

**Centro de Investigación en Alimentación  
y Desarrollo, A. C.**

**CORRELACIÓN ENTRE LOS NIVELES URINARIOS Y LA  
INGESTIÓN DE FITOESTRÓGENOS ESTIMADA POR  
ENCUESTAS DIETARIAS EN MUJERES ADULTAS  
HERMOSILLENSES**

Por

**KARINA MARÍA CHÁVEZ SUÁREZ**

Tesis aprobada por la  
COORDINACIÓN DE NUTRICIÓN  
como requisito parcial para obtener el grado de

**MAESTRÍA EN CIENCIAS**

Hermsillo, Sonora

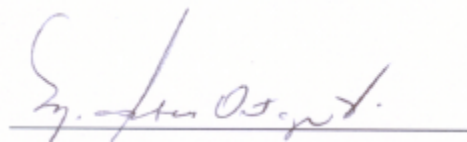
Enero del 2012

## APROBACIÓN

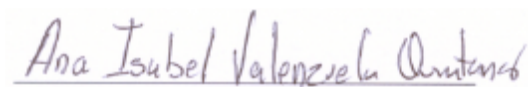
Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Karina María Chávez Suárez, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.



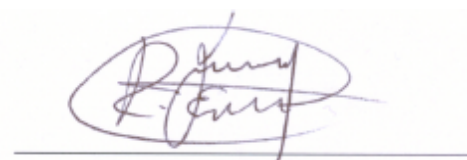
Dra. Graciela Caire Juvera  
Directora de Tesis



Dra. María Isabel Ortega Vélez  
Asesora



Dra. Ana Isabel Valenzuela Quintanar  
Asesora




Dr. Julián Esparza Romero  
Asesor

## DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé el crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del director del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD A.C., previa autorización escrita del manuscrito en cuestión, del director o directora de la tesis.



Dr. Ramón Pacheco Aguilar  
Director General

## AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por el apoyo financiero brindado para la investigación #CB-2008-01-106028 y para la beca otorgada. A las mujeres que participaron en este estudio y a Agilent por las facilidades otorgadas en el préstamo del espectrómetro de masas.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. Unidad Hermosillo y a la Coordinación de Nutrición, por brindarme la oportunidad de realizar el presente estudio, gracias a todo el personal.

A los miembros del comité de tesis: Dra. Ma. Isabel Ortega Vélez, Dra. Ana Isabel Valenzuela Quintanar y el Dr. Julián Esparza Romero, quienes conformaron un excelente equipo y que con sus sugerencias enriquecieron el presente estudio. En especial agradezco a la directora de la tesis, la Dra. Graciela Caire Juvera por ser tan eficaz en su trabajo, por la confianza depositada en mí y la libertad en la toma de decisiones, asimismo por transmitirme su entusiasmo en la investigación y trabajo en equipo.

A la M.S.P. María del Socorro Saucedo Tamayo por el gran apoyo brindado en el trabajo de campo y su experiencia. Asimismo a mis compañeras Q.B Melissa María Campa Siqueiros y Q.B Diana Luna Parra.

A la M.S.P. Alma Delia Contreras Paniagua por el apoyo técnico en la estandarización en las técnicas de evaluación dietaria, así como el análisis dietario.

A la M. en C. María del Refugio Robles Burgueño por el apoyo técnico en el HPLC-MS, a la M. en C. Patricia Grajeda Cota y a la Q.B Susana Palma Durán por el apoyo técnico en el laboratorio de toxicología de plaguicidas. Así como a la M. en C. Lourdes Gutiérrez Coronado. Asimismo, al laboratorio de

Residuos Tóxicos de la coordinación de Ciencias de los Alimentos por las facilidades otorgadas en el préstamo del equipo HPLC-MS

A la coordinación de programas académicos en especial a servicios escolares: Laura García Cruz, Argelia Marín Pacheco y Verónica Araiza Sánchez por su apoyo logístico y atenciones. También al personal de la biblioteca en especial al Q.B. Fernando Leyva Livshin y Luis Conde Ortiz por su eficiencia en la búsqueda de información científica. De igual manera al equipo de taller y servicios de cómputo, en especial al Ing. José Luis Aguilar Valenzuela y Karla Gabriela Robles Bernal por su apoyo técnico cada vez que se presentaban problemas técnicos con mi computadora.

A mi nueva familia en Hermosillo, mis roomies consentidas Vianey y Anita, que fueron como mis hermanas, como olvidar las pláticas nocturnas, los debates en temas actuales, las risas contagiadas, por compartir su conocimiento, por su ayuda y por la gran amistad que nació, las amo con todo mi corazón. Sin olvidar a mis roomies de unos cuantos meses, pero no menos importantes Olga, Monse, Melissita y Gagu, muchísimas gracias por compartir un pedacito de sus vidas conmigo. A mis cubimates Lily, Came, Melissa y Gaby les agradezco las pláticas y risas generadas en ese pequeño cubículo, siempre lleno de comida “nutritiva”, así como su apoyo incondicional y por escucharme. Por último, agradezco a mis amigos y compañeros de la coordinación de nutrición generación 2009-2011 a Erika, Elí, Gemma y Karlita, gracias por su ayuda y sonrisas. A todos ustedes, los estimo y los extrañaré mucho, las puertas de mi casa en la Baja Sur siempre estarán abiertas para ustedes.

## DEDICATORIA

*A mi familia maravillosa que es el motor de mi vida,  
A mis papás Adela y Sergio por todo el apoyo incondicional, los amo viejos, a  
mis hermanos Fabián y Beto y a mis sobrinos Emy y Leo, sin ustedes  
simplemente no sería como soy*

## ÍNDICE

RESUMEN GENERAL .....	1
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	2
ANTECEDENTES .....	4
Los Fitoestrógenos.....	4
Fuentes dietarias .....	5
Metabolismo.....	7
Efectos potenciales.....	10
No Hormonales.....	10
Hormonales.....	11
Cáncer de mama .....	12
Ingestión Dietaria y Excreción Urinaria de los Fitoestrógenos .....	15
Consumo dietario.....	15
Niveles urinarios .....	17
Métodos para Estimar el Consumo Dietario de Fitoestrógenos .....	19
En la dieta.....	20
En orina.....	22
Algunos Estudios de Correlación del Consumo de Fitoestrógenos con la Excreción Urinaria de sus Metabolitos .....	23
JUSTIFICACIÓN .....	25
HIPÓTESIS .....	26
OBJETIVO.....	27

General .....	27
Específicos .....	27
BIBLIOGRAFÍA.....	28
CAPÍTULO I.....	37
RESUMEN.....	37
INTRODUCCIÓN.....	38
SUJETOS Y MÉTODOS .....	40
Población de Estudio.....	40
Criterios de elegibilidad.....	40
Tamaño y selección de la muestra .....	40
Colección de la Información y Muestra Biológica .....	41
Cuestionario sociodemográfico y de salud general.....	42
Mediciones antropométricas .....	42
Encuesta dietaria: recordatorio de 24 horas .....	43
Orina de 12 horas .....	43
Cálculo del Consumo Dietario de los Fitoestrógenos.....	44
Construcción de base de datos de alimentos fuentes de fitoestrógenos ....	45
Estimación del consumo de fitoestrógenos.....	47
Análisis de fitoestrógenos en la orina de 12 h.....	48
Productos químicos y reactivos .....	48
Preparación de los estándares, reactivos y soluciones .....	49
Procedimiento de extracción.....	50
Pretratamiento de la muestra.....	50
Extracción líquido-líquido.....	51



Separación y detección.....	51
Recuperación y concentración de los fitoestrógenos.....	52
Linealidad del método.....	53
Análisis Estadístico.....	54
RESULTADOS.....	57
Selección de las Mujeres del Estudio.....	57
Características Generales y Antropométricas de las Mujeres del Estudio.....	58
Ingestión de Dietaria de las Mujeres del Estudio.....	59
Energía y macronutrientos.....	59
Fitoestrógenos.....	60
Extracción de Fitoestrógenos en la Orina.....	61
Niveles Urinarios de Fitoestrógenos.....	70
Correlaciones entre los Fitoestrógenos Dietarios Estimados por Recordatorio de 24 Horas y los Urinarios.....	74
DISCUSIÓN.....	77
CONCLUSIÓN.....	85
BIBLIOGRAFÍA.....	86
CAPÍTULO 2.....	91
RESUMEN.....	911
INTRODUCCIÓN.....	92
SUJETOS Y MÉTODOS.....	94
Instrumento de Recolección de la Información Dietaria: Cuestionario de Frecuencia de Consumo de Alimentos.....	94
Evaluación Dietaria de los Fitoestrógenos.....	95

Análisis Estadístico .....	96
RESULTADOS .....	98
Ingestión de Nutrientes y Fitoestrógenos .....	98
Niveles Urinarios de Fitoestrógenos.....	99
Correlaciones entre los Fitoestrógenos Dietarios Estimados por CFCA y los Urinarios.....	108
DISCUSIÓN.....	110
CONCLUSIÓN.....	116
BIBLIOGRAFÍA.....	117
LIMITACIONES Y FORTALEZAS DEL ESTUDIO COMPLETO.....	119
ANEXOS.....	120

## LISTA DE TABLAS

### CAPÍTULO UNO

<b>Tabla 1.</b> Ejemplo del cuadro utilizado para la selección del alimento fuente de fitoestrógenos .....	46
<b>Tabla 2.</b> Características generales y mediciones antropométricas en el total de las mujeres y estratificadas por estado de menopausia.....	59
<b>Tabla 3.</b> Ingestión dietaria de energía y nutrimentos en las mujeres del estudio .....	62
<b>Tabla 4.</b> Ingestión dietaria de isoflavonas en las mujeres del estudio.....	63
<b>Tabla 5.</b> Ingestión dietaria de lignanos, cumestrol y resveratrol en las mujeres del estudio .....	64
<b>Tabla 6.</b> Ingestión dietaria de flavonoides y fitoestrógenos totales en las mujeres del estudio .....	65
<b>Tabla 7.</b> Coeficiente de variación intraindividual e interindividual para las ingestiones de energía, nutrimentos y fitoestrógenos de las mujeres del estudio .....	66
<b>Tabla 8.</b> Porcentaje de recuperación y coeficiente de variación promedio de los fitoestrógenos obtenido por la extracción líquido-líquido de muestra de orina fortificada a 200 ng/mL.....	67
<b>Tabla 9.</b> Límites de detección y cuantificación del método de extracción líquido-líquido de fitoestrógenos en orina humana.....	68
<b>Tabla 10.</b> Concentraciones urinarias de las isoflavonas ( $\mu\text{g/L}$ ) en las mujeres de este estudio. ....	71
<b>Tabla 11.</b> Concentraciones urinarias de los lignanos ( $\mu\text{g/L}$ ) en las mujeres de este estudio. ....	71

<b>Tabla 12.</b> Concentraciones urinarias del cumestrol, resveratrol, flavonoides y fitoestrógenos totales ( $\mu\text{g/L}$ ) en las mujeres de este estudio.....	72
<b>Tabla 13.</b> Coeficientes de correlación entre las isoflavonas y cumestrol dietarios (recordatorio de 24 h) y urinarios (orina de 12 h) .....	75
<b>Tabla 14.</b> Coeficientes de correlación entre los lignanos dietarios (recordatorio de 24 h) y urinarios (orina de 12 h).....	76
<b>Tabla 15.</b> Coeficientes de correlación entre el resveratrol, los flavonoides y los fitoestrógenos totales dietarios (recordatorio de 24 h) y urinarios (orina de 12 h) .....	76

## **CAPÍTULO DOS**

<b>Tabla 1.</b> Consumo de nutrimentos de la población de estudio.....	100
<b>Tabla 2.</b> Ingestión dietaria de isoflavonas en la población de estudio.....	101
<b>Tabla 3.</b> Ingestión dietaria de lignanos, cumestrol y resveratrol en la población de estudio .....	102
<b>Tabla 4.</b> Ingestión dietaria de flavonoides y fitoestrógenos totales en la población de estudio.....	103
<b>Tabla 5.</b> Coeficiente de variación interindividual para las ingestiones de energía, nutrimentos y fitoestrógenos estimado en el CFCA.....	104
<b>Tabla 6.</b> Concentraciones urinarias de isoflavonas ( $\mu\text{g/L}$ ) en las mujeres de este estudio .....	106
<b>Tabla 7.</b> Concentraciones urinarias de los lignanos ( $\mu\text{g/L}$ ) en las mujeres de este estudio.....	106
<b>Tabla 8.</b> Concentraciones urinarias del cumestrol, resveratrol, flavonoides y fitoestrógenos totales ( $\mu\text{g/L}$ ) en las mujeres de este estudio.....	107

<b>Tabla 9.</b> Coeficientes de correlación entre las isoflavonas y cumestrol dietarios (CFCA) y urinarios (orina de 12 h).....	108
<b>Tabla 10.</b> Coeficientes de correlación entre los lignanos dietarios (CFCA) y urinarios (orina de 12 h) .....	109
<b>Tabla 11.</b> Coeficientes de correlación entre el resveratrol, flavonoides y fitoestrógenos totales dietarios (CFCA) y urinarios (orina de 12 h) .....	109

## LISTA DE FIGURAS

### ANTECEDENTES

- Figura 1.** Estructuras químicas del estradiol y los fitoestrógenos genisteína, resveratrol, quercetina y daidzeína..... 5
- Figura 2.** Representación esquemática de absorción de daidzeína desde el intestino ..... 9

### CAPÍTULO UNO

- Figura 1.** Total de entrevistas realizadas. .... 57
- Figura 2.** Ejemplo de un cromatograma de HPLC-ES-MS de los 16 estándares de fitoestrógenos. .... 69
- Figura 3.** Ejemplo de un cromatograma de HPLC-ES-MS de muestra de orina de 12 h de una voluntaria. .... 69
- Figura 4.** Comparación de concentraciones de fitoestrógenos en orina humana por estado de menopausia. .... 73
- Figura 5.** Porcentaje de detección de fitoestrógenos en orina de 12 h.....73
- Figura 6.** Gráfico de Bland-Altman. Método dietario (recordatorio de 24 h) y analítica (HPLC-MS).....77

### CAPÍTULO DOS

- Figura 1.** Distribución de fitoestrógenos urinarios en las participantes ..... 105
- Figura 2.** Gráfico de Bland-Altman. Técnica dietaria (cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos) y analítica (HPLC-MS) .....110

## RESUMEN GENERAL

Los fitoestrógenos son metabolitos secundarios derivados de plantas que tienen una actividad estrogénica y antiestrogénica débil debido a su similitud estructural con el  $17\beta$ -estradiol. Estos compuestos dietarios se encuentran en una gran variedad de alimentos y bebidas, como algunas frutas, verduras, cereales, vino, té, entre otros. Diversos estudios experimentales y epidemiológicos sugieren que los fitoestrógenos contribuyen a la prevención de algunas enfermedades crónicas (cáncer de mama, enfermedades cardiovasculares y osteoporosis). Sin embargo, actualmente los resultados son inconsistentes y controversiales y se han limitado a los estudios epidemiológicos para evaluar la relación entre los niveles ingeridos de los fitoestrógenos y el riesgo de desarrollar una enfermedad. Lo anterior podría deberse a la dificultad para cuantificar los fitoestrógenos de una manera más precisa en los alimentos consumidos utilizando las herramientas tradicionales de la evaluación dietaria. Los marcadores biológicos son mediciones objetivas, debido a que sus errores no están relacionados con los de los métodos de evaluación dietaria. Por lo que la utilización de las concentraciones de los fitoestrógenos en orina podría ofrecer una alternativa a los métodos de evaluación dietaria o servir para validar las técnicas dietarias.

En este estudio transversal se evaluó la correlación entre los fitoestrógenos dietarios y urinarios. Este trabajo se dividió en dos capítulos, en el primero se abordó la asociación del consumo de fitoestrógenos, estimados por recordatorio de 24 horas, con sus correspondientes niveles urinarios analizados por HPLC-ES-MS. Mientras que en el capítulo 2 se evaluó la relación entre la ingestión, estimada por cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos, y las concentraciones urinarias de fitoestrógenos analizados por la misma técnica analítica.

## INTRODUCCIÓN GENERAL

La presencia de enfermedades crónicas en el mundo ha aumentado con el tiempo, de tal manera que se estima un incremento del 46 al 57% de estas enfermedades para el año 2020 (WHO/FAO, 2002 ). Una de las enfermedades crónicas que representa un problema de salud mundial es el cáncer de mama, debido a que es el más frecuente entre las mujeres (Torres-Sanchez y cols., 2009). En México, este tipo de cáncer representa un desafío en materia de salud pública, ya que en el 2006 se desplazó para ocupar el primer lugar como causa de muerte por tumores malignos en la mujer (INEGI, 2007; Palacio-Mejía y cols., 2009).

Muchos estudios han evidenciado un menor riesgo de diferentes tipos de cáncer, como el de mama, con la utilización de ciertas dietas (Adlercreutz y Mazur, 1997; Cotterchio y cols., 2008). Estos estudios indican que poblaciones asiáticas, con un consumo mayor de soya, están en menor riesgo de cáncer mamario que las americanas y europeas. Este efecto protector puede deberse a uno o más componentes dietarios, entre los que se encuentran los fitoestrógenos. Estos compuestos de origen vegetal tienen la capacidad de inducir efectos estrogénicos o antiestrogénicos, debido a su similitud estructural con la hormona 17  $\beta$ -estradiol.

Los fitoestrógenos más reconocidos por sus efectos potencialmente benéficos, son las isoflavonas y los lignanos. Las isoflavonas se encuentran naturalmente en la soya y otras leguminosas como glucósidos de genisteína, daidzeína y gliciteína (Dixon, 2004). Por otro lado, los lignanos como el matairesinol y el secoisolariciresinol están ampliamente distribuidos en frutas, vegetales y semillas de linaza (Milder y cols., 2005).



Los fitoestrógenos modulan muchos procesos biológicamente relevantes, aunque en algunos casos la información al respecto es todavía cuestionable (Valentin-Blasini y cols., 2003). La incertidumbre proviene de la falta de información sobre el contenido de fitoestrógenos en los alimentos consumidos, principalmente por su dificultad para cuantificarlos. Esta escasez de datos ha limitado los estudios epidemiológicos para evaluar la relación entre los niveles ingeridos de fitoestrógenos y el riesgo de desarrollar una enfermedad, como el cáncer de mama (Grace y cols., 2004). Así, en este estudio dividido en dos capítulos, se propuso evaluar la relación de los niveles urinarios de fitoestrógenos con la ingestión estimada por encuestas dietarias y tablas de composición de alimentos en mujeres adultas saludables de Hermosillo, Sonora.

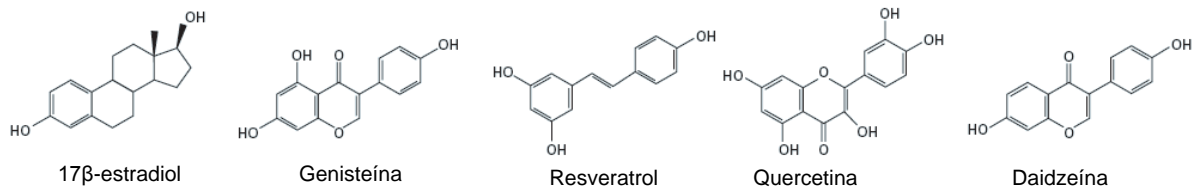
En el capítulo 1 se abordará la asociación del consumo de fitoestrógenos, estimados por recordatorio de 24 horas, con sus correspondientes niveles urinarios. Mientras que en el capítulo 2 se evaluará la relación entre la ingestión, estimada por cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos, y las concentraciones urinarias de fitoestrógenos.

## **ANTECEDENTES**

### Los Fitoestrógenos

Los alimentos de origen vegetal, además de sus valores nutricionales tradicionales, contienen ciertas sustancias fitoquímicas no nutricionales que pueden tener efectos a largo plazo que promuevan la salud en el humano (Mazur y Adlercreutz, 1998). Entre las más importantes están los fitoestrógenos. Este término está definido por el Comité en Toxicidad (COT, 2003) como “cualquier sustancia o metabolito que induce respuestas biológicas en vertebrados y que puede imitar o modular la acción de estrógenos endógenos, usualmente por unirse a los receptores de éstos”. Además de la actividad estrogénica débil, pueden presentar la propiedad antiestrogénica debido a su similitud estructural no esteroideal y funcional con el 17  $\beta$ -estradiol (Fig. 1) y los moduladores selectivos de los receptores de estrógenos (SERM) respectivamente (Brzezinski y Debi, 1999). Por lo anterior, los mecanismos por los cuales los fitoestrógenos pueden tener efectos benéficos en la salud humana pueden estar regulados, en parte, por sus propiedades agonistas y antagonistas estrogénicas.

Los fitoestrógenos están clasificados por su estructura principalmente como flavonoides y no flavonoides. Entre los flavonoides están las isoflavonas, flavonoles, flavonas, flavanonas y entre los no flavonoides están los lignanos, los cumestanos y los estilbenos. Los más estudiados son las isoflavonas, los lignanos y sus metabolitos por sus propiedades nutricionales potenciales y por ser componentes de fuentes dietarias comunes (Lampe, 2003; Setchell, 1998). Estas fuentes incluyen alimentos de origen vegetal como los granos, las leguminosas y ciertas frutas y vegetales.



**Figura 1.** Estructuras químicas del estradiol y los fitoestrógenos genisteína, resveratrol, quercetina y daidzeína (Mense y cols., 2008)

### Fuentes dietarias

Las isoflavonas se encuentran en plantas y tienen una estructura química difenólica, derivada de los flavonoides. La mayoría de las isoflavonas están presentes en formas conjugadas con un glucósido, como la  $\beta$ -genistina,  $\beta$ -daidzina y  $\beta$ -glicitina en diversas fuentes naturales (Wang y Murphy, 1994). Sin embargo, pocos alimentos las contienen, ya sea en su forma conjugada o libre. Por tanto, las especies de plantas comestibles que proporcionan isoflavonas a la dieta son escasas.

Las leguminosas como el frijol de soya y sus productos, son las fuentes dietarias principales de las isoflavonas. Estas fuentes contienen aproximadamente entre 0.2 y 1.6 mg de isoflavonas por gramo de peso seco (Kurzer y Xu, 1997). Como ejemplo, se tiene que un gramo de soya en polvo contiene 800  $\mu$ g de daidzeína y 500  $\mu$ g de genisteína, principalmente como glucósidos, mientras que un gramo de proteína aislada de soya contiene menos cantidad (150  $\mu$ g y 250  $\mu$ g, respectivamente) (Dixon, 2004). Además, la soya se encuentra como aditivo en más del 60% de los alimentos procesados como sustitutos de carne, fórmulas infantiles, cereales, bebidas energéticas, entre otros (COT, 2003). Otras leguminosas como el garbanzo, el germinado de alfalfa, el frijol, el chícharo, haba y alubia son fuentes naturales de isoflavonas, pero en concentraciones menores. De igual manera, están presentes en el vino,

los granos, las bayas y los frutos secos. Así, las concentraciones mayores de isoflavonas se encuentran en alimentos específicos, como la soya.

Se ha observado que existen otros alimentos fuentes de isoflavonas distintos a las leguminosas. En México, Muñoz y colaboradores identificaron al nopal y al chile manzano como alimentos mexicanos con un contenido de 1.5 mg y 0.1 mg de isoflavonas por 100 g de peso seco, respectivamente (Muñoz y cols., 2005).

Los lignanos, derivados de diversas plantas vasculares, se encuentran como glucósidos de secoisolariciresinol y matairesinol. Sin embargo, en los fluidos biológicos los lignanos están en la forma de enterodiol y enterolactona, los cuales son metabolitos bacterianos de secoisolariciresinol y matairesinol, respectivamente (Nurmi y cols., 2010).

Muchos de los lignanos se encuentran en cantidades medibles en una variedad de alimentos (Lampe y cols., 2006). Entre sus fuentes dietarias principales están las capas exteriores de los cereales y los granos, como el centeno y la linaza. También las frutas, como las bayas, los vegetales, las legumbres enteras y descascaradas, los cereales integrales de marca comercial, el ajo y algunas bebidas, como el café, el té, el vino y la cerveza tienen un contenido considerable de lignanos (Milder y cols., 2005). De ahí, se observa que los lignanos se encuentran en mayor concentración en los alimentos ricos en fibra y son más abundantes en las plantas que las isoflavonas, aunque su contenido en los demás alimentos no se ha caracterizado totalmente.

Las fuentes dietarias más significativas de cumestanos son el germinado de alfalfa (Hong y cols., 2010) y el trébol, con contenidos de cumestrol de 5.6 y 0.7 mg/g de peso seco, respectivamente. También, los frijoles pintos, los chícharos y las semillas de habas contienen cantidades pequeñas de cumestrol (15-80  $\mu$ g/g de peso seco) (Franke y cols., 1995).

En el caso de los estilbenos como el resveratrol, se encuentra principalmente en el vino tinto en cantidades que van de 1.5 a 3 mg/L (Yang y

cols., 2001). Algunos flavonoides como la naringenina, luteolina, kaempferol y quercetina están presentes en la mayoría de las frutas y verduras, principalmente en la naranja, el pimiento verde, la acelga y la cebolla (USDA, 2007).

Por otro lado, los fitoestrógenos también se encuentran en alimentos de origen animal. Un estudio realizado en el Reino Unido encontró fitoestrógenos en la leche, los productos lácteos, el huevo, la carne, el pescado y los mariscos (Kuhnle y cols., 2008). Mientras que en la carne, el pescado y los mariscos, virtualmente todos los fitoestrógenos son prácticamente derivados de plantas, una mayor proporción de los fitoestrógenos encontrados en el huevo y los productos lácteos son derivados del metabolismo gastrointestinal de los precursores derivados de plantas (Ward y Kuhnle, 2010).

## **Metabolismo**

El metabolismo de las isoflavonas y los lignanos no se ha elucidado completamente en el ser humano debido a la acción de diversos factores. Algunos de éstos son la actividad microbiana intestinal, la presencia sinérgica de otros componentes de la dieta y las variaciones entre individuos. De tal manera que el modelo metabólico propuesto está basado en estudios con animales y en los metabolitos de fitoestrógenos encontrados en la orina de humanos (Joannou y cols., 1995).

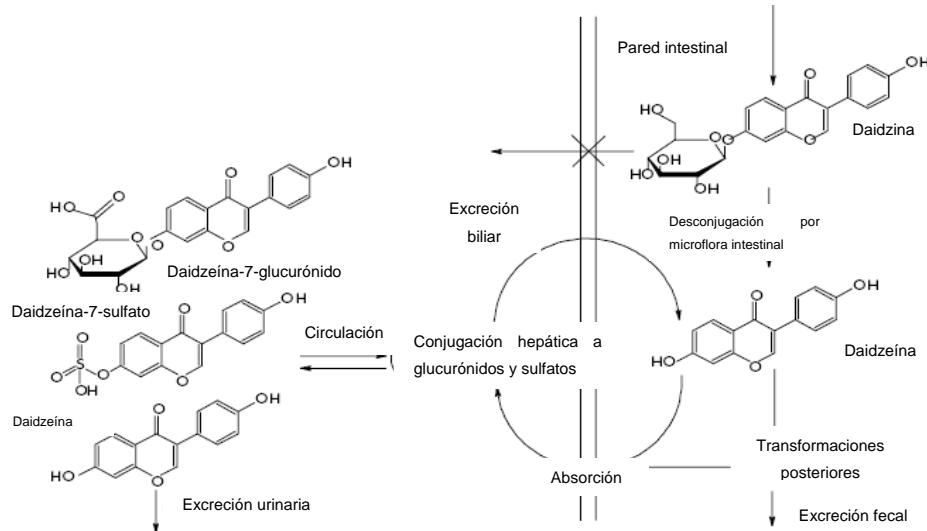
Las isoflavonas y los lignanos presentan patrones similares de metabolismo en los animales y los humanos. En el caso de las isoflavonas consumidas en los alimentos, éstas se liberan en el estómago del complejo proteína-isoflavona. Una vez en el intestino, sus conjugados glucosídicos se hidrolizan hasta su forma libre (agliconas), por acción de las bacterias y las enzimas intestinales humanas (Kelly y cols., 1993). Las bacterias que participan

en esta hidrólisis son los lactobacilos, los bacteroides, las bifidobacterias y sus enzimas  $\beta$ -glucosidasas. Además, se presume que la enzima floricina lactasa, localizada en el borde de cepillo intestinal, puede hidrolizar efectivamente los glucósidos de isoflavonas (Day y cols., 2000).

Los glucósidos de lignanos se hidrolizan por acción de  $\beta$ -glucosidasas bacterianas e intestinales. Sus productos, los secoisolariciresinoles y los matairesinoles, son absorbidos o pueden ser metabolizados después a los enterolignanos, enterodioles y enterolactonas, por acción bacteriana intestinal (Lampe y cols., 2006). En el metabolismo se incluyen reacciones de deshidroxilación y desmetilación por acción bacteriana, presumiblemente, de *Peptostreptococcus sp.* y *Eubacterium sp* (Wang y cols., 2000 ). Posteriormente, el enterodiol puede oxidarse a enterolactona. Esta reacción de oxidación está asociada a un grupo de bacterias, como *Atopobium*, *P. productus* y *Clostridium coccooides* (Clavel y cols., 2005). Así, el metabolismo de los fitoestrógenos requiere de una serie de reacciones de desconjugación para absorberse a través de las monocapas de las células epiteliales del intestino delgado.

Después de la absorción en el intestino delgado, las isoflavonas y los lignanos se incorporan a la circulación enterohepática y se conjugan con ácido glucurónico y sulfato, por acción de las enzimas hepáticas fase II (UDP-glucuronosiltransferasas y sulfotransferasas) (Fig. 2). Se sabe que en esta etapa el ácido glucurónico es la fracción primaria debido a los perfiles conjugados de isoflavonas y lignanos encontrados en la orina de humanos. Enseguida, estas formas conjugadas, glucurónicas, se excretan a través de la orina y bilis. Sin embargo, la excreción de las isoflavonas y lignanos conjugados en la bilis se somete nuevamente a circulación enterohepática y pueden desconjugarse por  $\beta$ -glucuronidasas bacterianas (Kurzer y Xu, 1997). Por tanto, la reacción de desconjugación promueve la reabsorción de las isoflavonas y los lignanos y su posterior metabolización hasta ecuol y enterolactona.

Las isoflavonas, en forma de glucurónicos, predominan en la orina y su vida media es de aproximadamente entre 7 y 10 h (Setchell y cols., 2001). Entre los principales metabolitos de isoflavonas están la daidzeína, la genisteína, el ecuol y la O-desmetilangolensina. Sin embargo, la excreción urinaria de estos metabolitos es variable entre individuos. Por ejemplo, sólo entre 30 y 40% de la población occidental excreta ecuol en cantidades significativas (Manach y cols., 2005). La mayor proporción de lignanos excretados en orina se conjugan, 95% de las enterolactonas y 85% de los enterodioles se excretan principalmente como monoglucurónicos. Estos enterolignanos aparecen en circulación aproximadamente entre 8 y 10 h después de la ingestión de lignanos derivados de plantas. En cambio, los lignanos derivados de plantas están en circulación sanguínea después de 2 horas del consumo pero sus concentraciones son menores que las de los enterolignanos (Peñalvo y cols., 2005). Así, las recolecciones urinarias pueden ser más útiles para la estimación completa de los niveles de lignanos e isoflavonas que las muestras de sangre.



**Figura 2.** Representación esquemática de absorción de daidzeína desde el intestino (Comité de toxicidad de químicos en alimentos, productos consumidos y el ambiente, 2003)

## **Efectos potenciales**

Las isoflavonas, los lignanos y sus respectivos metabolitos tienen diversas actividades potenciales que pueden explicar algunos de los efectos biológicos de las dietas altas en fitoestrógenos. Se han realizado algunos estudios con animales que han evaluado la relación de la ingestión dietaria de fitoestrógenos con efectos fisiológicos. Otros estudios han explorado la asociación del consumo de fitoestrógenos con enfermedades características de la mujer, como cáncer de mama (Velentzis y cols., 2009), osteoporosis (Arjmandi, 2001), y menopausia (Wylie-Rosett, 2005). En esta sección se explorarán los efectos no hormonales y hormonales. Finalmente, se revisará el cáncer de mama, la neoplasia más común en mujeres a nivel mundial y nacional, que se ha relacionado con el consumo de fitoestrógenos en la dieta.

No Hormonales. Los mecanismos protectores que se confieren a los fitoestrógenos están relacionados con diversos efectos no hormonales que modulan los procesos carcinogénicos. Entre los más estudiados están la modificación de la actividad enzimática, la actividad antioxidante, la supresión de angiogénesis y la estimulación de apoptosis (Whitten y Patisaul, 2001). En estudios *in vitro*, algunos fitoestrógenos como la genisteína inhiben varias enzimas involucradas en los mecanismos de señalización celular y eventos nucleares como la proliferación y diferenciación celular. Éstas incluyen a la ADN topoisomerasa I y II y la proteína tirosina cinasa (Bhathena y Velasquez, 2002). De igual manera, se ha demostrado que algunos fitoestrógenos inhiben la actividad de enzimas esteroideogénicas, como la aromatasa y 17  $\beta$ -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo I, que intervienen en la síntesis de estradiol a partir de los andrógenos y el sulfato de estrógeno y estrona circulantes, respectivamente. Por ejemplo, la quercetina tiene una actividad inhibitoria más potente hacia la aromatasa que las isoflavonas. Esta habilidad se le atribuye a



las diferencias de sus estructuras químicas (Rice y Whitehead, 2006). La genisteína estimula la actividad de enzimas antioxidantes, como la catalasa y la superóxido dismutasa, y previene la hemólisis peroxidativa (Yousef y cols., 2004). Además, algunos fitoestrógenos, como la quercetina y resveratrol se conocen por tener una actividad antioxidante potente (Kelly, 2011; King y cols., 2006). De ahí que, los fitoestrógenos pueden actuar en diferentes rutas metabólicas y procesos independientes de la actividad estrogénica.

Hormonales. Los fitoestrógenos tienen la capacidad de unirse a receptores de estrógenos,  $\alpha$  ó  $\beta$ , aunque débilmente en comparación con el estradiol. Esta unión débil permite que los fitoestrógenos presenten dos formas de acción opuestas, la actividad estrogénica y la antiestrogénica. Otras características que definen esta actividad hormonal son el tipo de tejido, la concentración biodisponible de los fitoestrógenos, la expresión de los receptores de estrógenos en las células blanco y el estado de estrógenos endógenos (Anderson y cols., 1999).

En estudios *in vitro*, la isoflavona genisteína parece tener más afinidad por el  $\beta$ -receptor estrogénico que por el  $\alpha$ -receptor (Mueller y cols., 2004). Se presume que las acciones de la genisteína son más efectivas en aquellos órganos y tejidos en los que predominan los receptores  $\beta$ , como el hueso, el tracto urogenital y sistema nervioso central. De tal manera que la actividad reducida de la genisteína sobre el receptor estrogénico  $\alpha$ , podría evitar la proliferación del tejido mamario y endometrial (López-Luengo, 2002). También se ha observado que la genisteína a dosis altas (50 -100  $\mu$ M) inhibe el crecimiento de células de cáncer mamario, mientras que a concentraciones bajas (0.01-10  $\mu$ M) induce la proliferación celular. Estos efectos contrarios se explican en relación con las propiedades estrogénicas a dosis bajas y citotoxicidad a dosis altas (Hsieh y cols., 1998). La acción de los efectos estrogénicos o antiestrogénicos de los fitoestrógenos probablemente dependa tanto del tejido diana como del tiempo y nivel de exposición. Así, la actividad

hormonal de los fitoestrógenos puede ser beneficiosa pero también perjudicial sobre los procesos dependientes de hormonas.

## **Cáncer de mama**

El cáncer de mama es un problema de salud pública que afecta a más de 1.3 millones de mujeres y se le atribuyeron 458,503 defunciones mundiales en el 2008 (Ferlay y cols., 2008). En México, esta neoplasia se convirtió en la principal causa de muerte por tumores malignos en mujeres (INEGI, 2007), siendo la incidencia mayor calculada de este tipo de cáncer de 60.6 por 100 mil mujeres entre 60 y 64 años (SUIVE, 2008) y la mortalidad estandarizada de 12.2 muertes por 100 mil mujeres (Flores-Luna y cols., 2008).

Hay muchos factores de riesgo para desarrollar cáncer de mama, la mayoría de ellos se relacionan con la historia reproductiva de la mujer. Algunos de estos factores son la menarquia temprana, nuliparidad o embarazo después de los 30 años, menopausia tardía, uso prolongado de anticonceptivos orales y terapia de reemplazo hormonal (McPherson y cols., 2000). Incluso, aproximadamente en el 70% de los cánceres de mama se detectan receptores de estrógenos, por lo que en estos casos los estrógenos se consideran promotores del crecimiento de este tipo de tumor (Rice y Whitehead, 2006).

En las últimas 3 décadas se le ha dado mucha importancia al efecto de la dieta en la etiología del cáncer. En los años setenta, los estudios epidemiológicos evidenciaban que la incidencia de cáncer de mama, próstata y colon era elevada en las poblaciones socioeconómicas más avanzadas. Así, se pensó que la incidencia de cáncer de mama estaba relacionada con la dieta occidental, caracterizada por un consumo alto de grasa total o saturada, carnes y carbohidratos simples (Riboli y Kaaks, 2000). Por otro lado, se indicaba que un consumo mayor de granos, frutas y vegetales conferiría protección contra el cáncer (Gandini y cols., 2000). Es en este contexto donde surge el estudio de los

fitoestrógenos, ya que se observó su posible efecto protector contra el cáncer mamario (Cassidy y cols., 2000).

Muchos estudios epidemiológicos han explorado la asociación entre el consumo dietario de fitoestrógenos, como las isoflavonas y los lignanos, y el riesgo de cáncer de mama. En estudios con mujeres premenopáusicas asiáticas se ha encontrado un efecto protector significativo del consumo de soya, fuente dietaria de isoflavonas, con el riesgo de cáncer de mama (Lee y cols., 2009; Nagata, 2010; Shu y cols., 2009). Mientras que en otros estudios en poblaciones occidentales, no se ha evidenciado relación ni asociación significativa del consumo mayor de isoflavonas y lignanos con la reducción del riesgo de cáncer de mama (Horn-Ross y cols., 2001; Keinan-Boker y cols., 2004; Ward y cols., 2010).

En México, dos estudios de casos-controles evaluaron la relación entre el consumo de alimentos seleccionados que contenían fitoestrógenos y el riesgo de cáncer de mama en mujeres pre y posmenopáusicas. Se encontró un efecto protector (Razón de momios (RM)= 0.27, IC<sub>95</sub> %= 0.16-0.47) del consumo de más de una rebanada de cebolla por día entre mujeres pre y posmenopáusicas sobre el riesgo de cáncer de mama. También se mostró un efecto similar de un consumo mayor ( $\geq 0.5$  taza/semana) de espinacas (RM= 0.44, IC<sub>95</sub> %= 0.20-0.98), pero solamente en mujeres premenopáusicas. Se observó, además, un efecto protector del consumo de los lignanos como el lariciresinol (RM= 0.32, IC<sub>95</sub> %=0.10-0.99) y pinoresinol (RM= 0.19, IC<sub>95</sub> %= 0.06-0.62) pero solamente en mujeres premenopáusicas (Torres-Sanchez y cols., 2009; Torres-Sánchez y cols., 2000).

Utilizando los niveles urinarios de fitoestrógenos, algunos estudios epidemiológicos han evidenciado la asociación protectora entre los fitoestrógenos y el riesgo de cáncer mamario. En un estudio de casos y controles anidado multiétnico, se evaluó la asociación de los niveles urinarios de fitoestrógenos con el riesgo de cáncer mamario en mujeres posmenopáusicas.

Se encontró una reducción significativa del riesgo de cáncer mamario en mujeres japonesas americanas con excreciones mayores de daidzeína urinaria (RM= 0.41, IC<sub>95 %</sub>= 0.19-0.89). Resultados similares se encontraron en mujeres blancas pero con niveles urinarios mayores de ecuol (RM=0.27, IC<sub>95 %</sub>= 0.08-0.95) (Goodman y cols., 2009).

Otro estudio de caso-control analizó las tasas de excreción urinaria de isoflavonas, lignanos y flavonoides de cítricos con el riesgo de cáncer mamario en mujeres chinas. El riesgo de esta neoplasia disminuyó con el incremento de la excreción de isoflavonas y lignanos totales, siendo la RM de 0.62 (IC<sub>95 %</sub>= 0.39-0.99) y 0.40 (IC<sub>95 %</sub>= 0.24-0.64), respectivamente. Además, se observó una asociación protectora en las mujeres con niveles urinarios mayores de isoflavonas y de lignanos (RM= 0.28, IC<sub>95 %</sub>= 0.15-0.50) (Dai y cols., 2002).

En otro estudio epidemiológico se exploró la asociación entre los niveles urinarios de genisteína y enterolactona con el riesgo de cáncer mamario en mujeres posmenopáusicas holandesas y no se encontró relación significativa (den Tonkelaar y cols., 2001). Otro estudio prospectivo realizado en el Reino Unido evaluó la relación entre los niveles urinarios de 7 fitoestrógenos y el riesgo de cáncer de mama. No se encontró asociación entre los niveles urinarios de todas las isoflavonas y aumento en el riesgo de cáncer de mama (Grace y cols., 2004). Resultados similares se encontraron en un estudio donde los niveles urinarios mayores de isoflavonas totales se asociaron con el incremento del riesgo de cáncer mamario (RM= 1.08, IC<sub>95 %</sub>= 1-1.16). También se observó una asociación entre niveles mayores de ecuol en orina y el riesgo del tumor canceroso (RM= 1.07, IC<sub>95 %</sub>= 1.01-1.12) (Ward y cols., 2008).

Con base en lo anterior, actualmente hay controversia sobre los efectos protectores de los fitoestrógenos, ya que en algunos estudios se observa un efecto protector (Dai y cols., 2002; Nagata, 2010; Shu y cols., 2009), pero en otros no (Allred y cols., 2001; Keinan-Boker y cols., 2004; Ward y cols., 2008). Algunos factores que pueden explicar estos resultados inconsistentes son la

cantidad, la forma y la fuente dietaria de los fitoestrógenos consumidos, el tiempo de exposición a estos compuestos, el estado del receptor de estrógenos de los tumores, el estado productor de ecul y el perfil hormonal de los individuos, entre otros (Nagata, 2010).

### Ingestión Dietaria y Excreción Urinaria de los Fitoestrógenos

En los últimos años ha aumentado el interés en los fitoestrógenos debido a sus efectos benéficos percibidos en la salud y a su posible papel en la prevención de enfermedades crónicas (Tham y cols., 1998). Por ello, el consumo habitual y la excreción urinaria de estos compuestos se han estimado en diferentes poblaciones de estudio.

#### **Consumo dietario**

La mayoría de los estudios descriptivos sobre el consumo de fitoestrógenos se han enfocado en poblaciones de países orientales (de Kleijn y cols., 2001). Muy pocos estudios han examinado esta ingestión en la población general occidental. Además, varios estudios (Bandera y cols., 2011; Boker y cols., 2002) disponibles actualmente muestran que el consumo de fitoestrógenos es menor en estas poblaciones que las que siguen una dieta tradicional asiática.

En España, un grupo de investigadores (Hernández-Elizondo y cols., 2009) evaluaron el consumo de fitoestrógenos en mujeres, encontrando que la ingestión promedio fue de 0.89 mg/día. La mayor parte de los fitoestrógenos consumidos fue en forma de lignanos (1.3 mg/día) mientras que la menor fue en forma de isoflavonas (0.12 mg/día).

En mujeres adultas holandesas (Boker y cols., 2002), el consumo promedio total de isoflavonas fue de 0.88 mg/día, el de lignanos de 1.11 mg/día

y el de cumestrol 0.0002 mg/día. Los autores concluyeron que los niveles de ingestión de fitoestrógenos en la población estudiada fueron bajos, pero que son comparables con los niveles de ingestión previamente reportados por otras cohortes occidentales.

En el 2005, Bhakta y colaboradores estimaron la ingestión de fitoestrógenos en mujeres originarias del sur de Asia, pero residentes en Inglaterra. El consumo de isoflavonas ( $0.47 \text{ mg/día} \pm 0.76$ ) fue mayor que el de lignanos ( $0.21 \text{ mg/día} \pm 0.14$ ), siendo la ingestión de fitoestrógenos totales menor de 1 mg/día. Esto es opuesto a los resultados encontrados en mujeres y hombres ingleses, donde el consumo promedio de isoflavonas se estimó en  $7.4 \text{ mg/día} \pm 3.05$  para voluntarios vegetarianos y  $1.2 \text{ mg/día} \pm 0.43$  para aquellos que siguen una dieta omnívora. La ingestión media para el grupo total fue de  $4.5 \pm 1.89 \text{ mg/día}$  (Ritchie y cols., 2006).

En un estudio realizado en mujeres caucásicas postmenopaúsicas en los EUA (de Kleijn y cols., 2001), se estimó un consumo medio de isoflavonas y de lignanos de  $0.76 \pm 4.34 \text{ mg/día}$  y  $0.64 \pm 0.36 \text{ mg/día}$ , respectivamente. Sus principales fuentes fueron las frutas, los frijoles y los chícharos. Los fitoestrógenos más consumidos fueron el secoisolariciresinol ( $0.62 \pm 0.357 \text{ mg/día}$ ) y genisteína ( $0.34 \pm 2.12 \text{ mg/día}$ ). En general, la ingestión dietaria diaria de fitoestrógenos en esta población es de 1 mg. Estos valores son similares a los resultados previamente publicados en poblaciones que no consumen los productos de soya típicos orientales, como los reportados por otros países occidentales. En contraste, el consumo diario de estos compuestos en las dietas orientales, donde la ingestión de isoflavonas es muy elevada, es de 10 a 40 veces mayor. Se ha observado que el consumo de daidzeína y genisteína en mujeres y hombres japoneses fue de 9.5 a 12.1 mg/día y de 14.9 a 19.6 mg/día, respectivamente (Wakai y cols., 1999) y que la ingestión *per cápita* en la población coreana tiene valores similares para el total de isoflavonas y cumestrol de 23.2 mg/día (Surh y cols., 2006). Mientras que la ingestión diaria de

isoflavonas en mujeres chinas residentes de Shangai fue de 40 mg (Chen y cols., 1999).

Sin embargo, los valores del consumo de fitoestrógenos en la población occidental podrían estar subestimados. Aunque el consumo de soya es mínimo en esta población, no se han considerado las fuentes de isoflavonas que pueden estar presentes en la proteína texturizada y aislada de soya utilizada como aditivo en los alimentos procesados como sustitutos de carne, cereales, bollería, imitación de productos lácteos, fórmulas infantiles, entre otros (Patisaul y Jefferson, 2010). Además, la falta de datos en el contenido de lignanos en productos alimenticios podría añadir inexactitudes especialmente cuando se estima la ingestión de fitoestrógenos en poblaciones occidentales. Culturalmente, teóricamente estas poblaciones tienden a consumir más lignanos que las poblaciones orientales ya que sus principales fuentes dietarias son abundantes. De tal manera que el consumo de fitoestrógenos que se ha estimado actualmente podría ser mayor en estas poblaciones.

En México, Galván y colaboradores (2007) estimaron el consumo de algunos fitoestrógenos por cuestionario de frecuencia de consumo en mujeres del estado de Morelos. Se encontró que la media de consumo varió de 1.3  $\mu\text{g/d}$  de matairesinol hasta 29.3 mg/d de flavonoles totales. En nuestro conocimiento, este es el primer estudio que ha evaluado la ingestión de fitoestrógenos en población Mexicana.

### **Niveles urinarios**

Los niveles de fitoestrógenos en orina humana, después de consumirlos, son muy variables entre individuos y poblaciones, incluso intraindividualmente. Aún así, su excreción en la orina podría utilizarse como una medida más exacta de su biodisponibilidad comparada con la estimación dietaria (Dai y cols., 2002).

Algunos estudios muestran que las concentraciones de estos compuestos dietarios y sus metabolitos en la orina dependen de la dosis de su consumo (Karr y cols., 1997), como lo observado en estudios previos, donde existe una clara relación dosis-respuesta. Incluso, algunos estudios (Chen y cols., 1999; Lampe, 2003) sugieren utilizar la excreción urinaria de los fitoestrógenos como un marcador biológico validado del consumo de éstos.

En poblaciones de países occidentales y orientales (Adlercreutz y cols., 1991; Dai y cols., 2002; Kunisue y cols., 2010; Valentin-Blasini y cols., 2005) se ha evaluado el perfil de las isoflavonas y lignanos en orina. Horn-Ross y colaboradores (1997) encontraron que los niveles de lignanos y cumestrol fueron mayores en mujeres blancas en EUA, que en las latinas y las afroamericanas, todas residentes de la misma área. No hubo diferencias estadísticas entre grupos étnicos en los niveles de las isoflavonas totales, a excepción de las cantidades mayores de genisteína entre mujeres latinas.

Otro estudio encontró que las mujeres holandesas excretaron cantidades mayores de lignanos urinarios (den Tonkelaar y cols., 2001) que las mujeres de países orientales. De igual manera, Valentin-Blasini y colaboradores (2005) estimaron la concentración más alta del lignano enterolactona (217 mg/g creatinina) en una población multiétnica de los EUA, mientras que en la población asiática de China (Dai y cols., 2002) y Japón (Yamamoto y cols., 2001) se excretaron cantidades mayores de isoflavonas, principalmente de daidzeína. Así, las concentraciones urinarias de los fitoestrógenos y sus metabolitos muestran diferencias entre los individuos y los grupos étnicos y/o raciales. Se presume que estos niveles pueden variar, dependiendo del metabolismo del individuo, la composición de la dieta, los distintos hábitos alimentarios y las tasas de ingestión de formas libres o conjugadas de fitoestrógenos (Manach y cols., 2005).



## Métodos para Estimar el Consumo Dietario de Fitoestrógenos

La exposición a los fitoestrógenos puede estimarse usando dos métodos diferentes, ya sea directamente por evaluación de la dieta o indirectamente por el uso de biomarcadores en fluidos biológicos como la orina (Grace y cols., 2004).

Algunos autores consideran que los biomarcadores son más confiables debido a las limitaciones en la evaluación de la dieta (Kipnis y cols., 2003), pero su aplicación no es tan factible, en particular en estudios más amplios o para evaluar la exposición en la población general. Además, la medición de biomarcadores en orina o suero es frecuentemente afectada por las diferencias interindividuales en el metabolismo, y al igual que la mayoría de los métodos analíticos usados para la medición de biomarcadores, solo determinan los metabolitos más comunes. A pesar de sus limitaciones, la principal ventaja de los biomarcadores en la evaluación dietaria es que sus errores son realmente aleatorios y no dependen de aquellos involucrados en los cuestionarios dietarios (Bingham, 2002).

Por otro lado, la estimación del consumo diario de fitoestrógenos por evaluación dietaria también es compleja debido al sesgo de memoria y a la falta de tablas y bases de datos completas de composición de alimentos sobre el contenido de fitoestrógenos. Además, la falta de un método conveniente y validado para evaluar su consumo es una limitante para describir el consumo y los posibles efectos saludables de algunos fitoestrógenos consumidos en una población. Por esta razón, se ha pensado que la estimación de los niveles de fitoestrógenos y sus metabolitos en fluidos biológicos, como la orina, podría colaborar como un método alternativo a la evaluación dietaria (Mennen y cols., 2007) cuando la estimación de la ingestión dietaria sea particularmente difícil (Horner y cols., 2002) o también como método estándar de validación de las encuestas dietarias (Bingham, 2002).

## En la dieta

La estimación de fitoestrógenos en la dieta utiliza encuestas dietarias, como el recordatorio de 24 horas y el de frecuencia de consumo de alimentos (CFCA). Entre las encuestas dietarias que se utilizan en estudios de cohorte prospectivo, está el CFCA. Este cuestionario recolecta datos de la frecuencia (día/semana/mes) y la cantidad de consumo de alimentos que son fuentes de nutrimentos; en este caso específico, de los fitoestrógenos (Jaceldo-Siegl y cols., 2008). Así, el cuestionario tiene la ventaja de obtener información del patrón habitual de consumo de alimentos a largo plazo en poblaciones grandes y de la influencia de la variabilidad estacional del alimento (Thompson y Subar, 2001). Sin embargo, la principal limitación de este método es que contiene una gran cantidad de errores de medición, ya que muchos detalles de la ingestión dietaria no son medidos y la estimación de la ingestión no es tan exacta como en el caso de recordatorios de 24 h o registro de alimentos. Es por ello que en los estudios epidemiológicos es esencial que el CFCA utilizado esté validado (Bingham, 2002).

Por otro lado, el recordatorio de 24 h es una buena alternativa para evaluar el consumo actual de la persona y si es aplicado en dos o más ocasiones, puede utilizarse para estimar medias de consumo (Suverza y cols., 2004). La técnica consiste en registrar todos los alimentos y las bebidas que el sujeto consumió durante las 24 h previas a la entrevista. Es un método práctico y barato aunque tiene la desventaja de que los individuos no pueden reportar su consumo exacto de alimentos porque depende de la memoria del encuestado y de la situación de la entrevista. En este caso resulta importante el entrenamiento adecuado de la persona que aplica el recordatorio.

Las encuestas dietarias requieren de la utilización de tablas de composición de alimentos para estimar la ingestión de fitoestrógenos en la dieta, las cuales en muchos casos están limitadas al contenido de fitoestrógenos de

alimentos de distintos países. De manera que, la exactitud de la estimación de la ingestión dietaria de fitoestrógenos está limitada a las restricciones del tipo de encuesta dietaria utilizada y a los problemas relacionados con el establecimiento del contenido de fitoestrógenos en los alimentos. Algunos de estos problemas son que el contenido de fitoestrógenos se modifica dentro de un mismo alimento por la variedad, la localidad y la temporada de cosecha del alimento así como los métodos de procesamiento. En México no existe tal información, sólo un estudio se ha publicado sobre la evaluación dietaria de fitoestrógenos en la dieta mexicana por CFCA utilizando una recopilación de distintas bases de datos publicadas de alimentos fuentes de fitoestrógenos (Galvan-Portillo y cols., 2007). Es por ello que la medición de fitoestrógenos en muestras biológicas podría representar una alternativa para estimar la exposición del humano a estos compuestos.

Sonora es un estado con características demográficas, económicas y sociales, distintas respecto a otros estados del país, que tienen un impacto en la dieta y en la salud de la población (Valencia y cols., 1998). La dieta de la población sonoreNSE se caracteriza por un consumo habitual de productos de origen animal y sus derivados, leguminosas, cereales, papa, plátano, manzana, café y refrescos embotellados (González, 2008). En cambio, a pesar del aumento en el consumo de frutas y vegetales en relación con un estudio de Valencia y colaboradores realizado en 1998, la población sigue teniendo consumos bajos de frutas y vegetales. No se conoce el consumo de fitoestrógenos en la población sonoreNSE. Sin embargo, con base en el patrón de alimentos característicos de la dieta, se podría suponer que el consumo de fitoestrógenos y por tanto su excreción urinaria en la población sonoreNSE son bajos.

## En orina

Los precursores y metabolitos de los fitoestrógenos pueden ser fácilmente medidos en la orina humana. La sencillez de la medición se debe a que los fitoestrógenos, en general, se encuentran en concentraciones relativamente altas (Jaceldo-Siegl y cols., 2008). Además, la estimación de sus niveles en la orina no depende de la información obtenida de las encuestas dietarias. Tampoco utiliza las tablas de composición de alimentos (incompletas) para estimarlos. Por tanto, el uso de orina, como biomarcador de la dieta, puede presentar mayores ventajas que las encuestas dietarias.

La principal ventaja de usar marcadores bioquímicos de la ingestión de alimentos en la evaluación dietaria, es que las fuentes posibles de error aleatorio presentes en éstos son diferentes de las mediciones del CFCA (Jenab y cols., 2009). Por lo tanto, es razonable suponer que los errores son independientes entre las dos mediciones.

Pocos son los biomarcadores dietarios que dan una referencia validada de medición, como la excreción de nitrógeno en orina de 24 h. Sin embargo, algunos biomarcadores por lo general no proporcionan una escala de referencia válida de medición, pero podrían aportar evidencia de la exactitud de las mediciones del cuestionario solamente en la forma de una correlación lineal adicional (Kaaks, 1997).

Por otro lado, para la detección y cuantificación de los niveles urinarios de fitoestrógenos se utilizan técnicas analíticas sensibles y específicas. Éstas incluyen a la cromatografía de gases y cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas, principalmente (Lampe y cols., 2006). También se utilizan otras técnicas cromatográficas más sensibles, como la cromatografía de gases por dilución isotópica y cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS) (Knust y cols., 2006; Ward y cols.,

2008). Entre todas las técnicas mencionadas anteriormente, la del HPLC-MS tiene mayores ventajas; es un método menos laborioso que el GC-MS ya que no requiere derivatización, por lo tanto resulta un mayor rendimiento. Además, esta técnica presenta buena selectividad, sensibilidad, precisión y rapidez para la detección cuantitativa de fitoestrógenos en orina de humanos con límites de detección en intervalo de bajas partes por billón (CDC, 2005).

### Algunos Estudios de Correlación del Consumo de Fitoestrógenos con la Excreción Urinaria de sus Metabolitos

De acuerdo a diversos estudios, el consumo de alimentos ricos en isoflavonas, estimado por encuestas dietarias, se correlaciona con sus concentraciones en la orina en una manera dosis-respuesta en poblaciones asiáticas (Adlercreutz y cols., 1991) y occidentales.

Las correlaciones obtenidas entre las estimaciones de la ingestión de fitoestrógenos por evaluación dietaria y su excreción urinaria son diversas. Esta variabilidad depende del metabolismo del individuo, del consumo de fuentes dietarias de fitoestrógenos, de los errores de medición en la evaluación dietaria y del método de recolección de muestra de orina (Maskarinec y cols., 1998). Por ejemplo, las correlaciones significativas de isoflavonas en poblaciones occidentales son menores (0.20-0.30) (Grace y cols., 2004) que las observadas en las poblaciones orientales (0.42-0.54) (Lee y cols., 2007). Esta diferencia puede deberse a un consumo menor de soya, fuente dietaria de isoflavonas.

Otro estudio en una población occidental multiétnica, evidenció una correlación mayor por cuestionarios de recordatorios de 24 horas que por los de frecuencia de consumo de alimentos (Jaceldo-Siegl y cols., 2008). Se ha observado que existen correlaciones aceptables entre un cuestionario de frecuencia y muestras de orina de 24 horas. Tseng y colaboradores en el 2008 encontraron que la ingestión de daidzeína y genisteína, estimada a partir de

CFCA, se correlacionó (0.48-54) con su excreción en las muestras de orina de 24 horas. Incluso, estas isoflavonas medidas en múltiples muestras de orina durante la noche (12 h) presentaron una correlación fuerte (0.61-0.93) con sus correspondientes medidas en muestras de orina de 24 horas.

En un estudio realizado en Canadá con mujeres adultas (French y cols., 2007) se estimó una asociación mayor ( $r=0.64$ ,  $p<0.001$ ) de la ingestión reciente de isoflavonas con sus metabolitos urinarios que con el consumo habitual ( $r=0.54$ ,  $p=0.004$ ). De la misma manera, la excreción urinaria de lignanos se correlacionó con su ingestión reciente ( $r=0.46$ ,  $p=0.02$ ) y habitual ( $r=0.40$ ,  $p=0.05$ ).

En general, la relación entre el consumo y los niveles urinarios de isoflavonas parecen ser mayores en poblaciones con un consumo alto de isoflavonas y variaciones importantes en la ingestión (Atkinson y cols., 2002; Maskarinec y cols., 1998).

En comparación a las isoflavonas, la variabilidad entre los niveles urinarios de los lignanos y la ingestión dietaria puede explicarse por otros factores, según estudios observacionales. Entre los factores más importantes están el uso de antibióticos orales, el consumo de fibra dietaria, independientemente de su contenido de lignanos, y el tiempo de tránsito de material a través del intestino grueso. Así, los factores que afectan las concentraciones de lignanos en la orina están relacionados en buena medida con la alteración de la microflora bacteriana (Lampe y cols., 2006).

## JUSTIFICACIÓN

Diversos estudios experimentales (Adlercreutz y cols., 1993; Adlercreutz y cols., 1992; Santell y cols., 1997) y clínicos (Clarkson, 2002; Messina y cols., 1994) sugieren que el consumo de una dieta rica en isoflavonas está asociado con la reducción en el riesgo de algunas enfermedades crónicas como el cáncer de mama y próstata, la osteoporosis y las enfermedades cardiovasculares. Sin embargo, no hay evidencia significativa de una asociación fuerte en estudios observacionales y poblacionales (Kreijkamp-Kaspers y cols., 2004; Steinberg y cols., 2003). Los beneficios saludables del resto de los fitoestrógenos son poco concluyentes. En México, la investigación al respecto es escasa, sólo un estudio de caso-control ha evaluado la relación de la ingestión de estos componentes dietarios con el riesgo de cáncer de mama (Torres-Sanchez y cols., 2009).

Para evaluar de una manera más precisa los posibles efectos saludables de los fitoestrógenos, en estudios de dieta y riesgo de enfermedad, es necesario estimar la ingestión de estos compuestos en la dieta de la población mexicana, ya sea de manera directa mediante encuestas dietarias o indirectamente por el monitoreo de sus niveles en la orina. No obstante, ambos métodos de medición disponibles presentan sus ventajas y desventajas. La evaluación dietaria en grandes poblaciones puede ser costosa y complicada pero es necesaria en la epidemiología nutricional. El instrumento más práctico en estudios prospectivos es un CFCA validado, por tanto, es importante evaluar el grado en el cual el cuestionario puede medir la ingestión verdadera (Willett y Lenart, 1998). Por otro lado, la medición de los fitoestrógenos y sus metabolitos en la orina podría estimar la ingestión dietaria de estos compuestos. Así, la selección del método apropiado dependerá de las características del diseño del estudio epidemiológico y la disponibilidad de recursos.

Actualmente, muchas investigaciones han evaluado el grado de asociación del consumo de fitoestrógenos con la excreción urinaria de sus metabolitos en diferentes poblaciones étnicas (Horn-Ross y cols., 2006; Nurmi y cols., 2010). Sin embargo, no hay tal información para la población mexicana.

Este es el primer estudio en México que investiga la asociación del consumo de fitoestrógenos con sus concentraciones en orina. Los resultados de este estudio servirán como base para investigaciones futuras en México que apoyen los estudios que pretenden identificar la función de los fitoestrógenos en la protección o reducción del riesgo de algunas enfermedades crónicas en la población.

## **HIPÓTESIS**

La estimación del consumo reciente, como recordatorio de 24 h, y habitual, como frecuencia de consumo, de fitoestrógenos, se correlaciona directamente con sus niveles excretados en orina, en mujeres hermosillenses saludables.



## OBJETIVO

### General

Evaluar la correlación entre los fitoestrógenos consumidos en la dieta y los analizados en la orina de mujeres aparentemente sanas mayores de 25 años de Hermosillo, Sonora.

### Específicos

- 1.- Estimar la ingestión dietaria de fitoestrógenos por un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos y un recordatorio de 24 horas, utilizando las tablas de composición de alimentos, en 100 mujeres hermosillenses saludables.
- 2.- Medir la concentración de 16 fitoestrógenos (matairesinol, secoisolariciresinol, enterolactona, enterodiol, genisteína, daidzeína, ecul, gliciteína, formononetina, biocanina A, cumestrol, naringenina, luteolina, kaempferol, quercetina y resveratrol) en muestras de orina de las mujeres por cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas.
- 3.- Evaluar la posible asociación entre los fitoestrógenos consumidos en la dieta de las mujeres participantes del estudio y sus niveles urinarios correspondientes.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adlercreutz H, Bannwart C, Wahala K, Makela T, Brunow G, Hase T, cols. Inhibition of human aromatase by mammalian lignans and isoflavonoid phytoestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1993;44:147 - 53.
- Adlercreutz H, Honjo H, Higashi A, Fotsis T, Hamalainen E, Hasegawa T, cols. Urinary excretion of lignans and isoflavonoid phytoestrogens in Japanese men and women consuming a traditional Japanese diet. *Am J Clin Nutr.* 1991;54(6):1093-100.
- Adlercreutz H, Mazur W. Phyto-oestrogens and Western diseases. *Ann Med* 1997;29(2):95-120.
- Adlercreutz H, Mousavi Y, Clark J, Höckerstedt K, Hämäläinen E, Wähälä K, cols. Dietary phytoestrogens and cancer: in vitro and in vivo studies. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1992;41(3-8):331-7.
- Allred CD, Ju YH, Allred KF, Chang J, Helferich WG. Dietary genistin stimulates growth of estrogen-dependent breast cancer tumors similar to that observed with genistein. *Carcinogenesis.* 2001;22(10):1667-73.
- Anderson JJB, Anthony M, Messina M, Garne SC. Effects of phyto-oestrogens on tissues. *Nutr Res Rev.* 1999;12(01):75-116.
- Arjmandi BH. The Role of Phytoestrogens in the Prevention and Treatment of Osteoporosis in Ovarian Hormone Deficiency. *J Am Coll Nutr.* 2001;20(suppl 5):398S-402S.
- Atkinson C, Skor HE, Fitzgibbons ED, Scholes D, Chen C, Wähälä K, cols. Overnight Urinary Isoflavone Excretion in a Population of Women Living in the United States, and Its Relationship to Isoflavone Intake. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002;11(3):253-60.
- Bandera EV, King M, Chandran U, Paddock LE, Rodriguez-Rodriguez L, Olson SH. Phytoestrogen consumption from foods and supplements and epithelial ovarian cancer risk: a population-based case control study. *BMC Women's Health.* 2011;11(40).
- Bhakta D, dos Santos Silva I, Higgins C, Sevak L, Kassam-Khamis T, Mangtani P, cols. A Semiquantitative Food Frequency Questionnaire Is a Valid Indicator of the Usual Intake of Phytoestrogens by South Asian Women in the UK Relative to Multiple 24-h Dietary Recalls and Multiple Plasma Samples. *J Nutr.* 2005;135(1):116-23.
- Bhathena SJ, Velasquez MT. Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes. *Am J Clin Nutr.* 2002;76(6):1191-201.
- Bingham SA. Biomarkers in nutritional epidemiology. *Public Health Nutr.* 2002;5(6A):821-7.

- Boker LK, Van der Schouw YT, De Kleijn MJJ, Jacques PF, Grobbee DE, Peeters PHM. Intake of Dietary Phytoestrogens by Dutch Women. *J Nutr.* 2002;132(6):1319-28.
- Brzezinski A, Debi A. Phytoestrogens: the "natural" selective estrogen receptor modulators? *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 1999;85:47 - 51.
- Cassidy A, Hanley B, Lamuela-Raventos RM. Isoflavones, lignans and stilbenes – origins, metabolism and potential importance to human health. *J Sci Food Agric.* 2000;80(7):1044-62.
- CDC. Centers for Disease Control and Prevention. Laboratory procedure manual. National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals. Atlanta GA. 2005.
- Chen Z, Zheng W, Custer LJ, Dai Q, Shu XO, Jin F, cols. Usual dietary consumption of soy foods and its correlation with the excretion rate of isoflavonoids in overnight urine samples among Chinese women in shanghai. *Nutr Cancer.* 1999;33(1):82-7.
- Clarkson TB. Soy, Soy Phytoestrogens and Cardiovascular Disease. *J Nutr.* 2002;132(3):566S-9S.
- Clavel T, Henderson G, Alpert C-A, Philippe C, Rigottier-Gois L, Dore J, cols. Intestinal Bacterial Communities That Produce Active Estrogen-Like Compounds Enterodiol and Enterolactone in Humans. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71(10):6077-85.
- COT. Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment. Phytoestrogens and Health [Internet]. London: Food Standard Agency; 2003 [Consultado 01 Mayo, 2010]; Disponible en: <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/phytoreport0503>.
- Cotterchio M, Boucher B, Kreiger N, Mills C, Thompson L. Dietary phytoestrogen intake—lignans and isoflavones—and breast cancer risk (Canada). *Cancer Causes Control.* 2008;19(3):259-72.
- Dai Q, Franke AA, Jin F, Shu X-O, Hebert JR, Custer LJ, cols. Urinary Excretion of Phytoestrogens and Risk of Breast Cancer among Chinese Women in Shanghai. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2002;11(9):815-21.
- Day AJ, Cañada FJ, Díaz JC, Kroon PA, McLauchlan R, Faulds CB, cols. Dietary flavonoid and isoflavone glycosides are hydrolysed by the lactase site of lactase phlorizin hydrolase. *FEBS (Fed Eur Biochem Soc) Lett.* 2000;468(2):166-70.
- de Kleijn MJJ, van der Schouw YT, Wilson PWF, Adlercreutz H, Mazur W, Grobbee DE, cols. Intake of Dietary Phytoestrogens Is Low in Postmenopausal Women in the United States: The Framingham Study. *J Nutr.* 2001;131(6):1826-32.
- den Tonkelaar I, Keinan-Boker L, Van't Veer P, Arts CJM, Adlercreutz H, Thijssen JHH, cols. Urinary Phytoestrogens and Postmenopausal Breast Cancer Risk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2001;10(3):223-8.
- Dixon RA. Phytoestrogens. *Annu Rev Plant Biol.* 2004;55(1):225-61.

- Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008, v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Base de datos en Internet]. Lyon France: International Agency for Research on Cancer; 2010. [Consultado 28 Abril, 2010]. Disponible en: <http://globocan.iarc.fr>
- Flores-Luna L, Salazar-Martínez E, Duarte-Torres RM, Torres-Mejía G, Alonso-Ruíz P, Lazcano-Ponce E. Factores pronósticos relacionados con la supervivencia del cáncer de mama. *Salud Pub Mex.* 2008;50(2):119-25.
- Franke AA, Custer LJ, Cerna CM, Narala K. Rapid HPLC analysis of dietary phytoestrogens from legumes and from human urine. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1995;208(1):18-26.
- French MR, Thompson LU, Hawker GA. Validation of a Phytoestrogen Food Frequency Questionnaire with Urinary Concentrations of Isoflavones and Lignan Metabolites in Premenopausal Women. *J Am Coll Nutr.* 2007;26(1):76-82.
- Galvan-Portillo MV, Wolff MS, Torres-Sánchez LE, López-Cervantes M, López-Carrillo L. Assessing phytochemical intake in a group of Mexican women. *Salud Pub Mex.* 2007;49:126-31.
- Gandini S, Merzenich H, Robertson C, Boyle P. Meta-analysis of studies on breast cancer risk and diet: the role of fruit and vegetable consumption and the intake of associated micronutrients. *Eur J Cancer.* 2000;36(5):636-46.
- González LE. Cambios en el patrón de consumo de alimentos y su relación con riesgo de enfermedades crónicas en la población sonorenses [Tesis Maestría]. Hermosillo, Sonora: Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.; 2008.
- Goodman MT, Shvetsov YB, Wilkens LR, Franke AA, Le Marchand L, Kakazu KK, cols. Urinary Phytoestrogen Excretion and Postmenopausal Breast Cancer Risk: The Multiethnic Cohort Study. *Cancer Prev Res.* 2009;2(10):887-94.
- Grace PB, Taylor JI, Low Y-L, Luben RN, Mulligan AA, Botting NP, cols. Phytoestrogen Concentrations in Serum and Spot Urine as Biomarkers for Dietary Phytoestrogen Intake and Their Relation to Breast Cancer Risk in European Prospective Investigation of Cancer and Nutrition-Norfolk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13(5):698-708.
- Hernández-Elizondo J, Mariscal-Arcas M, Rivas A, Feriche B, Velasco J, Olea-Serrano F. Estimación de la ingesta de fitoestrógenos en población femenina. *Nutr Hosp.* 2009;24(4):445-51.
- Hong Y-H, Wang S-c, Hsu C, Lin B-F, Kuo Y-H, Huang C-j. Phytoestrogenic Compounds in Alfalfa Sprout (*Medicago sativa*) beyond Coumestrol. *J Agr Food Chem.* 2010;59(1):131-7.
- Horn-Ross PL, Barnes S, Lee VS, Collins CN, Reynolds P, Lee MM, cols. Reliability and validity of an assessment of usual phytoestrogen consumption (United States). *Cancer Causes and Control.* 2006;17:85-93.

- Horn-Ross PL, John EM, Lee M, Stewart SL, Koo J, Sakoda LC, cols. Phytoestrogen Consumption and Breast Cancer Risk in a Multiethnic Population. *Am J Epidemiol*. 2001;154(5):434-41.
- Horn-Ross PL, Barnes S, Kirk M, Coward L, Parsonnet J, Hiatt RA. Urinary phytoestrogen levels in young women from a Multiethnic population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1997;6:339-45.
- Horner NK, Patterson RE, Neuhaus ML, Lampe JW, Beresford SA, Prentice RL. Participant characteristics associated with errors in self-reported energy intake from the women's Health Initiative food-frequency questionnaire. *Am J Clin Nutr*. 2002; 76:766-73.
- Hsieh C-Y, Santell RC, Haslam SZ, Helferich WG. Estrogenic Effects of Genistein on the Growth of Estrogen Receptor-positive Human Breast Cancer (MCF-7) Cells in Vitro and in Vivo. *Cancer Res*. 1998;58(17):3833-8.
- INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. Estadísticas vitales. Versión actual 2007. Internet: <http://www.inegi.org.mx/inegi/default.aspx?s=est&c=10960>. [www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/.../cancer10.doc](http://www.inegi.org.mx/inegi/contenidos/espanol/.../cancer10.doc). (consultado el 27 de abril 2010). 2007.
- Jaceldo-Siegl K, Fraser GE, Chan J, Franke A, Sabaté J. Validation of soy protein estimates from a food-frequency questionnaire with repeated 24-h recalls and isoflavonoid excretion in overnight urine in a Western population with a wide range of soy intakes. *Am J Clin Nutr*. 2008;87(5):1422-7.
- Jenab M, Slimani N, Bictash M, Ferrari P, Bingham S. Biomarkers in nutritional epidemiology: applications, needs and new horizons. *Human Genetics*. 2009;125(5):507-25.
- Joannou GE, Kelly GE, Reeder AY, Waring M, Nelson C. A urinary profile study of dietary phytoestrogens. The identification and mode of metabolism of new isoflavonoids. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1995;54(3-4):167-84.
- Kaaks R. Biochemical markers as additional measurements in studies of the accuracy of dietary questionnaire measurements: conceptual issues. *The American Journal of Clinical Nutrition*. 1997;65(4):1232S-9S.
- Karr S, Lampe J, Hutchins A, Slavin J. Urinary isoflavonoid excretion in humans is dose dependent at low to moderate levels of soy-protein consumption. *Am J Clin Nutr*. 1997;66(1):46-51.
- Keinan-Boker L, van Der Schouw YT, Grobbee DE, Peeters PH. Dietary phytoestrogens and breast cancer risk. *Am J Clin Nutr*. 2004;79(2):282-8.
- Kelly G, Nelson C, Waring M, Joannou G, Reeder A. Metabolites of dietary (soya) isoflavones in human urine. *Clin Chim Acta*. 1993;223(1-2):9-22.
- Kelly GS. Quercetin. *Alternative Medicine Review*. 2011;16(2):172-94.
- King RE, Bomser JA, Min DB. Bioactivity of Resveratrol. *Comprehensive Food Science and Food Safety*. 2006;5:65-70.

- Kipnis V, Subar AF, Midthune D, Freedman LS, Ballard-Barbash R, Troiano RP, cols. Structure of Dietary Measurement Error: Results of the OPEN Biomarker Study. *Am J Epidemiol.* 2003;158(1):14-21.
- Knust U, Hull WE, Spiegelhalder B, Bartsch H, Strowitzki T, Owen RW. Analysis of enterolignan glucuronides in serum and urine by HPLC-ESI-MS. *Food and Chemical Toxicology.* 2006;44(7):1038-49.
- Kreijkamp-Kaspers S, Kok L, Grobbee DE, de Haan EHF, Aleman A, Lampe JW, cols. Effect of Soy Protein Containing Isoflavones on Cognitive Function, Bone Mineral Density, and Plasma Lipids in Postmenopausal Women. *JAMA.* 2004;292(1):65-74.
- Kuhnle GGC, Dell'Aquila C, Aspinnall SM, Runswick SA, Mulligan AA, Bingham SA. Phytoestrogen Content of Foods of Animal Origin: Dairy Products, Eggs, Meat, Fish, and Seafood. *J Agr Food Chem.* 2008;56(21):10099-104.
- Kunisue T, Tanabe S, Isobe T, Aldous KM, Kannan K. Profiles of Phytoestrogens in Human Urine from Several Asian Countries. *J Agric Food Chem.* 2010;58(17):9838-46.
- Kurzer MS, Xu X. Dietary phytoestrogens. *Annu Rev Nutr.* 1997;17(1):353-81.
- Lampe J, Atkinson C, Hullar M. Assessing exposure to lignans and their metabolites in humans. *J AOAC Int.* 2006;89(4):1174-81.
- Lampe JW. Isoflavonoid and Lignan Phytoestrogens as Dietary Biomarkers. *J Nutr.* 2003 March 1, 2003;133(3):956S-64S.
- Lee S-A, Shu X-O, Li H, Yang G, Cai H, Wen W, cols. Adolescent and adult soy food intake and breast cancer risk: results from the Shanghai Women's Health Study. *Am J Clin Nutr.* 2009 June 1, 2009;89(6):1920-6.
- Lee S-A, Wen W, Xiang Y-B, Barnes S, Liu D, Cai Q, cols. Assessment of Dietary Isoflavone Intake among Middle-Aged Chinese Men. *J Nutr.* 2007;137(4):1011-6.
- López-Luengo MT. Fitoestrógenos *Fitoterapia OFFARM.* 2002;2(8):136-40.
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr.* 2005;81(1):230S-42.
- Maskarinec G, Singh S, Meng L, Franke AA. Dietary soy intake and urinary isoflavone excretion among women from a multiethnic population. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998;7(7):613-9.
- Mazur W, Adlercreutz H. Natural and anthropogenic environmental oestrogens: the scientific basis for risk assessment. *Pure & Appl Chem.* 1998;70(9):1759-76.
- McPherson K, Steel CM, Dixon JM. ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics. *Brit Med J.* 2000;321(7261):624-8.
- Mennen LI, Sapinho D, Ito H, Galan P, Hercberg S, Scalbert A. Urinary excretion of 13 dietary flavonoids and phenolic acids in free-living healthy subjects -

- variability and possible use as biomarkers of polyphenol intake. *Eur J Clin Nutr.* 2007;62(4):519-25.
- Mense SM, Hei TK, Ganju RK, Bhat HK. Phytoestrogens and Breast Cancer Prevention: Possible Mechanisms of Action. *Environmental Health Perspectives.* 2008;116(4):426-33.
- Messina MJ, Persky V, Setchell KDR, Barnes S. Soy intake and cancer risk: A review of the in vitro and in vivo data. *Nutr Cancer.* 1994;21(2):113-31.
- Milder IEJ, Feskens EJM, Arts ICW, de Mesquita HBB, Hollman PCH, Kromhout D. Intake of the Plant Lignans Secoisolariciresinol, Matairesinol, Lariciresinol, and Pinoresinol in Dutch Men and Women. *J Nutr.* 2005;135(5):1202-7.
- Mueller SO, Simon S, Chae K, Metzler M, Korach KS. Phytoestrogens and Their Human Metabolites Show Distinct Agonistic and Antagonistic Properties on Estrogen Receptor  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and ER $\beta$  in Human Cells. *Toxicol Sci.* 2004;80(1):14-25.
- Muñoz EC, Sánchez-Castillo CP, Bourges H. Recomendaciones de ingestión de nutrimentos para la población mexicana, bases fisiológicas Tomo II Mexico: Medica panamericana; 2005. Isoflavonas; p. 351-9.
- Nagata C. Factors to Consider in the Association Between Soy Isoflavone Intake and Breast Cancer Risk. *J Epidemiol.* 2010;20(2):83-9.
- Nurmi T, Mursu J, Peñalvo J, Poulsen H, Voutilainen S. Dietary intake and urinary excretion of lignans in Finnish men. *Br J Nutr.* 2010;103(5):677-85.
- Palacio-Mejía L, Lazcano-Ponce E, Allen-Leigh B, Hernández-Ávila M. Diferencias regionales en la mortalidad por cáncer de mama y cérvix en México entre 1979 y 2006. *Salud Pub Mex.* 2009;51(supl 2):S208-S19.
- Patisaul HB, Jefferson W. The pros and cons of phytoestrogens. *Front Neuroendocrinol.* 2010;31(4):400-19.
- Peñalvo JL, Heinonen S-M, Aura A-M, Adlercreutz H. Dietary Sesamin Is Converted to Enterolactone in Humans. *J Nutr.* 2005;135(5):1056-62.
- Riboli E, Kaaks R. Invited Commentary: The Challenge of Multi-Center Cohort Studies in the Search for Diet and Cancer Links. *Am J Epidemiol.* 2000;151(4):371-4.
- Rice S, Whitehead SA. Phytoestrogens and breast cancer –promoters or protectors? *Endocr-Relat Cancer.* 2006;13(4):995-1015.
- Ritchie M, Cummings J, Morton M, Michael Steel C, Bolton-Smith C, Riches A. A newly constructed and validated isoflavone database for the assessment of total genistein and daidzein intake. *Br J Nutr.* 2006;95(1):204-13.
- Santell RC, Chang YC, Nair MG, Helferich WG. Dietary Genistein Exerts Estrogenic Effects upon the Uterus, Mammary Gland and the Hypothalamic/Pituitary Axis in Rats. *J Nutr.* 1997;127(2):263-9.
- Setchell K. Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones. *Am J Clin Nutr.* 1998;68(6):1333S-46S.
- Setchell KDR, Brown NM, Desai P, Zimmer-Nechemias L, Wolfe BE, Brashear WT, cols. Bioavailability of Pure Isoflavones in Healthy Humans and

- Analysis of Commercial Soy Isoflavone Supplements. *J Nutr.* 2001;131(4):1362S-75.
- Shu XO, Zheng Y, Cai H, Gu K, Chen Z, Zheng W, cols. Soy Food Intake and Breast Cancer Survival. *JAMA.* 2009;302(22):2437-43.
- Steinberg FM, Guthrie NL, Villablanca AC, Kumar K, Murray MJ. Soy protein with isoflavones has favorable effects on endothelial function that are independent of lipid and antioxidant effects in healthy postmenopausal women. *Am J Clin Nutr.* 2003;78(1):123-30.
- SUIVE. Sistema Único de Información para la Vigilancia Epidemiológica/Dirección General de Epidemiología/SSA 2008 [Consultado Noviembre, 2010]; Disponible en: <http://www.dgepi.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>.
- Surh J, Kim M-J, Koh E, Kim Y-KL, Kwon H. Estimated intakes of isoflavones and coumestrol in Korean population. *Int J Food Sci Nutr.* 2006;57(5-6):325-44.
- Suverza A, Salinas A, Perichart O. Historia clínico-nutricional [Internet]. Ciudad de México: Universidad Iberoamericana; 2004; Disponible en: [http://www.uia.mx/campus/publicaciones/clinica\\_nutric/pdf/Documentonormativo.pdf](http://www.uia.mx/campus/publicaciones/clinica_nutric/pdf/Documentonormativo.pdf).
- Tham D, Gardner C, Haskell W. Clinical review 97: Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence. *J Clin Endocrinol Metab.* 1998;83:2223 - 35.
- Thompson FE, Subar AF. Capítulo 1, Dietary Assessment Methodology Nutrition in the prevention and treatment of disease [Internet]. San Diego, CA: Academic Press; 2001 [Consultado 12 Abril, 2010]; Disponible en: [http://riskfactor.cancer.gov/diet/adi/thompson\\_subar\\_dietary\\_assessment\\_methodology.pdf](http://riskfactor.cancer.gov/diet/adi/thompson_subar_dietary_assessment_methodology.pdf).
- Torres-Sanchez, Galvan-Portillo M, Wolff MS, Lopez-Carrillo L. Dietary consumption of phytochemicals and breast cancer risk in Mexican women. *Public Health Nutr.* 2009;12(6):825-31.
- Torres-Sánchez L, López-Carrillo L, López-Cervantes M, Rueda-Neria C, Wolff MS. Food Sources of Phytoestrogens and Breast Cancer Risk in Mexican Women. *Nutr Cancer.* 2000;37(2):134-9.
- Tseng M, Olufade T, Kurzer MS, Wahala K, Fang CY, van der Schouw YT, cols. Food frequency questionnaires and overnight urines are valid indicators of daidzein and genistein intake in U.S. women relative to multiple 24-h urine samples. *Nutr Cancer.* 2008;60(5):619-26.
- USDA. United States Department of Agriculture, Agriculture Research Service. 2007. USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods, Release 2.1 [Base de datos en Internet]. Nutriente Data Laboratory. 2007 [Consultado 11 Junio, 2011]. Disponible en: <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata>.



- Valencia ME, Hoyos LC, Ballesteros MN, Ortega MI, Palacios MR, Atondo JL. La dieta en Sonora: canasta de consumo de alimentos. *Revista Estudios Sociales*. 1998;VIII(15):11-33.
- Valentin-Blasini L, Blount BC, Caudill SP, Needham LL. Urinary and serum concentrations of seven phytoestrogens in a human reference population subset. *J Expo Anal Environ Epidemiol*. 2003;13(4):276-82.
- Valentin-Blasini L, Sadowski MA, Walden D, Calabiano L, Needham LL, Barr DB. Urinary phytoestrogen concentrations in the U.S. population (1999-2000). *J Expo Anal Environ Epidemiol*. 2005;15(6):509-23.
- Velentzis LS, Cantwell MM, Cardwell C, Keshtgar MR, Leathem AJ, Woodside JV. Lignans and breast cancer risk in pre- and post-menopausal women: meta-analyses of observational studies. *Br J Cancer*. 2009;100(9):1492-8.
- Wakai K, Egami I, Kato K, Kawamura T, Tamakoshi A, Lin Y, cols. Dietary Intake and Sources of Isoflavones Among Japanese. *Nutr Cancer*. 1999;33(2):139-45.
- Wang C-C, Prasain JK, Barnes S. Review of the methods used in the determination of phytoestrogens. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*. 2002;777(1-2):3-28.
- Wang H, Murphy PA. Isoflavone Content in Commercial Soybean Foods. *J Agr Food Chem*. 1994;42(8):1666-73.
- Wang L, Meselhy M, Li Y, Qin G, Hattori M. Human intestinal bacteria capable of transforming secoisolariciresinol diglucoside to mammalian lignans, enterodiol and enterolactone. *Chem Pharm Bull*. 2000 48(11):1606-10.
- Ward H, Chapelais G, Kuhnle G, Luben R, Khaw K-T, Bingham S. Breast cancer risk in relation to urinary and serum biomarkers of phytoestrogen exposure in the European Prospective into Cancer-Norfolk cohort study. *Breast Cancer Res*. 2008;10(2):R32.
- Ward HA, Kuhnle GG, Mulligan AA, Lentjes MA, Luben RN, Khaw K-T. Breast, colorectal, and prostate cancer risk in the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition–Norfolk in relation to phytoestrogen intake derived from an improved database. *Am J Clin Nutr*. 2010;91(2):440-8.
- Ward HA, Kuhnle GGC. Phytoestrogen consumption and association with breast, prostate and colorectal cancer in EPIC Norfolk. *Arch Biochem Biophys*. 2010;501(1):170-5.
- Whitten P, Patisaul H. Cross-species and interassay comparisons of phytoestrogen action. *Environ Health Perspect*. 2001;109(Suppl 1):5-20.
- WHO/FAO. Diet, nutrition and the prevention of chronic diseases: report of a joint WHO/FAO expert consultation. Technical Report Series 916 Geneva: World Health Organization [Internet]. 2002 [Consultado Abril 25, 2010]; Disponible en: [http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO\\_TRS\\_916.pdf](http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_916.pdf)
- Willett W, Lenart E. Reproducibility and validity of food-frequency questionnaires. In: Willett W, ed. *Nutritional epidemiology*. 2nd ed. New York, NY: Oxford University Press. 1998:101-47.

- Wylie-Rosett J. Menopause, micronutrients, and hormone therapy. *Am J Clin Nutr.* 2005;81(5):1223S-31S.
- Yamamoto S, Sobue T, Sasaki S, Kobayashi M, Arai Y, Uehara M, cols. Validity and Reproducibility of a Self-Administered Food-Frequency Questionnaire to Assess Isoflavone Intake in a Japanese Population in Comparison with Dietary Records and Blood and Urine Isoflavones. *J Nutr.* 2001;131(10):2741-7.
- Yang CS, Landau JM, Huang M-T, Newmark HL. Inhibition of carcinogenesis by dietary poliphenolic compounds. *Annu Rev Nutr.* 2001;21(1):381-406.
- Yousef MI, Kamel KI, Esmail AM, Baghdadi HH. Antioxidant activities and lipid lowering effects of isoflavone in male rabbits. *Food Chem Toxicol.* 2004;42(9):1497-503.

## CAPÍTULO I

### ASOCIACIÓN DEL CONSUMO DE FITOESTRÓGENOS ESTIMADOS POR RECORDATORIO DE 24 HORAS CON SUS CORRESPONDIENTES CONCENTRACIONES URINARIAS EN MUJERES DEL NOROESTE DE MÉXICO

#### RESUMEN

**Objetivo:** Evaluar la asociación entre el consumo de fitoestrógenos estimados por un recordatorio de 24 horas y las concentraciones en orina de 12 h. **Sujetos y métodos:** Mujeres mayores de 25 años, aparentemente saludables, de Hermosillo, Sonora respondieron a un recordatorio de 24 h, después de la recolección de orina de 12 h. Los fitoestrógenos y sus metabolitos en la orina se extrajeron por extracción líquido-líquido y se analizaron por HPLC-ES-MS. **Resultados:** Se obtuvieron correlaciones significativas del consumo de fitoestrógenos a nivel grupal con sus concentraciones urinarias respectivas. Después de corregir, por la variación intraindividual, genisteína y naringenina obtuvieron una correlación de 0.37 ( $p < 0.05$ ), y 0.62 ( $p < 0.05$ ). Las isoflavonas totales, lignanos totales y fitoestrógenos totales mostraron correlaciones significativas ( $p < 0.001$ ) de 0.46, 0.55 y 0.41, respectivamente. **Conclusión:** Estos resultados indican que, al menos en la población estudiada, los niveles urinarios de naringenina, isoflavonas, lignanos y fitoestrógenos totales podrían ser utilizados como marcadores de su ingestión dietaria reciente debido a su recuperación alta en orina y correlación moderada con la cantidad consumida obtenida por recordatorio de 24h.

## INTRODUCCIÓN

En las últimas décadas, ha habido un gran interés en algunos compuestos dietarios considerados para promover la buena salud (Manach y cols., 2004). Estos compuestos bioactivos identificados en algunos alimentos de origen vegetal no son nutrimentos, pero podrían tener un papel benéfico en la prevención de enfermedades humanas (Muñoz y cols., 2005). Tal es el caso de los fitoestrógenos que son cualquier sustancia o metabolito que induce respuestas biológicas en vertebrados y que puede imitar o modular las acciones de los estrógenos endógenos, lo cual sucede porque se unen a los receptores de estrógenos (COT, 2003).

Muchos estudios clínicos y experimentales con animales han indicado que el consumo de dietas altas en fitoestrógenos está asociado con un riesgo bajo de enfermedades crónicas como las cardiovasculares, la osteoporosis y el cáncer de mama. Sin embargo, las asociaciones todavía no se han confirmado en otros estudios experimentales o en observacionales con poblaciones en vida libre (Cassidy y cols., 2006; Chun y cols., 2009), por lo tanto, los resultados siguen siendo controversiales. Esto puede deberse principalmente a una combinación de errores en la medición de la dieta, escasez de biomarcadores confiables y validados para establecer las asociaciones y la medición incompleta de la exposición.

Entre los instrumentos dietarios que se utilizan para medir el consumo de fitoestrógenos está el recordatorio de 24 horas, que evalúa la ingestión dietaria reciente. Además, por la relativa sencillez de su aplicación, puede proporcionar estimaciones del consumo medio compuestos dietarios de grupos poblacionales grandes comparados a los obtenidos con técnicas complicadas (Beaton y cols., 1983) o muy invasivas. Adicionalmente, es útil para evaluar la ingestión entre grupos culturalmente diferentes ya que es menos sensible a las diferencias en la

diversidad cultural (Buzzard, 1998). Esto último se debe porque la herramienta es abierta y no limitada a una lista de alimentos determinados.

Aunque un único recordatorio de 24 h es un indicador poco confiable del estado nutricional de un individuo debido a la variabilidad intraindividual, proporciona estimaciones adecuadas del estado dietario de grupos con diferentes niveles de factores de riesgo para ciertas enfermedades (Byers, 1992). Como una alternativa a las herramientas más tradicionales de evaluación dietaria, están los marcadores biológicos de exposición de nutrientes o compuestos dietarios. En esta técnica una o más fracciones bioquímicas se miden en un fluido o tejido accesible para proporcionar un índice semicuantitativo de la exposición a los componentes individuales de los alimentos. Para los compuestos polifenólicos como los fitoestrógenos, esto puede parecer un enfoque atractivo. Sin embargo, la relación entre la ingestión dietaria y las concentraciones resultantes de biomarcadores en fluidos biológicos es altamente compleja (Spencer y cols., 2008).

En México, hay información limitada sobre el consumo de fitoestrógenos individuales y grupales en la población general y, sobre todo, no se tiene información donde se comparen los datos obtenidos por encuesta dietaria y los que resultan de su medición a través de un posible marcador biológico, como la orina. Así, este estudio tuvo como objetivo evaluar la asociación de la ingestión dietaria de fitoestrógenos estimada por recordatorio de 24 h con las concentraciones urinarias respectivas de fitoestrógenos en mujeres adultas de Hermosillo, Sonora, México.

## SUJETOS Y MÉTODOS

### Población de Estudio

#### **Criterios de elegibilidad**

Se realizó un estudio transversal con mujeres mayores de 25 años de edad y que tuvieran una residencia mínima de 5 años en Hermosillo, Sonora. Las mujeres en estado de gestación o lactancia, y las que presentaron diagnóstico previo de enfermedades crónicas específicas como cáncer, diabetes o del corazón no se incluyeron en este estudio.

El protocolo de esta investigación se revisó y aprobó por el comité de ética para estudios con seres humanos del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. de Hermosillo, Sonora. Se proporcionó a las mujeres participantes una descripción detallada de la importancia del estudio y de los procedimientos, así como de los riesgos y beneficios. Todas las mujeres autorizaron la carta de consentimiento informado por escrito previo a la participación.

#### **Tamaño y selección de la muestra**

El tamaño de muestra estimado para la prueba de correlación fue de 100 mujeres elegibles. Para el cálculo se utilizó la fórmula  $n = [(z_{\alpha} + z_{\beta}\sqrt{1-r^2})/r]^2 + 2$  considerando un poder del estudio del 80% y un nivel de significancia de 0.05. Así, con este tamaño de muestra se podrían encontrar correlaciones significativas para cada uno de los fitoestrógenos contenidos comúnmente en la dieta y la orina, en caso de que éstas existieran, con al menos una  $r = 0.30$ .

Se realizó un muestreo aleatorio polietápico con base en 20 áreas geoestadísticas básicas (AGEB) de Hermosillo, Sonora, a través del marco muestral maestro (MMM). El MMM es la base de muestreo de viviendas para las encuestas que conforman el Sistema de Encuestas Nacionales de Salud (Olaiz-Fernández y cols., 2006). En cada AGEB se seleccionó aleatoriamente una manzana. Las 20 manzanas se eligieron con probabilidad proporcional al número de hogares. Se identificaron todas las casas habitadas dentro de cada manzana. Los hogares a visitar se seleccionaron en forma aleatoria simple usando tablas de números aleatorios. De acuerdo con el número de hogares (ver anexo uno) en cada una de las 20 manzanas, se efectuó un estimado proporcional del 5% para que el tamaño de la muestra final se conformara con 100 mujeres. Cuando no se obtuvo respuesta al momento de tocar en las casas seleccionadas, se procedió a realizar una segunda visita en una hora distinta a la primera. Si no se localizó a la posible participante se descartó la casa seleccionada y se visitó la siguiente de la lista. En el caso de que hubiera más de una mujer elegible en una misma casa, sólo participó una de ellas de manera voluntaria.

### Colección de la Información y Muestra Biológica

Para la recolección de la información general de la población de estudio se aplicó un cuestionario de salud y se tomaron las mediciones antropométricas. En cuanto a la información dietaria se aplicó un recordatorio de 24 h, mientras que para el análisis de fitoestrógenos en la muestra biológica, se recolectó orina de 12 h. En esta sección se detalla cada una de ellas.

## **Cuestionario sociodemográfico y de salud general**

Se aplicó un cuestionario en la primera entrevista para obtener información general de las mujeres participantes. El cuestionario se estructuró con preguntas abiertas y, en su mayoría, por preguntas cerradas de opción múltiple. Se incluyeron indicadores socioeconómicos y demográficos como la edad, estado civil, ingreso económico, material de construcción de la vivienda, nivel educativo y acceso a los servicios públicos. También, el cuestionario incluyó preguntas acerca del historial médico y reproductivo, lactancia, información de tabaquismo e ingestión de alcohol y otros factores del estilo de vida. Este cuestionario se aplicó por personal entrenado en casa de las participantes.

## **Mediciones antropométricas**

Se midió el peso y la talla para caracterizar a la población de estudio por medio de las técnicas establecidas por Jellife y Jellife (1989) para peso y Cameron y Jordán (1978) para talla. El peso se midió con una balanza electrónica (AND FG-150KBM con 0.05 kg de precisión) portátil y utilizando un mínimo de ropa y sin zapatos. Bajo estas mismas condiciones, la talla se midió con un estadiómetro (SECA) portátil. Se calculó el índice de masa corporal (IMC en  $\text{kg}/\text{m}^2$ ), utilizando el peso y la talla, para clasificar a las mujeres con sobrepeso y obesidad cuando el IMC es mayor o igual a  $25 \text{ kg}/\text{m}^2$  y a  $30 \text{ kg}/\text{m}^2$ , respectivamente.



### **Encuesta dietaria: recordatorio de 24 horas**

La recolección de la información dietaria se realizó por personal entrenado a través de visitas a los hogares de las mujeres. La información de la ingestión dietaria actual de los fitoestrógenos se obtuvo por un recordatorio de 24 horas. A cada una de las mujeres se le solicitó la lista de todos los alimentos y bebidas consumidos 24 horas previas a la entrevista. Se utilizaron modelos tridimensionales de alimentos, cucharas, vasos y platos calibrados de diferentes medidas y fotografías de porciones de alimentos, como ayuda visual para estimar los gramos de los alimentos consumidos. Cuando el peso de un alimento no estaba presente en la lista de los pesos y volúmenes de alimentos, se procedió a pesar alimentos similares a los registrados en el recordatorio de 24 h. El recordatorio se aplicó el día que finalizó la recolección de la orina porque los fitoestrógenos se excretan en menos de 24 horas. Adicionalmente, a una submuestra de 50 mujeres se les aplicó un segundo recordatorio de 24 horas, con un mínimo de tres semanas después del primero, para calcular el coeficiente de variación intraindividual de la ingestión día a día. Las mujeres que presentaron mayor interés en la participación del estudio fueron invitadas a contestar este segundo recordatorio.

### **Orina de 12 horas**

Las participantes recibieron las instrucciones necesarias para la recolección total de orina de 12 horas, en cualquier día fuera de su periodo menstrual. Además, como criterio importante para la recolección, sólo las mujeres que no hubieran consumido algún tipo de antibióticos en los 7 días previos a la recolección proporcionaron su muestra de orina. Mientras que a las mujeres con tratamiento de antibióticos se les esperó el tiempo necesario para que lo concluyeran y donaran su orina de 12 h. A todas las mujeres se les

proporcionaron 4 recipientes oscuros con tapas de rosca, geles refrigerantes y una hielera. La orina total de 12 h se recolectó en estos recipientes portátiles de 0.5 L y cada uno con 0.5 g de ácido L-ascórbico (A4544-100G, SIGMA-Aldrich) para prevenir la contaminación microbiana y la degradación oxidativa de los fitoestrógenos (Tseng y cols., 2008). Se solicitó a las mujeres que usaran un recipiente por separado para recolectar la orina antes de cenar, después de cenar y la primera micción del día siguiente, y almacenaran los recipientes en su refrigerador (4 - 6°C) o en la hielera. Los recipientes con las orinas se recogieron y se transportaron en hieleras al laboratorio a la mañana siguiente. Dentro de las primeras 4 a 6 horas de la última recolección, se combinó la orina contenida en los 3 o 4 recipientes y se midió el volumen total urinario de cada mujer. De este volumen completo, se filtró una muestra de orina utilizando filtros Whatman grado 41. Se formaron 5 alícuotas cada una con 5 mL de orina filtrada y se almacenaron en viales criogénicos de polipropileno a una temperatura de -70°C hasta el análisis de fitoestrógenos.

Debido a los cambios impredecibles de flujo de la orina durante el día y a que la síntesis y eliminación total de creatinina es generalmente constante (Spierto y cols., 1997), la cantidad de fitoestrógenos en orina se ajustó a la concentración de creatinina. Para normalizar esta diuresis, se midió la excreción urinaria de creatinina (Bolca y cols., 2009). Estos análisis de creatinina se realizaron en un laboratorio biomédico utilizando un ensayo cinético colorimétrico basado en la reacción de Jaffé. Así, los resultados de fitoestrógenos en orina se reportan por gramo de creatinina.

### Cálculo del Consumo Dietario de los Fitoestrógenos

El cálculo del consumo reciente de fitoestrógenos en la dieta de las participantes se estimó utilizando los datos de la encuesta y el diccionario de

alimentos desarrollado por Ortega y colaboradores (1999). Este diccionario se adaptó para contener alimentos aportadores de fitoestrógenos.

### **Construcción de base de datos de alimentos fuentes de fitoestrógenos**

Para adaptar el diccionario desarrollado por Ortega y colaboradores a las necesidades del estudio, se realizaron búsquedas del contenido de fitoestrógenos de los alimentos. Los buscadores de literatura científica, como PubMed y google scholar, sirvieron para acceder a palabras claves como *phytoestrogens*, *database*, *contents*, *concentration*, *isoflavones*, *lignans*, *coumestans*, *flavonoids*, entre otras. Se encontraron 9 referencias con tablas del contenido de fitoestrógenos en diferentes alimentos y dos bases de datos publicadas por el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en inglés).

Las tablas y bases de datos (Horn-Ross y cols., 2000; Kuhnle y cols., 2009a; b; Kuhnle y cols., 2008a; b; Milder y cols., 2005; Pillow y cols., 1999; Thompson y cols., 2006; USDA, 2007; 2008; Zamora-Ros y cols., 2008) se utilizaron para identificar los alimentos que son fuente de fitoestrógenos. Una vez identificados, se procedió a elaborar una lista con la información disponible del contenido de fitoestrógenos. Sin embargo, cada base de datos mostraba un valor muy diferente para un mismo alimento.

Con el objetivo de distinguir los valores que se utilizarían para la construcción de la base de datos, todos los datos de fitoestrógenos obtenidos de las referencias se sometieron a un cuadro de control de calidad, como se muestra en la tabla 1. Se incluyeron criterios como el tipo de alimento y país de origen, si el alimento estaba crudo o cocido y el método de análisis utilizado. Además, todos los valores encontrados en la literatura se reportaron, y en algunos casos se convirtieron, en  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  de alimento (base de peso húmedo). Cuando se registraban valores diferentes de fitoestrógenos del mismo alimento

en las referencias bibliográficas, se seleccionó el valor de la referencia más actualizada y que haya utilizado HPLC-MS como método de análisis, seguida del valor más alto y con más especificaciones en orden de prioridad. Si se reportaban trazas de estos compuestos, se estableció su valor medio correspondiente según los límites de cuantificación y detección establecidos en el método de análisis de cada referencia citada. Cuando no se tenía la información sobre el contenido de fitoestrógenos de un alimento, se asignó un valor sustituto a partir de datos de un alimento similar disponible, por ejemplo de un mismo grupo botánico. Si la información de datos para un cierto alimento no estuvo disponible, se estableció el valor de cero. Por último, se amplió la base de datos con la estimación del contenido de fitoestrógenos en alimentos preparados. Así, los valores de las concentraciones de estos compuestos se añadieron a los alimentos del diccionario desarrollado por Ortega y colaboradores (1999).

**Tabla 1.** Ejemplo del cuadro utilizado para la selección del alimento fuente de fitoestrógenos

Alimento	Crudo/ cocido	Método	Tipo o marca	Referencia/ país	Seco* (µg/100 g)
Naranja	Fresco	GC-MS	No específica	Thompson et al., 2005/ Canadá	2.5
Naranja	Fresco	HPLC-ES(-) MS/MS	( <i>Citrus sinensis</i> ) sin cáscara y mesocarpo	Kuhnle et al., 2009/ Inglaterra	0
Naranja	Fresco	HPLC- APCI(-) MS	( <i>Citrus sinensis</i> L. <i>Osbeck</i> )	Milder et al., 2005/Holanda	5
Naranja	Fresco	NE	NE	Keinan et al., 2002/Holanda	11.29

NE= No específica; \*Secoisolariciresinol en microgramos por cada 100 gramos de alimento

## Estimación del consumo de fitoestrógenos

Se calcularon los gramos de los alimentos consumidos por cada participante a partir de los datos dietarios obtenidos por el recordatorio de 24 horas. Para esta estimación, se utilizó el manual que contiene los pesos promedio de los alimentos por pieza chica, mediana o grande y/o por recipiente o utensilio. Cuando no se encontró el peso de un alimento, se procedió a pesarlo o sustituirlo por el peso de un alimento similar. Posteriormente, se codificó cada alimento asignándole una clave de acuerdo al diccionario de alimentos adaptado. La clave de la participante, el código del alimento y los gramos consumidos se capturaron en una hoja de cálculo de *Excel*. Para calcular la cantidad de nutrimentos y fitoestrógenos consumidos por cada participante, se utilizó la información del diccionario y la siguiente fórmula:

$$\text{Cantidad de energía/nutrimento/fitoestrógeno (kcal/d, g/d, mg/d, } \mu\text{g/d)} = A * B / C$$

Donde:

A= cantidad de alimento consumido (g) por cada persona

B= cantidad de energía, nutrimento o fitoestrógeno (kcal, g, mg,  $\mu\text{g}$ ) proporcionada por cada alimento (obtenido del diccionario de alimentos adaptado)

C= 100 gramos de alimento (así están reportados en el diccionario)

## Análisis de Fitoestrógenos en la Orina de 12 h

El método cromatográfico que se utilizó para medir la concentración de 16 fitoestrógenos en la orina de 12 h fue el desarrollado por Wyns y colaboradores (2010). Este método consiste de una hidrólisis enzimática de los fitoestrógenos usando  $\beta$ -glucuronidasa/sulfatasa de *Helix pomatia*, seguida por una extracción líquida-líquida con disolvente orgánico, y una separación y detección usando cromatografía líquida de alta resolución acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS).

### **Productos químicos y reactivos**

Los estándares daidzeína, genisteína, ecuol, gliciteína, biocanina A, formononetina, secoisolariciresinol, matairesinol, enterodiol, enterolactona, cumestrol, resveratrol, kaempferol, el estándar interno 4-hidroxibenzofenona (98%), las enzimas  $\beta$ -glucuronidasa/sulfatasa (actividad de 1,926,000 U/g) de *Helix pomatia* (tipo H1), los estándares internos de desconjugación 4-metilumbeliferona sulfato y  $\beta$ -glucuronidato-fenolftaleína y los reactivos acetato de sodio (99%) y el ácido fórmico ( $\geq 95\%$ ) fueron obtenidos de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Quercetina, luteolina y naringenina se obtuvieron de INDOFINE Chemical Company Inc. (Hillsborough, NJ, USA).

Los disolventes acetonitrilo y metanol grado HPLC y el éter dietílico grado espectrofotométrico ( $\geq 99.9\%$ ) fueron obtenidos de J.T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA) y Sigma-Aldrich, respectivamente. El agua ultra pura (doblemente deionizada) fue obtenida por ultrafiltración de agua grado HPLC con un sistema Milli-Q (Millipore, Bedford, MA, USA).

## Preparación de los estándares, reactivos y soluciones

Las soluciones stock de los estándares se prepararon pesando el analito y diluyendo en metanol para tener una concentración final de 1 mg/mL, excepto los de desconjugación que fueron disueltos en agua milliQ y metanol. Los estándares de desconjugación se usaron para cuantificar la efectividad de la reacción enzimática. Estas soluciones se almacenaron a -70°C.

La solución estándar de trabajo (mezcla de fitoestrógenos más el estándar interno) utilizada para la fortificación de las muestras se obtuvo diluyendo las soluciones stock con metanol a una concentración de 4 µg/mL. La mezcla de estándares de desconjugación se preparó con β-glucuronidato-fenoltaleína y 4-metilumbeliferona sulfato a una concentración de 24 µg/mL y 20 µg/mL, respectivamente. Todas las soluciones se filtraron con filtros acrodisc para jeringa con membrana de PVDF (fluoruro de polivinilideno hidrófilo) y 0.2 µm de diámetro de poro (Pall Life Sciences, USA) y almacenadas a -20°C.

El buffer (pH 5.0; 0.1 M) se preparó pesando la cantidad apropiada de acetato de sodio en la concentración indicada disolviendo con agua milliQ. Se adicionó HCl para ajustar el pH y se almacenó a 4°C. Antes de utilizarse, se mantuvo a temperatura ambiente.

La mezcla de enzimas β-glucuronidasa/sulfatasa se preparó a una concentración de 5.14 mg/mL en buffer acetato de sodio, para tener una actividad de β-glucuronidasa y sulfatasa de 300 U/mg y 15.3 U/mg, respectivamente.

Los controles que se emplearon para el aseguramiento de la calidad de los datos fueron un blanco cristalería (2 mL de acetato de sodio), un blanco reactivo (acetato de sodio más la mezcla de enzimas), un blanco muestra (muestra de orina humana con concentración baja de fitoestrógenos recolectada de voluntarios, más la mezcla de enzimas) y una muestra adicionada con una cantidad conocida de los 16 estándares de fitoestrógenos. La fortificación de la

muestra se realizó adicionado 100  $\mu\text{L}$  de la mezcla de estándares a 4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  al blanco muestra para obtener una concentración final de 200  $\text{ng}/\text{mL}$ . Estos controles se corrieron para excluir la presencia de posibles interferencias.

Las mezclas de los fitoestrógenos utilizados para la curva de calibración se prepararon por dilución seriada (0.16, 1.6, 16, 160, 1600, 16000 y 24000  $\text{ng}/\text{mL}$ ) en metanol a partir de las soluciones stock. El volumen utilizado para fortificar las muestras fue de 100  $\mu\text{L}$  y representa el 5% del volumen total de las muestras de orina para mantener la integridad de la matriz.

La fase móvil consistió de los disolventes A y B. En el disolvente A se usó agua milliQ y en el B se utilizó metanol/acetonitrilo ( $\text{MeOH}/\text{CH}_3\text{CN}$ , 80:20, v/v), acidificados con ácido fórmico al 0.025% (v/v). Estas soluciones se filtraron con filtros de membrana de PTFE (politetrafluoroetileno) de 0.45  $\mu\text{m}$  de diámetro de poro (PALL Life Sciences) y desgasificadas por 15 min en un sonicador (Cole-Parmer Instruments Co, USA) antes de inyectarse. La solución de reconstitución (40:60, v/v) se preparó con fase móvil inicial (A:B, 65:35) y metanol.

## **Procedimiento de extracción**

Pretratamiento de la muestra. La preparación de la muestra de orina se basó en el protocolo publicado por Bolca y colaboradores (2009) y adaptado por Wyns y colaboradores (2010). Las muestras de orina de 12 h, previamente descongeladas, se centrifugaron a 3000 rpm por 10 minutos, en tubos eppendorf de 2 mL, para eliminar sólidos. El sobrenadante (2 mL) se diluyó con un volumen igual de buffer de acetato de sodio (pH 5.0; 0.1 M), se le añadió 100  $\mu\text{L}$  del estándar interno 4-hidroxibenzofenona (4  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ), 30  $\mu\text{L}$  de mezcla de enzimas (5.14  $\text{mg}/\text{mL}$ ) y 10  $\mu\text{L}$  de mezcla de desconjugación (24 y 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ). La mezcla anterior se depositó en tubos de centrífuga de fondo cónico de vidrio de 45 mL. Esta muestra problema se incubó por 4 h a 37°C en un baño de agua (Thermo Fisher Scientific, Marietta OH, USA).



Extracción líquido-líquido. Después de la incubación, se realizó en dos ocasiones una extracción líquido-líquido añadiendo 5 mL de éter dietílico. Posteriormente se mezcló por 30 s en un vortex y se dejó reposar por 5 min para conseguir una buena distribución de la capa orgánica y la acuosa. La capa de disolvente orgánico (aproximadamente 10 mL (2 x 5 mL en total) se recolectó cuidadosamente y se colocó en un tubo nuevo de centrifuga de fondo cónico y de vidrio (15 mL). El eluato se evaporó suavemente hasta sequedad con una corriente de nitrógeno a 37°C. Se lavaron las paredes del tubo con 500 µL de metanol y se evaporó de nuevo con nitrógeno. Los fitoestrógenos se disolvieron en 200 µL de la solución de reconstitución agitando cuidadosamente por 1 min en un vortex. Antes de transferir el extracto a los viales de cromatografía, se filtró con acrodisc (0.2 µm), para eliminar partículas sólidas. El volumen de inyección se ajustó a 50 µL de extracto filtrado.

El análisis de cada lote de muestras problema incluyó un blanco cristalería, un blanco reactivo, un blanco muestra y un duplicado de muestra fortificada. Todos se inyectaron por duplicado.

### **Separación y detección**

La separación cromatográfica y detección de los fitoestrógenos se basó en la técnica de Wyns y colaboradores (2010), que fue previamente modificada para llevar a cabo el análisis de los 16 fitoestrógenos de interés en muestras de orina. Se utilizó un equipo HPLC Agilent serie 1100 (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, Ca, USA) equipado con una columna (Waters XBridge) C<sub>18</sub> (150 x 3.0 mm D.I., 3.5 µm) de fase reversa y conectada a una precolumna C<sub>18</sub> (20 x 3.0 mm D.I., 3.5 µm) para resolver los analitos. Para la confirmación de los analitos se utilizó un espectrómetro de masas con analizador de masas de cuadrupolo simple G1946A, modelo VL (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, Ca, USA).

La columna C<sub>18</sub> se mantuvo a una temperatura de 52°C. Las condiciones de las corridas se programaron a una velocidad de flujo de la fase móvil y elusión del gradiente: 0-5.0 min: 35-40% de B (flujo 0.6 mL/min), 5.0-16.0 min: 40-100% de B (flujo 0.6 mL/min), 16.0-19.0 min: isocrático 100% B (flujo 0.8 mL/min), 19.0-19.1 min: 100-35% de B (flujo 0.6 mL/min) y 2.9 minutos para reequilibrar la columna. Como primera fase para la identificación de los fitoestrógenos se utilizaron los tiempos de retención, así como sus longitudes de onda de máxima absorción a 260, 280, 290, 310 y 360 nm. Cabe mencionar que estas fueron obtenidas a partir del barrido que se hizo con el detector de arreglo de diodos de 190 a 500 nm. Para la confirmación de los fitoestrógenos se utilizó el detector de espectrometría de masas (MSD) con un simple cuadrupolo y fuente de ionización por electrospray (ESI) operando en el modo del ión negativo. Se utilizó temperatura de secado de 350°C, 60 psi de presión del nebulizador, voltaje capilar 3.5 kV y flujo del gas de secado 11 L/min. Se seleccionó el ión padre, voltaje de fragmentación y el valor de ganancia óptimo para cada fitoestrógeno a través de su análisis por FIA (análisis de flujo de inyección) y SCAN. Se utilizaron las cuatro señales del MSD para la cuantificación en monitoreo del ión selecto (SIM). Estos análisis sirvieron para optimizar los parámetros utilizados para la cuantificación y confirmación en el modo SIM. Un estándar de calibración ESI (AT, USA) se usó para la calibración diaria del MSD y el procesamiento de los datos se realizó usando el programa *Chemstation* LC/MSD (Rev.B.03.02).

### **Recuperación y concentración de los fitoestrógenos**

El porcentaje de recuperación (% RE) mide la eficiencia de un método analítico para cuantificar los compuestos que se analizan en la muestra biológica. El porcentaje de recuperación del método se determinó adicionando

100 µL de la mezcla de fitoestrógenos (4 µg/mL) al blanco muestra de orina. Las muestras se sometieron a las mismas condiciones de extracción y cuantificación descritas anteriormente. El porcentaje de recuperación para cada fitoestrógeno se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$\%RE = (\text{área de la muestra fortificada} * 100) / \text{área del estándar}$$

Se consideró un intervalo de recuperación aceptable de 80 a 120% y un coeficiente de variación menor del 15% (FDA, 2001). Para calcular la concentración de los fitoestrógenos se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Concentración de fitoestrógenos } (\mu\text{g/L}) = [(AB)/D](C/E)$$

Donde:

A= Área de la muestra; B= Concentración del estándar; C= Factor dilución; D= Área del estándar; E= Porcentaje de recuperación.

### **Linealidad del método**

La curva de calibración del método se obtuvo inyectando, por triplicado, el extracto filtrado de las muestras fortificadas a 8 niveles de concentración entre 0.16 y 2400 ng/mL. Los puntos de calibración seleccionados que cubren el intervalo lineal del ensayo fueron las siguientes concentraciones: 0.008, 0.08, 0.8, 8, 80, 800 y 1200 ng/mL. Para construir las curvas de cada fitoestrógeno se graficaron las concentraciones finales (x) de los estándares de calibración contra el área bajo la curva (y) de los analitos obtenidos en los cromatogramas. La

linealidad se evaluó considerando como único criterio coeficientes de correlación mayores o iguales que 0.99. Se llevaron a cabo dos curvas de calibración, una al inicio y la otra a la mitad del tiempo que duró el ensayo experimental.

Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) del método se determinaron con la relación señal-ruido (S/R). El LD es la concentración mínima de un compuesto en una muestra, el cual puede ser detectado pero no cuantificado bajo las condiciones de operación experimental establecidas. EL LC es la concentración más baja del compuesto que puede cuantificarse cumpliendo con la precisión y exactitud establecidas en el método. El LD y el LC del método se definieron como la concentración más baja con una (S/R) de 3 y 10, respectivamente, a partir de los cromatogramas de muestras fortificadas en la concentración media (160 ng/mL) de los analitos de interés.

### Análisis Estadístico

La normalidad de la distribución de cada variable se verificó usando la prueba de Kurtosis. Se realizó un análisis descriptivo para describir las características principales de las mujeres, la ingestión dietaria y la excreción urinaria de los fitoestrógenos. Debido a la distribución sesgada de las variables dietarias y concentraciones urinarias de fitoestrógenos, se utilizaron valores de mediana (intervalo intercuartílico) o media geométrica ( $IC_{95\%}$ ). Se incluyó la media ( $\pm$  DE) con el objetivo de comparar los resultados de estudios previos.

La excreción urinaria de fitoestrógenos se ajustó por gramo de creatinina para estandarizar por las diferencias entre individuos en la producción de orina.

El consumo de macronutrientes, micronutrientes y fitoestrógenos se ajustó por el método de residuales de energía propuesto por Willett. Para este análisis, se utilizó el modelo  $a + b$ , donde  $a$  es el residual del modelo de

regresión con ingestión del nutrimento como la variable dependiente (x) y la ingestión de la energía total como la variable independiente (y) y b es la ingestión esperada del nutrimento para una persona con ingestión media de energía (ver anexo dos). Este ajuste se realizó debido a que la mayoría de los nutrimentos están asociados con la ingestión energética total, ya sea porque contribuyen directamente a la ingestión de energía o porque las personas que consumen más energía total también comen, en promedio, más de todos los nutrimentos y componentes dietarios específicos (Willett y cols., 1997).

Para evaluar la variación intra e interindividual en la ingestión de los componentes dietarios se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas (Willett, 1990) utilizando los datos de la muestra total y/o submuestra.

Para comparar las características generales de las participantes por estado de menopausia, se utilizó la prueba *t* de Student para dos muestras independientes. Para comparar la ingestión de fitoestrógenos por estado de menopausia, se utilizó la prueba no paramétrica U de Mann-Whitney. Las correlaciones de Spearman se utilizaron para evaluar la asociación entre la ingestión dietaria habitual de fitoestrógenos, estimados del recordatorio de 24 horas, y la excreción urinaria de fitoestrógenos en orina total de 12 h (en  $\mu\text{g/g}$  creatinina). Cuando los datos presentaron una distribución normal después de la transformación, se eligió el coeficiente de correlación de Pearson. Este análisis se realizó con datos transformados logarítmicamente. Se utilizó el logaritmo natural más uno ( $\ln + 1$ ), debido a un gran número de valores cero en el conjunto de los datos.

Los coeficientes de correlación se calcularon entre la ingestión de fitoestrógenos específicos ( $\mu\text{g/d}$ ) y la concentración urinaria de cada uno de los fitoestrógenos, isoflavonas totales, lignanos totales, flavonoides totales más resveratrol y fitoestrógenos totales utilizando tres unidades:  $\mu\text{g/L}$ ,  $\mu\text{g/d}$  y  $\mu\text{g/g}$  creatinina. Se evaluó primero la correlación sin ajustar (cruda) y luego se deatenuó considerando la variación intraindividual en el consumo. Esta

corrección se calculó para los datos en  $\mu\text{g/g}$  de creatinina. Coeficientes de correlación parciales entre la ingestión de fitoestrógenos individuales y totales y sus correspondientes excreciones urinarias se calcularon después de ajustar por el IMC.

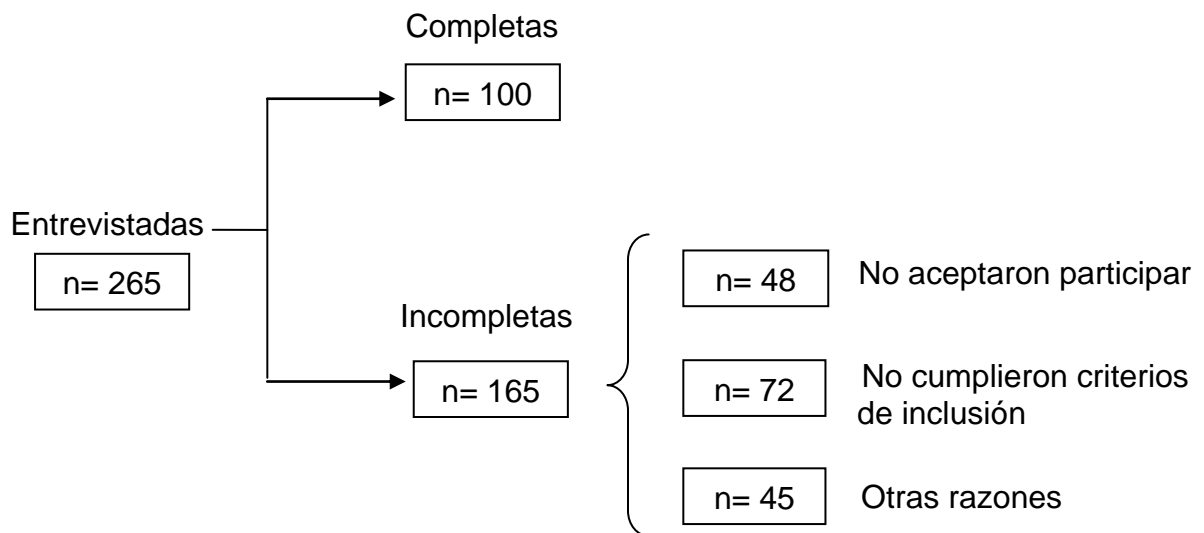
Adicionalmente, y como complemento al análisis de correlación, se calculó la magnitud de la correlación usando el método gráfico de Bland y Altman (Bland y Altman, 1986). Se utilizó el promedio de las diferencias entre los fitoestrógenos determinados por ambos métodos como variable dependiente contra el promedio de ambos métodos como variable independiente. Esta gráfica y el cálculo del coeficiente de correlación de concordancia se realizaron utilizando el programa estadístico MedCalc (se puede obtener una versión de prueba en el sitio <http://www.medcalc.be/>).

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa estadístico STATA versión 8.0 (StataCorp LP, College Station, TX). La significancia estadística se consideró a un valor de  $p \leq 0.05$ .

## RESULTADOS

### Selección de las Mujeres del Estudio

En la figura 1 se presenta el total de casas visitadas y el número de entrevistas realizadas para invitar a las mujeres a participar en este estudio. Se visitó un total de 564 hogares. En el 53% de estos hogares la mujer no estaba en casa. En el 47% de los hogares, se encontró a las mujeres en casa pero 62% de las entrevistas fueron incompletas, ya que las mujeres no participaron por las diversas razones que ahí se especifican. En total, el 38% de las mujeres entrevistadas decidieron participar y finalizar el estudio.



**Figura 1.** Total de entrevistas realizadas.

## Características Generales y Antropométricas de las Mujeres del Estudio

En la tabla 2 se presentan las características generales y antropométricas de las mujeres que participaron en este estudio. Su edad promedio sugiere que estaban en la cuarta década de la vida. La mayoría de las mujeres fueron de nivel socioeconómico bajo, seguido por las de nivel medio y en menor porcentaje las del nivel alto, considerando únicamente sus ingresos mensuales y los puntos de corte establecidos por Camberos en el 2008. El nivel socioeconómico bajo, se conformó de las mujeres cuyos ingresos mensuales del hogar eran menores a \$8,376 (menores a 5 salarios mínimos). El nivel medio correspondía a las mujeres que percibían un salario entre \$8,376 a \$ 16, 700 pesos mensuales (5 a 10 salarios mínimos) y el nivel alto estaba compuesto por aquellas que tenían ingresos mayores a \$16,700 pesos mensuales (mayores a 10 salarios mínimos). Con relación a la escolaridad, el 52% de las mujeres tenían menos de 9 años de estudio, el 20% entre 10 y 12 años y el resto más de 13 años de estudio. El 74% de las participantes estaban casadas. De las restantes, el 8% eran viudas, 5% eran solteras y 13% vivían en unión libre, estaban divorciadas o separadas.

En general, el porcentaje de sobrepeso y obesidad de acuerdo al índice de masa corporal en las mujeres del estudio fue de 79%, el cual es un valor muy elevado. No hubo diferencias significativas en los valores del peso ( $p=0.36$ ) e índice de masa corporal ( $p=0.88$ ) entre mujeres premenopáusicas y postmenopáusicas, indicando que el estado de menopausia no influyó en esta medida antropométrica en las mujeres participantes.



**Tabla 2.** Características generales y mediciones antropométricas en el total de las mujeres y estratificadas por estado de menopausia.

<b>Variable estudiada</b>	<b>Total</b>	<b>Premenopausia</b>	<b>Postmenopausia*</b>
	n= 100	n= 57	n= 43
Edad (años)	44.73 ± 12.78	35.35 ± 6.18	57.16 ± 7.50
Escolaridad (ae)	10.37 ± 4.40	11.06 ± 3.72	9.46 ± 5.07
Nivel socioeconómico			
Bajo	62%	67%	56%
Medio	21%	23%	19%
Alto	13%	9%	19%
Peso (kg)	74.96 ± 15.88	76.22 ± 17.22 <sup>a</sup>	73.28 ± 13.93 <sup>a</sup>
Talla (m)	1.59 ± 0.06	1.61 ± 0.05 <sup>a</sup>	1.57 ± 0.06 <sup>b</sup>
IMC (kg/m <sup>2</sup> )	29.48 ± 6.06	29.40 ± 6.60 <sup>a</sup>	29.58 ± 5.33 <sup>a</sup>
Clasificación IMC			
<25	21%	23%	19%
25-30	41%	37%	46%
>30	38%	40%	35%

Valores expresados como la media ± desviación estándar; ae= años de estudio; IMC= índice de masa corporal; n= tamaño de muestra. \*Menopausia natural o por cirugía. Superíndices diferentes entre las columnas del estado de menopausia indican diferencias significativas (p<0.05). Prueba t para muestras independientes.

### Ingestión Dietaria de las Mujeres del Estudio

#### **Energía y macronutrientos**

En la tabla 3 se muestra la ingestión promedio de energía, macronutrientos y de algunas vitaminas de las mujeres participantes. El

porcentaje de energía consumida en la dieta diaria proveniente de los carbohidratos, las grasas y las proteínas fue de 56%, 30% y 16%, respectivamente. Estos valores están dentro de los establecidos para la distribución de la energía proveniente de macronutrientos (Bourges y cols., 2005).

### **Fitoestrógenos**

La distribución de la ingestión de fitoestrógenos totales está sesgada a la derecha debido a la variación en el consumo de estos compuestos. Al transformar los datos a logaritmo natural más uno ( $\ln+1$ ), se logró normalizar la distribución. Sin embargo, el consumo individual de los diferentes tipos de fitoestrógenos no se logró normalizar, por tanto la ingestión se presenta con la media, la mediana y la media geométrica. La estimación del consumo de las isoflavonas, los lignanos y los flavonoides se presenta en las tablas 4, 5 y 6, respectivamente.

Para el consumo medio (geométrico) de fitoestrógenos según su clasificación por grupos se observa que la ingestión mayor la tiene el grupo de los flavonoides, seguido por el de las isoflavonas, los lignanos y el cumestrol. La genisteína, el secoisolariciresinol y la quercetina son los fitoestrógenos, por grupo, más representativos en la dieta de la muestra estudiada. Mientras que el ecul y resveratrol son los fitoestrógenos con los valores más bajos de ingestión. El consumo medio (geométrico) de fitoestrógenos totales fue mayor a 7 mg/día.

Los coeficientes de variación intra e interindividual del consumo de energía, nutrientes y fitoestrógenos se muestran en la tabla 7. Utilizando dos recordatorios de 24 horas, la variación interindividual fue mayor que la variación intraindividual para todos los nutrientes, a excepción de las vitaminas A y C. Los coeficientes de variación interindividual para el colesterol y particularmente

las vitaminas A y C fueron los más grandes entre los nutrimentos. En los fitoestrógenos, las variaciones intra e interindividual fueron similares a las encontradas en las vitaminas. Utilizando un recordatorio, el coeficiente de variación interindividual para el colesterol y particularmente las vitaminas A y C fueron los más grandes entre los nutrimentos y para el resveratrol y el secoisolariciresinol entre los fitoestrógenos.

### Extracción de Fitoestrógenos en la Orina

El método de extracción líquido-líquido utilizado para extraer fitoestrógenos en orina humana presentó recuperaciones satisfactorias. Las recuperaciones promedio de la mayoría de los fitoestrógenos en muestras fortificadas fueron entre 76% y 111%, a excepción del resveratrol (50%) y el secoisolariciresinol (59%). Se obtuvieron coeficientes de variación menores al 10% (tabla 8).

La linealidad del método se verificó por duplicado en 6 de los 7 puntos de concentraciones del intervalo de 0.008 a 1200 ng/mL (0.008, 0.08, 0.8, 8, 80 y 800) en todos los fitoestrógenos. Todas las curvas de calibración muestran una respuesta lineal entre el intervalo de concentración antes mencionado y el área bajo la curva obtenida del fitoestrógeno estudiado en el cromatograma. Los coeficientes de correlación ( $r$ ) entre el área de los picos y las concentraciones de los analitos estuvieron en el intervalo de 0.995 y 0.999.

**Tabla 3.** Ingestión dietaria de energía y nutrientes en las mujeres del estudio (n=100)

Nutrimiento/día	Media $\pm$ DE	Media Geométrica	Media Geométrica	Valor Min – Max	Percentiles		
		(IC <sub>95%</sub> )	(IC <sub>95%</sub> )*		25	50	75
Energía (Kcal)	1473.1 $\pm$ 530.8	1373.7 (1271.3-1484.4)	----- 54.3	454.1 - 3121.3	1095.5	1422.4	1770.2
Proteína (g)	57.2 $\pm$ 26.5	51.6 (47.0-56.5)	54.3 (50.3-58.6)	16.8 - 156.6	38.2	54.5	73.2
Grasa (g)	49.0 $\pm$ 25.8	42.2 (37.5-47.4)	46.4 (43-50.1)	6.4 - 143.8	31.2	45.4	60.9
Carbohidratos (g)	205.9 $\pm$ 92.3	187.2 (171.4-204.4)	198 (186.4-210.5)	55.9 - 636.0	132.7	197.7	247.0
Fibra (g)	19.20 $\pm$ 10.5	16.6 (14.9-18.5)	16.7 (14.9-18.8)	3.7 - 57.6	11.6	17.1	23.3
Colesterol (mg)	223.7 $\pm$ 174.9	157.1 (130.6-188.9)	183.6 (156.3-215.7)	6.7 - 858.0	74.9	185.5	316.0
Vitamina C (mg)	108.2 $\pm$ 179.9	54.3 (42.6-69.4)	79 (62-99.6)	0.9 - 1232.6	28.8	55.5	119.4
Vitamina A ( $\mu$ gRAE)	759.5 $\pm$ 2015.3	332.0 (258.5-426.3)	717 (582-883.4)	11.7 - 19234.6	187.9	354.8	739.5
Vitamina E (mg)	4.5 $\pm$ 4.7	3.0 (2.5-3.6)	3.4 (2.8-4)	0.2 - 34.6	1.4	3.4	5.4

DE= Desviación estándar; IC= Intervalo de confianza al 95%. \*Ajustados por el método de residuales de energía

**Tabla 4.** Ingestión dietaria de isoflavonas en las mujeres del estudio (n=100)

Fitoestrógeno (ug/día)	Media $\pm$ DE	Media Geométrica (IC <sub>95%</sub> )	Media Geométrica* (IC <sub>95%</sub> )	Valor Min-Max	Percentiles		
					25	50	75
Daidzeína	516.90 $\pm$ 2233.50	60.42 (42.41-86.08)	213.45 (157.42-289.42)	0.67-16220.31	22.51	86.43	135.71
Genisteína	775.08 $\pm$ 3507.54	74.12 (52.59-104.47)	262.41 (183.64-374.96)	0.58-26450.13	24.17	70.07	173.78
Ecuol	1.13 $\pm$ 1.52	1.235 (0.948-1.60)	0.67 (0.49 -0.92)	0-6.55	0	0.44	1.66
Gliciteína	9.46 $\pm$ 9.81	5.94 (4.87-7.23)	6.14 (5.06-7.45)	0.485-57.87	3.01	5.24	14.67
Biocanina A	57.85 $\pm$ 81.07	18.83 (13.12-27.04)	37.78 (29.01-49.20)	0.02-520.27	4.62	29.90	76.36
Formononetina	19.75 $\pm$ 25.55	6.38 (4.49-9.07)	14.17 (10.80-18.60)	0-159.44	1.38	4.28	31.30
Total de isoflavonas	1380.19 $\pm$ 5709.72	239.70 (178.70-321.51)	567.38 (423.01-761.02)	3.31-40788.64	116.51	271.58	441.50

DE= Desviación estándar; IC= Intervalo de confianza al 95%. \*Ajustados por el método de residuales de energía.

**Tabla 5.** Ingestión dietaria de lignanos, cumestrol y resveratrol en las mujeres del estudio (n=100)

Fitoestrógeno (ug/día)	Media $\pm$ DE	Media Geométrica (IC <sub>95%</sub> )	Media Geométrica* (IC <sub>95%</sub> )	Valor Min-Max	Percentiles		
					25	50	75
<b>Lignanos</b>							
Secoisolariciresinol	306.78 $\pm$ 1767.22	59.63 (48.09-73.94)	65.74 (50.02-86.41)	9.12-16937.65	31.83	52.19	81.28
Matairesinol	16.02 $\pm$ 45.17	7.69 (6.26-9.44)	9.61 (7.83-11.79)	0.58-437.53	4.14	7.24	13.95
Enterolactona	67.55 $\pm$ 83.36	29.81 (21.36-41.59)	53.35 (42.89-66.36)	0-435.52	8.59	41.67	88.74
Enterodiol	18.72 $\pm$ 23.03	12.33 (9.41-16.15)	15.19 (12.50-18.47)	0-133.59	1.99	11.56	26.25
Total lignanos	409.08 $\pm$ 1781.23	137.90 (112.26-169.39)	162.44 (129.55-203.67)	15.57-17001.38	75.00	130.14	211.89
<b>Cumestrol</b>	402.99 $\pm$ 1255.01	16.90 (9.27-30.80)	186.38 (131.61-263.95)	0.09-11642.66	1.41	3.65	433.37
<b>Resveratrol</b>	2.133 $\pm$ 21.11	1.00 (0.018-53.74)	2.91 (2.15-3.94)	0-211.2	0	0	0

DE= Desviación estándar; IC= Intervalo de confianza al 95%. \*Ajustados por el método de residuales de energía.

**Tabla 6.** Ingestión dietaria de flavonoides y fitoestrógenos totales en las mujeres del estudio (n=100)

Fitoestrógenos (ug/día)	Media $\pm$ DE	Media Geométrica (IC <sub>95%</sub> )	Media Geométrica* (IC <sub>95%</sub> )	Valor Min-Max	Percentiles		
					25	50	75
Naringenina	5352.04 $\pm$ 18833.65	1352.04 (760.38-2404.04)	1355.75 (900.96-2040.10)	0-151179	0	195.90	1191.3
Luteolina	470.91 $\pm$ 1080.92	97.02 (60.31-156.06)	156.62 (107.61-227.95)	0-6379.34	5.77	46.52	330.80
Kaempferol	475.50 $\pm$ 1274.47	138.42 (96.52-198.53)	327.31 (247.07-433.61)	0-8224.15	29.94	116.95	255.96
Quercetina	8170.23 $\pm$ 8954.26	4483.17 (3247.09-6189.79)	5202.13 (4090.36-6616.08)	0-56088.32	1514.44	5851.46	11276.8
Total Flav+Res	14470.83 $\pm$ 21693.44	7021.53 (5072.26-9719.90)	8431.68 (6578.49-10806.93)	0-160534	2775.47	8466.95	18208.0
<b>Fitoestrógenos totales</b>	16663.1 $\pm$ 22858.18	7387.14 (5431.92-10046.14)	10838.36 (8757.47-13413.69)	54.0-161359.5	3591.28	9841.55	20257.68

DE= Desviación estándar; IC<sub>95%</sub>= Intervalo de confianza al 95%; Flav= Flavonoides; Res= Resveratrol. \*Ajustados por el método de residuales de energía. Fitoestrógenos totales es la suma de isoflavonas, lignanos, cumestrol, flavonoides y resveratrol.

**Tabla 7.** Coeficiente de variación intraindividual e interindividual para la ingestión de energía, nutrimentos y fitoestrógenos de las mujeres del estudio

Nutrimento	Variación		
	Intraindividual	Interindividual	
	Dos recordatorios de 24 horas (n=50 mujeres)	Un recordatorio de 24 horas (n=100 mujeres)	Dos recordatorios de 24 horas (n=50 mujeres)
Energía	33.7	36.0	39.7
Proteína	31.7	46.3	37.5
Carbohidratos	38.1	44.8	41.5
Grasa	48.4	52.6	56.8
Colesterol	61.0	78.2	62.0
Fibra	44.2	54.9	47.5
Vitamina A	246.5	265.3	246.4
Vitamina C	157.0	166.2	155.5
Vitamina E	118.3	104.0	118.7
Daidzeína	166.7	432.0	165.0
Genisteína	229.6	452.5	227.5
Ecuol	104.8	134.8	120.3
Gliciteína	831.1	103.7	831.8
Biocanina A	125.3	140.1	125.1
Formononetina	117.6	129.4	116.9
Secoisolariciresinol	109.7	576.0	115.6
Matairesinol	101.4	282.0	100.4
Enterolactona	132.8	123.4	134.3
Enterodiol	155.2	123.0	157.0
Cumestrol	295.2	311.4	292.6
Naringenina	181.9	351.9	185.7
Luteolina	166.6	229.5	166.6
Kaempferol	194.1	268.0	193.9
Quercetina	98.9	109.6	98.9
Resveratrol	181.9	989.8	185.7



**Tabla 8.** Porcentaje de recuperación y coeficiente de variación promedio de los fitoestrógenos obtenido por la extracción líquido-líquido de muestra de orina fortificada a 200 ng/mL (n=16)

<b>Fitoestrógeno</b>	<b>Concentración obtenida (µg/L)</b>	<b>Concentración esperada (µg/L)</b>	<b>%RE</b>	<b>CV</b>
<b>Isoflavonas</b>				
Genisteína	49.18	55.48	87.00	3.39
Daidzeína	116.68	152.82	76.00	5.61
Gliciteína	34.53	30.05	111.00	4.12
Ecuol	42.39	44.71	90.00	7.13
Biocanina A	1.25	1.25	97.00	1.93
Formononetina	2.42	2.54	92.00	1.97
<b>Lignanós</b>				
Matairesinol	0.65	0.64	98.00	3.11
Secoisolariciresinol	3.46	5.80	59.00	4.56
Enterodiol	2.87	2.89	103.00	6.36
Enterolactona	64.94	56.79	110.00	3.86
<b>Cumestrol</b>	1.24	1.19	101.00	2.31
<b>Resveratrol</b>	11.87	17.04	50.00	9.78
<b>Flavonoides</b>				
Naringenina	135.42	163.43	83.00	5.02
Kaempferol	25.76	34.73	76.00	2.65
Luteolina	6.73	7.78	80.00	4.53
Quercetina	2.97	3.58	84.00	4.74

%RE= porcentaje de recuperación; CV= coeficiente de variación (%). Concentración obtenida por el método de extracción líquido-líquido. Concentración esperada considerando un 100% de recuperación.

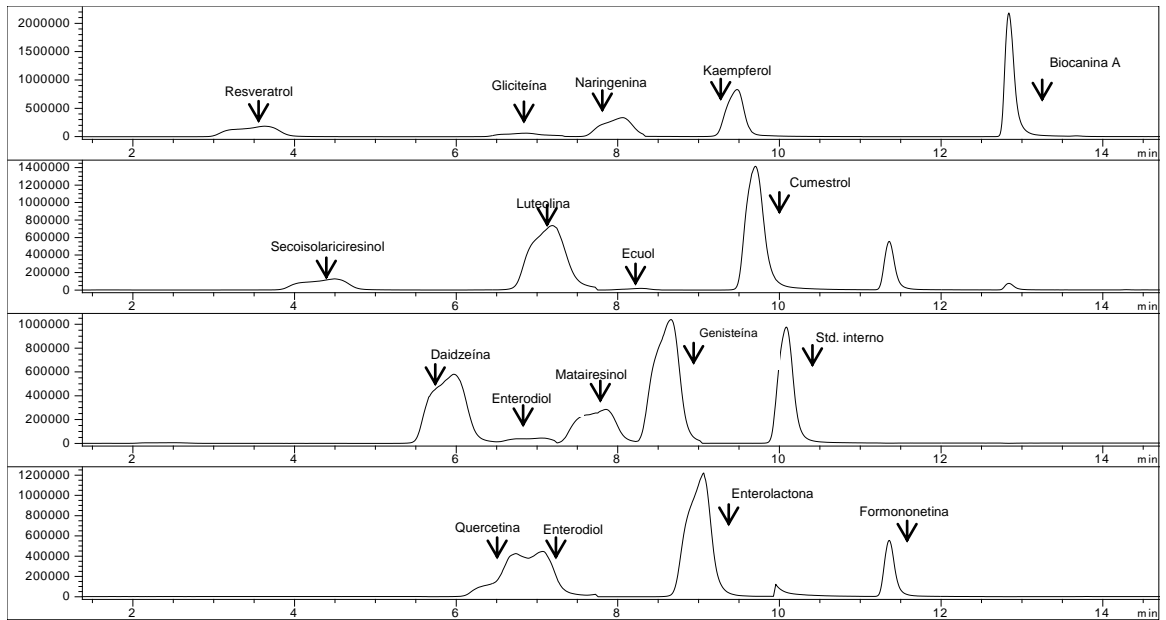
Los límites de detección (LD) y cuantificación (LC) del método se muestran en la tabla 9. Se establecieron los LD de 0.0011 ng/mL a 0.075 ng/mL y los LC de 0.0037 ng/mL a 0.25 ng/mL. Estos resultados muestran que el método de extracción líquido-líquido y el HPLC-ES-MS presentaron sensibilidad alta para el análisis de los fitoestrógenos en orina humana.

**Tabla 9.** Límites de detección y cuantificación del método de extracción líquido-líquido de fitoestrógenos en orina humana

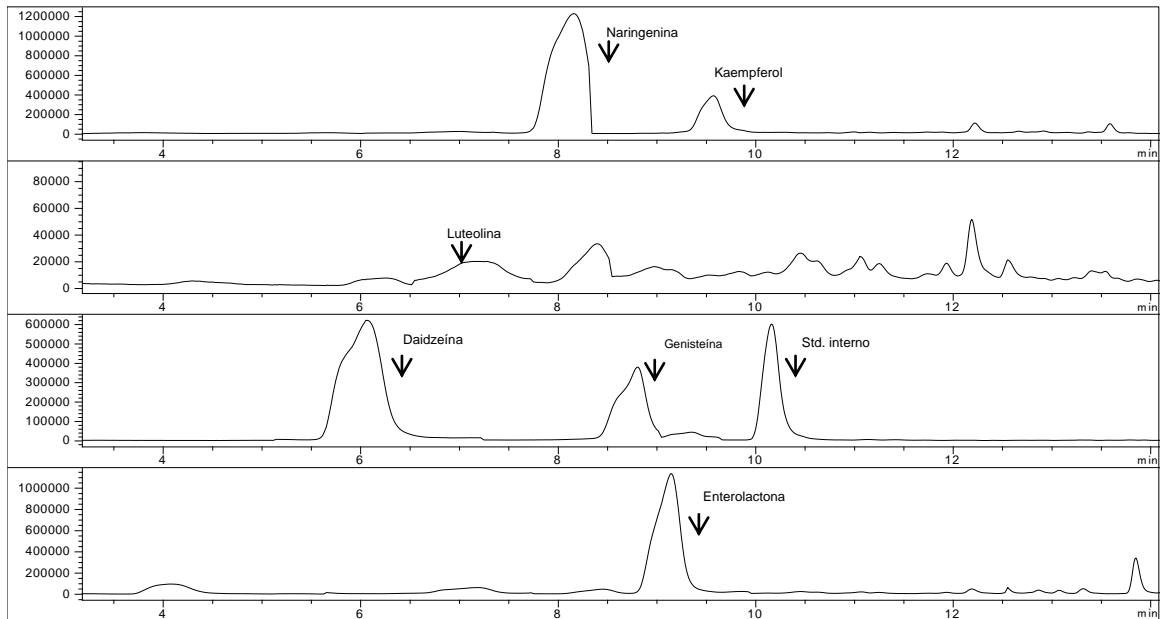
Fitoestrógeno	LD (ng/mL)	LC (ng/mL)	Fitoestrógeno	LD (ng/mL)	LC (ng/mL)
Biocanina A	0.00255	0.00850	Kaempferol	0.00381	0.01271
Genisteína	0.00199	0.00664	Luteolina	0.02898	0.09661
Daidzeína	0.04242	0.14141	Naringenina	0.00599	0.01999
Ecuol	0.06817	0.22724	Quercetina	0.06193	0.20645
Gliciteína	0.07552	0.25173	Resveratrol	0.01843	0.06143
Formononetina	0.00333	0.01113	Cumestrol	0.00116	0.00389
Matairesinol	0.05950	0.19836	Enterodiol	0.03999	0.13332
Secoisolariciresinol	0.00827	0.02758	Enterolactona	0.00111	0.00371

LD= Límite de detección; LC= Límite de cuantificación

Los cromatogramas típicos del espectrómetro de masas de la mezcla de estándares se muestran en la figura 2. El tiempo de retención para el resveratrol fue de 3.7 min y para biocanina A fue de 12.8 min. La figura 3 ilustra el cromatograma de la muestra problema. Los cromatogramas de los extractos fueron satisfactorios, sin interferencias en los tiempos de elución de los fitoestrógenos.



**Figura 2.** Ejemplo de un cromatograma de HPLC-ES-MS de los 16 estándares de fitoestrógenos.



**Figura 3.** Ejemplo de un cromatograma de HPLC-ES-MS de muestra de orina de 12 h de una voluntaria.

## Niveles Urinarios de Fitoestrógenos

El volumen de orina de 12 h recolectada fue de 0.22 a 1.7 L (volumen medio 0.74 L  $\pm$  0.30) y la concentración media de creatinina fue de 0.63 g/L  $\pm$  0.32. Los valores de excreción urinaria de las isoflavonas, los lignanos y los flavonoides de las participantes del estudio se presentan en las tablas 10, 11 y 12. Se observó una diferencia de hasta 2.4 veces entre el valor del percentil 25 y el del 75 para la mediana de la excreción urinaria de los fitoestrógenos individuales. Mientras que en los valores de los fitoestrógenos totales no hubo tal variación.

Los fitoestrógenos naringenina y enterolactona tuvieron las concentraciones más altas con una media geométrica (IC<sub>95%</sub>) de 107.95  $\mu$ g/g creatinina (83.22-140.02) y 87.44  $\mu$ g/g creatinina (70.44-108.54), respectivamente. Se encontró que la isoflavona biocanina A y el lignano matairesinol tuvieron las concentraciones más bajas, con una media geométrica menor a 2  $\mu$ g/g creatinina.

En la figura 4, se observa que no hubo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) en las concentraciones medias urinarias por grupos de fitoestrógenos entre las mujeres en estado pre y postmenopáusico. De igual manera, cuando se estratifica por nivel socioeconómico, IMC y estado civil, no se obtuvieron diferencias significativas. Con respecto a la frecuencia de detección, la daidzeína fue la isoflavona más detectada en la orina de 12 horas, seguida de la naringenina y la luteolina. La mayoría (75%) de los fitoestrógenos se detectaron en más de 77% de las muestras analizadas (Fig. 5). El enterodiol y el matairesinol fueron los menos frecuentes.

**Tabla 10.** Concentraciones urinarias de las isoflavonas ( $\mu\text{g/L}$ ) en las mujeres de este estudio. n=100

Fitoestrógeno ( $\mu\text{g/L}$ )	Media $\pm$ DE	Media Geométrica (IC <sub>95%</sub> )	Percentiles			Media Geométrica $\mu\text{g/g}$ creatinina (IC <sub>95%</sub> )
			25	50	75	
Daidzeína	116.68 $\pm$ 235.75	31.21 (21.95-44.37)	10.98	38.10	103.14	56.04 (39.69-79.11)
Genisteína	49.17 $\pm$ 100.52	17.38 (12.53-24.10)	4.62	18.35	48.77	30.97 (22.59-42.46)
Gliciteína	34.52 $\pm$ 88.32	25.52 (16.55-39.36)	0	0	25.77	43.53 (28.66-66.12)
Biocanina	1.25 $\pm$ 1.04	1.02 (0.89-1.17)	0.68	1.08	1.50	1.86 (1.59-2.18)
Formononetina	2.42 $\pm$ 1.71	2.31 (2.05-2.61)	1.49	2.16	3.28	4.19 (3.72-4.72)
Ecuol	42.39 $\pm$ 119.90	29.94 (25.28-35.46)	14.17	23.13	40.27	51.15 (44.04-59.41)
Total	246.45 $\pm$ 489.95	98.88 (75.94-128.75)	46.77	89.49	215.98	177.53 (138.46-227.63)

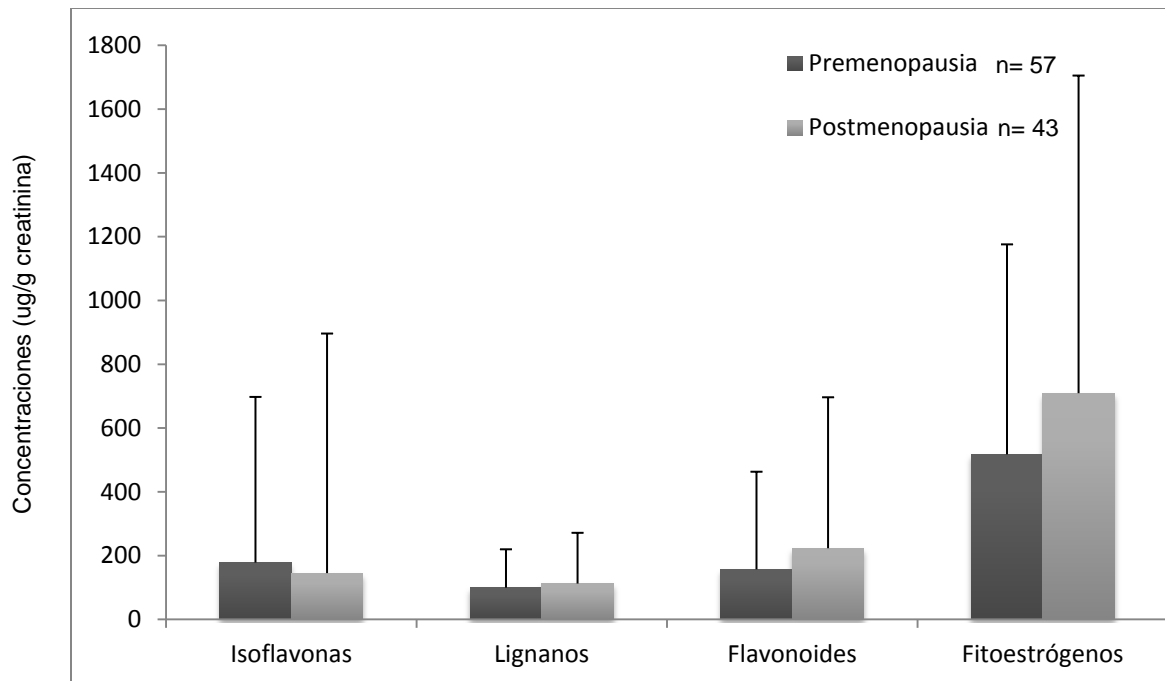
**Tabla 11.** Concentraciones urinarias de los lignanos ( $\mu\text{g/L}$ ) en las mujeres de este estudio. n=100

Fitoestrógeno ( $\mu\text{g/L}$ )	Media $\pm$ DE	Media Geométrica (IC <sub>95%</sub> )	Percentiles			Media Geométrica $\mu\text{g/g}$ creatinina (IC <sub>95%</sub> )
			25	50	75	
Secoisolariciresinol	3.45 $\pm$ 5.73	2.89 (2.36-3.55)	0.69	1.91	5.13	5.49 (4.3-6.86)
Matairesinol	0.64 $\pm$ 2.07	1.10 (0.63-1.90)	0	0	0.11	1.82 (1.01-3.26)
Enterodiol	2.86 $\pm$ 12.95	10.51 (5.93-18.65)	0	0	0	19.74 (11.95-32.60)
Enterolactona	64.94 $\pm$ 66.76	41.76 (33.47-51.88)	24.77	46.67	82.29	75.92 (59.80-96.40)
Total	71.91 $\pm$ 74.02	48.70(40.26-58.90)	28.92	55.31	93.31	87.44 (70.44-108.54)

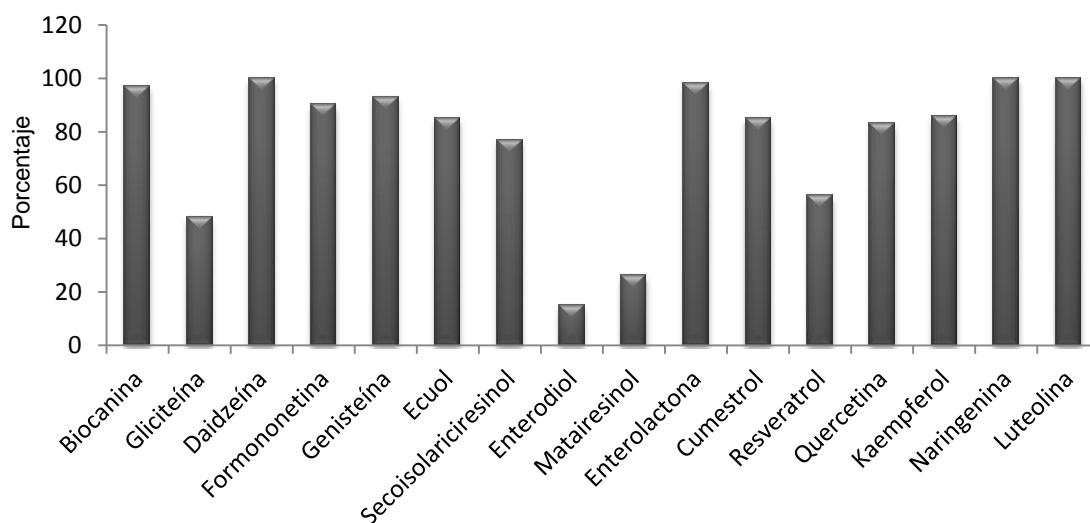
**Tabla 12.** Concentraciones urinarias del cumestrol, resveratrol, flavonoides y fitoestrógenos totales ( $\mu\text{g/L}$ ) en las mujeres de este estudio.  $n=100$

Fitoestrógeno ( $\mu\text{g/L}$ )	Media $\pm$ DE	Media Geométrica (IC <sub>95%</sub> )	Percentiles			Media Geométrica $\mu\text{g/g}$ creatinina (IC <sub>95%</sub> )
			25	50	50	
<b>Cumestrol</b>	1.24 $\pm$ 1.09	1.10 (0.91-1.33)	0.55	1.01	1.72	2.07 (1.71-2.50)
<b>Resveratrol</b>	11.86 $\pm$ 107.71	1.32 (0.89-1.96)	0	0.23	1.72	2.51 (1.69-3.73)
<b>Flavonoides</b>						
Luteolina	6.72 $\pm$ 32.45	2.57 (2.12-3.10)	1.40	2.38	4.31	4.61 (3.85-5.53)
Kaempferol	25.75 $\pm$ 54.98	12.98 (9.67-17.41)	2.13	10.39	26.10	22.99 (17.18-30.77)
Naringenina	135.41 $\pm$ 213.34	60.12 (46.28-78.12)	26.22	64.77	126.76	107.95 (83.22-140.02)
Quercetina	2.96 $\pm$ 7.14	2.15 (1.77-2.60)	0.71	1.83	3.34	3.92 (3.25-4.73)
Total Flav+Res	182.73 $\pm$ 248.40	94.48 (74.68-119.54)	47.81	98.07	208.90	169.64 (134.16-214.49)
<b>Fitoestrógenos</b>	502.34 $\pm$ 579.89	336.17 (283.63-398.44)	213.14	305.60	517.05	603.55 (510.78-713.17)

DE= Desviación estándar; Flav= Flavonoides; Res= Resveratrol; Fitoestrógenos= es la suma de las isoflavonas, lignanos, cumestrol, flavonoides y resveratrol; IC95%= intervalo de confianza al 95%.



**Figura 4.** Comparación de concentraciones (mediana  $\pm$  desviación estándar) de fitoestrógenos en orina humana por estado de menopausia. No hubo diferencias significativas ( $p > 0.05$ ) por estado de menopausia. Prueba no paramétrica de Mann-Whitney.



**Figura 5.** Porcentaje de detección de fitoestrógenos en orina de 12 h

## Correlaciones entre los Fitoestrógenos Dietarios Estimados por Recordatorio de 24 Horas y los Urinarios

Las asociaciones entre la ingestión y excreción de las isoflavonas, usando datos de la ingestión de estos compuestos ( $\mu\text{g}/\text{día}$ ) estimados del recordatorio de 24 h se muestran en la tabla 13. Se encontró una correlación positiva y significativa ( $r=0.46$ ,  $p<0.0001$ ) entre la ingestión y excreción promedio de las isoflavonas (suma de daidzeína, genisteína, ecuol, gliciteína, formononetina y biocanina A) de las isoflavonas. Las asociaciones fueron más débiles ( $r<0.17$ ,  $p>0.05$ ) para las isoflavonas individuales, excepto para la genisteína ( $r=0.37$ ,  $p<0.002$ ).

En la tabla 14 se presentan los coeficientes de correlación entre las estimaciones de ingestión dietaria y las concentraciones de los lignanos y sus metabolitos urinarios. Las asociaciones entre la ingestión y la excreción fueron débiles y no significativas cuando se consideran los lignanos individuales. Un comportamiento similar se presentó para todos los flavonoides individuales, a excepción de la naringenina que obtuvo una correlación moderada y significativa ( $r=0.62$ ,  $p<0.05$ ) (tabla 15).

Se observaron correlaciones significativas entre las concentraciones urinarias y la ingestión dietaria estimada de los lignanos ( $r=0.55$ ,  $p<0.05$ ) y los fitoestrógenos totales ( $r=0.41$ ,  $p<0.05$ ).

El coeficiente de correlación crudo entre los fitoestrógenos totales dietarios ( $\mu\text{g}/\text{d}$ ) y urinarios ( $\mu\text{g}/\text{g}$  creatinina) fue de 0.33 ( $p<0.001$ ), este incrementó a 0.41 ( $p<0.001$ ) después de ajustar por la atenuación de la variación intra-inter individual en los recordatorios de 24 h (tabla 15). Cuando las concentraciones de los fitoestrógenos ( $\mu\text{g}/\text{L}$ ) se convirtieron en tasas de excreción ( $\mu\text{g}/\text{día}$ ) en las bases de cada volumen de orina de 12 horas



multiplicada por dos para cada persona, la única diferencia fue un ligero aumento en la mayoría de las correlaciones.

Se obtuvieron correlaciones parciales, ajustadas por IMC, para el coeficiente de correlación ( $\mu\text{g/d}; \mu\text{g/g}$  creatinina) de genisteína ( $r=0.29$ ,  $p<0.05$ ), naringenina ( $r=0.50$ ,  $p<0.001$ ), isoflavonas totales ( $r=0.35$ ,  $p<0.001$ ), lignanos totales ( $r=0.43$ ,  $p<0.001$ ), flavonoides totales más resveratrol ( $r=0.20$ ,  $p<0.05$ ) y fitoestrógenos totales ( $r=0.32$ ,  $p<0.002$ ) (datos no mostrados en tabla).

**Tabla 13.** Coeficientes de correlación entre las isoflavonas y cumestrol dietarios (recordatorio de 24 h) y urinarios (orina de 12 h)

Fitoestrógeno	CC	CC	CC crudo	CC corr	p
	D, $\mu\text{g/d}$ ; O, $\mu\text{g/L}$	D, $\mu\text{g/d}$ ; O, $\mu\text{g/d}$	D, $\mu\text{g/d}$ ; O, $\mu\text{g/g}$ creatinina		
Daidzeína	0.092 (0.36)	0.107 (0.29)	0.081	0.099	0.42
Genisteína	0.332 (0.0007)	0.304 (0.002)	0.305	0.374	0.002
Ecuol	0.009 (0.93)	0.038 (0.705)	0.068	0.079	0.50
Gliciteína	0.092 (0.36)	0.085 (0.402)	0.099	0.120	0.33
Biocanina A	0.136 (0.17)	0.261 (0.009)	0.131	0.160	0.19
Formononetina	0.096 (0.34)	0.174 (0.08)	0.140	0.170	0.16
Isoflavonas totales	0.346* (0.0004)	0.263 (0.008)	0.377*	0.460	0.0001
Cumestrol	0.012 (0.90)	0.116 (0.25)	0.099	0.120	0.32

CC= Coeficiente de correlación de spearman, el valor de p se muestra entre paréntesis; D= dieta; O= orina; corr= coeficiente de correlación corregido por la variación intra-interindividual. \*Correlación de pearson, datos normales transformados con logaritmo natural más uno ( $\ln+1$ ).

**Tabla 14.** Coeficientes de correlación entre los lignanos dietarios (recordatorio de 24 h) y urinarios (orina de 12 h)

Fitoestrógeno	CC	CC	CC crudo	CC corr	p
	D, µg/d; O, µg/L	D, µg/d; O, µg/d	D, µg/d; O, µg/g creatinina		
Secoisolariciresinol	0.185 (0.06)	0.218(0.03)	0.190	0.23	0.06
Matairesinol	0.023(0.82)	0.026(0.79)	0.023	0.028	0.81
Enterolactona	0.055(0.59)	0.077(0.45)	0.055	0.067	0.58
Enterodiol	0.105(0.29)	0.108(0.28)	0.109	0.13	0.27
Lignanos totales	0.340( 0.0005)	0.313( 0.0015)	0.458*	0.55	0.0000

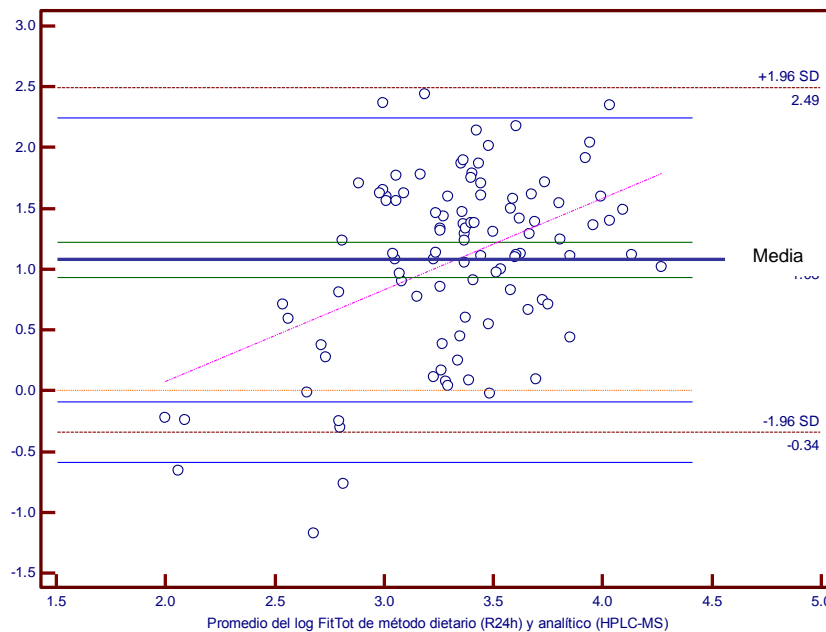
CC= Coeficiente de correlación de spearman, el valor de p se muestra entre paréntesis; D= dieta; O= orina; corr= coeficiente de correlación corregido por la variación intra-interindividual. \*Correlación de pearson, datos normales transformados con logaritmo natural más uno (ln+1).

**Tabla 15.** Coeficientes de correlación entre el resveratrol, los flavonoides y los fitoestrógenos totales dietarios (recordatorio de 24 h) y urinarios (orina de 12 h)

Fitoestrógeno	CC	CC	CC crudo	CC corr	p
	D, µg/d; O, µg/L	D, µg/d; O, µg/d	D, µg/d; O, µg/g creatinina		
Resveratrol	0.005 (0.96)	-0.0020(0.98)	0.0046	0.005	0.96
<b>Flavonoides</b>					
Naringenina	0.467 (0.0000)	0.4939(0.0000)	0.514	0.62	0.000
Luteolina	0.239 (0.02)	-0.1479(0.14)	-0.167	-0.20	0.09
Kaempferol	-0.010 (0.91)	0.0246(0.80)	0.039	0.04	0.69
Quercetina	-0.028 (0.78)	0.0554(0.58)	0.023	0.027	0.82
Flav totales + Res	0.124 (0.22)	0.2357(0.018)	0.202	0.24	0.043
<b>Fitoestrógenos totales</b>	0.234 (0.02)*	0.348(0.0004)*	0.334*	0.41	0.0007

CC= Coeficiente de correlación de spearman, el valor de p se muestra entre paréntesis; D= dieta; O= orina; Flav= flavonoides, Res= Resveratrol; corr= coeficiente de correlación corregido por la variación intra-interindividual. \*Correlación de pearson, datos normales transformados con logaritmo natural más uno (ln+1).

Tomando en cuenta que el coeficiente de correlación informa la variación de una medición en función de la otra, se exploró el grado de concordancia existente entre las dos mediciones con un gráfico de Bland y Altman para el total de fitoestrógenos (figura 6). De acuerdo con este gráfico el promedio de las diferencias entre ambos métodos no fue cercano a cero (línea de concordancia promedio perfecta) y los límites de concordancia inferior y superior (IC95%) fueron -0.34 (-0.5834 a -0.09178) y 2.49 (2.2489 a 2.7405), respectivamente. Se observó que el 97% de los puntos están dentro de los límites de concordancia al 95%. Por otro lado, el intervalo de confianza al 95% de la media de las diferencias (datos no mostrados en el gráfico) fue de 0.93 a 1.22. También se estimó el coeficiente de correlación de concordancia, el cual fue de 0.058 (IC<sub>95%</sub>)(-0.003 a 0.121).



**Figura 6.** Gráfico de Bland-Altman de la diferencia logarítmica (log) contra los promedios log de estimaciones de fitoestrógenos entre dos métodos diferentes, método dietario (recordatorio de 24 h) y analítico (HPLC-MS).

## DISCUSIÓN

En este estudio se observó que los fitoestrógenos dietarios se relacionaron con los urinarios, aunque de manera moderada y a nivel grupal. En el caso de los fitoestrógenos específicos, la genisteína y la naringenina dietaria fueron las únicas que se correlacionaron significativamente con sus respectivas concentraciones urinarias. El resultado para fitoestrógenos totales coincide con lo encontrado en algunos estudios donde se ha observado una correlación significativa (aunque mayor) entre los fitoestrógenos totales dietarios y los urinarios, como en el estudio de Atkinson y colaboradores (2002). Los autores obtuvieron una correlación menor ( $r=0.43$   $p<0.001$ ) entre genisteína dietaria y urinaria que la correlación estimada a nivel grupal de isoflavonas ( $r=0.53$ ,  $p<0.001$ ). La correlación alta encontrada para naringenina puede deberse al consumo relativamente elevado de este flavonoide, ya que se encuentra en los cítricos, como la naranja (junto con el plátano) que fue la fruta más consumida en el grupo de mujeres de este estudio.

La fuerza de la correlación entre la ingestión y la excreción urinaria varió grandemente de un compuesto a otro. Las isoflavonas urinarias son un indicador de la ingestión, absorción y metabolismo de las isoflavonas. Estos compuestos son hidrosolubles y excretados dentro de las 12 a 24 horas (Setchell y cols., 2001). En la población estudiada, se observaron correlaciones débiles pero significativas para la genisteína y las isoflavonas totales. Resultados similares se reportaron en la dieta occidental (Lampe y cols., 1999), estimando la asociación entre el consumo con 5 registros dietarios y excreción urinaria de 24 horas ( $r$  genisteína= 0.40,  $p=0.0001$ ;  $r$  isoflavonas totales= 0.39,  $p= 0.0001$ ). Sin embargo, correlaciones más débiles ( $0.09$ ,  $p>0.05$ ) se observaron para los metabolitos microbianos, como el ecuol, formado de la isoflavona daidzeína. Las grandes variaciones interindividuales observadas en la excreción de ecuol y en

la microbiota del hospedero explican esta asociación débil. Resultados similares se obtuvieron en un estudio observacional en el cual el mismo componente se midió en muestras de orina y su metabolito comparados con la ingestión calculada de registros dietarios y del contenido de isoflavonas en alimentos (Grace y cols., 2004).

Las correlaciones de las isoflavonas dietarias y urinarias en este estudio son mucho más bajas que las observadas en otros estudios de poblaciones asiáticas. Esto sugiere que estos compuestos urinarios podrían ser un mejor biomarcador para la evaluación de la ingestión de isoflavonas en población donde su consumo es común y mayor (Lee y cols., 2007). Por otro lado, no se encontraron asociaciones entre los lignanos totales dietarios y los enterolignanos (enterodiol y enterolactona). Esto resulta contradictorio ya que el secoisolariciresinol puede formar enterodiol y matairesinol por la flora bacteriana. De igual manera, el matairesinol y el enterodiol pueden metabolizarse hasta enterolactona. Sin embargo, se observó que los niveles urinarios (sin ajustar) de enterolactona fueron 23 veces más que los del enterodiol.

En cuanto a la valoración antropométrica de las participantes del estudio, la mayoría (79%) de las mujeres presentan sobrepeso y obesidad, de acuerdo al índice de masa corporal. Este porcentaje es mayor que lo reportado para mujeres adultas a nivel nacional (71.9%) y similar a lo reportado a nivel estatal (77.5%) en la Encuesta Nacional de Salud y Nutrición (Olaiz-Fernández y cols., 2006). Sin embargo y aunque no se presentaron los datos, se exploró el consumo de fitoestrógenos con respecto al IMC y se observó que la ingestión de estos compuestos no presentó diferencias en las mujeres estratificadas por IMC.

El consumo de la energía total proveniente de los alimentos podría estar subestimado. Estudios diversos (Johansson y cols., 2001) sugieren que la población con obesidad tiende a subvalorar de forma inconsciente la ingestión energética de un 33 a 62% comparada con la población sin obesidad. Sin embargo, la distribución del consumo de energía se encuentra dentro de las

recomendaciones nacionales (Bourges y cols., 2005). Resultados similares se reportaron en mujeres urbanas adultas de bajo ingreso del estado de Sonora, México (Quizán-Plata y Ortega, 2000).

La variación de la dieta entre las mujeres fue mayor que la de la dieta en días diferentes en un mismo individuo. Se presenta la misma tendencia en poblaciones de países subdesarrollados (Willett, 1990) donde la dieta es homogénea. Los valores de los CV para los macronutrientes fueron ligeramente menores que los observados en mujeres urbanas de Sonora (Ortega y Valencia, 2000). Sin embargo, se obtuvieron CV inter e intraindividuales altos para el colesterol y las vitaminas. Esta variación podría explicarse por el consumo de cantidades pequeñas y con menor frecuencia de los alimentos de origen animal consumidos en poblaciones de bajo ingreso, como la de este estudio. De igual manera, el consumo de frutas y verduras es escaso y estacional.

Existe información limitada acerca de los niveles de ingestión dietaria de los fitoestrógenos, estimada por recordatorio de 24 h, en mujeres de países occidentales, especialmente para la población general. La ingestión media diaria estimada de isoflavonas en la población de este estudio ( $1.38 \text{ mg/d} \pm 5.70$ ) está dentro del intervalo de lo reportado en estudios previos (Chun y cols., 2009; Horn-Ross y cols., 2006) para mujeres americanas, y cuarenta veces más bajo que lo estimado en mujeres japonesas (Arai y cols., 2000). Mientras que los consumos de lignanos y cumestrol fueron mayores que los reportados en la población general americana ( $161 \text{ } \mu\text{g/d}$ , 9–719 y  $157 \text{ } \mu\text{g/d}$ , 7–474) (Horn-Ross y cols., 2006). Esto podría deberse a la inclusión del consumo de enterolactona, proveniente de los alimentos de origen animal, en la suma de los lignanos totales. De igual manera, el consumo mayor de frijol en la población de este estudio ( $57.3 \text{ g/d}$ ) que en la población americana ( $7.5 \text{ g/d}$ ) (USDA, 2011), podría explicar la ingestión alta de cumestrol.

En general, el consumo mayor de isoflavonas que de lignanos por parte de las mujeres del estudio, podría explicarse en parte por la adición de varios alimentos específicos (por ejemplo los alimentos de origen animal y productos industrializados) fuentes de isoflavonas en la base de datos (Kuhnle y cols., 2008b; Patisaul y Jefferson, 2010).

Por otro lado, en comparación con otros países occidentales, la ingestión diaria de flavonoides, estimada por recordatorio de 24 h, fue menor que lo observado en estudios estadounidenses y europeos. En un estudio (Mullie y cols., 2007) realizado con mujeres en Bélgica, se estimó el consumo de flavonoides utilizando 4 diarios de alimentos no consecutivos. Se encontraron valores ligeramente mayores (naringenina 7.7 mg/d  $\pm$  12, kaempferol 4.6 mg/d  $\pm$  4.2 y quercetina 12 mg/d  $\pm$  7.9) a los reportados en este estudio, excepto para luteolina que fue similar (0.3 mg/d  $\pm$  0.3). Para la población general de EUA se han reportado consumos mayores de hasta 100 mg/d para el total de flavonoides (Chun y cols., 2005). Sin embargo, estas estimaciones consideraron otros flavonoides a la suma total y que en el presente estudio no se estimaron. Además, uno de estos estudios se basó en la conversión del consumo *per cápita* de frutas y verduras a flavonoides totales. La base de datos no explica estas diferencias, ya que se utilizó la misma base de datos de flavonoides elaborada por la USDA que otros estudios han utilizado (Johannot y Somerset, 2005; Sampson y cols., 2002). Cuando las estimaciones de cada uno de los cuatro flavonoides se comparan por grupos de flavonoides al cual corresponden (flavonoles, flavonas, flavanonas y flavanoles) se demuestran resultados similares a la población de EUA (Chun y cols., 2007).

En este estudio se observó una variación de considerable amplitud en la ingestión de todos los fitoestrógenos. Esto coincide con los CV intra-individual altos que se obtuvieron. Esta variación en la dieta de las mujeres no está reportada, limitando así las comparaciones de nuestro estudio con otros. Sin embargo, Wakai y colaboradores en 1999 obtuvieron un coeficiente de

variación intraindividual de 89.1% para daidzeína y genisteína, pero estimado por 16 registros pesados. De tal forma que los CV observados en nuestro estudio podrían contrastarse con la variación alta de la fibra y de las vitaminas, compuestos presentes en los alimentos fuente de fitoestrógenos, como algunos cereales, frutas, verduras, entre otros.

Los 16 fitoestrógenos analizados se encontraron en la mayoría de las muestras de orina, lo que coincide con estudios previos (Valentin-Blasini y cols., 2003). Los fitoestrógenos con los niveles promedio ( $\mu\text{g/L}$ ) más altos y frecuentes en la orina fueron naringenina, daidzeína, enterolactona y genisteína. Sin embargo, la concentración promedio (geométrico) de la enterolactona es 5.6 veces menor que la reportada ( $226 \mu\text{g/L}$ ) en mujeres americanas (Valentin-Blasini y cols., 2005), probablemente debido a la dieta baja en cereales y granos enteros.

Similar a los datos dietarios, las concentraciones urinarias de isoflavonas totales fueron mayores que las de los lignanos. Sin embargo, estas concentraciones (ajustadas por creatinina) no reflejan una dieta típica en poblaciones occidentales, la cual es más alta en lignanos que en isoflavonas (CDC, 2009). Estas diferencias podrían explicarse en cierta manera a que la mayoría de los estudios evalúan como isoflavonas totales la suma de la genisteína, daidzeína y ecuol. En nuestro estudio, se consideraron adicionalmente en la suma los niveles urinarios de gliciteína, formononetina y biocanina A.

Adicionalmente, se observó una tasa de excreción mayor de ecuol en el presente estudio que en estudios previos en poblaciones occidentales (CDC, 2009; Setchell y Cole, 2006). Esto puede deberse a diferencias interindividuales en la microflora y a factores dietarios como el consumo mayor de daidzeína, la cual es biotransformada a ecuol en el tracto gastrointestinal por la microflora bacteriana. Incluso, en un estudio previo con ratones (Touillaud y cols., 2006) y humanos (Lampe y cols., 1998) se reportó que la producción de ecuol podría



promoverse por la fibra dietaria. Sin embargo, los estudios con humanos son todavía inconsistentes (Gardana y cols., 2009; Setchell y Cole, 2006). El consumo de fibra en la región noroeste de México es en general alto (González 2008), y las mujeres de este estudio no fueron la excepción, ya que el consumo de fibra fue 5 g más que en la población americana (Anderson y cols., 2005).

La genisteína y la daidzeína urinarias fueron las isoflavonas más abundantes. Sin embargo, sus valores medios corresponden a la décima y tercera parte de los valores medios para genisteína y daidzeína dietarias, respectivamente. Esto coincide con lo reportado para las recuperaciones urinarias de estudios de dosis respuesta, donde los porcentajes de recuperación de las dosis para la genisteína y daidzeína fueron de 12% y 37%, respectivamente (Pérez-Jiménez y cols., 2010). En cuanto a los lignanos, los niveles urinarios de enterodiol fueron similares a los reportados por la NHANES (Encuesta Nacional de salud y nutrición de los EUA) en el 2003-2004 (CDC, 2009).

La concentración urinaria del cumestrol fue mucho menor que para los lignanos e isoflavonas. Esta diferencia puede atribuirse a las tasas de ingestión baja del cumestrol vía alimentos, dado que este compuesto está presente en un número pequeño de alimentos, como germinado de alfalfa y de frijol, brócoli, frijol, entre otros (de Kleijn y cols., 2001). Sólo el 2%, 3% y 42% de las mujeres consumieron frijol germinado, brócoli y frijol, respectivamente.

Para los flavonoides, se observó que la quercetina fue la más consumida, pero la menos excretada. Lo anterior podría explicarse en base a que algunos polifenoles, como la quercetina, tienen baja absorción intestinal, son altamente metabolizables o rápidamente eliminados (Manach y cols., 2004). Holmman y colaboradores (1995) demostraron que los glucósidos de quercetina fueron más eficientemente absorbidos que la quercetina pura. La explicación bioquímica para que los glucósidos de quercetina se absorban mejor es que la biodisponibilidad difiere entre las fuentes de alimentos, dependiendo del tipo de

glucósido que contenga. Por ejemplo, la cebolla contiene glucósidos, y es mejor fuente de quercetina biodisponible que las manzanas o el té, las cuales contienen rutina y otros glucósidos (Manach y cols., 2005). Así, la excreción urinaria de algunos flavonoides depende de su ingestión y de su biodisponibilidad.

El gráfico de Bland y Altman mostró que el promedio de las diferencias no fue cercano a cero, esto indica que los dos métodos probados produjeron resultados diferentes. También, la línea de regresión detectó la situación típica de una diferencia proporcional, donde la diferencia (dispersión alrededor de la línea de referencia) entre los métodos tiende a ser mayor a medida que el promedio aumenta. Por otro lado, el gráfico mostró que la mayoría de los valores obtenidos estaban comprendidos entre los límites de concordancia, por lo que desde un punto de vista estadístico podría concluirse que los métodos evaluados ofrecen una gran confiabilidad. Sin embargo, los límites de concordancia muy amplios y el coeficiente de correlación de concordancia podrían indicar que no hubo suficiente concordancia entre las estimaciones de fitoestrógenos totales del recordatorio de 24 horas y el análisis por HPLC-MS.

## CONCLUSIÓN

En este estudio se observaron asociaciones débiles, moderadas y significativas para la genisteína, la naringenina, las isoflavonas totales, los lignanos totales, los flavonoides y el resveratrol y los fitoestrógenos totales.

La correlación modesta de naringenina sugiere una tendencia a utilizar sus niveles urinarios como indicador de su consumo dietario actual o bien como un índice de calidad para la estimación de su consumo verdadero. Aún cuando la variabilidad intraindividual sea alta, el recordatorio de 24 h puede producir estimaciones adecuadas del consumo promedio.

Debido a la escasez de tablas de composición de fitoestrógenos en los alimentos regionales y a la información limitada del consumo de fitoestrógenos estimado por recordatorio de 24 horas en la población occidental, se necesitan investigaciones futuras para asegurar el uso de los fitoestrógenos en la orina como una medida alternativa a la evaluación dietaria.

Este estudio es el primer paso hacia la generación de datos de referencia o comparativos de la ingestión dietaria actual de fitoestrógenos en mujeres adultas del Noroeste de México.

El método y el sistema de análisis por HPLC-MS mostraron una buena sensibilidad y recuperación de las muestras, y aunque la estabilidad y validez analítica necesitan trabajarse aún más, las concentraciones urinarias de los fitoestrógenos pudieron medirse de forma precisa y confiable.

Los resultados indican que, al menos es la población estudiada, los niveles urinarios de naringenina y los fitoestrógenos grupales y totales podrían utilizarse como marcadores de su ingestión dietaria reciente debido a su recuperación alta en orina y correlación moderada y significativa con la cantidad consumida.

## BIBLIOGRAFÍA

- Anderson J, Perryman S, Young L. Dietary Fiber. No. 9.333. Colorado State University Extension-Nutrition Resources. Retrieved July 20, 2007, from Colorado State University 2005 [Noviembre, 2011]; Disponible en: <http://www.ext.colostate.edu/pubs/foodnut/09333.html>.
- Arai Y, Uehara M, Sato Y, Kimira M, Eboshida A, Adlercreutz H, cols. Comparison of Isoflavones Among Dietary Intake, Plasma Concentration and Urinary Excretion for Accurate Estimation of Phytoestrogen Intake. *J Epidemiol*. 2000;10 (2):127-35.
- Atkinson C, Skor HE, Fitzgibbons ED, Scholes D, Chen C, Wähälä K, cols. Overnight urinary isoflavone excretion in a population of women living in the United States, and its relationship to isoflavone intake. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2002;11:253-60.
- Beaton G, Milner J, McGuire V, Feather T, Little J. Source of variance in 24-hour dietary recall data: implications for nutrition study design and interpretation. Carbohydrate sources, vitamins, and minerals. *Am J Clin Nutr*. 1983;37(6):986-95.
- Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. 1986;i:307-10.
- Bolca S, Wyns C, Possemiers S, Depypere H, De Keukeleire D, Bracke M, cols. Cosupplementation of Isoflavones, Prenylflavonoids, and Lignans Alters Human Exposure to Phytoestrogen-Derived 17 $\beta$ -Estradiol Equivalents. *J Nutr*. 2009;139(12):2293-300.
- Bourges H, Casanueva E, Rosado J. Recomendaciones de ingestión de nutrimentos para la población mexicana, bases fisiológicas Tomo II. Mexico: Medica panamericana; 2005.
- Buzzard M. In: Willett W, editor. *Nutritional Epidemiology*. New York: Oxford University Press; 1998. 24-Hour dietary recalls; p. 50-73.
- Byers T. Nutrition monitoring and surveillance. In: Willett WC, ed. *Nutritional Epidemiology*. 2nd ed. New York, NY: Oxford University Press. 1992:347-56.
- Camberos M. La pobreza regional de Sonora de cara al siglo XXI. *Revista Sonarida, SEC-Sonora-Comisión Sonora-Arizona, Hermosillo, Son.*, 2008:21-24. ARBITRADA
- Cameron. The methods of auxological anthropometry. In Falkner Rand Tanner JM. *Human Growth. Post natal growth*. Plenum press. London. 1978.
- Cassidy A, Albertazzi P, Lise N, Hall W, Williamson G, Tetens I, cols. Critical review of health effects of soyabean phyto-oestrogens in post-menopausal women. *Proc Nutr Soc*. 2006;65:76-92.

- CDC. Fourth National Report on Human Exposure to Environmental Chemicals 2009 [Consultado Abril, 2011]; Disponible en: <http://www.cdc.gov/exposurereport/pdf/FourthReport.pdf>.
- Chun OK, Chung SJ, Song WO. Estimated Dietary Flavonoid Intake and Major Food Sources of U.S. Adults. *J Nutr.* 2007;137(5):1244-52.
- Chun OK, Chung SJ, Song WO. Urinary Isoflavones and Their Metabolites Validate the Dietary Isoflavone Intakes in US Adults. *J Am Diet Assoc.* 2009;109:245-54.
- Chun OK, Kim D-O, Smith N, Schroeder D, Han JT, Lee CY. Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the American diet. *J Sci Food Agric.* 2005;85:1715-24.
- COT. Committee on Toxicity of Chemicals in Food, Consumer Products and the Environment. Phytoestrogens and Health [Internet]. London: Food Standard Agency; 2003 [Consultado 01 Mayo, 2010]; Disponible en: <http://www.food.gov.uk/multimedia/pdfs/phytoreport0503>.
- de Kleijn MJJ, van der Schouw YT, Wilson PWF, Adlercreutz H, Mazur W, Grobbee DE, cols. Intake of Dietary Phytoestrogens Is Low in Postmenopausal Women in the United States: The Framingham Study. *J Nutr.* 2001;131(6):1826-32.
- FDA US. Guidance for industry bioanalytical method validation. Rockville: MD:CDER; 2001 [Consultado 01 Diciembre, 2011] Disponible en: <http://www.fda.gov/cder/guidance/index.htm>
- Gardana C, Canzi E, Simonetti P. The role of diet in the metabolism of daidzein by human faecal microbiota sampled from Italian volunteers. *J Nutr Biochem.* 2009;20(12):940-7.
- Grace P, Taylor J, Low Y, Luben R, Mulligan A, Botting N, cols. Phytoestrogen concentrations in serum and spot urine as biomarkers for dietary phytoestrogen intake and their relation to breast cancer risk in European prospective investigation of cancer and nutrition-norfolk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2004;13:698 - 708.
- González LE. Cambios en el patrón de consumo de alimentos y su relación con riesgo de enfermedades crónicas en la población sonorenses [Tesis Maestría]. Hermosillo, Sonora: Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C.; 2008.
- Hollman P, de Vries J, van Leeuwen S, Mengelers M, Katan M. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. *Am J Clin Nutr.* 1995;62(6):1276-82.
- Horn-Ross PL, Barnes S, Lee M, Coward L, Mandel JE, Koo J, cols. Assessing Phytoestrogen Exposure in Epidemiologic Studies: Development of a Database (United States). *Cancer Causes Control.* 2000;11(4):289-98.
- Horn-Ross PL, Barnes S, Lee VS, Collins CN, Reynolds P, Lee MM, cols. Reliability and validity of an assessment of usual phytoestrogen consumption (United States). *Cancer Causes and Control.* 2006;17:85-93.

- Jellife BD, Jellife P. Community Nutritional Assessment. Oxford Medical Publications. N.Y. 1989.
- Johannot L, Somerset SM. Age-related variations in flavonoid intake and sources in the Australian population. *Public Health Nutr.* 2005;9(8):1045-54.
- Johansson G, Wikman A, Ahrén A, Hallmans G, Johansson I. Underreporting of energy intake in repeated 24-hour recalls related to gender, age, weight status, day of interview, educational level, reported food intake, smoking habits and area of living. *Public Health Nutr.* 2001;4(4):919-27.
- Kuhnle G, Dell'aquila C, Aspinall S, Runswick S, Mulligan A, Bingham S. Phytoestrogen content of cereals and cereal-based foods consumed in the UK. *Nutr Cancer.* 2009a;61(3):302-9.
- Kuhnle G, Dell'Aquila C, Aspinall S. Phytoestrogens content of fruits and vegetables commonly consumed in the UK based on LC-MS and <sup>13</sup>C-labelled standards. *Food Chemistry* (in press). 2009b;doi:doi:10.1016/j.foodchem.2009.03.002.
- Kuhnle GGC, Dell'Aquila C, Aspinall SM, Runswick SA, Mulligan AA, Bingham SA. Phytoestrogen Content of Beverages, Nuts, Seeds, and Oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2008a;56(16):7311-5.
- Kuhnle GGC, Dell'Aquila C, Aspinall SM, Runswick SA, Mulligan AA, Bingham SA. Phytoestrogen Content of Foods of Animal Origin: Dairy Products, Eggs, Meat, Fish, and Seafood. *J Agr Food Chem.* 2008b;56(21):10099-104.
- Lampe J, Karr S, Hutchins A, Slavin J. Urinary equol excretion with a soy challenge: influence of habitual diet. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1998;217(3):335-9.
- Lampe JW, Gustafson DR, Hutchins AM, Martini MC, Li S, Wähälä K, cols. Urinary Isoflavonoid and Lignan Excretion on a Western Diet: Relation to Soy, Vegetable, and Fruit Intake. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1999;8(8):699-707.
- Lee S-A, Wen W, Xiang Y-B, Barnes S, Liu D, Cai Q, cols. Assessment of Dietary Isoflavone Intake among Middle-Aged Chinese Men. *J Nutr.* 2007;137(4):1011-6.
- Manach C, Scalbert A, Morand C, Rémésy C, Jiménez L. Polyphenols: food sources and bioavailability. *Am J Clin Nutr.* 2004;79(5):727-47.
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Remesy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr.* 2005;81(1):230S-42.
- Milder I, Arts I, van de P, Venema D, Hollman P. Lignan contents of Dutch plant foods: a database including lariciresinol, pinoresinol, secoisolariciresinol and matairesinol. *Br J Nutr.* 2005;93:393 - 402.
- Mullie P, Clarys P, Deriemaeker P, Hebbelinck M. Estimation of Daily Human Intake of Food Flavonoids. *Plant Foods Hum Nutr (Formerly Qualitas Plantarum).* 2007;62(3):93-8.

- Muñoz EC, Sánchez-Castillo CP, Bourges H. Recomendaciones de ingestión de nutrimentos para la población mexicana, bases fisiológicas Tomo II Mexico: Medica panamericana; 2005. Isoflavonas; p. 351-9.
- Olaiz-Fernández G, Rivera-Dommarco J, Shamah-Levy T, Rojas R, Villapaldo S, Hernández M, cols. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2006 [Internet]. Cuernava, México: Instituto Nacional de Salud Pública-Secretaría de Salud; 2006 [Consultado Noviembre 28, 2010]; Disponible en: <http://www.insp.mx/ensanut/ensanut2006.pdf>.
- Ortega M, Valencia M. Measuring the intakes of foods and nutrients of marginal populations in north-west Mexico. *Public Health Nutr.* 2000;00:1-5.
- Ortega MI, Quizán T, Morales G, Preciado M. Cálculo de ingestión dietaria y coeficientes de adecuación a partir de registro de 24 horas y frecuencia de consumo de alimentos. Estimación del consumo de alimentos Hermosillo, Sonora: Centro de Investigación en alimentación y Desarrollo, AC. 1999.
- Patisaul HB, Jefferson W. The pros and cons of phytoestrogens. *Front Neuroendocrinol.* 2010;31(4):400-19.
- Pérez-Jiménez J, Hubert J, Hooper L, Cassidy A, Manach C, Williamson G, cols. Urinary metabolites as biomarkers of polyphenol intake in humans: a systematic review. *Am J Clin Nutr.* 2010;92(4):801-9.
- Pillow P, Duphorne C, Chang S. Development of a database for assessing dietary phytoestrogen intake. *Nutr Cancer* 1999;33(1):3-19.
- Quizán-Plata T, Ortega MI. Diseño y validación de una herramienta para identificar riesgo dietario en mujeres adultas de bajo ingreso (Design and validation of a tool dietary risk in low-income adult women). *Nutr Clin.* 2000;2:128-35.
- Sampson L, Rimm E, Hollman PC, de Vries JH, MB K. Flavonol and flavone intake in US health professionals. *J Am Diet Assoc.* 2002;102(10):1414-20.
- Setchell KDR, Brown NM, Desai P, Zimmer-Nechemias L, Wolfe BE, Brashear WT, cols. Bioavailability of Pure Isoflavones in Healthy Humans and Analysis of Commercial Soy Isoflavone Supplements. *J Nutr.* 2001;131(4):1362S-75.
- Setchell KDR, Cole SJ. Method of Defining Equol-Producer Status and Its Frequency among Vegetarians. *J Nutr.* 2006;136(8):2188-93.
- Spencer JPE, Abd El Mohsen MM, Minihane A-M, Mathers JC. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *Br J Nutr.* 2008;99:12-22.
- Spierto FW, Hannon WH, Gunter EW, Smith SJ. Stability of urine creatinine. *Clin Chim Acta.* 1997;264(2):227-32.
- Thompson L, Boucher B, Liu Z, Cotterchio M, Kreiger N. Phytoestrogen content of foods consumed in Canada, including isoflavones, lignans, and coumestan. *Nutr Cancer.* 2006;54(2):184-201.

- Touillaud M, Thiebaut A, Niravong M, Boutron-Ruault M, Clavel-Chapelon F. No association between dietary phytoestrogens and risk of premenopausal breast cancer in a French cohort study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2006;15:2574 - 6.
- Tseng M, Olufade T, Kurzer MS, Wähälä K, Fang CY, van der Schouw YT, Daly MB. Food frequency questionnaires and overnight urines are valid indicators of daidzein and genistein intake in U.S. women relative to multiple 24-h urine samples. *Nutr Cancer.* 2008;60(5):619-26.
- USDA. United States Department of Agriculture, Agriculture Research Service. 2007. USDA Database for the Flavonoid Content of Selected Foods, Release 2.1 [Base de datos en Internet]. Nutriente Data Laboratory. 2007 [Consultado 11 Junio, 2011]. Disponible en: <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata>.
- USDA. United States Department of Agriculture, Agriculture Research Service. 2008. USDA Database for the Isoflavone Content of Selected Foods, Release 2.0 [Base de datos en Internet]. Nutriente Data Laboratory. 2008 [Consultado 10 Mayo, 2010]. Disponible en: <http://www.ars.usda.gov/nutrientdata/isoflav>
- USDA. United States Department of Agriculture. Food availability (per capita) 2011 [Noviembre, 2011]; Disponible en: <http://www.ers.usda.gov/data/foodconsumption/FoodAvailspreadsheets.htm>.
- Valentin-Blasini L, Blount BC, Caudill SP, Needham LL. Urinary and serum concentrations of seven phytoestrogens in a human reference population subset. *J Expo Anal Environ Epidemiol.* 2003;13(4):276-82.
- Valentin-Blasini L, Sadowski MA, Walden D, Caltabiano L, Needham LL, Barr DB. Urinary phytoestrogen concentrations in the U.S. population (1999-2000). *J Expo Anal Environ Epidemiol.* 2005;15(6):509-23.
- Wakai K, Egami I, Kato K, Kawamura T, Tamakoshi A, Lin Y, cols. Dietary Intake and Sources of Isoflavones Among Japanese. *Nutr Cancer.* 1999;33(2):139-45.
- Willett W, editor. *Nutritional Epidemiology.* New York: Oxford University Press; 1990.
- Willett W, Howe G, Kushi L. Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr.* 1997;65(4):1220S-8S.
- Wyns C, Bolca S, De Keukeleire D, Heyerick A. Development of a high-throughput LC/APCI-MS method for the determination of thirteen phytoestrogens including gut microbial metabolites in human urine and serum. *J Chromat B.* 2010;878(13-14):949-56.
- Zamora-Ros R, Andres-Lacueva C, Lamuela-Raventós RM, Berenguer T, Jakszyn P, Martínez C, cols. Concentrations of resveratrol and derivatives in foods and estimation of dietary intake in a Spanish population: European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Spain cohort. *Br J Nutr.* 2008;100:188-96.



## CAPÍTULO 2

### ASOCIACIÓN ENTRE LOS FITOESTRÓGENOS ESTIMADOS POR CUESTIONARIO DE FRECUENCIA DE CONSUMO DE ALIMENTOS Y LOS ANALIZADOS EN LA ORINA DE 12 HORAS DE MUJERES DEL NOROESTE DE MÉXICO

#### RESUMEN

**Objetivo:** Evaluar la correlación de los fitoestrógenos estimados por un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos con sus niveles correspondientes en orina de 12 h en mujeres adultas del noroeste de México.

**Sujetos y métodos:** Participaron 100 mujeres mayores de 25 años, aparentemente saludables residentes en Hermosillo, Sonora. Se aplicó un cuestionario sociodemográfico y un cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos (CFCA) adaptado para estimar el consumo de fitoestrógenos. Las concentraciones urinarias de estos compuestos se analizaron por cromatografía de líquidos de alta resolución acoplada a masas.

**Resultados:** La naringenina fue el fitoestrógeno más consumido (MG= 12.4 mg/d, IC<sub>95%</sub>=10.24-15.08) y excretado (MG= 107.9 µg/gcreatinina, IC<sub>95%</sub>=83.2-140.0) por esta población. La correlación de spearman entre el resveratrol estimado por el CFCA y urinario fue débil (r= 0.27, p<0.05). Mientras que la asociación entre los fitoestrógenos totales (isoflavonas totales, lignanos totales, cumestrol, resveratrol y flavonoides totales) fue moderada (r=0.59, <0.0001). Para el resto de los fitoestrógenos no se encontraron asociaciones.

**Conclusión:** El CFCA resultó útil para cuantificar el consumo de fitoestrógenos totales, por lo que se puede utilizar para este propósito en estudios donde se pretenda evaluar la relación de estos compuestos dietarios con la enfermedad.

## INTRODUCCIÓN

Las enfermedades crónicas, como las cardiovasculares (115.8/100,000 hab), la diabetes (88.5/100,000 hab) y los tumores malignos son las principales causas de muerte de las mujeres en el estado de Sonora, que forma parte de la región noroeste de México. Dentro de los tumores malignos, el cáncer de mama (16.7/100,000 hab) ocupa el primer lugar en mortalidad (SINAIS, 2008). Uno de los factores ambientales que pueden jugar un papel en la etiología de las enfermedades mencionadas es la dieta (Henderson y cols. 1996). Así, componentes dietarios como los fitoestrógenos podrían tener efectos benéficos en estas enfermedades, debido a que diversos estudios epidemiológicos han observado este efecto positivo (Linseisen y cols., 2004). Los fitoestrógenos son cualquier sustancia o metabolito que induce respuestas biológicas en vertebrados y que puede imitar o modular las acciones de los estrógenos endógenos, lo cual sucede porque se une a los receptores de estrógenos. Sin embargo, la evidencia epidemiológica permanece todavía inconsistente e inconclusa (Ward y Kuhnle, 2010).

Para poder evaluar la asociación entre dieta y enfermedad es necesario estimar la ingestión de los compuestos dietarios. Existen métodos dietarios como los cuestionarios de frecuencia de consumo de alimentos (CFCA) que evalúan la ingestión habitual de un componente dietario o alimento en la población. Esta herramienta es frecuentemente el método de elección en estudios epidemiológicos sobre dieta y enfermedades crónicas, debido a su habilidad para estimar la ingestión usual a largo plazo. La técnica, aunque de mayor complejidad que los registros de un día, provee información más útil en términos de la dieta habitual de los individuos y se puede aplicar al gran número de sujetos requeridos en la mayoría de los estudios de investigación epidemiológica (Bhakta y cols., 2005).

Por lo anterior, es importante evaluar el grado en el cual un cuestionario puede medir la ingestión verdadera de nutrimentos. Debido a que la medición de los errores asociados con la evaluación del cuestionario disminuye el riesgo relativo estimado en estudios de dieta y riesgo de enfermedades, tales estudios deben incorporar una validación del cuestionario en el que se compare éste con un método de referencia más preciso (Kaaks y Ferrari, 2006), como podrían ser análisis de fitoestrógenos en orina. La estimación de estos compuestos en la orina podría proporcionar un mejor índice de ingestión, ya que monitorean las concentraciones totales de los metabolitos del intestino delgado y grueso. Para los compuestos polifenólicos como los fitoestrógenos, esto puede parecer un enfoque atractivo. Sin embargo, la relación entre la ingestión dietaria y las concentraciones resultantes de biomarcadores en fluidos biológicos es altamente compleja (Spencer y cols., 2008). Así, el objetivo de esta investigación fue evaluar la asociación de los fitoestrógenos estimados por un CFCA con sus niveles correspondientes de fitoestrógenos en orina.

## SUJETOS Y MÉTODOS

La selección de la muestra, la población estudiada y el procedimiento de análisis de fitoestrógenos en la orina de 12 h fueron los mismos que los mencionados en el capítulo uno.

### Instrumento de Recolección de la Información Dietaria: Cuestionario de Frecuencia de Consumo de Alimentos

La recolección de la información dietaria se realizó por personal entrenado a través de visitas a los hogares de las mujeres. Se aplicó un cuestionario semicuantitativo de frecuencia de consumo de alimentos (CFCA) para estimar la ingestión de fitoestrógenos en las mujeres de este estudio.

El CFCA previamente validado en mujeres adultas de Hermosillo, Sonora (Quizán-Plata y Ortega, 2000) fue adaptado para el propósito de este estudio. El objetivo de este CFCA fue obtener información del consumo habitual de fitoestrógenos en la dieta un año previo a la entrevista. Para la adaptación de esta herramienta se consideraron como criterios de inclusión los alimentos que contienen fitoestrógenos y los más consumidos por la población sonoreense. Este cuestionario contiene un total de 162 alimentos clasificados en 11 grupos, de los cuales un subconjunto de 133 alimentos (frutas, vegetales, cereales, semillas, bebidas) son fuentes importantes de fitoestrógenos y sus metabolitos. El cuestionario está estructurado con una escala de cinco categorías de frecuencia de consumo (diario, semanal, mensual, anual, raramente) y tres opciones del tamaño de la porción (pequeña, mediana, grande). Se agregaron los métodos de cocción (crudo, hervido/cocido, al vapor, horneado/asado, microondas, frito y no aplica) a la lista de los alimentos para completar el CFCA. De forma adicional se

incluyó una sección final con preguntas abiertas sobre la ingestión de suplementos o vitaminas en los últimos 12 meses.

### Evaluación Dietaria de los Fitoestrógenos

La estimación del consumo habitual de los 16 fitoestrógenos en la dieta de las participantes se evaluó utilizando el diccionario de alimentos desarrollado por Ortega y colaboradores (1999). Este diccionario se amplió con una base de datos de alimentos fuentes de fitoestrógenos, proceso ya descrito previamente en el capítulo uno. La información de la frecuencia y tamaño de la porción consumida de cada alimento listado en el CFCA se capturó en una hoja de cálculo de *Excel versión 7.0*. Se calcularon los gramos consumidos por día de cada alimento (Ortega y cols., 1999). La estimación de los fitoestrógenos de los datos del CFCA se calculó por el método de producto-suma:

$$\text{Ingestión total de fitoestrógenos específico/día} = \text{suma } [(A)(B)(C)]/365$$

Donde:

A= ponderación de frecuencia de consumo de un alimento, es decir el número de porciones al año

B= tamaño de la porción consumida ponderada de ese alimento

C= gramos de fitoestrógeno específico contenido en un tamaño de porción estándar del alimento

La ingestión de isoflavonas totales se calculó como la suma de daidzeína, ecuol, genisteína, gliciteína, formononetina y biocanina A. La ingestión de los lignanos totales incluyó la suma de secoisolariciresinol, matairesinol,

enterolactona y enterodiol. Los flavonoides incluyeron naringenina, kaempferol, luteolina y quercetina. Para los fitoestrógenos totales se estimó la suma de las isoflavonas, los lignanos, los flavonoides, el cumestrol y el resveratrol en microgramos por día ( $\mu\text{g}/\text{d}$ ).

### Análisis Estadístico

La normalidad de la distribución de cada variable se verificó usando la prueba de kurtosis. Se realizó un análisis descriptivo para describir las características principales de las mujeres, la ingestión dietaria y excreción urinaria de los fitoestrógenos. Debido a la distribución sesgada de las variables dietarias y concentraciones urinarias de fitoestrógenos, se utilizaron valores de mediana (intervalo intercuartílico) y media geométrica ( $\text{IC}_{95\%}$ ). Se incluyó la media ( $\pm \text{DE}$ ) con el objetivo de comparar los resultados de estudios previos.

La excreción urinaria de fitoestrógenos se ajustó por gramo de creatinina para estandarizar por las diferencias entre individuos en la producción de orina.

El consumo de macronutrientes, micronutrientes y fitoestrógenos se ajustó por el método de residuales de energía propuesto por Willett. Para este análisis, se utilizó el modelo  $a + b$ , donde  $a$  es el residual del modelo de regresión con ingestión del nutriente como la variable dependiente ( $x$ ) y la ingestión de la energía total como la variable independiente ( $y$ ) y  $b$  es la ingestión esperada del nutriente para una persona con ingestión media de energía (ver anexo dos). Este ajuste se realizó debido a que la mayoría de los nutrientes están asociados con la ingestión energética total, ya sea porque contribuyen directamente a la ingestión de energía o porque las personas que consumen más energía total también comen, en promedio, más de todos los nutrientes y componentes dietarios específicos (Willett y cols., 1997).

Para comparar la ingestión de fitoestrógenos por estado de menopausia, los datos se transformaron y se utilizó la prueba *t* de Student para muestras independientes.

Las correlaciones de Spearman se utilizaron para evaluar la asociación entre la ingestión dietaria habitual de fitoestrógenos, estimados del CFCA, y la excreción urinaria de fitoestrógenos en orina total de 12 h (en  $\mu\text{g}/\text{mg}$  creatinina) para datos anormales. Cuando los datos presentaron una distribución normal después de la transformación, se eligió el coeficiente de correlación de Pearson. Este análisis se realizó con datos transformados logarítmicamente. Se utilizó el logaritmo natural ( $\ln$ ) + 1, debido a un gran número de valores cero en el conjunto de los datos.

Los coeficientes de correlación se calcularon entre la ingestión de fitoestrógenos específicos ( $\mu\text{g}/\text{d}$ ) y la concentración urinaria de cada uno de los fitoestrógenos, isoflavonas totales, lignanos totales, flavonoides totales más resveratrol, fitoestrógenos totales, utilizando tres unidades:  $\mu\text{g}/\text{L}$ ,  $\mu\text{g}/\text{d}$  y  $\mu\text{g}/\text{g}$  creatinina. Coeficientes de correlación parciales entre la ingestión de fitoestrógenos individuales y totales y sus correspondientes excreciones urinarias se calcularon después de ajustar por el IMC.

Adicionalmente, y como complemento al análisis de correlación, se calculó la magnitud de la correlación usando el método gráfico de Bland y Altman (Bland y Altman, 1986). Se utilizó el promedio de las diferencias entre los fitoestrógenos determinados por ambos métodos como variable dependiente contra el promedio de ambos métodos como variable independiente.

Los análisis estadísticos se realizaron utilizando el programa estadístico STATA versión 8.0 (StataCorp LP, College Station, TX). La significancia estadística se consideró a un valor de  $p \leq 0.05$ .

## RESULTADOS

Las características sociodemográficas y antropométricas de las mujeres están detalladas en el capítulo uno. En general, la edad media de las mujeres (n=100) fue 44.7 años y la mayoría son de nivel socioeconómico bajo (62%) y con educación básica (78%).

### Ingestión de Nutrientes y Fitoestrógenos

El consumo de los nutrientes, estimado por un CFCA, se presenta en la tabla 1. El porcentaje de energía consumida en la dieta diaria proveniente de los carbohidratos, las grasas y las proteínas fue de 57.5%, 29.1%, 13.4%, respectivamente. Estos valores están dentro de los intervalos establecidos en la distribución de energía proveniente de macronutrientes que corresponde a 55-63%, 25-30% y 10-12% para carbohidratos, grasas y proteínas, respectivamente (Bourges y cols., 2005).

El consumo de los fitoestrógenos estimados en las mujeres del estudio utilizando el CFCA se muestra en las tablas 2, 3 y 4. El principal compuesto consumido fue la naringenina (15.9 mg/d  $\pm$  16.6), seguido de la quercetina (13.0 mg/d  $\pm$  6.9) y el cumestrol (1.8 mg/d  $\pm$  1.7).

En la tabla 5 se muestran los coeficientes de variación interindividual entre el consumo dietario de los individuos. Se compararon con los obtenidos por un recordatorio de 24 horas (previamente calculados y detallados en el capítulo uno). Se obtuvo una variación interindividual para la mayoría de los nutrientes y fitoestrógenos menor en el CFCA que la estimada por un recordatorio de 24 horas.



## Niveles Urinarios de Fitoestrógenos

En la figura 1 se presenta la distribución de las concentraciones de los fitoestrógenos en la orina de 12 h, basadas en el ajuste por gramo de creatinina excretada por cada participante. Debido a la distribución no normal de los datos, éstos se transformaron y utilizaron para la comparación de medias por estado de menopausia. No se encontraron diferencias significativas en la excreción de los fitoestrógenos totales ( $p > 0.05$ ) entre las mujeres pre y postmenopáusicas, por estado civil, IMC y nivel socioeconómico (datos no mostrados).

La tabla 6 muestra los valores medios de excreción para las isoflavonas. Estos resultados indican un nivel de excreción más bajo para biocanina A y formononetina y el más alto para daidzeína. Con respecto a las mediciones urinarias de los lignanos, la enterolactona fue la más detectada y la más excretada en la orina de 12 h. El nivel medio más bajo encontrado fue para el lignano matairesinol, el cual se metaboliza a enterolactona (tabla 7).

**Tabla 1.** Consumo de nutrimentos de la población de estudio (n=100)

Nutrimento/día	Media $\pm$ DE	Media geométrica	Media geométrica*	Valor Min – Max	Percentiles		
		(IC <sub>95%</sub> )	(IC <sub>95%</sub> )		25	50	75
Energía (Kcal)	2562.9 $\pm$ 952.3	2399.2 (2230.6-2580.5)	----- (2230.6-2580.5)	822.9-6108.8	1860.4	2294.4	3148.2
Proteína (g)	83.7 $\pm$ 29.8	78.8 (73.5-84.5)	81.8 (78.1-85.6)	28.7-183.9	59.0	78.3	101.2
Grasa (g)	82.4 $\pm$ 34.9	75.5 (69.5-82.1)	79 (74.2-84.1)	30.2-171.3	58.0	76.3	102.6
Carbohidratos (g)	370.5 $\pm$ 161.3	341.4 (315.3-369.8)	365 (352.5-378)	107.7-1077.4	259.9	328.7	454.9
Fibra (g)	42.6 $\pm$ 19.4	38.8 (35.7-42.3)	40.6 (37.9-43.4)	13.3-111.5	28.5	37.2	52.3
Colesterol (mg)	292.4 $\pm$ 259.5	237.4 (210.2-268.1)	244.3 (217-274.9)	52.7-2354.2	149.6	238.0	337.3
Vitamina C (mg)	268.7 $\pm$ 160.8	231.4 (207.8-257.7)	248.3 (227-271.7)	77.6-914.7	159.2	237.7	305.6
Vitamina A ( $\mu$ gRAE)	2251.7 $\pm$ 2085.3	1646.7 (1407.9-1926.0)	2021 (1754-2328.7)	243.8-13606.3	967.0	1612.7	2955.9
Vitamina E (mg)	6.72 $\pm$ 3.1	6.1 (5.6-6.7)	6.3 (5.9-6.8)	1.9-20.4	4.5	6.2	8.1

DE= Desviación estándar; IC= Intervalo de confianza al 95%; RAE= equivalentes de actividad de retinol; \*Ajustados por el método de residuales de energía

**Tabla 2.** Ingestión dietaria de isoflavonas en la población de estudio (n=100)

Fitoestrógeno (ug/día)	Media $\pm$ DE	Media Geométrica (IC <sub>95%</sub> )	Media Geométrica* (IC <sub>95%</sub> )	Valor Min – Max	Percentiles		
					25	50	75
Daidzeína	1151.3 $\pm$ 3210.5	356.4 (273.2-465.0)	388.5 (283.0-533.2)	30.7-26249.2	145.8	232.5	867.9
Genisteína	1641.8 $\pm$ 5251.1	427.9 (323.1-566.7)	642.0 (452.0-911.9)	38.0-46147.1	156.0	296.0	1023.7
Gliciteína	14.8 $\pm$ 16.9	11.0 (9.7-12.7)	11.3 (9.5-13.4)	2.6-107.3	7.3	10.4	15.3
Biocanina A	310.0 $\pm$ 279.0	211.5 (176.0-254.1)	270.5 (236.0-310.0)	23.7-1420.6	105.9	234.8	471.5
Formononetina	53.0 $\pm$ 110.2	26.1 (21.3-32.0)	28.3 (22.6-35.5)	1.6-775.7	14.2	23.9	42.1
Ecuol	2.4 $\pm$ 1.9	1.8 (1.6-2.1)	1.9 (1.6-2.2)	0.2-13.6	1.1	1.9	3.16
Total de isoflavonas	3173.4 $\pm$ 8456.3	1325.1 (1069.3-1642.2)	1167.8 (893.7-1526.0)	288.6-73036.6	625.8	1025.4	2297.8

DE= Desviación estándar; IC= Intervalo de confianza al 95%. \*Ajustados por el método de residuales de energía. Total de isoflavonas es la suma de daidzeína, genisteína, gliciteína, biocanina A, formononetina y ecuol.

**Tabla 3.** Ingestión dietaria de lignanos, cumestrol y resveratrol en la población de estudio (n=100)

Fitoestrógeno (ug/día)	Media $\pm$ DE	Media geométrica (IC <sub>95%</sub> )	Media geométrica* (IC <sub>95%</sub> )	Valor Min – Max	Percentiles		
					25	50	75
Lignanos							
Secoisolariciresinol	712.8 $\pm$ 1448.4	321.3 (258.7-399.1)	490.5 (386.2-623.0)	69.6-11771.1	145.6	222.5	586.9
Matairesinol	20.1 $\pm$ 14.0	16.9 (15.0 -18.9)	17.1 (15.3-19.1)	3.9-97.3	11.4	17.2	25.1
Enterodiol	67.4 $\pm$ 37.6	58.9 (53.2-65.4)	62.5 (57.2-68.3)	16.4-222.3	42.3	61.8	80.9
Enterolactona	183.2 $\pm$ 115.2	154.7 (137.9-173.7)	156.7 (138.0-177.9)	49.9-662.7	102.2	158.9	227.6
Total de lignanos	1171.4 $\pm$ 1585.6	803.3 (689.6-935.7)	872.7 (741.6-1027.0)	240.9-13334.7	439.9	754.9	1182.3
Cumestrol	1850.4 $\pm$ 1730.1	1186.4 (966.9-1455.6)	1568.8 (1332.6 -1846.8)	96.6-8633.7	541.9	1361.3	2900.6
Resveratrol	17.4 $\pm$ 43.7	3.5 (2.3-5.2)	5.2 (3.6-7.4)	0.006-290.3	0.9	4.4	14.8

DE= Desviación estándar; IC= Intervalo de confianza al 95%. \*Ajustados por el método de residuales de energía. Total de lignanos es la suma de secoisolariciresinol, matairesinol, enterodiol y enterolactona.

**Tabla 4.** Ingestión dietaria de flavonoides y fitoestrógenos totales en la población de estudio (n=100)

Fitoestrógeno (ug/día)	Media $\pm$ DE	Media Geométrica (IC <sub>95%</sub> )	Media Geométrica* (IC <sub>95%</sub> )	Valor Min – Max	Percentiles		
					25	50	75
Naringenina	15939.8 $\pm$ 16581.77	9943.8 (8085.0-12223.0)	12428.8 (10242.7-15081.5)	737.2-111746.8	4887.4	10996.7	20758.7
Luteolina	1555.0 $\pm$ 1355.1	1141.1 (972.0-1339.7)	1239.0 (1065.4-1441.0)	143.9-8772.0	670.2	1221.0	2019.4
Kaempferol	826.1 $\pm$ 685.4	631.6 (546.2-730.4)	625.5 (537.6 -727.7)	120.0-4519.6	351.1	649.6	1018.3
Quercetina	13023.0 $\pm$ 6912.2	11219.8 (10009.2-12576.8)	11352.9 (10129.2-12724.4)	1719.3-31993.1	7873.9	11472.2	17864.5
Total flav+res	31361.4 $\pm$ 20862.4	25785.2 (22711.3-29275.3)	26773.3 (23600.4-30372.9)	6526.7-139335.1	15617.2	28100.6	39287.7
Total fitoestrógenos	37556.6 $\pm$ 23908.8	31447.3 (27897.8-35448.4)	31957.2 (28321.9-36059.1)	9016.1-159239.4	20716.0	32716.4	48553.5

DE= Desviación estándar; IC<sub>95%</sub>= Intervalo de confianza al 95%; Flav= Flavonoides (suma de naringenina, luteolina, kaempferol y quercetina); Res= Resveratrol. \*Ajustados por el método de residuales de energía. Fitoestrógenos totales es la suma de isoflavonas, lignanos, cumestrol, flavonoides y resveratrol

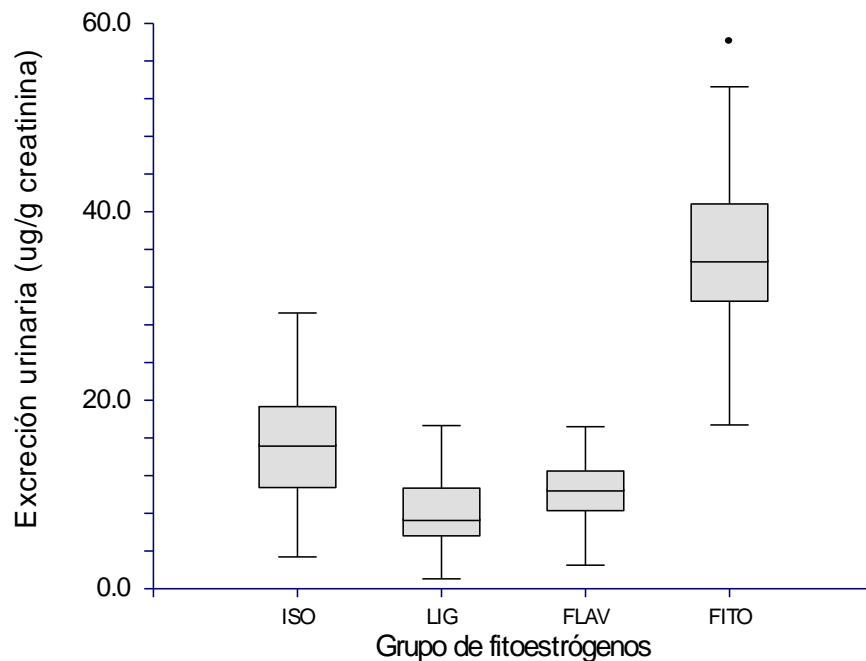
**Tabla 5.** Coeficiente de variación interindividual para las ingestiones de energía, nutrimentos y fitoestrógenos estimado en el CFCA

Nutrimento	Variación interindividual		Fitoestrógenos	Variación interindividual	
	Un recordatorio de 24 horas (n=100)	*CFCA (n=100)		Un recordatorio de 24 horas (n=100)	*CFCA (n=100)
Energía	36.0	37.1	Daidzeína	432.0	278.8
Proteína	46.3	35.7	Genisteína	452.5	319.8
Carbohidratos	44.8	43.5	Ecuol	134.8	80.7
Grasa	52.6	42.3	Gliciteína	103.7	113.5
Colesterol	78.2	88.7	Biocanina A	140.1	90
Fibra	54.9	45.5	Formononetina	129.4	207.1
Vitamina A	265.3	92.6	Secoisolariciresinol	576.0	203.2
Vitamina C	166.2	59.8	Matairesinol	282.0	69.5
Vitamina E	104.0	46.6	Enterolactona	123.4	62.9
			Enterodiol	123.0	55.7
			Cumestrol	311.4	93.5
			Naringenina	351.9	104
			Luteolina	229.5	87.1
			Kaempferol	268.0	82.9
			Quercetina	109.6	53
			Resveratrol	989.8	250

\*CFCA= Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos; n= tamaño de la muestra

Entre el grupo de los flavonoides, la concentración de la naringenina fue aproximadamente 40 veces mayor que la de quercetina (tabla 8). Por otro lado, los niveles detectables en los 16 fitoestrógenos analizados por HPLC-ES-MS, se encontraron en las 100 muestras de orina de 12 h de las participantes.

Los resultados individuales muestran una gran variación interindividual, particularmente para el resveratrol (de 0 a 1490.8) con un coeficiente de variación interindividual de 250% (datos no mostrados en tabla).



**Figura 1.** Distribución de fitoestrógenos urinarios en las participantes (n=100). La concentración es expresada en  $\mu\text{g/g}$  creatinina en una escala logarítmica más uno. Isoflavonas totales (ISO), lignanos totales (LIG), flavonoides totales (FLAV), Fitoestrógenos totales (FITO)

**Tabla 6.** Concentraciones urinarias de isoflavonas ( $\mu\text{g/L}$ ) en las mujeres de este estudio, n=100

Fitoestrógeno ( $\mu\text{g/L}$ )	Media $\pm$ DE	Media Geométrica (IC <sub>95%</sub> )	Percentiles			Media Geométrica $\mu\text{g/g}$ creatinina (IC <sub>95%</sub> )
			25	50	75	
Daidzeína	116.68 $\pm$ 235.75	31.21 (21.95-44.37)	10.98	38.10	103.14	56.04 (39.69-79.11)
Genisteína	49.17 $\pm$ 100.52	17.38 (12.53-24.10)	4.62	18.35	48.77	30.97 (22.59-42.46)
Gliciteína	34.52 $\pm$ 88.32	25.52 (16.55-39.36)	0	0	25.77	43.53 (28.66-66.12)
Biocanina	1.25 $\pm$ 1.04	1.02 (0.89-1.17)	0.68	1.08	1.50	1.86 (1.59-2.18)
Formononetina	2.42 $\pm$ 1.71	2.31 (2.05-2.61)	1.49	2.16	3.28	4.19 (3.72-4.72)
Ecuol	42.39 $\pm$ 119.90	29.94 (25.28-35.46)	14.17	23.13	40.27	51.15 (44.04-59.41)
Total	246.45 $\pm$ 489.95	98.88 (75.94-128.75)	46.77	89.49	215.98	177.53 (138.46-227.63)

**Tabla 7.** Concentraciones urinarias de los lignanos ( $\mu\text{g/L}$ ) en las mujeres de este estudio, n=100

Fitoestrógeno ( $\mu\text{g/L}$ )	Media $\pm$ DE	Media Geométrica (IC <sub>95%</sub> )	Percentiles			Media Geométrica $\mu\text{g/g}$ creatinina (IC <sub>95%</sub> )
			25	50	75	
Secoisolariciresinol	3.45 $\pm$ 5.73	2.89 (2.36-3.55)	0.69	1.91	5.13	5.49 (4.39-6.86)
Matairesinol	0.64 $\pm$ 2.07	1.10 (0.63-1.90)	0	0	0.11	1.82 (1.01-3.26)
Enterodiol	2.86 $\pm$ 12.95	10.51 (5.93-18.65)	0	0	0	19.74 (11.95-32.60)
Enterolactona	64.94 $\pm$ 66.76	41.67 (33.47-51.88)	24.77	46.67	82.29	75.92 (59.80-96.40)
Total	71.91 $\pm$ 74.02	48.70(40.26-58.90)	28.92	55.31	93.31	87.44 (70.44-108.54)



**Tabla 8.** Concentraciones urinarias del cumestrol, resveratrol, flavonoides y fitoestrógenos totales ( $\mu\text{g/L}$ ) en las mujeres de este estudio, n=100

Fitoestrógeno ( $\mu\text{g/L}$ )	Media $\pm$ DE	Media Geométrica (IC <sub>95%</sub> )	Percentiles			Media Geométrica* $\mu\text{g/g creatinina (IC}_{95\%})$
			25	50	75	
Cumestrol	1.24 $\pm$ 1.09	1.10 (0.91-1.33)	0.55	1.01	1.72	2.07 (1.71-2.50)
Resveratrol	11.86 $\pm$ 107.71	1.32 (0.89-1.96)	0	0.23	1.72	2.51 (1.69-3.73)
Flavonoides						
Luteolina	6.72 $\pm$ 32.45	2.57 (2.12-3.10)	1.40	2.38	4.31	4.61 (3.85-5.53)
Kaempferol	25.75 $\pm$ 54.98	12.98 (9.67-17.41)	2.13	10.39	26.10	22.99 (17.18-30.77)
Naringenina	135.41 $\pm$ 213.34	60.12 (46.28-78.12)	26.22	64.77	126.76	107.95 (83.22-140.02)
Quercetina	2.96 $\pm$ 7.14	2.15 (1.77-2.60)	0.71	1.83	3.34	3.92 (3.25-4.73)
Total Flav+Res	182.73 $\pm$ 248.40	94.48 (74.68-119.54)	47.81	98.07	208.90	169.64 (134.16-214.49)
Fitoestrógenos	502.34 $\pm$ 579.89	336.17 (283.63-398.44)	213.14	305.60	517.05	603.55 (510.78-713.17)

DE= Desviación estándar; IC95%= intervalo de confianza al 95%; Flav= Flavonoides; Res= Resveratrol; Fitoestrógenos= es la suma de las isoflavonas totales, lignanos totales, cumestrol, flavonoides totales y resveratrol; n= tamaño de muestra; \* ajustados por gramos de creatinina.

Correlaciones entre los Fitoestrógenos Dietarios Estimados por CFCA y los  
Urinarios

En la tabla 9, 10 y 11 se resumen los coeficientes de correlación obtenidos para las concentraciones urinarias de los diferentes fitoestrógenos y los gramos consumidos de éstos, estimados por un CFCA, en las mismas mujeres. La mayoría de estos resultados mostraron una nula o muy débil correlación. En el resveratrol se observó una asociación significativa débil (tabla 11). Sin embargo y a pesar de que a nivel individual los fitoestrógenos dietarios no presentaron correlación con los urinarios, los fitoestrógenos totales analizados en la dieta mostraron una correlación considerable y significativa con los fitoestrógenos totales analizados en la orina ( $r=0.59$ ,  $p<0.0001$ ).

**Tabla 9.** Coeficientes de correlación entre las isoflavonas y cumestrol dietarios (CFCA) y urinarios (orina de 12 h)

Fitoestrógeno	CC	CC	CC crudo	CC corr	p
	D, µg/d; O, µg/L	D, µg/d; O, µg/d	D, µg/d; O, µg/g creatinina		
Daidzeína	-0.056 ( 0.576)*	-0.044 ( 0.663)*	-0.020	-0.024	0.840
Genisteína	-0.064 ( 0.525)*	-0.049 ( 0.627)*	-0.028	-0.034	0.784
Ecuol	0.148 ( 0.143)*	0.143 ( 0.155)*	0.108*	0.126	0.283
Gliciteína	0.041 ( 0.687)	0.062 ( 0.538)	0.045	0.055	0.657
Biocanina A	0.018 ( 0.857)	0.113 ( 0.261)	0.010*	0.012	0.923
Formononetina	-0.003 ( 0.974)	0.006 ( 0.954)	-0.020	-0.024	0.841
Isoflavonas totales	-0.019 ( 0.852)*	0.014 ( 0.890)*	0.002*	0.002	0.983
Cumestrol	-0.045 ( 0.658)*	0.031 ( 0.759)*	-0.026*	-0.035	0.800

CC= Coeficiente de correlación de spearman; D= dieta; O= orina; Isoflavonas totales= daidzeína + genisteína + gliciteína + biocanina A + formononetina. \*Correlación de pearson, datos normales transformados con logaritmo natural más uno (ln+1). corr= coeficiente de correlación corregido por la variación intra-interindividual. El valor de p se muestra entre paréntesis.

**Tabla 10.** Coeficientes de correlación entre los lignanos dietarios (CFCA) y urinarios (orina de 12 h)

Fitoestrógeno	CC	CC	CC crudo	CC corr	p
	D, µg/d; O, µg/L	D, µg/d; O, µg/d	D, µg/d; O, µg/g creatinina		
Secoisolariciresinol	-0.035 ( 0.730)*	-0.015 ( 0.885)*	0.008*	0.009	0.934
Matairesinol	0.061 ( 0.547)	0.062 ( 0.538)	0.065	0.079	0.524
Enterolactona	-0.061 ( 0.544)	0.099 ( 0.326)*	-0.029	-0.035	0.775
Enterodiol	-0.136 ( 0.178)	-0.131 ( 0.194)	-0.138	-0.168	0.171
Lignanos totales	0.106 ( 0.295)	0.110 ( 0.276)	-0.092*	-0.111	0.359

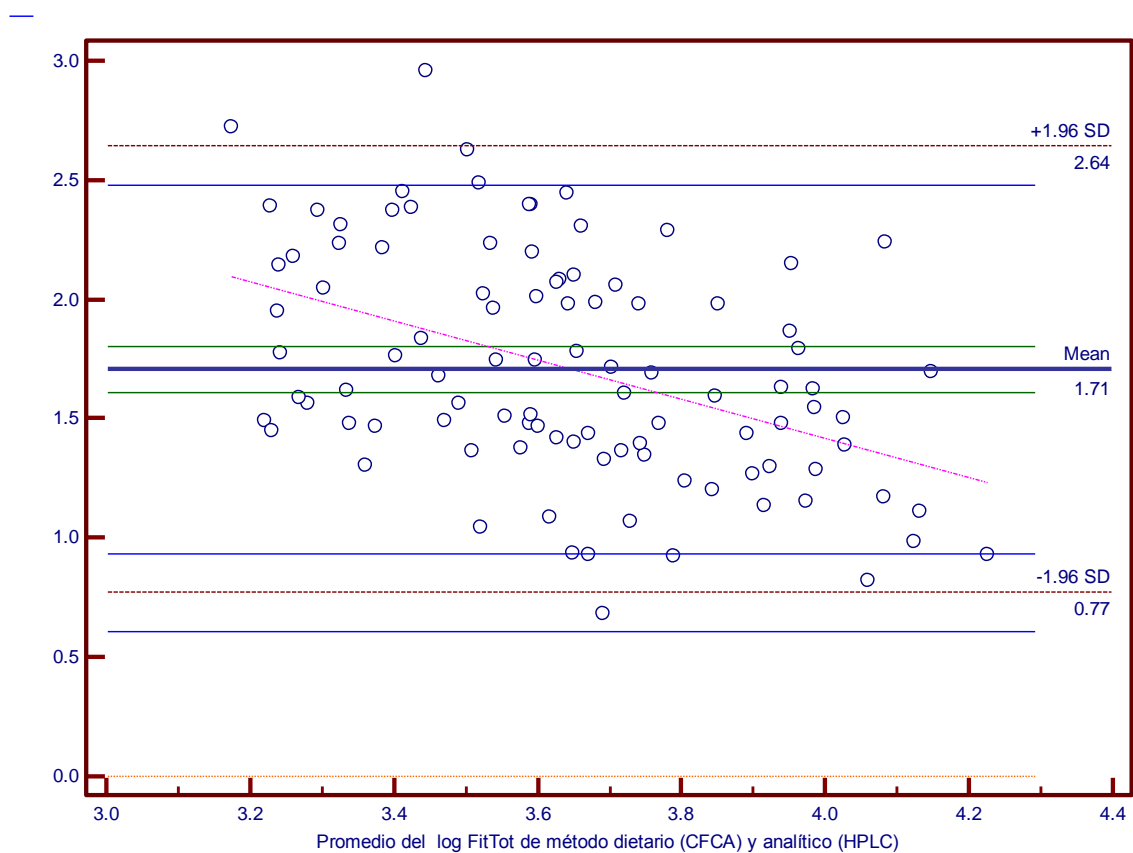
CC= Coeficiente de correlación de spearman; D= dieta; O= orina; Lignanos totales= secoisolariciresinol + matairesinol + enterolactona + enterodiol. \*Correlación de pearson, datos normales transformados con logaritmo natural más uno (ln+1). corr= coeficiente de correlación corregido por la variación intra-interindividual. El valor de p se muestra entre paréntesis.

**Tabla 11.** Coeficientes de correlación entre el resveratrol, flavonoides y fitoestrógenos totales dietarios (CFCA) y urinarios (orina de 12 h)

Fitoestrógeno	CC	CC	CC crudo	CC corr	p
	D, µg/d; O, µg/L	D, µg/d; O, µg/d	D, µg/d; O, µg/g creatinina		
Resveratrol	0.277( 0.005)	0.257( 0.010)	0.276	0.337	0.005
Flavonoides					
Naringenina	0.030( 0.763)*	0.056( 0.577)*	0.057*	0.069	0.571
Luteolina	-0.151( 0.132)	-0.113( 0.261)	-0.085	-0.104	0.398
Kaempferol	-0.100( 0.322)*	-0.085( 0.401)*	-0.068*	-0.084	0.496
Quercetina	0.071 ( 0.481)	0.104( 0.302)*	0.126*	0.154	0.212
Flav totales + Res	-0.043( 0.673)*	0.009( 0.928)*	0.045*	0.055	0.653
Fitoestrógenos totales	0.575( 0.000)*	0.557( 0.000)*	0.599*	0.73	0.000

CC= Coeficiente de correlación de spearman; D= dieta; O= orina; Flav= flavonoides, Res= Resveratrol; \*Correlación de pearson, datos normales transformados con logaritmo natural más uno (ln+1). corr= coeficiente de correlación corregido por la variación intra-interindividual. El valor de p se muestra entre paréntesis.

El gráfico de Bland y Altman se presenta en la figura 2. La mayoría de las diferencias se encuentran dentro de los límites de concordancia (0.77 a 2.64). La media de las diferencias no fue cercana a cero y su intervalo de confianza al 95% fue de 1.61 a 1.80. La línea de concordancia promedio perfecta ( $y=0$ ) está debajo de los límites de concordancia. El valor del coeficiente de correlación de concordancia fue de 0.005 (IC<sub>95%</sub> de -0.008 a 0.018).



**Figura 2.** Gráfico de Bland-Altman para la diferencia logarítmica (log) contra el promedio log de estimaciones de fitoestrógenos entre dos métodos diferentes, técnica dietaria (Cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos) y analítica (HPLC-MS).

## DISCUSIÓN

En este estudio se observó que los fitoestrógenos totales dietarios, estimados por CFCA, se relacionaron con los urinarios a nivel total. Mientras que no se observó correlación a nivel individual o por grupos, excepto para resveratrol. La correlación encontrada a nivel de fitoestrógenos totales podría explicarse porque los niveles urinarios de algunos fitoestrógenos reflejan principalmente su consumo en las últimas 24 a 48 horas, aunado a la variabilidad día a día en el consumo escaso de alimentos con cantidades altas de fitoestrógenos. La falta de correlación para la mayoría de los fitoestrógenos específicos obtenida en este estudio, es inconsistente con estudios previos realizados en países occidentales donde se han encontrado correlaciones entre isoflavonas dietarias y urinarias de 0.33 a 0.38 para mujeres en los EUA (Tseng y cols., 2008) y entre 0.17 a 0.30 para mujeres inglesas (Grace y cols., 2004). Mientras que las correlaciones fueron mayores de 0.42 en población asiática (Lee y cols., 2007).

Algunos autores atribuyen las asociaciones débiles a las categorías extensas de respuesta que fueron usadas en la frecuencia del cuestionario y a la interpretación incompleta del entrevistador de las mujeres en describir “pocas veces a la semana” o “diario o casi diario” (Willett y Lenart, 1998). Además, las tablas de composición utilizadas no son representativas de los alimentos que fueron consumidos en la realidad. También, las asociaciones tienden a subestimarse debido a que los errores en el método de comparación no se asocian con los errores en el CFCA evaluado. Adicionalmente, el error técnico asociado con el método de extracción de estos compuestos en la orina contribuye a la variación en el indicador bioquímico, debido a que no está validado totalmente. Así, que el efecto neto de todas estas fuentes de variación son correlaciones débiles y modestas entre el CFCA usado para evaluar la ingestión habitual y el indicador bioquímico.

En cuanto a la ingestión dietaria de energía y macronutrientos, se encontraron resultados similares en energía (2449.9 Kcal/d, 1818.5-3053.4), fibra (42.7 g/d, 28.4-57.0) y proteína (77.6 g/d, 59.3-101.0) consumidas en las mujeres (12-49 años) de la zona norte de México (Rivera-Dommarco y cols., 2001). Mientras que el consumo de grasa fue ligeramente mayor y el de los carbohidratos, vitamina A y C fueron menores que los reportados en las mujeres del estudio anteriormente mencionado. Con lo anterior, se considera una posibilidad baja de un sesgo de selección, debido a que el consumo de la energía y los nutrientes estimada por el CFCA, en comparación con lo reportado en la Encuesta Nacional de Nutrición de mujeres residentes de la zona norte de México, fueron similares.

La información disponible acerca del consumo dietario de fitoestrógenos en la población general en los países occidentales es limitada. La ingestión estimada del grupo de las isoflavonas en las mujeres de este estudio fue mayor que la reportada en estudios previos. En las mujeres blancas postmenopáusicas que participaron en el estudio *Framingham* se estimó un consumo medio de isoflavonas menor de 1 mg/d (de Kleijn y cols., 2001) y en mujeres que participaron como controles en un estudio de cáncer de ovario fue de 1.8 mg/d (Bandera y cols., 2011). En comparación con las mujeres asiáticas (Chen y cols., 1999) el consumo medio es 8 veces menor. En cuanto a los lignanos totales y cumestrol, se encontraron resultados similares (1 mg/d y 1.4 mg/d, respectivamente) a los de Bandera y colaboradores (2011). En el caso de los flavonoides, la naringenina y la quercetina, fueron los más consumidos y se encuentran en frutos cítricos y cebolla, respectivamente.

En general, los resultados indican que la ingestión de isoflavonas en la dieta de las participantes es mayor que el consumo de los lignanos. Esto es contrario a los resultados reportados por estudios previos en dietas occidentales (Bandera y cols., 2011; Hernández-Elizondo y cols., 2009; Keinan-Boker y cols., 2004). Estas diferencias podrían deberse a los fitoestrógenos particulares

considerados para la evaluación dietaria por grupo de fitoestrógenos. Otra razón es el uso persistente de la proteína, aislado y harina de soya como aditivos alimenticios, en la manufactura de cereales y postres helados a base de soya, barras de energía y en particular los sustitutos de carne (Patisaul y Jefferson, 2010).

En el CFCA se incluyeron alimentos como cereal “maizoro”, empanizador, sopas instantáneas, pan comercial, bebidas de soya, entre otros, que contribuyen a la estimación del consumo mayor de isoflavonas. Por otro lado, la falta de análisis de los diferentes tipos de lignanos en los alimentos presentes en la dieta occidental contribuyó a la subestimación de los lignanos. Resultados preliminares en el laboratorio del Dr. Herman Adlercreutz, en el 2001, indican que varios precursores de la enterolactona son más abundantes que los que frecuentemente se analizan, que son el secoisolariciresinol y matairesinol. Cuando los métodos para el análisis cuantitativo de estos precursores estén disponibles, los valores verdaderos incrementarán al menos 10 veces en los alimentos como los cereales. Kuhnle y colaboradores (2008) analizaron el contenido de enterolactona y enterodiol, metabolitos de los lignanos, por HPLC-MS, en alimentos de origen animal y encontraron niveles de enterolactona entre 1 a 22  $\mu\text{g}/100\text{ g}$  de leche, queso, huevo, helados e hígado de cordero.

Este estudio es el primero realizado en mujeres mexicanas adultas sobre el consumo diario de fitoestrógenos, estimados por un CFCA, y su comparación con la excreción urinaria de estos compuestos y sus metabolitos. En México, sólo un grupo de investigación ha estimado la ingestión dietaria de fitoestrógenos para asociarla con el cáncer de mama en un estudio de casos y controles (Torres-Sanchez y cols., 2009). Estos investigadores utilizaron un CFCA adaptado para medir el consumo de algunos fitoestrógenos como flavonoides (flavonoles, flavonas y flavanoles), lignanos (secoisolariciresinol, matairesinol, lariciresinol y pinioresinol) y cumestrol. Estos valores en general no corresponden a los reportados en este estudio, excepto para el cumestrol. Estas

diferencias podrían deberse a que no se utilizaron las mismas bases de datos publicadas y a la variación de la dieta regional.

Existen diversos enfoques utilizados para evaluar el desempeño de un CFCA. En este estudio se incluyó la comparación con un posible marcador bioquímico. Por lo anterior, se utilizaron las concentraciones de fitoestrógenos medidos en orina de 12 h para comparar la evaluación de estos compuestos urinarios con los dietarios obtenidos por el CFCA. Así, los errores que pudieran encontrarse en el análisis de fitoestrógenos en la orina, utilizado como método de referencia, se pueden deber principalmente a otras fuentes de variación distintas a la ingestión dietaria, como diferencias en el metabolismo y la absorción de la mayoría de los compuestos postabsortivos como los fitoestrógenos.

Las estimaciones del consumo reciente de algunos fitoestrógenos dietarios, como genisteína, naringenina y secoisolariciresinol (ver capítulo uno) fueron más fuertemente correlacionadas con la excreción urinaria que las estimaciones del consumo habitual de los fitoestrógenos individuales.

Cuando la variabilidad intraindividual en la ingestión de los nutrientes altamente variables (como las vitaminas y los fitoestrógenos) es grande, afecta las correlaciones con este tipo de nutrientes. El coeficiente de correlación crudo entre los fitoestrógenos totales dietarios ( $\mu\text{g}/\text{d}$ ) y urinarios ( $\mu\text{g}/\text{g}$  creatinina) fue de 0.60 ( $p < 0.001$ ), este incrementó a 0.73 ( $p < 0.001$ ) después de ajustar por la atenuación de la variación intra-inter individual en los recordatorios de 24 h.

El gráfico de Bland y Altman mostró que la línea de referencia se graficó fuera del  $\text{IC}_{95\%}$  de la media de las diferencias, que todos los puntos se dispersaron arriba de la línea cero y que existe una tendencia de error inversamente proporcional. Esto podría indicar la presencia de error sistemático en la tendencia a sobre- o subestimar los fitoestrógenos totales. Alternativamente, se graficaron (gráfica no mostrada) las diferencias contra uno de los métodos, considerando el logaritmo de los fitoestrógenos totales en orina



analizados por el método analítico (HPLC-MS) como el método de referencia (graficado en el eje X) y se encontró un comportamiento similar a la tendencia de error inversamente proporcional. El promedio de las diferencias no fue cercano a cero y la línea de referencia estuvo fuera de los límites de concordancia, lo cual indica que no hubo concordancia suficiente entre las estimaciones del CFCA y el método analítico.

El uso de biomarcadores en un estudio de validación puede ser útil cuando están disponibles. Por ejemplo, una asociación nula entre una ingestión de nutrimento medido por un CFCA y el riesgo de una enfermedad es más significativa si el cuestionario de medición ha sido demostrado que presenta correlación con un indicador bioquímico. De acuerdo a lo anterior, el CFCA no tiene suficiente validez para estimar la ingestión de los fitoestrógenos específicos, pero si proporciona una asociación comparable para la estimación de los fitoestrógenos totales, pudiéndose utilizar en estudios epidemiológicos (Willett y Lenart, 1998).

## CONCLUSIÓN

En este estudio se obtuvieron datos de la ingestión y niveles urinarios de fitoestrógenos en un grupo de mujeres hermosillenses con una gran variación interindividual en la ingestión de fitoestrógenos, pero a niveles comparables a los consumos medios de las poblaciones occidentales. Las estimaciones de la ingestión de fitoestrógenos totales del cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos se correlacionaron significativamente con sus niveles urinarios, a pesar de la diferencia metabólica. Así, los valores de consumo medio similares a los derivados de otras fuentes externas y la correlación moderada observada, proporcionan cierta seguridad de que el cuestionario es bastante completo para estimar el consumo de fitoestrógenos totales.

Los resultados obtenidos en este estudio sirven de base para estudios futuros en identificar la función de los fitoestrógenos para reducir la incidencia de enfermedades crónicas en la población mexicana. Estos resultados claramente motivan a otros investigadores a estudiar en un futuro, los medios para validar la ingestión de fitoestrógenos específicos.

Adicionalmente y debido a los problemas que implica estimar la ingestión dietaria de fitoestrógenos con bases de datos de otros países, se necesita de analizar los alimentos regionales. Una vez analizados estos alimentos, se incorporarían a las bases de datos de la región, con la finalidad de tener mayor certeza del contenido de fitoestrógenos en los alimentos que más se consumen en el noroeste de México. Así, se tendrá mayor certidumbre del consumo real de fitoestrógenos en la población, cuando se utilice la encuesta dietaria.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bandera EV, King M, Chandran U, Paddock LE, Rodriguez-Rodriguez L, Olson SH. Phytoestrogen consumption from foods and supplements and epithelial ovarian cancer risk: a population-based case control study. *BMC Women's Health*. 2011;11(40).
- Bhakta D, dos Santos Silva I, Higgins C, Sevak L, Kassam-Khamis T, Mangtani P, cols. A Semiquantitative Food Frequency Questionnaire Is a Valid Indicator of the Usual Intake of Phytoestrogens by South Asian Women in the UK Relative to Multiple 24-h Dietary Recalls and Multiple Plasma Samples. *J Nutr*. 2005;135(1):116-23.
- Bland JM, Altman DG. Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet*. 1986;i:307-10.
- Bourges H, Casanueva E, Rosado J. Recomendaciones de ingestión de nutrimentos para la población mexicana, bases fisiológicas Tomo II. Mexico: Medica panamericana; 2005.
- Chen Z, Zheng W, Custer LJ, Dai Q, Shu XO, Jin F, cols. Usual dietary consumption of soy foods and its correlation with the excretion rate of isoflavonoids in overnight urine samples among Chinese women in shanghai. *Nutr Cancer*. 1999;33(1):82-7.
- de Kleijn MJJ, van der Schouw YT, Wilson PWF, Adlercreutz H, Mazur W, Grobbee DE, cols. Intake of Dietary Phytoestrogens Is Low in Postmenopausal Women in the United States: The Framingham Study. *J Nutr*. 2001;131(6):1826-32.
- Grace PB, Taylor JI, Low YL, Luben RN, Mulligan AA, Botting NP, cols. Phytoestrogen concentrations in serum and spot urine as biomarkers for dietary phytoestrogen intake and their relation to breast cancer risk in european prospective investigation of cancer and nutrition-Norfolk. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004;13(5):698-708.
- Henderson BE, Pike MC, Bernstein L, Whelen SL. Breast Cancer. In: *Cancer Epidemiology and Prevention*, Schottenfeld D, Parkin DM (eds). 1996:1022-1039. Oxford University Press: New York.
- Hernández-Elizondo J, Mariscal-Arcas M, Rivas A, Feriche B, Velasco J, Olea-Serrano F. Estimación de la ingesta de fitoestrógenos en población femenina. *Nutr Hosp*. 2009;24(4):445-51.
- Kaaks R, Ferrari P. Dietary Intake Assessments in Epidemiology: Can We Know What We Are Measuring? *Ann epidemiol*. 2006;16(5):377-80.
- Keinan-Boker L, van Der Schouw YT, Grobbee DE, Peeters PH. Dietary phytoestrogens and breast cancer risk. *Am J Clin Nutr*. 2004;79(2):282-8.
- Kuhnle GGC, Dell'Aquila C, Aspinall SM, Runswick SA, Mulligan AA, Bingham SA. Phytoestrogen Content of Foods of Animal Origin: Dairy Products,

- Eggs, Meat, Fish, and Seafood. *J Agr Food Chem.* 2008;56(21):10099-104.
- Lee SA, Wen W, Xiang YB, Barnes S, Dake L, Cai Q, cols. Assessment of dietary isoflavone intake among middle-aged chinese men. *J Nutr.* 2007; 137(4):1011-6.
- Linseisen J, Piller R, Hermann S, Chang-Claude J. Dietary phytoestrogen intake and premenopausal breast cancer risk in a German case-control study. *Int J Cancer.* 2004;110(2):284-90.
- Ortega M, Quizán T, Morales G, Preciado M. Cálculo de la ingestión dietaria y coeficientes de adecuación a partir de: registro de 24 horas y frecuencia de consumo de alimentos [Food consumption and diet adequation analysis: 24 hour recall and food frequency questionnaires]. *Serie Evaluación del Consumo de Alimentos.* 1999;1(1-48).
- Patisaul HB, Jefferson W. The pros and cons of phytoestrogens. *Front Neuroendocrinol.* 2010;31(4):400-19.
- Quizán-Plata T, Ortega MI. Diseño y validación de una herramienta para identificar riesgo dietario en mujeres adultas de bajo ingreso (Design and validation of a tool dietary risk in low-income adult women). *Nutr Clin.* 2000;2:128-35.
- Rivera Dommarco J, Shamah Levy T, Villalpando Hernández S, González de Cossío T, Hernández Prado B, Sepúlveda J. Encuesta Nacional de Nutrición 1999. Estado nutricio de niños y mujeres en México. Cuernavaca, Morelos, México: Instituto Nacional de Salud Pública. 2001.
- SINAIS. Sistema Nacional de Información en Salud. Estadísticas por tema. Mortalidad 2008 [Noviembre, 2011]; Disponible en: <http://www.sinais.salud.gob.mx/mortalidad/index.html>.
- Spencer JPE, Abd El Mohsen MM, Minihane A-M, Mathers JC. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. *Br J Nutr.* 2008;99:12-22.
- Tseng M, Olufade T, Kurzer M, Wähälä K, Fang CY, van der Schouw YT, cols. Food frequency questionnaires and overnight urines are valid indicators of daidzein and genistein intake in U.S. women relative to multiple 24-h urina samples. *Nutr Cancer.* 2008;60(5):619-26.
- Torres-Sanchez L, Galvan-Portillo M, Wolff MS, Lopez-Carrillo L. Dietary consumption of phytochemicals and breast cancer risk in Mexican women. *Public Health Nutr.* 2009;12(06):825-31.
- Ward HA, Kuhnle GGC. Phytoestrogen consumption and association with breast, prostate and colorectal cancer in EPIC Norfolk. *Archives of Biochemistry and Biophysics.* 2010;501:170-75.
- Willett W, Howe G, Kushi L. Adjustment for total energy intake in epidemiologic studies. *Am J Clin Nutr.* 1997;65(4):1220S-8S.
- Willett W, Lenart E. Reproducibility and validity of food-frequency questionnaires. In: Willett W, ed. *Nutritional epidemiology.* 2nd ed. New York, NY: Oxford University Press. 1998:101-47.

## LIMITACIONES Y FORTALEZAS DEL ESTUDIO COMPLETO

La principal limitación fue la obtención del contenido de fitoestrógenos en varios alimentos, principalmente en los alimentos regionales, listados en el diccionario de Ortega y colaboradores (1999). Además, las tablas de composición existentes contienen información incompleta del contenido de fitoestrógenos. A esto habría que agregar que algunas de las metodologías utilizadas para analizar los fitoestrógenos en los alimentos no están validadas.

Otra limitación, fue la aplicación de sólo un recordatorio de 24 horas. Una limitación adicional, fue la gran extensión del listado de alimentos en el CFCA que añade otras fuentes de error, principalmente una sobreestimación de los compuestos estudiados. Finalmente, la mayoría de las mujeres presentaron niveles fuera del intervalo normal para creatinina (0.8-1.8 g de creatinina/d) en mujeres, que pudo sobreestimar los niveles urinarios de los fitoestrógenos.

La principal fortaleza del estudio fue la selección y el tamaño de la muestra que permitió una muestra homogénea. Además, el método analítico (HPLC-DAD-ES-MS) utilizado es novedoso y sensible, logró detectar y cuantificar los fitoestrógenos de interés a niveles bajos. El analizador de masas utilizado (cuadrupolo simple) tiene una alta sensibilidad para confirmar la presencia de los fitoestrógenos y sus metabolitos en la orina de 12 horas. El análisis de fitoestrógenos en orina utilizado se amplió de 11 a 16 fitoestrógenos a cuantificar por corrida cromatográfica, incluyendo a la naringenina, kaempferol, luteolina, quercetina y resveratrol. Esto genera información para los niveles de excreción urinaria de estos flavonoides en la población mexicana.

Otra fortaleza del estudio fue la inclusión del método de preparación de algunos alimentos en el CFCA y la adaptación de la base de datos de alimentos fuentes de fitoestrógenos, que permitió calcular su consumo.

## ANEXO 1

Número de casas visitadas por manzana

No. de Manzana	No. de casas habitadas/manzana	No. casas visitadas/manzana
52	42	7
92	60	10
29	24	4
21	32	6
56	15	3
15	19	3
39	28	5
44	8	1
32	27	5
33	43	7
28	30	5
35	26	5
15	32	6
22	16	3
11	36	6
4	24	4
9	29	5
37	9	2
17	48	8
17	28	5
Suma	576	100

En 20 manzanas hay 576 casas habitadas, por tanto hay 28.8 casas por cada manzana. Si se considera un estimado proporcional del 5% por manzana, entonces el número proporcional de casas a visitar por manzana es:

$$28.8 \text{ ---- } 5$$

$$42 \text{ ---- } x \quad x \simeq 7 \text{ casas/manzana}$$

## ANEXO 2

Método del ajuste de la ingestión de nutrimentos y componentes dietarios por ingestión de la energía total por análisis de regresión

Ingestión de nutrimento ajustada por energía=  $a + b$

En donde,

$a$ = residual del modelo de regresión con ingestión del nutrimento como la variable dependiente ( $y$ ) y la ingestión de la energía total como la variable independiente ( $x$ )

$b$ = ingestión del nutrimento esperada para una persona con ingestión media de energía

El análisis de regresión se utilizó para calcular los residuos de la ingestión de nutrimentos mediante la eliminación de la variación causada por la ingestión de energía total (Willett y Stampfer, 1986). En este procedimiento, se hace una regresión lineal simple de la ingestión de nutrimentos de los individuos en un grupo con su ingestión total de energía. Los residuos de la regresión representan las diferencias entre la ingestión actual de cada individuo y la ingestión predicha por su consumo de energía total. Debido a que los residuos, por definición, tienen un promedio de cero e incluyen valores negativos como positivos, se puede agregar una constante a cada valor para transmitir el sentido de un valor observado de ingestión de nutrimentos. La constante es estadísticamente arbitraria, pero podría ser la ingestión predicha de nutrimentos

en la ingestión media de energía total o la ingestión predicha de nutrientes para algunos números redondos de ingestión energética (por ejemplo 2000 kcal). Así, la ingestión del nutriente podría ser dicho a estar “estandarizado” a 2000 kcal (Willett y cols. 1997).

Por ejemplo, utilizando los comandos del paquete estadístico *STATA*, el método del ajuste por energía para el consumo de proteína sería de la siguiente manera:

```
. sum PROTEINA, detail
```

```

                                PROTEINA
-----
      Percentiles      Smallest
1%      32.70759      28.66202
5%      47.49324      36.75317
10%     52.50002      37.96301      Obs          100
25%     59.6138      43.45516      Sum of Wgt.    100

50%     78.26866
                                Mean          83.73218
                                Largest      Std. Dev.    29.87086
75%     101.1302      145.3565
90%     125.6567      161.0503      Variance     892.2681
95%     134.4358      171.3531      Skewness     .8788535
99%     177.6386      183.9241      Kurtosis     3.772384

```

```
. regress PROTEINA ENERGIA
```

```

      Source |         SS      df      MS
-----+-----
      Model | 59545.6563      1 59545.6563
      Residual | 28788.8876     98  293.76416
-----+-----
      Number of obs =      100
      F( 1, 98) = 202.70
      Prob > F      = 0.0000
      R-squared     = 0.6741

```



```

-----+-----
Total | 88334.5439    99    892.26812    Adj R-squared = 0.6708
Root MSE    = 17.14

```

```

-----+-----
PROTEINA |      Coef.   Std. Err.    t    P>|t|    [95% Conf. Interval]
-----+-----
ENERGIA |   .0257525   .0018088   14.24  0.000   .022163   .029342
_cons |   17.73183   4.942457    3.59  0.001   7.923687  27.53998

```

```

. predict PROTEINARED, residuals
. gen PROTEINAAD= 83.73218 + PROTEINARED
. sum PROTEINAAD, detail

```

```

PROTEINAAD
-----+-----

```

Percentiles	Smallest		
1%	35.02757	34.02278	
5%	58.00001	36.03236	
10%	65.83891	39.73049	Obs 100
25%	73.78562	40.60984	Sum of Wgt. 100
50%	83.88638		Mean 83.73218
		Largest	Std. Dev. 17.05277
75%	93.27829	113.9036	
90%	102.4757	114.2448	Variance 290.7969
95%	112.3038	122.6499	Skewness -.2355864
99%	129.6935	136.7372	Kurtosis 4.311456

### ANEXO 3

#### Corrección del coeficiente de correlación

Se utilizó la siguiente fórmula para la corrección del coeficiente de correlación observado entre los fitoestrógenos dietarios y urinarios:

$$r = r_o \sqrt{1 + \tau_o/nx}$$

En donde:

$\tau_o = S_w^2/S_b^2$ , es el ratio de la varianza intra e interindividual

$nx$ = número de réplicas por persona para la variable x (recordatorio)= 2

$r_o$ = coeficiente de correlación observado

$r$ = coeficiente de correlación corregido por la variación intra e interindividual de la dieta

Las varianzas intra e interindividual son obtenidas del análisis de varianza de la ingestión dietaria en días repetidos (Willett y cols. 1990). En donde:

Variable de respuesta= nutrimento específico

Variable sujeto= mujer

Factor intraindividual= no. de recordatorio para la varianza intraindividual

Factor interindividual= no. de recordatorio para la varianza interindividual