antioxidant capacity with respect to the control, which is favorably modified in those with estrogenic treatment.

**Conclusion.** There are natural products that present in their chemical composition different compounds that induce an estrogenic and antioxidant response, which attenuates bone deterioration, thus regulating the REDOX state.

**Key words:** Menopause, oxidative stress, reactive oxygen species, REDOX balance, osteoporosis, estrogenic treatments.



## RESUMEN

**Introducción.** La menopausia es definida como un proceso fisiológico normal en la mujer, donde existe un cese de la actividad folicular ovárica y con ello del ciclo menstrual, lo que conlleva a una disminución en la síntesis y secreción de estradiol, el cual ejerce su función en los sistemas cardiovascular, nervioso central y óseo. Dicha disminución va a afectar la regulación y el equilibrio REDOX, aumentando el daño oxidativo en diferentes tejidos. Es el caso del tejido óseo, donde el daño oxidativo está involucrado en la disminución de su densidad. Para contrarrestar el efecto negativo del desbalance REDOX, existen ciertos alimentos que poseen capacidad estrogénica, además de antioxidantes que podrían regular y evitar procesos como osteoporosis. Por lo que, nos hemos planteado evaluar los parámetros REDOX en tejido óseo en el modelo roedor menopáusico con tratamientos estrogénicos.

**Material y Método.** La utilización de animales se llevó a cabo bajo procedimientos estándares de bioética (Guide for the care and use of laboratory animals, 2011) (certificación bioética Acta 010/2016). Para el modelo roedor de menopausia, se seleccionaron 20 hembras de la cepa Sprague-Dawley las cuales fueron ovariectomizadas (OVX) (protocolo OECD 440, 2007), utilizando otras 5 ratas como control NO OVX. 2 meses después de la OVX, se administraron durante 35 días los tratamientos estrogénicos. Los grupos fueron designados aleatoriamente según la siguiente distribución: G0: NO OVX; G1: OVX; G2: OVX + estradiol; G3: OVX + Aceite de palta; G4: OVX + Fitoesteroles. Transcurrido el tiempo, se determinaron parámetros REDOX (defensa antioxidante CAT y TRAP; daño oxidativo TBARS) en el tejido óseo de cada grupo de estudio (sección de la tibia proximal).

**Resultados y Discusión.** Existen diferencias significativas en los parámetros REDOX cuando se compara G0 con el resto de los grupos experimentales. Estos últimos poseen un elevado nivel de daño oxidativo y baja capacidad antioxidante con respecto al control, el cual es modificado favorablemente en aquellos con tratamiento estrogénico.

**Conclusión.** Existen productos naturales que presentan en su composición química diferentes compuestos que inducen una respuesta estrogénica y antioxidante, lo que atenúa el deterioro óseo, regulando así el estado REDOX.

**Palabras Claves:** menopausia, estrés oxidativo, especies reactivas del oxígeno, balance REDOX, osteoporosis, tratamientos estrogénicos.

## 1. INTRODUCCIÓN

La menopausia es un proceso fisiológico normal en la mujer, que comienza a la edad de 45 a 55 años, donde existe un cese de la actividad folicular ovárica y con ello del ciclo menstrual, definiéndose después de transcurrido un año de la última menstruación, donde existe una disminución de la síntesis y secreción de estradiol (Doshi SB. & Agarwal A, 2013), el cual presenta una función reguladora a nivel de los diferentes sistemas, como el Sistema Reproductivo, Cardiovascular, Sistema Nervioso Central y en Tejido Óseo. Además, al estradiol se le atribuyen propiedades que pueden actuar como moduladoras de la actividad antioxidante (Sharma T. et al 2015). La menopausia se presenta en una edad laboralmente activa y que afecta, tras los cambios que se generan, la salud y calidad de vida de las mujeres (Davis et al 2015).

A lo largo del tiempo se ha estudiado las diversas funciones que presentan las especies reactivas del oxígeno (ROS), las cuales forman parte de distintos mecanismos de señalización y de regulación. Dentro de los que se encuentra la inducción en la síntesis de antioxidantes, procesos de reparación, inflamación, controlan la migración celular, proliferación, supervivencia y apoptosis. Todo esto dependiendo del tipo de célula, del oxidante que la genere y de su intensidad. (Marotte C. & Zeni S., 2013). Sin embargo, cuando existe un desbalance en la

producción de ROS y de su regulación, se produce estrés oxidativo, lo que se define como “un desequilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes” (Sekhon L. & Argawal A., 2013), en donde los elementos celulares se ven expuestos a diversas fuentes que van a producir una alteración en el balance entre las sustancias prooxidantes y los mecanismos antioxidantes (AOX) quienes son los encargados de disminuir la producción de ROS. Esto puede ocurrir por un déficit de las defensas AOX, o por un incremento exagerado en la producción de ROS. (Gutiérrez J., 2002).

Se ha visto que el declive de estrógenos puede afectar el equilibrio REDOX aumentando los niveles de daño oxidativo en los diferentes tejidos, especialmente en el Tejido Óseo donde el aumento de ROS se involucra la disminución de su densidad por el aumento de la resorción tras la activación osteoclastica (Doshi S. et al 2013).

Durante los últimos años se han sugerido el uso de diversos tratamientos para mujeres en la menopausia en lugar del reemplazo hormonal tradicional. Esto debido a que no todas las mujeres posmenopáusicas con síntomas de la menopausia se consideran candidatas probables para recibir terapia hormonal, y porque el tratamiento de reemplazo hormonal está asociado a riesgo de desarrollar cáncer de mama, accidente cerebrovascular y/o complicaciones cardiovasculares. Dentro de los tratamientos alternativos que se sugieren

incluyen medicamentos no hormonales, remedios herbales, vitaminas, minerales y suplementos antioxidantes entre otros. En base a esto último, se ha visto que una dieta balanceada con cantidades adecuadas de vitaminas, minerales y otros nutrientes juega un papel importante en la prevención y el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, osteoporosis, obesidad, diabetes, cáncer, depresión y otras enfermedades relacionadas con la menopausia (Behr et al 2012). En base a esto, se ha estudiado la existencia de ciertos alimentos que posean propiedades estrogénicas (D`Abrosca B. et al 2017) las cuales podrían regular el equilibrio REDOX en hueso. En estudios previos realizados 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. Además, debido a que el fitoesterol presenta dentro de sus componentes  $\beta$ -sitosterol, este sería capaz de unirse a los receptores de estrógeno RE $\alpha$  y con mayor afinidad al RE $\beta$  y actuar de la misma forma que el estradiol en los diferentes sistemas (Ju et al, 2004). Por otra parte, el aceite de palta presenta dentro de sus compuestos fitoesterol y ácidos grasos teniendo en mayor proporción el ácido oleico, elemento que le confieren la propiedad de ser un alimento con capacidad antioxidante (Moreno et al 2015) además de su propiedad estrogénica que le permite regular los niveles de daños que se producen tras la disminución del estradiol. A pesar de esto, falta evidencia que respalde por medio de estudios clínicos y de ciencias básicas los mecanismos y los verdaderos efectos de estos tratamientos sobre el balance REDOX en tejido

óseo, por lo que se hace interesante investigar cuales son los efectos que poseen estos tratamientos estrogénicos como el Aceite de Palta y Fitoesteroles, sobre los parámetros REDOX, los que pudiesen ser una alternativa terapéutica para tratar las manifestaciones en la menopausia y en el contexto de esta investigación atenuar o enlentecer los procesos vinculados a la osteoporosis.

Esta investigación se llevó a cabo bajo la aprobación del comité de bioética de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso (Anexo 1) en las dependencias del Laboratorio de Toxicología de la Facultad de farmacia y en el Laboratorio de Investigación de Estrés Oxidativo de la Escuela de Kinesiología, Facultad de Medicina, de la Universidad de Valparaíso, durante el año 2017.

## 2. MARCO TEÓRICO

Las mujeres al entrar a la etapa de menopausia disminuyen la síntesis y a su vez la secreción de estradiol, el cual ejerce una función reguladora a nivel de los diferentes sistemas, tales como: a nivel del Sistema Reproductivo, Sistema Cardiovascular, Sistema Nervioso Central y en Tejido Óseo. El estradiol, por otra parte, hay referencias que le asignan una función antioxidante (Sharma T. et al 2015) por lo que el declive de estradiol puede afectar el equilibrio REDOX aumentando los niveles de daño oxidativo en los diferentes tejidos, y particularmente en el caso del Tejido Óseo donde el aumento de ROS se involucra en la disminución de su densidad (Doshi S. et al 2013), sin embargo, es probable que existan ciertos alimentos que posean propiedades estrogénicas (D`Abrosca B. et al 2017) quienes podrían regular el equilibrio REDOX en hueso.

## **2.1 MENOPAUSIA**

### **2.1.1 Definición**

La menopausia según la Organización Mundial de la Salud (OMS) se define como “cese permanente de la menstruación, determinado de manera retrospectiva, después de 12 meses consecutivos de amenorrea, sin causas patológicas”. Por otra parte, en el ámbito clínico la menopausia es definida como un proceso fisiológico normal en la mujer, donde existe un cese de la actividad folicular ovárica y con ello el ciclo menstrual, definiéndose después de transcurrido un año de la última menstruación, donde existe una disminución de las hormonas sexuales tales como estrógeno y progesterona (Doshi SB. & Agarwal A, 2013). Dicho proceso, se encuentra precedido por lo que se conoce como transición a la menopausia, el cual constituye al período de irregularidad del ciclo menstrual, y constituye la pérdida gradual de la producción de folículos ováricos (Doshi SB. & Agarwal A, 2013).

Por lo tanto, estamos hablando de un fenómeno totalmente natural sin una connotación patológica o de enfermedad, al que todas las mujeres se ven expuestas en una etapa determinada de sus vidas, generando una serie de alteraciones y sintomatología en diferentes órganos y sistemas, que van a repercutir en la calidad de vida de las mujeres menopaúsicas.

### **2.1.2 Descripción (rango etario)**

La menopausia se encuentra comprendida entre los 45 y 55 años, siendo la edad promedio los 50-52 años, esto se cumple en las diferentes culturas y razas. Sin embargo, puede existir el cese de la menstruación antes de los 40 años, lo cual es considerado como la menopausia precoz (Dul A., 2009).

### **2.1.3 Menopausia Precoz**

La menopausia está asociada al proceso de envejecimiento reproductivo, por ende, es catalogado como un proceso natural por el cual toda mujer ha de pasar. Sin embargo, pueden existir otras causas que adelanten la menopausia sin estar asociado directamente con los cambios que existen producto del envejecimiento (Doshi SB. & Agarwal A, 2013). Dentro de las causas a las que se le hace mención son las cirugías como la histerectomía (extracción del útero) y la ligadura tubárica; la quimioterapia; la insuficiencia ovárica prematura, el hábito tabáquico; un alto índice de masa corporal; la diabetes mellitus tipo 1; el hecho de que no haya tenido embarazos anteriormente y por último, las causas producto de una mala acción médica (daño iatrogénico) (Dul A., 2009).



#### **2.1.4 Incidencia**

Alrededor del 10% de la población mundial está en el período postmenopáusico y cerca de 25 millones de mujeres en el mundo entero, entran en este período cada año.

En el año 1990 la población mundial que se encontraba en la edad promedio de inicio de la menopausia era de aproximadamente 470 millones de mujeres, donde 128 millones (un 27% del total) correspondían a países desarrollados (economía de mercado) y sólo el 7% correspondían a Latinoamérica, África y el Medio Oriente. Sin embargo, para el 2030 se estima que el número total de mujeres postmenopáusicas a nivel mundial ascenderá alcanzando 1.200 millones representado en la **Tabla 1** (Hill K., 1996).

**Tabla 1. Resumen Estadístico de Mujeres en Edad Menopáusica en el Mundo por Regiones, 1990 a 2030. (Hill, 1996)**

<i>(a) Numbers of Women Aged 50 and Over ('000)</i>					
Region	Year				
	1990	2000	2010	2020	2030
Sub-Saharan Africa	26,022	34,280	45,714	63,599	90,735
India	57,570	72,000	94,911	127,909	168,507
China	92,986	115,388	160,240	227,557	281,353
Other Asia & Islands	44,394	57,610	82,314	116,470	154,749
Latin America	31,088	42,083	60,140	84,454	111,751
Middle Eastern Crescent	29,551	38,085	54,767	77,133	106,529
Ex Socialist Europe	57,367	62,642	72,449	75,797	81,748
Market Economies	128,112	147,352	171,615	194,544	205,823
World	467,090	569,440	742,150	967,463	1,201,195
<i>(b) Proportion Women Aged 50 and Over of Total Population (%)</i>					
Sub-Saharan Africa	5.10	5.00	5.09	5.62	6.62
India	6.78	7.16	8.23	9.96	11.97
China	8.20	8.92	11.28	14.77	17.08
Other Asia & Islands	6.50	7.16	8.96	11.38	13.82
Latin America	7.00	7.97	9.96	12.44	14.99
Middle Eastern Crescent	5.87	5.87	6.77	7.86	9.21
Ex Socialist Europe	16.57	17.37	19.30	19.50	20.41
Market Economies	16.06	17.54	19.72	21.87	22.85
World	8.87	9.23	10.53	12.22	13.73
<i>(c) Median Age of the Female Population Aged 50 and Over</i>					
Sub-Saharan Africa	59.8	59.8	59.8	59.8	59.9
India	60.1	60.6	60.4	60.6	61.5
China	61.6	61.8	60.6	61.2	63.7
Other Asia & Islands	60.3	60.9	59.9	60.7	62.2
Latin America	61.2	61.2	61.0	61.7	63.1
Middle East Crescent	60.6	61.2	59.9	60.7	61.5
Ex Socialist Europe	63.8	65.6	64.2	66.4	67.9
Market Economies	64.9	65.0	64.8	66.1	68.2
World	62.2	62.4	61.7	62.2	63.5

### **2.1.5 Importancia**

Las mujeres hoy en día a nivel país tienen una mayor participación en el campo laboral, lo cual queda demostrado tras la encuesta nacional de empleo del año 2016 realizada por el instituto nacional de estadística (INE), que comprobó que cerca del 48% de las mujeres mayores de 15 años se encuentran en actividad laboral, a su vez, el 62,2% son mujeres sobre los 45 años que participan en alguna actividad laboral y el 59,4% se encuentran en alguna ocupación. Por otra parte, existe una tendencia mundial con un número mayor de mujeres en relación con el número de hombres, sin embargo, son las mujeres quienes presentan una mayor esperanza de vida. En Chile existen cerca de 7.414.844 mujeres, dentro de las cuales 1.934.210 corresponden al rango etario de 45 años y más, siendo éste el grupo mayoritario en nuestro país. Por consiguiente, si se considera el rango etario en el cual las mujeres comienzan el proceso de menopausia corresponde a una edad laboralmente activa que se puede ver alterada y/o mermada por comorbilidades asociadas a los efectos de la menopausia.

### **2.1.6 Efectos Hormonales**

El control hormonal que determina la madurez folicular depende del eje Hipotálamo-hipófisis –gonadal, que modula la etapa reproductiva en la mujer. Durante la pre-menopausia existe una regulación del ciclo menstrual mediante la liberación de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), la cual estimula la síntesis y liberación de la hormona folículo estimulante (FSH) y hormona luteinizante (LH) por la glándula pituitaria anterior. A través del aumento de FSH se estimula la producción, a nivel de los folículos ováricos, de estradiol e inhibina B, las cuales van a realizar un feedback sobre la hipófisis e hipotálamo regulando de esta forma, la producción de GnRH, LH y FSH. Esta producción coordinada y programada permite el desarrollo de los folículos ováricos, ovulación y menstruación. Sin embargo, tras la menopausia, existe una disminución del número de folículos, por ende, existe una disminución en la producción de estradiol y de inhibina B, lo que conlleva a un cese de la menstruación (Davis SR. et al 2015).

En relación a lo anteriormente descrito, la menopausia genera cambios hormonales, dentro de los que se destaca el aumento de la hormona folículo estimulante (FSH), debido a una disminución de la producción de inhibina B, la cual es una glicoproteína dimérica cuya función es suprimir a la FSH mediante un feedback negativo a nivel de la glándula Pituitaria y el Hipotálamo. Además,

tras el paso de los años en la etapa post-menopáusicas, existe también un aumento de la hormona luteinizante (LH) (Dul A., 2009).

Los órganos reproductivos femeninos jóvenes e indemnes responden de manera óptima a nivel sistémico producto de la acción reguladora que cumple el estradiol, sin embargo, existen varios procesos que contribuyen a disminuir la función ovárica y generar el desarrollo de la menopausia, estos incluyen: hipotálamo y envejecimiento funcional de los ovarios; factores ambientales, genéticos y estilos de vida; y por último sistémico a través de enfermedades. El envejecimiento hipotalámico conduce a la liberación desincronizada de gonadotropina (GnRH) y por ende, una alteración del aumento de la liberación de la hormona luteinizante (LH). Estos cambios en el sistema nervioso central, junto con los ovarios envejecidos, afectan la maduración del folículo ovárico, la producción de hormonas (inhibina B, hormona anti-Müllerian (AMH) y estradiol) y la ovulación. Esto conduce a irregularidades en el ciclo y al aumento de la hormona folículo estimulante (FSH) (Davis SR. et al, 2015).

Juntamente con el aumento de los niveles de FSH y LH, existe a su vez una disminución importante del estradiol, el cual es una hormona lipofílica cuya función es generar las características sexuales secundarias femeninas; por otra parte, el estradiol permite un control lipídico por medio del aumento de las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y una disminución de las lipoproteínas de

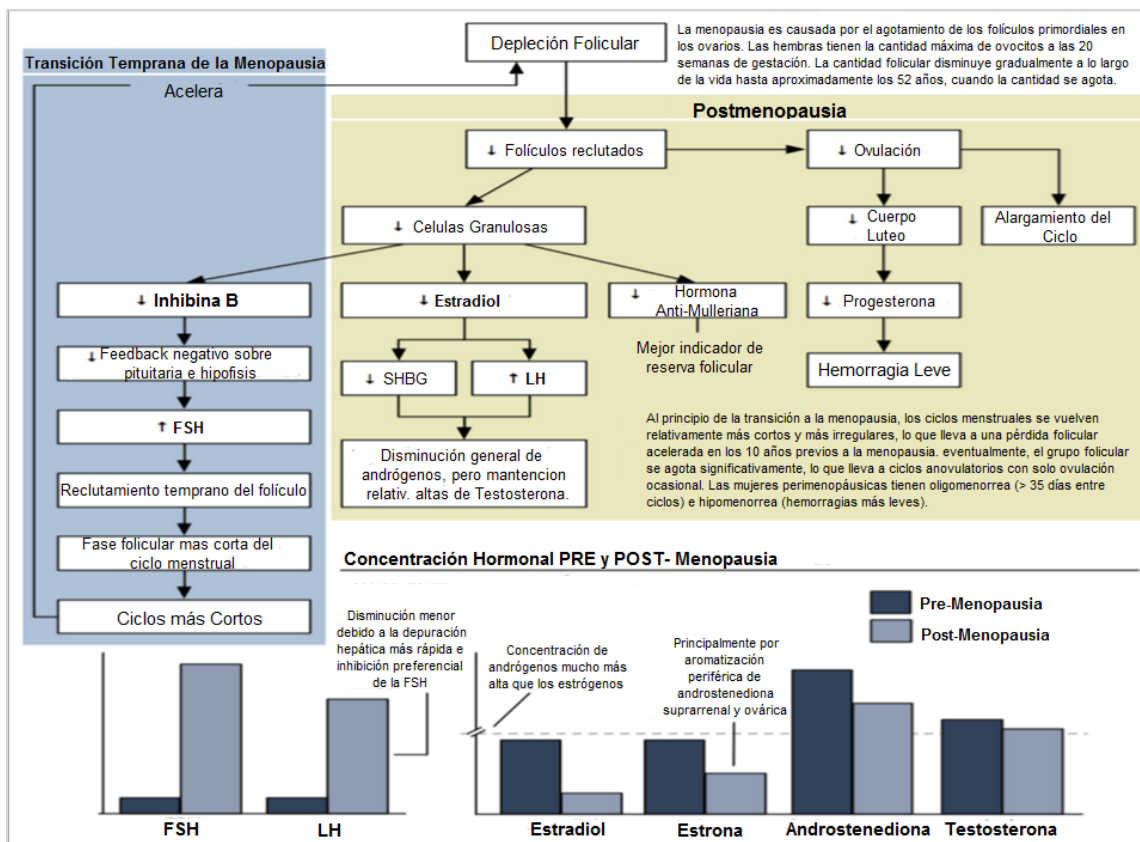
baja densidad (LDL). Además, dentro de sus funciones se le atribuye un rol antioxidante. Sin embargo, las funciones antes descritas se ven alteradas en estados menopaúsicos generando diferentes trastornos en los diferentes sistemas (Dul A., 2009).

Otra hormona que se ve afectada producto de la menopausia es la progesterona, quien disminuye en este proceso y con ello también lo hacen sus funciones principales correspondiente a estimular la etapa secretora del endometrio con el fin de preparar al útero para el embarazo (Doshi SB. & Agarwal A., 2013).

### **2.1.7 Fisiología**

La menopausia es producto de una disminución en la producción de inhibina B, quien corresponde a una glicoproteína dimérica. Ésta en niveles normales genera un feedback negativo en la pituitaria anterior inhibiendo la secreción de la FSH al inicio del ciclo menstrual. Sin embargo, producto del envejecimiento la inhibina B disminuye y con ello el feedback se ve alterado, por lo que se genera un aumento de FSH provocando un aumento en el reclutamiento de folículos y de su liberación acortando el ciclo menstrual y a su vez lo hace más irregular (Fase de transición a la menopausia) (Dul A., 2009). Esto hace que la disponibilidad de folículos disminuya a tal punto que los ovarios dejan de responder al aumento de

FSH, por lo que la ovulación disminuye y con ello la función del cuerpo lúteo, por lo que los niveles de progesterona también se ven afectados. Además, las células granulosas disminuyen su función lo que afecta a su vez la producción de estradiol. El organismo en respuesta a estos cambios aumenta la producción de la LH, la cual va a estimular la secreción de andrógenos (Dul A., 2009) (**Fig. 1**).



**Figura 1. Fisiología del proceso de menopausia (Modificado desde A., 2009).**

## **2.1.8 Efecto Sistémico**

### **2.1.8.1 A nivel cardiovascular**

Tras la disminución del estradiol, se pierden muchas de sus funciones, dentro de ellas es ser un cardio-protector, ya que participa en la formación de vasos colaterales, además se le atribuye efectos favorables sobre la insulina, la glucosa y la estabilidad de las lipoproteínas tales como, la lipoproteína de alta densidad (HDL) y la lipoproteína de baja densidad (LDL). Es por esto, que al existir una variación en los niveles de estrógeno es posible encontrar una alteración a nivel de los ácidos grasos libres, lo que aumenta en ellas el riesgo de padecer aterosclerosis (Doshi SB. & Agarwal A, 2013).

Por otra parte, en las mujeres postmenopáusicas, se ha visto una sobreexpresión de los receptores de angiotensina AT-II, juntamente con una disminución del óxido nítrico (ON) y un aumento de la musculatura lisa a nivel de los vasos sanguíneos, lo cual conlleva a generar disfunción endotelial y por ende una mayor vasoconstricción disminuyendo el flujo hacia los tejidos periféricos, aumentando así el gasto cardiaco. (Doshi SB. & Agarwal A, 2013).



### **2.1.8.2 A nivel vasomotor**

Existen cambios a este nivel que implican sofocos (sensación repentina de calor en la zona del rostro, cuello y pecho) o sudores nocturnos los cuales son seguidos por escalofríos. Esta sensación tiene una duración de 1-5 minutos, siendo más común su ocurrencia por las noches, lo que altera el sueño y provoca una mayor fatiga. Sin embargo, puede darse también producto del estrés, el encontrarse en un ambiente cálido o simplemente por el hecho de haber consumido algún alimento picante y/o irritante (Doshi SB. & Agarwal A, 2013).

La regulación de la temperatura está dada por el centro termorregulador que se ubica en el área preóptica medial del hipotálamo. Cuando existe una disminución del estradiol no se genera un aumento de la estimulación de la norepinefrina, un aumento de la activación de la serotonina y a su vez un aumento de la actividad de los péptidos opioides centrales. Al producirse todas estas activaciones se provocará un estrechamiento de la neutralidad térmica en el centro termorregulador, lo que significa que a un menor ascenso de la temperatura corporal se va a activar los mecanismos para disipar el calor dentro de ellos el sudor y la vasodilatación. Del mismo modo, tras disminuir en pocos grados la temperatura corporal se van a activar los mecanismos para conservar el calor, dentro de ellos los escalofríos y el temblor (Dul A., 2009).

El sofoco se da producto del aumento de la temperatura a nivel central, lo que conlleva a una vasodilatación a nivel de la piel, aumentando la presión arterial sistólica, la frecuencia cardiaca y la tasa metabólica (Dul A., 2009).

### **2.1.8.3 A nivel del endometrio y el tracto urogenital**

En el endometrio producto de la menopausia existe una atrofia del tejido epitelial y con ello una atrofia vaginal, ya que los niveles de estradiol y progesterona, que eran los encargados de estimular la hiperplasia de las células epiteliales, se encuentran disminuidos. Además, existen cambios en el tracto urogenital, en donde hay una disminución de la vascularización de dicha zona lo cual favorece la atrofia (Dul A., 2009).

Por otra parte, se produce irritación, ardor, prurito y falta de lubricación en la zona urogenital, y existen además cambios en el pH en donde este se vuelve más alcalino (pH 4,5) lo que favorece la generación de infecciones. También, existen alteraciones a nivel del tejido conectivo lo que afecta la laxitud de estructuras ligamentosas del piso pélvico llevando a una incontinencia urinaria y en casos graves el prolapso de estructuras pélvicas (Dul A., 2009).

#### **2.1.8.4 A nivel de Hueso**

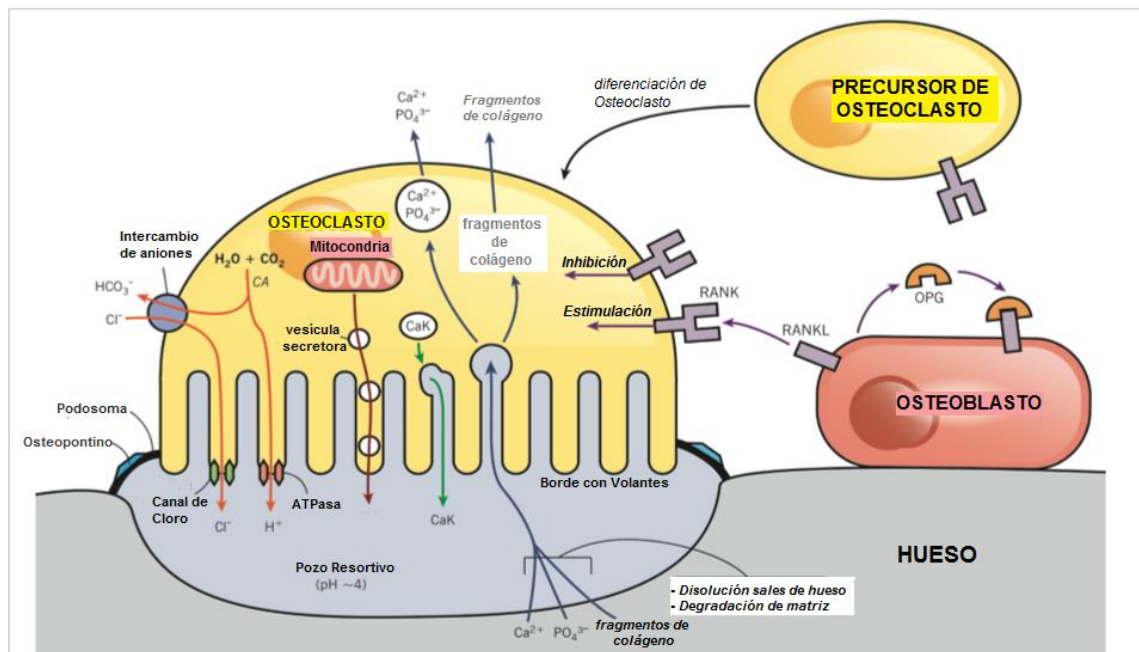
A nivel de tejido óseo existe disminución de la densidad de éste, producto de la pérdida de estradiol, el cual desempeñaba un rol importante en la regulación de la relación que existe entre osteoblastos y osteoclastos. Además, se describe que es uno de los elementos involucrados en la forma y desarrollo del tejido óseo durante el crecimiento y regula la homeostasis ósea en la etapa más adulta (Manolagas S. et al, 2013). Todo esto debido a que el estradiol estimula a diferentes células, dentro de estas se encuentran, los condrocitos, células periostial, osteoprogenitora (con el fin de disminuir la resorción ósea) y regulan la acción de los osteoclastos (Manolagas S. et al, 2013).

También se ha descrito que el estradiol es el encargado de inhibir a los precursores hematopoyéticos de osteoclastos y promover la diferenciación de las células mesenquimales para osteoblastos, además de estimular y mantener la sobrevivencia de los osteoblastos y osteocitos. Sin embargo, debido al declive de estradiol, y al aumento de la FSH, existe un aumento de las citoquinas inflamatorias tales como interleuquina (IL)- 4, IL-10 e IL-12, y el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), siendo este último uno de los actores importantes en la pérdida de densidad ósea, ya que estimulan la actividad osteoclástica y favorecen su sobrevivencia. (Doshi SB. & Agarwal A, 2013).

La remodelación ósea está dada principalmente por la actividad osteoclástica, quienes son los encargados de la resorción de la matriz ósea, y la actividad de los osteoblastos quienes están a cargo de la síntesis de hueso laminar. Las actividades de estos dos tipos celulares se regulan mediante diferentes mecanismos de señalización que interactúan entre sí, dentro de esos mecanismos de señalización se encuentran el receptor activador del factor nuclear  $\kappa$ B (RANK), los cuales se expresan en los osteoclastos, y RANK ligando (RANKL), los cuales se expresan en las células óseas (osteocitos) y en los osteoblastos. La unión de RANKL a RANK va a estimular la diferenciación del precursor de osteoclasto (precursor hematopoyético) a osteoclasto maduro, por ende, estimula su actividad. Sin embargo, esta diferenciación se ve contraregulada por medio de la Osteoprogenitora (OPG), la cual es secretada por los osteoblastos en respuesta a la estimulación del estradiol, en donde la OPG va a unirse a los receptores RANKL inhibiéndolos interrumpiendo el proceso descrito anteriormente (Kennedy P. et al, 2013) **(Fig. 2)**.

En las mujeres menopáusicas los niveles de estradiol se encuentran muy reducidos, por lo que no estimulan a los osteoblastos para que secreten OPG, traduciéndose en un aumento de la actividad de RANKL, aumentando la diferenciación y proliferación de los osteoclastos, lo cual conlleva a un desequilibrio entre la resorción ósea y la formación de hueso, aumentando la pérdida de hueso trabecular y con ello la pérdida de densidad mineral ósea,

generando osteoporosis. Por otra parte, la disminución y pérdida de estradiol va a llevar a una sensibilización en la capacidad del hueso a responder frente a los niveles de la paratohormona (PTH), por lo que a niveles bajos de PTH se liberará fácilmente calcio desde el tejido óseo (Dul A., 2009).



**Figura 2. Resorción ósea y la relación osteoclasto/osteoblasto** (Modificado desde Kennedy P. et al, 2013). Receptor activador del factor nuclear kappa beta (RANK) se expresa en los osteoclastos, lo que permite que las señales de otros tipos de células afecten su ciclo de vida y actividad. Ligando RANK (RANKL) se expresa en las células de la médula y los osteoblastos. La unión de RANKL a RANK estimula la formación, diferenciación y activación de osteoclastos, los cuales tras unirse por medio de los podosomas y sus proteínas de adhesión (osteopontinas) crean un pozo de resorción que se sella desde el hueso adyacente. Varios ácidos (por ejemplo, ácido cítrico, ácido láctico) se liberan desde las mitocondrias y las vesículas secretoras. Los iones de hidrógeno también se liberan a través de las acciones de la anhidrasa carbónica (CA) y las bombas de protones de vacuolar ATPasa. Esto crea un ambiente ácido en el pozo de resorción, lo que da como resultado la disolución de la sal de hueso. Las enzimas proteolíticas catepsina K (CaK) se liberan de los lisosomas en el osteoclasto. Estas enzimas descomponen la matriz ósea de colágeno y son más activas en un ambiente ácido. Los materiales dentro del pozo de resorción se fagocitan y se mueven a través de la célula y se liberan a la sangre provocando un aumento en la concentración de iones en la sangre.

### **2.1.9 Envejecimiento**

Según la OMS el envejecimiento desde el punto de vista biológico es “la consecuencia de la acumulación de una gran variedad de daños moleculares y celulares a lo largo del tiempo, lo que lleva a un descenso gradual de las capacidades físicas y mentales, un aumento del riesgo de enfermedad, y finalmente la muerte”.

El envejecimiento reproductivo marca un cambio en el eje hipotálamo-hipófisis-gonadal, donde la base radica en la depleción de los ovocitos en el ovario, llevándolo a un estado no funcional, pero este cambio no depende de la edad cronológica de la mujer, sino que más bien de cambios endocrinos y funcionales propios del proceso menopaúsico, causando hipoestrogenismo y altas concentraciones de FSH (Davis et al 2015).

### **2.1.10 Osteoporosis / Fracturas**

La osteoporosis es una patología en la cual el tejido óseo en especial el hueso trabecular, pierde su densidad, provocando que los huesos se vuelvan más frágiles y por ende estén más predispuestos a fracturas. Según la International Osteoporosis Foundation (IOF) la osteoporosis en las mujeres mayores de 45 años es un problema de salud frecuente que conlleva a fracturas dentro de las que se destacan la fractura de cadera, columna y muñeca, las cuales afectan a una de cada tres mujeres mayores de 50 años en todo el mundo. Del mismo modo la IOF plantea que una de cada tres mujeres y uno de cada cinco hombres mayores de cincuenta años experimentarán una fractura por osteoporosis a lo largo de su vida. Además, se había predicho que en los años comprendidos entre el 2005 y el 2015 habría aproximadamente 5,2 millones de fracturas por osteoporosis en mujeres de Estados Unidos mayores de 45 años, lo cual significó para la salud un gasto de US\$ 45 mil millones. Se calcula que, en Chile durante el año 2008, hubo 5.236 y 2.104 fracturas de cadera, respectivamente, entre las mujeres (45 años o más) (IOF, 2012). Todo lo anterior, se condice con el periodo de edad en que las mujeres inician la menopausia y por ende experimentan los cambios físicos antes descritos, dentro de los principales se encuentra la disminución de la densidad ósea y con ello el aumento del riesgo de padecer osteoporosis.

## **2.2 ESTRÉS OXIDATIVO**

### **2.2.1 Definición**

El estrés oxidativo ha sido definido como “un desequilibrio entre especies oxidantes y antioxidantes” (Sekhon L. & Argawal A., 2013), en donde los elementos celulares se ven expuestos a diversas fuentes que van a producir una alteración en el balance entre las sustancias pro-oxidantes y los mecanismos antioxidantes (AOX) quienes son los encargados de eliminar las especies reactivas del oxígeno (ROS). Esto puede ocurrir por un déficit de las defensas AOX, o por un incremento exagerado en la producción de ROS (Gutiérrez J., 2002).

### **2.2.2 Radicales Libres**

Los radicales libres se definen como aquellas especies químicas que pueden poseer carga o no y que en su orbital externo presentan uno o más electrones desapareados, lo cual le otorga una gran reactividad y la capacidad de interactuar con otras moléculas celulares desestabilizándolas (Gutiérrez J., 2002).



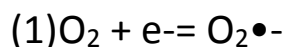
Los radicales libres presentan una estructura birradicálica, por lo que son muy reactivos e inestables cinética y energéticamente, lo que conlleva a una mayor capacidad de generar daños estructurales de aquellas moléculas cercanas al sitio en el que fueron formadas. Además, poseen una vida media muy corta, es decir, duran milisegundos y en algunos casos nanosegundos, por lo cual se hace difícil su medición en las reacciones de oxidación con otras moléculas. A su vez, producto de estas reacciones, los radicales libres producen nuevas formas con diferente nivel de estabilidad y toxicidad (Fernández J, Da Silva-Grigoletto M & Túnez-Fiñanac I., 2009).

Los radicales libres son pequeñas moléculas ubicuitarias, difusibles que se pueden formar durante diversos mecanismos, tales como, la cadena transportadora de electrones a nivel mitocondrial y en diversos sistemas proteicos oxido-reductasas. Durante dichos mecanismos se van a formar especies reactivas, siendo las de mayor importancia aquellas que se van a formar producto del metabolismo del oxígeno denominadas: “Especies Reactivas del Oxígeno” (ROS) (Gutiérrez J., 2002).

### 2.2.3 Especies reactivas del Oxígeno (ROS) y Nitrógeno (RNS)

En las mitocondrias de los organismos aeróbicos, existe la llamada respiración oxidativa, el cual es un proceso que permite la reducción univalentemente del oxígeno. Dicha reducción es incompleta debido a que los electrones libres se unen a la molécula de oxígeno generando las especies reactivas del oxígeno (ROS). El término ROS incluiría a todas las variedades de radicales libres propiamente dichos y aquellos átomos o moléculas que no lo son, pero que se encuentran dentro de la clasificación de ROS debido a su alta reactividad como es el caso del peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (Fernández J. et al, 2009). Dentro de las ROS más comunes se encuentran:

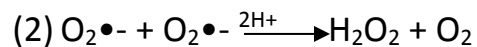
Anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>), quien es formado tras la adición de un electrón a la molécula de oxígeno, dando como resultado una especie altamente reactiva con el poder suficiente para generar oxidación lipídica, peroxidación y daño en el ADN **(Ecuación 1)**.



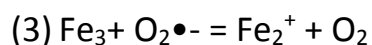
Es considerado como la fuente primaria para la generación de ROS, sin embargo, el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> puede reaccionar con otras moléculas desestabilizándolas lo cual conlleva a la producción de especies secundarias con mayor capacidad de daño a nivel celular. Por otra parte, el O<sub>2</sub><sup>•-</sup> posee una carga negativa, y una vida media mayor

que el promedio, lo que le otorga la facultad de difundir dentro de las células incrementando el daño. Además, algunos  $O_2^{\bullet-}$  se pueden formar tras la reacción del oxígeno con compuestos como las catecolaminas, o a través de las reacciones inmunitarias como fagocitosis (Fernández J. et al, 2009).

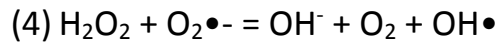
También se encuentran aquellas ROS que son moléculas inestables sin ser un compuesto radical, dentro de las que se destaca el Peróxido de Hidrógeno ( $H_2O_2$ ), cuya formación es el resultado de la interacción de las moléculas de  $O_2^{\bullet-}$  con los iones de  $H^+$ , ocurriendo una dismutación (óxido-reducción). Representación química del  $H_2O_2$  (**Ecuación 2**).



A su vez, el  $H_2O_2$  presenta una mayor estabilidad y concentración molar intracelular, lo cual le permite una mayor actividad oxidativa, pudiendo difundir a otras localizaciones celulares formando así radicales libres, dando la posibilidad de extender el daño oxidativo. Como es el caso de la reacción de Fenton, en donde existe una reacción catalizada por metales, y el  $H_2O_2$  termina formando radical de hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ). Reacción de Fenton (**Ecuación 3**).



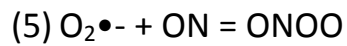
Por otra parte, la interacción del  $O_2^{\bullet-}$  y  $H_2O_2$  va a generar  $OH^\bullet$  por medio de la reacción de Haber Weiss (**Ecuación 4**).



Otro ROS conocido por su capacidad de generar daño es el  $OH^\bullet$ , el cual como se ha indicado anteriormente, se puede obtener por diversas reacciones (reacción de Fenton y reacción de Haber Weiss). A pesar de no presentar la capacidad de difundir por medio de la membrana celular, tiene el suficiente poder oxidante, el cual es capaz de provocar peroxidación lipídica y daño oxidativo en las proteínas. Esto último, ya que tiene una alta reactividad, otorgando el rol de ser la especie más tóxica de las ROS, debido a que como se ha mencionado tiene la propiedad de causar daño en el lugar en el que son generados, a las estructuras orgánicas estables como lo son los fosfolípidos de membrana, colesterol y proteínas (Fernández J. et al, 2009).

También es posible encontrar las llamadas especies reactivas del nitrógeno (RNS), que si bien tras la respiración oxidativa existe una mínima producción de óxido nítrico (ON), en las cercanías de la membrana mitocondrial, estas pueden reaccionar con el  $O_2^{\bullet-}$ , generando así especies reactivas, tal como el peroxinitrito (ONOO), quien es capaz de producir daño al ADN y la nitración de proteínas, ya

que posee la capacidad de modificar macromoléculas (Marotte C. & Zeni S., 2013). Su representación química es la siguiente **(Ecuación 5)**.

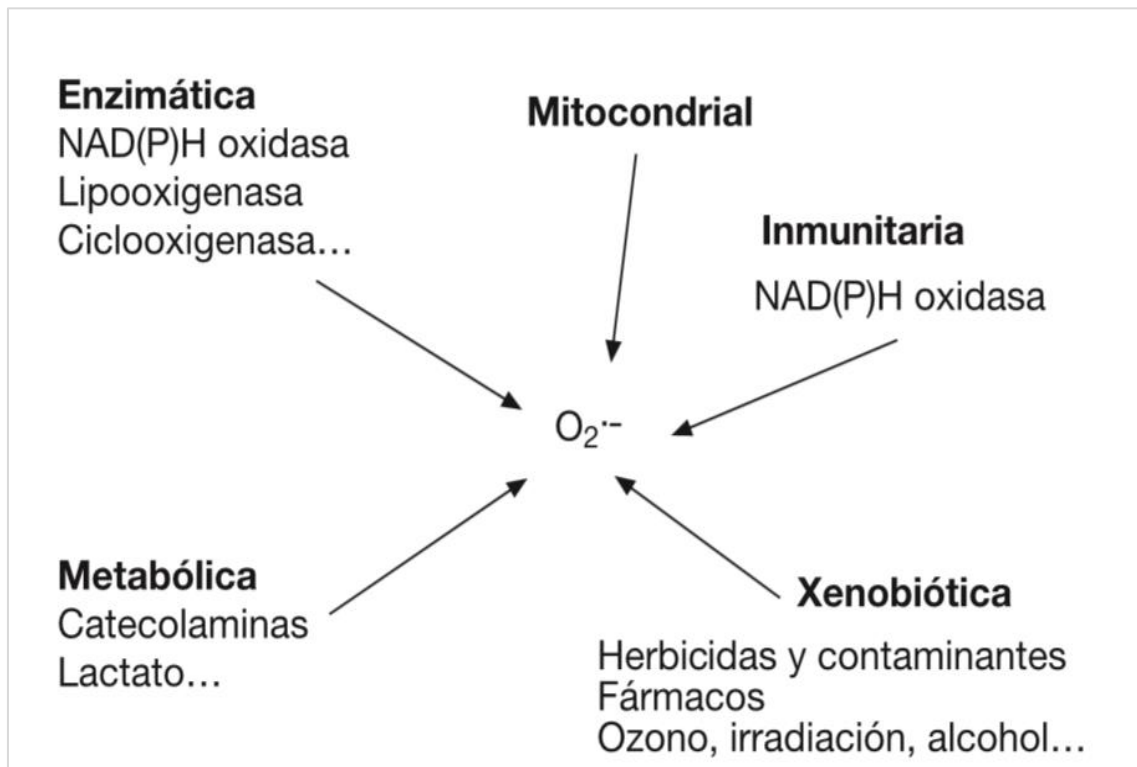


La formación incontrolada y excesiva de dicho compuesto no sólo va a provocar la depleción de grupos tioles, sino que también va a generar una disminución en la biodisponibilidad del ON, y con ello va a inducir diversos problemas (Fernández J. et al, 2009).

#### **2.2.4 Fuentes de ROS Y RNS**

Dentro de las principales fuentes endógenas se encuentra la mitocondria, debido a que durante la respiración celular el 1% y 3% del oxígeno consumido se convierte en ROS por parte de dicho organelo. Esto convierte a la mitocondria en la productora del 90% de las ROS intracelular, sin embargo, existen otras fuentes endógenas, tales como: los peroxisomas, éstos contienen oxidasas capaces de formar  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Del mismo modo el sistema inmunológico, principalmente aquellas células fagocíticas presentan la enzima NADPH oxidasa unida a su membrana atribuyéndole la capacidad de formar una gran cantidad de  $\text{H}_2\text{O}_2$  (Marotte C. & Zeni S., 2013).

Existen también otras fuentes endógenas, algunas enzimas oxidantes como la Xantina Oxidoreductasa, la indolamindioxigenasa, la triptófano-dioxigenasa, la ciclooxigenasa, la lipooxigenasa, la monoamino-oxidasa, el sistema de detoxificación hepática del citocromo P450, acil CoA oxidasa, las NADPH/NADH oxidasas que son formadoras de ROS como el  $O_2^{\bullet-}$  y  $H_2O_2$ . A su vez, las fuentes exógenas que ayudan a la formación de ROS, son las radiaciones ionizantes, el humo de cigarrillo, la luz solar, entre otros (**Fig. 3**) (Gutiérrez J., 2002).



**Figura 3: Fuentes generadoras de  $O_2^{\bullet-}$**  (Fernández J. et al, 2009).

### 2.2.5 Sistemas Antioxidantes

Tras la producción constante de ROS, las células en respuesta desarrollan mecanismos de defensa adaptativos de prevención, reparación y antioxidantes. Estos últimos, se definen como aquellos átomos o moléculas capaces de evitar o bloquear a las ROS que se forman y con ello impedir el daño oxidativo, al sacrificar su propia integridad molecular (Marotte C. & Zeni S., 2013).

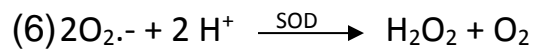
Los antioxidantes pueden interactuar directamente con el agente oxidante con el fin de formar un radical menos activo, o simplemente pueden interferir en la cadena de reacciones oxidativas que es la causante del daño de los diversos sustratos, tales como, los lípidos, proteínas, carbohidratos y el ADN (Gutiérrez J., 2002).

Existen diversas formas de clasificar a los antioxidantes, ya sea por su origen endógeno (en el cual son sintetizados por el organismo) o exógenos (los cuales son adquiridos por medio de la dieta). También pueden ser clasificados según su naturaleza enzimática y no enzimática.

#### a) Antioxidantes enzimáticos:

Superóxido dismutasa (SOD), este tiene la facultad de eliminar  $O_2^{\bullet-}$  y convertirlo en oxígeno y  $H_2O_2$  (**Ecuación 6**). Existen diferentes formas de esta enzima que

va a depender del ion metálico que esté ligado a su sitio activo pudiendo ser estos: cobre (Cu), zinc (Zn) o magnesio (Mn). Así el Cu/Zn SOD se encuentran mayoritariamente a nivel nuclear, citoplasmático y vascular. Mientras que el Mn SOD se halla principalmente en la matriz mitocondrial (Fernández J. et al, 2009).



A pesar de su acción, la SOD por sí sola no se considera un antioxidante como tal, debido a que produce  $H_2O_2$ , por lo que requiere de la enzima catalasa (CAT) para descomponer a dicha molécula.

Catalasa (CAT), es una hemoproteína de 4 subunidades, las cuales se encuentran en mayor concentración a nivel de los peroxisomas. Se le describe como acción principal el de transformar el  $H_2O_2$  (producido por la beta-oxidación de ácidos grasos en los peroxisomas) en  $H_2O$  y  $O_2$ : **(Ecuación 7)**.



Sistema de glutatión peroxidasa/glutatión reductasa: El glutatión reductasa (GR) es una enzima que cataliza la reducción del glutatión oxidado (GSSH) a glutatión reducido (GSH) el cual será utilizado por el glutatión peroxidasa (GPx) para la reducción del peróxido y de lipoperóxidos, quienes son especies reactivas del oxígeno. Se localizan a nivel del citosol, mitocondria y la membrana celular, y



cuya síntesis puede ser modificada mediante el ejercicio, la dieta y la edad. Dicha enzima es complementaria a la acción de CAT en la descomposición del  $H_2O_2$  con baja intensidad, pero con alta afinidad (Fernández J. et al, 2009).

b) Antioxidantes No enzimáticos:

Como se mencionó anteriormente, existen otros elementos no enzimáticos que cumplen la función de antioxidantes actuando a nivel intracelular, extracelular o en ambos compartimentos. Dentro de los antioxidantes intracelulares se encuentra el glutati6n reducido (GSH) el cual es un peptídico de la familia de los tioles, cuya funci6n es de ceder electrones al interactuar con radicales libres, tambi6n, sirve como sustrato para la GPx en su rol antioxidante, y por 6ltimo reduce las formas oxidadas “reciclando” el poder antioxidante de vitaminas como la C y E (Fernández J. et al, 2009).

Por otra parte, se tienen antioxidantes no enzimáticos como las ubiquinonas (coenzima Q), bilirrubina, albúmina, ferritina, ceruloplasmina y ácido úrico. Adem6s, se encuentran aquellos que son incorporados por medio de la dieta como es el caso de los  $\beta$ -caroteno o provitamina A; a las vitaminas C (ácido asc6rbico) y E (a-tocoferol); a los polifenoles antioxidantes presentes en frutas y verduras (flavonoides, ácidos fen6licos y taninos) que colaboran en la eliminaci6n

de radicales libres, y ciertos micronutrientes minerales que actúan como cofactores enzimáticos (Cu, Se, Mg, Zn) (Marotte C. & Zeni S., 2013).

Un desequilibrio entre la formación de ROS y el actuar de los mecanismos de defensa antioxidantes, en donde este último se ven sobrepasados, va a provocar estrés oxidativo y con ello efectos dañinos sobre diversas estructuras celulares. Sin embargo, las concentraciones bajas de ROS pueden ser beneficiosas, debido a que forman parte de distintos mecanismos de señalización y de regulación. Dentro de los que se encuentra la inducción en la síntesis de antioxidantes, procesos de reparación, inflamación, controlan la migración celular, proliferación, sobrevivencia y apoptosis. Todo esto dependiendo del tipo de célula, del oxidante que la genere y de su intensidad (Marotte C. & Zeni S., 2013).

## **2.3 MENOPAUSIA Y ESTRÉS OXIDATIVO**

### **2.3.1 Rol del Estradiol**

El estradiol es una hormona que se obtiene producto de la aromatización del anillo A de la androstenediona o de la testosterona, por medio de un complejo enzimático de monooxigenasa de citocromo P450, juntamente con la reductasa NADPH/citocromo P450, la cual es una flavoproteína de amplia distribución (Almeida M. et al, 2016). Ambas proteínas se encuentran ubicadas dentro del retículo endoplasmático de las células granulosa en ovario, en estroma adiposo y en tejido óseo (Simpson et al, 2002). Permitiendo la formación de distintos tipos de estrógeno, siendo los principales estrógenos la estrona, estriol y 17- $\beta$ -estradiol (E2), en donde a este último se le confiere un mayor poder en relación con su función (Loose & Stancel, 2007).

Para que puedan ejercer su función se requiere de la unión a sus receptores de estradiol (ERs), que son parte de la familia de receptores nucleares ubicados a nivel citoplasmático y que permiten modular la expresión de genes específicos (Lee et al, 2001; Rosenfeld et al, 2001). De los ERs se pueden encontrar dos tipos: ER $\alpha$  y ER $\beta$  (Heldring et al, 2007), el primero está presente mayoritariamente en el aparato reproductor femenino, principalmente útero, vagina y ovarios; mientras que el segundo, se encuentra en los ovarios, y en

menor medida, pero no despreciable, a nivel de pulmones, encéfalo, huesos y vasos (Hall y McDonnell, 1999).

Al estradiol se le atribuyen distintas funciones y una de ellas es ser un elemento antioxidante que puede actuar en diversos sistemas, ya que puede inducir mecanismos que regulan la sobreexpresión de ROS, dentro de los que se encuentran:

#### **2.3.1.1 Sistema nervioso central**

El 17- $\beta$ -estradiol (E2) juega un rol crítico en relación con la neuroprotección, debido a que disminuye la inducción de apoptosis generada por el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, además de generar un incremento en los niveles de fosforilación extracelular de la señal reguladora kinasa 1/2 (p-ERK1/2) regulando a Bcl-2 y procaspasa-3, teniendo un efecto antiapoptótico (Calzada C. & Jiménez C., 2013).

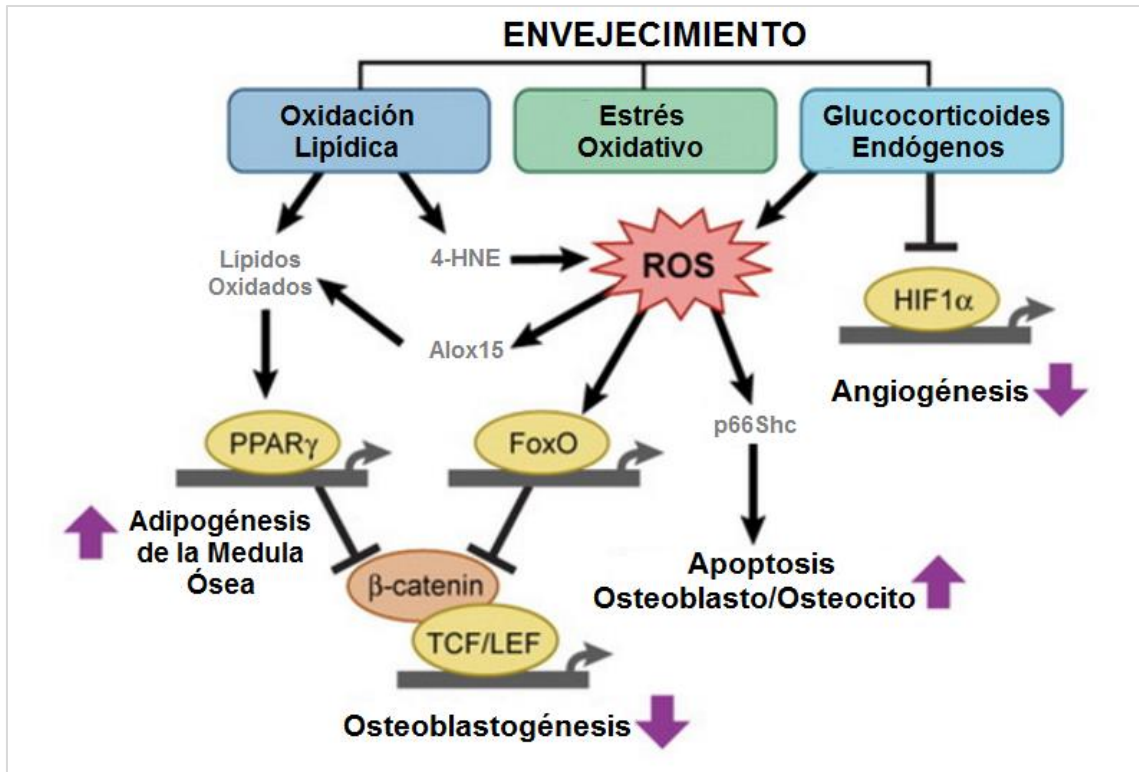
#### **2.3.1.2 Sistema Cardiovascular**

El E2 permite disminuir la oxidación de los lípidos como el LDL, además de atenuar la actividad y expresión de NADPH oxidasa vascular, por lo que previene

la formación de placas de ateroma en los vasos circulatorios, principalmente a nivel de las arterias coronarias, por lo que actuaría como un cardio-protector preservando así la función cardíaca (Han G. & White R., 2014).

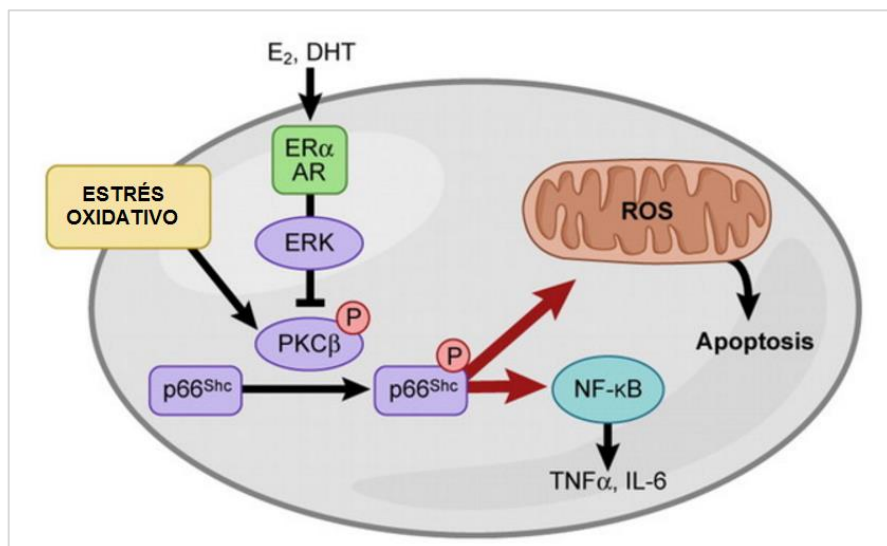
### 2.3.1.3 Tejido Óseo

Se ha demostrado que la producción de ROS es uno de los elementos que contribuye en la formación y diferenciación de los osteoclastos, no obstante, una alteración en la producción de estos, puede llevar a un estrés oxidativo que no solo afecte a los osteoclastos de manera favorable, sino que también va a generar cambios en los osteoblastos que pueden provocar incluso su muerte, debido a que dicho estrés va a promover la translocación de proteínas forkhead (FOxO), que son las responsables de la autofagia y también de la apoptosis, debido a que pueden inducir muerte celular con el fin de eliminar a aquellas células que se encuentran dañadas o alteradas. El estrés oxidativo va a anular el secuestro de FOxO en el citoplasma por aquellos factores de crecimiento que potencian la supervivencia de los osteoblastos, de modo que se estimulará la actividad transcripcional de FOxO, inhibiéndose así la acción de  $\beta$ -catenina (factor que permite la osteoblastogénesis) disminuyendo la diferenciación de los osteoblastos (Almeida M., 2010), como se muestra en la **Fig. 4**.



**Figura 4. Rol del estrés oxidativo en la mineralización ósea** (Modificación desde Almeida M., 2010). Mecanismos que contribuyen al desarrollo de la osteoporosis, en donde el estrés oxidativo, la oxidación de lípidos y la sensibilidad a los glucocorticoides endógenos generan un aumento de las especies reactivas del oxígeno (ROS) induciendo la activación de p66 Shc provocando la apoptosis de osteoblastos y osteocitos. También se estimula la actividad transcripcional de proteínas forkhead (FoxO), el cual disminuye la  $\beta$ -catenina que actúa como cofactor de los factores de transcripción del factor de células T / factor de potenciación linfocitaria (TCF)/LEF y con ello la osteoblastogénesis. A su vez, la oxidación de lípidos a través de 4-hidroxinonenal (4-HNE) contribuye a la generación de ROS, lo cual incrementa la expresión de la lipoxigenasa Alox5 estimulando aún más la oxidación de lípidos. Los lípidos oxidados se unen y activan al receptor gamma activado por el factor proliferador de peroxisomas (PPAR $\gamma$ ), lo cual contribuye en la disminución de  $\beta$ -catenina/ osteoblastogénesis inducida por TCF. La activación de PPAR $\gamma$  también conduce a un aumento de la médula ósea adiposa. Por otra parte, la mayor sensibilidad a los glucocorticoides de los osteoblastos/ osteocitos disminuye la angiogénesis ósea mediada por el factor 1 inducible por hipoxia (HIF1 $\alpha$ ), además del volumen de la vasculatura y el fluido lacunar-canalicular de los osteocitos.

A su vez, FOxO juntamente con ROS estimulan la activación de p66 Shc, el cual es un mediador entre el estrés oxidativo y de apoptosis a nivel de osteoblastos y osteocitos. La activación de p66 Shc, va a activar la vía de NF-κB y con ello la producción de citoquinas, tales como, Interleuquina 6 (IL-6) y Factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) (Almeida M., 2010). Es a este nivel donde el E2 ejerce su función antioxidante, ya que va a disminuir la producción de ROS por medio de la regulación e inhibición del receptor activador del ligando NF-κB (RANKL), elemento esencial para la formación y maduración de los osteoclastos **(Fig. 5)**.



**Figura 5. Rol del estrés oxidativo en la mineralización ósea** (Modificado desde Almeida M., 2010). El gen p66Shc es un mediador esencial de los efectos del estrés oxidativo sobre la apoptosis, ya que media la activación del factor nuclear potenciador de las cadenas ligeras kappa de las células B activadas (NF-κB) y la producción de citoquinas, como el factor de necrosis tumoral alfa (TNFα) y la interleuquina 6 (IL-6), por las células osteoblásticas. Sin embargo, el estradiol (E2) y la Dihidrotestosterona (DHT) o conocida también como androstanolona atenúan todos estos efectos mediante la supresión de la fosforilación de la proteína quinasaβ (PKCβ) / p66Shc, tras unirse al receptor de estrógeno (ERα) y al receptor de androstanolona (AR) activando a Quinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) las cuales inhiben a PKCβ.

Por otra parte, el E2 estimula la actividad del sistema GR/GPx, a través de la inducción del factor nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2 (Nrf2), potenciándose aún más la actividad antioxidante. Sin embargo, tras la menopausia los niveles de E2 disminuyen, lo que favorece el aumento de ROS dentro de los que se destaca el H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, que va a generar la apertura de los poros a nivel mitocondrial aumentando la permeabilidad y con ello la liberación de citocromo C, desencadenando la cascada de apoptosis por vía intrínseca en las células formadoras de hueso (Almeida M., 2010).

En situaciones en las que los niveles de E2 se encuentran normales, p66 Shc se ve inhibida por medio de la supresión de la fosforilación de PKCβ/ p66 Shc, dicha supresión va a potenciar la resistencia a la apoptosis generada por la acción de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Del mismo modo la sobrevida de los osteoblastos y osteocitos está relacionada con mecanismos anti-apoptóticos cuya señalización es dependiente de Src y quinasas del tipo MAPK, a su vez estas mismas señalizaciones que promueven la sobrevida de los osteoblastos, son los encargados de la muerte de los osteoclastos (Almeida M., 2010). Por otra parte, el E2 regula que los osteoclastos no logren su maduración ni diferenciación desde las células progenitoras, por lo que tras la activación del Fas ligando (FasL), a nivel de las células hematopoyéticas, dicha diferenciación no se lograría, de modo que el E2, tiene como finalidad mantener el equilibrio entre la actividad de los osteoblastos y osteoclastos, potenciando a los osteoblastos de manera directa favoreciendo



la osteoblastogénesis, y de forma indirecta disminuyendo la actividad y diferenciación osteoclástica, por lo que no se vería afectada la densidad ósea. Sin embargo, en el caso de la menopausia, todas las acciones protectoras antes descritas se verían afectadas producto de los bajos niveles de E2, traduciéndose en una disminución de la densidad ósea y con ello un aumento de aquellas patologías asociadas a la alteración de la integridad del tejido óseo, como es el caso de las osteoporosis (Almeida M., 2010). Por tanto, E2 inhiben la resorción ósea a través de cambios en los niveles de citoquina y factor de crecimiento, activación células T y producción de ROS, evitando una condición proinflamatoria que favorece la diferenciación osteoclastogénica.

Por otra parte, el estrés oxidativo inducido por especies de oxígeno reactivo (ROS) aumenta por un lado con el envejecimiento y / o la deficiencia de estradiol en mujeres post-menopáusicas y la reducción de mecanismos antioxidantes, afectando negativamente la homeostasis ósea y conducir a la fragilidad esquelética (Sun et al, 2015).

Las medidas compensatorias para regular los síntomas de la menopausia están relacionadas con los tratamientos de reemplazo hormonal, como la terapia hormonal, la terapia con estrógenos, la terapia con estrógenos sumado a progestinas que puede ser secuencial o continua, terapia con andrógenos, terapia con estrógenos más andrógenos y terapia con tibolona, que tienen como

objetivo disminuir síntomas debilitantes y sus secuelas como regular la atrofia urogenital, prevenir y tratar la osteoporosis y la falla ovárica prematura, además de disminuir la sintomatología vasomotora. Sin embargo, su uso permanente puede traer diversas complicaciones, por lo que la indicación de un tratamiento prolongado debe ser revisada anualmente y requiere de una vigilancia estrecha de Médico/Paciente (Arriagada et al, 2005).

Por otro lado, hoy en día se reconoce que existen productos naturales incorporados en la dieta que presentan actividad estrogénica, ya sea por la similitud estructural y /o la afinidad por los receptores de estrógeno ( $RE\alpha$  y  $RE\beta$ ) induciendo una respuesta similar al Estradiol (Eastell et al, 2016), lo que podría atenuar este deterioro, y regular así el estado REDOX.

## **2.4 TRATAMIENTOS ESTROGÉNICOS**

Dentro de los productos naturales que podrían inducir respuestas estrogénicas se encuentran:

### **2.4.1 Fitoestrógenos**

Los fitoestrógenos poseen un origen natural y son los representantes de aquellos productos no esteroideos que presentan actividad estrogénica, a quienes se les atribuye la similitud estructural que existen entre ambas. La exposición a estos compuestos es principalmente por medio de la dieta, debido a que se realiza la ingesta de isoflavonas, las cuales están presentes en la soja y legumbres; los lignanos, que se pueden encontrar en semillas, granos enteros, frutas y verduras; y los cumestanos, que están en alimentos como el brócoli y los brotes (Poluzzi et al, 2014).

Los fitoestrógenos, debido a su similitud estructural con el 17- $\beta$ -estradiol, pueden unirse a los receptores de estrógeno  $\alpha$  y  $\beta$  (RE $\alpha$  y RE $\beta$ ), siendo más afines a los RE $\beta$ , tras lo cual puede ejercer su función dependiendo del tejido al cual estén asociado. Se ha visto que uno de aquellos tejidos es el óseo, en donde los fitoestrógenos actúan inhibiendo los procesos de resorción ósea, tras actuar sobre el sistema RANK/RANKL (Pankova & Tsvetkova, 2015).

## 2.4.2 Fitoesteroles

Los fitoesteroles corresponden a un grupo de esteroides producidos por las plantas y son el principal componente de la dieta humana (Moreau et al, 2001). Se pueden encontrar como diferentes tipos de esteroides, dentro de los cuales están el stigmasterol, campesterol y  $\beta$ -sitosterol ( $\beta$ SSG), siendo este último el más abundante (Merino y col., 2014).

Algunos estudios han demostrado que los fitoesteroles poseen similitud estructural a la del colesterol y a su vez tendrían efectos estrogénicos (Malini et al, 1992; Rosenblun et al, 1993), esto es debido a que el  $\beta$ -sitosterol sería capaz de unirse a los receptores de estrógeno RE $\alpha$  y con mayor afinidad al RE $\beta$  (Ju et al, 2004).

Dentro de las propiedades que se le atribuyen a los Fitoesteroles, principalmente a su tipo  $\beta$ -sitosterol, es presentar agentes antiinflamatorios que tienen actividad antioxidante y analgésica, lo cual ha sido demostrado por medio de estudios realizados en animales (Shi et al., 2013). Además, en estudios clínicos realizados a mujeres posmenopáusicas, se observó que los Fitoesteroles y la  $\beta$ -criptoxantina tienen un efecto sobre los riesgos cardiovasculares y la disminución de densidad ósea, en donde se obtuvo una diferencia significativa en los niveles

de colesterol total HDL-TC, LDL-C y en los marcadores de recambio óseo (Granado et al, 2014).

### 2.4.3 Aceite de Palta

El aceite de palta es un tipo de aceite vegetal, que está compuesto por ácidos grasos dentro de los cuales están: El ácido oleico (56%), siendo este su principal ácido graso, seguido por el linoleico (8%), palmítico (9%) y palmitoleico (3%), trazas de linolénico y también de esteárico. A su vez, tiene un alto contenido de compuestos bioactivos, tales como, los fitosteroles (0,43%), principalmente  $\beta$ -sitoesterol (0,32%), y tocoferoles (Olaeta et al., 1999). Estos ácidos grasos se encuentran en la **Tabla 2**.

**Tabla 2: Composición del aceite de palta** (Olaeta et al, 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-sitoesterol	0,32

Por otra parte, en investigaciones realizadas por el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso, se puso en evidencia que el aceite de palta presenta efectos estrogénicos, siendo capaz de aumentar el peso uterino húmedo y seco en un 232% en ratas prepúberes (León y Peña, 2012). En otro ensayo realizado en ratas ovariectomizadas (OVX) se observó la aparición de células cornificadas y de un engrosamiento del epitelio endometrial tras la ingesta de aceite de palta (Vozmediano, 2013). De igual forma, las propiedades estrogénicas del aceite de palta otorgada por la presencia de fitoesteroles quedaron demostrada en la presencia de células cornificadas en el frotis vaginal, aumento del grosor del epitelio uterino y vaginal, endometrio y la aparición de glándulas uterinas (Medina, 2016; Solis, 2016).

Por lo anteriormente expuesto, se hace interesante estudiar tratamientos fitoquímicos que pudiesen atenuar las manifestaciones menopaúsicas en un contexto terapéutico, principalmente si tienen una actividad estrogénica que pudiesen regular procesos que retrasen su manifestación, en esta investigación, se ahondará en la temática correspondiente a osteoporosis post-menopausica.

### **3. HIPOTESIS**

Los fitoquímicos con capacidad estrogénica presentes en los alimentos mejoran la condición REDOX en tejido óseo atenuando el proceso de resorción ósea en un modelo roedor de menopausia.

### **4. OBJETIVOS**

#### **4.1 Objetivo General**

Evaluar parámetro REDOX en tejido óseo en un modelo roedor menopaúsico con tratamiento estrogénico convencional y alternativos.

#### **4.2 Objetivos Específicos**

Evaluar daño oxidativo en lípidos de la membrana en tejido óseo en los distintos tratamientos.

Evaluar actividad antioxidante enzimática en tejido óseo en los distintos tratamientos.

Evaluar actividad antioxidante total en tejido óseo en los distintos tratamientos.

## **5. MATERIALES**

### **5.1 Determinación de Parámetros REDOX**

#### **a. Instrumentos de medición:**

Espectrofotometro UV visible. Marca Rayleigh. UV-2601.

Software Estadístico STATISTICA versión 7. Año 2002.

#### **b. Equipos:**

Balanza Analítica. Marca RADWAG, modelo AS220-C/2.

pHmetro. Marca JENCO, modelo 60.

Centrífuga Clínica. Marca HETTICH, modelo UNIVERSAL/K2S.

Placa Calefactora. Marca LabTech, modelo LMS – 1003.

Vórtex. Modelo 37600 Mixer.

Sonicador. Marca Elma, modelo TRANSSONIC 310.

Baño Termorregulado. Marca K, modelo YCW – 04M (11L).

Micropipeta. Marca GILSON (Volúmenes 1-10 $\mu$ L, 20-200 $\mu$ L, 100-1000 $\mu$ L y 1-5 mL).

Notebook. Marca Lenovo ideapad 100-14 IBY.

Software Microsoft Office Excel 365. Versión 15.0.4797.1003, 2013.



**c. Reactivos (Tabla 3):**

**Tabla 3.** Reactivos para determinar parámetros REDOX

ABTS: 2,2'-azinobi(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)
ABAP: 2,2'-azobis(2-amidinopropano)
Buffer catalasa: $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , $\text{Na}_2\text{HPO}_4$
Buffer de Lavado: $\text{NaCl}$ , $\text{NaHPO}_2$ , $\text{NaH}_2\text{PO}_4$
Cloruro de Sodio ( $\text{NaCl}$ )
Carbonato de sodio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ )
Fosfato de Disódio ( $\text{Na}_2\text{HPO}_3$ )
Fosfato Sódico Dihidrogenado ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ )
Folin- Ciocalteu
Hidróxido de Sodio ( $\text{NaOH}$ )
Peróxido de Hidrogeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )
Sulfato de Cobre ( $\text{CuSO}_4$ )
Tartrato Sodio Potasio ( $\text{KNaC}_4\text{H}_4\text{O}_6$ )
TBA: Ácido Tiobarbitúrico
TCA: Ácido Tricloroacético

## **6. MÉTODOLÓGÍA**

### **6.1 Condiciones Generales**

Los procedimientos experimentales se llevaron a cabo de acuerdo con procedimientos estándares. El estudio de biodisponibilidad y la evaluación de estrogenicidad fueron realizados en el Laboratorio de Toxicología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso. Todos los procedimientos con animales de experimentación se llevaron a cabo de acuerdo con el Guide for the Care and Use of Laboratory Animals del National Research Council de Estados Unidos (NRC, 2010).

### **6.2 Animales de Experimentación**

Se utilizaron 25 ratas hembras de la cepa Sprague-Dawley de 10 a 12 semanas de edad, de las cuales se seleccionaron 20 ratas para generar el modelo roedor de menopausia y 5 para el grupo control sin ovariectomización (OVX). Los animales de experimentación eran pertenecientes a la colonia del Laboratorio de

Toxicología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso, las que fueron mantenidas a una temperatura de  $21 \pm 3$  °C, humedad relativa ambiental entre 30%-70%, ciclos de luz/oscuridad de 12/12 (6AM-6PM) y acceso ad libitum a alimento (Lab Rat Diet, Champion) y agua potable. Se contó con apoyo veterinario para los procedimientos con animales.

Los procedimientos fueron sometidos a certificación de bioética para manejo y uso de roedores de experimentación por el Comité de Bioética de la facultad de farmacia de la Universidad de Valparaíso (**Anexo 1**).

### **6.3 Generación de Modelo Menopáusico**

Se escogieron a aquellas ratas con ciclo estral estable, y que estuvieran sobre 260 g de peso corporal. Se realizó el procedimiento de ovariectomización (OVX) de acuerdo con el protocolo OECD 440 (OECD, 2007). Dicho procedimiento fue realizado por un equipo veterinario de cirujano y anestesista. En breve, las ratas fueron anestesiadas con ketamina al 10 % y xilacina al 2 % en dosis de 90 y 10 mg/kg, respectivamente para luego exponer los ovarios, ligarlos a la altura de los oviductos y proceder a la extirpación por encima de la ligadura. Para confirmar el éxito de la operación, se realizó un seguimiento del ciclo estral por al menos 5 días. Los animales que presentaron días esporádicos de cornificación del epitelio

vaginal, fueron retirados del ensayo. Una vez establecido el anestro, los animales fueron administrados con una dosis única de 1 µg de estradiol, para comprobar respuesta estrogénica a través de inducción de estro. Terminada la respuesta estrogénica, alrededor de 5 días, los animales se asignaron aleatoriamente a los grupos de tratamiento.

#### **6.4 Grupos de Tratamientos**

Luego de cumplirse 2 meses después de la OVX, período en el cual se evidencia cambio de la densidad ósea producto de la disminución de estradiol (Esteves et al., 2015). Se comenzó con la administración subcrónica de 35 días.

Los grupos fueron designados aleatoriamente, y fueron ordenados según la distribución de la **tabla 4**.

**Tabla 4.** Distribución de Grupos de Tratamiento.

GRUPOS	TRATAMIENTO	CARACTERÍSTICAS
<b>G0</b>	Ratas Hembras NO OVX	Sin Tratamiento: CONTROL Ratas sanas sin intervenciones quirúrgicas previas.
<b>G1</b>	Ratas Hembras OVX	Sin Tratamiento: CONTROL NEGATIVO Ratas previa intervención quirúrgica denominada Ovariectomización (OVX).
<b>G2</b>	Ratas hembras OVX + estradiol (E)	Con Tratamiento: CONTROL POSITIVO Inyección subcutánea de Estradiol (Sigma) de 50 µg/kg/cada 5 días (Castillo, 2010).
<b>G3</b>	Ratas hembras OVX + Aceite de palta (AP)	Tratamiento 1: Dosificación diaria vía oral a través del pellet; 2ml de AP (adquirida en un supermercado local), el volumen corresponde al volumen máximo que puede ser administrado a un animal adulto por vía oral (Semler et al, 1992)
<b>G4</b>	Ratas hembras OVX + Fitoesteroles (FE)	Tratamiento 2: Administración diaria vía oral a través del pellet; 10mg/kg 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 contenidas en 2ml de aceite de palta de acuerdo con literatura (Olaeta et al, 1999).

## **6.5 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 (8,6 mg/d)). Los compuestos fueron unidos al alimento previamente triturado, con una razón 1:2 de agua destilada. Se homogeneizó 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.

## **6.6 Recolección de Muestras**

La recolección de muestras se realizó al término del periodo de exposición (35 días en los cuales se le administró los diversos tratamientos). La eutanasia se llevó a cabo por inhalación de dióxido de carbono en cámara de eutanasia y se monitorean hasta la pérdida de conciencia, lo cual se verificará por la ausencia de reflejos, posteriormente se realiza dislocación cervical para asegurar la muerte. Se recolectó las tibias derechas e izquierdas para su evaluación de biomarcadores de estrés oxidativo, respectivamente. Las tibias fueron recolectadas, pesadas, limpiadas de restos tisulares y de grasa, para posteriormente ser congeladas a -20 °C hasta su análisis.

## 6.7 Variables medidas (Tabla 5)

**Tabla 5.** Variables de Estudio.

VARIABLE	TIPO DE VARIABLE	DEFINICIÓN	DIMENSIONES	INDICADORES
Grupos	Independiente	Tratamientos	Grupo 0 Grupo 1 Grupo 2 Grupo 3 Grupo 4	Nº ratones: 5 por grupo.
TBARS	Dependiente	Prueba que mide daño a lípidos.	Concentración de MDA	nM MDA/mL
CAT	Dependiente	Prueba que mide actividad enzimática de Catalasa.	Actividad enzimática	U enzima CAT/mg proteína
TRAP	Dependiente	Prueba que mide capacidad antioxidante total.	Concentración equivalente Trolox.	TEAC $\mu$ M

## **6.8 Determinación de Biomarcadores REDOX**

A partir de las tibias extraídas de cada grupo de estudio, los cuales fueron congelados y posteriormente llevadas al Laboratorio de Investigación de Estrés Oxidativo de la Escuela de Kinesiología, Facultad de Medicina, de la Universidad de Valparaíso, donde se analizará, parámetros oxidativos de daño a través de la prueba TBARS y de defensa antioxidantes enzimática (CAT) y no enzimática (TRAP).

Para los análisis de biomarcadores REDOX se utilizará 150 mg de la epífisis de las tibias, las cuales fueron maceradas en un mortero juntamente con 4 ml de buffer de lavado que contiene NaCl 150 mM, NaHPO<sub>2</sub> y NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0,01m, ajustado a un pH de 7,4. Dicho buffer se utilizado para la homogeneización de la muestra.



## **6.9 Análisis de Biomarcadores REDOX**

### **6.9.1 Determinación de Daño Oxidativo**

#### **6.9.1.1 Ensayo TBARS**

Este análisis se realizará según lo descrito en Esterbauer et al. (1982) que evalúa la reacción del ácido tiobarbitúrico con un producto de lipoperoxidación el Malondialdehído (MDA). Para el análisis se utilizarán macerado de tibia (2 mL) y se mezclará con 2ml de ácido tricloroacético (TCA) al 30% p/v, luego se centrifugará por 15 minutos a 3000 r.p.m.; para obtener un pellet (precipitación de proteínas) y sobrenadante. A continuación, se extraerán 1,5 mL de sobrenadante y se le agregará 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) al 0,67% p/v que reacciona con el aldehído de la muestra. Posteriormente la solución será llevada a ebullición (100°C) por 20 minutos. Para la lectura de las muestras se realizará un barrido en espectrofotómetro entre 400- 600 nm con el fin de determinar el pick de MDA a los 535 nm aproximadamente.

## **6.9.2 Determinación de Defensa Antioxidante**

### **6.9.2.1 Actividad de Catalasa (CAT)**

Este análisis se realizará según lo descrito en Aebi (1984). La actividad de la enzima catalasa se medirá en espectrofotometría, mediante una cinética de degradación de  $H_2O_2$ , detectando la pérdida de la absorbancia a 240 nm; en una solución de 100  $\mu$ l de  $H_2O_2$  (a 0,3 M) más 50  $\mu$ l de la muestra de macerado de tibia, disuelto en 2,9 ml de buffer PBS ( $Na_2HPO_4$  50mM y  $NaH_2PO_4$  50 mM) ajustado a un pH 7,0. La lectura se realizará a 240 nm durante 90 segundos y pausas cada 15 segundos y los valores se expresarán como unidades de enzima/mg proteína usando la determinación de proteínas totales obtenidas mediante el método de Lowry.

### **6.9.2.2 Proteínas Totales**

La concentración de proteínas totales se determinará mediante la reacción entre los residuos de tirosina presentes en la muestra y el reactivo Folin-Ciocalteu, según lo descrito en Lowry et al. (1951). Para el análisis se preparará el reactivo cobre alcalino (RCA) ( $Na_2CO_3$  a 0,94 M,  $KNaC_4H_4O_6$  a 3,5 mM,  $CuSO_4$  a 2 mM y  $NaOH$  a 0,5M) en donde 1 ml de RCA será mezclado con 4 ml del reactivo Folin-

Ciocalteu (1:20 en agua destilada) más 1 ml del macerado de tibia. La solución resultante será incubada a 55°C durante 5 minutos. Finalmente, se leerá en espectrofotométricamente a 650nm.

### **6.9.2.3 Capacidad Antioxidante total (TRAP)**

Este análisis se realizará según lo descrito en Romay et al. (1996). La incubación de ABTS (2,2'-azinobi(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfónico)) con ABAP (2,2'-azobis(2-amidinopropano)) produce radicales catiónicos estable coloreado cuya formación puede ser seguida espectrofotométría. Para el análisis se prepara una mezcla de 1:1 de ABTS (a 150 µM) con ABAP (a 10 mM), la cual será incubada durante 30 minutos a 45°C, dando una solución verde azulada. Luego, se utilizará 10 µl del macerado de tibia, y 1 ml de la mezcla de ABTS con ABAP. Estos se harán reaccionar y la solución restante será leída en una cinética de espectrofotométrica a 734 nm durante 50 segundos con pausas cada 10 segundos. Los datos serán extrapolados en una curva TROLOX® y se expresará en µM TEAC.

## **6.10 Análisis Estadístico**

Mediante la determinación de los biomarcadores REDOX, se reportaron los datos, promedios y desviación estándar. Para el análisis estadístico se utilizó el software STATISTICA; donde los datos fueron sometidos a prueba de distribución de normalidad (paramétrica) de Pearson. En el caso de ser paramétrica, se realizó el análisis ANOVA y la prueba a posteriori de Tukey; en el caso de no paramétricos, se utilizó Kruskal-Wallis para múltiples muestras independientes. En cualquiera de los casos se utilizó un nivel de significancia de  $p = 0,05$  (Zar, 1999). Cabe destacar que todas las pruebas fueron realizadas por triplicado para cada muestra.

## 7. RESULTADOS

El estudio se llevó a cabo en modelo roedor menopaúsico, donde se realizó la determinación de parámetros REDOX en tejido óseo, para las distintas condiciones se evaluó daño oxidativo (TBARS) y actividad antioxidante enzimática (CAT) y no enzimática (TRAP). En la **tabla 6**, se presentan las abreviaturas para la presentación de resultados en los grupos de estudio.

**Tabla 6.** Abreviaturas de grupos de estudio.

<b>GRUPOS</b>	<b>TRATAMIENTO</b>
<b>G0</b>	Ratas Hembras NO OVX*: Control
<b>G1</b>	Ratas Hembras OVX: Control Negativo
<b>G2</b>	Ratas hembras OVX + estradiol (E): Control Positivo
<b>G3</b>	Ratas hembras OVX + Aceite de palta (AP)
<b>G4</b>	Ratas hembras OVX + Fitoesteroles (FE)

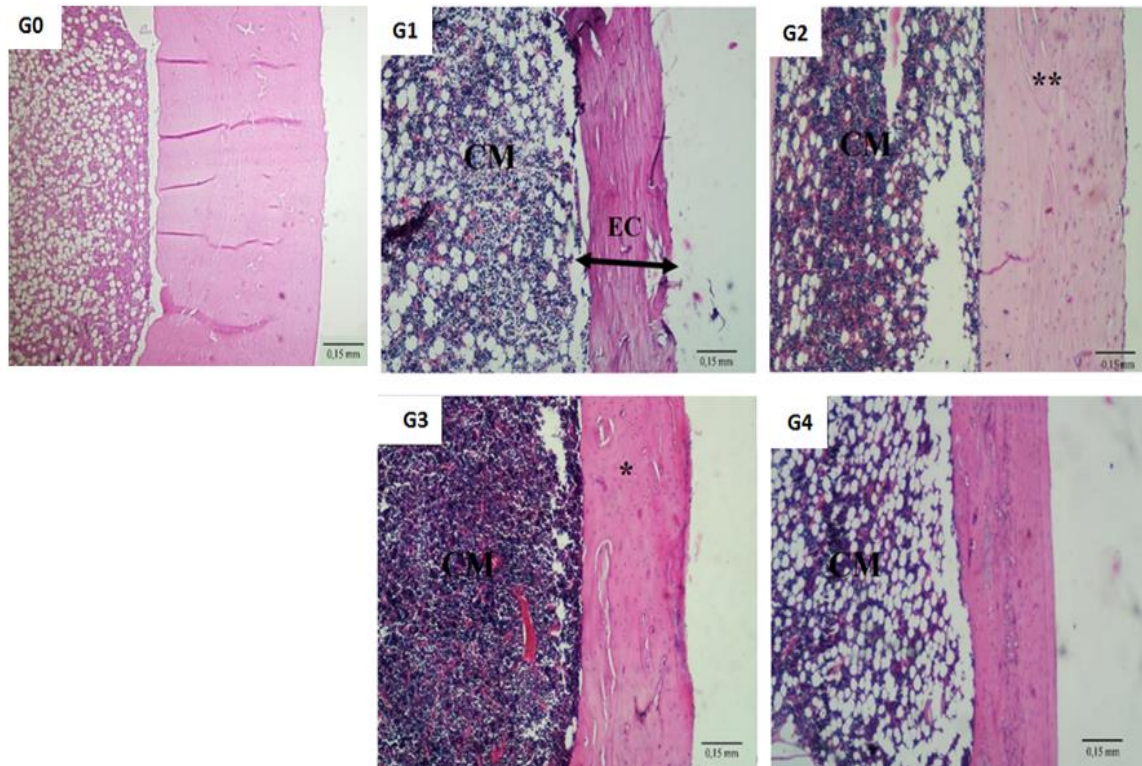
\*OVX= Ovariectomizada

A modo de control interno, se utilizó los resultados de morfología ósea obtenidos en un estudio paralelo realizado en laboratorio de Toxicología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Valparaíso, para asegurar el efecto estrogénico de los tratamientos.

## 7.1 MORFOMETRÍA ÓSEA

Estudios previos en Laboratorio de Toxicología de la Universidad de Valparaíso, realizaron observaciones de estrogenicidad a través de morfometría ósea, donde aseguran que el Aceite de Palta y Fitoesteroles producen este efecto pro-estrogénico en el modelo roedor menopaúsico.

Los resultados histológicos se obtuvieron mediante el corte longitudinal de tejido óseo, específicamente de tibias izquierdas, los cuales se encuentran representados en la **Figura 6**. Este estudio evidencia los cambios en el grosor o espesor del hueso cortical en todos los grupos: G0, G1, G2, G3 y G4; donde se obtuvo una diferencia significativa para G2 ( $p < 0,01$ ) y G3 ( $p < 0,05$ ) donde el espesor cortical fue mayor con respecto a G1. Por otra parte, G4 tuvo un aumento del hueso cortical, sin embargo, este no alcanzó a tener una diferencia significativa. G0 es referencial ya que corresponde a la condición NO OVX.



**Figura 6: Histología del corte longitudinal de tejido óseo.** Corresponde a una sección de la tibia proximal en 4X al mismo zoom. G0: NO OVX; G1: OVX; G2: OVX + Estradiol, G3: OVX+ Aceite de Palta, G4: OVX + Fitoesteroles. Diferencias significativas \*\* ( $p < 0,01$ ); \* ( $p < 0,05$ ). 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). OVX: Ratas hembras ovariectomizadas.

## 7.2 DAÑO OXIDATIVO

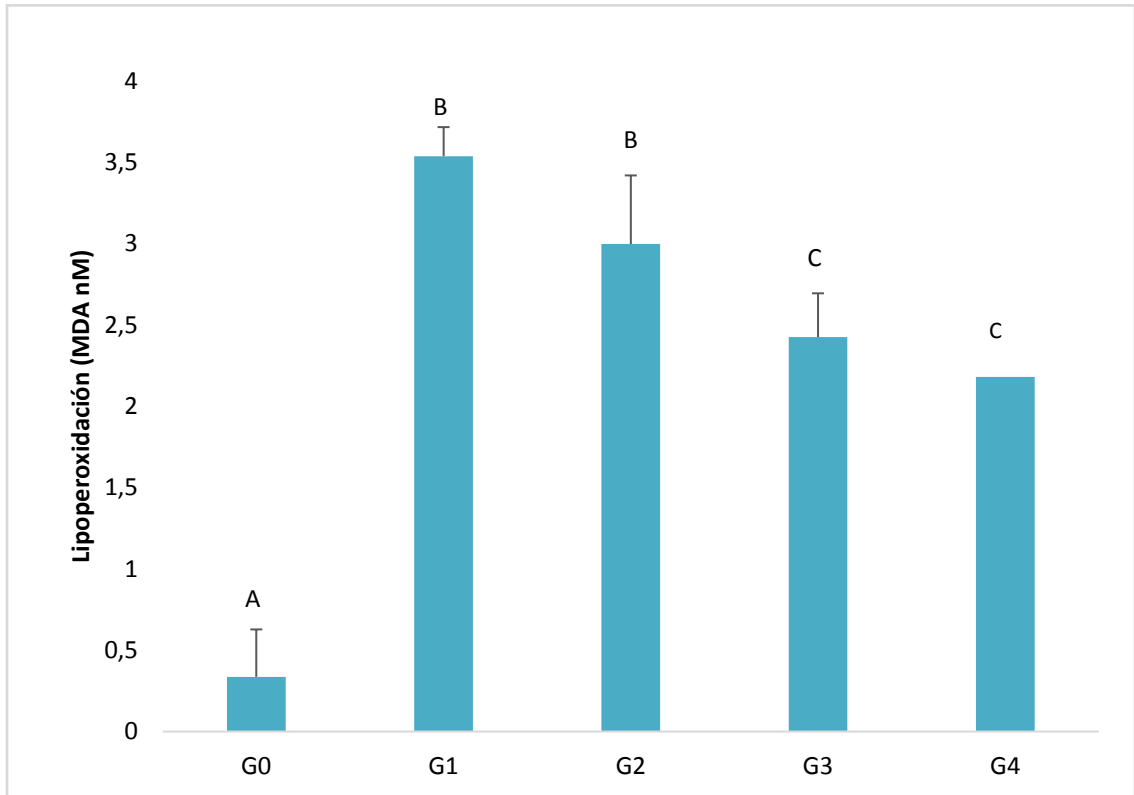
### 7.2.1 Lipoperoxidación

Este parámetro se midió a través de la oxidación de MDA, el cual es un residuo de la lipoperoxidación que se evalúa a través del ensayo TBARS y que extrapola daño oxidativo a nivel de membrana celular.

Los datos muestran que, luego de 35 días de administración de los tratamientos se observó diferencia significativa en la condición normal de una rata hembra no ovariectomizada (G0) ( $p = 1,5 \times 10^{-9}$ ) con respecto a aquellas que modelan una condición menopáusica, donde se observa claramente daño oxidativo. El comportamiento de los tratamientos muestra cambio significativo entre las condiciones experimentales, observándose una disminución del daño con respecto a la rata hembra ovariectomizada sin tratamiento (G1). Se observa similitud entre los tratamientos G1 y G2 ( $p = 0,439$ ) y entre G3 y G4 ( $p = 0,226$ ).

**(Fig. 7)**





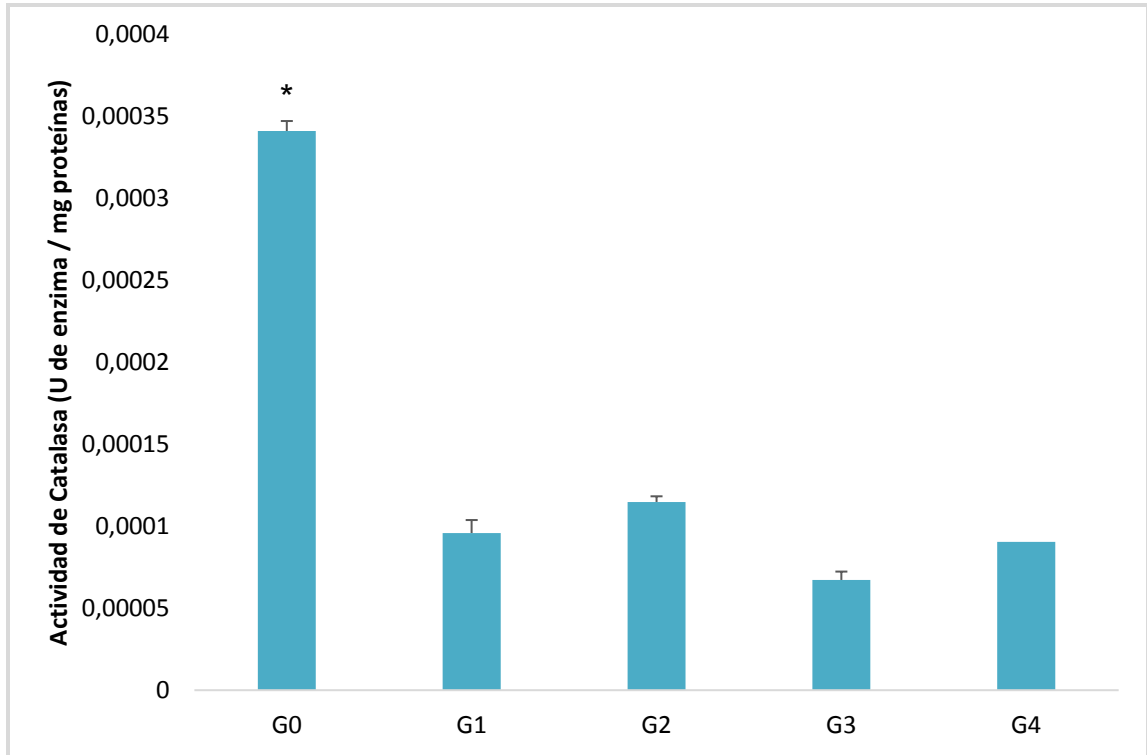
**Figura 7. Lipoperoxidación en macerado de tejido óseo correspondiente a una sección de la tibia proximal (MDA nM).** G0: NO OVX; G1: OVX; G2: OVX + Estradiol, G3: OVX+ Aceite de Palta, G4: OVX + Fitoesteroles. A muestra diferencias significativas con todos los tratamientos ( $p < 0,05$ ), B y C señalan similitud entre tratamientos. OVX: Ratas hembras ovariectomizada. ( $n = 25$ ; promedio  $\pm$  SD).

## 7.3 CAPACIDAD DE DEFENSA ANTIOXIDANTES ENZIMÁTICOS

### 7.3.1 Actividad de Catalasa

Se midió la actividad de catalasa expresada en U de enzimas/ mg de proteínas, usando la determinación de proteínas totales obtenidas mediante el método de Lowry et al (1951).

Los datos muestran que, luego de 35 días de administración de los tratamientos se observó diferencia significativa en la condición normal de una rata hembra no ovariectomizada (G0) ( $p = 0,00001$ ) en relación con los grupos que modelan una condición menopáusica, donde se observa una menor actividad de catalasa comparadas con G0. Sin embargo, el comportamiento de los tratamientos no muestra cambio significativo entre las 4 condiciones experimentales. Se observa un comportamiento similar entre los tratamientos G1, G2, G3 y G4. Lo antes descrito se representa en la **Figura 8**, en la cual se aprecia dicha diferencia.

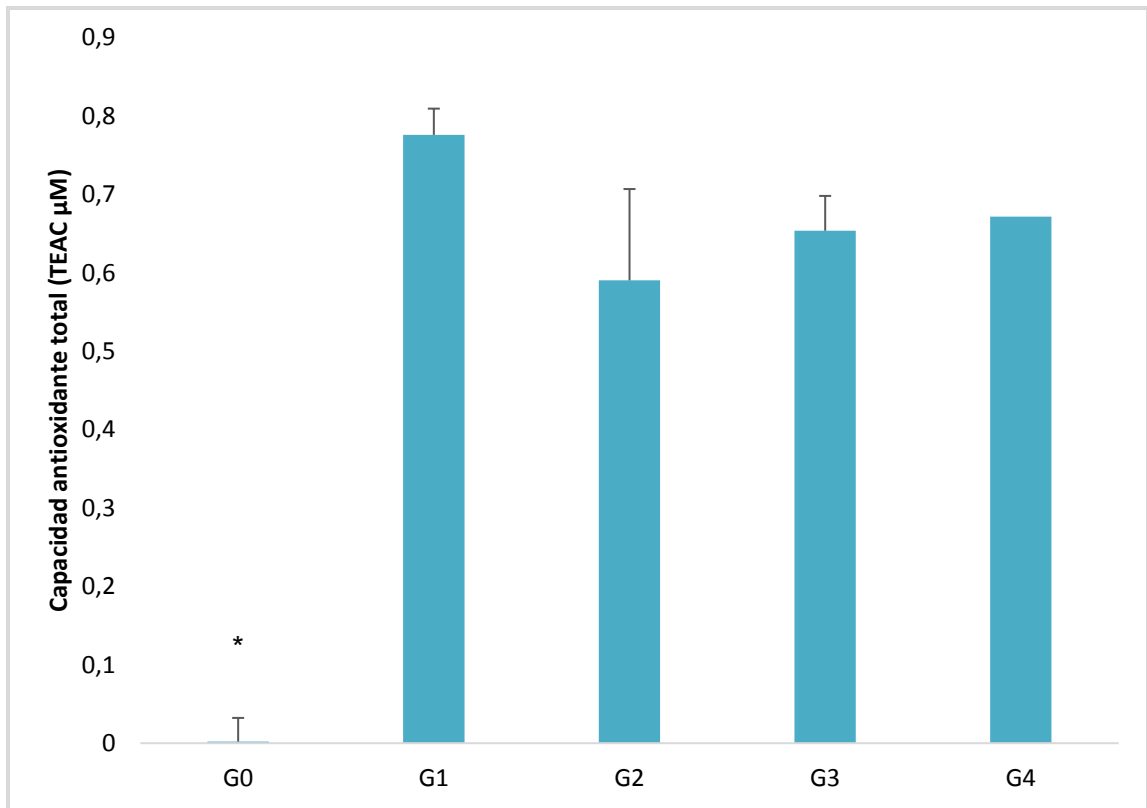


**Figura 8. Actividad de CAT (unidad de enzima / mg de proteína).** G0: NO OVX; G1: OVX; G2: OVX + Estradiol, G3: OVX+ Aceite de Palta, G4: OVX + Fitoesteroles. \*indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). OVX: Ratas hembras ovariectomizada. (n= 25; promedio  $\pm$  SD).

## 7.4 CAPACIDAD DE DEFENSA ANTIOXIDANTES NO ENZIMÁTICA

### 7.4.1 Capacidad Antioxidante Total

En relación con este parámetro expresado en  $\mu\text{M}$  TEAC (capacidad antioxidante equivalente a trolox) se observó que, tras 35 días de administración de los tratamientos, existen diferencias significativas en la condición normal de una rata hembra no ovariectomizada (G0) ( $p = 0,00001$ ) comparadas con aquellas que modelan una condición menopáusica, donde estas presentan una mayor capacidad antioxidante no enzimática con relación a G0. Sin embargo, el comportamiento de los tratamientos no muestra cambio significativo entre las 4 condiciones experimentales. Se observa similitud entre los tratamientos G1, G2, G3 y G4. Lo anterior se ve reflejado en la **Figura 9**.



**Figura 9. Capacidad antioxidante total medida en TEAC  $\mu\text{M}$  (capacidad antioxidante equivalente a trolox).** G0: NO OVX; G1: OVX; G2: OVX + Estradiol, G3: OVX+ Aceite de Palta, G4: OVX + Fitoesteroles. \*indica diferencias significativas ( $p < 0,05$ ). OVX: Ratas hembras ovariectomizada. ( $n = 15$ ; promedio  $\pm$  SD).

## 8. DISCUSIÓN

Las mujeres menopáusicas experimentarán una gran variedad de cambios fisiológicos principalmente asociados con el cese de la secreción de estrógeno. De hecho, se sabe que el estrógeno regula funciones biológicas benéficas conocidas, como el control de los episodios depresivos, la reducción del factor de riesgo cardiovasculares y también actúan como mediador de la regulación antioxidante (Sharma T. et al 2015).

Dentro de los síntomas comunes de la menopausia se encuentran las alteraciones del estado de ánimo y la cognición, síntomas vasomotores (es decir, sofocos), atrofia vaginal y uterina e interrupción del sueño y pérdida de densidad ósea. Esta complejidad de condiciones se ve reflejada en las alteraciones importantes que existen en las cascadas de señalización y las vías metabólicas. La literatura proporciona evidencia de que el estrés oxidativo afecta toda la vida reproductiva de una mujer, incluso la menopausia. Más recientemente, muchos estudios sugirieron la participación de los radicales libres y el estrés oxidativo en el envejecimiento y algunos procesos relacionados con la edad que a menudo acompañan a la menopausia (Behr et al 2012).

El aumento de la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) se considera una de las principales causas de varias enfermedades relacionadas con la edad. Estas especies se generan continuamente en condiciones fisiológicas y se controlan/eliminan eficazmente mediante sistemas antioxidantes intracelulares y extracelulares. Sin embargo, cuando la eficiencia de la capacidad antioxidante se ve disminuida, existe un aumento en la producción de ROS provocando un desequilibrio conocido como estrés oxidativo. (Doshi et al 2013).

En los últimos años, diversos autores sugieren el uso de diferentes tratamientos para mujeres en la menopausia en lugar del reemplazo hormonal tradicional. Esto debido a que, en primer lugar, no todas las mujeres posmenopáusicas con síntomas de la menopausia se consideran candidatas probables para recibir terapia hormonal; segundo, para evitar el aumento del riesgo de desarrollar cáncer de mama, accidente cerebrovascular y/o complicaciones cardiovasculares asociadas con el reemplazo hormonal. Dentro de los tratamientos alternativos que se sugieren incluyen medicamentos no hormonales, remedios herbales, vitaminas, minerales y suplementos antioxidantes entre otros. En base a esto último, se ha visto que una dieta balanceada con cantidades adecuadas de vitaminas, minerales y otros nutrientes juega un papel importante en la prevención y el tratamiento de enfermedades cardiovasculares, osteoporosis, obesidad, diabetes, cáncer, depresión y otras enfermedades relacionadas con la menopausia (Behr et al 2012).

A pesar de esto, aún se necesitan estudios clínicos y de ciencias básicas para dilucidar los mecanismos y los verdaderos efectos de estos tratamientos, lo que dificulta la provisión de recomendaciones basadas en la evidencia. Es por lo que, el objetivo de este estudio es evaluar los parámetros REDOX con tratamientos estrogénico como fitoesteroles y Aceite de Palta los que pudiesen ser una alternativa terapéutica para tratar las manifestaciones en la menopausia y en el contexto de esta investigación atenuar o enlentecer los procesos vinculados a la osteoporosis.

Los modelos experimentales de menopausia son ampliamente utilizados con fines de investigación, ya que las formas más comunes de inducir síntomas parecidos a la menopausia en animales de experimentación son mediante procedimientos quirúrgicos (ovariectomía, con cese dramático en la secreción hormonal) que da un acercamiento a lo que experimenta el modelo en humano. El procedimiento quirúrgico mejor caracterizado e informado para inducir la menopausia experimental en ratas y ratones es la ovariectomía bilateral. Este procedimiento hace posible en un corto período de tiempo la adquisición de ratas hembras sin la secreción de hormonas ováricas (Behr et al 2012). Además, las ratas ovariectomizadas (OVX) muestran mayor riesgo de presentar síntomas de osteoporosis, hipertrofia cardíaca, importantes disfunciones cardiovasculares, atrofia uterina y un desequilibrio entre la producción de radicales libres y los niveles de defensas antioxidantes, con un mayor estrés oxidativo y, en



consecuencia, una aceleración del proceso de envejecimiento en diferentes tejidos (Davis et al 2015).

Como se mencionaba anteriormente el modelo menopaúsico presenta una condición de base que lo hace más susceptible al daño oxidativo, debido a que se ha interrumpido la estrogenicidad propia del roedor tras el proceso de ovariectomización (OVX) y con ello se ven alterados todos los mecanismos de defensa a nivel óseo en los que actuaría el estradiol (Manolagas 2010). A su vez, la OVX llevaría a un aumento del recambio óseo asociado a la pérdida de la regulación que ejercía el estradiol en la producción y acción de citoquinas inflamatorias como el factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleuquina 1 (IL-1) e IL-6, linfocitos y sobre el ligando receptor activador del factor nuclear kB (RANKL) (El Habachi et al 2014) favoreciéndose un ambiente proinflamatorio y generando un mayor riesgo para que la rata presente osteoporosis (Eastell et al 2016).

En relación con lo descrito por la literatura y a lo observado al comparar el grupo G0 con G1 (rata OVX), se ve demostrado que dicha condición promueve un aumento oxidativo lo cual se expresa en daño a nivel de los lípidos de membrana, un resultado similar se obtuvo en un estudio realizado por El Habachi (2014) , en donde se midió la oxidación de malondialdehído (MDA) en sangre, demostrando que el grupo que fue ovariectomizado presentó un nivel mayor de Oxidación

lipídica que el grupo control no ovariectomizado. Por otro lado, G1 que representa el modelo menopáusico, mostró una disminución de la capacidad antioxidante de primera línea (endógenas) como catalasa, la cual se ve sobrepasada por el daño, y un aumento de TRAP lo cual podría estar compensando la disminución de antioxidantes endógenos, sin embargo, no es capaz de revertir el daño. Frente a esto último, el estudio realizado por El Habachi (2014) muestran que en el ensayo de TRAP que el grupo OVX tenía niveles significativamente inferiores frente al grupo control sin OVX, cosa que contrasta con lo obtenido en este estudio, lo cual se podría explicar por el hecho de que fue medido en sangre donde los resultados se analizan a nivel sistémico y no directamente en tejido óseo donde podemos observar in situ y tener un acercamiento del comportamiento del tejido en particular.

Por otra parte, al observar a aquellos grupos que fueron sometidos a tratamientos con capacidades estrogénicas, se puede apreciar que son capaces de disminuir el daño oxidativo, lo que podría favorecer las vías de formación de matriz ósea y la disminución de las condiciones que promueven la resorción lo que se comprueba en la histología. En estudios realizados en sangre de ratas, se ha observado que el tratamiento con estradiol en modelos menopáusicos ha llevado a un descenso del daño oxidativo, pero este no alcanza los niveles que expresa el modelo de rata no OVX (El Habachi et al 2014).

Tras el estudio de la histología ósea se puede apreciar un claro aumento en la densidad del hueso en donde el grupo G3 (OVX + aceite de palta) alcanza significativamente el grosor del control con estradiol (grupo G2: (OVX + estradiol), esto debido a que el aceite de palta presenta dentro de sus compuestos elementos esteroides como el fitoesterol ( $\beta$ -sitoesterol), estigmasterol y campesterol (Moreno et al 2014), que le otorgan propiedades estrogénicas, lo que quedó comprobado en un ensayo realizado en ratas OVX, en el cual tras la ingesta de aceite de palta, se observó en la histología un engrosamiento del epitelio endometrial (Vozmediano, 2013). Además de un aumento del grosor del epitelio uterino y vaginal, junto con la aparición de glándulas uterinas (Medina, 2016; Solis, 2016).

Por otra parte, el aceite de palta presenta ácidos grasos monoinsaturados y poliinsaturados como el ácido oleico, linoléico y palmitoleico que le proporcionan una capacidad antioxidante capaz de estabilizar la generación de radicales. En un estudio realizado por Moreno et al 2014, se obtuvo que el aceite de palta presenta mayor actividad antioxidante en comparación con otros frutos tropicales (curuba, gulupa, lulo, tomate de árbol y uchuva) por medio del método DPPH, además de presentar un alto contenido total de fenoles. De igual forma, en dicho estudio se comprobó, tras el ensayo de inhibición del estrés oxidativo sobre el crecimiento de *S. cerevisiae* (Levadura de cerveza), el efecto protector del aceite de palta, el cual indujo mayores efectos de protección y por ende de crecimiento

del *S. cerevisiae*. Lo anterior puede ser explicado, debido a que el aceite de palta posee mayoritariamente ácido oleico (Olaeta et al, 1999) el cual se ha comprobado que presenta propiedades antioxidantes al ser capaz de reducir los niveles de lipoperoxidación, a nivel del sistema nervioso central, inducida por la administración del ácido 3-nitropropionico (Alconchel et al 2014). Según lo descrito anteriormente, tanto las características estrogénicas como antioxidantes del aceite de palta, le otorga un potencial que le permiten disminuir el daño que se produce tras el descenso de estradiol favoreciendo la homeostasis ósea y la formación de hueso, además de aumentar la capacidad antioxidante no enzimática.

A su vez los fitoesteroles presentan  $\beta$ -sitosterol, el cual posee agentes antiinflamatorios que tienen actividad antioxidante y analgésica, lo cual ha sido demostrado por medio de estudios realizados en animales, en donde el  $\beta$ -sitosterol al ser considerado un fitoestrógeno presenta afinidad por los receptores de estrógeno (ER), generándose su efecto antioxidante por medio de la activación de señales como PI3K similar a lo que sucede naturalmente con el estradiol (Shi et al., 2013). Además, se ha comprobado en estudios realizados en ratas OVX que el  $\beta$ -sitosterol puede actuar como agonista estrogénico (Malini y Vanithakumari, 1992) afectando de forma positiva al sistema reproductivo de los animales, debido a que se une a los receptores ER $\alpha$  y ER $\beta$  (Ju y col., 2004), siendo más eficaz la unión a los receptores ER $\beta$  presente en células óseas del

hueso trabecular (Eastell et al 2016). De igual forma, tras estudios clínicos realizados a mujeres postmenopáusicas, se comprobó su efecto estrogénico que contribuiría a la formación de hueso (Granado y col, 2014).

A pesar de lo anteriormente descrito, los tratamientos no son capaces de revertir la disminución de la actividad de catalasa, esto pudiese explicarse ya que como hay un ambiente prooxidante esta condición pudiese estar oxidando a la enzima, o podría estar induciendo la expresión de otras enzimas antioxidantes como el glutatión peroxidasa-reductasa los que utiliza como sustrato al peróxido de hidrogeno ( $H_2O_2$ ), sin embargo estas enzimas no fueron medidas. Lo anterior se explica por medio de aquellos factores que ayudan en la protección contra el daño oxidativo como el factor nuclear eritroide 2 relacionado con el factor 2 (Nrf2), el cual es un factor de transcripción expresado en las células óseas, en donde la disminución de estradiol y con ello la generación de estrés oxidativo provoca que se inhiba Keap1 y se libere Nrf2 migrando al núcleo activándose los genes antioxidantes favoreciendo la formación del complejo glutatión peroxidasa-reductasa que tiene como efecto potenciar la supervivencia del osteoblasto y regular la diferenciación osteoclástica (Sun et al 2015). A su vez Nrf2 disminuye la expresión de RANKL reduciendo el número de osteoclastos, por lo que la disminución de Nrf2 promueve la actividad y diferenciación osteoclástica generando una mayor resorción ósea.

En relación con TRAP, se puede apreciar un aumento en los tratamientos estrogénicos similar a lo que sucede con G1, lo que se podría explicar debido a la disminución de la capacidad antioxidante endógena (observada en la actividad de catalasa). Se ha visto que en estudios realizados en sangre de ratas ovariectomizadas y sometidas a tratamiento estrogénico se ha generado un aumento de la capacidad antioxidante no enzimática (El Hibachi et al 2014).

En el caso obtenido de G0, no se observaron aumentos en TRAP, lo que se debe principalmente a que los mecanismos primarios son capaces de mitigar el daño. Ya que existen niveles normales de estradiol, ejerciendo su acción de regulación de la actividad y diferenciación osteoblástica, debido a que estimula las células mesenquimales precursoras de la osteogénesis e inhiben la apoptosis de los osteoblastos y osteocitos (Eastell et al 2016). Por otra parte, la estructura hidroxifenólica del estradiol le permite donar un átomo de hidrógeno de su grupo hidroxilo fenólico terminando la reacción en cadena de oxidación, además de que regula la actividad de enzimas antioxidantes como GSH-PX (Bednarek-Tupikowska et al 2004).

## **8.1 RELEVANCIA CLÍNICA**

En base a lo anteriormente descrito, se debe tener en cuenta la transición que produce la menopausia en la condición de salud y calidad de vida de la mujer (Davis et al 2015), y como los efectos de la menopausia, tales como la resorción ósea acelerada, la pérdida de masa muscular esquelética y con ello la inactividad, son un factor de riesgo para la generación de osteoporosis haciéndola más propensa a fracturas (Eastell et al 2016).

Además, se puede observar la influencia de los diversos tratamientos, ya sean farmacológicos, como el reemplazo hormonal o los no farmacológicos, como aquellos incorporados a través de la dieta y la actividad física, los cuales generaran sus efectos en los diferentes sistemas, condicionando la evolución y tiempos de reparación de los tejidos, especialmente el óseo (Davis et al 2015). Esto es relevante a la hora de tratar a una paciente que se encuentre en esta condición, por lo que es de suma importancia el conocimiento a profundidad sobre el proceso de menopausia, para tener en cuenta los cambios que ésta genera y las precauciones que se deben tener.

Por lo tanto, la mirada kinésica debe ir orientada a la prevención de alteraciones cardiovasculares y musculo-esqueléticas por medio de la educación, dándoles a conocer que la actividad física, la dieta equilibrada y estilo de vida saludables (el

no consumo de alcohol y el cese del hábito tabáquico) pueden aliviar y prevenir complicaciones propias de la menopausia (Davis et al 2015). Se ha visto que el estímulo mecánico mediante la actividad física sobre el sistema musculoesquelético, mantiene los niveles óptimos de masa muscular y permite mejorar la densidad ósea, lo cual va a proporcionar, mayor equilibrio estático/dinámico, reduciendo el riesgo de caídas y fracturas en las mujeres post-menopáusicas (Davis et al 2015).

Es por lo anteriormente descrito, que los cambios asociados a la menopausia, dentro de ellos el desbalance en la formación ósea juntamente con una disminución de la masa muscular, sumado a la inactividad física producto del sedentarismo causado por el desánimo y la depresión por la que cursan algunas mujeres durante este periodo, conlleva a un mayor riesgo de caídas, fracturas y en casos graves muertes por fracturas (Eastell et al 2016), afectando su condición de salud y calidad de vida (Davis al 2015). Siendo importante la labor del profesional kinesiólogo, tanto en la rehabilitación de estas pacientes como en la educación de las mujeres que se encuentran en este periodo fisiológico y a los profesionales de la salud, respecto a los efectos sistémicos de la menopausia, donde es importante para nosotros los tiempos de consolidación ósea, lo cual va a condicionar la aplicación de técnicas kinésicas y el tiempo en el cual se deben aplicar.



Por otra parte, se debe promover los estilos de vida saludable, en donde una dieta equilibrada que incorpore en este caso aceite de palta, el cual debido a sus compuestos como fitoesteroles ( $\beta$ -sitoesterol) y ácidos grasos monoinsaturados (ácido oleico), tiene efectos benéficos en el aumento de la densidad ósea (Granado y col, 2014), permitiendo disminuir los riesgos de padecer osteoporosis. Esto, sumado a promover la realización de actividad física, la cual tras los estímulos mecánicos mejora el depósito de matriz ósea a través del aumento en la sensibilidad de los osteocitos (Davis et al 2015), disminuyendo el riesgo de fracturas principalmente de cadera, muñeca y columna que según la IOF son las primeras zonas en perder masa ósea en la post-menopausia. Por lo que se mejoraría así, la calidad de vida de las mujeres que estén cursando este periodo.

## 9. CONCLUSIÓN

El modelo de rata ovariectomizada que representa una condición menopáusica, presenta un ambiente de base pro-oxidante que contribuye al desbalance REDOX promoviendo el daño oxidativo y favoreciendo la manifestación de la osteoporosis.

Los tratamientos alternativos muestran un efecto estrogénico ya que son capaces de disminuir la resorción ósea en el modelo OVX. Esta condición se condice con la disminución en el daño oxidativo tanto en el tratamiento con aceite de palta como con fitoesterol.

El Aceite de Palta como fitoesterol no son capaces de inducir la actividad de catalasa. Sin embargo, favorecen las condiciones antioxidantes no enzimáticas que mitigan el daño oxidativo y que promueve un microambiente que favorece el aumento en la densidad ósea.

## 10. REFERENCIAS

Aebi, H. (1984) Catalase in vitro. *Methods Enzimol* 105:121–126.

Almeida M., Laurent M., Dubois V., Claessens F., O'Brien C., Bouillon R., Vanderschueren D., & Manolagas S. (2016). Estrogens and Androgens in Skeletal Physiology and Pathophysiology. *Physiol Rev*; 97: 135-187.

Almeida M., (2012). Aging mechanisms in bone. *BoneKEY Reports* n°102.

Almeida M., (2010); Aging and oxidative stress: A new look at old bone. *Rev. IBMS BONEKEY* 7: 340-352.

Almeida M., Han L., Martin-Millan M., Plotkin L., Stewart S., Roberson P., Kousteni S., O'Brien C., Bellido T., Parfitt A. M., Weinstein R., Jilka R., Manolagas S. (2007). Skeletal Involution by Age-associated Oxidative Stress and Its Acceleration by Loss of Sex Steroids. *The journal of biological chemistry* vol. 282, NO. 37, pp. 27285–27297.

Alconchel Gago F., Santamaría A., Túnez I. (2014). Antioxidant effect of oleic acid and hydroxytyrosol in an experimental model similar to Huntington's disease. *Actualidad médica*. 99. 60-64. 10.15568/am.2014.792. or 01.

Arslan A., Orkun S., Aydin G., Keles I., Tosun A., Arslan M., Caglayan O. (2011). Effects of ovariectomy and ascorbic acid supplement on oxidative stress parameters and bone mineral density in rats. *Libyan J Med* 6: 5965.

Arriagada M., Arteaga E., Bianchi M., Brantes S., Montaña R., Osorio E., Pardo M., Rencoret C., Suárez E., Valderrama O., Valdivia I., Villaseca P. (2005). Recomendaciones de tratamiento en la menopausia. *rev chil obstet ginecol*; 70(5): 340-345.

Bai X., Lu D., Bai J., Zheng H., Ke Z., Li X., Luo S. (2004). Oxidative stress inhibits osteoblastic differentiation of bone cells by ERK and NF- $\kappa$ B. *Biochemical and Biophysical Research Communication* 314: 197-207.

Banfi G., Iorio E., Corsi M. (2008). Oxidative stress, free radicals and bone remodeling. *Clin Chem Lab Med*; 46(11):1550–1555.

Barton M. (2013). Cholesterol and atherosclerosis: modulation by oestrogen. Researchgate Vol 24 1-7.

Behr, G. A., Schnorr, C. E. and Moreira, J. C. F. (2012), Increased blood oxidative stress in experimental menopause rat model: the effects of vitamin A low-dose supplementation upon antioxidant status in bilateral ovariectomized rats. *Fundamental & Clinical Pharmacology*, 26: 235–249.

Bednarek-Tupikowska G., Tworowska U., Jedrychowska I., Radomska B., Tupikowski K., Bidzinska-Speichert B. and Milewicz A. (2006) Effects of oestradiol and oestrogen on erythrocyte antioxidative enzyme system activity in postmenopausal women. *Clinical Endocrinology* 64: 463–468.

Bednarek-Tupikowska G, Tupikowski K, Bidzinska B, Bohdanowicz-Pawlak A, Antonowicz-Juchniewicz J, Kosowska B. and Milewicz A. (2004). Serum lipid peroxides and total antioxidant status in postmenopausal women on hormone replacement therapy. *Gynecol Endocrinol* 19:57–63.

Castillo R. Propuesta de un método alternativo para la detección de sustancias con actividad estrogenica mediante la inducción de pubertad anticipada en ratas. Tesis para optar al título de Químico Farmacéutico, Universidad de Valparaíso, 2010.

Calderón A. M. (2005) Los estrógenos y el hueso: revisión de la evidencia. *Prog Obstet Ginecol*; 48(2):79-90.

Calzada C. & Jiménez C., (2013). Menopause induces Oxidative Stress. *INTECH*. Chapter 12: 290-307.

Cervellati C., Bonaccorsi G., Cremonini E., Romani A., Fila E., Castaldini M. C., Ferrazzini S., Giganti M., Massari L. (2014). Oxidative Stress and Bone Resorption Interplay as a Possible Trigger for Postmenopausal Osteoporosis. *BioMedResearchInternational* 1-8.

D`Abrosca B., Lavorgna M., Scognamiglio M., Russo C., Graziani V., Piscitelli C., Fiorentino A., Isidori M. (2017) 2D-NMR investigation and in vitro evaluation of antioxidant, antigenotoxic and estrogenic/antiestrogenic activities of strawberry grape. *Food Chem Toxicol*; 105: 52-60.

Davis SR, Lambrinoudaki I, Lumsden M, Mishra GD, Pal L, Rees M, Santoro N, Simoncini T. (2015) Menopause *Nat Rev Dis Primers*. 1:15004.

Dul A. (2013). Menopause of McMaster Pathophysiology Review.

Doshi, S. B., & Agarwal, A. (2013). The role of oxidative stress in menopause. *Journal of Mid-Life Health*, 4(3), 140–146.

Eastell R., O'Neill T., Hofbauer L., Langdahl B., Reid I., Gold D. and Cummings S. (2016) Postmenopausal osteoporosis. Macmillan Publishers Limited, part of Springer Nature vol: 2, 1-16.

El Habachi N, Maklad H, Sharara G, Allam E, Fawzy E (2014). A comparative study between the effect of 17- $\beta$  estradiol and antioxidants combination on some menopausal changes in oophorectomised rats. *Middle East Fertility Society Journal* 19: 303-313.

Esterbauer, KH., Cheeseman, MU., Dianzani, G., Slater, TF. (1982), Separation and characterization of the aldehydic products of lipid peroxidation stimulated by ADP-Fe<sup>2+</sup> in rat liver microsomes. *Biochem J*, 208(1), 129–140.

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: 125–129.

Farman H., Windahl S., Westberg L., Isaksson H., Egecioglu E., Schele E., Ryberg H., Jansson J. O., Tuukkanen J., Koskela A., Xie S., Hahner L., Zehr J., Clegg D. J., Lagerquist M. K., Ohlsson C. (2016). Female Mice Lacking Estrogen Receptor- $\alpha$  in Hypothalamic Proopiomelanocortin (POMC) Neurons Display Enhanced Estrogenic Response on Cortical Bone Mass. *Endocrinology*, 157(8):3242–325.

Fernández J, Da Silva-Grigoletto M & Túnez-Fiñanac I. (2009). Estrés oxidativo inducido por el ejercicio. *Rev Andal Med Deporte*, 1, 19-34.

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.

Fidarov A., Vihma V., Bogautdinov R., Morozkina S. N., Shavva A., Tikkanen M. (2015). Novel structural features increase the antioxidant effect of estrogen analogues on low density lipoprotein. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 154: 142-149.

Gutiérrez J. (2002). Daño oxidativo, radicales libres y antioxidantes. *Rev Cubana Med Milit*, 31(2): 126-33.

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.

Han G. & White R. (2014) G-protein-coupled estrogen receptor as a new therapeutic target for treating coronary artery disease. *World J Cardiol* June 26; 6(6): 367-375.

Hill K. (1996). *The demography of menopause*. Elsevier, 23, 113-127.

International Osteoporosis Foundation (IOF). (2012) Latin America regional audit: epidemiología, costos e impacto de en osteoporosis 2012.

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.

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.

Kennedy P., Jain A., Srinivasan R. and Chaudhry S. (2013). Calcium homeostasis and osteoporosis. Enero 16, 2013, de McMaster Pathophysiology Review Sitio web.

Kushi L., Folsom A., Prineas R., Mink P., Wu Y., Bostick R. (1996). dietary antioxidant vitamins and death from coronary heart disease in postmenopausal women. *The new england journal of medicine* 1156-1162.

Lee Y., Hong J., Kim S., Joo J., Na Y., Lee K. (2015). The association between oxidative stress and bone mineral density according to menopausal status of Korean women. *Obstet Gynecol Sci*; 58(1): 46-52.

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.

Malini T., Vanithakumari G. (1992). Comparative study of  $\beta$ -sitosterol, stradiol and progesterone on selected biochemical parameters of the uterus of ovariectomized rats. *J Ethnopharmacol*. 28:221-234.

Malini T, Vanithakumari G (1990). Rat toxicity studies with beta-sitosterol. *Journal of Ethnopharmacology*, 28(2), 221–234.

Manolagas S. (2010). From Estrogen-Centric to Aging and Oxidative Stress: A Revised Perspective of the Pathogenesis of Osteoporosis. *Endocrine Reviews*, 31(3):266–300.

Manolagas S, O'Brien CA, Almeida M. (2013). The role of estrogen and androgen receptors in bone health and disease. *Nat Rev Endocrinol.*, 9(12), 699-712.

Marotte C. & Zeni S. (2013), Especies reactivas de oxígeno y su efecto sobre la actividad de las células óseas. *Acta Bioquím Clín Latinoam*; 47 (4): 661-74.

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.

Mendelsohn M. & Karas R. (1999) the protective effects of estrogen on the cardiovascular system. *The New England Journal of Medicine* Vol 340 Number 23 1801-1811.

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.

Miquel J., Ramírez-Bosca A., Ramírez-Bosca J. V., Diaz Alperi J. (2006). Menopause: A review on the role of oxygen stress and favorable effects of dietary antioxidants. *Archives of Gerontology and Geriatrics* 42: 289–306.

Moreau G., 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.* 49:37933795.

Moreno E., Ortiz B., Restrepo L. (2014). Contenido total de fenoles y actividad antioxidante de pulpa de seis frutas tropicales. *Rev. Colomb. Quim.*, 43 (3), 41-48.

Moris S, Sawai T, Teshima T, Kyogoku M (1988). A new decalcifying studies of calcified for immunohistochemical tissue, especially applicable to technique. *The Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, 36:111–114.

Muthusami S., Ramachandran I., Muthusamy B., Vasudevan G., Prabhu V., Subramaniam V., Jagadeesan A., Narasimhan S. (2005). Ovariectomy induces oxidative stress and impairs bone antioxidant system in adult rats. *Clinica Chimica* 360: 81-86.

NRC, National Research Council. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals: Eighth Edition. The National Academies Press, Washington DC, 2011.

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

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.

Ozgoçmen S., Kaya H., Fadillioglu E., Aydoğan R., Yılmaz Z. (2007). Role of antioxidant systems, lipid peroxidation, and nitric oxide in postmenopausal osteoporosis. *Molecular and Cellular Biochemistry* 295: 45–52.

Pankova S, Tsvetkova D (2015). Role of phytoestrogens in prevention of osteoporosis. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*. 7(2):1-6.

Pavel R., Popescu M., Novac L., Mogoantă L., Mogoanta L., Pavel L., Vicas R., Traistaru M. (2016). Postmenopausal osteoporosis – clinical, biological and histopathological aspects. *Rom J Morphol Embryol* 57(1):121–130.

Pérez R, Villanueva S, Cosío R (2005). El aceite de aguacate y sus propiedades nutricionales. *E-Gnosis*. 3(10), 0–11.

Pérez-López P., Cano A., Calaf J., Vázquez F., Ferrer Barriendos J. (2009). Factores reguladores del recambio óseo: estrógenos y vitamina D. *Prog Obstet Ginecol*. 52(2):99-108.

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.

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.



Prasad K, Kumar PB, Chakravarthy M y Prabhu G (2012). Applications of "TissueQuant"- a color intensity quantification tool for medical research. *Computer Methods and Programs in Biomedicine*, 106: 27–36.

Romay, C., Pascual, C., Lissi, E.A. (1996). The reaction between ABTS radical cation and antioxidants and its use to evaluate the antioxidant status of serum samples. *Braz. J. Med. Biol.* 29, 175-183.

Rosenblum E., Stauber R., Van Thiel D. (1993). Assessment of estrogenic activity of phytoestrogens isolated from bourbon and beer. *Alcohol clin Exp Res.* 17:1207-1209.

Sekhon L. H. & Agarwal A. (2013). The Menopause and Oxidative Stress. *ResearchGate* 181- 203.

Sharma T, Islam N, Ahmad J, Akhtar N, Beg M. (2015) Correlation between bone mineral density and oxidative stress in postmenopausal women. *Indian J Endocr Metab*; 19:491-7.

Shi C, Wu F, Zhu X y Xu J (2013). Incorporation of  $\beta$ -sitosterol into the membrane increases resistance to oxidative stress and lipid peroxidation via estrogen receptor mediated PI3K/GSK3 $\beta$  signaling. *Biochimica et Biophysica Acta General Subjects*, 1830(3), 2538–2544.

Solis C. 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. 2016.

Sugioka K., Shimosegawa Y. & Nakano M. (1987). Estrogens as natural antioxidants of membrane phospholipid peroxidation. *Elsevier Volume 210*, number 1, 37-39.

Sun, Y.-X., Xu, A.-H., Yang, Y., y Li, J. (2015). Role of Nrf2 in bone metabolism. *Journal of Biomedical Science*, 22:101.

Victorino V. J., Panis C., Campos F. C., Cayres R. C., Colado-Simão A. N., Oliveira S. R., Herrera A. C., Cecchini A. L., R. Cecchini (2013). Decreased oxidant profile and increased antioxidant capacity in naturally postmenopausal women *Springer* 35:1411–1421.

Velásquez N. & Fernández-Michelena M. (2004). Efectos poco publicados de los estrógenos. Revisión. *Rev Obstet Ginecol Venez* vol 64.

Vozmediano A. J., 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. 2013.

Vural P, Akgu C and Canbaz M. (2005). Effects of menopause and tibolone on antioxidants in postmenopausal women. *Ann Clin Biochem* 2005; 42: 220–223.

Yang S., Feskanich D., Willett W., Eliassen A. H., Wu T. (2014). Association Between Global Biomarkers of Oxidative Stress and Hip Fracture in Postmenopausal Women: A Prospective Study. *Journal of Bone and Mineral Research*, Vol. 29, No. 12, pp 2577–2583.

Yang Y., Zheng X., Li B., Jiang S., Jiang L. (2014). Increase activity of osteocyte autophagy in ovariectomized rats and its correlation with oxidative stress status and bone loss. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 451: 86-92.

Yin H., Shi Z., Yu Y., Hu J., Wang R., Luan Z., Guo D. (2012). Protection against osteoporosis by statins is linked to a reduction of oxidative stress and restoration of nitric oxide formation in aged and ovariectomized rats. *European Journal of Pharmacology* 674: 200-206.

Yuan Z., Jiang G., Fu S., Li Q., Chen L., Peng K., Gao W., Zeng J., Tan Z., Ai Y., Mi I. (2016) Original Article Correlation between autophagy of osteoblasts and oxidative stress of osteoporosis rats. *Int J Clin Exp Pathol* 9(10):9907-9915.

Zago V., Sanguinetti S., Brites F., Berg G., Verona J., Basilio F., Wikinski R., Schreier L. (2004). Impaired high density lipoprotein antioxidant activity in healthy postmenopausal women. *Atherosclerosis* 177: 203-210.

Zhang Y., Zhong Z., Hou G., Jiang H., Chen J. (2011). Involvement of Oxidative Stress in Age-Related Bone Loss. *Journal of Surgical Research* 169: 37-42.

Zhou Q., Zhu L., Zhang D., Li N., Li Q., Dai P., Mao Y., Li X., Ma J., Huang S. (2016). Oxidative Stress-Related Biomarkers in Postmenopausal Osteoporosis: A Systematic Review and Meta-Analyses. Hindawi Publishing Corporation *Disease Markers* 1-12.

## 11. ANEXOS

### Anexo 1: Comité de Bioética para la Investigación.



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.

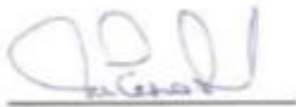
Para su evaluación, el CBI revisó los antecedentes contenidos en la “SOLICITUD PARA LA APROBACIÓN DE INVESTIGACIÓN QUE INVOLUCRE A ANIMALES COMO SUJETOS DE INVESTIGACION (Versión Julio 2015). La solicitud incluye como anexos: (1) Protocolo de supervisión de animales y (2) CV de Prof. María Fernanda Cavieres.

*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.

- 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.

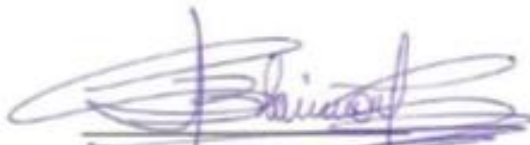
Firman el Acta los miembros del Comité:



Marcela Escobar



Claudia Vega



Sergio Bustamante



Rafael Jiménez



Raúl Vinet

Valparaíso, 09 de septiembre de 2016