

UNIVERSIDAD NACIONAL MAYOR DE SAN MARCOS

FACULTAD DE FARMACIA Y BIOQUÍMICA

UNIDAD DE POST-GRADO

**Efecto Estrogénico del extracto Hidroalcohólico de
alfalfa (Medicago Sativa) en Ratas Albinas
Ovariectomizadas**

TESIS

Para optar al Grado Académico de Magister en Farmacología con mención
en Farmacología Experimental

AUTOR

Sandra Gracia Bezada Quintana

Lima-Perú

2010

INDICE

RESUMEN

	Pág.
I. INTRODUCCIÓN	1
II. GENERALIDADES	3-21
III. PARTE EXPERIMENTAL	22-28
IV. RESULTADOS	29-34
V. DISCUSIÓN	35-39
VI. CONCLUSIONES	40
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41-51
VIII. ANEXOS	52-57

RESUMEN

Objetivo: Demostrar las propiedades estrogénicas del extracto hidroalcohólico de la especie *Medicago sativa* L (alfalfa) en ratas albinas ovariectomizadas (OVX). **Método:** Se emplearon 48 ratas albinas Sprague Dawley hembras de 200 a 250 g. de 8 semanas de edad de las cuales 40 fueron sometidas a extirpación quirúrgica de ambos ovarios (OVX) siguiendo la técnica de ovariectomía bilateral por el flanco. Después del post-operatorio las ratas se dividieron en seis grupos y se suministró el extracto hidroalcohólico de *Medicago sativa* (alfalfa) bajo el siguiente esquema de trabajo: Grupo 1: Control Negativo (OVX), vehículo, VO, 2mL/kg; Grupo 2: Control Positivo (OVX) ,Estradiol, SC, 3ug/kg; Grupo 3: (OVX)Extracto Alfalfa ,VO, 100 mg/kg; Grupo 4: (OVX),Extracto Alfalfa, VO, 500 mg/kg; Grupo 5: (OVX), Extracto Alfalfa, VO, 1000 mg/kg; Grupo 6: (No OVX),Control del procedimiento quirúrgico. El tratamiento duró 14 días. Los parámetros evaluados fueron peso del útero, peso corporal, cambios del ciclo estral mediante frotis vaginal y análisis del perfil hormonal. **Resultados:** Se observó aumento en el peso de útero en las dosis de 500mg/kg y 1000mg/kg.; además de la presencia de alcaloides, flavonoides y saponinas en el extracto hidroalcohólico de alfalfa en cantidad regular. En la técnica quirúrgica empleada la combinación anestésica xilazina (2mg/kg), ketamina (40mg/kg) indujo un plano quirúrgico óptimo (plano 2), sin complicaciones en el post-operatorio ni la muerte de los animales. **Conclusiones:** El extracto hidroalcohólico de *Medicago sativa* L (alfalfa) causa un efecto estrogénico al incrementar el peso de útero en ratas OVX

en las dosis de 500mg/kg y 1000mg/kg. Además contiene saponinas en cantidad regular. La técnica quirúrgica ovariectomía bilateral por el flanco es un método práctico, confiable y menos traumático para los animales que permite realizar investigaciones sobre deficiencia de estrógenos.

Palabras clave: *Medicago sativa* L alfalfa, efecto estrogénico, ratas ovariectomizadas (OVX), ovariectomía bilateral por el flanco.

SUMMARY

Objective: Demonstrate the estrogenic properties of hydroalcoholic extract of the species *Medicago sativa* L (alfalfa) in albino rats ovariectomized (OVX).

Methods: We used 48 Sprague Dawley female albino rats of 200 to 250 g. 8 weeks of age, of which 40 underwent surgical removal of both ovaries (OVX) by means of bilateral ovariectomy on the flank. After post-operative rats were divided into six groups and provided the hydroalcoholic extract of *Medicago sativa* (alfalfa) under the following work schedule: Group 1: Negative Control (OVX), vehicle, VO 2 ml / kg, Group 2: Positive Control (OVX), estradiol, SC, 3ug/kg; Group 3 (OVX) Alfalfa extract, VO, 100 mg / kg, Group 4 (OVX), Alfalfa extract, VO, 500 mg / kg, Group 5: (OVX), Alfalfa extract, VO, 1000 mg / kg, Group 6: (No OVX), Control of the surgical procedure. The treatment lasted 14 days. The outcome measures were uterine weight, body weight, estrous cycle changes by vaginal smear and hormonal profile analysis.

Results: The increase in uterine weight at doses of 500mg/kg and 1000mg/kg., Besides the presence of alkaloids, flavonoids and saponins in the hydroalcoholic extract of alfalfa in regular amount. In the surgical technique used anesthetic combination xylazine (2mg/kg), ketamine (40mg/kg) induced an optimal surgical plane (plane 2), without complications or postoperative death of animals. **Conclusions:** The hydroalcoholic extract of *Medicago sativa* L (alfalfa) causes an oestrogenic effect by increasing the uterus weight in OVX rats at doses of 500mg/kg and 1000mg/kg. It also contains saponins in regular amount. The surgical technique for bilateral ovariectomy flank is a practical,

reliable and less traumatic for the animals that can do research on estrogen deficiency.

Keywords: *Medicago sativa* L alfalfa, oestrogenic, rats ovariectomized (OVX), bilateral ovariectomy in the flank.

I. INTRODUCCION

La deficiencia de estrógenos, asociada con la menopausia en la mujer, condiciona la aparición de síntomas tales como los denominados “sofocos”, predisposición a osteoporosis, enfermedad cerebro-vascular, disminución de la memoria de corto plazo e incluso atrofia y sequedad vaginal, lo que disminuye la calidad de vida en la mujer.^(1,2,3,4) Si bien el tratamiento de primera línea para la el cese o disminución de estos síntomas continúa siendo la “Terapia de Reemplazo Hormonal”, hoy se viene optando el uso de medicamentos botánicos debido a los riesgos que conlleva el uso prolongado de hormonas sintéticas^(5, 6)

A nivel mundial el empleo de plantas medicinales con fines curativos es una práctica que se ha utilizado desde tiempos inmemoriales y que persiste hasta nuestros días debido principalmente a la amplia variedad de flora con propiedades curativas con la que cuenta nuestro territorio, además de la fácil adquisición y manejo de los recursos vegetales empleados con fines terapéuticos por la población, no sólo para el cuidado de ellos mismos sino también para el mantenimiento de la salud de sus animales ^(7, 8).

Los fitoestrógenos, son sustancias de origen vegetal con efectos estrogénicos y actividad antioxidante que en la actualidad se vienen estudiando como una alternativa de tratamiento para diversos problemas donde se presenta desbalance hormonal, como en la menopausia ^(9,10,11). La alfalfa es un

miembro de la familia de fabaceae originaria de Asia occidental y la región oriental del Mediterráneo. Dentro de su composición química se encuentran fitoestrógenos tales como las coumarinas y pequeñas cantidades de formononetina y biochanina, las cuales tienen la capacidad de unirse a los receptores de estrógenos ^(12,13).

Debido a esta propiedad la alfalfa se consideraría como una alternativa natural que puede suplir la deficiencia de estrógenos sin presentar efectos secundarios indeseables. Por lo tanto, para la presente investigación farmacológica se plantearon los siguientes objetivos específicos: 1) Identificar los metabolitos secundarios principales presentes en el extracto hidroalcohólico de alfalfa (*Medicago sativa* L); 2) Observar el efecto a nivel de útero al administrar por vía oral durante 14 días el extracto hidroalcohólico de alfalfa (*Medicago sativa* L) en ratas albinas OVX; 3) Comparar los niveles hormonales de estrógenos en ratas albinas OVX y enteras (NO-OVX) después de la administración del extracto hidroalcohólico de alfalfa (*Medicago sativa* L); 4) Observar el ciclo estral en los seis tratamientos al administrar por vía oral, durante 14 días, el extracto hidroalcohólico de alfalfa, mediante frotis vaginal; y, 5) Evaluar la inocuidad al administrar por vía oral durante 14 días el extracto hidroalcohólico de alfalfa (*Medicago sativa* L) en ratas albinas OVX.

II. GENERALIDADES

Muchas especies vegetales han demostrado contener sustancias que son activas en ensayos biológicos para actividad estrogénica ^(14,15,16,17). Estas sustancias pueden ser productos metabólicos de la planta o ser formadas en respuesta a factores ambientales, tales como ataque de hongos (ej. alta síntesis de coumestrol en alfalfa infectada con el hongo *Pseudopeziza medicaginis*)⁽¹⁸⁾; o síntesis de la micotoxina zearalenona proveniente de hongos del género *Fusarium* spp.⁽¹⁹⁾. El hombre ingiere fitoestrógenos a través del consumo directo de frutas frescas, hortalizas y productos procesados de plantas (ej aceite de oliva) o a través del consumo de carcasas y productos de animales alimentados con forraje que contienen fitoestrógenos. Estas especies vegetales incluyen *Trifolium subterraneum* L, *T. pratense* (trébol rojo), *T. fragiferum* L. (trébol fresa), *T. alexandrinum* (trébol de alejandría), ***Medicago sativa*** (alfalfa o lucerne) y frijol de Soya⁽²⁰⁾. Una acción beneficiosa de los estrógenos contenidos en estas plantas ha sido implícita aunque no ha sido bien establecida. Se ha prestado más atención a sus efectos nocivos sobre el ganado^(18,21). Se ha establecido que una planta puede tener más de una clase de fitoestrógenos, por ejemplo, las semillas de soya (*Glycine* sp.), son ricas en isoflavonas, mientras que el germen de soya es la principal fuente del coumestano ^(12,20). Asimismo, el COU (coumestrol) también se encuentra en la alfalfa (*Medicago sativa* L.)⁽²²⁾. En las plantas, las isoflavonas: GEN y daidzeina (DEZ) están presentes como glucósidos inactivos ⁽²³⁾.

2.1. ESPECIE VEGETAL ALFALFA (*Medicago sativa* L)

La alfalfa (*Medicago sativa* L) es un miembro de la familia fabaceae las leguminosas. Dentro de su composición química se encuentran fitoestrógenos tales como las coumarinas y pequeñas cantidades de formononetina y biochanina ^(11,24).

El fitoestrógeno que se encuentra presente en mayor cantidad es el coumestrol el cual es de 30 a 100 veces más potente que las isoflavonas⁽²⁴⁾ Todas estas sustancias estrogénicas de origen vegetal se encuentran en pequeñas cantidades de manera natural en el forraje y se le atribuyen también efectos antimicrobianos y fungicidas^(25,26).

La síntesis de fitoestrógenos se incrementa notablemente bajo condiciones adversas para el crecimiento de las plantas. El coumestrol, en condiciones naturales, se encuentra en pequeñas concentraciones 1-2.5 mg kg/MS de alfalfa, pero cuando se presentan condiciones adversas, tales como temperatura y luminosidad inadecuadas, o invasiones por hongos, en especial la especie *Pseudopeziza medicaginis*, las concentraciones de coumestrol en la alfalfa pueden llegar a superar los 100mg kg/MS; cantidad que puede causar en las hembras que consumen dicho forraje, aumento en la repetición de celos, abortos, metritis y quistes ováricos; patologías que se agrupan bajo el término de “síndrome estrogénico” ⁽²⁷⁾. La alfalfa también tiene L –canavanina, la que se concentra en semillas (0.8 a 1.5%) ⁽²⁷⁾.

2.1.1. CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA

División	:	Magnoliophyta
Clase	:	Magnoliopsida
Subclase	:	Magnoliidae
Orden	:	Fabales
Familia	:	Fabaceae
Género	:	<i>Medicago</i>
Especie	:	<i>Medicago sativa</i> L.

(Ver Anexo 1).

2.1.2. DESCRIPCIÓN BOTANICA

Planta perenne, vivaz y erecta. La raíz principal pivotante, robusta y muy desarrollada (hasta 5 m. de longitud) con numerosas raíces secundarias. Posee una corona que sale del terreno, de la cual emergen brotes que dan lugar a los tallos delgados y erectos para soportar el peso de las hojas y de las inflorescencias, además son muy consistentes, por tanto es una planta muy adecuada para la siega. Las hojas trifoliadas, aunque las primeras hojas verdaderas son unifoliadas. Los márgenes son lisos y con los bordes superiores ligeramente dentados. La flor característica de esta familia es la de la subfamilia Papilionoidea. Son de color azul o púrpura, con inflorescencias en racimos que nacen en las axilas de las hojas. El fruto es una legumbre indehiscente sin espinas que contiene entre 2 y 6 semillas amarillentas, arriñonadas y de 1.5 a 2.5 mm. de longitud.

La alfalfa puede adaptarse a bajas temperaturas, pero requiere de un suelo fértil. El pH, óptimo es el neutro (6.6-7.5) presenta una baja productividad y perennidad en suelos ácidos, es difícil su establecimiento en suelos con pH, inferiores a 5.8.

La existencia de múltiples variedades en nuestro país registra 24 variedades introducidas y comercializadas, se adaptan a una gama muy diversa de climas, aunque su productividad y perennidad están determinada por las variaciones de temperaturas, fotoperíodo y régimen hídrico.⁽²⁹⁾.

2.1.3. IMPORTANCIA ECONÓMICA Y DISTRIBUCIÓN GEOGRÁFICA.

Se trata de un cultivo muy extendido en los países de clima templado. La ganadería intensiva es la que ha demandado de forma regular los alimentos que ha tenido que proveer la industria, dando lugar al cultivo de la alfalfa, cuya finalidad es abastecer a la industria de piensos⁽²⁹⁾.

La importancia del cultivo de la alfalfa va desde su interés como fuente natural de proteínas, fibra, vitaminas y minerales; así como su contribución paisajística y su utilidad como cultivo conservacionista de la fauna. Además de la importante reducción energética que supone la fijación simbiótica del nitrógeno para el propio cultivo y para las rotaciones de las que forma parte. Por ser una especie pratense y perenne, su cultivo aporta elementos de interés como limitador y reductor de la erosión y de ciertas plagas y enfermedades de los cultivos que le siguen en la rotación.

En América se cultiva desde la llegada de los europeos. En el Perú se cultivan variedades tanto al nivel del mar como en los Andes hasta cerca de 3,700 m s. m. Las mejores condiciones de suelo y clima para expresar el potencial de producción de las variedades, pueden obtenerse bajo condiciones de campo rendimientos promedios anuales entre 15 a 25 t/ha de materia seca^(29,30).

2.2. ESTROGENOS

Los estrógenos se segregan en el ovario, la placenta, los testículos y las cápsulas suprarrenales. El principal estrógeno que secreta el ovario y el más potente de los estrógenos naturales es el estradiol. La estrona también es secretada en el ovario, aunque su principal fuente procede de la conversión extraovárica de androstenediona en los tejidos periféricos^(31,32,33).

En el hombre se presentan varios tipos de estrógenos, siendo los más importantes la estrona, el estradiol y el estriol. Presentan una estructura de 4 anillos, todos ellos mostrando un esqueleto esteroide de 18 átomos de carbonos y un anillo aromático A ; un grupo fenólico en posición C-3 y una función cetona en C17 (estrona). El estradiol esta en equilibrio con la estrona y difiere de esta en que tiene una función alcohol en el C17 en lugar de la función cetona (estradiol). El estradiol (16-hidroxiestradiol), procede de la 16-hidroxilación de la estrona y del estradiol y es el estrógeno preponderante en la orina. El estriol tiene la misma estructura que el estradiol pero con otra función alcohol en la posición 16.^(34,35) (Figuras 1,2,3):

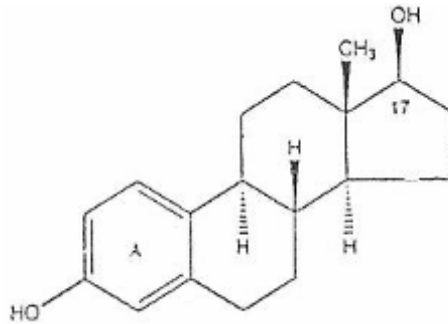


Figura 1. Estradiol

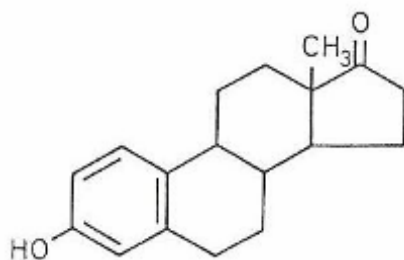


Figura 2. Estrona

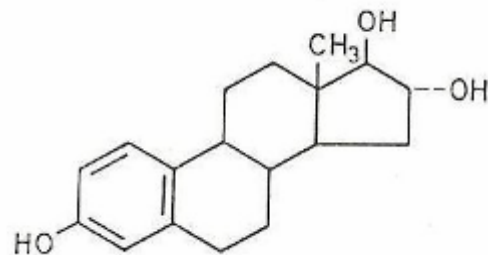


Figura 3. Estriol

La estrona y el estradiol, al ser secretadas en la pubertad, intervienen en el desarrollo de los órganos femeninos y después de la pubertad, favorecen la proliferación de la mucosa que reviste las trompas de Falopio, estimulan el crecimiento de las mamas, favorecen el crecimiento esquelético, provocan un aumento de los depósitos de proteínas en el organismo, producen depósitos de grasa principalmente en glúteos, causan ligera retención de cloruros, sodio y agua en el túbulo renal; favorecen el desarrollo de bulbo piloso y afectan a la textura de la piel, volviéndola más tensa y lisa.^(36,37)

Esta hormona, al igual que otros casos, circula por el torrente sanguíneo unido a una proteína portadora, y son inactivadas principalmente en el hígado mediante procesos de sulfoconjugación y de glucoronoconjugación. Sin embargo, los niveles plasmáticos de estrógenos pueden ser medidos con

suficiente exactitud actualmente, al igual que su utilización urinaria en forma de conjugados, lo que permite inferir el comportamiento ovárico en un ciclo normal de una mujer sana. En ese caso, los niveles estrogénicos llegan a un pico en la preovulación, y es seguido de un pequeño descenso y una nueva elevación durante la aparición del cuerpo lúteo. La producción diaria de estradiol y estrona oscila, según el día del ciclo, entre 0,1 y 0,5 mg. por 24 horas. Los niveles plasmáticos varían de 0 a 500 $\mu\text{g/mL}$.⁽³⁸⁾.

El efecto de los estrógenos es mediado por 2 receptores conocidos como ER α y ER β , que se unen en el dominio LDB (*ligand binding domain*), eso origina liberación de proteínas llamadas chaperonas y se induce un cambio en la configuración del receptor, lo cual a su vez permite su unión a la región promotora del gen diana, responsable de la actividad reguladora del gen^(39,40).

Una vez el receptor estrogénico dímero se ha unido al ligando, se produce el reclutamiento de proteínas adicionales llamadas correguladoras, que disparan la activación o represión de genes específicos^(41,42).

Los ER α y ER β tienen proteínas moduladoras fabricadas en 3 distintos dominios^(39,40,41,42): 1. Dominio amino terminal (A/B): es el menos conservado pues exhibe solo el 15 % de la homología entre ambos receptores. Esconde una función de activación llamada AF-1 que puede activar los genes de transcripción en ausencia de estradiol y en presencia de los moduladores selectivos del receptor estrogénico o estrógenos órgano-específicos (SERMs). 2. Región central: contiene 2 dedos de zinc que facilitan la unión a una secuencia específica de DNA localizada en la región promotora de genes reguladores. Contiene la región DBD o DNA *binding domain*. Esta región tiene

95 % de homología para ambos receptores. 3. Porción carboxi terminal: Es similar en solo 55 % entre los ER α y ER β . Contiene la región LBD o *ligand binding domain* que forma un paquete donde el compuesto estrogénico se une a la región envuelta en la dimerización del ER y la interacción con proteínas correguladoras. Contiene una segunda unión de activación conocida como AF-2, imprescindible para que actúen las proteínas correguladoras.

La diferencia en la composición de aminoácidos de los LBD de los ER α y β es que están involucradas para crear ER con diferentes papeles transcripcionales lo que permite a ambos receptores regular la actividad de genes diferentes y promover distintos efectos clínicos^(39,40,41,42).

Los ER α se expresan en útero, hígado, mama y riñón, los ER β , en tejidos no reproductivos como hueso, cerebro, hipófisis, tracto urinario, aparato cardiovascular y próstata, además en tejidos reproductivos como ovario y testículo. Ambos receptores se presentan en ovarios, cerebro, hueso, sistema cardiovascular y mamas. Además de la vía antes descrita, conocida como elemento de respuesta estrogénica (ERE), existe otra llamada alternativa o AP-1, donde la unión del estrógeno con el receptor activa 2 proteínas, c-Jun y c-Fos, que promueven y activan los genes diana por un mecanismo no claro, pero que requiere la presencia constante de la función AF-1 del dominio A/B, así como de proteínas correguladoras^(40,41,42).

2.3. MENOPAUSIA

El climaterio, que incluye perimenopausia, menopausia y posmenopausia, es un período de cambios fisiológicos en el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, con

disminución progresiva del estradiol endógeno. Como consecuencia, en la etapa perimenopáusica comienzan los periodos menstruales irregulares y hay trastornos de la termorregulación, los bochornos, entre otros síntomas vasomotores. En la menopausia cesa permanentemente la actividad menstrual, debiendo transcurrir por lo menos 12 meses con amenorrea para tener un diagnóstico certero. La edad promedio de la mujer en el momento en que cesa la hemorragia menstrual es de 50 a 51 años. La amenorrea es producto de la disminución de la función folicular ovárica, que se manifiesta por deficiencia de estrógenos. La intensidad de la sintomatología se relaciona con la herencia, estilos de vida, paridad, entre otros. En la posmenopausia ocurre envejecimiento de la piel, aumento de peso, riesgo de osteoporosis y de fracturas, y de problemas cardiovasculares, como arterioesclerosis, angina pectoris, hipertensión, accidentes cerebro vasculares, enfermedad de Alzheimer, entre otros. Como se observa, el déficit estrogénico va a producir alteraciones físicas y psíquicas en la vida de la mujer, por lo que se busca tratamientos que le mejoren su calidad de vida. Se ha empleado diversas terapias hormonales con estrógenos, progestágenos y otros, para prevenir o tratar estas complicaciones. Pero, las investigaciones médicas advierten que la terapia hormonal prolongada, mayor a los 5 años, expone a las mujeres a riesgos de adquirir cáncer de endometrio, mama, ovario y al incremento de riesgos de enfermedades cardiovasculares, como infarto de miocardio y trombosis venosa. Por ello, se busca otras terapias, como la medicina alternativa, siendo los componentes más apreciados isoflavonas y coumestrol, sustancias que difieren significativamente entre ellas.^(43,44).

Los ovarios de la mujer posmenopáusica son de pequeño tamaño y las células residuales son principalmente del estroma. Los niveles de estrógeno y andrógenos en el plasma se reducen pero no desaparecen del todo. Antes de la menopausia, la androstendiona plasmática procede en una proporción similar de la glándula suprarrenal y del ovario, pero después de esta, la contribución ovárica cesa, por lo que los niveles plasmáticos de androstendiona desciende un 50%. No obstante, el ovario menopáusico continúa secretando testosterona, probablemente a partir de las células del estroma ^(36,38).

Los estrógenos circulantes de la mujer ovuladora derivan de dos fuentes. El 60% de los estrógenos producidos durante el ciclo menstrual se encuentran en forma de estradiol, procedente básicamente del ovario, y el resto en forma de estrona que se sintetiza principalmente en tejidos extraováricos a partir de la androstendiona. La síntesis extraovarica de estrógenos constituye la vía principal después de la menopausia. La producción de estrógenos por el ovario menopáusico es mínima y la ooforectomía no se acompaña de una disminución de estos niveles. Los niveles plasmáticos de estradiol, principal estrógeno secretado por el folículo, son menores que los de estrona en la mujer posmenopáusica. El tejido adiposo constituye uno de los lugares fundamentales de síntesis de estrógenos fuera del ovario por lo que la producción periférica de estrógenos, en realidad, puede aumentar en las mujeres obesas posmenopáusicas, de tal modo que la tasa total de síntesis de estrógenos resulta equivalente o superior a la de la mujer premenopáusica. El estrógeno predominante es la estrona, y no el estradiol. ⁽³⁶⁾

Los síntomas menopáusicos más frecuentes consisten en inestabilidad vasomotora "bochornos", atrofia del epitelio urogenital y de la piel, disminución del tamaño de las mamas y osteoporosis. La patogénia de los bochornos no se conoce bien. Las alteraciones del metabolismo de las catecolaminas, prostaglandinas, endorfinas, o neurotensinas, asociadas a la producción reducida de estrógenos aparentemente influyen en este fenómeno. Otros síntomas que se asocian con frecuencia a los bochornos o sofocos, como el nerviosismo, la ansiedad, la irritabilidad y la depresión pueden estar producidos o no por la deficiencia de estrógenos. La disminución del tamaño de los órganos del aparato reproductor femenino y de las mamas durante la menopausia es consecuencia de la deficiencia de estrógenos. El endometrio se adelgaza y se atrofia en la mayoría de los casos la mucosa vaginal y la uretra también muestran adelgazamiento y atrofia. La osteoporosis es una de las complicaciones más temidas del envejecimiento. Las mujeres posmenopáusicas muestran una mayor predisposición hacia osteoporosis y hacia sus complicaciones^(36,45).

El tratamiento estrogénico de la menopausia, constituye una sustitución farmacológica de un análogo de los estrógenos, y no una sustitución fisiológica del estradiol. Los estrógenos utilizados en el tratamiento de sustitución son los estrógenos conjugados, los derivados de los estrógenos (dietilestilbestrol), los estrógenos sintéticos (etinilestradiol y sus derivados), el estradiol micronizado, las cremas vaginales con estrógenos y los parches dérmicos con estrógenos. Entre los tratamientos con un menor riesgo de complicaciones se encuentra, el tratamiento cíclico de estrógenos, a las dosis mínimas eficaces, durante 21 a 25

días por vía oral., la administración cíclica de estrógenos, junto con la adición de gestágenos en los últimos 10^a a 13 días del ciclo estrogénico.

El efecto más beneficioso más notorio del tratamiento estrogénico de la menopausia consiste en el alivio de la inestabilidad vasomotora (sofocos de calor) y la atrofia del epitelio urogenital y de la piel. El riesgo más preocupante del tratamiento estrogénico es el carcinoma endometrial. Este riesgo aumenta con la duración de la dosis de los estrógenos, pero disminuye en las mujeres que reciben tratamiento de combinación de estrógenos y gestágenos. El empleo de estrógenos en la menopausia se asocia a un ligero aumento de la colelitiasis ^(46,47).

2.4 FITOESTROGENOS

Los fitoestrógenos, son sustancias de origen vegetal con actividad biológica similar a los estrógenos; su estructura química es semejante a la de las hormonas esteroides, pero sus efectos son más débiles que los del 17 β -estradiol ^(9,10). Desde que se logró demostrar la biosíntesis de estradiol en la leguminosa *Phaseolus vulgaris* se ha continuado el estudio de los diferentes tipos de sustancias con similar actividad estrogénica que puede estar contenida en otras especies de plantas forrajeras, principalmente leguminosas ^(44,45). De este modo se ha demostrado que los fitoestrógenos pueden clasificarse en tres compuestos principales como son: las isoflavonas, los lignanos y los cumestanos ^(9,10,15).

El término “fitoestrógeno” se empleó por primera vez en 1961 para describir la acción de un grupo de plantas del tipo leguminosas las cuales ocasionaban signos clínicos similares a un cuadro de hiperestrogenismo en el ganado que las consumía a modo de forraje en grandes cantidades^(24,25). Los fitoestrógenos juegan un papel antioxidante en las plantas mientras que en los animales (incluido el hombre) funcionan como agonistas y antagonistas de los estrógenos ^(13,15,50). El efecto antagonista de algunos fitoestrógenos se explicaría porque no activan la vía ERE (elemento de respuesta estrogénica), sino más bien, bloquearían por inhibición competitiva la función de receptores (ER $\alpha\beta$), pues se unen a ellos con similar afinidad que los estrógenos, disocian las proteínas chaperonas, producen dimerización del receptor, sin embargo no se crearía la superficie AF-2 ni la formación de las proteínas correguladoras requeridas para la activación transcripcional del ERE. El efecto agonista de los fitoestrógenos estaría dado porque activan la vía alternativa del ERE AP-1 que, como señalamos, promueven y activan genes diana por un mecanismo no del todo elucidado, pero que requiere la presencia constante de la función AF-1 en el dominio A/B, así como de proteínas corregulatorias ^(39,41,42).

Otro grupo de compuesto de origen vegetal con efecto estrogénico es la micotoxina zearalenona. Las micotoxinas son metabolitos secundarios altamente tóxicos producidos por varios hongos, principalmente aquellos pertenecientes al género *Fusarium*, *Aspergillus* y *Penicillium*, y se ha estimado

que por lo menos 300 de estos metabolitos son potencialmente tóxicos para animales y humanos ^(51,52). Las lactonas del ácido resorcílico y la zearalenona son micotoxinas estrogénicas de distribución mundial, presente principalmente en el maíz, en bajas concentraciones; sin embargo, pueden encontrarse concentraciones altas en países en desarrollo, especialmente donde se cultiva maíz en climas más templados, por ejemplo en regiones de tierras altas^(9,19,53).

La exposición a maíz contaminado con zearalenona ocasiona hiperestrogenismo en animales, especialmente cerdos, caracterizado por vulvovaginitis, mastitis e infertilidad, aunque en estudios con animales de experimentación se han obtenido pocas pruebas de la carcinogenicidad de la zearalenona⁽⁵⁴⁾.

Los isoflavonoides derivan directamente de las flavononas, compuestos presentes en plantas. Se encuentran en numerosas especies vegetales, sobre todo en la familia de las fabaceae, destacando por su alto contenido la soya (*Glycine max*, Fabaceae), y el trébol rojo (*Trifolium pratense*, Fabaceae). Los compuestos más importantes de este grupo son la genisteína y la daidzeína, agliconas presentes en las plantas en forma glicosilada o metoxilada (genistina y biochanina A para la genisteína, y daidzeina y formononetina para la daidzeína). Otro compuesto isoflavónico es la gliciteína, cuyo precursor natural glicosilado es la glicitina ^(14,15) (Figura 4).

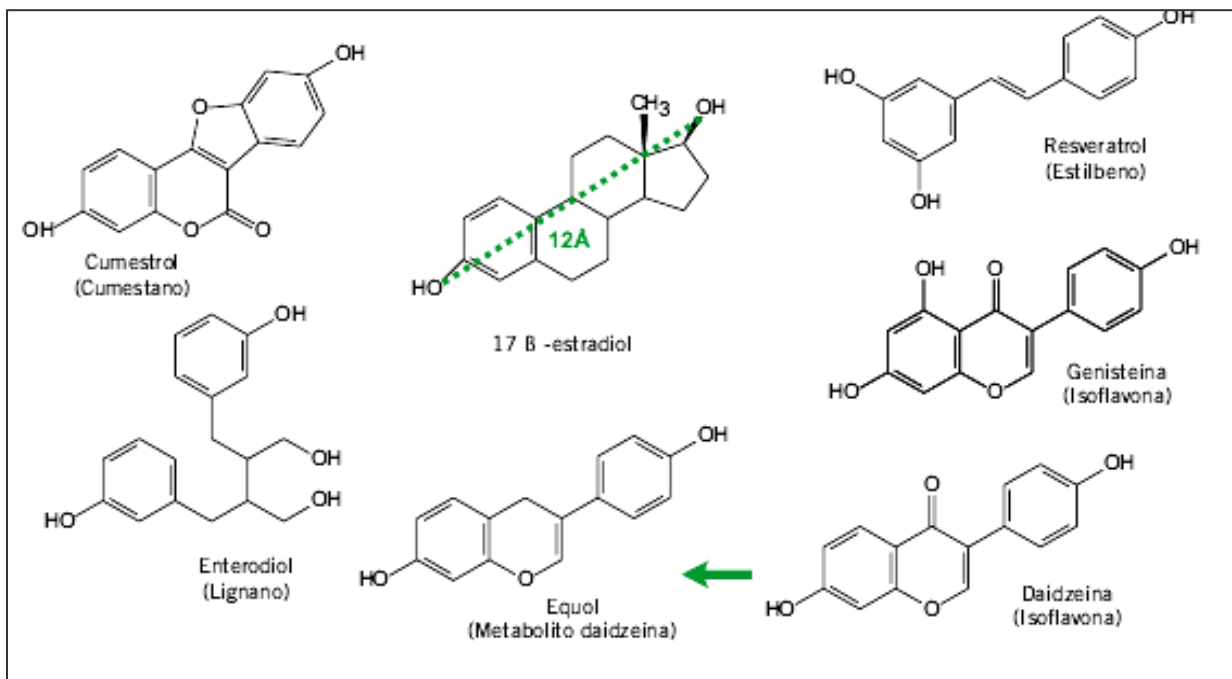


Fig. 4 Estructura química de los principales fitoestrógenos

2.4.1. MECANISMO DE ACCION DE LOS FITOESTROGENOS

Los fitoestrógenos poseen la capacidad de unirse a los receptores estrogénicos. Desde un punto de vista estructural, respecto a la posibilidad de unión de estos compuestos con los receptores estrogénicos (RE), dicho receptor se liga a moléculas de distinta naturaleza, sean o no de estructura esteroide⁽¹⁴⁾.

El grado de unión de cualquier ligando al RE depende de la presencia de un anillo aromático y de grupos hidroxilo, así como el carácter hidrofóbico de la estructura⁽¹⁵⁾. El 17-β-estradiol contiene dos grupos hidroxilo en las posiciones 3 y 17 de un esqueleto esteroideo de carácter hidrofóbico, a una distancia aproximada entre sí de unos 1,2 nm. Como puede apreciarse en la Figura 4,

existen notables similitudes estructurales de los fitoestrógenos con el 17- β -estradiol, que se traducen en la capacidad de unión de los mismos al RE, si bien con diferente grado de afinidad según el compuesto de que se trate. La actividad estrogénica se ve negativamente afectada tanto por la metilación como por la glicosilación de los hidróxilos fenólicos ^(15, 55).

Los fitoestrógenos como la genisteína tiene entre 7 y 30 veces mayor afinidad por los ER β que por los α . Las isoflavonas son muy potentes agonistas para disparar la activación transcripcional de la vía clásica ERE aunque mediada por los receptores beta, con poco efecto de los ER alfa ^(39,40).

2.5. EFECTOS DE LOS FITOESTROGENOS SOBRE LA SALUD HUMANA

2.5.1. EFECTO ANTICANCERIGENO

Los fitoestrógenos han demostrado un efecto anticancerígeno, a través de variados mecanismos hormonales y no hormonales, que aún están en estudio. Sin embargo es pertinente aclarar que este efecto se ha obtenido trabajando con dosis muy elevadas de fitoestrógenos, imposibles de alcanzar con la dieta. El mayor efecto protector se observaría en tumores de mama, colon y próstata. La aromatasa, enzima implicada en la formación del 17- β estradiol a partir de sus precursores androgénicos, es también inhibida por la genisteína, con la consiguiente reducción en la producción de esta hormona, lo que puede tener una especial importancia en los tumores hormono-dependientes, como el de mama. Algo parecido sucede con las familias enzimáticas de las 17- β esteroide dehidrogenasas y las sulfotrasnferasas, implicadas asimismo en el metabolismo de los estrógenos así como con la 5- α reductasa, enzima

convertidora de la testosterona en dihidrotestosterona e implicada en el cáncer de próstata ^(14,15, 43).

2.5.2. DISMINUCION DEL RIESGO DE ENFERMEDADES CARDIOVASCULARES

El consumo de fitoestrógenos modifica algunos de los factores de riesgo de enfermedad cardiovascular, en especial las dislipidemias, por lo que reduce el riesgo de este tipo de enfermedades ^(46,47). Sin embargo un estudio realizado en mujeres menopaúsicas demostró que la ingesta de fitoestrógenos no confiere protección contra el riesgo ni es causante de enfermedad cardiovascular ⁽⁵⁶⁾. Aunque el fitoestrógeno genisteína tiene efectos cardioprotectores similares al 17- β -estradiol ⁽⁵⁷⁾.

2.5.3. EFECTO EN LOS TRANSTORNOS MENOPÁUSICOS

Por su actividad estrogénica, se ha difundido su uso para aliviar los síntomas propios de la menopausia. La doble actividad de las isoflavonas (actuando a la vez como estrogénicas y antiestrogénicas), le confieren una serie de cualidades que permiten regular el balance hormonal en la mujer, pudiendo prevenir la osteoporosis y actuar como potentes antioxidantes que protegen frente al cáncer de mama. También pueden tener actividad estrogénica ya que, si durante la menopausia, el nivel natural de estrógenos corporal cae, las isoflavonas pueden compensar esto uniéndose a los mismos sitios del receptor de tal modo que alivia los síntomas de la menopausia. Asimismo, contribuyen a disminuir la intensidad y frecuencia de los sofocos, fatiga, sudor nocturno y cambios en el estado de ánimo ^(45,50).

2.5.4. EFECTO EN LA PREVENCIÓN DE OSTEOPOROSIS

Existe una estrecha relación entre la falta de estrógenos y la aparición de osteoporosis. En el caso de los varones el riesgo de padecer esta enfermedad es menor ya que éstos tienen índices más altos de masa ósea, por lo que la pérdida de hueso que pueden soportar también es mayor. Frente a este cuadro las investigaciones muestran que el consumo de fitoestrógenos ayuda a mejorar un cuadro de osteoporosis; así se ha verificado en estudios realizados en mujeres menopáusicas, que el consumo de dietas con alto contenido de isoflavonas, pueden prevenir la pérdida de masa ósea ⁽⁵⁸⁾.

2.6. ESTUDIO DE LA ACTIVIDAD ESTROGENICA

Uno de los modelos para evaluar actividad estrogénica es el incremento del peso del útero en hembras ovariectomizadas (OVX). Este efecto es fundamental y reproducible en animales expuestos a agonistas estrogénicos. El modelo de hembra adulta ovariectomizada consiste en la extirpación, mediante cirugía, de ambos ovarios. De esta manera se elimina la fuente primaria de síntesis de estrógenos ⁽⁵⁹⁾. Por lo tanto, el incremento del peso relativo y absoluto del útero en estos animales es el principal indicativo de que el extracto o droga empleada presenta actividad estrogénica ⁽⁶⁰⁾.

Este aumento en el peso del útero se debe al incremento de la interacción del estrógeno administrado con receptores que presentan actividad en los tejidos del útero, lo que induce cambios celulares trayendo como consecuencia inhibición de agua en los tejidos y en el lumen uterino⁽⁶¹⁾.

2.7. ESTUDIO DEL CICLO REPRODUCTIVO DE LAS RATAS MEDIANTE FROTIS VAGINAL

El ciclo reproductivo de las ratas hembras, llamado ciclo estral dura 4 días aproximadamente y está formado por las fases siguientes: proestro, estro, metaestro (o diestro I) y diestro (o diestro II)⁽⁶²⁾. La corta duración del ciclo estral en las ratas permite que esta sea una especie ideal para la investigación de los cambios que se producen durante el ciclo reproductivo⁽⁶³⁾. En estudios del sistema reproductivo así como investigaciones sobre la influencia del ciclo estral en funciones no reproductivas ^(64,65), la citología del exudado vaginal es utilizada para la determinación de las fases del ciclo estral ⁽⁶⁶⁾. La caracterización de cada fase está basada en la proporción entre los 3 tipos de células observados en el exudado vaginal: células epiteliales, células cornificadas y leucocitos.

III. PARTE EXPERIMENTAL

3.1. EQUIPOS Y MATERIALES

3.1.1. Material Biológico

- Ratas hembras adultas cepa Sprague Dawley, de 2 meses de edad, peso promedio 200-250 g.).
- Muestra seca pulverizada de la planta entera alfalfa *Medicago sativa*.

3.1.2. Equipos de Laboratorio

- Molino de cuchillas (Willey Mill St. Modell N°3)
- Balanza analítica Mettler (precisión de 0.01 g.)
- Estufa Memmert GMBH + Co.KG Typ Um200
- Mesa de disección
- Equipo de disección
- Rotavapor

3.1.3 Material de Laboratorio

- Pipetas Pasteur.
- Sondas orogástricas para rata.
- Termómetro ambiental.
- Cronómetro.
- Papel filtro.
- Frascos de color ámbar
- Embudo de vidrio
- Placas petri
- Cepo para ratas
- Matraz aforado
- Gradilla

3.1.4 Material Farmacológico y Reactivos

- Solución salina estéril 0.9% (p/v).
- Pentobarbital de sodio 6.5% (Penta-Hypnol® - Agrovvet Market)
- Ketamina clorhidrato (Ket-A-100® - Agrovvet Market)

- Xilazina clorhidrato (Dormi-Xyl® 2 - Agrovvet Market)
- Etanol 96°
- Agua destilada

3.2 METODOS Y TECNICAS PROCEDIMENTALES

3.2.1 Recolección y desecación del material botánico.

La especie vegetal alfalfa *Medicago sativa* L. fue recolectada en la provincia de Canta, departamento de Lima, en los meses de abril y mayo. Se recolectó la planta entera (hojas, tallos y flores) sin raíz y se llevó al Herbario de la Universidad Nacional Agraria La Molina para su posterior identificación.

La muestra recolectada se llevó a estufa con aire circulante a una temperatura de 40 °C durante 12 días para su secado respectivo. Se realizó la molienda en un molino eléctrico de cuchillas. El producto seco y molido fue almacenado en frascos de vidrio ámbar para su posterior extracción preparación.

3.2.2 Obtención del extracto hidroalcohólico de *Medicago sativa* L alfalfa

Seiscientos ochenta gramos (680 g.) de polvo de la planta entera de alfalfa *Medicago sativa* L fueron macerados en 7 litros de etanol a 96° al que fue añadido agua destilada en una proporción de 2:8 (agua : etanol). El tiempo de maceración fue por un periodo de 21 días al amparo de la luz y calor⁽⁶⁷⁾.

Se filtraron las soluciones hidroalcohólicas, y se concentraron en Rotavapor, obteniéndose una solución parduzca; posteriormente se llevaron a sequedad a una temperatura de 37° C en estufa hasta obtener el extracto hidroalcohólico: masa homogénea de consistencia blanda ^(67,68). El extracto hidroalcohólico fue conservado a una temperatura de 1-3°C en frasco ámbar herméticamente cerrado y refrigerado evitando su exposición a la luz solar para prevenir su degradación.

3.2.3. Marcha de solubilidad del extracto hidroalcohólico de *Medicago sativa* L alfalfa

El extracto hidroalcohólico se sometió a pruebas de solubilidad en solventes de diferentes polaridades.

En tubos de ensayo se colocaron pequeñas porciones del extracto y se agregaron 2 mL del solvente respectivo: cloroformo, n-butanol, etanol, agua destilada, se agitaron y observaron los resultados ⁽⁶⁸⁾.

3.2.4. Marcha fitoquímica del extracto hidroalcohólico *Medicago sativa* L. alfalfa

Se realizaron las siguientes reacciones químicas en el extracto hidroalcohólico total ⁽⁶⁸⁾.

Tabla 1. Reacciones de coloración y precipitación del extracto hidroalcohólico de *Medicago sativa* L. alfalfa.

Reactivos	Resultados
Reacción con FeCl ₃	Compuestos fenólicos: verde a marrón: catecol, azul: piragalol.
Reacción con gelatina	Precipitado abundante indica presencia de taninos
Reacción de Shinoda	Coloración indican la presencia y tipo de flavonoides.
Reacción de Dragendorff	Precipitado o coloración rojo naranja : alcaloide
Reacción de Mayer	Precipitado blanco inmediato, indicará la presencia de alcaloides.
Reacción Lieberman	Coloración verde o azul verdoso: núcleo esteroidal

La marcha fitoquímica se realizó en el Laboratorio de Química Orgánica de la Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UNMSM.

3.2.5. Preparación de los animales

Se emplearon 48 ratas albinas Sprague Dawley de 8 semanas de edad las cuales fueron alojadas en jaulas metálicas de crianza para su aclimatación por una semana previa a los experimentos, con libre acceso a agua y alimento. La temperatura ambiental fue de 22-26 °C y 70 -80% de humedad relativa con 12 horas de luz/oscuridad. Toda la manipulación de los animales se realizó de acuerdo con los principios éticos para el uso de animales de experimentación recomendados por Comité de Ética para el Uso de Animales (CIEA) de la Universidad Peruana Cayetano Heredia. El CIEA esta registrado en la OLWA (Office of Laboratory Animal Welfare), con el código A5146-01.

3.2.6. Distribución de grupos experimentales para dosificación del extracto hidroalcohólico de *Medicago sativa* L alfalfa

Los animales se distribuyeron en seis grupos constituidos por ocho (n=8) ratas cada grupo, tal como se indica en la **Tabla 2**:

Tabla 2: Dosis de las sustancias evaluadas

GRUPO	CATEGORIA	TECNICA	TRATAMIENTO	VIA ADM.	DOSIS
G-1	Control Negativo	OVX	Vehículo	Oral	2mL/kg
G-2	Control Positivo	OVX	Estradiol	SC	3ug/kg
G-3	Experimento	OVX	Extracto Alfalfa	Oral	100 mg/kg
G-4	Experimento	OVX	Extracto Alfalfa	Oral	500 mg/kg
G-5	Experimento	OVX	Extracto Alfalfa	Oral	1000 mg/kg
G-6	CPQ (Control del procedimiento quirúrgico)	SHAM (No OVX)	Alimento/Agua	Oral	<i>Ad libitum</i>

Al sexto grupo denominado Control del Procedimiento Quirúrgico (SHAM) se le realizó toda la manipulación quirúrgica sin llegar a extirpar los ovarios.

Los animales fueron pesados doce días después de realizada la cirugía que se tomó como peso inicial para el inicio del tratamiento.

3.2.7. Duración del tratamiento con extracto hidroalcohólico de *Medicago sativa* alfalfa

La duración del tratamiento fue de 14 días, debido a que el ciclo estral en las ratas es de cuatro a cinco días, el experimento abarcó tres ciclos estrales.

Finalizado el tiempo de tratamiento los animales fueron pesados (peso final) y sacrificados mediante el empleo de uretano y desangrados hasta morir.

3.2.8. Técnica de Ovariectomía (OVX) en ratas albinas

Del total de hembras se seleccionaron al azar 40 ratas las cuales se mantuvieron en ayunas 8h antes de la intervención. Se anestesiaron empleando una combinación de xilazina (3 mg/kg) y ketamina (50 mg/kg). Se colocaron los animales en posición de cúbito lateral derecho. Se hace una incisión de 1 cm. en el cuadrante inferior del abdomen, se alcanza el ovario que se separa con una ligadura junto con unos 0.5 cm. del cuerno uterino correspondiente y se extrae de la cavidad peritoneal. La incisión se cierra y se procede de igual forma al lado derecho.

Entre los diez y quince días posteriores a la operación se realizan frotices vaginales de cada uno de los animales. Se comprueba que ninguno de ellos presenta el estro; en caso contrario, se eliminan los animales que lo presenten, estarán todos en fase DIESTRO o fase inactiva ^(59,60).

3.2.9. Técnica de Colpocitología (Frotis vaginal) en ratas albinas

Se introduce la punta de una pipeta Pasteur de bordes romos (no cortantes) conteniendo 0.1ml de ClNa al 0.89% en la vagina del animal. Se deposita la solución salina en la vagina del animal y se aspira nuevamente con la pipeta Pasteur a modo de lavado. Este procedimiento se repite tres veces y luego se deposita la solución de lavado sobre una lámina portaobjeto y se adiciona □ gota de Lugol. Inmediatamente se cubre con un cubreobjeto y la preparación se observa al microscopio⁽⁶⁹⁾.

3.3.0. Parámetros evaluados

3.3.1 Peso corporal de los animales: en balanza analítica al inicio y al término del tratamiento.

3.3.2. Peso del útero: el que fue separado de la vagina por el cuello uterino e inmediatamente pesado en balanza analítica.

3.3.3. Cambios en el ciclo estral: Mediante el estudio del frotis vaginal empleando suero fisiológico a las 24, 48, 72 y 96 horas al administrar por vía oral durante 14 días el extracto hidroalcohólico de alfalfa.

3.3.4. Analisis del perfil hormonal : Se realizó la detección y el nivel de estradiol en saliva y plasma sanguíneo mediante la técnica de quimioluminiscencia.

3.3 ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos se presentaron como media (promedio) +/-, desviación estándar. La diferencia entre los grupos tratados se determinó mediante el análisis de varianza ANOVA y Prueba de Levene. Para las comparaciones entre grupos se utilizó el Test Tukey y Test de Games – Howell, considerándose significativo $p < 0,05$. Todo el procedimiento se realizó con el programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences), versión 15.0 en español.

IV. RESULTADOS

4.1. Rendimiento del extracto hidroalcohólico de *Medicago sativa* alfalfa

El extracto hidroalcohólico tuvo el aspecto de una masa homogénea, de consistencia blanda, color verde petróleo (Ver Anexo). El rendimiento del extracto hidroalcohólico se calculó mediante la siguiente fórmula:

$$\% \text{ ES} = \frac{\text{Peso final}}{\text{Peso inicial}} \times 100 = \mathbf{14.17}$$

4.2. Ensayo de solubilidad del extracto hidroalcohólico

En la tabla 3 se muestran los resultados del ensayo de solubilidad del extracto hidroalcohólico de *Medicago sativa L* (alfalfa).

Tabla 3. Ensayo de solubilidad del extracto hidroalcohólico *Medicago sativa L* alfalfa⁽⁶⁸⁾

SOLVENTES	RESULTADOS
Cloroformo	+ + +
Etanol 70%	+ + +
n-butanol	+++
Agua	+ + +

Leyenda: + : Insoluble + + : Poco soluble +++: Soluble

4.3. Análisis Cualitativo Fitoquímico del extracto hidroalcohólico

En la tabla 4 se muestran los resultados del análisis fitoquímico del extracto hidroalcohólico de *Medicago sativa* L alfalfa.

Tabla 4. Análisis Cualitativo Fitoquímico del extracto hidroalcohólico de *Medicago sativa* L alfalfa⁽⁶⁸⁾

REACTIVO	METABOLITO SECUNDARIO	RESULTADO
Dragendorff	Alcaloides	+ +
Shinoda	Flavonoides	+ +
Tricloruro férrico	Compuestos fenólicos	-
Gelatina	Taninos	+ +
Lieberman-Burchard	Triterpenoides y esteroides	-
Molish (alfa naftol)	Azúcares	+ +
Baljet A y B	Lactonas	+
Keller-Kiliani	Desoxiazúcares	+ +
Salkowski	Núcleo esteroidal	+
Borntrager	Quinonas	-
Ninhidrina	Aminoácidos libres	-
Espuma	saponinas	++

Leyenda:

+ + +: Abundante cantidad
++ : Regular cantidad
+ : Poca cantidad
- : Ausencia

4.4. De la Técnica Quirúrgica Ovariectomía (OVX) en ratas albinas

La combinación anestésica xilazina (3mg/kg), ketamina (50mg/kg) indujo un plano quirúrgico óptimo (plano 2) para realizar la ovariectomía bilateral por el flanco (OVX) en las ratas, sin causar complicaciones en el post-operatorio, ni la muerte ninguno de los animales intervenidos quirúrgicamente. El tiempo de duración de la anestesia en las hembras intervenidas quirúrgicamente (n=40) fue de 40 minutos aproximadamente y el tiempo de recuperación fue de 4-6 horas al término de los cuales los animales iniciaban la ingesta de alimento y agua.

4.5 De los Parámetro evaluados

4.5.1. Peso Corporal

Tabla 5. Efecto del extracto hidroalcohólico de *Medicago sativa* alfalfa sobre el peso corporal en ratas OVX

GRUPOS	TRATAMIENTO	DOSIS	PESO CORPORAL (g)		
			Peso 0	Peso Inicial	Peso Final
Control Negativo	Vehículo	2mL/kg	220.13 ± 2.90	307.13 ± 6.8 *	314.0 ± 3.7 ⁺
Control Positivo	Estradiol	3ug/kg	220.75 ± 3.37	302.00 ± 8.3*	296.25 ± 6.71*
Experimento	Extracto Alfalfa	100 mg/kg	219.75 ± 2.82	302.88 ± 6.4*	308.75 ± 8.29 ⁺
Experimento	Extracto Alfalfa	500 mg/kg	220.25 ± 3.81	301.25 ± 6.7*	314.5 ± 6.8 ⁺
Experimento	Extracto Alfalfa	1000 mg/kg	219.75 ± 3.45	302.13 ± 5.4*	305.75 ± 4.3 ⁺
(CPQ) SHAM	Alimento/Agua	<i>Ad libitum</i>	221.38 ± 3.11	267.75 ± 6.6	281.25 ± 3.3

*p < 0.05 Comparación con el grupo SHAM (ANOVA). Los resultados fueron expresados como Media ± DE. +p < 0.05 Comparación con el grupo Control positivo (ANOVA). Los resultados fueron expresados como Media ± DE.

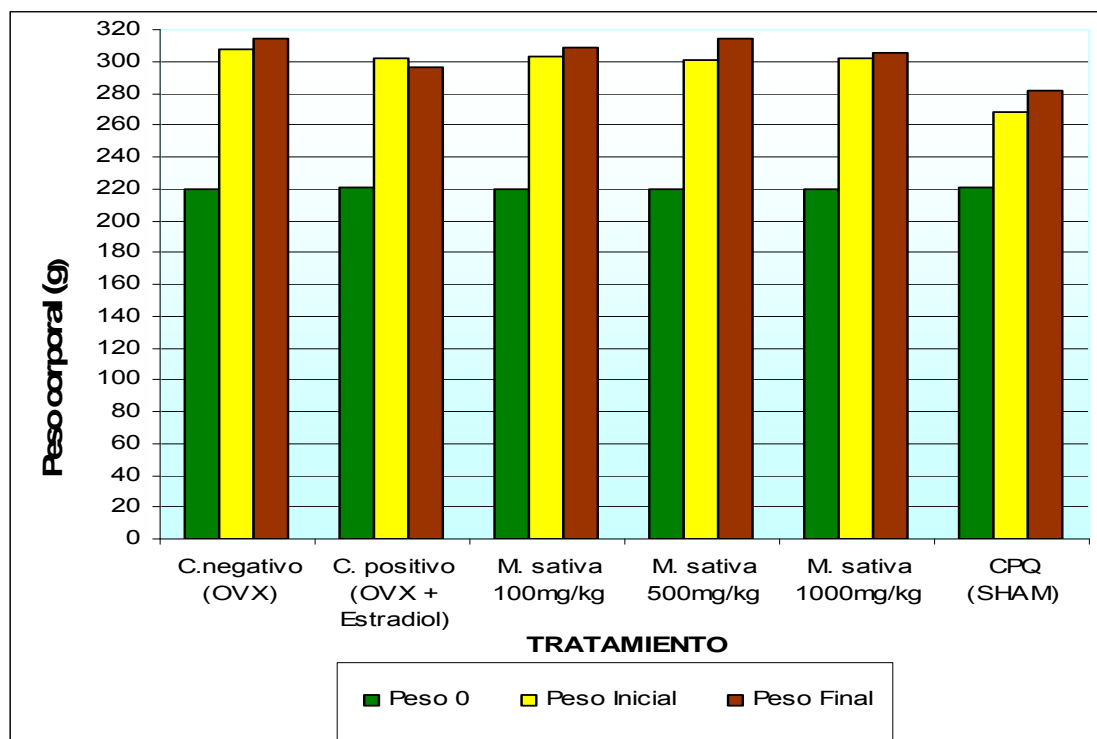


Fig. 5 Efecto del extracto hidroalcohólico de *Medicago sativa* alfalfa sobre el peso corporal en ratas OVX

4.5.2. Peso del Utero

Tabla 6. Efecto del extracto hidroalcohólico de *Medicago sativa* alfalfa sobre el peso del útero en ratas OVX

PESO DEL ÚTERO				
GRUPOS	TRATAMIENTO	DOSIS	Absoluto (g)	Relativo (%)
Control Negativo	Vehículo	2mL/kg	0.22 ± 0.07	0.07 ± 0.03
Control Positivo	Estradiol	3ug/kg	1.45 ± 0.21* +	0.52 ± 0.07* +
Experimento	Extracto Alfalfa	100 mg/kg	0.29 ± 0.06	0.10 ± 0.02
Experimento	Extracto Alfalfa	500 mg/kg	0.38 ± 0.03*	0.13 ± 0.03*
Experimento	Extracto Alfalfa	1000 mg/kg	0.66 ± 0.04* "	0.22 ± 0.01* "
(CPQ) SHAM	Alimento/Agua	Ad libitum	0.79 ± 0.08*	0.28 ± 0.03*

*p < 0.05 Comparación con el grupo control negativo (ANOVA). +p < 0.05 Comparación con los demás grupos (ANOVA). "p < 0.05 Comparación con el grupo 3 (ANOVA). " Los resultados fueron expresados como Media ± DE.

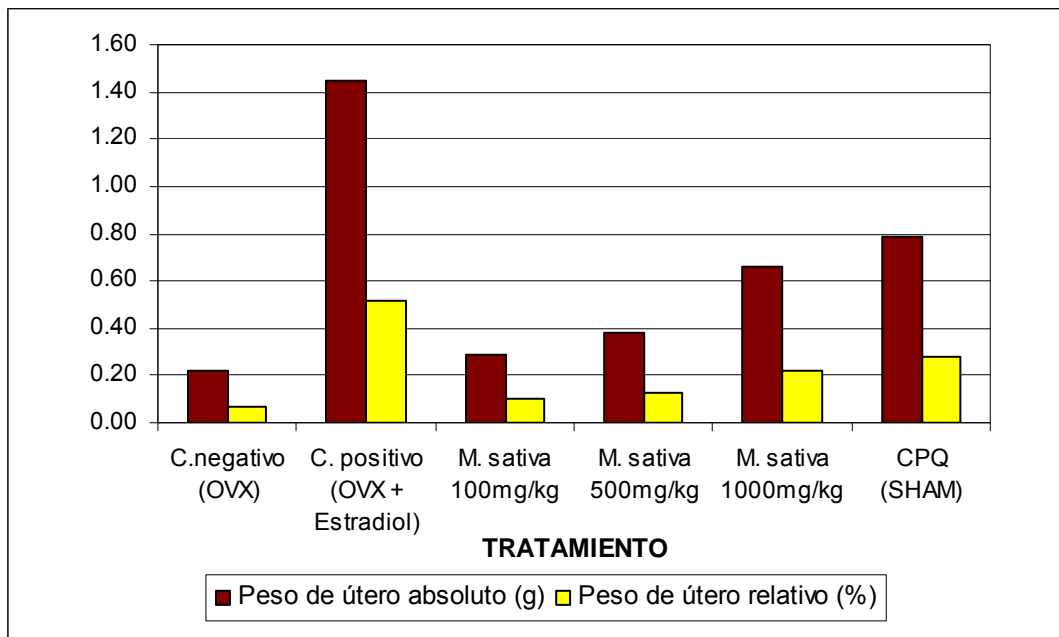


Figura 6. Peso de útero absoluto y relativo en ratas OVX

4.5.3. Citología vaginal

Tabla 7. Efecto del extracto hidroalcohólico de *Medicago sativa* alfalfa sobre citología vaginal en ratas OVX

GRUPOS	TRATAMIENTO	DOSIS	CITOLOGIA VAGINAL			
			24 h	48 h	72 h	96 h
Control Negativo	Vehículo	2mL/kg	Diestro 8/8	Diestro 8/8	Diestro 8/8	Diestro 8/8
Control Positivo	Estradiol	3ug/kg	Proestro	Estro	Metaestro	Diestro
Experimento	Extracto Alfalfa	100 mg/kg	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro
Experimento	Extracto Alfalfa	500 mg/kg	Diestro	Diestro	Diestro	Diestro
Experimento	Extracto Alfalfa	1000 mg/kg	Diestro	Diestro	Diestro	Proestro
(CPQ) SHAM	Alimento/Agua	<i>Ad libitum</i>	Proestro	Estro	Metaestro	Diestro

4.5.4. Niveles de Estradiol

Tabla 8. Efecto del extracto hidroalcohólico de *Medicago sativa* alfalfa sobre los niveles de estradiol sanguíneo en ratas OVX

Estradiol Suero mUI / ml sangre							
	N	Media	Desviación típica	Intervalo de confianza para la media al 95%		Mínimo	Máximo
	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite inferior	Límite superior	Límite inferior	Límite superior
Control Negativo (OVX)	8	24.6300	4.04508	14.5815	34.6785	20.60	28.69
Control Positivo (OVX + Estradiol)	8	1238.8750 ⁺⁺	348.35755	947.6408	1530.1092	789.00	1680.00
Medicago sativa 100mg/kg	8	31.1838	5.13658	26.8895	35.4780	21.77	36.79
Medicago sativa 500mg/kg	8	36.7638	8.03830	30.0436	43.4839	27.77	51.67
Medicago sativa 1000mg/kg	8	39.0900 [*]	4.77587	35.0973	43.0827	30.32	41.65
Control Procedimiento Quirurgico (SHAM)	8	44.8163 [*]	6.27148	39.5732	50.0593	36.90	56.80
Total	48	260.4586	494.26970	108.3448	412.5724	20.60	1680.00

*p < 0.05 Comparación con el grupo control negativo (ANOVA). ++p < 0.05 Comparación con los demás grupos (ANOVA). " Los resultados fueron expresados como Media ± DE.

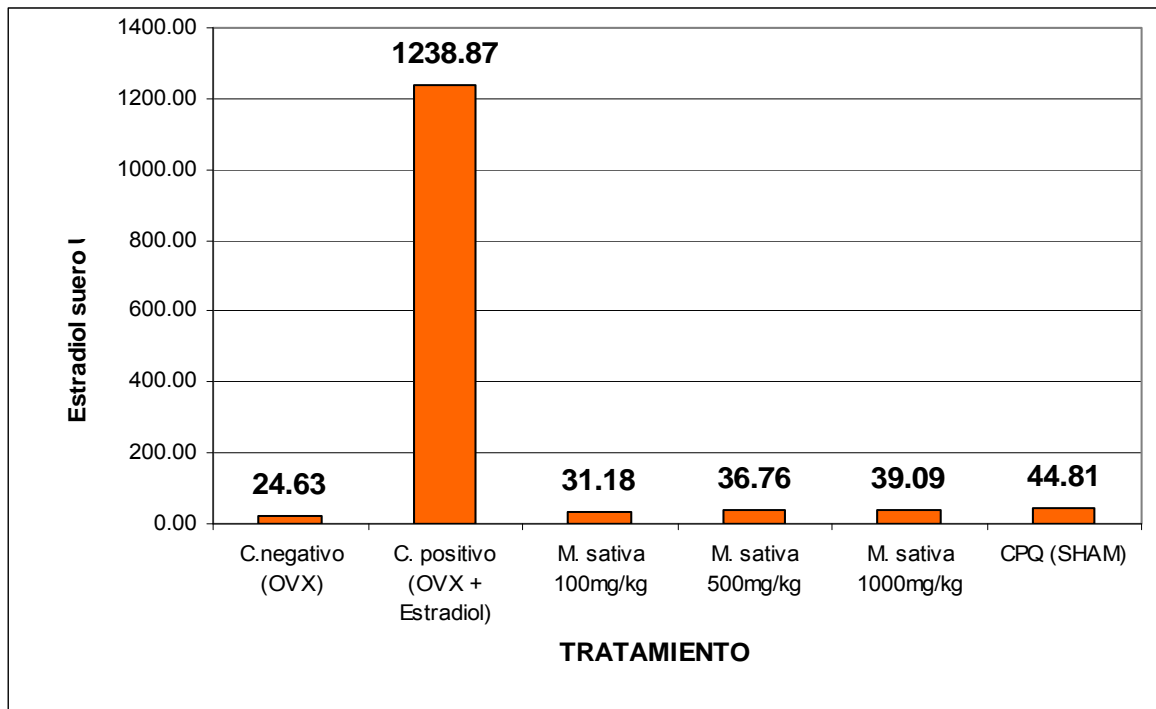


Figura 7. Niveles de estradiol sanguíneo en ratas OVX

V. DISCUSION

En el contenido de fitoestrógenos en la alfalfa (*Medicago sativa* L), destaca el coumestrol seguido de apigenina y biochanina que varían de acuerdo a la variedad y grado de madurez de la planta⁽²⁴⁾. De esta manera, se han determinado concentraciones de coumestrol que oscilan en un rango de 15 a 225 µg/g MS, en variedades de alfalfa que aún no son introducidas en nuestro medio^(70, 71).

De las veinticuatro variedades de alfalfa que son cultivadas en la sierra de nuestro país ⁽²⁹⁾, en la presente investigación sólo se ha estudiado la actividad estrogénica de la variedad “Moapa Superior”. Dicha variedad fue recolectada en la provincia de Canta, y aunque todavía no se ha determinado la concentración de coumestrol en la mencionada variedad, ésta puede afectarse por los cambios de temperatura, fotoperíodo y régimen hídrico en que se cultiva⁽²⁹⁾; que debería tenerse en cuenta al formular suplementos estrogénicos para uso humano provenientes de esta fabaceae.

En relación al aporte nutricional de esta variedad vegetal *Medicago sativa* L alfalfa, es considerada un alimento funcional no sólo por su contenido en fitoestrógenos sino también, debido a su contenido en minerales, principalmente Fe (153.73 mg/kg MS) y Zn (53.32 mg/kg MS), y vitaminas entre las que destacan Vit C (ácido ascórbico, 826.80 mg/kg MS), Vit A (β caroteno Retinol 531.89 per 100g MS), Vit E (α-tocoferol, 37.94 mg/kg MS)^(72, 73) y vit K(

filoquinona 2.500 gammas /100 g)⁽⁷⁴⁾. Por su contenido en vitamina K la alfalfa es utilizada en medicina veterinaria como agente antihemorrágico en la patología descrita como “hemorragia pulmonar inducida por el ejercicio”.^(75,76). Esta propiedad antihemorrágica también se ha validado en seres humanos^(77,78); la vitamina K juega un papel clave en la regulación de tres procesos fisiológicos: 1. Coagulación de la sangre: (protrombina (factor II), Factores VII, IX, X, proteína C, proteína S y proteína Z) 2. Metabolismo Óseo: osteocalcina, también llamada proteína-Gla ósea (BGP siglas en inglés), y proteína gla de la matriz(MGP)y 3. Biología Vascular⁽⁷⁹⁾. La acción que tiene la vitamina K sobre la osteocalcina podría trabajar en forma sinérgica con el coumestrol, contenidos ambos en la alfalfa, para la prevención de osteoporosis en mujeres menopáusicas⁽⁸⁰⁾.

El contenido de vitaminas y minerales de la alfalfa, por los resultados obtenidos en la presente investigación, no afecta aparentemente, la actividad estrogénica del coumestrol contenido en el extracto hidroalcohólico trabajado. En cambio si se ha demostrado que la presencia en el forraje de hongos como el *Pseudopeziza medicaginis*, eleva considerablemente las concentraciones de cumestrol en esta especie vegetal la misma que puede llegar a subir los niveles de cumestrol por encima de los 100mg kg/MS; cantidad suficiente para causar hiperestrogenismo en ganado lechero⁽¹⁸⁾. Asimismo la cantidad de clorofila presente en esta especie vegetal, alrededor del 0.40% Base Seca ⁽⁸¹⁾, no interfiere con la actividad estrogénica del extracto hidroalcohólico trabajado en la presente investigación. En relación a determinar cuantitativamente los

niveles de coumestrol que podrían encontrarse en la leche de ganado alimentado con alfalfa, hasta la fecha no hay una prueba validada en campo que logre este propósito; por lo tanto queda abierta la realización de trabajos de investigación que aborden este tema.

Los alcaloides contenidos en la planta son trigonelina, estaquidrina y homoestaquidrina⁽⁸²⁾ presentes en las semillas normalmente en pequeñas cantidades; en la presente investigación el contenido en alcaloides mediante análisis cualitativo, se halló en regular cantidad lo que se puede atribuir al estado de floración de la variedad de alfalfa trabajada: "Moapa superior" el cual llegaba a un 20% de floración lo cual es indicativo del estado de madurez de la planta. El estudio fitoquímico preliminar ha indicado la presencia de saponinas en el extracto hidroalcohólico de alfalfa (*Medicago sativa*), al encontrarse en cantidades regulares a moderadas. La presencia de saponinas en la alfalfa aparentemente no está relacionada al contenido de coumestrol en esta fabaceae, hasta la fecha no se ha publicado ninguna investigación relacionando ambos compuestos. Se considera a la alfalfa como ejemplo de leguminosa con actividad alelopática capaz de ejercer un efecto inhibitor sobre la germinación de las semillas de trigo, maíz, sorgo, soya e incluso de la misma planta debido a la presencia de saponinas del ácido medicagénico que se halla presente en esta especie vegetal⁽⁸³⁾.

Aunque se ha observado también, que las saponinas presentes en la alfalfa, disminuyen el crecimiento de pollos Leghorn⁽⁸⁴⁾, se ha comprobado, sin

embargo, que cantidades menores de 0,5% de este metabolito producen una disminución de la hipercolesterolemia en ratas; dicho efecto estaría causado por una disminución de la absorción del colesterol a nivel intestinal ^(85,86). No se ha estudiado aún si la disminución de la absorción del colesterol influye en la actividad de los fitoestrógenos presentes en la alfalfa.

En relación a la técnica de ovariectomía bilateral realizada en las ratas albinas para el presente estudio, el protocolo de anestesia empleado utilizando Xilazina (3 mg/kg) y Ketamina (50 mg/kg), proporcionó un buen plano anestésico con un óptimo grado de analgesia sumado a una pronta recuperación de los animales. La xilazina pertenece al grupo de α -2-agonistas y sus efectos se basan principalmente en la estimulación directa de los receptores α -2-adrenérgicos además de receptores colinérgicos, serotoninérgicos, histamínicos H-2 y opiáceos los cuales se relacionan con su efecto analgésico ⁽⁸⁷⁾. A diferencia de otros protocolos de anestesia que emplean barbitúricos o anestesia inhalatoria para la misma técnica quirúrgica en ratas, la combinación Xilazina-Ketamina logra un estado de anestesia mayor que con otros pre-anestésicos⁽⁵⁹⁾., y brinda un óptimo grado de relajación muscular en los animales sumado a una pronta recuperación, no habiéndose presentado inconveniencias cardiorrespiratorias en ninguno de los animales ovariectomizados, lo que confirma el buen margen de seguridad que se ha logrado en el presente trabajo de investigación con la modificación realizada a anteriores protocolos de anestesia para la misma técnica quirúrgica ^(59,60,61).

En el presente estudio los hallazgos estadísticos indican que en las condiciones experimentales el extracto hidroalcohólico de *Medicago sativa* alfalfa aumentó los valores sanguíneos de estradiol en ratas albinas OVX en comparación con el grupo control negativo, sin embargo estos valores no fueron suficientes para provocar cambios en citología vaginal de dichas hembras; pero si fueron suficientes para provocar un marcado incremento en el peso del útero con respecto al control negativo. Los niveles hormonales de estradiol son directamente proporcionales a la concentración de los extractos hidroalcohólicos administrados de *Medicago sativa* L alfalfa.

El hecho de que los resultados relacionados con los pesos corporal absoluto y relativo del útero, así como los derivados del análisis serológico en los grupos control negativo, CPQ (SHAM) y control positivo hayan sido consistentes con lo esperado, avala el modelo de ratas ovariectomizadas (OVX) empleado y sustenta los resultados obtenidos con el tratamiento con el extracto hidroalcohólico de *Medicago sativa* alfalfa. Se recomienda realizar posteriores estudios sobre actividad estrogénica de otras variedades de *Medicago sativa* alfalfa separando el contenido de clorofila y demás compuestos que pudieran interferir con la actividad de los fitoestrógenos contenidos en esta especie vegetal.

VI. CONCLUSIONES

- 1 En las condiciones experimentales, el extracto hidroalcohólico de *Medicago sativa* L alfalfa tiene efecto estrogénico al aumentar los valores de estradiol en las muestras sanguíneas de ratas OVX tratadas, a las dosis de 500mg/kg y 1000mg/kg siendo los resultados directamente proporcionales a la concentración del extracto administrado ejerciendo actividad estrogénica.
- 2 Los metabolitos secundarios presentes en el extracto hidroalcohólico de *Medicago sativa* alfalfa variedad "Moapa superior" en un 20% de floración son: flavonoides, saponinas, taninos y alcaloides en regular cantidad.
- 3 La técnica quirúrgica ovariectomía bilateral por el flanco es un método práctico, confiable y menos traumático para los animales que permite realizar investigaciones sobre deficiencia de estrógenos.
- 4 El protocolo de anestesia (Xilazina 3 mg/kg y ketamina 50mg/kg) utilizado en la presente investigación, brinda un óptimo margen de seguridad para la ejecución de técnicas quirúrgicas que comprometan órganos situados en cavidad abdominal.
- 5 El extracto hidroalcohólico de la especie vegetal *Medicago sativa* L alfalfa es inocuo para las ratas en el modelo utilizado y las dosis de tratamiento empleadas en la presente investigación.

VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Rossouw J, Prentice R, Manson J, Wu L, Barad D, Barnabei V, Ko M *et al.* Postmenopausal Hormone Therapy and Risk of Cardiovascular Disease by Age and Years Since Menopause. *JAMA*. 2007;297:1465-1477.
2. Matthews K, Kuller L, Sutton-Tyrrell K, Chang Y. Changes in Cardiovascular Risk Factors During the Perimenopause and Postmenopause and Carotid Artery Atherosclerosis in Healthy Women. *Stroke*. 2001;32:1104-1111.
3. McEwen B, Stephen A. *Endocrine Reviews*. 1999. 20 (3): 279-307.
4. Leiblum S, Bachmann G, Kemmann E y Col. Vaginal atrophy in postmenopausal women. *JAMA* 1983; 6: 249.
5. Geller S, Studee L. Botanical and Dietary Supplements for Menopausal Symptoms: What Works, What Doesn't, *J Womens Health (Larchmt)*. 2005 September; 14(7): 634–649.
6. Geller S, STUDEE L. Soy and red clover for midlife and aging. *Climacteric* 2006. 9: 245-263.
7. Quave C, Pieroni A, Bennett B. Dermatological remedies in the traditional pharmacopoeia of Vulture-Alto Bradano, inland southern Italy. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 2008, 4:5.
8. Lans Ch, Turner N, Khan T, Brauer G, Boepple W. Ethnoveterinary medicines used for ruminants in British Columbia, Canada. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 2007, 3:11.
9. Santos, Javier. Fitoestrógenos: una alternativa al tratamiento hormonal de reemplazo. *Revista del climaterio* 2004;7(41):203-9

10. Murkies, Alice; Gisela Wilcox, and Susan R. Davis. Phytoestrogens. *J Clin. Endocrinol. Metab.*, Feb 1998; 83: 297 - 303.
11. Ravnikar VA. Compliance with hormone replacement therapy. *Am J Obstet Gynecol* 1987;156:1332-36
12. Jorgensen N. A. and D. D. Freymiller. Estrogenic Activity of Fermented Alfalfa . *J Dairy Sci*, Jan 1972; 55: 80 - 82.
13. Beltrán E. Interés terapéutico de los fitoestrógenos en ginecología: una revisión de las evidencias. *Revista de Fitoterapia* 2004; 4 (1): 23-38
14. Navarro C. Mecanismo de acción de las isoflavonas. *Ginecología y Obstetricia Clínica* 2005;6(3):159-165.
15. Dixon R. Phytoestrogens. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2004. 55:225–61.
16. Seguin P and Zheng W. Phytoestrogen content of alfalfa cultivars grown in eastern Canada. *Journal of the Science of Food and Agriculture J Sci Food Agric.* 2006; 86:765–771.
17. Deavours BE, Dixon RA. Metabolic engineering of isoflavonoid biosynthesis in alfalfa. *Plant Physiology* 2005 Aug; Vol. 138 (4), pp. 2245-59;
18. Romero C, Tarrago R, Muñoz R, Arista A, Rosado A. Síndrome estrogénico en vacas lecheras por consumo de alfalfas con grandes cantidades de coumestrol. *Vet. Mex.* 1997. 28:25-30.
19. Córdova A, Ramírez R, Peña S, Córdova M, Córdova C, Muñoz R. Zearalenona (*fusarium* spp.) en la alimentación de cerdos con problemas reproductivos. *Archivos de zootecnia.* 2007. Vol 56 numero 213. Cordoba . España.

20. Polya, G. Biochemical Targets of Plant Bioactive Compounds By Gideon Polya (La Trobe University, Melbourne). Taylor & Francis, London. 2003. p. 964.
21. Muñoz R, Murillo A, Perez J, Córdova A. Parámetros reproductivos en vacas Holstein alimentadas con alfalfa alta en cumestrol. Archivos de zootecnia. 2002. vol 51. número 195. Córdoba. España.
22. Jacob D, Temple J, Patisaul L, Young L, Rissman E. Coumestrol antagonizes neuroendocrine actions of estrogen via the estrogen receptor α . Exp. Biol. Med. 2001. 226:301-306.
23. Rosselli M., Reinhart K, Imthurn B, Keller J, Dubey R. Cellular and biochemical mechanisms by which environmental oestrogens influence reproductive function. Hum. Reprod. 2000. Update 6:332-350.
24. Boué SM, Wiese TE, Nehls S, Burow ME, Elliott S, Carter-Wientjes CH, et al. Evaluation of the estrogenic effects of legume extracts containing phytoestrogens. J Agric Food Chem. 2003 Apr 9;51(8):2193-9.
25. Bickoff AM, Livingston AL. Relative potencies of several estrogen like compounds in forages. Agric Food Chem 1962;10:410-412
26. Cowan Marjorie Murphy. Products as Antimicrobial Agents Clin. Microbiol. Rev., Oct 1999; 12: 564 - 582.
27. Le Bars J, Le Bars P et Brice G. Presence accumulation et devenir du coumestrol dans la luzerne et ses dérivés. Rec Med Vet. 1990 ; 166 : 463-469
28. Bruneton J. Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas medicinales. 2ª ed. Zaragoza: Acribia, 2001.

29. Noli C. Producción de Forrajes para cuyes. INIA. Curso Nacional de crianza de cuyes. 2005. Marzo 15-16. Huancayo- Perú.
30. Dhont C, Castonguay Y, Nadeau P, Bélanger G, Drapeau R, Laberge S, Avice J, Chalifour F. Nitrogen Reserves, Spring Regrowth and Winter Survival of Field-grown Alfalfa (*Medicago sativa*) Defoliated in the Autumn. *Ann Bot.* 2006 January; 97(1): 109–120. doi: 10.1093/aob/mcj006.
31. Schorge J, Schaffer J, Halvorson L, Hoffman B, Bradshaw K, Cunningham FG, Williams. *Gynecology*. The McGraw-Hill Companies. 2008.
32. Miller V, Duckles S. Vascular Actions of Estrogens: Functional Implications. *Pharmacol Rev.* 2008 June; 60(2): 210–241.
33. Tausk M. *Farmacología de las hormonas*. Primera edición. Editorial Alambra S.A España.p 71-72. 1975.
34. Macarulla J. *Bioquímica Humana*. Segunda edición. Editorial Reverte S.A. Barcelona.,p 435,436,443-446.1991.
35. Villavicencio M. *Bioquímica Tomo II*. Segunda edición. Editorial UNMSM Lima, p 658,667-668. 1999.
36. Wilson J. *Harrison Principios de medicina interna*.12 edición Vol. II, Editorial Interamericana Mc.Graw-Hill. Inc. Atlampa-México D.F. 1991,p,2066-2068,2080.
37. Kuklinski C. *Farmacognosia .Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen vegetal*. Editorial OMEGA S.A. Barcelona,2003,p,94-95,329.
38. Mazzei E. *Semiología y fisiopatología Volumen II*. Tercera Edición. Editorial El Ateneo Buenos Aires. p 853-854.1988.

39. Bryant H, Dere W. Selective estrogen receptor modulator: an alternative to hormone replacement therapy. *Soc Exp Biol Med* 1998;217:45-52.
40. Brzezinski A, Debi A. Phytoestrogens: the "natural" selective estrogen receptor modulators? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 1999;85(1):47-51.
41. Wester S, Rosenfeld ME, Glass CK. Nuclear receptor coactivators. *Adv Pharmacol* 2000;47:89-112.
42. Palacios S. Concepto de receptores esteroideos y su repercusión clínica. En: González O, Arteaga E, Contreras P, Editores. *Menopausia y patologías asociadas*. Santiago de Chile: Adiciones Sociedad chilena de Climaterio; 1998:109-17.
43. Cross HS, Kállay E, Lechner D, Gerdenitsch W, Adlercreutz H, Armbrecht HJ. Phytoestrogens and Vitamin D Metabolism: A New Concept for the Prevention and Therapy of Colorectal, Prostate, and Mammary Carcinomas. *J. Nutr.*, May 2004; 134: 1207S - 1212S.
44. Jara D, Valer V, León I. Efectos de la soya en la mucosa endometrial de mujeres posmenopáusicas. *Anales de la Facultad de Medicina Universidad Nacional Mayor de San Marcos*. Abr.-jun. 2006, vol.67, no.2, p.101-107. ISSN 1025-5583. Disponible en la World Wide Web: <<http://www.scielo.org.pe/scielo>.
45. Burton JJ and M Wells. The effect of phytoestrogens on the female genital tract. *J. Clin. Pathol.*, Jun 2002; 55: 401 – 407.
46. Wroblewski L, Cooke L. Phytoestrogens and cardiovascular health. *J Am. Coll. Cardiol.*, May 2000; 35: 1403 - 1410.

47. Healthlibrary. Hierbas y suplementos. EBSCO CAM Medical. Última revisión Septiembre del 2003. www.healthlibrary.epnet.com
48. I. J. YOUNG, B. A. KNIGHTS & J. R. HILLMAN. Oestradiol and its biosynthesis in *Phaseolus vulgaris* L. *Nature* 267, 429.02 June 1977.
49. Atallah, A. M., Aixel, R. T., Ramsay, R. B., Threlkeld, S. T. & Nicholas, H. J. *Phytochemistry* 14, 1927–1932. 1975.
50. Nikander E, Metsä-Heikkilä M, Ylikorkala O, Tiitinen A. Effects of Phytoestrogens on Bone Turnover in Postmenopausal Women with a History of Breast Cancer. *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, Mar 2004; 89: 1207 - 1212.
51. Hedayati M, Pasqualotto A, Warn P, Bowyer P, Denning D. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. *Microbiology* 153 (2007), 1677-1692.
52. Osuna, O. Control de las micotoxicosis en el campo avícola. Memorias "Curso de Actualización sobre Micotoxicosis Aviar" ANECA, México. pp 82-89. 1989.
53. Hitokoto H, Morozumi S, Wauke T, Sakai S, Kurata H. Fungal contamination and mycotoxin detection of powdered herbal drugs. *Appl Environ Microbiol.* 1978 August; 36(2): 252-256.
54. Swamy H, Smith T, MacDonald T, Karrow N, Woodward N, Boermans H. 2003. Effects of feeding a blend of grains naturally contaminated with *Fusarium* mycotoxins on growth and immunological measurements of starter pigs and the efficacy of a polymeric glucomannan mycotoxin adsorbents. *J. Anim. Sci.*, 81: 2792-2803.

55. Manson JE, et al. The menopausal transition and postmenopausal hormone therapy. In: Fauci AS, et al. Harrison's Principles of Internal Medicine. 17th ed. New York, N.Y.: McGraw-Hill Medical; 2008.
56. Lital Keinan-Boker, Yvonne T van Der Schouw, Diederick E Grobbee and Petra HM Peeters. Dietary phytoestrogens and breast cancer risk. *American Journal of Clinical Nutrition*, 2004. Vol. 79, No. 2, 282-288.
57. H. A. Walker, MRCP; T. S. Dean, BSc; T. A. B. Sanders, DSc; G. Jackson, FRCP; J. M. Ritter, FRCP; P. J. Chowienczyk, FRCP. The Phytoestrogen Genistein Produces Acute Nitric Oxide–Dependent Dilation of Human Forearm Vasculature With Similar Potency to 17 β -Estradiol. (*Circulation*. 2001;103:258.).
58. Mei, J., Yeung, S. S. C., Kung, A. W. C. (2001). High dietary phytoestrogen intake is associated with higher bone mineral density in postmenopausal but not premenopausal women. *J Clin. Endocrinol. Metab.* 86, 5217–21.
59. Davidge S, Yunlong Zhang, and Ken G. Stewart. A comparison of ovariectomy models for estrogen studies. *Am J Physiol Regulatory Integrative Comp Physiol*, Mar 2001; 280: 904.
60. Kanno J, Onyon L, Haseman J, Fenner-Crisp P, Ashby J, Owens W. The OECD program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: phase 1. *Environ Health Perspect.* 2001 Aug;109(8):785–794.
61. Kanno Jun, Onyon Lesley, Peddada Shyamal, Ashby John, Jacob Elard, Owens William. The OECD program to validate the rat uterotrophic

- bioassay. Phase 2: coded single-dose studies. *Environ Health Perspect.* 2003 Sep;111(12):1550–1558.
62. Freeman ME. The ovarian cycle of the rat. In: Knobil E & Neil J. (eds.). *Physiology of reproduction* New York: Raven Press; 1988. p. 1893-928.
63. Marcondes FK, Miguel K, Melo LL, Spadari-Bratfisch RC. Estrous cycle influences the response of female rats in the elevated plus-maze. *Physiol. Behav* 2001;74 (4-5):435-40.
64. Rodriguez MLV, Marcondes FK, Spadari-Bratfisch RC. Relationship among sensitivity to adrenaline, plasma corticosterone level and estrous cycle in rats. *Can J Physiol Pharmacol.* 1995;73: 602-7.
65. Chateau D, Geiger JM, Samama B, Boehm N. Vaginal keratinization during the estrous cycle in rats: a model for evaluating retinoid activity. *Skin Pharmacol.* 1996;9: 9-16.
66. Hoar W, Hickman CP. Ovariectomy and the estrous cycle of the rat. In: W. Hoar & C. P. Hickman (eds.), *General and comparative physiology.* 2. ed. New Jersey: Prentice-Hall; 1975:260-5.
67. CYTED. *Manual de Técnicas de Investigación.* Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo. Proyecto X-1. Búsqueda de Principios Bioactivos en Plantas de la Región. 1995. pág.220.
68. Lock De Ugaz, O., *Investigación Fitoquímica,* 2da. Edición. Editorial Pontificia Universidad Católica del Perú. 1994. Lima – Perú.
69. Universidad Nacional Autónoma de México-Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia. 1982. *Manual de Prácticas de Fisiología Veterinaria.* México, D.F.

70. Seguin P, Zheng W, Souleimanov A. Alfalfa Phytoestrogen Content: Impact of Plant Maturity and Herbage Components. *Journal of Agronomy and Crop Science*. 2004 ; Volume 190, Issue 3, 211-217.
71. Seguin P, Zheng W. Phytoestrogen content of alfalfa cultivars grown in eastern Canada. *Journal of the Science of Food and Agriculture J Sci Food Agric*. 2006; 86:765–771.
72. Plaza L, De Ancos B, Cano P. Nutritional and health-related compounds in sprouts and seeds of soybean (*Glycine max*), wheat (*Triticum aestivum*.L) and alfalfa (*Medicago sativa*) treated by a new drying method. *Eur Food Res Technol* (2003) 216:138–144.
73. Newell-McGloughlin M. Nutritionally Improved Agricultural Crops. *Plant Physiol*. 2008 July; 147(3): 939–953.
74. Vitamina K. http://www.vivirnatural.com/alim/vitami_k.htm.
75. Lans Ch, Turner N, Brauer, Gergard B, Georges K. Ethnoveterinary medicines used for horses in Trinidad and in British Columbia, Canada. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine* 2006, 2:31.
76. Block G, Jensen C, Norkus E, Tapashi D. Usage patterns, health, and nutritional status of long-term multiple dietary supplement users: a cross-sectional study .
77. Cornelissen M, Von Kries R, Loughnan P, et al. Prevention of vitamin K deficiency bleeding: efficacy of different multiple oral dose schedules of vitamin K. *Eur J Pediatr* 1997;156(2):126–30.

78. Ijland M, Pereira R, Cornelissen E. Incidence of late vitamin K deficiency bleeding in newborns in the Netherlands in 2005: evaluation of the current guideline. *Eur J Pediatr*, 2007 Mar 1;
79. Berkner KL, Runge KW. The physiology of vitamin K nutriture and vitamin K-dependent protein function in atherosclerosis. *J. Thromb. Haemost.* 2004; 2 (12): 2118 - 32.
80. Cheung A, Tile L, Lee Y, Tomlinson L, Hawker G, Scher J, Hu H, et al. Vitamin K Supplementation in Postmenopausal Women with Osteopenia (ECKO Trial): A Randomized Controlled Trial. October 2008 | Volume 5 | Issue 10 | e196. *PLoS Medicine*
81. Cortés A, Gallardo Y. Obtención de concentrados proteicos a partir de alfalfa (*Medicago sativa*). 2005. VII Congreso Nacional de Ciencia de los Alimentos y III Foro de Ciencia y Tecnología de Alimentos. Guanajuato .Mexico.
82. Stochmal A, Piacente S, Pizza C, De Riccardis F, Leitz R, Oleszek W. Alfalfa (*Medicago sativa* L.) flavonoids. 1. Apigenin and luteolin glycosides from aerial parts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 2001; 49: 753-758.
83. Anaya AL, Espinosa-García F, Cruz-Ortega R, Abou-Mansour E. Relaciones Químicas entre organismos: Aspectos básicos y perspectivas de su aplicación. Edit. México: Plaza y Valdez: UNAM. 2001. 734 p.
84. Peterson D. Some properties of a factor in alfalfa meal causing depression of growth in chicks. *J. Biol. Chem.*, Apr 1950; 183: 647 - 653.

85. Malinow M, McLaughlin P, Stafford C, Livingston A, Kohler G and Cheeke R. Comparative effects of alfalfa saponins and alfalfa fiber on cholesterol absorption in rats. *Am. J. Clinical Nutrition*, Sep 1979; 32: 1810 - 1812.
86. Store J, LePage S, Petro M, West L, Cassidy M, Lightfoot F, Vahouny G. Interactions of alfalfa plant and sprout saponins with cholesterol in vitro and in cholesterol-fed rats. *Am. J. Clinical Nutrition*, Jun 1984; 39: 917 - 929.
87. Cullen L and Reynoldson J. Xilazina or medetomidina premedication before propofol anaesthesia. *Vet Rec.* 1993. 132:378-383.

ANEXO



La Molina, 26 de septiembre de 2008

CONSTANCIA

Mediante la presente se informa que los ejemplares de “alfalfa” procedentes de la localidad de Canta, departamento de Lima, remitidos por la Sra. Sandra Bezada Quintana, han sido estudiados en el herbario de la Facultad de Ciencias de la Universidad Nacional Agraria La Molina (MOL) para su determinación taxonómica. El examen y reconocimiento de los caracteres morfológicos de orden cualitativo y cuantitativo en dicho espécimen permiten concluir que los mismos corresponden a la entidad *Medicago sativa* L.

A continuación se adjunta la sistemática de la “alfalfa”, siguiendo los lineamientos de Cronquist (1)

Reino Plantae
División Magnoliophyta
Clase Magnoliopsida
Subclase Magnoliidae
Orden Fabales
Familia Fabaceae
Genero *Medicago*
Especie *Medicago sativa* L.

- (1) Cronquist, A. 1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. Columbia Univ. Press. New York



Mg. Sc. Mercedes Flores Pimentel

Parámetros evaluados en Ratas Ovariectomizadas (OVX)

Involución de Cuernos Uterinos post cirugía



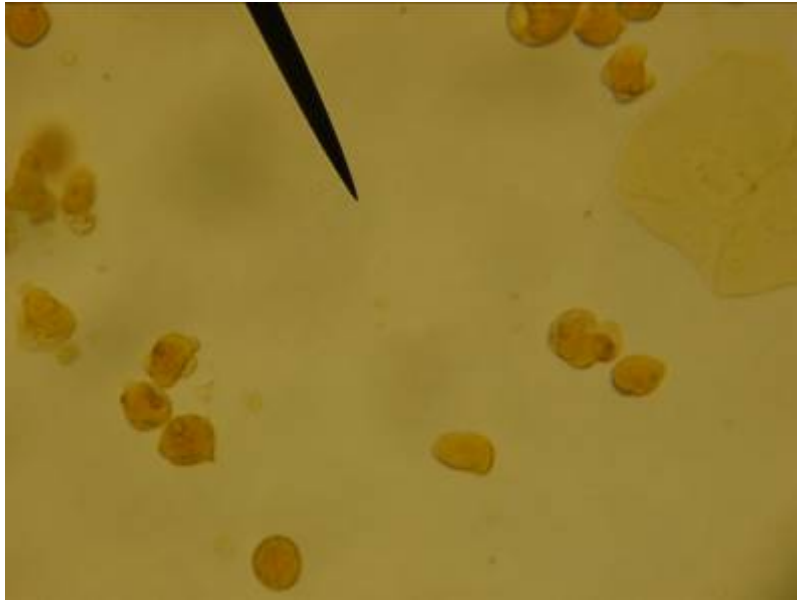
Figura 8

Imagen Izquierd: Rata ENTERA (No OVX): Cuernos uterinos y ovarios

Imagen Centro: Rata OVX: Cuernos uterinos sin ovarios, 02 semanas post cirugía

Imagen Derecha: Rata OVX: Cuernos uterinos sin ovarios, 04 semanas post cirugía

Citología Vaginal



**Figura 9. Citología vaginal de rata OVX :Fase Diestro (Abundantes linfocitos)
100x**



**Figura 10. Citología vaginal de rata No OVX :Fase Estro (células cornificadas)
100x**



Figura 11. Abordaje bilateral por ambos flancos. Exteorización del cuerno uterino izquierdo

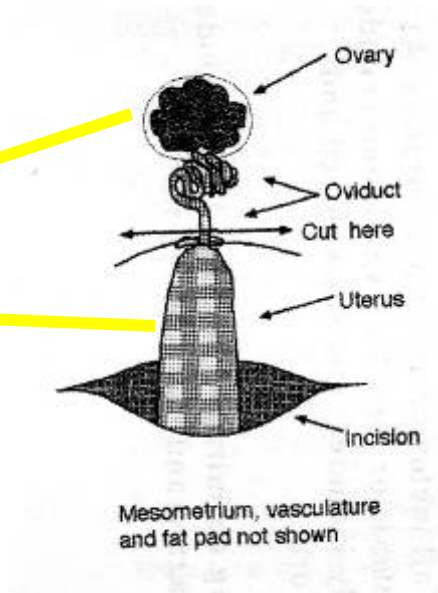
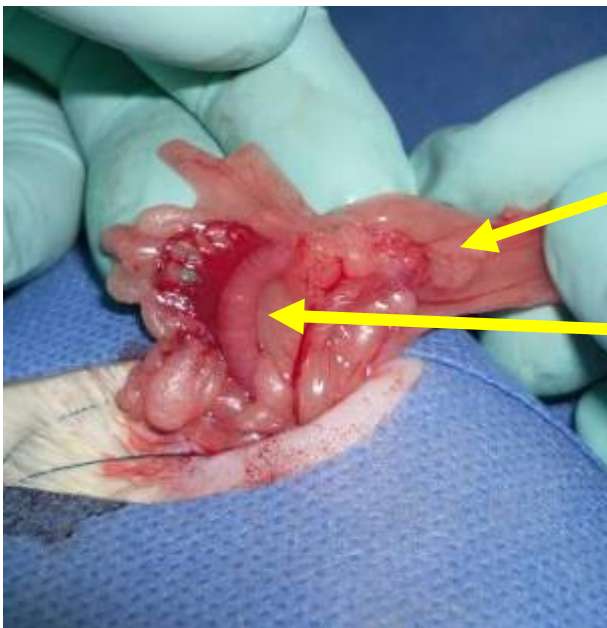


Figura 12. Se procede a ligar justo debajo del oviducto. Inmediatamente se regresa el cuerno uterino a cavidad abdominal.



Figura 13. Extracción de sangre mediante punción cardiaca en animales previamente anestesiados.