

EFFECTO DE UN SUPLEMENTO DIETARIO A BASE DE LÚPULO SOBRE EL ÚTERO DE RATAS WISTAR OVARIECTOMIZADAS

Almiron, Ailin

Instituto de Salud y Ambiente del Litoral (ISAL; UNL-CONICET)

Directora: Durando, Milena
Codirectora: Zanardi, María Victoria

Área temática: Ciencias Biológicas

Palabras claves: útero, estrogenicidad, lúpulo.

INTRODUCCIÓN

El tratamiento clásico para tratar la sintomatología de la menopausia como los sofocos es la Terapia de Reemplazo Hormonal (TRH), la cual consiste en la administración de estrógeno o una combinación de estrógeno y progesterona (Rossouw y col., 2002). En 2002, el estudio publicado por la Women Health Initiative (WHI) observó un mayor riesgo de desarrollar algún tipo de cáncer hormono dependiente, como el cáncer de mama y de endometrio en mujeres con tratamiento prolongado de TRH (Rossouw y col., 2002). A partir del estudio de la WHI, muchas mujeres optaron por alternativas a la TRH para tratar los síntomas menopáusicos. Entre estas, mencionamos la flor del *Humulus lupulus L.* o más corrientemente conocida como lúpulo, el cual es tradicionalmente utilizado en la elaboración de la cerveza. El lúpulo está compuesto por fenoles prenilados que incluyen la chalcona xanthohumol (XH) y las flavonas isoxanthohumol (IX), 6-prenilnaringenina (6PN) y 8-prenilnaringenina (8PN). El 8PN es un potente fitoestrógeno (Milligan y col., 1999) capaz de reducir la sintomatología post-menopáusica (Aghamiri y col., 2016). Debido a la presencia de 8PN en el lúpulo, se considera al extracto como un suplemento dietario con efectos beneficiosos que podría aliviar los síntomas de la menopausia (Aghamiri y col., 2016).

OBJETIVO

Evaluar si el lúpulo y el extracto reducido en XH es seguro sobre el útero, utilizando un ensayo uterotrófico.

Título del proyecto: EVALUACIÓN DE LOS EFECTOS DEL HERBICIDA GLIFOSATO ASOCIADO AL DESARROLLO DE TUMORES UTERINOS.

Instrumento: CAI+D

Año de la Convocatoria: 2020

Organismo financiador: UNL

Directora: Varayoud, Jorgelina

DISEÑO EXPERIMENTAL

Animales y tratamiento.

Se realizó un ensayo uterotrófico para evaluar la estrogenicidad del extracto de lúpulo. Se utilizaron ratas hembras de la cepa Wistar de 7 semanas de edad, ovariectomizadas bilateralmente (Ovx) bajo anestesia, con el objetivo de simular los cambios hormonales menopáusicos. Catorce días posteriores a la cirugía, los animales fueron alimentados con pellet (Control) o una pasta de pellet conteniendo el compuesto de interés durante tres días consecutivos:

- Control: Ovx
- Estradiol (E2) (0,3 µg/kg peso/día)
- Lúpulo alto (200 mg/kg peso/día)
- Knockout (KO)*-lúpulo alto (200 mg/kg peso/día)
- Lúpulo medio (40 mg/kg peso/día)
- KO*-lúpulo medio (40 mg/kg peso/día)
- Lúpulo bajo (8 mg/kg peso/día)
- KO*-lúpulo bajo (8 mg/kg peso/día)

**KO-lúpulo significa lúpulo reducido en XH y consecuentemente en 8PN debido a que el XH es metabolizado en el organismo a 8PN el cual es el compuesto estrogénico.*

La administración fue por vía oral, excepto el grupo E2, cuya administración se realizó por vía subcutánea. Los animales fueron sacrificados 24 horas después de finalizado el tratamiento, mediante inhalación de CO₂. Previo al sacrificio, los animales se pesaron y al momento del sacrificio, se obtuvo y pesó una porción de 1,5cm de longitud de uno de los cuernos uterinos, que luego fue sumergido en formol bufferado al 10% v/v para su posterior procesamiento histológico e inclusión en tacos de parafina, para realizar análisis morfológico y evaluación de la proliferación celular. Para ello, se obtuvieron cortes histológicos uterinos de 5 µm de espesor, que fueron montados sobre portaobjetos tratados con adherente tisular (silano).

Peso relativo del útero.

Para determinar si los compuestos son estrogénicos, se determinó el peso relativo del útero, calculado como peso húmedo del útero (mg)/100 g de peso corporal (Varayoud & Durando y col., 2017).

Análisis morfológico.

Sobre cortes teñidos con hematoxilina-eosina, se determinó la altura del epitelio luminal. Para ello, las imágenes fueron obtenidas con una cámara de video color Spot Insight V3.5, acoplada a un microscopio Olympus BH2 (con una objetiva Dplan 20X, apertura numérica = 0,40). El análisis morfométrico se realizó utilizando el software Image J (Varayoud & Durando y col., 2017).

Proliferación celular.

Se evaluó mediante inmunohistoquímica (IHQ): Los cortes histológicos fueron sometidos a desparafinización, seguido de hidratación y recuperación antigénica en horno de microondas utilizando buffer citrato (pH: 6). Luego del bloqueo de la peroxidasa endógena los cortes fueron incubados con el anticuerpo primario (anti-Ki-67, ISAL) durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, los cortes fueron incubados con el anticuerpo secundario conjugado con biotina (anti-conejo, ISAL) durante 30 minutos y la reacción fue revelada mediante el sistema

estreptavidina-peroxidasa, usando diaminobencidina (Sigma–Aldrich) como sustrato cromogénico. En cada corrida de IHQ se incluyeron los controles negativos (sin anticuerpo primario) y positivos (muestras con expresión reconocida y validada) (Varayoud & Durando y col., 2017). Los cortes inmunomarcados fueron coloreados con hematoxilina de Mayer (Biopur), deshidratados y montados con medio de montaje permanente (Eukitt, Sigma-Aldrich). La cuantificación de la proliferación en el epitelio luminal y glandular, se realizó determinando el porcentaje de células positivas para Ki-67, contando como mínimo 1500 células por compartimento y utilizando el microscopio óptico Olympus BH2 con una objetiva Dplan 40X (apertura numérica = 0,65). Los resultados se expresaron como porcentaje.

Análisis estadístico.

Los resultados fueron analizados mediante test no paramétricos y expresados como el promedio \pm SEM. Se analizó mediante el test de Kruskal-Wallis seguido por un post-test de Mann Whitney para comparación entre dos grupos experimentales. Los valores de $p < 0,05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

RESULTADOS

El lúpulo y KO-lúpulo no afectan el peso relativo del útero.

Los animales expuestos a E2 mostraron aumento del peso relativo del útero respecto al Control ($0,42 \pm 0,06$ vs E2: $3,31 \pm 0,35$; $p < 0,05$). Los animales tratados con lúpulo y KO-lúpulo en las distintas concentraciones no mostraron diferencias en el peso relativo del útero con respecto al grupo Control.

El lúpulo en su concentración media aumenta la altura del epitelio luminal.

Los animales del grupo lúpulo medio y E2 mostraron un incremento en la altura del epitelio luminal, respecto al grupo Control (Figura 1).

El KO-lúpulo bajo aumenta la proliferación celular en el epitelio luminal.

La proliferación celular en el epitelio luminal fue mayor en los animales expuestos a KO-lúpulo bajo y a E2 (Figura 2 A y B). Sin embargo, la proliferación celular en el epitelio glandular fue similar entre los grupos experimentales.

CONCLUSIONES

El suplemento dietario a base de lúpulo no aumentó el peso relativo del útero, por lo que no es estrogénico, siendo una opción segura para el tratamiento de los síntomas menopáusicos. Sólo el lúpulo medio aumentó la altura del epitelio luminal, en tanto que KO-lúpulo bajo aumentó la proliferación celular en el epitelio luminal.

Nuestros resultados son alentadores en cuanto demuestran ausencia de efecto estrogénico potente del lúpulo y KO-lúpulo. Con estos resultados, podemos sugerir que ambos extractos son seguros para el útero y se pueden plantear como una opción sustituta de la TRH, a futuro.

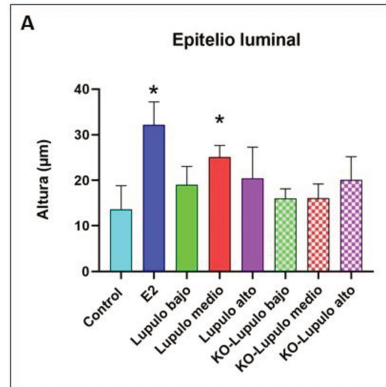


Figura 1: Efecto de las diferentes dosis de lúpulo y KO-lúpulo sobre la altura del epitelio luminal.

A) Altura del epitelio luminal. *p<0,05

B) Imágenes del epitelio luminal representativas de cortes uterinos teñidos con hematoxilina-eosina. Barra: 50 µm.

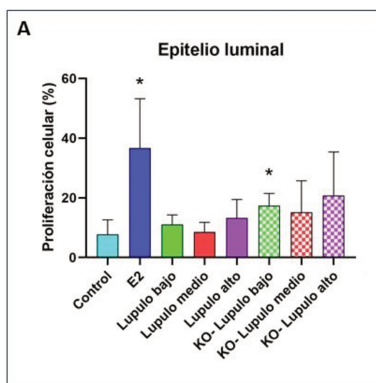
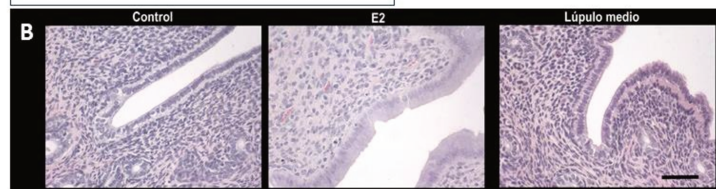
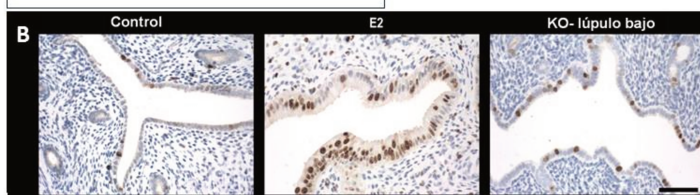


Figura 2: Efecto de las diferentes dosis de lúpulo y KO-lúpulo sobre la proliferación celular.

A) Epitelio luminal. *p<0,05

B) Imágenes representativas de la proliferación celular (Ki-67) sobre el epitelio luminal. Barra: 50 µm.



BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Aghamiri V., Mirghafourvand M., Nazemiyeh H. y Mohammad-Alizadeh-Charandabi S. (2016). The effect of hop (*Humulus lupulus* L.) on early menopausal symptoms and hot flashes: a randomized placebo-controlled trial. *Complementary therapies in clinical practice* 23:130-135.

Milligan S.R., Kalita J.C., Heyerick A., Rong H., De Cooman L., y De Keukeleire D. (1999). Identification of a potent phytoestrogen in hops (*Humulus Lupulus* L.) and beer. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 83 (6):2240-2252.

Rossouw J.E., Anderson G.L., Prentice R.L. y col. (2002). Risks and Benefits of Estrogen Plus Progestin in Healthy Postmenopausal Women: Principal Results From the Women's Health Initiative Randomized Controlled Trial. *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 288(3):321-333.

Varayoud J., Durando M., Ramos J.G. y col. (2017). Effects of a glyphosate-based herbicide on the uterus of adult ovariectomized rats. *Environmental Toxicology*, 32(4):1191-1201.