

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

**Niveles séricos de fitoestrógenos determinados por
HPLC-DAD-ESI-MS como biomarcadores de su
consumo dietario reciente en mujeres sonorenses**

POR:

SUSANA ALEJANDRA PALMA DURÁN

TESIS APROBADA POR LA:
COORDINACIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRÍA EN CIENCIAS

HERMOSILLO, SONORA

ENERO DEL 2012

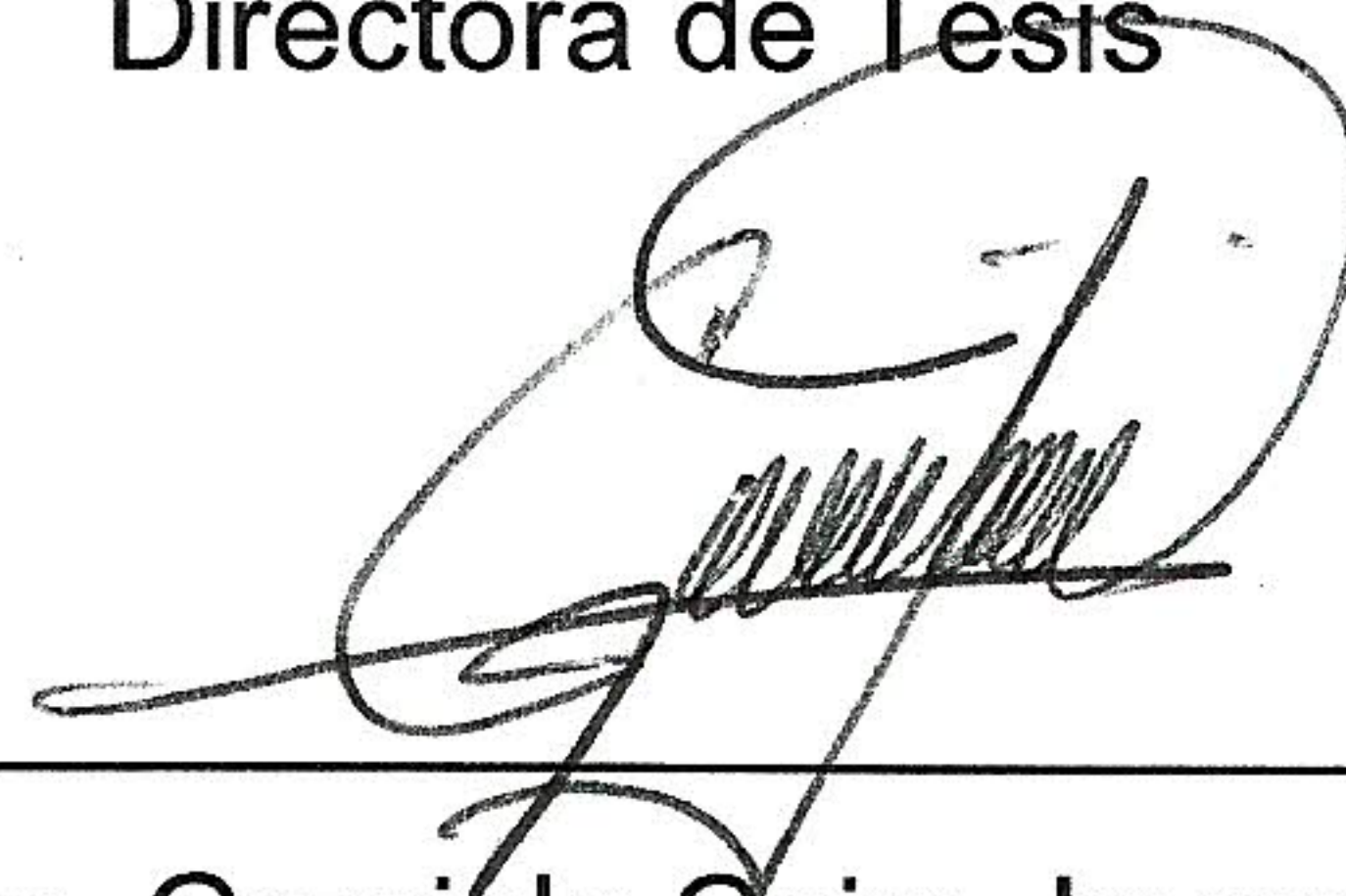
APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para revisar la tesis de Susana Alejandra Palma Durán, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestra en Ciencias.

Ana Isabel Valenzuela Quintanar

Dra. Ana Isabel Valenzuela Quintanar

Directora de Tesis



Dra. Graciela Caire Juvera

M^{ca} de Lourdes Gutiérrez Coronado

M. C. María de Lourdes Gutiérrez Coronado

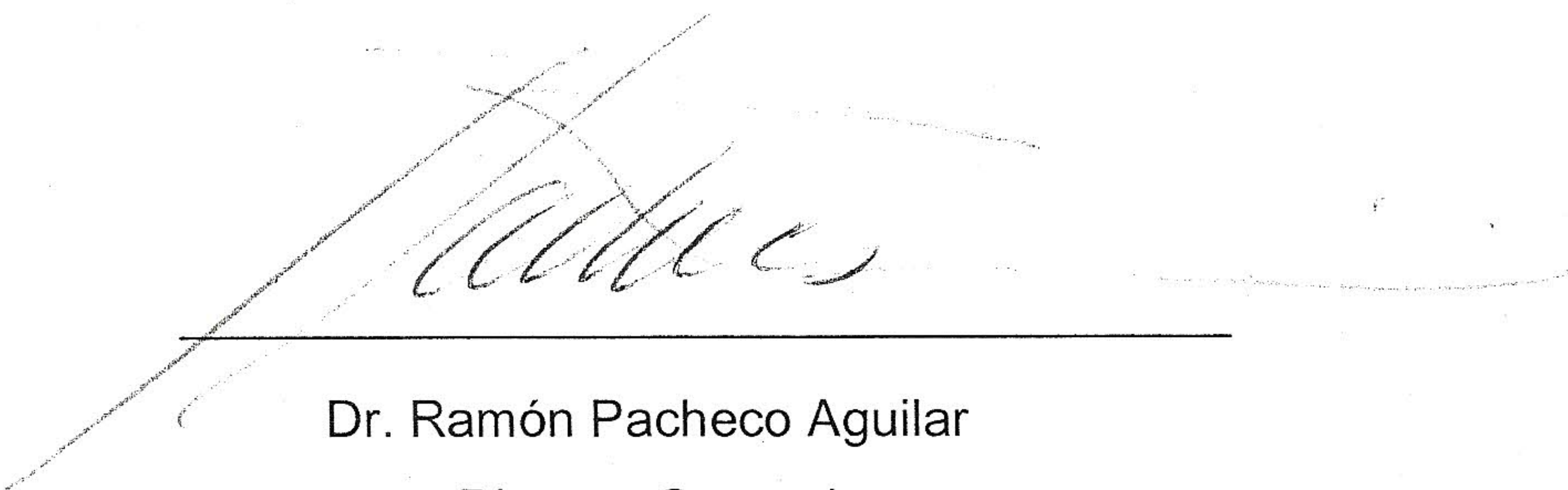
M^{ca} del Refugio Robles Burgueño

M. C. María del Refugio Robles Burgueño

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. (CIAD, 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 aprobación del manuscrito en cuestión de la directora de tesis.



Dr. Ramón Pacheco Aguilar
Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, por el apoyo económico otorgado para la investigación #CB-2008-01-106028 y la beca de posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. por brindarme la oportunidad de realizar mis estudios de posgrado en una institución de alta calidad.

A mi comité de tesis, por su gran apoyo, guía y por otorgarme un poquito de sus conocimientos, pero sobre todo por la confianza y cariño que me han brindado.

A las mujeres que participaron en este estudio, por su tiempo y dedicación en nuestro proyecto.

A M.C. Melissa Campa y M. C. Karina Chávez, sólo juntas logramos terminar esta etapa de nuestras vidas.

A M. C. Carlos Barajas y M. C. Gabriel Fuente, por todos los gratos momentos que pasamos juntos y por cambiar mi forma de pensar.

A los integrantes del Laboratorio de Toxicología de Plaguicidas: M. C. Patricia Grajeda, por su apoyo técnico y Sergio Leal, por hacer más alegre el laboratorio.

A todos los integrantes del proyecto fitoestrógenos: Dra. Isabel Ortega, Dr. Julián Esparza, M. S. P. Socorro Saucedo y Q. B. Diana Luna.

A los laboratorios de Residuos Tóxicos, Bioquímica de Proteínas, Fisiología Celular y Bioprocesos, Ecología Química y Biología Molecular de Plantas por permitirme compartir sus instalaciones para el desarrollo de una parte de mi trabajo de tesis. Especialmente a M. C. María del Carmen Bermúdez, M. C. Angélica Espinosa, M. C. Javier Ojeda, M. C. Alberto Sánchez, y M. C. Haydé Gonzales, por su confianza en mí en todo momento.

A Agilent Technologies, por todo el apoyo técnico y las facilidades brindadas, principalmente a Heber Castillo y Gerardo Martínez.

DEDICATORIAS

A mis padres Susana Durán Aguilar y Carlos Palma Santos que siempre me han enseñado a seguir adelante y poner lo mejor de mí en todo lo que haga.

A mis hermanos Andrea y Carlos porque siempre estarán ahí para mí y yo para ustedes.

A mi nana Susana que ha hecho que seamos una familia unida, eres un gran ejemplo para todos nosotros.

A mis tíos y primos que me cuidan y quieren como si fuera su hija o hermana y siempre están a mi lado en todo lo que decida.

A mis amigos Roberto, Karen, Javier, Fernanda, Wenceslao, Alejandrina, Ana, Miriam, Cesar y Adán, por todo lo que hemos compartido, yo sé que a pesar del tiempo y la distancia seguiremos siendo tan unidos.

CONTENIDO

| | |
|---|------|
| LISTA DE TABLAS..... | viii |
| LISTA DE FIGURAS | ix |
| RESUMEN | xi |
| INTRODUCCIÓN | 1 |
| ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN..... | 3 |
| Fitoestrógenos | 3 |
| Flavonoides | 4 |
| Flavonoles, Flavonas y Flavanonas | 4 |
| Isoflavonas..... | 6 |
| No flavonoides..... | 8 |
| Cumestanos..... | 8 |
| Lignanós | 9 |
| Estilbenos | 10 |
| Absorción, metabolismo y excreción de fitoestrógenos en humanos | 11 |
| Efecto de los Fitoestrógenos de la Dieta en la Salud Humana | 15 |
| Fitoestrógenos y menopausia..... | 17 |
| Fitoestrógenos y riesgo cardiovascular | 18 |
| Fitoestrógenos y osteoporosis..... | 19 |
| Fitoestrógenos y cáncer | 21 |
| Estimación del Consumo de Fitoestrógenos..... | 23 |
| Evaluación del consumo de fitoestrógenos en México | 24 |
| El Suero como biomarcador del consumo de fitoestrógenos..... | 26 |
| Métodos para la Extracción y Cuantificación de Fitoestrógenos | 29 |

| | |
|---|----|
| HIPÓTESIS | 32 |
| OBJETIVOS | 33 |
| Objetivo General | 33 |
| Objetivos Particulares | 33 |
| SUJETOS Y MÉTODOS | 34 |
| Sujetos de Estudio | 34 |
| Diseño Experimental | 34 |
| Soluciones de Trabajo de Fitoestrógenos | 35 |
| Mezclas de Estándares Internos de Deconjugación | 36 |
| Muestras de Suero | 37 |
| Tratamiento y Extracción de Fitoestrógenos en Suero..... | 37 |
| Cromatografía Líquida y Espectrometría de Masas | 38 |
| Optimización del Método de Análisis de Fitoestrógenos en Suero | 39 |
| Aseguramiento de la calidad de los datos | 39 |
| Selectividad del método..... | 40 |
| Porcentajes de recuperación | 40 |
| Linealidad del sistema y del método..... | 41 |
| Análisis Estadístico | 41 |
| RESULTADOS Y DISCUSIÓN..... | 43 |
| Optimización del Método de Análisis de Fitoestrógenos en Suero por HPLC- DAD-ESI-MS..... | 43 |
| Parámetros de LC-DAD | 43 |
| Parámetros del LC-ESI-MS | 45 |
| Extracción de los fitoestrógenos del suero | 53 |
| Pretratamiento de la muestra..... | 54 |

| | |
|--|-----|
| Extracción en Fase sólida | 55 |
| Monitoreo de la hidrólisis enzimática | 57 |
| Aseguramiento de la calidad de los datos | 62 |
| Selectividad del método..... | 66 |
| Porcentajes de recuperación | 67 |
| Linealidad del sistema y del método..... | 69 |
| Niveles Séricos de Fitoestrógenos Determinados por HPLC-DAD-ESI-MS | 71 |
| Estimación del Consumo de Fitoestrógenos por Recordatorio de 24 h..... | 81 |
| Asociación Entre el Consumo y los Niveles Séricos de Fitoestrógenos..... | 84 |
| CONCLUSIONES..... | 95 |
| BIBLIOGRAFÍA | 96 |
| LIMITACIONES Y FORTALEZAS DEL ESTUDIO | 104 |

LISTA DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Método descrito por Wyns <i>et al.</i> , (2010) y su optimización para el análisis de 16 fitoestrógenos por HPLC en el presente estudio | 44 |
| Tabla 2. Señales del detector de masas, tiempo de retención, voltaje de fragmentación y ganancia para la cuantificación de fitoestrógenos en modo SIM | 52 |
| Tabla 3. Porcentajes de recuperación (%RE) y coeficientes de variación (CV) de los fitoestrógenos a una concentración de 16 ng/mL en suero (n = 6) | 68 |
| Tabla 4. Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) (ng/mL) del sistema y método..... | 70 |
| Tabla 5. Características generales de la población del estudio | 72 |
| Tabla 6. Niveles séricos de fitoestrógenos (nmol/L) en mujeres sonorenses (n= 69) | 80 |
| Tabla 7. Estimación del consumo de fitoestrógenos (µg/día) a partir del recordatorio de 24 h en mujeres sonorenses (n= 69) | 83 |
| Tabla 8. Correlación entre niveles séricos de isoflavonas y consumo diaria (recordatorio de 24 h) (n = 69)..... | 93 |
| Tabla 9. Correlación entre niveles séricos de flavonoides y consumo diaria (recordatorio de 24 h) (n = 69)..... | 93 |
| Tabla 10. Correlación entre niveles séricos de lignanos y consumo diaria (recordatorio 24 h) (n = 69)..... | 94 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Clasificación de los fitoestrógenos de acuerdo a su estructura química | 4 |
| Figura 2. Flavonoles, flavanonas y flavonas considerados como fitoestrógenos | 5 |
| Figura 3. Isoflavonas y sus metabolitos considerados como fitoestrógenos | 7 |
| Figura 4. Cumestrol | 9 |
| Figura 5. Principales lignanos presentes en la dieta y sus metabolitos..... | 10 |
| Figura 6. <i>trans</i> -resveratrol | 11 |
| Figura 7. Representación esquemática del metabolismo de daidzeína | 13 |
| Figura 8. Similitud estructural de los fitoestrógenos con estradiol..... | 16 |
| Figura 9. Perfil cromatográfico y espectros de absorción en UV para la identificación de fitoestrógenos por HPLC-DAD | 45 |
| Figura 10. Cromatograma generado en modo FIA de biochanina A, cumestrol y kaempferol (1 µg/mL) a diferentes voltajes de fragmentación en modo negativo (A) y positivo (B). | 47 |
| Figura 11. Cromatograma en modo SCAN de los 16 fitoestrógenos (3000 ng/mL) y espectros de masas de resveratrol, gliciteína, enterodiol y biochanina A con voltaje de fragmentación de 180 V y ganancia 5 en modo negativo. | 48 |
| Figura 12. Espectros de masas y fragmentación propuesta para quercetina (A) y enterodiol (B) (1 µg/mL) en modo negativo, voltaje de fragmentación de 200 V y ganancia de 5. | 50 |
| Figura 13. Espectro de masas y fragmentación propuesta para gliciteína (1 µg/mL) en modo negativo, voltaje de fragmentación de 160 V y ganancia de 5..... | 51 |
| Figura 14. Cromatograma normalizado en modo SIM de la mezcla de fitoestrógenos (16 µg/mL) en el disolvente de reconstitución (MeOH/Solución Inicial; 40:60) | 53 |
| Figura 15. Perfil cromatográfico y espectros de absorción en UV de los estándares de deconjugación en ausencia de la enzima β-glucuronidasa/sulfatasa (H1) | 58 |
| Figura 16. Perfil cromatográfico y espectros de absorción en UV de los estándares de deconjugación en presencia de la enzima β-glucuronidasa/sulfatasa (H1) | 59 |

| | |
|---|----|
| Figura 17. Cromatograma en modo SCAN y espectros de masas de los estándares de deconjugación con voltaje de fragmentación de 100 V y ganancia 10 en modo negativo en ausencia de la enzima glucuronidasa/sulfatasa (H1). | 60 |
| Figura 18. Cromatograma en modo SCAN y espectros de masas de los estándares de deconjugación con voltaje de fragmentación de 100 V y ganancia 10 en modo negativo en presencia de la enzima glucuronidasa/sulfatasa (H1). | 61 |
| Figura 19. Cromatograma representativo de un blanco reactivo en las cuatro señales del detector de masas..... | 64 |
| Figura 20. Cromatograma representativo de un blanco tejido en las cuatro señales del detector de masas..... | 64 |
| Figura 21. Cromatograma de un suero fortificado con los 16 fitoestrógenos (16 ng/mL) en las cuatro señales del detector de masas..... | 65 |
| Figura 22. Cromatograma representativo de un suero blanco en las cuatro señales del detector de masas..... | 67 |
| Figura 23. Cromatograma representativo de una muestra problema en las cuatro señales del detecto de masas, indicando los fitoestrógenos, los estándares de deconjugación e interno presentes | 73 |

RESUMEN

Los fitoestrógenos han generado interés en la salud humana debido a su posible capacidad de disminuir el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas. Algunos estudios epidemiológicos, al investigar la asociación entre los fitoestrógenos y la salud, se han visto limitados debido a la dificultad de cuantificar el consumo de estos. Por ello, es necesario establecer un biomarcador para determinar su consumo. En este sentido, los niveles séricos de fitoestrógenos representan una alternativa como indicador de exposición a estos compuestos. Sin embargo, debe disponerse de métodos sensibles y específicos. Por lo anterior, en el presente trabajo se implementó un método para la cuantificación de fitoestrógenos en suero por cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS). Además, se evaluó el uso de estos niveles séricos de fitoestrógenos como biomarcadores de su consumo dietario en mujeres adultas sanas de Hermosillo, Sonora.

El método para la determinación de 16 fitoestrógenos (luteolina, kaempferol, equol, biochanina A, formononetina, quercetina, naringenina, cumestrol, secoisolariciresinol, genisteína, matairesinol, enterolactona, enterodiol, daidzeína, gliciteína y resveratrol) se realizó por HPLC-DAD-ESI-MS en suero. Los fitoestrógenos fueron extraídos en fase sólida, previo tratamiento de la muestra. Los analitos fueron detectados por MS con un cuadrupolo simple usando ionización por electrospray en modo negativo. El método presentó una alta especificidad y sensibilidad, con una respuesta lineal de 0.02 a 3000 ng/mL.

Los niveles séricos de isoflavonas, flavonoides, lignanos, cumestrol y resveratrol fueron de 68.4, 107.9, 2.7, 1.6 y 3.2 nmol/L. Estos niveles no presentaron correlación con el consumo determinada a partir del recordatorio de 24 horas. Sólo se presentó correlación para naringenina ($r = 0.47$, $p < 0.001$), luteolina ($r = 0.4$ $p < 0.001$) y genisteína ($r = 0.32$, $p < 0.01$). Dada la variación en el consumo y la concentración en suero, el uso de los dos métodos (niveles séricos de fitoestrógenos y recordatorio de 24 horas) en conjunto sería de utilidad al investigar la relación entre fitoestrógenos y el estado de salud.

INTRODUCCIÓN

Los alimentos de la dieta tienen la capacidad de aumentar o disminuir el riesgo de desarrollar enfermedades crónicas como cáncer, osteoporosis y cardiovasculares. Estos efectos son el resultado de la ingestión de macronutrientes, micronutrientes y sustancias bioactivas [1]. Dentro de estas últimas se encuentran los fitoestrógenos, los cuales modulan diversos procesos biológicos que pueden incidir en la salud [1-2]. Esta modulación puede producirse a través de la unión a receptores hormonales, o bien, mediante la regulación enzimática [3-4]. Dado que las hormonas sexuales están relacionadas con las vías de señalización y factores de crecimiento, los fitoestrógenos, al actuar sobre este sistema, participan en procesos cancerígenos y ateroscleróticos [5].

Los estudios epidemiológicos se han visto limitados por la dificultad de cuantificar el consumo de fitoestrógenos, debido a la escasez de datos relacionados con el contenido de éstos en los alimentos y en la dieta. De la misma forma, en México la información relacionada con el consumo de alimentos ricos en fitoestrógenos es escasa [6-7]. Por ello, existe la necesidad de contar con un biomarcador que mida el consumo de estos fitoquímicos. En este sentido, los niveles séricos representan una alternativa para determinar el consumo de fitoestrógenos [8-11]. Sin embargo, existen pocos estudios donde se haya analizado la relación entre las concentraciones séricas de fitoestrógenos y la dieta [12-13].

El interés que han recibido los fitoestrógenos en la salud ha llevado a la necesidad de desarrollar técnicas cada vez más rápidas, sensibles y específicas para su cuantificación en diversas matrices [2]. Una de las técnicas

es la cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) sin embargo, presenta baja sensibilidad y selectividad [1-2]. La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (GC-MS) presenta alta sensibilidad pero requiere de varios pasos de preparación y derivatización de la muestra [5, 14]. Por ello, el método cromatográfico preferido por su alta sensibilidad, selectividad y confirmación de los analitos de interés es la cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas (HPLC-MS), utilizando ionización por electrospray (ESI) o química (APCI) [15-17]. Esta técnica, permite la determinación simultánea de 7 a 13 fitoestrógenos por análisis. Por lo tanto, los datos generados por este sistema pueden ser utilizados para complementar los estudios epidemiológicos y, con la información recabada, determinar las posibles asociaciones entre el consumo de fitoestrógenos y la salud.

Con base en los argumentos anteriores, en el presente trabajo se evaluó el uso del suero como biomarcador del consumo dietario de fitoestrógenos en mujeres adultas sanas de Hermosillo, Sonora. Para ello, se estableció una metodología para el análisis de fitoestrógenos en muestras biológicas por HPLC-DAD-ESI-MS.

ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

Fitoestrógenos

El interés en los fitoestrógenos ha sido impulsado por su efecto potencial para reducir el riesgo de desarrollar diferentes enfermedades crónicas [2]. Algunos estudios epidemiológicos indican que una dieta rica en fitoestrógenos se asocia con una reducción del riesgo de cáncer dependiente de hormonas, enfermedades cardiovasculares y osteoporosis [2, 18-20]. A su vez, estudios *in vitro* e *in vivo* con animales de experimentación, sugieren que los fitoestrógenos presentan un papel protector en el desarrollo de cáncer [1]. En este sentido, incluir en la dieta el consumo de fitoestrógeno, podría representar una vía para disminuir el riesgo de padecer diversas enfermedades crónicas [21].

Los fitoestrógenos son compuestos difenólicos biológicamente activos, de origen vegetal, que estructuralmente mimetizan la acción del 17 β -estradiol [4, 22-23]. Su actividad puede producirse a través de la unión a receptores hormonales, o bien, a través de la regulación enzimática [3-4]. De esta forma, intervienen en el metabolismo y producción de hormonas sexuales, proliferación de células malignas, diferenciación celular, regulación de niveles enzimáticos intracelulares y balance oxidativo [1]. Basados en su estructura química, los fitoestrógenos se dividen en flavonoides y no flavonoides (Figura 1).

Flavonoides

Los flavonoides son el grupo más grande de polifenoles, con una estructura base de difenilpropanos (C6-C3-C6), que consta de dos anillos aromáticos (A y B) unidos a través de tres átomos de carbono (Figura 1). Los flavonoides se dividen en base a las variaciones que presenta el anillo C en flavonas, flavanonas, flavonoles, catequinas, antocianidinas e isoflavonas [24].

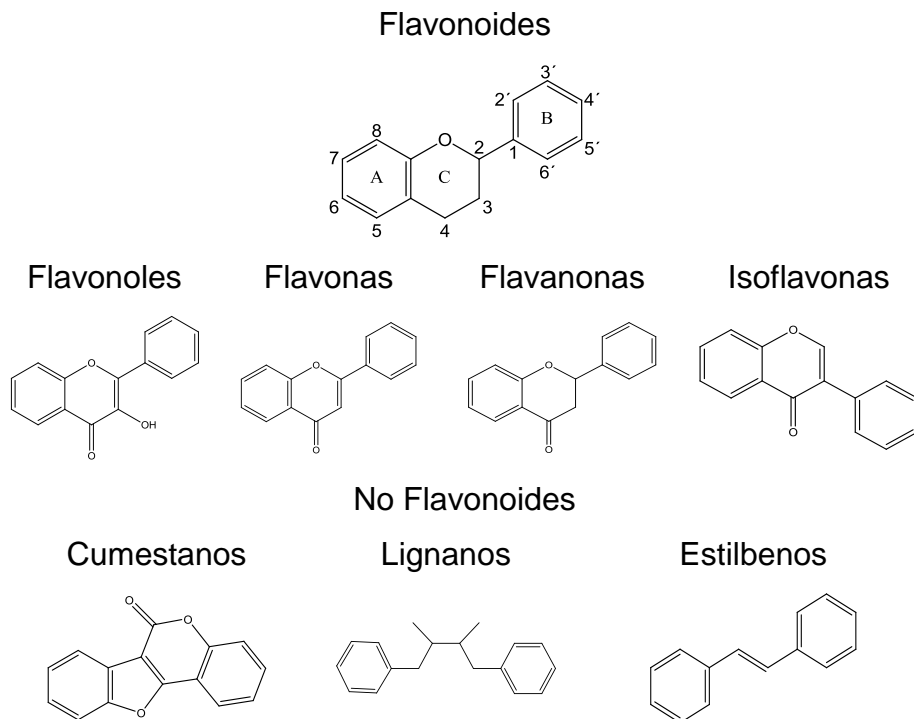


Figura 1. Clasificación de los fitoestrógenos de acuerdo a su estructura química

Flavonoles, Flavonas y Flavanonas

Dentro de estas subclases, los flavonoles considerados como fitoestrógenos son quercetina y kaempferol, la flavanona naringenina y la

flavona apigenina [4]. Recientemente se incluye a esta lista a luteolina por su capacidad de inhibir actividades procancerígenas [25].

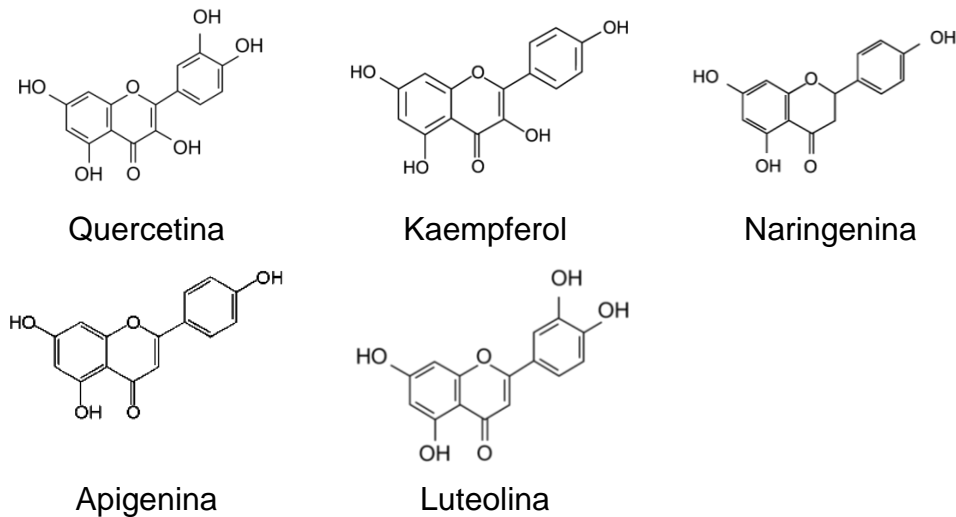


Figura 2. Flavonoles, flavanonas y flavonas considerados como fitoestrógenos

Estos compuestos se encuentran distribuidos ampliamente en bebidas y alimentos como frutas, verduras, té, chocolate, cerveza y vino [24, 26]. Dentro del grupo de los flavonoles y flavonas, quercetina es el que se encuentra en mayor cantidad en los alimentos [27]. A su vez, kaempferol, miricetina, apigenina y naringenina están presentes en cítricos, manzanas, cebollas, té y vino [28]. Quercetina es el principal flavonol presente en cebolla, mientras que quercetina y kaempferol son los principales compuestos en té [24]. En cuanto a luteolína, metabolito proveniente de diosmetina, se encuentra en hojas de olivo [25]. Por ello, existe una gran variedad de alimentos que contienen flavonoides en la dieta.

El potencial de estos polifenoles como fitoestrógeno ha recibido menor atención que los isoflavonas. La importancia de estos compuestos radica en su actividad antioxidante más que en su actividad como fitoestrógenos. Esto se debe a que presentan nula o baja actividad estrogénica. No obstante,

flavonoides débilmente estrogénicos se producen en plantas comestibles y en ocasiones se utilizan con fines terapéuticos [26]. A pesar de su baja actividad, algunos son buenos inhibidores del citocromo P450 aromatasas. Éste se encuentra implicado en la conversión de los andrógenos a estrógenos y por lo tanto, en cierta forma, intervienen en los niveles estrogénicos de la mujer [26].

Isoflavonas

Los isoflavonas difieren de los flavonoides en presentar el anillo B unido al C3, y no al C2, del heterociclo principal (Figura 1). La variación estructural dentro de los isoflavonas es muy diversa, incluyendo no sólo el número y complejidad de los sustituyentes, sino también diferentes niveles de oxidación del heterociclo [26].

Los isoflavonas presentes en la dieta, se dividen generalmente en isoflavonas simples y glicósidos [26]. Las isoflavonas constituyen el grupo principal de los flavonoides con 364 compuestos aglicados [5]. Dentro de este grupo, las de mayor interés con relación a su actividad estrogénica son genisteína, daidzeína, gliciteína, biochanina A y formononetina (Figura 3). Además los glicósidos con esta actividad biológica son daidzina, genistina y glicitina (ya sea en forma glucosídica, acetilglucosídica o malonilglucosídica) [23].

Los isoflavonas presentan una distribución limitada en el reino vegetal ya que se encuentran principalmente en la subfamilia de las leguminosas, la *Papilionaceae*. En algunas investigaciones, se ha detectado su presencia en otras familias de las angiospermas, incluyendo a *Compositae* (lechuga), *Iridaceae* (azafrán), *Myristicaceae* (nuez moscada) y *Rosaceae* (manzana) [29].

Por ello, son relativamente pocas las especies que contienen isoflavonas en la dieta.

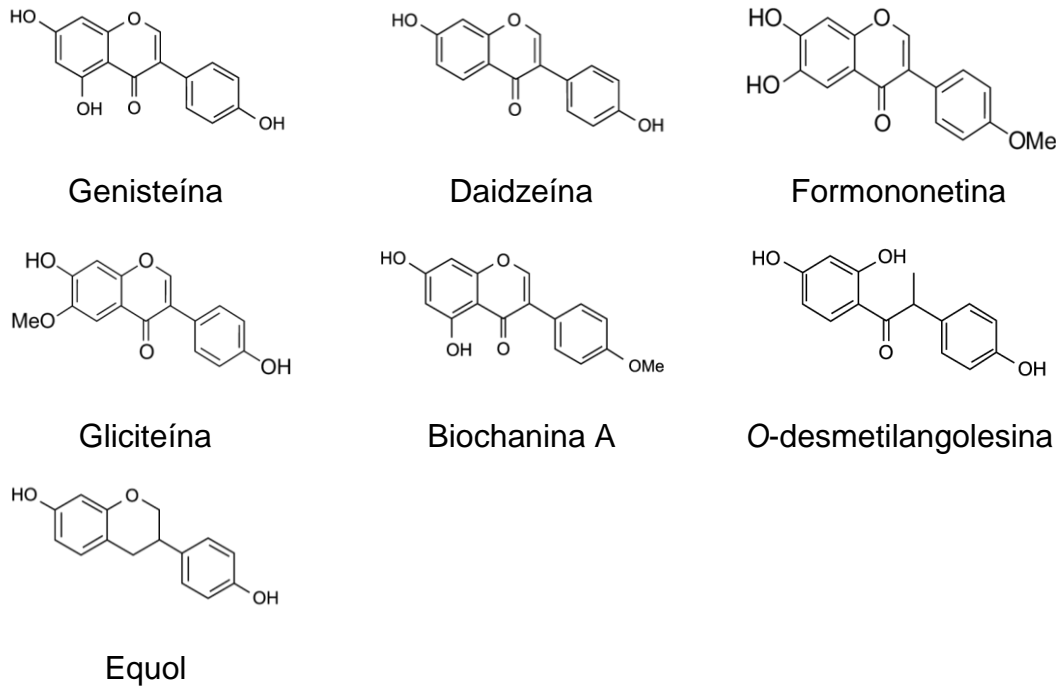


Figura 3. Isoflavonas y sus metabolitos considerados como fitoestrógenos

La principal fuente dietaria de isoflavonas es la soya. Altos niveles de genisteína y daidzeína se presentan en alimentos a base de soya, harina de soya y concentrados de soya. También se han identificado como fuentes al garbanzo, los chícharos, el frijol y otras leguminosas, así como el trébol y alfalfa; además de los granos de cereales [23]. A su vez, la col, frutas secas, espárragos, ajo y bebidas alcohólicas proporcionan isoflavonas a la dieta [23, 26]. Si bien la soya es el alimento con mayor concentración de isoflavonas, se cree que algunas frutas como la papaya y el kiwi podrían ser una fuente dietaria importante de isoflavonas [5].

La concentración y composición química de las isoflavonas se ve afectada por su procesamiento comercial [30]. Por lo que, los productos

altamente procesados (como la salsa de soya y el miso) pierden casi el total de las isoflavonas en su elaboración, mientras que los alimentos sin procesar mantienen inalteradas sus concentraciones [23]. Los cambios químicos dependerán del procesamiento del alimento, presentándose alteración en el glicósido hasta pérdida del mismo. Los alimentos mínimamente procesados, como la harina de soya, contienen 6''-O-malonildaidzin y 6''-O-malonilgenistina como principales compuestos. En cambio, los alimentos tratados térmicamente, presentan 6''-O-acetildaidzina y 6''-O-acetilgenistina. Durante el proceso de fermentación, se presenta remoción de glicosilaciones. Por ello, los alimentos no fermentados contienen mayores niveles de glucosilaciones, mientras que los alimentos de soya fermentados contienen mayores niveles de isoflavonas aglicadas [23].

No flavonoides

Los difenoles no flavonoides considerados como fitoestrógenos pertenecen a los cumestanos, lignanos y estilbenos.

Cumestanos

Los cumestanos se están relacionados genéticamente con las isoflavonas [31]. De esta forma, el cumestrol se deriva de la daidzeína por una serie de reacciones que incluyen hidroxilación y oxidación en el C2 y la formación de un anillo entre el C4 del heterociclo y C2' del anillo B (numeración de acuerdo a las isoflavonas) [26]. Dentro de los cumestanos, se han identificado una gran variedad de ellos pero sólo algunos presentan actividad estrogénica. Por lo

tanto, dentro de esta clase, el de mayor interés en relación a su actividad estrogénica es el cumestrol. Siendo, la principal fuente dietaria, el germen de soya y la alfalfa. También se encuentra en el garbanzo, los chícharos y el frijol.

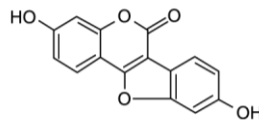


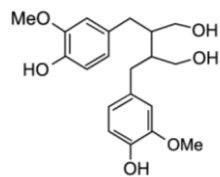
Figura 4. Cumestrol

Lignanos

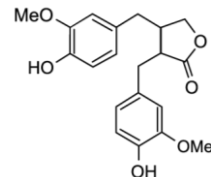
Los lignanos son un grupo de metabolitos secundarios de plantas que consisten principalmente de unidades fenilpropanoides (C6-C3) (Figura 1). Son un grupo de compuestos diversos, ampliamente distribuidos en todo el reino vegetal donde funcionan como agentes de defensa [26]. Los principales lignanos presentes en plantas son secoisolariciresinol y matairesinol. Sin embargo, se ha demostrado que también las plantas contienen en pequeñas cantidades lariciresinol, pinoresinol, siringaresinol, 7-hidroximatairesinol, entre otros. Lo anterior sugiere que el consumo de estos compuestos puede ser más alta y diversa a lo estimado. En la actualidad, se han identificado cerca de 500 estructuras diferentes de lignanos en plantas [32].

Los lignanos están presentes en las raíces, tallos, hojas, granos y frutos, encontrándose la mayor cantidad en la capa externa de los granos (Figura 5) [26, 33]. Las fuentes dietarias más importantes de estos compuestos son las semillas de lino y soya, cereales integrales (trigo, centeno y avena), leguminosas, hortalizas, nueces y frutas (principalmente las moras) [23, 34]. A su vez, se incluye el consumo de bebidas como el café, té y vino [32]. Además,

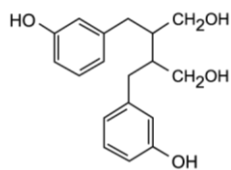
las dietas ricas en fibra son fuente de estos compuestos especialmente en países occidentales [21].



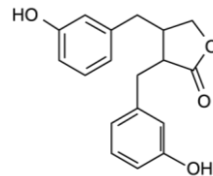
Secoisolariciresinol



Matairesinol



Enterodiol



Enterolactona

Figura 5. Principales lignanos presentes en la dieta y sus metabolitos

Estilbenos

El resveratrol (3, 5, 4'-trihidroxiestilbeno) es el único estilbeno considerado dentro de los fitoestrógenos. Su estructura consiste en la unión de dos anillos fenólicos por un enlace doble estireno (Figura 6). El doble enlace es responsable de la presencia de los isómeros *cis* y *trans*, pero el isómero *trans* es el más estable desde el punto de vista estérico. Si bien los dos isómeros presentan actividad estrogénica, es el isómero *trans* el más estudiado probablemente por encontrarse en mayor concentración en los alimentos y por presentar mayor actividad anticancerígena [35-36].

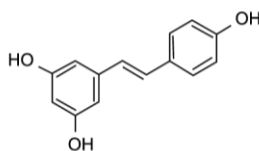


Figura 6. *trans*-resveratrol

El resveratrol pertenece al grupo de las fitoalexinas, las cuales se producen en las plantas bajo estrés microbiano o por radiación ultravioleta. A pesar de que los sustratos, 4-coumaroil-CoA y malonil-CoA, necesarios para la biosíntesis de este estilbeno están presentes en todas las plantas, no todas contienen la enzima resveratrol sintasa necesaria para su síntesis. Sin embargo, se han identificado más de 70 especies de plantas que contienen este estilbeno. Así, el resveratrol se encuentra en la dieta en alimentos como el vino, las moras, arándanos, uvas y el cacahuate [37-38]. Su concentración en los alimentos dependerá del clima y la presión fúngica ya que al ser un fungicida su síntesis es inducida por la infección de diversos microorganismos [35].

Absorción, metabolismo y excreción de fitoestrógenos en humanos

Para poder establecer el papel de los fitoestrógenos en la salud humana es importante esclarecer su metabolismo, lo cual no se ha logrado por completo. La información recabada al momento se centra en las isoflavonas daidzeína y genisteína y, en menor medida, en los lignanos enterodiol y enterolactona [39]. Existe poca o nula información relacionada con otros flavonoides como los prenilados o los cumestanos, por lo que a continuación sólo se mencionará el metabolismo de las principales isoflavonas y lignanos.

La mayoría de los fitoestrógenos presentes en los alimentos existen como glicósidos. Cuando se consumen, son sometidos a transformaciones metabólicas por enzimas tisulares o bacterianas, dando como resultado la formación de compuestos similares a hormonas con actividad estrogénica débil [5]. Por lo que, la biodisponibilidad de estos componentes de la dieta depende de diversos factores. Entre estos factores está la tasa de captación de forma libre y conjugada, hidrólisis de glicósidos, metabolismo posterior (formación de compuestos glucurónidos en el hígado, circulación enterohepática), y tasa de excreción en heces y orina [26].

En el ser humano, los fitoestrógenos aparecen en el plasma a un ritmo rápido y a un mayor nivel después de su administración oral en forma libre que los conjugados. Así por ejemplo, daidzeína, pero no sus glicósidos, es fácilmente transportada a través de las células intestinales (Figura 7). Se ha sugerido que su hidrólisis inicia en la saliva y en el estómago, pero existen desacuerdos al respecto. Por su parte, las β -glucosidasas en el hígado y en los enterocitos del intestino delgado son capaces de hidrolizar las isoflavonas glicosiladas. Así mismo, las β -glucosidasas de bacterias como lactobacilos, bacteroides y bifidobacterias, juegan un papel en la hidrólisis [39]. Una vez hidrolizados, los fitoestrógenos pueden ser absorbidos, o bien, pueden ser metabolizados por la flora bacteriana.

Una vez absorbidos, los fitoestrógenos son reconjugados con ácido glucurónico y, en menor medida, con sulfatos. La conjugación se lleva a cabo en el hígado o en el intestino por acción de las UDP-glucuronosil transferasas y sulfottransferasas [39]. De esta forma, los fitoestrógenos presentes en circulación estarán glucuronidados, sulfatados o sulfoglucuronidados.

A pesar de que la ingestión de isoflavonas resulta en un incremento de las mismas en plasma y orina, estos compuestos son posteriormente metabolizados. Así, Biochanina A y formononetina son rápidamente

desmetilados después de su ingestión por bacterias y por la actividad de diferentes citocromos P450 en el hígado. Biochanina A se transforma a genisteína, la cual es metabolizada a *p*-etilfenol y dihidrogenisteína. Este último es posteriormente metabolizado a 6'-hidroxi-*O*-desmetilangolesina. En cambio, formononetina se transforma a daidzeína y a continuación a *O*-desmetilangolesina (*O*-DMA), equol y otros metabolitos [5, 23].

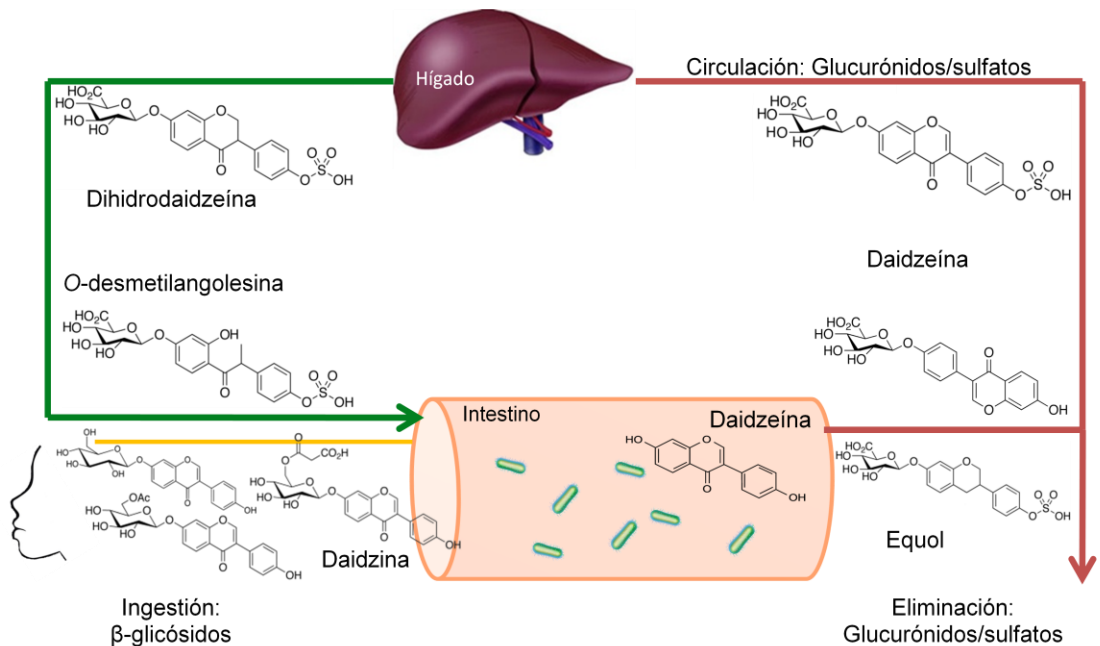


Figura 7. Representación esquemática del metabolismo de daidzeína

Antes de ser absorbida en el intestino, daidzina es hidrolizada a daidzeína por acción de enzimas bacterianas y tisulares. Para pasar a circulación, daidzeína es glucuronidada y/o sulfatada por acción de UDP-glucuronosil transferasas o sulfatasas presentes en el hígado o en el intestino. Estos conjugados pueden ser excretados de nuevo al intestino vía circulación enterohepática donde son deconjugados por enzimas bacterianas. De esta forma, pueden ser reabsorbidos, transformados y/o excretados.

Si bien las isoflavonas presentan actividad estrogénica, su metabolito equol; es significativamente más estrogénico. Por lo tanto, es en gran medida responsable de los efectos fisiológicos del consumo de isoflavonas. Sin embargo, la habilidad para producir equol no es la misma en todos los individuos. Su conversión se ve afectada por factores como la microflora del

intestino, consumo de carbohidratos, fibra y antibióticos principalmente. A pesar de ello, equol puede ser ingerido a partir de alimentos como la leche, carne y mariscos [5, 26, 40].

Por su parte, el metabolismo de los lignanos es bastante complejo. Una vez ingeridos se convierten en fitoestrógenos activos por la acción de la microflora en el colon proximal. Así, secoisolariciresinol se convierte a enterodiol a través de reacciones que implican hidrólisis, deshidroxilación y desmetilación. Posteriormente el enterodiol es metabolizado a enterolactona por oxidación. Mientras que matairesinol se metaboliza a enterolactona a través de deshidroxilación y desmetilación [23]. A su vez, pinoresinol y lariciresinol son metabolizados a enterolactona [41]. De esta forma, los lignanos encontrados en sangre y orina son enterodiol y enterolactona, aunque también pueden presentarse lignanos como lariciresinol e isolariciresinol [42].

Los fitoestrógenos conjugados y sus metabolitos, pueden ser excretados de nuevo al intestino por circulación enterohepática. Una vez ahí, las enzimas β -glucuronidasas y arilsulfatasas bacterianas pueden liberar a los fitoestrógenos y dejarlos disponibles para su reabsorción [39]. La actividad de ciertas bacterias puede seguir metabolizando y degradando a los fitoestrógenos, previniendo su reabsorción. Finalmente, los fitoestrógenos son eliminados por la bilis o vía urinaria, presentándose bajas recuperaciones, resultado de la extensa degradación bacteriana, produciéndose compuestos tan simples como *p*-etilfenol [43].

Efecto de los Fitoestrógenos de la Dieta en la Salud Humana

Los estrógenos promueven la proliferación y el crecimiento de células de tejidos específicos en el cuerpo como las glándulas mamarias, útero, vagina, ovarios, testículos, epidídimo y próstata. Los estrógenos a su vez intervienen en el mantenimiento de diferentes sistemas como el óseo, nervioso y cardiovascular. La función del estrógeno en el organismo se realiza por su afinidad y especificidad de unión a proteínas intracelulares denominadas receptores de estrógenos α y β (RE α y RE β) [44]. Una vez unido el estrógeno al RE se produce una serie de señales que conllevan a la modulación de la transcripción de genes [45].

Los fitoestrógenos, por su similitud estructural con el 17 β -estradiol, presentan actividad estrogénica débil (10^3 - 10^4 veces menor que el estrógeno) [46]. Estos compiten con el estrógeno por la unión del RE, modulando la transcripción de genes [47]. La capacidad de unión al RE dependerá de la presencia del anillo aromático, grupos hidroxilo y el carácter hidrófobo de la estructura [48]. Como se observa en la figura 8, existe una similitud estructural entre el estradiol y los fitoestrógenos. La distancia entre el hidroxilo del C7 y del C4' en las isoflavonas es casi idéntico a los hidroxilos del C3 y C17 del estradiol [26]. Por lo que la distancia entre los dos grupos hidroxilo en los fitoestrógenos y los presentes en el 17 β -estradiol, es esencial en la unión al RE [49].

Un cambio en la estructura repercute en la actividad estrogénica. Así por ejemplo, la metilación o glicosilación disminuye la capacidad de unión al RE. Por ello, formononetina y biochanina A son menos estrogénicos que daidzeína y genisteína. En cambio, la isoprenilación incrementa la unión la RE. La capacidad de unión relativa de los fitoestrógenos puede describirse como sigue: estradiol \geq cumestrol > genisteína = equol > daidzeína > gliciteína > kaempferol > naringenina > resveratrol > biochanina A = enterolactona = formononetina [39,

44, 50]. Por lo tanto, la estructura química de los fitoestrógenos determina la afinidad, selectividad y eficiencia de unión al RE [51].

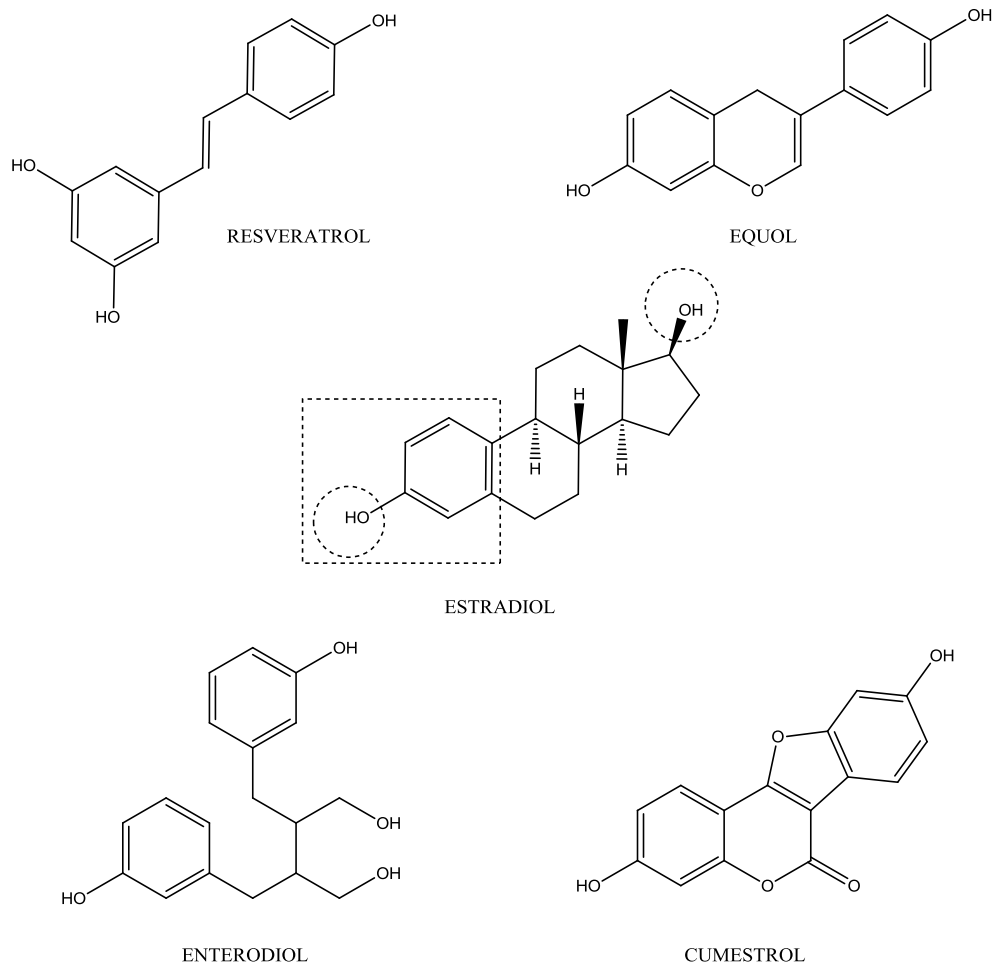


Figura 8. Similitud estructural de los fitoestrógenos con estradiol

La unión del fitoestrógeno al RE es equivalente al formado por el estradiol, por lo que induce actividad transcripcional. Los fitoestrógenos presentan mayor afinidad por el RE β que por el RE α . EL RE β se expresa en ovarios, útero, cerebro, testículos, próstata, pulmones, sistema cardiovascular y óseo [44]. Por lo que, la acción agonista en RE β y la baja activación del RE α ,

tienen un efecto benéfico en la menopausia, osteoporosis, protección cardiovascular, metabolismo de lípidos, cáncer de próstata y mama [45, 47, 52]

Los fitoestrógenos también ejercen sus efectos biológicos a través de mecanismos no estrogénicos. Por esta vía modulan la inhibición de enzimas como la tirosina cinasa, ADN topoisomerasa I y II, y la cinasa ribosomal S6, las cuales están involucradas en mecanismos de señalización, diferenciación y proliferación celular [53]. Además, presentan actividad antioxidante inhibiendo la formación de peróxido de hidrógeno, iones superóxido, y aumentando la actividad de enzimas antioxidantes [23].

Es a través de estos efectos estrógenicos y no estrogénicos que se han estudiado a los fitoestrógenos en diferentes padecimientos. Con base en estos estudios epidemiológicos y clínicos, se ha considerado que los fitoestrógenos pueden presentar un efecto benéfico en la salud.

Fitoestrógenos y menopausia

En la menopausia, el uso de la terapia hormonal de reemplazo (THR) ofrece un efecto protector contra enfermedades cardiovasculares, mejora la función cognitiva y alivia la sintomatología neurovegetativa. Sin embargo, existe poca confiabilidad en su uso debido a datos epidemiológicos y clínicos que indican un aumento en el desarrollo de cáncer mamario [54]. Para ello, el uso de fitoestrógenos ofrece un alivio potencial en la sintomatología de la menopausia por proveer de estrógenos exógenos [23]. En esta forma, se evitan los riesgos por el uso prolongado de la THR y se reduce el riesgo de cáncer y osteoporosis [55]

A pesar de posible efecto positivo de los fitoestrógenos en la menopausia, ciertas investigaciones revelan no necesariamente los fitoestrógenos ayudan a aliviar los síntomas de la menopausia. Además aseguran que el alivio en la severidad y frecuencia de los bochornos es “modesto” en comparación con los de la THR [56]. Pese a esta información, se ha observado que las mujeres productoras de equol presentan la menor severidad en la sintomatología neurovegetativa de la menopausia. Lo anterior remarca el hecho de que las mujeres continúen recomendando el consumo de alimentos ricos en fitoestrógenos para minimizar los sofocos [57]. La evidencia, al momento, es escasa para poder afirmar que los fitoestrógenos reducen los bochornos, sobre todo diversos diseños de estudio hacen difícil comparar los efectos [58].

Fitoestrógenos y riesgo cardiovascular

Las enfermedades cardiovasculares (ECV) se encuentran dentro de las principales causas de muerte en los países occidentales. Las personas con obesidad central, hipertensión, bajos niveles de colesterol unido a las lipoproteínas de alta densidad, dislipidemia e hiperglucemia, se encuentran en alto riesgo de padecer una ECV [59]. Sin embargo, se ha observado que un alto consumo de fitoestrógenos puede reducir este riesgo [37, 60].

Los estrógenos brindan protección cardiovascular al inhibir mediadores pro-inflamatorios, estimular la producción de prostaciclina (PGI_2 ; previenen la formación y agregación plaquetaria) y de prostaglandina (aumenta la permeabilidad del tejido para el paso de antiagregantes plaquetarios) al activar la ciclooxigenasa 2 (COX-2). De la misma forma, los fitoestrógenos presentan

efectos sobre el sistema cardiovascular, incluso los que presentan baja actividad como biochanina A [61]. Así, se ha observado que biochanina A presenta efectos benéficos al regular la expresión hepática del mRNA de apoA-1 a través de la unión al RE [44, 52].

Los flavonoides presentan actividades anti-inflamatorias a través de la producción de PGI₂ e inhibición de enzimas como lipoxigenasas y ciclooxigenasas, y factores como óxido nítrico sintasa (iNOS), el factor nuclear- $\kappa\beta$ (NF- $\kappa\beta$), y moléculas de adhesión celular (ICAM-1 y VCAM-1) [37, 61-63]. Estos efectos resultan de la unión de los flavonoides al RE, ya que al inhibir la actividad del receptor a través de antagonistas como ICI 182,780 (medicamento que permite la disminución del RE), los fitoestrógenos son incapaces de producir PGI₂ [61].

Los fitoestrógenos a su vez, protegen contra la peroxidación lipídica a través de su actividad antioxidante. Estudios *in vitro* demuestran que genisteína, daidzeína, sus derivados glicosilados, metoxilados y metabolitos, son capaces de inhibir la oxidación de las LDL [64-65]. De hecho los metabolitos equol y O-desmetilangolesina presentan mayor actividad antioxidante. Lo anterior sugiere que la ausencia del doble enlace en los carbonos 2,3 y el grupo oxo en el carbono 4 incrementa la actividad antioxidante. Así mismo, el número y la posición de los grupos hidroxilo (en el C-4', C-5, C-7) son determinantes en la inhibición de la peroxidación [64, 66].

Fitoestrógenos y osteoporosis

La deficiencia de estrógenos en mujeres postmenopáusicas puede llevar a desgaste óseo. Esto por un aumento en la reabsorción ósea y por disminución

en la formación de los huesos [26]. Los fitoestrógenos al presentar acción estrogénica podrían reducir el riesgo de osteoporosis. Los mecanismos para estos efectos incluyen la estimulación en la proliferación de osteoblastos, protección de estas células del daño oxidativo y aumento en la apoptosis de células progenitoras de los osteoclastos [67-68]. Por consiguiente, existe un gran interés de los fitoestrógenos en el posible papel en la reducción de osteoporosis.

La genisteína, a bajas concentraciones (0.1 μ M), presenta efectos a través de la unión al RE β , mientras que a altas concentraciones inhibe a tirosina cinasa (enzima involucrada en la actividad de los osteoclastos). De la misma forma, se ha sugerido que la genisteína podría modular la producción de óxido nítrico lo que resultaría en la modulación de la formación del hueso y por lo tanto, la disminución de la pérdida de material óseo [67]. Incluso se ha observado que la genisteína (a 1 nM) protege a los osteoblastos MC3T3-E1 contra el daño oxidativo en mayor medida que las vitaminas E y C [69].

Si bien los fitoestrógenos no presentan el mismo mecanismo de acción, se ha observado que son capaces de ejercer sus efectos a través de diferentes vías. Tal es el caso de daidzeína, la cual es incapaz de inhibir a tirosina cinasa. A pesar de ello, daidzeína presenta actividad (a 1 nM) al reducir la diferenciación de osteoclastos en respuesta a la vitamina D. Además, puede inducir la apoptosis de células progenitoras de osteoclastos a través de la activación de caspasas 8 y 3, fragmentación nuclear y formación de cuerpos apoptóticos. Estos efectos los logra daidzeína por su unión al RE, ya que al inhibir la actividad del receptor a través de ICI 182,780, daidzeína es incapaz de activar a las caspasas, permitiendo la formación de los osteoclastos [70].

Por otro lado, los flavonoides son capaces de inhibir la proliferación, diferenciación y mineralización de los osteoblastos. La proliferación de los osteoblastos se ve inhibida cuando las células son expuestas a quercetina a

una concentración de 5 μM a 10 μM . Así mismo, quercetina (a 10 μM) detiene a la célula en la primera fase del ciclo celular (G1) al estimular la expresión de mRNA de p21 que conlleva a la inhibición de cinasas dependientes de ciclina y la fosforilación de las histonas 1. Una vez que los osteoblastos han dejado de proliferar, la genisteína reduce la actividad de fosfatasa alcalina, la expresión de mRNA de osteocalcina, los depósitos de Ca^{2+} y la formación de nódulos mineralizados, los cuales son marcadores de la diferenciación de osteoblastos [71].

A pesar de los mecanismos de acción propuestos, el consumo de fitoestrógenos provenientes de la soya presenta mecanismos independientes a sus efectos estrogénicos. En primer lugar, los alimentos con soya son fuente de calcio. En segundo lugar, una dieta rica en proteínas de soya, puede prevenir la pérdida urinaria de calcio comparado con una dieta rica en proteína animal [23]. Por lo que el efecto protector de los fitoestrógenos en la osteoporosis aún no está bien establecido.

Fitoestrógenos y cáncer

Existen diversas investigaciones que apoyan la hipótesis de que el consumo de fitoestrógenos reduce el riesgo de cáncer, como el de mama, colon y próstata. Esto se debe a que pueden inhibir la angiogénesis (esencial en la expansión del tumor) e inhibir la actividad de diversas enzimas, por mecanismo dependiente o independiente de unión al elemento de respuesta a estrógenos (ERE) [22].

El factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) es un potente estimulador de la angiogenesis. Los fitoestrógenos, como genisteína, inhiben el

crecimiento vascular hasta un 50% cuando se utilizan concentraciones de 370 μM . Sin embargo, estos resultados no son relevantes ya que las concentraciones en circulación son de 1 a 10 μM [72]. Por otro lado, estudios donde se utilizaron concentraciones menores de genisteína (1 a 50 μM) se observó, en células de tumor de mama (F3II) y de melanoma (B16F0), una reducción en la migración celular [73]. Se sabe que las isoflavonas ejercen su efecto antiangiogénico por inhibición del VEGF, pero no se sabe si los demás fitoestrógenos presentarán los mismos efectos y el mecanismo de acción [72-73].

Los fitoestrógenos, a través de la regulación enzimática, inhiben a tirosina cinasa, topoisomerasa II e histidina cinasa, relacionadas con la expresión de oncogenes [74]. Cabe mencionar que las tirosinas cinasas son esenciales en los mecanismos de traducción de señales. Los fitoestrógenos, al inhibir la actividad de estas enzimas, previenen la progresión de la célula a la fase S, la detienen en G2/M e inducen la apoptosis [51, 75]. Así, por ejemplo, genisteína (75 μM) inhibe el crecimiento celular de cáncer cérvico-uterino (HeLa) al reducir la expresión de topoisomerasa II. Esta variación de los niveles de topoisomerasa II juega un papel en la apoptosis de las células cancerosas [76].

La transducción de genes no se limita por su unión al ERE. Los fitoestrógenos presentan este efecto, al regular las cascadas de señalización responsables de la expresión de genes, ciclo celular, proliferación celular y apoptosis a través de $\text{ER}\alpha$ y $\text{ER}\beta$. Resveratrol y naringenina inhiben cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK) y la activación de la proteína cinasa activada por mitógeno p38 (MAPK) en diferentes líneas celulares (HeLa y HepG2). Mientras que, genisteína y daidzeína regulan la actividad de proteína cinasa activada por mitógeno 1 (MEK1) y por ERK en células cancerosas de mama. Lo anterior, conlleva a la supresión del $\text{NF-}\kappa\beta$ y ciclina D1 y, por lo tanto,

a la apoptosis. Estos efectos no se ven inhibidos por la presencia del antiestrógeno ICI 182 780, lo que comprueba que la actividad es independiente de la capacidad estrogénica del fitoquímico [22, 72, 75].

A pesar de los diversos estudios realizados, éstos no son concluyentes por lo que el posible efecto protector de los fitoestrógenos en la prevención del cáncer sigue siendo incierta [22]. Algunos trabajos mencionan efectos moderados entre el consumo y el riesgo, otros han detectado nula asociación, y algunos han determinado un marcado efecto protector [21, 77-78]. Otros aseguran que los resultados benéficos no son aplicables *in vivo* [51].

Estimación del Consumo de Fitoestrógenos

Generalmente la estimación del consumo de fitoestrógenos se realiza a través de cuestionarios, diarios o entrevistas. Estos métodos implican ya sea la recopilación de la ingestión reciente, con el recordatorio de 24 h, o la ingestión habitual, con el cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos. Para ello, se requiere la cantidad consumida y una descripción detallada del alimento. La información obtenida de los cuestionarios se traduce a datos cuantitativos a través de la tabla de composición de alimentos con lo que se establece el consumo del individuo [79-80].

Existen diferentes factores que afectan la formación y concentración de los fitoestrógenos en los alimentos. Dentro de estos factores se encuentran las condiciones ambientales, tipo, madurez y variedad del alimento [4]. Además, existen factores que influyen en la ingestión y absorción como son el patrón de consumo de alimentos, las diferencias en el metabolismo, flora bacteriana y consumo de antibióticos entre otros [81-82]. Por lo anterior, el contenido de

fitoestrógenos en los alimentos es variable y, su ingestión lo es aún más. De esta forma, se observan estimaciones de consumo que van de 10 a 100 mg/día, incluso de 200 mg/día o bien, por debajo de los 5 mg/día [4, 8, 27, 83].

Numerosos estudios se han centrado en estimar el consumo de fitoestrógenos, sin embargo, los resultados son diversos. Esto se debe a que los cuestionarios dietarios están asociados a errores aleatorios y sistemáticos [84]. Estos errores surgen del uso de las tablas de composición de alimentos, la evaluación de la frecuencia del consumo, el tamaño de la porción, la variación diaria del consumo y un fallo en el reporte de la dieta (ya sea por cambios en la alimentación o un reporte erróneo del entrevistado) [79, 84]. La presencia de estos errores conlleva a que los cuestionarios carezcan de exactitud. En cambio, un biomarcador es un indicador objetivo del consumo, por lo que los podrían reemplazar los métodos tradicionales [80].

Es indudable que al evaluar la actividad estrogénica de los fitoestrógenos, la concentración de estos compuestos deberá estar en un intervalo cercano al encontrado en humanos. En este sentido, muchos factores deben tomarse en cuenta, tales como su consumo diaria, su metabolismo, niveles plasmáticos y excreción; factores que varían entre individuos [4]. Una vez logrado esto, se podrá contribuir a establecer la relación entre el consumo de fitoestrógenos y el estado de salud de las personas.

Evaluación del consumo de fitoestrógenos en México

En México, la mayoría de las investigaciones relacionadas con el consumo de fitoestrógenos han sido realizadas en mujeres sanas del centro del país y en mujeres con cáncer de mama [6-7, 85]. El estudio en mujeres sanas

reveló que los alimentos que contribuyen al consumo de los fitoestrógenos son: frijol pinto, brócoli, manzanas, salsas, cebollas y naranjas. Sin embargo, el estudio presenta varias limitaciones. En primer lugar, el análisis se limitó a nueve fitoestrógenos, por lo que no refleja el consumo total de ellos. En segundo lugar, no incluye el contenido de los compuestos de algunos alimentos locales y de su consumo frecuente. En tercer lugar, la información sobre la preparación de alimentos no fue incluida en los cuestionarios. Por último, los datos obtenidos no reflejan a la población de la república por lo que no pueden ser generalizados [6].

El estudio realizado en México acerca de la ingestión de fitoestrógenos y el riesgo de cáncer de mama fue consistente con investigaciones realizadas en países como Grecia, Italia y Estados Unidos. Se observó que las mujeres postmenopáusicas, con alto consumo de flavonoles y flavonas, presentaban una reducción significativa de riesgo de cáncer mamario (RM = 0.21, IC 95 %: 0.07-0.60 y RM = 0.29, IC 95 %: 0.10-0.82 respectivamente). Dentro de este estudio también se observó un efecto similar de los lignanos pero en mujeres premenopáusicas (RM = 0.32, IC 95 %: 0.10- 0.99 y RM= 0.19, IC 95 %: 0.06-0.62). Estos resultados respaldan el papel protector de los fitoestrógenos en el cáncer de mama a diferentes estados menopáusicos, independientemente de otros factores reproductivos [7].

Aunado a lo anterior, es necesario evaluar la ingestión de fitoestrógenos y su relación con la salud en el norte de México. El norte del país tiene una tasa de incidencia de cáncer de mama mayor que los del sur de México. En el 2009, la Dirección General de Epidemiología informó una incidencia de cáncer de mama en Sonora de 8.09 por 100 000 habitantes. Si bien, la incidencia se encuentra por debajo de la nacional (15.41 por 100 000 habitantes), los estados del sur de México presentan incidencias menores a 5 por 100 000 habitantes. Existen diversos factores que podrían explicar esta diferencia, pero debe

tenerse en cuenta que los hábitos alimenticios son distintos. La dieta del sur se caracteriza por ser baja en grasas y carne roja, pero rica en alimentos con flavonas y lignanos. Por otro lado, la dieta del norte, se caracteriza por el alto consumo de grasas, azúcares y carnes rojas, y bajo consumo de frutas y verduras [7]. Por ello, conocer el consumo de fitoestrógenos a través de la dieta regional sonoreense permitiría hacer asociaciones con en el posible riesgo de cáncer de mama y otras enfermedades crónicas.

El Suero como biomarcador del consumo de fitoestrógenos

Los estudios epidemiológicos se han visto limitados por la dificultad de cuantificar la ingestión de los fitoestrógenos. Esto puede atribuirse a la escasez de datos sobre las concentraciones de estos compuestos en los alimentos y su consumo diaria. La extracción y el análisis de los fitoquímicos es difícil dada la variedad y la variación de alimentos en los cuales se encuentran presentes [86]. Las bases de datos de composición de alimentos son costosas y difíciles de establecer, sobre todo en alimentos procesados, funcionales y suplementos alimenticios. Por lo tanto, la disponibilidad de un biomarcador como medida independiente y objetiva de la exposición a estos compuestos exógenos representa una alternativa atractiva [10, 19].

Un biomarcador se define como un cambio medible, ya sea bioquímico, fisiológico o patológico, en un organismo, relacionado a una exposición o efecto específico [51]. Existen tres tipos de biomarcadores: de exposición, efecto y susceptibilidad a la exposición [87]. Los marcadores de exposición indican que el compuesto exógeno (o sus metabolitos) se encuentra biodisponible en el organismo. Los biomarcadores de efecto miden la capacidad funcional, o

cualquier indicador del estado del cuerpo afectado por la exposición. Por último, los marcadores de susceptibilidad permiten identificar a los individuos más susceptibles a daños debido a la exposición en una población [79]. Por lo tanto, un biomarcador es una medición en el organismo que refleja cuantitativamente la interacción con el agente exógeno [88].

Para ello, un biomarcador ideal, para ser utilizado, debe de cumplir con las siguientes características [89]:

- Debe ser de relevancia biológica para el tipo de efecto o de compuesto que pretenda controlarse o medirse.
- El método de cuantificación debe ser sensible, de forma que refleje un cambio debido a la exposición al agente.
- Debe ser específico para un agente determinado.
- Debe ser detectable en muestras disponibles, no invasivas y no destructivas para el organismo (sangre, orina, pelo).
- El método de cuantificación debe ser reproducible y de bajo costo.
- La variabilidad natural y modificaciones temporales del indicador debieran ser controlables o al menos conocidas.

Dentro de los biomarcadores de exposición a fitoestrógenos, que pueden ser utilizados, se encuentran el suero y orina de 24 h [8]. Se ha visto que estos presentan una alta correlación con los cuestionarios de consumo como el recordatorio de 24 h. Lo anterior sugiere que cualquiera de los dos puede ser utilizado como marcador del consumo cuando no se cuente con información suficiente sobre la dieta. Establecer un biomarcador del consumo de fitoestrógenos permite desarrollar estudios epidemiológicos de mayor impacto con resultados precisos. Además, fortalece la información contenida en los recordatorios dietarios y reduce el tiempo de análisis para estimar el consumo de fitoestrógenos [19].

El uso de la orina o el suero como marcadores biológicos tiene sus ventajas y desventajas. La orina es fácil de recolectar y de manejar, mientras que el suero puede ser considerado invasivo para algunos individuos. Uno de los problemas en el uso de orina es que la concentración del analito depende de la dilución en la misma. Para ajustar la variabilidad en la dilución se ajustan las concentraciones de los fitoquímicos en relación a la excreción de creatinina [19]. Además, la orina de 24 h no se recolecta por completo en muchas de las muestras. En el caso del suero no es necesario llevar a cabo ningún ajuste. Sin embargo, las concentraciones son menores en el suero que en la orina. A pesar de ello, el suero es considerado un marcador fiable y aplicable [27, 90].

El análisis de fitoestrógenos en suero corresponde principalmente a su consumo reciente dado la rápida eliminación de estos compuestos [83, 91]. Generalmente, los fitoestrógenos son eliminados del organismo de 6 a 96 h [83, 92]. De este modo, se ha observado una mayor relación entre los niveles de fitoestrógenos en plasma y la dieta actual (recordatorio de 24 h) que con la dieta habitual (cuestionario de frecuencia de consumo de alimentos) [93]. Por lo tanto, los niveles séricos de fitoestrógenos reflejan una exposición reciente.

Existen pocos estudios donde se ha determinado la relación entre las concentraciones plasmáticas de los fitoestrógenos y la dieta [12-13]. Hasta ahora, estas investigaciones han encontrado asociaciones débiles a moderadas. Lo anterior puede deberse al número de compuestos determinados. En algunos casos sólo se han establecido los niveles de secoisolariciresinol, matairesinol y enterolactona [34, 93-94]. O bien, sólo se centran en determinaciones de isoflavonoides o flavonoles [43, 95-97]. Por lo que, si se desea conocer cuáles son los principales fitoestrógenos de la dieta y disminuir el error de medición, el número de compuestos a cuantificar debe ser mayor [33]. Sobre todo, deben medirse aquellos fitoestrógenos de la dieta con

mayor actividad biológica, es decir, los flavonoides, cumestrol, lignanos y resveratrol.

Métodos para la Extracción y Cuantificación de Fitoestrógenos

Desde el inicio del estudio de los fitoestrógenos se han desarrollado una gran cantidad de técnicas para su extracción, determinación y cuantificación. Estas metodologías se han aplicado a numerosos alimentos, fluidos biológicos y tejidos [30, 98-99]. Para ello, las técnicas deben presentar alta sensibilidad, especificidad, precisión y exactitud. Además, las metodologías deben ser capaces de procesar numerosas muestras para poder ser aplicadas en estudios epidemiológicos a gran escala [60, 100]. Para lograr esto, la extracción y análisis de las muestras debe realizarse con el menor gasto de disolventes y en el menor tiempo [90]. Por lo que, los métodos para la extracción y cuantificación de fitoestrógenos se desarrollan constantemente.

La mayoría de los métodos publicados para la extracción de fitoestrógenos de muestras biológicas implican técnicas complejas de preparación de las mismas. A pesar de ello, existen extracciones sencillas, incluso de un sólo paso, que pueden ser empleadas. Entre estas se encuentra la extracción en fase sólida (SPE) y extracción líquido-líquido [101-102]. La más utilizada es la SPE ya que se pueden prevenir los problemas asociados a la extracción líquido-líquido, es decir, no se producen separaciones de fases incompletas, se mantienen los rendimientos de extracción y se reduce el tiempo de procesamiento. El adsorbente C₁₈ en la SPE es ampliamente utilizado en la extracción, concentración y limpieza de muestras biológicas ya que no se

requiere de un pretratamiento de la muestra para mantener el porcentaje de recuperación [90].

En general, las técnicas de cuantificación de fitoestrógenos se pueden clasificar en cromatográficas y no cromatográficas. En las primeras se incluyen a la cromatografía líquida (HPLC) y gases (GC) acoplados o no a espectrometría de masas (MS) [78, 103]. Mientras que en las segundas se incluyen a los inmunoensayos como el fluoroinmunoensayo de tiempo resuelto (TR-FIA) [104-106]. Cada una de ellas determina y cuantifica un número limitado de fitoestrógenos en muestras biológicas [2, 17].

Una de las técnicas que ha sido ampliamente utilizada es el TR-FIA. Ésta se ha utilizado principalmente para determinar enterolactona, genisteína, daidzeína, O-desmetilangolesina y equol [34, 106-107]. Las ventajas del método son su alta sensibilidad y rápido análisis. Sin embargo, presenta baja especificidad comparado con el MS. Debido a esto, se pueden cometer errores de medición entre compuestos estructuralmente similares a los fitoestrógenos presentes en la muestra. Otra limitación del método es que únicamente puede cuantificar un analito por ensayo [16, 90]. Por lo tanto, no es conveniente si se desea analizar varios fitoestrógenos por muestra.

La metodología de elección por su selectividad y sensibilidad en el análisis cuantitativo de fitoestrógenos en muestras biológicas es GC-MS [14]. A pesar de sus beneficios, las muestras requieren numerosos pasos de limpieza y un tiempo de procesamiento largo [2, 16]. Además, al ser compuestos no volátiles, los fitoestrógenos requieren derivatizarse antes de llevar a cabo el análisis [5, 90]. Por lo que en la mayoría de los casos se opta por utilizar HPLC-MS.

En los últimos años se han registrado diversos estudios que utilizan HPLC-MS para la determinación de fitoestrógenos [2, 96, 108]. En ésta técnica,

se han utilizado ionización química a presión atmosférica (APCI) y por electrospray (ESI), tanto en modo positivo como negativo [17, 109]. A su vez, se han empleado espectrómetros de masas con diferentes analizadores incluidos trampa de iones, cuadropolar y triple cuadropolar [109]. La máxima sensibilidad y selectividad se consigue utilizando HPLC acoplada a espectrometría de masas en tándem (HPLC-MS/MS) a través del espectrómetro de masas triple cuadropolar [90]. Una de las ventajas de utilizar HPLC-MS es que la preparación de las muestras se simplifica y, a diferencia de la GC-MS, no se requiere derivatizar [2, 16].

Las nuevas metodologías para el análisis de fitoestrógenos por HPLC-MS permite la determinación simultánea de hasta 13 fitoestrógenos. Además, son adecuados para procesar numerosas muestras debido a su tratamiento simple, tiempo de corrida corto (2-10 min) y confirmación simultánea. Asimismo, sus parámetros de validación como la exactitud y precisión se encuentran dentro de los intervalos permitidos. Así mismo, los límites de cuantificación se encuentran en el orden de las partes por billón (ppb). Así, el sistema HPLC-MS puede ser utilizado en estudios epidemiológicos y, con la información generada, establecer, de manera más precisa, las posibles asociaciones entre el consumo de fitoestrógenos y la salud [2, 17, 19, 90].

HIPÓTESIS

Los niveles séricos de fitoestrógenos en mujeres sanas se pueden utilizar como biomarcadores de su consumo reciente en la dieta sonoreense.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar el uso de niveles séricos de fitoestrógenos determinados por HPLC-DAD-ESI-MS como biomarcadores de su consumo dietario reciente en mujeres adultas sanas de Hermosillo, Sonora.

Objetivos Particulares

- Establecer la metodología para la determinación de 16 fitoestrógenos (luteolina, kaempferol, equol, biochanina A, formononetina, quercetina, naringenina, cumestrol, secoisolariciresinol, genisteína, matairesinol, enterolactona, enterodiol, daidzeína, gliciteina y resveratrol) por HPLC-DAD-ESI-MS.
- Determinar los niveles de fitoestrógenos en suero de mujeres sanas de Hermosillo, Sonora por HPLC-DAD-ESI-MS.
- Evaluar la posible correlación entre los niveles séricos de fitoestrógenos y el consumo de éstos determinada por recordatorio de 24 h, en mujeres sanas de Hermosillo, Sonora.

SUJETOS Y MÉTODOS

Sujetos de Estudio

En el estudio participaron 100 mujeres aparentemente sanas mayores de 25 años de edad, no embarazadas, ni en periodo de lactancia, sin antecedentes de enfermedades como cáncer, diabetes o del corazón, que no hayan consumido algún medicamento o antibiótico siete días antes de la toma de muestra y con residencia mínima de 5 años en Hermosillo, Sonora. El estudio fue aprobado por el comité de ética del CIAD A.C. A cada participante se le solicitó que leyera y firmara, si estaba de acuerdo, una carta de consentimiento informado en donde se le explicó el objetivo de la investigación así como los riesgos y responsabilidades de las participantes.

Diseño Experimental

El diseño del estudio es de corte transversal. Las mujeres fueron seleccionadas a través del marco muestral maestro (MMM) proporcionado por el Instituto Nacional de Salud Pública. El MMM comprende áreas geoestadísticas básicas (AGEBs), las cuales se agruparon en unidades primarias de muestreo (UPM) para fines de selección muestral. Las UPM se agruparon por niveles socioeconómicos bajos, medios y altos. Para cada uno de estos subgrupos se seleccionó de manera aleatoria una manzana. El número de viviendas muestreadas (una mujer por vivienda), se distribuyó de

manera proporcional al número de viviendas en cada subgrupo de nivel socioeconómico. En cada manzana se seleccionaron de manera aleatoria las viviendas donde se buscaba la presencia de una mujer que cumpliera con los criterios de elegibilidad. Cuando no se encontró una mujer elegible o que no haya aceptado formar parte del estudio, se procedió a ubicar en el siguiente domicilio de la lista.

Se realizaron mediciones antropométricas, un recordatorio de 24 h y un cuestionario socio-demográfico. El recordatorio de 24 h se realizó el día de la toma de muestra, por personal entrenado de la institución. De esta forma, se identificó los alimentos consumidos y el tamaño de las porciones. El análisis de los componentes dietarios se derivan de la adaptación del diccionario de alimentos realizado en el CIAD A. C. (Coordinación de Nutrición), provenientes de numerosas tablas de composición de alimentos (Departamento de Agricultura de los Estados Unidos, Instituto Nacional de Nutrición en México y artículos científicos). Así mismo, se evaluaron los niveles séricos de fitoestrógenos a través del método por HPLC-DAD-ESI-MS.

Soluciones de Trabajo de Fitoestrógenos

Los fitoestrógenos estudiados fueron biochanina A (bio), formononetina (for), kaempferol (kae), gliciteína (gli), daidzeína (dai), cumestrol (cum), secoisolariciresinol (sec), genisteína (gen), matairesinol (mat), enterolactona (enl), enterodiol (end), equol (eq) y resveratrol (res) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) y quercetina, luteolina, y naringenina de INDOFINE Chemical Company Inc. (Hillsborough, NJ, USA) grado HPLC, GC y TLC. Se prepararon las soluciones patrón de cada fitoestrógeno a 1.0 mg/mL en metanol, excepto

para biochanina A que se preparó en etanol. A gliciteína y cumestrol se le añadieron 20 μL de dimetilsulfóxido para aumentar su solubilidad en metanol. A partir de éstas, se preparó la solución de trabajo a un nivel de concentración en suero de 16 ng/mL en metanol. Se utilizó como estándar interno a 4-hidroxibenzofenona (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA), la cual fue preparada en metanol a una concentración de 0.2 $\mu\text{g/mL}$. Los disolventes metanol y etanol fueron grado HPLC de J. T. Baker (Phillipsburg, NJ, USA). El dimetilsulfóxido fue grado HPLC (pureza $\geq 99.7\%$) de Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA).

Mezclas de Estándares Internos de Deconjugación

El 4-metilumbeliferilsulfato de potasio y la fenolftaleína glucurónido (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO, USA) fueron utilizados como estándares de deconjugación para corroborar la reacción enzimática de acuerdo al manual de procedimientos de laboratorio de la CDC (Center of Disease Control and Prevention, por sus siglas en inglés) [110]. Los estándares fueron preparados a una concentración de 400 $\mu\text{g/mL}$ para fenolftaleína glucurónido y 330 $\mu\text{g/mL}$ para 4-metilumbeliferonasulfato en metanol y agua respectivamente. Las muestras y controles fueron fortificados con 10 μL de la mezcla de estándares de deconjugación.

Muestras de Suero

Se solicitó a cada participante la donación de una muestra de sangre, de preferencia en ayunas, la cual fue recolectada en tubos vacutainer con gel separador sin anticoagulante. Las muestras fueron transportadas al laboratorio de Toxicología de Plaguicidas de la Coordinación de Ciencia de los Alimentos del CIAD, A. C. en hielo. Posteriormente se separó el suero a 1 400 x g durante 15 min a 4°C (centrífuga refrigerada Allegra 6R Beckman) y se formaron alícuotas de 1.0 mL de suero en viales de polipropileno de 2 mL. Todas las muestras se almacenaron a una temperatura de -70°C hasta su análisis.

Tratamiento y Extracción de Fitoestrógenos en Suero

El tratamiento y extracción de fitoestrógenos se realizó de acuerdo a una técnica previamente descrita [17]. Se realizaron modificaciones a la técnica de extracción en fase sólida para mejorar los porcentajes de recuperación de los analitos. A 1 mL de la muestra de suero se le agregó 1.0 mL de hexano y 800 µL de ésta fueron transferidos a un tubo de polipropileno de 2 mL. Se adicionaron 200 µL de metanol para la precipitación de proteínas. Posteriormente, se adicionaron 50 µL del estándar interno, 10 µL de estándares de deconjugación, 800 µl de la mezcla de enzimas (33 mg/mL de *Helix pomatia* en buffer acetato de sodio pH 5, 0.1 M; 300 U/mg de β- glucuronidasa y 15.3 U/mg de sulfatasa) y se incubó a 37°C por 12 h. Los cartuchos Bond Elut C₁₈ (3ml, 100 mg, Varian) fueron previamente acondicionados con 3 mL de metanol y 3 mL de buffer acetato de sodio. Las muestras fueron centrifugadas durante 10 min a 7 200 x g y el sobrenadante se aplicó a los cartuchos para ser lavados

con 3 mL de metanol al 5%. Los cartuchos se dejaron secar durante 5 min a -10 kPa. Los fitoestrógenos se eluyeron con 4 mL de metanol. El eluato se llevó a sequedad con nitrógeno y se resuspendió con 200 μ L del disolvente de reconstitución (metanol/fase móvil inicial 40:60, v/v).

Cromatografía Líquida y Espectrometría de Masas

El análisis de los fitoestrógenos se realizó mediante una técnica previamente desarrollada [17] a la cual se le realizaron ciertas modificaciones. Se utilizó un equipo Agilent 1100 serie LC/MSD acoplado a un espectrómetro de masas con cuadrupolo simple G1946A, modelo VL, con software Chemstation (Rev B.03.02) (Agilent Technologies, Inc., Palo Alto, Ca, USA). La separación cromatográfica se realizó con una columna XBridge C₁₈, (150 x 3 mm, 3.5 μ m) conectada a una precolumna XBridge C₁₈ (20 x 3 mm, 3.5 μ m). La fase móvil consistió en agua (solución A) y metanol/acetonitrilo 80:20, v/v (solución B), ambas acidificadas con ácido fórmico al 0.025% (v/v). La velocidad de flujo y gradiente fue como sigue: 0 – 5.0 min; 35 – 40 % de B (flujo: 0.6 mL/min), 5.0 - 16 min; 40 – 100 % de B (flujo: 0.6 mL/min); 16 – 19 min; 100% de B (flujo: 0.8 mL/min), 19 – 19.1 min; 100 – 35 % de B (flujo: 0.6 mL/min) y 2.9 min para reequilibrar la columna. Los compuestos eluidos fueron detectados a 260, 280, 290, 310 y 360 nm e identificados por comparación de los tiempos de retención de acuerdo a los estándares y con los espectros de absorción de 190 a 500 nm utilizando un detector de arreglo de diodos. La confirmación de los compuestos se hizo por espectrometría de masas, con un cuadrupolo simple y fuente de ionización por electrospray en modo negativo. Los analitos entraron a la cámara de ionización durante los primeros 15 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 por flujo de inyección) y por SCAN (barrido completo de iones). Se utilizaron las cuatro señales del detector de espectrometría de masas para la cuantificación en monitoreo del ión selecto (SIM).

Optimización del Método de Análisis de Fitoestrógenos en Suero

Para optimizar el método, se establecieron las condiciones cromatográficas y los tiempos de retención de los analitos. El método fue establecido de acuerdo a la Guía para Validación de Métodos Bioanalíticos de la FDA (U.S. Food and Drug Administration, por sus siglas en inglés) [111]. Los parámetros evaluados fueron: selectividad, linealidad y porcentajes de recuperación.

Aseguramiento de la calidad de los datos

En todos los análisis realizados durante la optimización y procesamiento de muestras, se incluyó un blanco cristalería, un blanco reactivo, una muestra blanco (libre de fitoestrógenos), una muestra adicionada (muestra blanco fortificada con la solución de trabajo) y la solución de trabajo.

Selectividad del método

Se identificaron sueros blanco comerciales libres de fitoestrógenos (Innovative Research; Novi, MI, USA), los cuales fueron utilizados para determinar la selectividad del método. Se analizaron cinco sueros blancos provenientes de diferentes donadores. A cada suero blanco se le evaluó la presencia de interferencias, las cuales no deben encontrarse por arriba del límite de cuantificación.

Porcentajes de recuperación

El porcentaje de recuperación (%RE) se realizó comparando los resultados del análisis de muestras adicionadas a 16 ng/mL antes de la extracción (A) con la solución de trabajo (B).

$$\%RE = (A/B)(100)$$

Se consideran como %RE aceptables de 70 a 120 %, con un coeficiente de variación menor al 20%. Debido a la heterogeneidad del suero, los porcentajes de recuperación se realizaron en seis sueros comerciales blanco independientes.

Linealidad del sistema y del método

Se evaluó la linealidad del sistema, la cual fue demostrada a través de curvas de calibración a concentraciones de 0.16, 1.6, 16, 160, 1600, 16000 y 24000 ng/mL de la mezcla de fitoestrógenos. Para evaluar la linealidad del método, se utilizaron sueros blanco adicionados con la mezcla de fitoestrógenos a una concentración final de 0.02, 0.2, 2.0, 20, 200, 2000 y 3000 ng/mL. Además, se incluyó un suero blanco adicionada con el estándar interno y un suero blanco. La linealidad del sistema y del método, se realizó en dos ocasiones y cada uno de los niveles de concentración se inyectó por triplicado en el cromatógrafo. De los cromatogramas generados se obtuvieron los gráficos de concentración, área y el coeficiente de correlación.

Se determinó el límite de detección (LD) y límite de cuantificación (LC) como la mínima concentración en sueros adicionados con la mezcla de fitoestrógenos con una señal 3 y 10 veces, respectivamente, mayor que la señal ruido de la solución de inyección o de sueros comerciales blancos.

Análisis Estadístico

Los datos obtenidos durante la optimización del método fueron analizados por estadística descriptiva considerando la media, desviación estándar, coeficiente de variación, coeficiente de correlación de las curvas de calibración de cada fitoestrógeno y la linealidad del sistema.

El tamaño de muestra considerado para la prueba de correlación fue de 100 individuos. De esta manera, se planteó encontrar correlaciones

significativas para cada uno de los fitoestrógenos que aparecen comúnmente en la dieta y suero, con al menos una $r = 0.30$.

Se realizó un análisis descriptivo de los sujetos de estudio utilizando media aritmética, desviación estándar y porcentajes. Dada la dispersión de los niveles de los fitoestrógenos en suero y dieta, éstos se describen utilizando la media y desviación estándar, así como la media geométrica e intervalo de confianza al 95% y la mediana con el correspondiente intervalo intercuartil.

Se evaluó la normalidad de la distribución de los niveles de los fitoestrógenos en suero. Se observaron cuáles fitoestrógenos estaban presentes en suero en comparación a los encontrados en los alimentos de los recordatorios de 24 h. Para los fitoestrógenos que se encontraron tanto en dieta como en suero, se correlacionaron las concentraciones de cada uno de ellos mediante la prueba no-paramétrica de Spearman.

El análisis estadístico se llevó a cabo en el programa estadístico NCSS 2001. Para cada uno de los análisis, la significancia estadística se consideró a un valor de $p < 0.05$.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Optimización del Método de Análisis de Fitoestrógenos en Suero por HPLC-DAD-ESI-MS

Parámetros de LC-DAD

Se establecieron los parámetros para la separación e identificación de los 16 fitoestrógenos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con un detector de arreglo de diodos (DAD). Siguiendo las condiciones cromatográficas establecidas por el método de Wyns *et al.*, (2010), se logró la resolución de resveratrol, secoisolariciresinol, formononetina y biochanina A [17]. Por lo tanto, para optimizar la separación de los 16 fitoestrógenos de interés, se probaron cambios en la temperatura de separación, longitud de columna, velocidad de flujo y gradiente de la fase móvil. De esta forma, se disminuyó la temperatura de separación a 52°C, se incrementó el tiempo de cambio del porcentaje de la solución B. Por otro lado, se aumentó el tiempo de corrida a 2 min con respecto al método original, manteniendo la longitud de la columna y velocidad de flujo (Tabla 1). Bajo estas condiciones, se logró una resolución adecuada de 5 fitoestrógenos por HPLC. Sin embargo, por espectrometría de masas (MS), estas condiciones permiten la cuantificación de los 16 fitoestrógenos, apartado que se discutirá en la sección de LC-ESI-MS.

La primera fase de identificación de los fitoestrógenos se realizó por sus espectros de absorción en UV. Dado que los fitoestrógenos cuentan con una estructura muy diversa por las diferentes conjugaciones y radicales en los anillos aromáticos, sus longitudes de máxima absorbancia pueden diferir. Sin

embargo con el uso de un detector de arreglo de diodos y la presencia de anillos aromáticos, la identificación de los fitoestrógenos se vio favorecida por su barrido en el UV. De esta forma, los 16 estándares de fitoestrógenos se pudieron identificar con sus espectros de absorción en UV como se observa en la figura 9.

Tabla 1. Método descrito por Wyns *et al.*, (2010) y su optimización para el análisis de 16 fitoestrógenos por HPLC en el presente estudio

| Parámetros | Wyns <i>et al.</i> , 2010 | Método optimizado |
|--------------------|--|--|
| Columna | C ₁₈ , (150 x 3 mm, 3.5 µm) | C ₁₈ , (150 x 3 mm, 3.5 µm) |
| Temperatura | 55 °C | 52 °C |
| Velocidad de flujo | 0.6 mL/min | 0.6 mL/min |
| Gradiente | 0 – 3.5 min = 35 – 45% B | 0 – 5 min = 35 – 40 % B |
| | 3.5 – 5.5 min = 45% B | 5 – 16 min = 40 – 100 % B |
| | 13 – 16 min = 100 % B | 16 – 19 min = 100 % B |
| | 16.1 – 20 min = 35 % B | 19 – 22 min = 35 % B |

La identificación de resveratrol por su espectro de absorción se realizó considerando sus dos longitudes de máxima absorción (λ_{\max}) a 215 y 310 nm, lo cual es característico de alquenos y *m*-dihidroxibencenalquenos respectivamente [38]. En cuanto a cumestrol, éste se realizó con sus cuatro bandas característica de máxima absorción a 342 (banda I), 303 (banda II), 242 (banda III) y 208 (banda IV) nm [31]. Para los lignanos, las λ_{\max} fueron 200, 220 y 280 nm, por la presencia de furanos, bencilos y fenilarilos. Por último, para los flavonoides e isoflavonas, sus longitudes de máxima absorción, en la fase móvil, fueron de 302 a 375 nm (banda I o anillo B) y de 200 a 280 nm (banda II o anillo A) [112]. Las diferencias en los espectros son resultado de los distintos radicales y conjugaciones presentes en los anillos. De esta forma, flavonas, flavonoles, flavanonas e isoflavonas presentan diferentes longitudes de máxima absorción. La flavona luteolina presentó una λ_{\max} a 350 nm, mientras que los flavonoles quercetina y kaempferol a 375 y 366 nm respectivamente. La ionización de los hidroxilos en los C3 y C4' de kaempferol y quercetina dio lugar

a un corrimiento de la banda I sin afectar la banda II [112]. La flavanona naringenina, al faltarle el sistema enona conjugado, presenta absorción del anillo aromático a 290 nm. En cuanto a las isoflavonas, su λ_{\max} fue a 260 nm para genisteína, biochanina A y gliciteína, y 250 nm para daidzeína y formononetina.

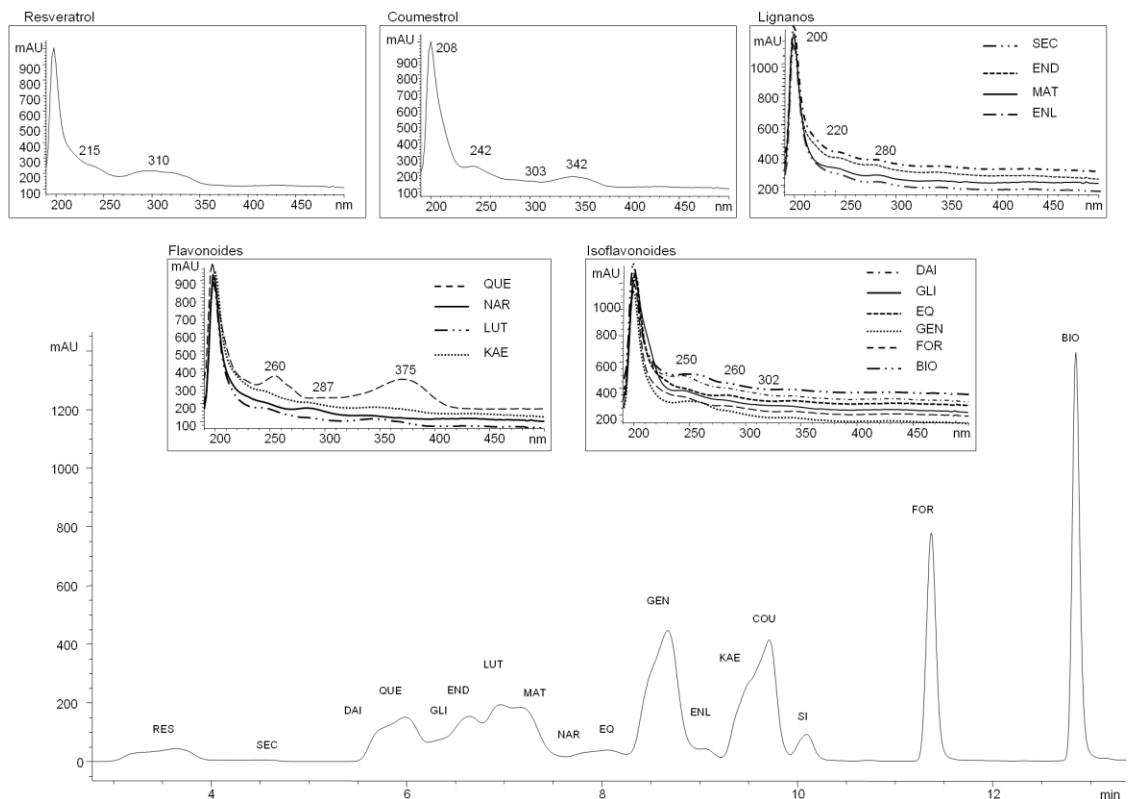


Figura 9. Perfil cromatográfico y espectros de absorción en UV para la identificación de fitoestrógenos por HPLC-DAD

Parámetros del LC-ESI-MS

Los parámetros de confirmación y cuantificación de los fitoestrógenos a su vez se establecieron por espectrometría de masas utilizando un cuadrupolo

simple. Los parámetros probados fueron: modo de ionización, voltaje de fragmentación, ganancia, temperatura de secado, presión del nebulizador, flujo del gas de secado y voltaje capilar. Lo anterior permitió reducir la formación de fragmentos, disminuir el ruido, aumentar la intensidad de los iones e incrementar la sensibilidad del método.

Primeramente se llevó a cabo la identificación y separación de fitoestrógenos mediante el método en modo FIA (análisis por flujo de inyección). En esta parte se realizaron inyecciones directas (sin columna) probando diferentes voltajes de fragmentación, modo de ionización y valores de ganancia. Cada fitoestrógeno (1 µg/mL) fue inyectado por separado probando su fragmentación de 50 a 300 V, tanto en modo positivo como negativo y con un rango de masa de 50 a 400. Se seleccionó como voltaje de fragmentación el que presentó mayor intensidad de los iones y menor número de fragmentos. Para todos los fitoestrógenos, la ionización en modo negativo presentó menor número de iones y menor ruido (Figura 10). A pesar de la alta intensidad de los iones en modo positivo, el ruido de la señal fue alta por lo que se seleccionó la ionización en modo negativo. En cuanto al voltaje de fragmentación, éste varió entre cada fitoestrógeno pero fueron similares a los reportados en el método propuesto por Wyns *et al.*, (2010). Se seleccionaron los voltajes de fragmentación de 100, 130, 160, 180 y 200 V. Por su parte, la ganancia se llevó hasta un valor de 5 para aumentar la señal del detector y aumentar la sensibilidad del método. Sin embargo, este parámetro fue finalmente definido hasta el análisis de los fitoestrógenos por monitoreo del ión seleccionado (SIM).

Asimismo, se establecieron los parámetros para la cámara de spray en modo FIA. Las modificaciones realizadas a estos parámetros no presentaron cambios en la formación y abundancia de los iones. Por ello, se fijaron de acuerdo a la velocidad de flujo del disolvente (descrito por la guía práctica del

equipo) a una temperatura de secado de 350°C, presión del nebulizador a 60 psi, voltaje del capilar de 3.5kV y flujo del gas de secado a 11 L/min.

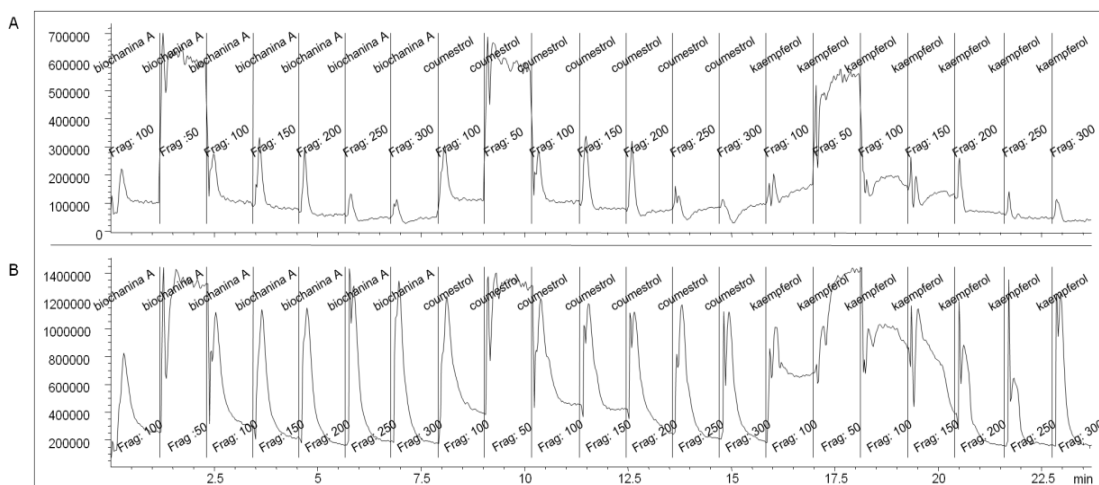


Figura 10. Cromatograma generado en modo FIA de biochanina A, coumestrol y kaempferol (1 µg/mL) a diferentes voltajes de fragmentación en modo negativo (A) y positivo (B).

Una vez establecidos los parámetros de fragmentación, los fitoestrógenos fueron evaluados en modo SCAN (barrido completo de iones). Se utilizaron las cuatro señales del detector de masas con 100, 130, 160, 180, y 200 V en el fragmentador y un valor de ganancia de 5. Los fitoestrógenos, fueron evaluados en modo positivo y negativo, empleando un rango de masa de 50 a 400. Los tiempos de retención, espectros de absorción en el UV, la masa molecular y la m/z de los iones en las cuatro señales permitieron identificar y confirmar la estructura de cada fitoestrógeno. El cromatograma en modo SCAN de los fitoestrógenos se presenta en la figura 11, con los espectros de masas de algunos fitoestrógenos. Los iones predominantes fueron $[M+H]^+$ y $[M-H]^-$. A su vez, se observó la formación de fragmentos, pero su abundancia relativa fue baja. Por su parte, la ionización en modo negativo presentó menor fragmentación y por lo tanto, mayor intensidad de la señal del ión padre y menor

señal ruido que en modo positivo. Por ello, los parámetros establecidos en el método por FIA fueron adecuados para evitar la formación de fragmentos, disminuir el ruido, aumentar la intensidad y abundancia del ión padre.

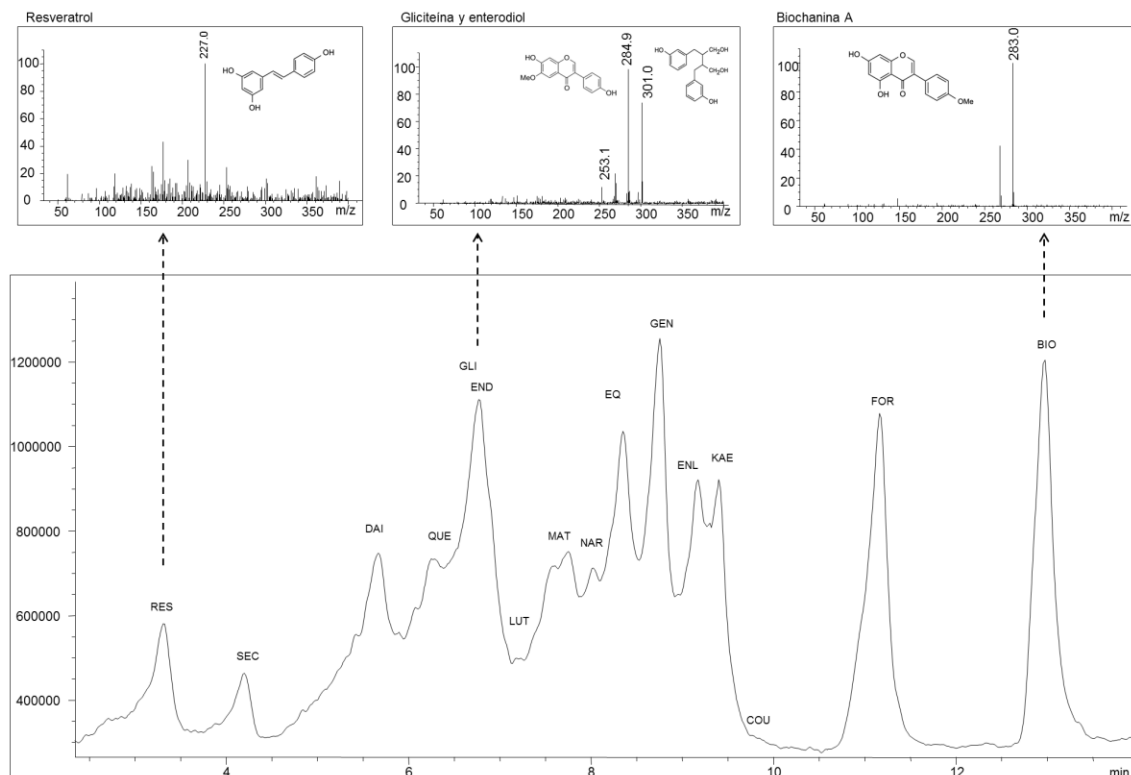


Figura 11. Cromatograma en modo SCAN de los 16 fitoestrógenos (3000 ng/mL) y espectros de masas de resveratrol, gliciteína, enterodiol y biochanina A con voltaje de fragmentación de 180 V y ganancia 5 en modo negativo.

La ionización de los fitoestrógenos se llevó a cabo por pérdida de radical a $[M-H]^-$ y $[M-OH]^-$. Los fragmentos de los fitoestrógenos por pérdida de radical fueron $[M-CH_3]^-$, $[M-CH_2OH]^-$. Estos se presentaron en formononetina y biochanina y el último en enterodiol y enterolactona. De la misma forma, esta ionización se ha observado en otros estudios al utilizar diferentes interfaces y detectores de masas [90, 113]. La fragmentación también se llevó a cabo por vía Retro-Diels-Alder (RDA), donde cada fragmento es característico de cada

flavonoide [112]. Lo anterior permitió diferenciar entre flavonas, flavonoles, flavanonas e isoflavonas. Así mismo, favoreció la identificación de lignanos.

Debido a que gliciteína, quercetina y enterodiol coeluyeron, y estos dos últimos presentan la misma masa molecular, los tres estándares fueron inyectados individualmente usando el modo SCAN. Los espectros de masas de estos tres fitoestrógenos se presentan en las figuras 12 y 13. Los iones de quercetina fueron: 301.1, 179 y 151.1. En cambio, enterodiol presentó m/z de 301.1, 253 y 271.1. Los primeros dos iones de enterodiol son utilizados generalmente para la cuantificación y confirmación, con la inclusión del ión con m/z de 241[2]. Sin embargo, este último, se observó al utilizar APCI como interface en un detector cuadrupolo triple. Por su parte, se evaluó la formación de fragmentos de gliciteína para evitar la selección de fragmentos similares a quercetina o enterodiol. Los iones de gliciteína presentaron un m/z de 283, 178.9 y 163. Generalmente, los iones seleccionados son 283/268, o bien 283/184 [15, 90, 113]. Sin embargo, bajo las condiciones de fragmentación establecidas, el ión observado fue 163 y no 184. Por lo tanto, los iones seleccionados para cuantificación fueron: quercetina; 151.1, enterodiol; 253 y gliciteína; 283. Adicionalmente se incluyó el ión con m/z de 163 para confirmar la presencia de gliciteína.

En conjunto, tiempo de retención, espectros de absorción en UV y los espectros de masas, permitieron la identificación de los 16 fitoestrógenos. Dado que la sensibilidad en modo SCAN es baja en el cuadrupolo se prosiguió a aplicar las condiciones establecidas en modo SIM (monitoreo del ión seleccionado).

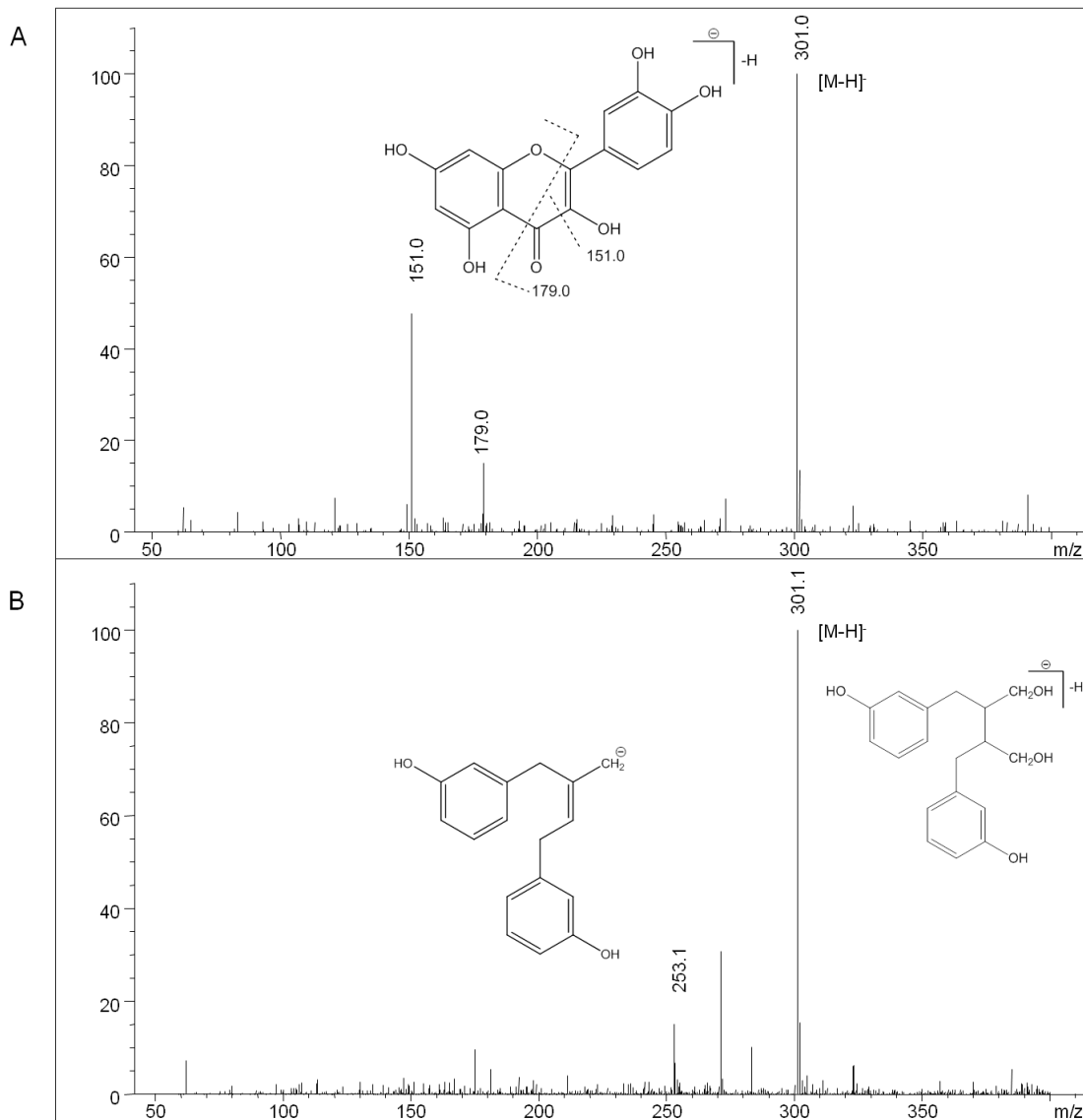


Figura 12. Espectros de masas y fragmentación propuesta para quercetina (A) y enterodiol (B) (1 $\mu\text{g/mL}$) en modo negativo, voltaje de fragmentación de 200 V y ganancia de 5.

Los iones de mayor abundancia, $[M-H]^-$, fueron seleccionados para aumentar la especificidad, sensibilidad y el rango de trabajo del método en modo SIM. Se seleccionó un segundo ión (fragmento) para la confirmación de

gliciteína (m/z: 163). A su vez, se utilizó el ión con m/z de 151.1 y 253 para la cuantificación de quercetina y enterodiol.

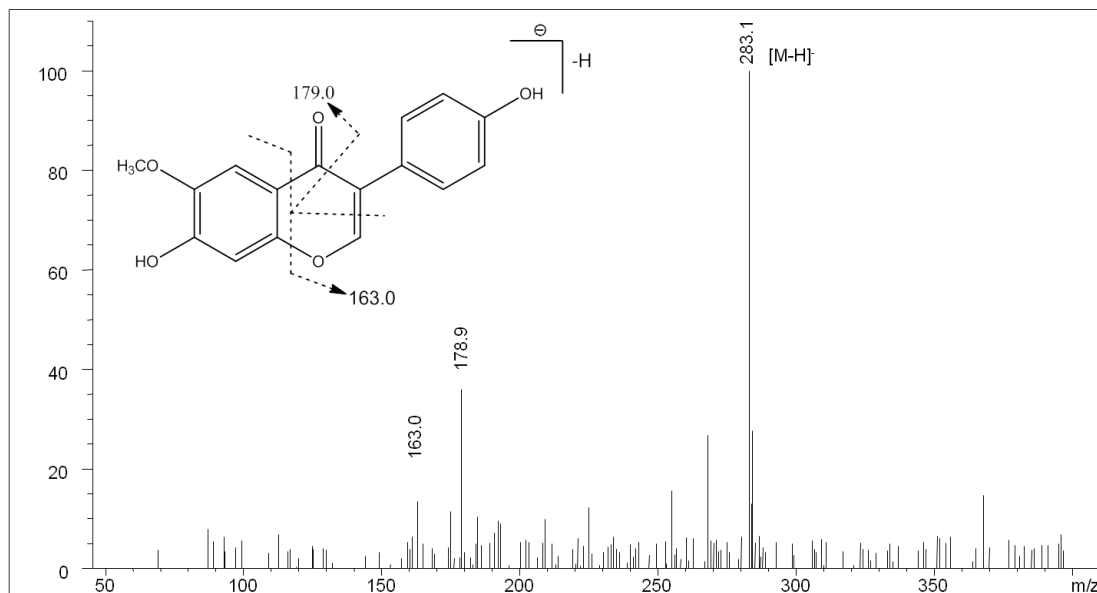


Figura 13. Espectro de masas y fragmentación propuesta para gliciteína (1 $\mu\text{g/mL}$) en modo negativo, voltaje de fragmentación de 160 V y ganancia de 5.

Los fitoestrógenos fueron analizados utilizando las cuatro señales del detector. De acuerdo a los tiempos de retención, los fitoestrógenos fueron agrupados dentro de las diferentes señales y se establecieron los tiempos de monitoreo para cada uno de los iones (Tabla 2). De esta forma se facilitó la detección de los compuestos desde el inicio hasta el final de su elución. En la figura 14, se ilustra el cromatograma normalizado de la mezcla de fitoestrógenos (16 $\mu\text{g/mL}$) al ser analizado con las cuatro señales del detector de masas. Por su parte, los valores de ganancia se evaluaron individualmente por ión hasta que se obtuvo la mayor sensibilidad. Así mismo, se probaron de nuevo los voltajes de fragmentación establecidos en el modo FIA y SCAN. Finalmente, se ajustaron las condiciones de detección en modo SIM como se observa en la tabla 2.

Tabla 2. Señales del detector de masas, tiempo de retención, voltaje de fragmentación y ganancia para la cuantificación de fitoestrógenos en modo SIM

| Señal | Fitoestrógeno | TR (min) | Ión (m/z) | Frag (V) | G |
|-------|---|----------|-----------|----------|----|
| 1 | Resveratrol | 3.7 | 227.1 | 180 | 15 |
| | Gliciteína | 6.9 | 163/283.0 | 160 | 25 |
| | Naringenina | 8.0 | 271.0 | 180 | 15 |
| | Kaempferol | 9.5 | 285.0 | 200 | 15 |
| | Biochanina A | 12.8 | 283.1 | 180 | 10 |
| 2 | Secoisolariciresinol | 4.5 | 361.1 | 100 | 20 |
| | Luteolina | 7.2 | 285.1 | 180 | 20 |
| | Equol | 8.3 | 241.1 | 160 | 35 |
| | Cumestrol | 9.7 | 267.1 | 200 | 10 |
| 3 | Fenolftaleína β -D-glucurónido [‡] | 4.7 | 493.1 | 100 | 10 |
| | Daidzeína | 5.9 | 253.1 | 180 | 10 |
| | Enterodiol | 7.0 | 253.1 | 180 | 10 |
| | Matairesinol | 7.8 | 357.0 | 130 | 10 |
| | Genisteína | 8.6 | 269.0 | 180 | 10 |
| | Fenolftaleína [‡] | 9.2 | 317.1 | 100 | 10 |
| | 4-hidroxibenzofenona* | 10.0 | 197.1 | 100 | 5 |
| 4 | 4-metilumbeliferona [‡] | 4.0 | 175.1 | 100 | 10 |
| | Quercetina | 6.6 | 151/301 | 200 | 20 |
| | Enterolactona | 9.0 | 297.1 | 180 | 20 |
| | Formononetina | 11.3 | 267.1 | 200 | 10 |
| | 4-metilumbeliferilsulfato [‡] | 13.8 | 293.2 | 100 | 10 |

* Estandar interno [‡] estándares de deconjugación

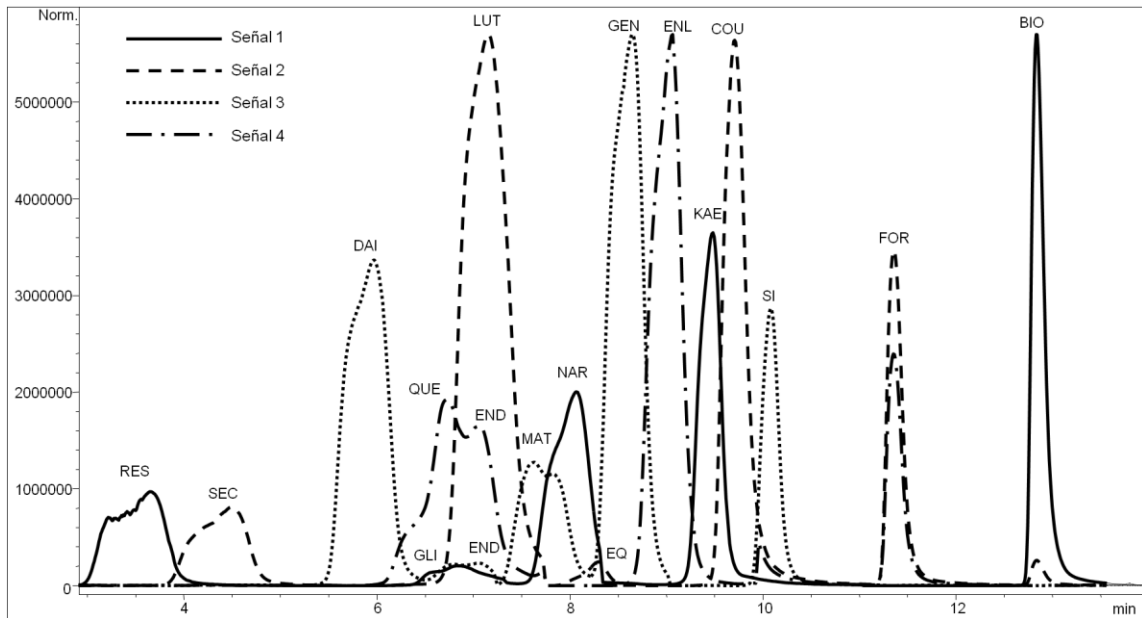


Figura 14. Cromatograma normalizado en modo SIM de la mezcla de fitoestrógenos (16 $\mu\text{g/mL}$) en el disolvente de reconstitución (MeOH/Solución Inicial; 40:60)

Extracción de los fitoestrógenos del suero

Dada la diversidad de los niveles séricos de fitoestrógenos, los analitos deben concentrarse para facilitar su cuantificación [2]. De igual manera, el suero debe ser sometido a pretratamiento para minimizar la presencia de compuestos que pudieran interferir en el análisis de los fitoestrógenos [114-115]. Por lo tanto, las muestras fueron pretratadas y extraídas por extracción en fase sólida (SPE) para su posterior análisis.

Pretratamiento de la muestra

Las proteínas son uno de los componentes del suero que interfieren en la recuperación de los fitoestrógenos; al inhibir la hidrólisis enzimática o al interactuar con el cartucho de extracción [115-116]. Por ello, su presencia en la muestra debe reducirse de tal manera que no repercuta en las recuperaciones de los analitos de interés. Por lo tanto, la remoción de proteínas se probó utilizando diferentes disolventes a diferentes volúmenes.

La precipitación se realizó con metanol, acetonitrilo y etanol. Se observó mayor precipitado al usar etanol, pero los porcentajes de recuperación fueron mayores con metanol. La mayor precipitación con etanol puede deberse a que disminuye en mayor medida la constante dieléctrica de la muestra, lo cual tiende a disminuir la solubilidad de las proteínas [117]. Sin embargo, la solubilidad de los fitoestrógenos es mayor en metanol por lo que presenta mejores recuperaciones. Así mismo, se ha reportado que los flavonoides no son estables en acetonitrilo, lo que degrada estos compuestos y repercute en las recuperaciones [118]. Usualmente se recomiendan dos volúmenes de disolvente para la precipitación, pero las mejores recuperaciones se obtuvieron al precipitar con 200 μ L de metanol. Por su parte, Coward *et al.*, (1996) reportaron que la precipitación de proteínas reduce sustancialmente las recuperaciones. A pesar de ello, se han presentado buenas recuperaciones al utilizar etanol y acetonitrilo [11, 16, 119]. Incluso las recuperaciones se mantienen al utilizar tres volúmenes de etanol o un volumen de acetonitrilo [119-121].

Los lípidos son otros de los componentes del suero que interfieren en el análisis de los fitoestrógenos; al incrementar los tiempos de retención e inhibir la actividad enzimática [114-115]. A pesar de estos efectos, existen pocas extracciones donde se desgrasa el suero. Para remover los lípidos del suero se usaron diferentes volúmenes de *n*-hexano. Por lo tanto, se probaron 1 y 1.5 mL

de hexano por 1 mL de muestra. No se presentaron diferencias en el análisis de fitoestrógenos al aumentar el volumen de hexano, por lo que el desgrasado del suero se mantuvo 1:1 (v:v). Incluso al utilizar 4 mL de hexano, las recuperaciones se mantuvieron dentro de los mismos porcentajes, por lo que no fue necesario aumentar su volumen [114].

Extracción en Fase sólida

La extracción en fase sólida permite la limpieza y concentración de la muestra. Por ello, debe tomarse en consideración cualquier paso que pudiera minimizar el potencial de extracción de los analitos [2]. Para aumentar los porcentajes de recuperación, se realizaron cambios al método de extracción original [17]. Se probaron diferentes condiciones de centrifugación para evitar que cualquier residuo de proteína fuera cargado a la columna de extracción. Se seleccionó la condiciones de centrifugación a 7 200 x g por 10 min ya que se observó una mejor formación del *pellet*. Así mismo, se realizaron cambios en el volumen de elución. A pesar de que se recomienda utilizar 3 volúmenes de disolvente por tratarse de un cartucho de 3 mL, al aumentar a 4 volúmenes se presentó una mejora en la recuperación. Sin embargo, al eluir con 5 volúmenes, las recuperaciones se mantienen. La mejora en las recuperaciones puede deberse al carácter no polar de los fitoestrógenos, sobre todo de cumestrol, que requiere de mayor volumen para su elución.

El disolvente de reconstitución es otro de los componentes que puede influir en las recuperaciones de los analitos extraídos. Por ello, debe seleccionarse un disolvente que permita la resuspensión de los analitos sin alterar la fuerza de la fase móvil [122]. Generalmente, la reconstitución del eluato debe hacerse con la fase móvil inicial para evitar un desequilibrio en la

fuerza de elución (picos divididos, anchos o coleados) [122]. En ocasiones, el disolvente de reconstitución puede tratarse de metanol o acetonitrilo [123].

En este sentido, para aumentar la sensibilidad y las recuperaciones, se evaluaron diferentes disolventes de reconstitución. Utilizando 100% metanol, propuesto por Wyns *et al.*, (2010), las recuperaciones se encontraron entre 60–120% para la mayoría de los fitoestrógenos. Sin embargo, la sensibilidad se vio afectada, en particular para equol y gliciteína, cuyos límites de detección del sistema se aproximaron a una concentración de 16 ng/mL. Por lo que se decidió a cambiar el disolvente por la fase móvil inicial (35% de solución B). Bajo estas condiciones se logró la cuantificación de equol y gliciteína por debajo de 16 ng/mL, ya que al aumentar el disolvente acuoso, el límite de detección aumentó [124]. Sin embargo, la solubilidad de los fitoestrógenos disminuyó al incrementar la polaridad del disolvente reduciendo los porcentajes de recuperación hasta 20%. Si bien en otros estudios se han utilizado disolventes con mayor proporción acuosa, incluso del 80%, cabe mencionar que sólo se analizaron algunos fitoestrógenos [2, 90, 114]. Por lo tanto, fue necesario incrementar el porcentaje de metanol para permitir la solubilidad de los fitoestrógenos, manteniendo un porcentaje de la solución inicial que aumente la sensibilidad y evite la deformación de los picos. Por ello, se seleccionó como disolvente de reconstitución metanol/fase móvil inicial 40:60 (v/v). De la misma forma, Cao *et al.*, (2009) y Prasain *et al.*, (2010) al reconstituir con metanol/fase móvil inicial (MeOH/ácido fosfórico al 0.1% (3/2, v/v) y MeOH/H₂O 80:20), presentaron altas recuperaciones (65-105 %) y establecieron un límite de detección por debajo de los 16 ng/mL [15, 91].

Monitoreo de la hidrólisis enzimática

La cuantificación de los niveles séricos de fitoestrógenos asume la hidrólisis completa de los mismos a su forma libre. Tiempos de incubación insuficientes resultarían en una hidrólisis incompleta y, por lo tanto, en niveles erróneamente bajos. Por otro lado, la incubación por largos periodos podría alterar químicamente los analitos (como la oxidación) [2]. Por ello, la hidrólisis enzimática fue monitoreada con fenolftaleína glucurónido (FFG) y 4-metilumbeliferilsulfato (4-MS) para asegurar la actividad de la enzima en cada extracción. Así mismo el proceso de deconjugación fue optimizado para reducir el tiempo requerido para la deconjugación enzimática.

El monitoreo de los estándares de deconjugación se realizó por HPLC y MS. Los estándares, tanto libres (FF; fenolftaleína y 4-M; 4-metilumbeliferona) como conjugados (FFG y 4-MS), no coeluyeron con los fitoestrógenos ni con el estándar interno (Figuras 15 y 16). Lo anterior permitió adicionar los estándares a cada una de las muestras analizadas.

La identificación de los estándares se realizó por sus espectros de absorción en UV y por sus espectros de masas. El perfil cromatográfico y los espectros de absorción de los estándares se observan en las figuras 15 y 16. Fenolftaleína libre y conjugada presentan una λ_{\max} de 275 y 230 nm con diferentes tiempos de retención debido a la polaridad de los compuestos. En cambio, 4-MS y 4-M presentan diferentes espectros de absorción y tiempos de retención. Como se observa en el espectro de absorción, 4-MS no absorbe en el UV. Sin embargo 4-M, en solución ácida, es capaz de absorber a 322 nm [125]. La absorción óptica en este caso resulta de su forma excitada donde se presenta una transferencia de carga del oxígeno del C2 al oxígeno del C7 [126].

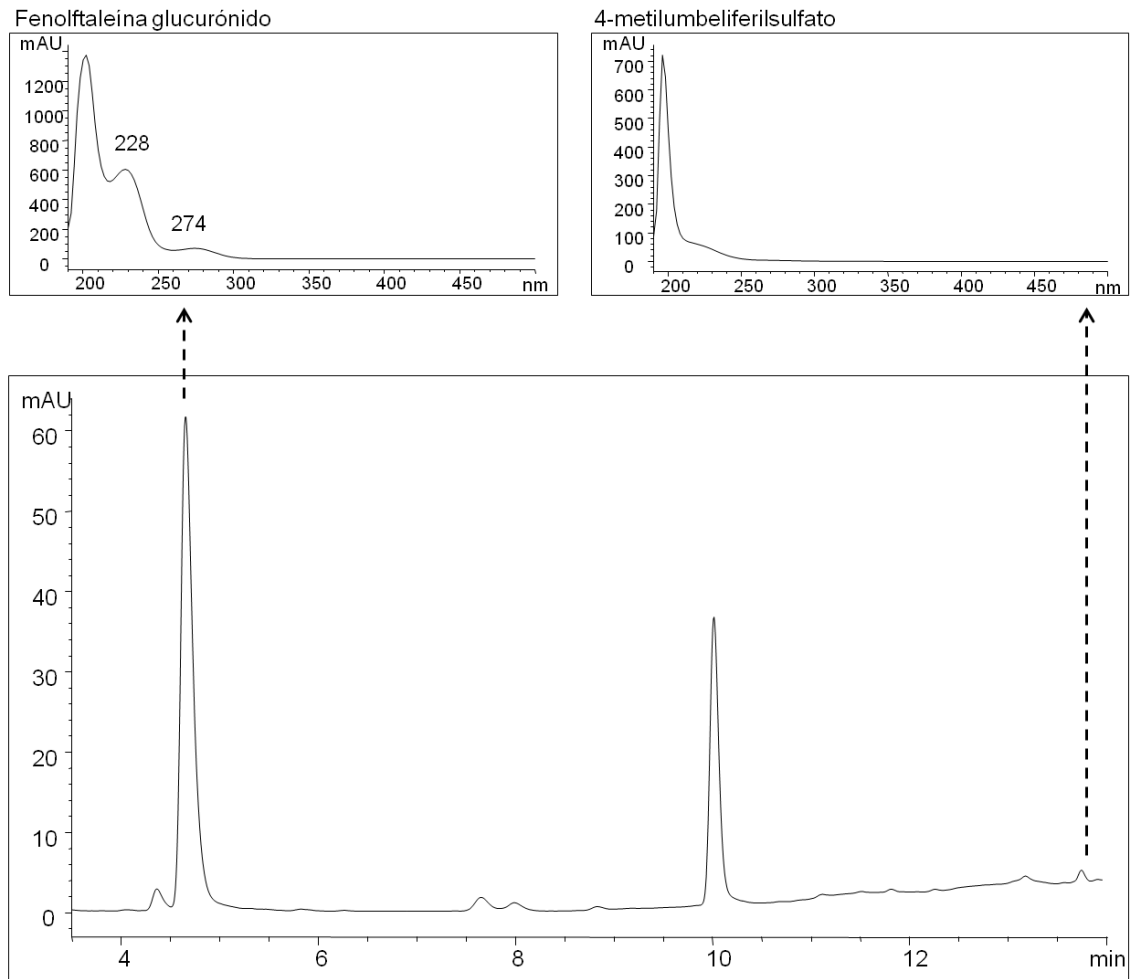


Figura 15. Perfil cromatográfico y espectros de absorción en UV de los estándares de deconjugación en ausencia de la enzima β -glucuronidasa/sulfatasa (H1)

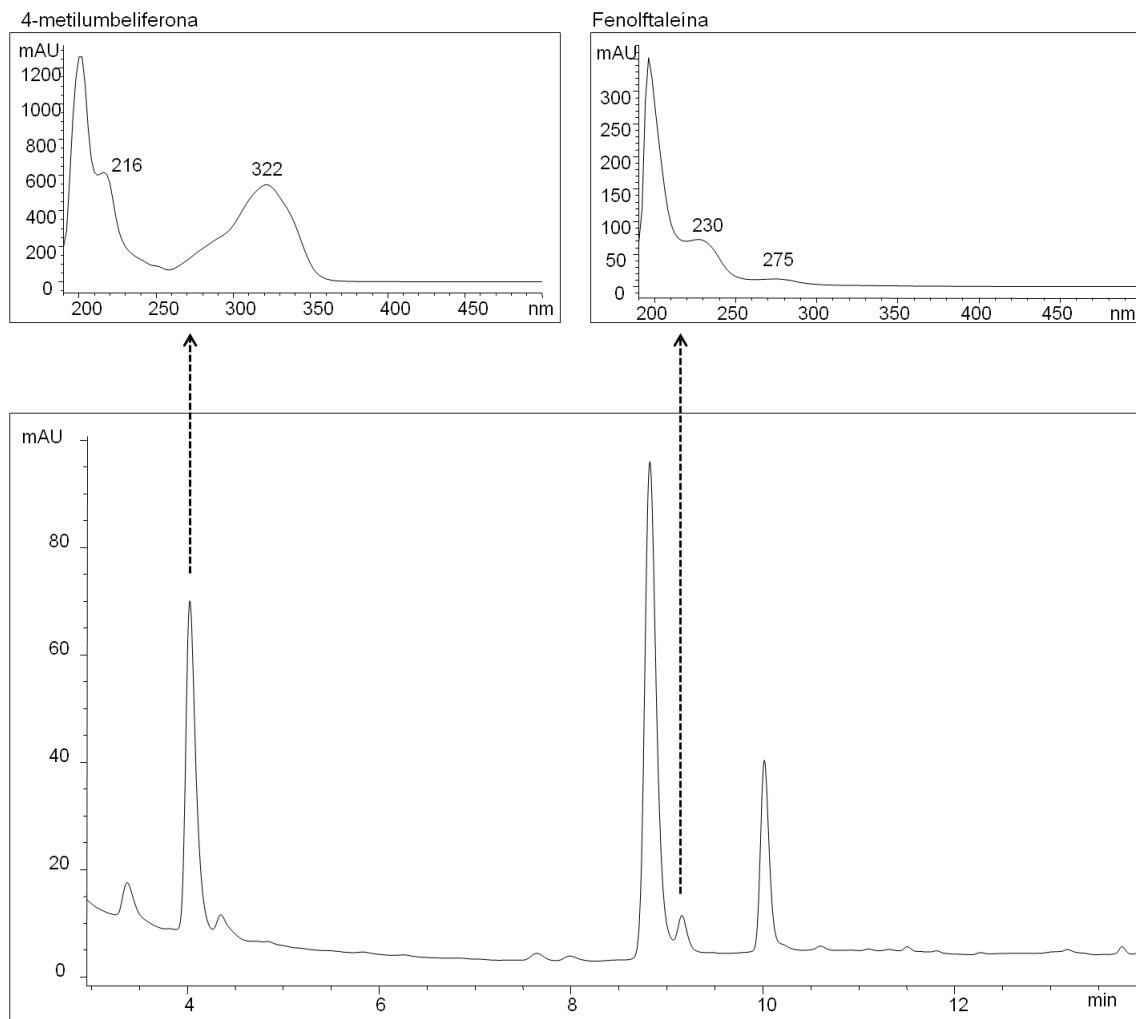


Figura 16. Perfil cromatográfico y espectros de absorción en UV de los estándares de deconjugación en presencia de la enzima β -glucuronidasa/sulfatasa (H1)

Por otro lado, se establecieron los parámetros de identificación de los estándares de deconjugación en el MS. Dado que la adición de las muestras con los estándares fue alta (concentración final en suero: 5 $\mu\text{g/mL}$ y 4.13 $\mu\text{g/mL}$), los estándares fueron evaluados por modo SCAN considerando un voltaje de fragmentación de 100 V y ganancia de 10 en modo negativo. Bajo estas condiciones, los iones predominantes fueron $[\text{M}-\text{H}]^-$ (Figuras 17 y 18). A su

vez, se observó la formación de fragmentos para 4-metilumbeliferinilsulfato y fenoltaleína. Sin embargo, se seleccionaron los iones $[M-H]^-$ para aumentar la especificidad y sensibilidad en el monitoreo de la actividad enzimática. De la misma forma, Prasain *et al.*, (2010) y Valentin-Blasini *et al.*, (2000) presentaron iones con la misma m/z de los estándares, pero con la inclusión de un segundo ión para la confirmación del analito [2, 15]. Los iones padres tanto de los estándares conjugados como libres se incluyeron en el análisis en modo SIM de los fitoestrógenos (Tabla 2).

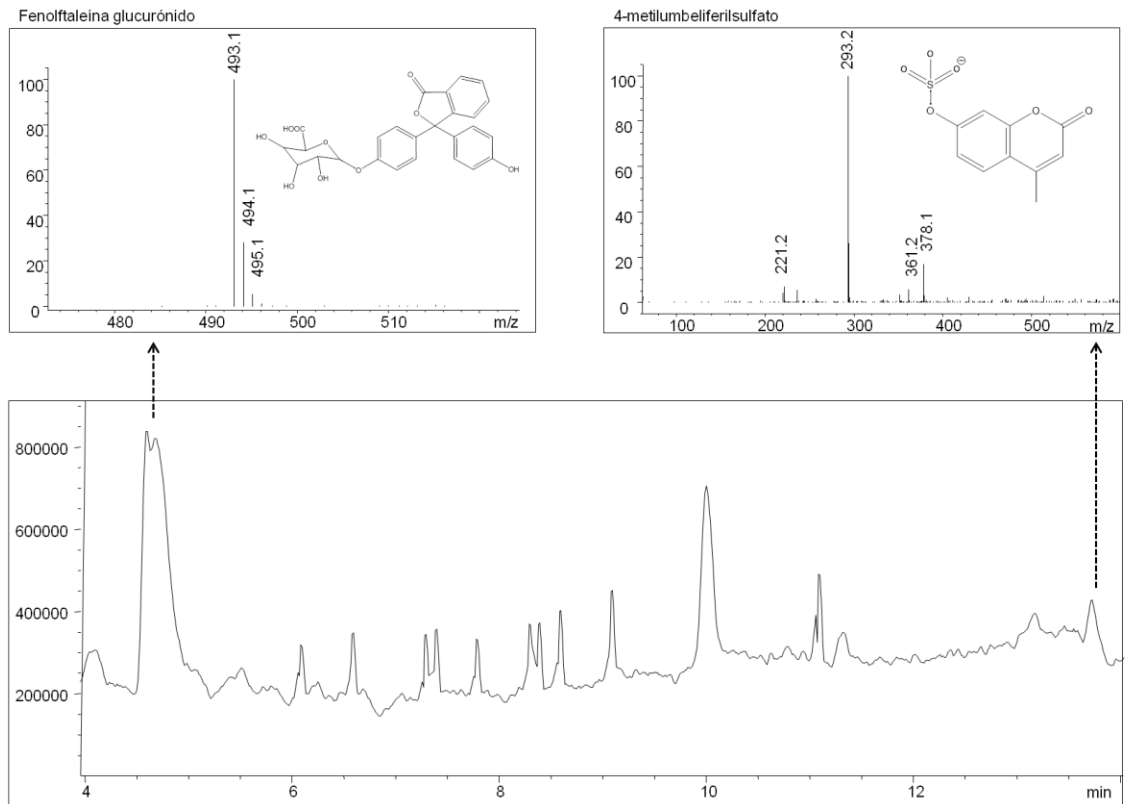


Figura 17. Cromatograma en modo SCAN y espectros de masas de los estándares de deconjugación con voltaje de fragmentación de 100 V y ganancia 10 en modo negativo en ausencia de la enzima glucuronidasa/sulfatasa (H1).

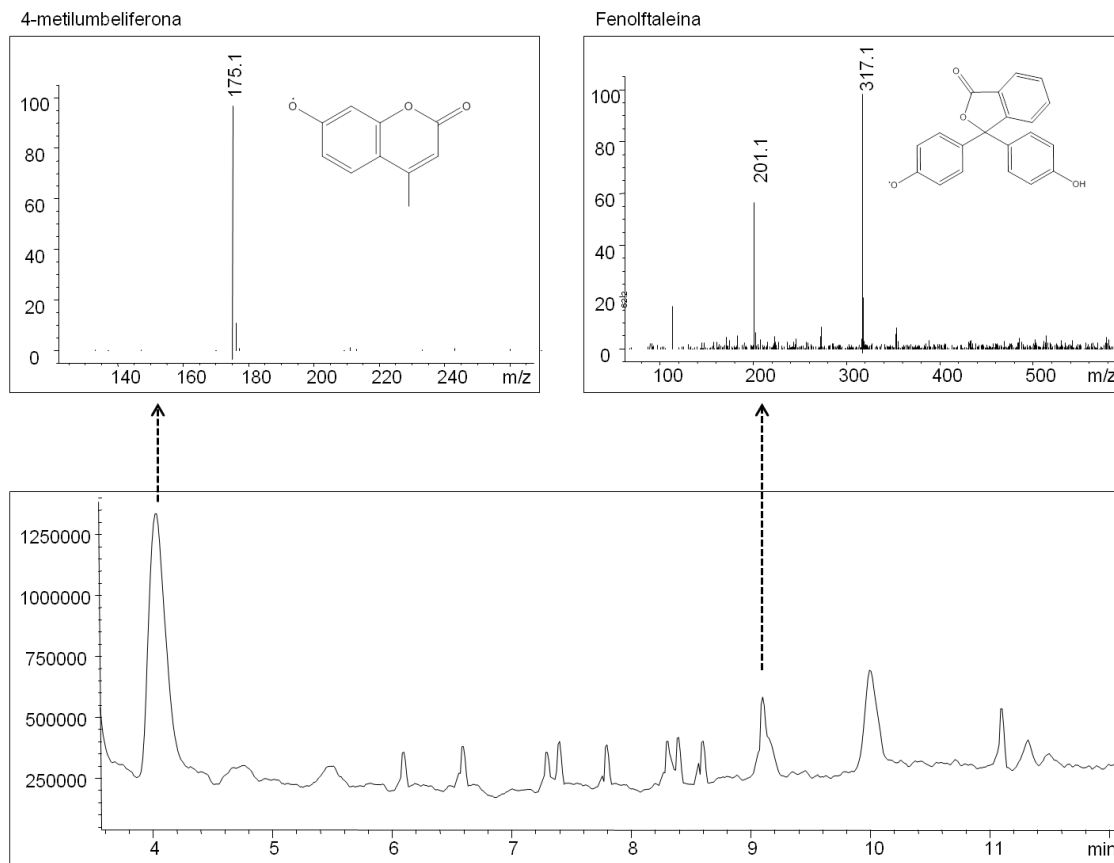


Figura 18. Cromatograma en modo SCAN y espectros de masas de los estándares de deconjugación con voltaje de fragmentación de 100 V y ganancia 10 en modo negativo en presencia de la enzima glucuronidasa/sulfatasa (H1).

Estudios previos reportan que la hidrólisis completa de los fitoestrógenos en plasma requiere de una digestión durante toda la noche. Esto se debe a que los metabolitos conjugados son más difíciles de hidrolizar en plasma que en otros fluidos biológicos como la orina. La presencia de algunos componentes como lípidos, iones orgánicos y proteínas podrían ser responsables de la inhibición enzimática, pero la razón de la baja eficiencia no se conoce completamente. Por ello, se recomienda que la incubación se realice en 16 h [115]. Sin embargo, existen reportes que aseguran que la incubación se puede realizar en 4 a 8 h [2, 122]. En este sentido, la optimización de la hidrólisis enzimática se realizó probando tiempos de incubación a 12 y 16 h.

Para optimizar el tiempo de incubación de la hidrólisis enzimática se realizó el monitoreo de los estándares de deconjugación en sueros comerciales a 12 y 16 h. Además, se monitoreó la hidrólisis enzimática de una muestra problema a 12 y 16 h de incubación con la inclusión de los estándares de deconjugación. No se presentaron diferencias significativas ($p > 0.05$) en la hidrólisis enzimática de los estándares de deconjugación a 12 y 16 h. En cambio, las concentraciones de los fitoestrógenos en la muestra fueron mayores al incubar por 12 h ($p < 0.05$). Valentin-Blasini *et al.*, (2000) reportaron que la deconjugación de 12 a 16 h aseguraba la hidrólisis completa sin alterar los niveles de los fitoestrógenos [2]. Sin embargo, la incubación de la muestra por 16 h resultó en un decremento de la concentración de los fitoestrógenos, lo que podría indicar una alteración química de los analitos.

Taylor *et al.*, (2005) afirman que si se realiza un cambio en el protocolo (procesamiento de la muestra, adición de fitoestrógenos de análisis o cambio de matriz), éste deberá optimizarse de nuevo para asegurar que la enzima hidrolice bajo las nuevas condiciones [127]. En este sentido, aunque en el método original se requirió de 16 h de incubación, la optimización y adición de fitoestrógenos requirió monitorear de nuevo el tiempo de incubación, reduciéndose a 12 h.

Aseguramiento de la calidad de los datos

Durante la optimización del método y el análisis de las muestras, se incluyeron diferentes blancos para la corrección de cualquier interferencia presente en el suero o contaminación de la muestra. En todos los análisis se incluyó un blanco cristalería, un blanco reactivo, una muestra blanco o blanco

tejido (suero comercial libre de fitoestrógenos), un duplicado del fortificado (suero comercial adicionado con la solución de trabajo), la solución de trabajo (16 ng/mL) y un duplicado de una muestra problema.

En las figuras 19, 20 y 21 se muestra un cromatograma representativo en modo SIM de un blanco reactivo, blanco tejido y fortificado, respectivamente. Sólo se observaron algunos picos en los cromatogramas en los diferentes blancos utilizados, los cuales corresponden a interferencias. Por lo que las áreas fueron restadas en los fortificados para determinar la recuperación real de los fitoestrógenos. De la misma manera, Wyns *et al.*, (2010), incluyeron diferentes blancos para minimizar las posibles interferencias en los fortificados. Por su parte, los duplicados de los fortificados y de las muestras problemas presentaron coeficientes de variación por debajo del 20%, por lo que el método propuesto presenta una repetibilidad adecuada.

El cromatograma del blanco cristalería se encontró libre de interferencias. En cambio, los blancos reactivo y tejido presentaron diferentes picos. Dado que el blanco cristalería no contiene enzima y matriz a diferencia de los blancos reactivo y tejido, la contaminación se debe a la presencia de la enzima y del suero. Sin embargo, los tiempos de retención de los picos en los blancos reactivos y tejidos fueron similares. Así mismo, las áreas de los picos fueron semejantes por lo que las interferencias se deben principalmente a la enzima, la cual está contaminada con diferentes fitoestrógenos. No obstante, no debe descartarse alguna posible interferencia por parte del suero, apartado que se discutirá en la sección de selectividad del método.

Las interferencias de la enzima se han demostrado que se deben a su contaminación con fitoestrógenos [127-128]. A pesar de que estas enzimas pueden obtenerse de otras fuentes, se ha observado que también presentan ciertos niveles de fitoestrógenos [127]. Así mismo, las concentraciones de los

fitoestrógenos pueden variar entre presentación y dentro de un mismo lote. Por lo que debe tenerse en consideración en la hidrólisis de los fitoestrógenos.

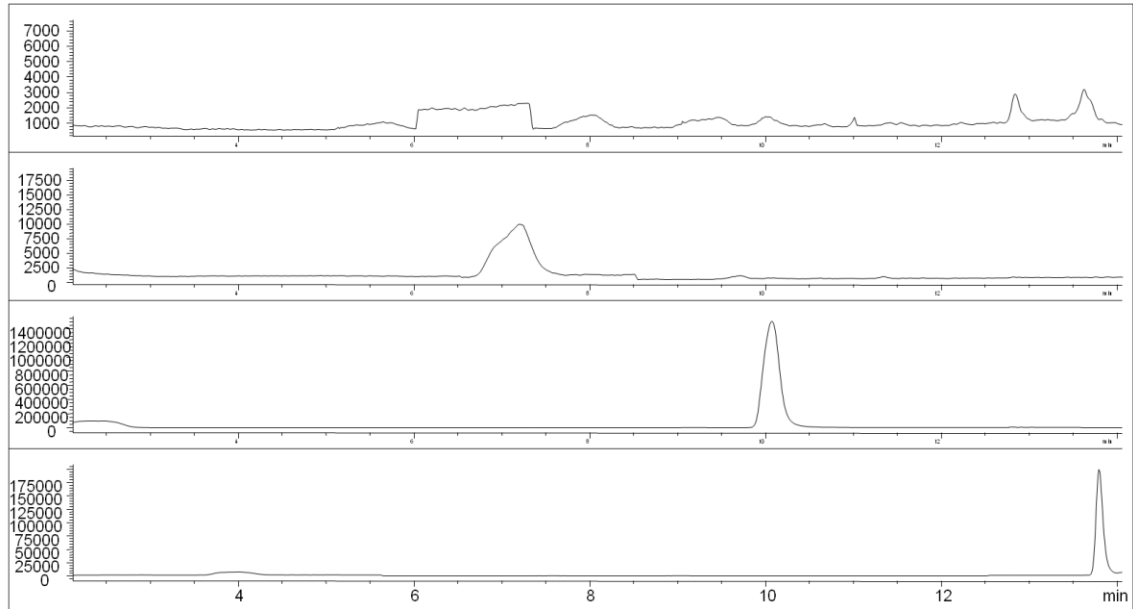


Figura 19. Cromatograma representativo de un blanco reactivo en las cuatro señales del detector de masas

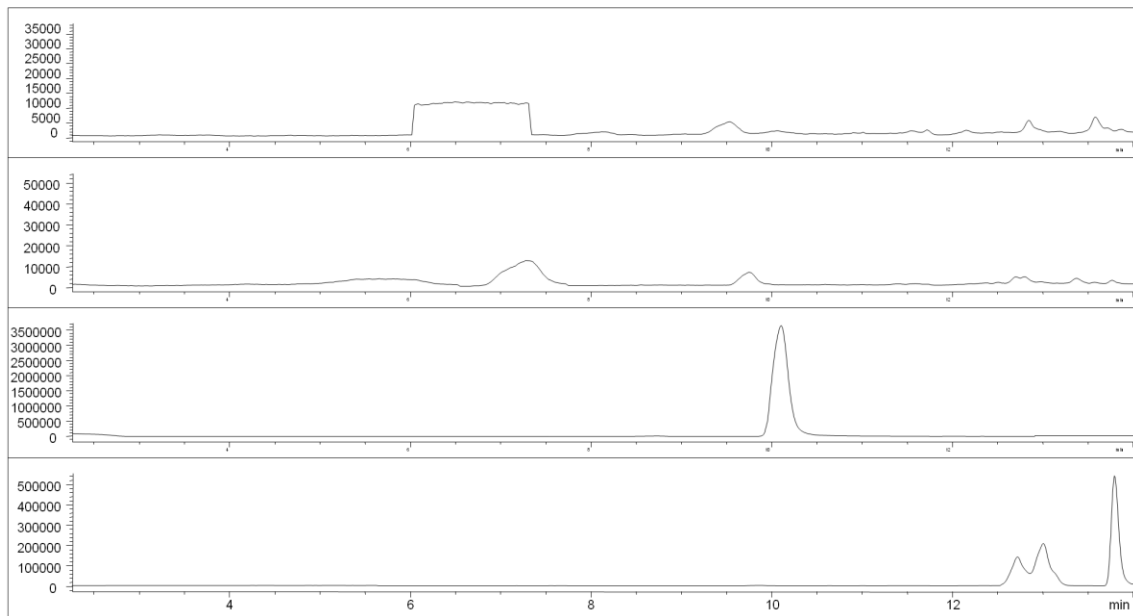


Figura 20. Cromatograma representativo de un blanco tejido en las cuatro señales del detector de masas

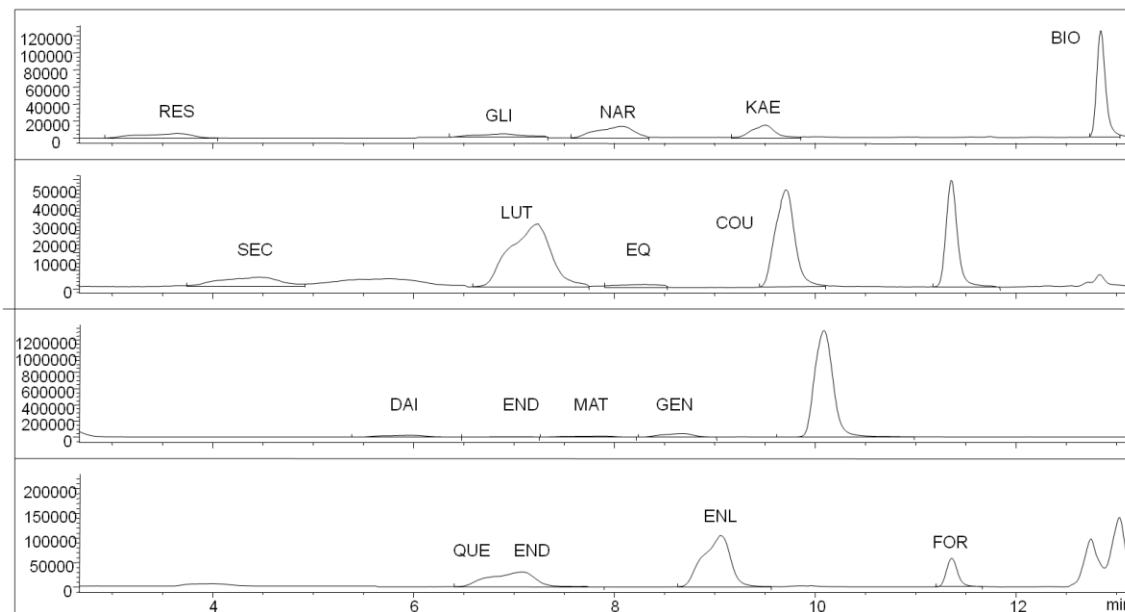


Figura 21. Cromatograma de un suero fortificado con los 16 fitoestrógenos (16 ng/mL) en las cuatro señales del detector de masas

Los fitoestrógenos presentes en la enzima pueden ser eliminados a través de una extracción en fase sólida. No obstante, la actividad enzimática puede verse afectada, sobre todo cuando el análisis incluye a cumestrol [128]. Por lo tanto, la inclusión de blancos reactivos en el análisis permite restar la contaminación de la enzima en cada muestra analizada. En este sentido, a cada muestra procesada, se le restó la concentración de fitoestrógenos aportados por la enzima.

La enzima glucuronidasa/sulfatasa tipo H-1 de *Helix pomatia* presentó contaminación con los fitoestrógenos naringenina (0.47 ng/mg), kaempferol (0.02 ng/mg), biochanina A (0.01 ng/mg), y luteolina (0.517 ng/mg). A diferencia de otras publicaciones, no se presentó contaminación con secoisolariciresinol y genisteína, fitoestrógenos que se encuentran en alta concentración en la enzima tipo HP-2 [127-128]. Tampoco se observó la contaminación con otros isoflavonas y lignanos. Debido a que estudios anteriores no incluyeron el análisis de los mismos compuestos, la enzima HP-2 también podría estar

contaminada con otros fitoestrógenos. De la misma forma, la enzima H-1 podría estar contaminada con apigenina y O-desmetilangolesina, los cuales han sido identificados en otras enzimas [127-128]. Dada la diversidad de fitoestrógenos que pueden estar presentes en la enzima, cada lote debe ser analizado para establecer la concentración y tipo de fitoestrógeno presente.

Selectividad del método

En la figura 22 se muestra un cromatograma representativo en modo SIM de un suero blanco. Sólo se observaron algunos picos en los cromatogramas de los diferentes sueros blanco analizados. Por lo tanto, la extracción en fase sólida reduce las interferencias presentes en el suero. Además, debido a que el método hace uso del monitoreo del ión seleccionado, el ruido se ve reducido y la especificidad se ve aumentada. Así mismo, los tiempos de retención y espectros en UV, ayudaron a la identificación y cuantificación de los fitoestrógenos.

De igual manera, en el método descrito por Wyns *et al.*, (2010), se observó la presencia de algunos picos en los cromatogramas de los diferentes sueros blanco. Principalmente, secoisolariciresinol se ve afectado por su coelución con componentes de la matriz. Esto conlleva a una sobreestimación de la concentración de este fitoestrógeno [17]. Sin embargo, debido al cambio en los parámetros de separación e identificación de los fitoestrógenos en el presente trabajo, este componente no interfiere con el análisis de secoisolariciresinol. Por lo tanto, el método optimizado por HPLC-DAD-ESI-MS demostró ser altamente específico, indicando que las sustancias endógenas del suero no interfieren en el análisis de fitoestrógenos.

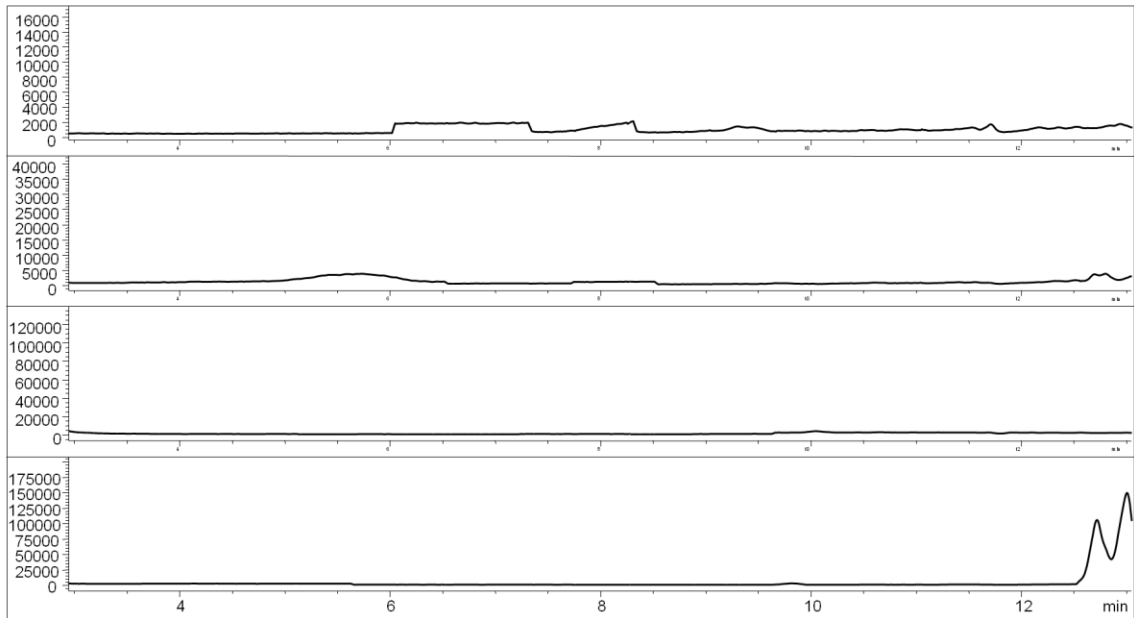


Figura 22. Cromatograma representativo de un suero blanco en las cuatro señales del detector de masas

Porcentajes de recuperación

Los porcentajes de recuperación (%RE) de los fitoestrógenos se realizaron en sueros adicionados a una concentración de 16 ng/mL, al comparar el área de los picos de los fortificados con el área de los picos de la mezcla de los estándares. Los %RE para la mayoría de los fitoestrógenos fueron superiores al 60 % y menores al 111 % (Tabla 3). Si bien, los %RE de ciertos fitoestrógenos fueron menores comparados con el método original cabe mencionar que Wyns *et al.*, (2010) establecieron los %RE a concentraciones mayores (600 ng/mL), lo que facilita su recuperación [2]. A pesar de ello, se incrementó el %RE para cumestrol, enterodiol y enterolactona en este trabajo, lo que representa una mejora en la extracción. De la misma forma, se han

reportado recuperaciones similares en diferentes extracciones en fase sólida Incluso con extracciones líquido-líquido [2, 15, 90, 114, 121].

Tabla 3. Porcentajes de recuperación (%RE) y coeficientes de variación (CV) de los fitoestrógenos a una concentración de 16 ng/mL en suero (n = 6)

| Fitoestrógenos | Método actual | | Wyns <i>et al.</i> , 2010* | |
|----------------------|---------------|------|----------------------------|------|
| | %RE | CV | %RE | CV |
| Resveratrol | 61 | 0.6 | - | - |
| Gliciteína | 85 | 7.2 | - | - |
| Naringenina | 66 | 5.8 | - | - |
| Kaempferol | 22 | 2.9 | - | - |
| Biochanina A | 44 | 12.0 | - | - |
| Secoisolariciresinol | 91 | 6.9 | 95.8 | 0.08 |
| Luteolina | 50 | 3.1 | - | - |
| Equol | 83 | 6.7 | 95.5 | 0.06 |
| Cumestrol | 33 | 2.5 | 19.7 | 0.71 |
| Daidzeína | 73 | 12.3 | 95.2 | 0.07 |
| Enterodiol | 108 | 5.7 | 95.6 | 0.10 |
| Matairesinol | 94 | 5.2 | 98.0 | 0.07 |
| Genisteína | 67 | 7.7 | 90.6 | 0.07 |
| Quercetina | 85 | 11.9 | - | - |
| Enterolactona | 110 | 5.9 | 95.0 | 0.07 |
| Formononetina | 68 | 2.8 | - | - |

* Concentración a 600 ng/mL y 60 ng/mL para cumestrol

En el caso de cumestrol y biochanina A los %RE fueron del 33 y 44% respectivamente. Prasain *et al.*, (2010) reportaron %RE del 66 y 77% para biochanina A y cumestrol respectivamente, al realizar extracción líquido-líquido. En cambio, en la extracción de orina por fase sólida, Valentin-Blasini *et al.*, (2000) presentaron recuperaciones de cumestrol del 91% [2]. Esto podría atribuirse a la naturaleza acuosa de la muestra, y a que presenta menores interferencias que el suero, las cuales pueden repercutir en la recuperación de los analitos [2]. Los %RE de luteolina y kaempferol en el presente trabajo fueron 50 y 22% respectivamente. Por su parte, Cao *et al.*, (2009), reportaron recuperaciones del 97 % para kaempferol y luteolina. Incluso Radtke *et al.*,

(2002), lograron recuperaciones del 105% para kaempferol en extracción líquido-líquido. Lo anterior indica que estos analitos pueden recuperarse por los dos tipos de extracciones con altas recuperaciones. Sin embargo, bajo las condiciones establecidas, no fue posible aumentar los %RE. Esto podría deberse a una sobrecarga de la muestra en el cartucho de extracción (100 mg de C₁₈). Bolca *et al.*, (2007), al analizar 800 µL de suero utilizaron 200 mg de C₁₈, por lo que se podría aumentar el empaque del cartucho. Igualmente, se podría reducir el volumen del suero a 200 µl y extraer en un cartucho de 30 mg [90]. De esta forma, se podría evitar la saturación del empaque y aumentar las recuperaciones de los analitos.

Linealidad del sistema y del método

Los estudios epidemiológicos muestran que las concentraciones plasmáticas de los fitoestrógenos pueden variar de 5 a 50 veces entre individuos. Por lo tanto, es necesario desarrollar un método con un rango dinámico. En este sentido, la linealidad del sistema se llevó a cabo utilizando rangos de concentración de los fitoestrógenos en metanol/fase móvil inicial (40:60, v/v) de 0.16 a 24 000 ng/mL. Por su parte, la linealidad del método se realizó utilizando rangos de concentración en suero de 0.02 a 3000 ng/mL. Las curvas de calibración de cada uno de los fitoestrógenos presentaron un coeficiente de correlación de 0.98 a 0.99. Los límites de detección (relación señal/ruido = 3) y los límites de cuantificación (relación señal/ruido = 10) para el sistema y el método se presentan en la tabla 4.

Los límites de detección (LD) fueron menores a los reportados por el método original. Wyns *et al.*, (2010), presentaron un LD de 132.6, 2.4, 17.8 y

6.2 ng/mL para secoisolariciresinol, enterolactona, matairesinol y cumestrol respectivamente. No obstante, con la optimización del método, los LD disminuyeron de 6 a casi 600 veces de los límite reportados por Wyns *et al.*, (2010). Lo anterior puede deberse al aumento de 10 veces el valor de ganancia con respecto a los parámetros descritos por Wyns *et al.*, (2010). A su vez, el tiempo de ciclo para daidzeína y genisteína se aumentó de 10 a 25%, por lo que el tiempo ejecutado fue el mismo para las cuatro señales. Así mismo, el pretratamiento y extracción de la muestra permitió reducir el ruido, disminuyendo de esta forma el límite de detección y cuantificación.

Tabla 4. Límites de detección (LD) y cuantificación (LC) (ng/mL) del sistema y método

| Fitoestrógeno | Linealidad del sistema ⁺ | | Linealidad del método* | |
|----------------------|-------------------------------------|-------|------------------------|------|
| | LD | LC | LD | LC |
| Resveratrol | 0.62 | 2.05 | 0.02 | 0.08 |
| Gliciteína | 0.88 | 2.93 | 0.07 | 0.22 |
| Naringenina | 0.22 | 0.72 | 0.13 | 0.44 |
| Kaempferol | 0.14 | 0.48 | 0.07 | 0.24 |
| Biochanina A | 0.09 | 0.31 | 0.03 | 0.09 |
| Secoisolariciresinol | 0.40 | 1.35 | 0.08 | 0.26 |
| Luteolina | 0.07 | 0.23 | 0.02 | 0.05 |
| Equol | 3.45 | 11.5 | 0.51 | 1.71 |
| Cumestrol | 0.02 | 0.06 | 0.01 | 0.04 |
| Daidzeína | 0.06 | 0.20 | 0.02 | 0.08 |
| Enterodiol | 1.45 | 4.85 | 0.15 | 0.50 |
| Matairesinol | 0.13 | 0.45 | 0.01 | 0.03 |
| Genisteína | 0.06 | 0.22 | 0.02 | 0.06 |
| Quercetina | 4.25 | 14.17 | 0.25 | 0.84 |
| Enterolactona | 0.04 | 0.12 | 0.01 | 0.02 |
| Formononetina | 0.11 | 0.37 | 0.04 | 0.15 |

⁺ Concentración de los estándares en metanol/fase móvil inicial (40:60, v/v)

* Concentración final en suero

Los límites de detección en el orden de las partes por billón a su vez se pueden obtener por HPLC con un detector electroquímico [91]. Con este

detector, los flavonoides quercetina, kaemferol y luteolina presentaron LD de 0.7 ng/mL, similares a los establecidos en el presente trabajo. Sin embargo, el detector electroquímico presenta la limitación que no discrimina entre fitoestrógenos y por lo tanto no puede ser utilizado para confirmar y predecir estructuras [129]. En cambio, por espectrometría de masas, se logran LD por el orden de las ppb, con la posibilidad de determinar estructuras. De esta forma, con un cuadrupolo triple, se han establecido LD y LC de 0.5 a 2.0 ng/mL [2, 15, 90]. No obstante, con un cuadrupolo simple, como se observa en la tabla 4, los LD y LC obtenidos son aún menores a los reportados con un cuadrupolo triple. Por lo tanto, con el método optimizado, se logró un amplio rango de cuantificación, con una sensibilidad ideal para los estudios epidemiológicos.

Niveles Séricos de Fitoestrógenos Determinados por HPLC-DAD-ESI-MS

En el estudio participaron 100 mujeres sonorenses, sin embargo sólo fue posible determinar los niveles séricos de fitoestrógenos en 69 muestras. Por lo tanto, los resultados y discusiones corresponden a las 69 mujeres que contaron con el análisis de fitoestrógenos en suero y el recordatorio de 24 h.

En la tabla 5 se presentan las características generales de las 69 mujeres participantes en el estudio. Se observó que la edad promedio fue de 45.6 años, siendo la mayoría (80%) casada de un nivel socioeconómico bajo (menos de 5 salarios mínimos). De acuerdo a la clasificación basada en el IMC (índice de masa corporal) propuesta por la Organización Mundial de la Salud, las mujeres presentaron sobrepeso (IMC de 25.0 a 29.9). Así mismo, para el norte del país, la ENSANUT (Encuesta Nacional de Salud y Nutrición, 2006) reportó que el 83% de las mujeres urbanas de 40 a 49 años mostraron

sobrepeso y obesidad [130]. Por su parte, se observó un nivel de escolaridad de 10 años, siendo para el estado de Sonora un promedio de 9.4 años de estudio [131]. Finalmente las mujeres presentaron una edad de menarquia y menopausia de 13 y 47 años respectivamente.

Tabla 5. Características generales de la población del estudio

| Características | Media aritmética \pm SD |
|-----------------------------------|---------------------------|
| Edad (años) | 45.6 \pm 12.8 |
| Estado Civil ⁺ | |
| Soltera | 20 |
| Casada | 80 |
| Nivel Socioeconómico ⁺ | |
| Bajo | 64 |
| Medio | 25 |
| Alto | 7 |
| No contestó | 4 |
| IMC (kg/m ²) | 29.86 \pm 6.43 |
| Nivel de escolaridad (años) | 10.1 \pm 4.48 |
| Menarquia | 12.83 \pm 1.48 |
| Menopausia | 47.19 \pm 6.39 |

IMC= índice de masa corporal

⁺ Expresado en porcentaje

En estudios previos, la determinación de los niveles séricos de fitoestrógenos se ha centrado en la cuantificación de enterodiol, enterolactona, genisteína, daidzeína y equol. En menor medida, existen ciertos estudios que determinan quercetina, kaempferol, gliciteína y luteolina. Para matairesinol y naringenina no se han podido establecer sus niveles en suero debido a la baja sensibilidad de los métodos establecidos. Sin embargo, para biochanina A, formononetina, secoisolariciresinol, cumestrol y resveratrol, aparentemente no existen estudios donde se cuantifiquen en suero o plasma.

En el presente trabajo se analizaron 16 fitoestrógenos en suero por el método optimizado de HPLC-DAD-ESI-MS. Las concentraciones de los fitoestrógenos fueron ajustados al 100% de recuperación. En la figura 23 se

muestra un cromatograma representativo del análisis de fitoestrógenos en suero. Los niveles séricos de fitoestrógenos de las 69 muestras analizadas se presentan en la tabla 6. Concentraciones por debajo del límite de detección se designaron como cero al calcular las concentraciones medias de los fitoestrógenos.

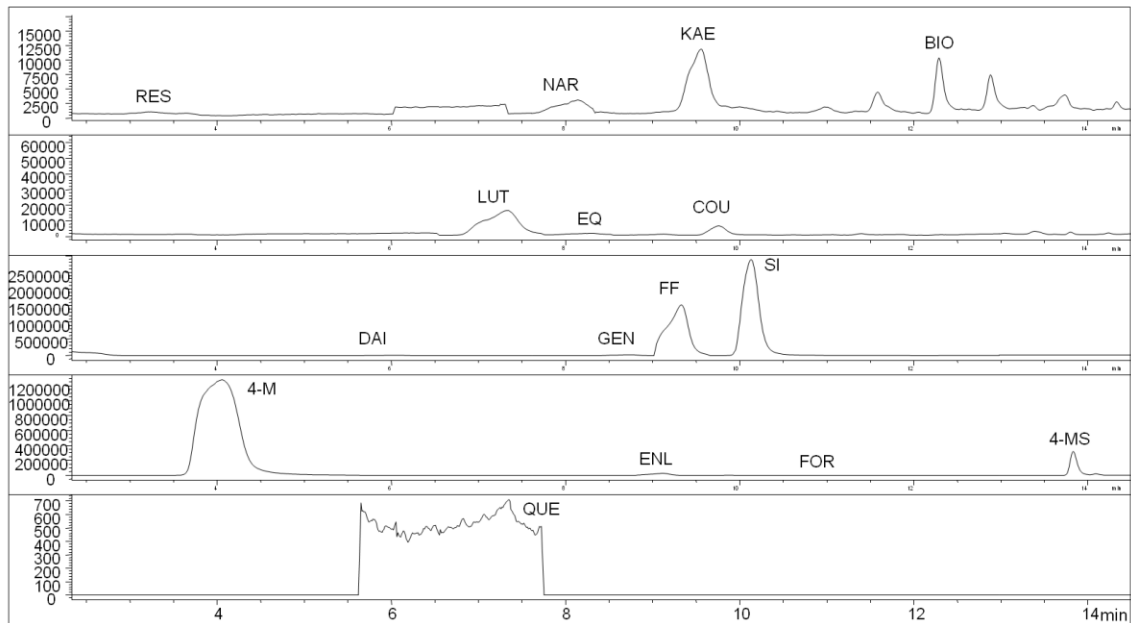


Figura 23. Cromatograma representativo de una muestra problema en las cuatro señales del detecto de masas, indicando los fitoestrógenos, los estándares de deconjugación e interno presentes

Los niveles séricos de fitoestrógenos más altos fueron para kaempferol (54.0 nmol/L), equol (42.9 nmol/L) y luteolina (22.1 nmol/L). En cambio, los niveles de más bajos fueron para formononetina (0.5 nmol/L), enterodiol (1.0 nmol/L) y cumestrol (1.6 nmol/L). El flavonol kaempferol y la flavona luteolina presentaron las concentraciones más altas. Para los isoflavonas, genisteína daidzeína y su metabolito equol, fueron los que se encontraron en mayor concentración. En el caso de los lignanos, enterolactona y matairesinol se presentaron en mayor concentración.

Los altos niveles de flavonoides observados podrían estar relacionados al consumo de frutas y verduras. Sin embargo, su consumo en Sonora es poco frecuente y en pequeñas cantidades [132]. No obstante, el muestreo se realizó en invierno y primavera, temporadas donde se presenta una mayor variedad de frutas y verduras al alcance de la población [132]. Por lo que el consumo se ve incrementado resultando en una mayor concentración de flavonoides en circulación.

Al igual que en estudios previos, los niveles séricos de flavonoides presentaron una amplia variación (59.4 a 352.8 nmol/L). Para quercetina, sus niveles fueron menores a los reportados anteriormente en mujeres finlandesas (52 nmol/L) y alemanas (20.26 nmol/L) [133-134]. A diferencia de publicaciones pasadas, los niveles de kaempferol fueron superiores a los de quercetina [91, 133]. Incluso, la concentración de kaempferol fue mayor a lo reportado por Radtke *et al.*, (2002), (8.72 nmol/L) y Cao *et al.*, (2009), (38 nmol/L) al evaluar sus concentraciones en mujeres estudiantes [91, 133]. Así mismo, naringenina presentó niveles mayores a los publicados por Radtke *et al.*, (2002) (<LD) y Erlund *et al.*, (2002), (4.8 nmol/L) [133-134]. Sin embargo, la concentración de luteolina fue menor a lo reportado por Cao *et al.*, (2009) (77.46 nmol/L), en estudiantes mujeres [91].

Por su parte, los niveles de genisteína y daidzeína fueron inferiores a los reportados para japonesas (genisteína; 200 a 230 nmol/L, daidzeína; 109 a 73 nmol/L), y estadounidenses vegetarianos (198 y 143 nmol/L respectivamente) cuyo consumo de soya fue similar a la oriental [14, 135-136]. Los bajos niveles de isoflavonas observados en el presente estudio sugieren un consumo limitado de productos derivados de soya. Sin embargo, los niveles de genisteína fueron semejantes a los reportados para mujeres neoyorquinas y asiáticoamericanas (5.7 y 6.6 nmol/L respectivamente) [10, 97]. En cambio, para daidzeína, su concentración sólo fue similar a las asiáticoamericanas (6.5 nmol/L) [10]. Así

mismo, fueron mayores a las encontradas en europeas (1.5 a 4.1 nmol/L) [19, 101]. A diferencia de la mayoría de los reportes, los niveles de daidzeína fueron similares a los de genisteína.

En contraste con estudios anteriores, la concentración de equol fue 25 a 430 veces superior a las reportadas. Incluso, la concentración más alta correspondía a 1.7 nmol/L en japonesas [14]. Además, el porcentaje de mujeres productoras de equol fue del 95.65%, superior al establecido de 30 a 40% [92, 137]. De la misma manera, el porcentaje fue mayor al de excreción urinaria en mujeres japonesas (50%) [135]. Por lo que, el presente trabajo muestra los más altos niveles y porcentaje de productoras de equol reportados hasta el momento.

Los altos niveles de equol podrían deberse a los patrones dietarios del estado. En Sonora, se estima que 50% de la población tiene un patrón alimentario compuesto principalmente de frijol, tortilla de maíz y trigo, huevos, carne (pollo, salchicha, jamón y res), leche, azúcar, tomates y papa [132]. Dado que equol se encuentra en los productos de origen animal, su consumo podría contribuir en parte a sus concentraciones séricas [138]. Sin embargo, de acuerdo al recordatorio de 24 h, el consumo de equol en las mujeres fue bajo (1.51 µg/día) Las bacterias intestinales a su vez son un factor importante en la producción de equol. Existe una gran variedad de bacterias intestinales involucradas en la conversión de daidzeína/daidzina a equol [139]. Aldercreutz presume que el consumo de grasa y proteína de origen animal incrementa un ambiente en el colon permitiendo la supervivencia de estas bacterias [33]. De esta forma, en el recordatorio de 24 h se observó un consumo de proteína (56.52 g/día) y grasa (49.2 g/día) superior a la consumo diaria recomendada (46 y 20-35 g/d para proteína y grasa respectivamente). Sin embargo, no se ha encontrado relación entre el consumo de proteína animal o grasa con el estatus

de productores de equol. Hasta el momento, la asociación entre la producción de equol y componentes dietarios no ha mostrado conclusiones claras.

A pesar de que la capacidad para producir equol se considera un fenómeno estable, individuos no productores de equol pueden presentar niveles de este fitoestrógeno después del consumo constante de soya. Por lo tanto se piensa que su producción podría estar relacionada con el tipo de soya consumida. En occidente el consumo de isoflavonas se realiza principalmente en forma glicosilada, mientras que en oriente en forma libre, siendo ésta última la más fácil en ser absorbida y metabolizada a equol [139]. Sin embargo, el consumo de isoflavonas en las mujeres sonorenses fue bajo (237.14 $\mu\text{g}/\text{día}$), por lo que el alto porcentaje de productoras de equol podría no estar relacionado con el tipo de isoflavonas consumidas.

El alto porcentaje de productoras de equol podría deberse al bajo límite de detección (0.51ng/mL) del método, el cual fue 1.5 a 47 veces más sensible que otras metodologías [2, 10, 17]. Wu *et al.*, (2004) al medir los niveles plasmáticos de equol, con un LD de 24 ng/mL, presentaron un porcentaje de productoras de equol del 39% [10]. Así mismo, en mujeres japonesas, con los niveles más altos de equol (1.7 nmol/L) y un LD de 10 ng/mL, reportaron que sólo el 38% presentaron concentraciones mayores a 20 nmol/L, mientras que para las sonorenses fue del 75.36 %. En cambio, Valentin-Blasini *et al.*, (2003) con un LD de 2.4 ng/mL, presentaron un porcentaje de productores de equol del 1% [1]. En este sentido, Grace *et al.*, (2004) con un método 2.4 veces más sensible que el presente, sólo el 38 % de la población fue productor de equol [19]. Por lo tanto, si bien la sensibilidad es alta, no puede explicar por sí sólo el porcentaje de productoras de equol en las mujeres sonorenses.

Por lo tanto, existen una gran variedad de factores involucrados en la formación de equol, no sólo el tipo y cantidad de alimento consumido. En conjunto, la presencia de bacterias productoras de equol, los sustratos

específicos (daidzina o daidzeína) y las condiciones intestinales óptimas para el metabolismo (lípidos; sobre todos los poliinsaturados, proteínas) determinarán la producción de equol en el individuo [33, 137, 139].

Como se mencionó anteriormente, la evaluación de los isoflavonas se ha centrado en la determinación de genisteína, daidzeína y equol, y en menor medida en la cuantificación de gliciteína. Los escasos reportes realizados de gliciteína corresponden a mujeres europeas, donde su concentración (0.1 nmol/L) es inferior a la encontrada en el presente trabajo [19, 101]. Por otro lado, hasta el momento, no se han reportado concentraciones séricas de formononetina y biochanina A. Esto puede deberse a que los dos fitoestrógenos son metabolizados a genisteína, daidzeína y equol, por lo que su determinación podría ser irrelevante. Sin embargo, se observó que el 33% y 99% de la población presentó niveles superiores al LD de formononetina y biochanina A respectivamente. Lo anterior indica que no han sido metabolizados por completo. Por lo tanto, la cuantificación de formononetina y biochanina A debería ser incluida al evaluar los niveles séricos de isoflavonas.

La cuantificación de lignanos en suero se centra en enterolactona y en menor medida en enterodiol. En algunas ocasiones, se incluye el análisis de matairesinol pero no así el de secoisolariciresinol. Lo anterior se debe a que los niveles plasmáticos/séricos de enterolactona son utilizados generalmente como biomarcadores del consumo de lignanos [83, 93]. En este sentido, solamente el 3 y 10% de las muestras presentaron niveles por encima del LD para matairesinol y secoisolariciresinol respectivamente. Lo anterior indica que la mayor proporción fue metabolizada. Sin embargo, sólo el 16% presentó niveles de enterodiol, por lo que los lignanos consumidos fueron metabolizados principalmente a enterolactona. Lo anterior se verificó al observar que el 100% de las mujeres presentaron niveles de enterolactona. Por ello, la determinación

de lignanos en sangre podría limitarse, como indican estudios anteriores, a la cuantificación de enterolactona.

Los bajos niveles de lignanos (2.7 nmol/L) podrían deberse al bajo consumo de granos y cereales. La Encuesta Nacional de Ingresos y Gastos de los Hogares (ENIGH) estimó que sólo el 18% de los gastos en alimentación se destinaron al consumo de cereales [140]. Por su parte, los alimentos de origen animal, frutas y verduras representan un 40.5% y 16% de los gastos respectivamente. En Sonora, el porcentaje destinado al gasto de cereales es aún menor (13.6%) [141]. Lo anterior se ve reflejado en las bajas concentraciones de lignanos observado en el presente estudio.

Por su parte, las concentraciones de enterolactona en las mujeres del presente estudio (2.1 nmol/L) fueron inferiores a las reportadas para británicas (28.5 a 3.15 nmol/L), estadounidenses (20.2 a 14 nmol/L), y asiáticas (14 a 11 nmol/L) [83, 93, 97, 101]. Incluso, aparentemente no existen reportes semejantes a los niveles de enterolactona encontrados. La concentración más baja reportada (de 0.11 nmol/L) se presentó en la Tercera Encuesta Nacional de Evaluación de Salud y Nutrición (NHANES III, 1988-1994) en los Estados Unidos [1]. Por lo que, los bajos niveles observados, como se mencionó anteriormente, podrían deberse al consumo limitado de granos y cereales.

Los niveles de enterodiol, secoisolariciresinol y matairesinol fueron menores a los de enterolactona, presentando incluso medianas por debajo del LD. De la misma forma, Valentin-Blasini *et al.*, (2003) presentaron niveles de matairesinol por debajo del LD, pero con niveles de enterodiol superiores (5.44 nmol/L) a los observados en el presente trabajo [1]. Asimismo, mujeres europeas y neoyorquinas presentaron mayores concentraciones (con una mediana de 0.24 y 1.5 nmol/L respectivamente) [101]. En cuanto a secoisolariciresinol, no se han reportado niveles séricos o plasmáticos. En

conjunto, los niveles de lignanos fueron bajos comparados con la mayoría de los estudios mencionados.

Finalmente, se presentan los niveles séricos de cumestrol y resveratrol. Si bien los niveles de cumestrol fueron bajos (1.6 nmol/L), en comparación con otros fitoestrógenos, se observó un alto porcentaje en suero (97.1%). Lo anterior puede deberse a que cumestrol se encuentra en una gran variedad de alimentos, desde derivados de soya hasta productos de origen animal que forman parte de la dieta sonorensis [132, 138, 142]. Sin embargo, la concentración de cumestrol en estos alimentos es baja, Para el caso de resveratrol se encontró una mayor concentración (3.2 nmol/L) pero sólo en el 30.4 % de las mujeres de estudio. Esto puede explicarse en parte a que resveratrol se encuentra principalmente en el vino y uvas, por lo que su consumo se ve limitado [37-38].

En conjunto, los niveles séricos de la mayoría de los fitoestrógenos en el presente trabajo fueron inferiores a los encontrados en otros estudios de diferentes poblaciones. En cambio, kaempferol, naringenina y equol presentaron los niveles más altos hasta el momento reportados. La inclusión de resveratrol, cumestrol, secoisolariciresinol, biochanina A, gliciteína, formononetina y matairesinol incrementó el número de fitoestrógenos a cuantificar que no han sido considerados en otros estudios.

Tabla 6. Niveles séricos de fitoestrógenos (nmol/L) en mujeres sonorenses (n= 69)

| | Media | DS | Media Geométrica (IC 95 %) | Percentil | | |
|---------------------------|-------|-------|----------------------------|-----------|-------|-------|
| | | | | 25 | 50 | 75 |
| Fitoestrógenos | 259.5 | 250.2 | 22.9 (187.3 – 241.9) | 155.7 | 188.1 | 255.8 |
| Flavonoides e Isoflavonas | 246.4 | 243.8 | 203.3(179.6-230.2) | 152.0 | 182.4 | 250.8 |
| Isoflavonas | 132.2 | 246.8 | 68.4 (52.6-89.1) | 41.9 | 60.6 | 120.2 |
| Formononetina | 0.1 | 0.3 | 0.5 (0.3-0.7) | -* | -* | -* |
| Biochanina A | 1.4 | 1.1 | 1.2 (1.1-1.4) | 0.9 | 1.1 | 1.5 |
| Gliciteína | 2.6 | 7.7 | 2.6 (1.6-4.2) | -* | -* | 1.4 |
| Genisteína | 18.9 | 45.9 | 7.0 (5.0-9.9) | 2.3 | 5.74 | 16.2 |
| Daidzeína | 20.3 | 49.7 | 6.0 (4.2 – 8.6) | 1.7 | 5.5 | 13.7 |
| Equol | 89.0 | 231.7 | 42.9 (33.7 – 54.6) | 20.4 | 41.3 | 53.9 |
| Flavonoides | 114.2 | 46.2 | 107.9 (100.0-116.6) | 88.2 | 102.9 | 126.5 |
| Luteolina | 24.0 | 17.3 | 22.1 (20.5 – 23.9) | 19.1 | 21.2 | 23.3 |
| Naringenina | 12.5 | 24.8 | 7.7 (6.5-9.2) | 4.6 | 6.27 | 10.8 |
| Kaempferol | 58.3 | 24.4 | 54.0 (49.1 – 59.3) | 39.1 | 54.2 | 67.0 |
| Quercetina | 19.4 | 12.1 | 17.1 (14.9-19.7) | 11.2 | 16.3 | 25.5 |
| Lignanós | 4.2 | 4.4 | 2.7 (2.2-3.4) | 1.4 | 2.8 | 5.6) |
| Matairesinol | 0.1 | 0.4 | 2.5 (2.0-3.1) | -* | -* | -* |
| Secoisolariciresinol | 0.2 | 0.7 | 1.7 (1.1-2.8) | -* | -* | -* |
| Enterodiol | 0.2 | 0.6 | 1.0 (0.6 – 1.6) | -* | -* | -* |
| Enterolactona | 3.8 | 4.1 | 2.3 (1.8 – 3.0) | 1.3 | 2.1 | 5.0 |
| Cumestrol | 3.0 | 8.8 | 1.6 (1.3 – 2.0) | 0.9 | 1.4 | 2.3 |
| Resveratrol | 8.7 | 64.6 | 3.2 (1.7 – 6.1) | -* | -* | 1.2 |

* Valores por debajo del límite de detección

Estimación del Consumo de Fitoestrógenos por Recordatorio de 24 h

El consumo de fitoestrógenos estimado a partir del recordatorio de 24 h se presenta en la tabla 7. El principal fitoestrógeno ingerido fue quercetina (3,760.5 µg/día), seguido de naringenina (1,068.7 µg/día) y kaempferol (196.6 µg/día). En cambio, los fitoestrógenos menos consumidos correspondieron a resveratrol (0.2 µg/día), equol (1.5 µg/día) y matairesinol (6.3 µg/día). Dentro de los flavonoides, quercetina, naringenina y kaempferol presentaron el mayor consumo. Para las isoflavonas, genisteína, daidzeína y biochanina A fueron las mayormente consumidas. Por su parte, secoisolariciresinol y enterolactona fueron los lignanos de mayor consumo. Al igual que los niveles séricos, los flavonoides fueron los principales fitoestrógenos ingeridos.

A pesar de que el mayor consumo correspondió a quercetina, éste fue menor a lo reportado por Cao *et al.*, (2009) (10,760 µg/día), Erlund *et al.*, (2002) (11,000 µg/día) y Radtke *et al.*, (2002) (17,250 µg/día) [91, 133-134]. De la misma forma, el consumo fue menor a la observada en estudios anteriores para naringenina (5,450 y 3,000 µg/día), kaempferol (3,160 y 10,940 µg/día) y luteolina (7,410 µg/día) [91, 133-134]. Por lo tanto, el consumo de flavonoides es bajo en las mujeres sonorenses.

De la misma forma, el consumo de genisteína y daidzeína fue menor al observado por Arai *et al.*, (2000) (27,864 y 14,706.6 µg/día), Yamamoto *et al.*, (2001) (22,300 y 14,000 µg/día) y Grace *et al.*, (2004) (247.2 y 205.5 µg/día) [19, 86, 135]. Sin embargo, el consumo fue mayor a la reportada por Bhakta *et al.*, en el 2005 (245 y 159.5 µg/día) y 2006 (225.6 y 163.8 µg/día) en surasiáticas del Reino Unido y británicas (193 y 176 µg/día) [143]. Por su parte, el consumo de formononetina fue menor al consumo en holandesas (79 µg/día) y

estadounidenses (31 $\mu\text{g}/\text{día}$), pero para biochanina A el consumo fue mayor al observado en estas poblaciones (1.0 $\mu\text{g}/\text{día}$ y 6 $\mu\text{g}/\text{día}$) [60, 144].

A su vez, el consumo de lignanos fue bajo en las mujeres sonorenses. Para enterolactona, el consumo fue menor a la observada en británicas (173.6 $\mu\text{g}/\text{día}$) y surasiáticas (136.8 – 140.7 $\mu\text{g}/\text{día}$) residentes en el Reino Unido [83, 143]. De la misma manera, el consumo de matairesinol y secoisolariciresinol fue menor al reportado para europeas (30 y 121 $\mu\text{g}/\text{día}$) y holandesas (73 y 988 $\mu\text{g}/\text{día}$) [19, 60, 144]. En cambio, mexicanas del centro del país, presentaron un menor consumo de matairesinol (0.8 $\mu\text{g}/\text{día}$), pero no así de secoisolariciresinol (67.5 $\mu\text{g}/\text{día}$) [7].

En el caso de cumestrol, el consumo fue mayor al observado en holandesas (0.2 $\mu\text{g}/\text{día}$), y estadounidenses (1.0 $\mu\text{g}/\text{día}$) [60, 144]. Incluso, el consumo de cumestrol superó a la reportada para mexicanas del centro del país (1.8 $\mu\text{g}/\text{día}$) [7]. Por lo tanto, existe una gran variedad de alimentos aportadores de cumestrol en la dieta sonorense, donde destaca el frijol.

El estudio de resveratrol en humanos se ha centrado generalmente en determinar su metabolismo y biodisponibilidad. Por ello, este es el primer trabajo, según la bibliografía consultada, donde se determina el consumo de resveratrol. Además, el análisis de resveratrol se limita a un grupo reducido de alimentos, por lo que su consumo se relaciona principalmente con el vino, uvas y jugos. En este sentido, la estimación del consumo de resveratrol (0.201 $\mu\text{g}/\text{día}$) fue bajo en comparación con los demás fitoestrógenos.

Tabla 7. Estimación del consumo de fitoestrógenos ($\mu\text{g}/\text{día}$) a partir del recordatorio de 24 h en mujeres sonorenses (n= 69)

| | Media | DS | Media geométrica (IC 95 %) | Percentil | | |
|---------------------------|----------|----------|-----------------------------|-----------|---------|----------|
| | | | | 25 | 50 | 75 |
| Fitoestrógenos | 14683.73 | 22132.31 | 6546.28 (4532.21 – 9455.39) | 3209.1 | 8237.96 | 19925.05 |
| Flavonoides e Isoflavonas | 13965.71 | 22095.13 | 5503.27 (3638.2 – 8324.43) | 2526.12 | 7089.27 | 19534.1 |
| Isoflavonas | 840.25 | 2539.85 | 237.14 (169.95 – 330.9) | 131.46 | 270.37 | 503.46 |
| Formononetina | 17.64 | 21.05 | 7.22 (5.07 -10.28) | 2.33 | 4.67 | 27.87 |
| Biochanina A | 62.92 | 86.58 | 23.18 (15.81 – 33.97) | 6.55 | 29.74 | 100.01 |
| Gliciteína | 20.94 | 68.78 | 7.83 (5.84 – 10.52) | 3.13 | 7.03 | 17.75 |
| Genisteína | 460.13 | 1634.72 | 72.06 (48.49 – 107.09) | 18.87 | 86.7 | 177.92 |
| Daidzeína | 277.09 | 872.28 | 58.02 (38.87 – 86.60) | 18.08 | 87.7 | 135.51 |
| Equol | 1.53 | 1.56 | 1.51 (1.14 – 1.99) | 0 | 1.44 | 2.12 |
| Flavonoides | 13125.5 | 21865.3 | 5976.0(4002.1 – 8923.48) | 2235.95 | 6514.2 | 17052.91 |
| Luteolina | 344.54 | 788.38 | 85.72 (45.36 - 161.97) | 0.19 | 36.98 | 371.23 |
| Naringenina | 4823.58 | 19943.46 | 1068.72 (526.3 – 2170.18) | 0 | 179.4 | 721.1 |
| Kaempferol | 684.08 | 1730.88 | 196.56 (127.52 – 302.97) | 40.29 | 104 | 335.33 |
| Quercetina | 7273.26 | 7934.67 | 3760.46 (2497.59 – 5661.88) | 1406.76 | 4489.68 | 10844.21 |
| Lignanós | 450.38 | 2030.2 | 154.357 (119.87 – 198.77) | 90.37 | 149.17 | 280.42 |
| Matairesinol | 10.41 | 15.78 | 6.332 (5.0 – 8.02) | 3.32 | 6.27 | 11.81 |
| Secoisolariciresinol | 310.8 | 2031.66 | 50.79 (38.96 – 66.21) | 25.28 | 49.23 | 79.53 |
| Enterodiól | 35.4 | 40.84 | 20.57 (14.93 – 28.35) | 6.53 | 18.99 | 51.20 |
| Enterolactona | 93.77 | 103.48 | 55.40 (41.39 – 74.16) | 20.5 | 61.91 | 125.98 |
| Cumestrol | 267.64 | 532.89 | 15.53 (7.91 – 30.47) | 1.88 | 4.76 | 327.98 |
| Resveratrol | 0.006 | 0.034 | 0.201 (0.049 – 0.83) | 0 | 0 | 0 |

Asociación Entre el Consumo y los Niveles Séricos de Fitoestrógenos

Se evaluó la asociación entre los niveles séricos de fitoestrógenos con el consumo de éstos, los cuales fueron determinados a partir del recordatorio de 24 h. Para ello, se correlacionaron las concentraciones de cada uno de los fitoestrógenos mediante la prueba no-paramétrica de Spearman. Sin embargo, el tamaño de muestra con que se trabajó fue de 69 mujeres, número inferior al calculado para que el análisis contara con el suficiente poder. Las correlaciones se corrigieron de acuerdo a la variación intra e interpersonal en los recordatorios de 24 h (ya que se realizó un segundo recordatorio a una muestra de 50 mujeres). Los resultados se muestran en las tablas 8 para isoflavonas, tabla 9 para flavonoides y tabla 10 para lignanos.

Sólo se observó una correlación positiva significativa ($p < 0.01$) entre genisteína, luteolina y naringenina sérica y el estimado por el recordatorio de 24 h. A su vez, se encontró una correlación significativa entre los niveles séricos de daidzeína y genisteína con el consumo de isoflavonas ($p < 0.05$). De la misma forma, los niveles séricos de luteolina y el consumo de flavonoides presentaron una correlación significativa ($p < 0.04$). Asimismo, los niveles séricos de enterodiol presentaron una correlación significativa con el consumo de lignanos ($p < 0.05$).

Los niveles séricos de enterolactona y el consumo de matairesinol presentaron una correlación positiva y cercana a la significancia ($r = 0.3485$, $p = 0.0553$). De la misma forma, la relación entre resveratrol sérico e ingerido fue positiva ($r = 0.2876$, $p = 0.0517$). Un patrón similar fue evidente para cumestrol ($r = 0.2579$, $p = 0.0835$). No se encontraron relaciones positivas significativas entre los demás fitoestrógenos. A su vez, no se encontraron correlaciones positivas significativas entre el consumo de precursores y sus metabolitos en

suero. No se encontró relación entre fitoestrógenos séricos totales y su consumo ($r = -0.1134$, $p = 0.4515$).

Cao *et al.*, (2009) mostraron una correlación significativa entre los niveles plasmáticos de luteolina y su consumo ($r = 0.44$ $p < 0.05$), así como para quercetina ($r = 0.51$, $p < 0.05$) y kaempferol ($r = 0.44$, $p < 0.05$), lo cual no fue posible demostrar para estos dos últimos en el presente trabajo [91]. Sin embargo, estas diferencias podrían explicarse por la población de estudio de Cao *et al.*, (2009) el cual se realizó en estudiantes universitarias de 20 a 28 años de edad. Se ha observado que la edad y los años de educación presentan una asociación positiva con los niveles séricos de fitoestrógenos [34, 94]. Por su parte, Erlund *et al.*, (2002) al correlacionar quercetina con su consumo no encontraron una relación significativa al igual a lo reportado en este estudio. A diferencia de Erlund *et al.*, (2002) si se encontró una correlación significativa para naringenina [134]. En este caso, el estudio se realizó con 37 mujeres (de 43 años de edad), muestra menor a la utilizada en el presente trabajo. Cabe mencionar que en ambos trabajos se realizaron al menos cuatro recordatorios para estimar el consumo de flavonoides.

Radtke *et al.*, (2001) al evaluar la correlación de quercetina y kaempferol séricos con su consumo encontraron correlaciones significativas, ya sea al utilizar 1 ó 7 recordatorios, resultados opuestos a lo encontrado en este estudio [133]. Sin embargo, la mayor correlación se encontró con el recordatorio del día anterior a la toma de muestra (quercetina, $r = 0.42$ $p < 0.01$; kaempferol, $r = 0.5$, $p < 0.01$). Al igual que a lo observado en el presente trabajo, Radtke *et al.*, (2001) reportaron un coeficiente de correlación similar para naringenina ($r = 0.47$, $p < 0.01$).

En el caso de las isoflavonas, las correlaciones entre niveles séricos se han realizado principalmente para genisteína y daidzeína, por lo que aparentemente no existen datos para las demás isoflavonas. Las correlaciones

de genisteína y daidzeína séricas con su consumo en la mayoría de los casos han sido positivas y significativas. Las correlaciones van de 0.32 a 0.43 ($p < 0.001$) para genisteína y de 0.25 a 0.33 ($p < 0.001$) para daidzeína [19, 83, 135, 143]. Sin embargo, también se han presentado correlaciones no significativas para los dos fitoestrógenos [83, 86, 143]. Al igual que en el presente estudio, se han obtenido correlaciones positivas significativas entre los niveles de genisteína y daidzeína séricos con el consumo de isoflavonas ($r = 0.32$, $r = 0.27$, $p < 0.001$) [19]. En cambio, no se presentó una correlación entre equol sérico con el consumo de daidzeína y genisteína a diferencia de otros estudio que han observado correlaciones significativas ($r = 0.14$, $p < 0.05$) [19].

Las asociaciones entre el consumo de lignanos y los presentes en el suero se realizan a través de sus precursores en los alimentos y sus metabolitos en suero. A su vez, se incluye la correlación entre niveles séricos de enterolactona y su consumo. En el primer caso, las relaciones entre matairesinol y secoisolariciresinol dietarios con sus metabolitos séricos sólo han sido significativas con los niveles de enterolactona (matairesinol, $r = 0.2$; secoisolariciresinol, $r = 0.10$, $p < 0.001$) [13]. En el presente estudio, la correlación con matairesinol dietario y enterolactona sérica fue alta ($r = 0.3485$), y cercana a la significancia ($p = 0.0553$). En cuanto al consumo de lignanos con sus metabolitos séricos, otros estudios han presentado correlaciones débiles significativas tanto para enterodiol como enterolactona (enterodiol $r = 0.09$, $p < 0.05$; enterolactona, $r = 0.18$, $p < 0.001$) [13, 94]. Pero, a diferencia de estos estudios, la correlación observada en el presente trabajo sólo fue significativa para lignanos dietarios y enterodiol sérico ($r = 0.3313$, $p < 0.05$). Al igual que en otros estudios, la relación entre enterolactona sérica con la dieta ha sido débil no significativa [83, 143].

Por lo tanto, para la mayoría de los fitoestrógenos, no se observó una asociación entre los niveles séricos y el consumo de éstos determinada por

recordatorio de 24 h. Sin embargo, existen diferentes factores los cuales pudieron haber afectado la relación entre el consumo de fitoestrógenos y su cuantificación en suero. De esta forma, estos factores pueden influir en la interpretación e implementación de los niveles séricos de fitoestrógenos como biomarcadores de su consumo dietario.

Primeramente al realizar las correlaciones no se contó con el tamaño de muestra deseado. El tamaño considerado para la prueba de correlación fue de 100 individuos. De esta manera, se planteó encontrar correlaciones significativas ($p < 0.05$) para los fitoestrógenos. Sin embargo, existen reportes donde se han encontrado correlaciones mayores a 0.30 con un tamaño de muestra menor a 60 individuos [83, 133]. Incluso, no se han observado correlaciones significativas cuando la muestra es mayor a 100 [13, 83, 143]. Por lo que pudieran existir otros factores que afectan en mayor medida la correlación entre niveles séricos de fitoestrógenos y su consumo.

Uno de los principales problemas es la dificultad de cuantificar el consumo de estos compuestos en la población. El consumo determinado a partir del recordatorio de 24 h es transformado a información cuantitativa a través de la tabla de composición de alimentos [80]. No obstante, este método está limitado a la memoria del sujeto o a la veracidad del registro del consumo diario [79]. Por ello, su exactitud como método de medición del consumo es incierta. Además, sólo se aplicó un recordatorio de 24 h, por lo que sería conveniente aplicar más de uno.

Es posible que individuos con obesidad y sobrepeso sobre estimen su consumo de alimentos saludables [94]. De esta forma, el consumo de frutas y verduras, los cuales representan en gran medida una fuente de fitoestrógenos, se vea sobre estimado por los individuos. En este mismo sentido, los alimentos no saludables, ya sean ricos en grasa, azúcar o altamente procesados pueden ser subestimados [80]. Se ha observado que los bajos niveles séricos de

enterolactona de las personas con obesidad o sobrepeso comparadas con su contraparte pueden explicarse por un sesgo en el recordatorio, dando como resultado que la estimación del consumo carezca de exactitud [94].

La base de datos de la composición de alimentos es otro de los factores a considerar al estimar el consumo de fitoestrógenos. Sí bien, en el presente trabajo se contó con un diccionario con alimentos regionales, la concentración de los fitoestrógenos en éstos no se conoce por completo. Lo anterior conlleva a una tabla de composición de alimentos incompleta, lo que sesga la estimación del consumo de fitoestrógenos. En ciertas investigaciones, la base de datos se realizó con el análisis de los alimentos regionales por métodos cromatográficos. En estos casos, las correlaciones fueron positivas y significativas [13, 133, 135]. Sin embargo, con bases de datos incompletas, sólo algunas de las correlaciones fueron significativas [83, 143]. Recientemente el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos y su contraparte en Europa, elaboran una base de datos, la cual está lejos de completarse dada la complejidad de los alimentos [145]. No obstante, su elaboración contribuirá para su uso en estudios epidemiológicos.

Otro de los factores que pudieron haber contribuido a la inexactitud de la estimación del consumo, es la elaboración de las tablas de composición de alimentos, dada la diversidad de sistemas utilizados para caracterizar y cuantificar los fitoestrógenos [80]. Las diferentes técnicas utilizadas podrían contribuir en una variación en el contenido de los fitoestrógenos en los alimentos [145]. Además, en algunas ocasiones no se especifica la forma del compuesto analizado (libre o conjugado) o sólo se incluye un grupo reducido de fitoestrógenos [14, 93, 138]. Por lo tanto la información en la cuantificación de los fitoestrógenos en los alimentos pudo estar incompleta.

Adicionalmente, un elemento que interviene en la estimación es la variación en la concentración de los fitoestrógenos en los alimentos. Así mismo,

factores ambientales y su modificación durante el procesamiento influyen en su concentración [33, 80, 145]. Con el recordatorio de 24 h es difícil establecer todos estos factores que finalmente contribuyen en la concentración de los fitoestrógenos. Sin embargo, en el presente trabajo se incluyó el método de preparación de los alimentos. Lo anterior permitió al menos ajustar este efecto al evaluar el consumo de los fitoestrógenos.

A diferencia del recordatorio de 24 h, los niveles séricos de fitoestrógenos cuantifican de forma precisa y objetiva el consumo, el cual no está limitado a la memoria del sujeto o a la veracidad del registro del consumo diario [79]. Sin embargo, existen diversos factores que también pudieron haber contribuido en un error en la relación del consumo dietario y los niveles séricos.

La relación entre el consumo dietaria y sus concentraciones en el organismo es un aspecto complejo. Para que un metabolito sea utilizado como biomarcador de exposición existen diversos factores a considerar. Se debe conocer qué tipo de exposición refleja el biomarcador y que tan bien se ve reflejada esta exposición. Para ello, deben seleccionarse los metabolitos que indiquen en mayor medida la exposición. El método de análisis deberá ser sensible y específico. Se deberá conocer la relación entre el tiempo del consumo y su aparición en el torrente sanguíneo. De la misma forma, un cambio en el consumo debe verse reflejado en los niveles del biomarcador. Finalmente es necesario conocer los factores fisiológicos que afectan el metabolismo. Sin embargo, esta información se encuentra limitada para la mayoría de los fitoestrógenos [80, 145-146].

Una de las fortalezas del método de análisis es la gran variedad de fitoestrógenos incluidos. A pesar de ello, aún existen metabolitos los cuales pueden adicionarse al análisis como O-desmetilangolesina (metabolito de daidzeína y formononetina). El método establecido presentó una alta especificidad y sensibilidad (por el orden de las ppb), con una linealidad de 0.02

a 3000 ng/mL. Además la inclusión de controles de calidad asegura que el método analítico es confiable y reproducible.

Uno de los factores que pudieron haber disminuido la relación entre consumo y niveles séricos es el tiempo de la toma de muestra. En el presente trabajo se recolectó por la mañana una muestra de sangre en ayunas de 12 h. El tiempo requerido para alcanzar la concentración máxima (T_{max}) en el plasma varía entre fitoestrógenos y dentro del mismo fitoestrógeno (por estar libre o conjugado). Las isoflavonas presentan un T_{max} de 9 h [92]. En cambio para los flavonoides, el T_{max} es de aproximadamente 5 h[92]. Para equol, enterodiol y enterolactona el T_{max} va de 12 a 24 h, por lo que la toma de muestra de 12 h pareciera ser óptima [92, 147]. Sin embargo, las concentraciones basales de fitoestrógenos se restablecen a las 48 h aproximadamente, pudiéndose recolectar la muestra antes de este periodo [92, 133]. Lo anterior ha hecho difícil establecer cuál es el tiempo adecuado de la toma de muestra.

El número de toma de muestra a su vez pudo haber contribuido a la baja correlación. Aunque, diferentes estudios al realizar una toma de muestra presentaron correlaciones similares a las realizadas con 2 a 4 tomas de muestras [19, 83]. Fraser *et al.*, (2010) sugieren que de ser posible y preferible, las correlaciones crudas deberán ajustarse por el coeficiente de correlación intraclase (ICC) [136]. El ICC compara la varianza de los niveles séricos entre sujetos con la total (varianza intra e interpersonal). Por lo que al estimar el ICC se requiere de un subestudio donde los sujetos cuenten con al menos 2 muestras separadas por meses o años. Además, cuando el ICC sea bajo (0.01 – 0.4), deberá incrementarse el tamaño de la muestra.

La relación consumo-niveles séricos también depende de los factores que intervienen en el metabolismo. La flora bacteriana juega un papel importante en la biodisponibilidad de los fitoestrógenos. Si bien las mujeres participantes en el estudio no habían consumido ningún tipo de antibiótico o

medicamento en los 7 días previos a la toma de muestra, la baja carga bacteriana intestinal pudo haber reducido los niveles séricos de fitoestrógenos. No obstante, aún no se han podido determinar por completo los efectos del uso de antibióticos [33]. Por otro lado, la distribución de los fitoestrógenos en el organismo repercute en los niveles séricos. Así, enterolactona pasa a través de la membrana celular de preadipocitos, lo que diluye rápidamente las concentraciones en los sujetos con obesidad o sobrepeso resultando en niveles séricos menores [94]. Finalmente, dado la limitada información en el metabolismo de los fitoestrógenos en humanos, aun existen otros elementos que pudieran estar actuando sobre los niveles séricos y que no se conocen con exactitud.

Si bien, sólo se observaron correlaciones positivas para genisteína, luteolina y naringenina, estas son relevantes dada la capacidad de unión de estos fitoestrógenos a los receptores de estrógenos ($RE\alpha$ y $RE\beta$) [44]. De la misma forma, las correlaciones para enterodiol y enterolactona son relevantes, incluso para cumestrol y resveratrol, cuyas correlaciones se encontraron cerca de la significancia. Además, estos fitoestrógenos son capaces de producir una activación transcripcional (a una concentración de 10 a 100 nmol/L) con la misma magnitud que el estrógeno [44]. Por lo tanto, el análisis de los niveles séricos de estos fitoestrógenos podría ser de gran utilidad en estudios epidemiológicos.

A pesar de que no se presentó una correlación entre niveles séricos y la estimación del consumo por recordatorio de 24h para la mayoría de los fitoestrógenos analizados, los niveles séricos de fitoestrógenos presenta varias ventajas sobre el uso de recordatorios de 24 h. Las encuestas dietarias no consideran diferencias en la biodisponibilidad u otros factores que intervienen en la concentración de los fitoestrógenos. Por lo que es difícil establecer qué tan exactos son los resultados obtenidos por este método. La cuantificación de

fitoestrógenos en suero presenta un alto potencial como alternativa al recordatorio de 24 h, pero aún existen diversos aspectos que deben estudiarse (metabolismo, farmacocinética, procesamiento de alimentos, entre otros) para proporcionar información valiosa entre el consumo de fitoestrógenos y estado de salud.

La variación en el consumo y niveles séricos de fitoestrógenos es alta. Por lo tanto, al investigar la relación entre el estado de salud y el consumo de fitoestrógenos, sería recomendable utilizar los niveles séricos en combinación con su estimación a través de los recordatorios de 24 h. Ambos métodos presentan fallas (las cuales se pueden minimizarse), pero la fuente de error es diferente [134]. Como afirman Bhakta *et al.*, (2005) “El consumo verdadera recae en algún lugar entre ellos”.

Tabla 8. Correlación entre niveles séricos de isoflavonas y consumo diaria (recordatorio de 24 h) (n = 69)

| Recordatorio | Niveles séricos | | | | | | |
|---------------|-----------------|---------------|--------------|------------|------------------|----------------|---------|
| | Isoflavonas | Formononetina | Biochanina A | Gliciteína | Genisteína | Daidzeína | Equol |
| Isoflavonas | 0.1574 | -0.1269 | 0.1605 | -0.0858 | 0.3257** | 0.3193* | -0.0657 |
| Formononetina | | 0.0806 | 0.4075* | -0.08292 | -0.0318 | 0.0021 | -0.1658 |
| Biochanina A | | | 0.1661 | -0.0599 | 0.0361 | 0.0101 | -0.2478 |
| Gliciteína | | | | -0.0431 | 0.2106 | 0.2383* | 0.0216 |
| Genisteína | | | | | 0.3163*** | 0.3370*** | 0.0061 |
| Daidzeína | | | | | | 0.1904 | 0.0702 |
| Equol | | | | | | | -0.5167 |

coeficiente de correlación de Spearman, * p< 0.05, ** p< 0.02, *** p< 0.01

Tabla 9. Correlación entre niveles séricos de flavonoides y consumo diaria (recordatorio de 24 h) (n = 69)

| Recordatorio | Niveles séricos | | | | |
|--------------|-----------------|------------------|-----------------|------------|------------|
| | Flavonoides | Luteolina | Naringenina | Kaempferol | Quercetina |
| Flavonoides | 0.1801 | 0.2999* | 0.2231 | 0.0660 | -0.1081 |
| Luteolina | | 0.3950*** | 0.1758 | 0.0863 | 0.0230 |
| Naringenina | | | 0.4732** | 0.1621 | -0.0829 |
| Kaempferol | | | | 0.1554 | -0.1500 |
| Quercetina | | | | | -0.0468 |

Coeficiente de correlación de Spearman, * p< 0.05, ** p < 0.01, *** p< 0.001

Tabla 10. Correlación entre niveles séricos de lignanos y consumo diaria (recordatorio 24 h) (n = 69)

| Recordatorio | Niveles séricos | | | | |
|----------------------|-----------------|--------------|----------------------|-----------------|----------------|
| | Lignano | Matairesinol | Secoisolariciresinol | Enterodiol | Enterolactona |
| Lignanos | -0.0659 | -0.2265 | -0.1060 | 0.3313** | 0.0274 |
| Matairesinol | | -0.1155 | 0.0933 | 0.2267 | 0.3485* |
| Secoisolariciresinol | | | 0.0002 | 0.2094 | 0.1293 |
| Enterodiol | | | | 0.2055 | -0.0036 |
| Enterolactona | | | | | -0.0306 |

coeficiente de correlación de Spearman, * $p = 0.0553$, ** $p < 0.05$

CONCLUSIONES

La cuantificación de fitoestrógenos en suero por HPLC-DAD-ESI-MS presenta un alto potencial como alternativa al recordatorio de 24 h ya consideran diferencias en la biodisponibilidad de los fitoestrógenos. Sin embargo, aún existen diversos aspectos que deben estudiarse (metabolismo, farmacocinética, procesamiento de alimentos, entre otros) para establecerse como biomarcadores del consumo dietario reciente.

El método establecido por HPLC-DAD-ESI-MS, representa un avance en el análisis cuantitativo de 16 fitoestrógenos presentes en suero humano. Las modificaciones realizadas al método descrito por Wyns *et al.*, (2010) han permitido la identificación cromatográfica de los 16 fitoestrógenos, ampliando de esta forma, el número de fitoestrógenos a cuantificar por corrida cromatográfica. Por lo que el método puede ser utilizado en el análisis de fitoestrógenos en suero.

Las correlaciones positivas significativas para luteolina, naringenina y genisteína, incluso para resveratrol y cumestrol son relevantes dada la capacidad de unión de estos fitoestrógenos a los receptores de estrógenos. Por lo que pueden ser utilizados como biomarcadores de su consumo en estudios epidemiológicos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Valentin-Blasini, L., et al., *Urinary and serum concentrations of seven phytoestrogens in a human reference population subset*. J Expo Anal Environ Epidemiol, 2003. **13**(4): p. 276-282.
2. Valentin-Blasini, L., et al., *HPLC-MS/MS method for the measurement of seven phytoestrogens in human serum and urine*. J Expo Anal Environ Epidemiol, 2000. **10**(6): p. 799-807.
3. Kurzer, M.S., *Hormonal effects of soy in premenopausal women and men*. J Nutr, 2002. **132**(3): p. 570S-573S.
4. Moutsatsou, P., *The spectrum of phytoestrogens in nature: our knowledge is expanding*. Hormones, 2007. **6**(3): p. 173-193.
5. Mazur, W. and H. Adlercreutz, *Naturally occurring oestrogens in food*. Pure Appl Chem, 1998. **70**(9): p. 1759-1776.
6. Galvan-Portillo, M.V., et al., *Assessing phytochemical intake in a group of Mexican women*. Salud Publica Mex, 2007. **49**(2): p. 126-131.
7. Torres-Sanchez, L., et al., *Dietary consumption of phytochemicals and breast cancer risk in Mexican women* Public Health Nutrition, 2008. **12**(6): p. 825-831.
8. Ritchie, M.R., et al., *Plasma and urinary phyto-oestrogens as biomarkers of intake: validation by duplicate diet analysis*. Br J Nutr, 2004. **91**(3): p. 447-457.
9. Frankenfeld, C.L., et al., *Validation of a soy food-frequency questionnaire and evaluation of correlates of plasma isoflavone concentrations in postmenopausal women*. Am J Clin Nutr, 2003. **77**(3): p. 674-680.
10. Wu, A.H., et al., *Plasma isoflavone levels versus self-reported soy isoflavone levels in Asian-American women in Los Angeles County*. Carcinogenesis, 2004. **25**(1): p. 77-81.
11. Joshi, J.V., et al., *Plasma levels of genistein following a single dose of soy extract capsule in Indian women*. Indian J Med Res, 2007. **125**(4): p. 534-541.
12. Setchell, K.D.R., *Phytoestrogens: the biochemistry, physiology, and implications for human health of soy isoflavones*. Am J Clin Nutr, 1998. **68**(6): p. 1333S-1346S.
13. Milder, I.E.J., et al., *Relation between plasma enterodiol and enterolactone and dietary intake of lignans in a Dutch endoscopy-based population*. J Nutr, 2007. **137**(5): p. 1266-1271.
14. Morton, M.S., et al., *Phytoestrogen concentrations in serum from Japanese men and women over forty years of age*. J Nutr, 2002. **132**(10): p. 3168-3171.
15. Prasain, J.K., et al., *Simultaneous determination of 11 phytoestrogens in human serum using a 2 min liquid chromatography/tandem mass spectrometry method*. Journal of Chromatography B, 2010. **878**: p. 994-1002.
16. Knust, U., et al., *Analysis of enterolignan glucuronides in serum and urine by HPLC-ESI-MS*. Food Chem Toxicol, 2006. **44**(7): p. 1038-1049.
17. Wyns, C., et al., *Development of a high-throughput LC/APCI-MS method for the determination of thirteen phytoestrogens including gut microbial metabolites in human urine and serum*. Journal of Chromatography B, 2010. **878**: p. 949-956.
18. Limer, J.L. and V. Speirs, *Phyto-oestrogens and breast cancer chemoprevention*. Breast Cancer Research, 2004. **6**(3): p. 119-127.

19. Grace, P.B., et al., *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 Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2004. **13**(5): p. 698-708.
20. den Tonkelaar, I., et al., *Urinary phytoestrogens and postmenopausal breast cancer risk*. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2001. **10**(3): p. 223-228.
21. Duffy, C., K. Perez, and A. Partridge, *Implications of phytoestrogen intake for breast cancer*. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*, 2007. **57**(5): p. 260-277.
22. Mense, S.M., et al., *Phytoestrogens and breast cancer prevention: Possible mechanisms of action*. *Environ Health Perspect*, 2008. **116**(4): p. 426-433.
23. Kurzer, M.S. and X. Xu, *Dietary Phytoestrogens*. *Annual Review of Nutrition* 1997. **17**: p. 353-81.
24. Ross, J.A. and C.M. Kasum, *Dietary flavonoids: Bioavailability, metabolic effects, and safety*. *Annual Review of Nutrition*, 2002. **22**: p. 19-34.
25. Androusoyopoulos, V., et al., *Bioactivation of the phytoestrogen diosmetin by CYP1 cytochromes P450*. *Cancer letters*, 2009. **274**(1): p. 54-60.
26. Dixon, R.A., *Phytoestrogens*. 1040-2519, 2004. **55**: p. 225-261.
27. Noroozi, M., et al., *Prediction of dietary flavonol consumption from fasting plasma concentration or urinary excretion*. *Eur J Clin Nutr*, 2000. **54**(2): p. 143-149.
28. Nielsen, S.E., et al., *Flavonoids in human urine as biomarkers for intake of fruits and vegetables*. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2002. **11**(5): p. 459-466.
29. Harborne, J.B., H. Baxter, and G.P. Moss, *Phenolics in Phytochemical Dictionary A Handbook of Active Compounds from Plants*, J.B. Harborne, H. Baxter, and G.P. Moss, Editors. 1999, Taylor & Francis. p. 359-602
30. Coward, L., et al., *Chemical modification of isoflavones in soyfoods during cooking and processing*. *The American Journal of Clinical Nutrition* 1998. **68**: p. 1486S-91S.
31. Bickoff, E.M., *Studies on the Chemical and Biological Properties of Coumestrol and Related Compounds*. 1969: U.S. Agricultural Research Service.
32. Saarinen, N.M., et al., *Role of dietary lignans in the reduction of breast cancer risk*. 1613-4125, 2007. **51**(7): p. 857-866.
33. Lampe, J.W., *Isoflavonoid and lignan phytoestrogens as dietary biomarkers*. *J Nutr*, 2003. **133**(9): p. 2920-2920.
34. Kilkkinen, A., et al., *Determinants of serum enterolactone concentration*. *Am J Clin Nutr*, 2001. **73**(6): p. 1094-1100.
35. Eliés-Gómez, J., *Efectos de los isómeros del resveratrol sobre la homeostasis del calcio y del óxido nítrico en células vasculares*. 2009, Universidad Santiago de Compostela.
36. Bowers, J.L., et al., *Resveratrol acts as a mixed agonist/antagonist for estrogen receptors alpha and beta*. *Endocrinology*, 2000. **141**(10): p. 3657.
37. Labinskyy, N., et al., *Vascular dysfunction in aging: Potential effects of resveratrol, an anti-inflammatory phytoestrogen*. *Curr Med Chem*, 2006. **13**(9): p. 989-996.
38. Versari, A., et al., *Stilbene compounds and stilbene synthase expression during ripening, wilting, and UV treatment in grape cv. Corvina*. *J Agric Food Chem*, 2001. **49**(11): p. 5531-6.
39. Woods, H. and I. Hughes, *Phytoestrogens and health*. 2003, Food Standards Agency.

40. Ozasa, K., et al., *Association of serum phytoestrogen concentration and dietary habits in a sample set of the JACC study*. J Epidemiol, 2005. **15**: p. S196-S202.
41. Adlercreutz, H., *Phyto-oestrogens and cancer*. Lancet Oncology, 2002. **3**: p. 364-73.
42. Adlercreutz, H., et al., *Effect of dietary components, including lignans and phytoestrogens, on enterohepatic circulation and liver metabolism of estrogens and on sex hormone binding globulin (SHBG)*. J Steroid Biochem, 1987. **27**(4-6): p. 1135-1144.
43. Setchell, K.D.R., et al., *Bioavailability, disposition, and dose-response effects of soy isoflavones when consumed by healthy women at physiologically typical dietary intakes*. J Nutr, 2003. **133**(4): p. 1027-1035.
44. Kuiper, G., et al., *Interaction of estrogenic chemicals and phytoestrogens with estrogen receptor beta*. Endocrinology, 1998. **139**(10): p. 4252-4263.
45. Kuiper, G.G., et al., *Comparison of the Ligand Binding Specificity and Transcript Tissue Distribution of Estrogen Receptors α and β* . Endocrinology, 1997. **138**(3): p. 863-870.
46. Rice, S. and S.A. Whitehead, *Phytoestrogens and breast cancer - promoters or protectors?* Endocrine-Related Cancer, 2006. **13**(4): p. 995-1015.
47. Usui, T., *Pharmaceutical prospects of phytoestrogens*. Endocrine Journal, 2006. **53**(1): p. 7 - 20
48. Navarro, M., *Mecanismo de acción de las isoflavonas*. Ginecología y Obstetricia Clínica, 2005. **6**(3): p. 159-65.
49. Tham, D.M., C.D. Gardner, and W.L. Haskell, *Potential health benefits of dietary phytoestrogens: a review of the clinical, epidemiological, and mechanistic evidence*. J Clin Endocrinol Metab, 1998. **83**(7): p. 2223.
50. Mueller, S.O., et al., *Phytoestrogens and their human metabolites show distinct agonistic and antagonistic properties on estrogen receptor α (ER α) and ER β in human cells*. Toxicol Sci, 2004. **80**(1): p. 14-25.
51. Hughes, I., et al., *Phytoestrogens and health*. London, UK: Food Standards Agency, 2003.
52. Chan, M.Y., et al., *Oestrogen receptor is required for biochanin A-induced apolipoprotein A-1 mRNA expression in HepG2 cells*. Br J Nutr, 2007. **98**(03): p. 534-539.
53. Bhatena, S.J. and M.T. Velasquez, *Beneficial role of dietary phytoestrogens in obesity and diabetes*. Am J Clin Nutr, 2002. **76**(6): p. 1191-1201.
54. Setchell, K.D.R. and A. Cassidy, *Dietary isoflavones: Biological effects and relevance to human health*. J Nutr, 1999. **129**(3): p. 758S-767S.
55. This, P., et al., *Phytoestrogens after breast cancer*. Endocrine-Related Cancer, 2001. **8**(2): p. 129-134.
56. Sirtori, C., A. Arnoldi, and S. Johnson, *Phytoestrogens: end of a tale?* Annals of medicine, 2005. **37**(6): p. 423-438.
57. Setchell, K.D.R., N.M. Brown, and E. Lydeking-Olsen, *The clinical importance of the metabolite equol—a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones*. the Journal of Nutrition, 2002. **132**(12): p. 3577.
58. Benvenuto, R. and J. Garay, *Los fitoestrógenos: ¿alternativa a la TRH en climaterio?* Fronteras en Obstetricia y Ginecología, 2002. **2**: p. 49-60.
59. Zimmet, P., K. Alberti, and M. Serrano, *Una nueva definición mundial del síndrome metabólico propuesta por la Federación Internacional de Diabetes: fundamento y resultados*. Rev Esp Cardiol, 2005. **58**(12): p. 1371-6.

60. de Kleijn, M.J.J., et al., *Intake of dietary phytoestrogens is low in postmenopausal women in the United States: The Framingham Study*. J Nutr, 2001. **131**(6): p. 1826-1832.
61. Paoletti, T., et al., *Anti-inflammatory and vascularprotective properties of 8-prenylapigenin*. Eur J Pharmacol, 2009. **620**(1-3): p. 120-130.
62. Lin, J. and S. Tsai, *Chemoprevention of cancer and cardiovascular disease by resveratrol*. Proc. Natl. Sci. Counc. ROC (B), 1999. **23**(3): p. 99-106.
63. Wroblewski Lissin, L. and J.P. Cooke, *Phytoestrogens and cardiovascular health*. Journal of the American College of Cardiology, 2000. **35**(6): p. 1403-1410.
64. Arora, A., M.G. Nair, and G.M. Strasburg, *Antioxidant activities of isoflavones and their biological metabolites in a liposomal system*. Archives of biochemistry and biophysics, 1998. **356**(2): p. 133-141.
65. Wilson, T., et al., *Antioxidant effects of phyto- and synthetic-estrogens on cupric ion-induced oxidation of human low-density lipoproteins in vitro*. Life Sci, 2002. **70**(19): p. 2287-2297.
66. Wei, H., et al. *Antioxidant and antipromotional effects of the soybean isoflavone genistein*. 1995.
67. Weaver, C.M. and J.M.K. Cheong, *Soy isoflavones and bone health: The relationship is still unclear*. J Nutr, 2005. **135**(5): p. 1243-1247.
68. Legette, L.L., et al., *Supplemental Dietary Racemic Equol Has Modest Benefits to Bone but Has Mild Uterotropic Activity in Ovariectomized Rats*. J Nutr, 2009. **139**(10): p. 1908-1913.
69. Lee, Y.S., X. Chen, and J.J.B. Anderson, *Physiological concentrations of genistein stimulate the proliferation and protect against free radical-induced oxidative damage of MC3T3-E1 osteoblast-like cells*. Nutrition Research, 2001. **21**(9): p. 1287-1298.
70. Rassi, C.M., et al., *Down Regulation of Osteoclast Differentiation by Daidzein via Caspase 3*. J Bone Miner Res, 2002. **17**(4): p. 630-638.
71. Notoya, M., et al., *Quercetin, a flavonoid, inhibits the proliferation, differentiation, and mineralization of osteoblasts in vitro*. Eur J Pharmacol, 2004. **485**(1-3): p. 89-96.
72. Bulzomi, P., et al., *Naringenin and 17 estradiol coadministration prevents hormone induced human cancer cell growth*. IUBMB life, 2010. **62**(1): p. 51-60.
73. Virk-Baker, M.K., T.R. Nagy, and S. Barnes, *Role of phytoestrogens in cancer therapy*. Planta Med, 2010. **76**(11): p. 1132-1142.
74. Adlercreutz, H., *Phytoestrogens: Epidemiology and a Possible Role in Cancer Protection*. Environ Health Perspect, 1995. **103**(7): p. 103-112.
75. Sakamoto, T., et al., *Effects of diverse dietary phytoestrogens on cell growth, cell cycle and apoptosis in estrogen-receptor-positive breast cancer cells*. The Journal of Nutritional Biochemistry, 2010. **21**(9): p. 856-864.
76. Zhou, N., et al., *Genistein Inhibition of Topoisomerase II Expression Participated by Sp1 and Sp3 in HeLa Cell*. International Journal of Molecular Sciences, 2009. **10**(7): p. 3255-3268.
77. Fink, B.N., et al., *Dietary flavonoid intake and breast cancer survival among women on long island*. Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention, 2007. **16**(11): p. 2285-2292.

78. Goodman, M.T., et al., *Urinary Phytoestrogen Excretion and Postmenopausal Breast Cancer Risk: The Multiethnic Cohort Study*. *Cancer Prevention Research*, 2009. **2**(10): p. 887-894.
79. Wild, C., et al., *A critical evaluation of the application of biomarkers in epidemiological studies on diet and health*. *Br J Nutr*, 2001. **86**(S1): p. S37-S53.
80. Spencer, J.P.E., et al., *Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research*. *Br J Nutr*, 2008. **99**(1): p. 12.
81. Kano, M., et al., *Bioavailability of isoflavones after ingestion of soy beverages in healthy adults*. *J Nutr*, 2006. **136**(9): p. 2291-2296.
82. Lu, L.J.W. and K.E. Anderson, *Sex and long-term soy diets affect the metabolism and excretion of soy isoflavones in humans*. *Am J Clin Nutr*, 1998. **68**(6): p. 1500S-1504S.
83. Bhakta, D., et al., *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): p. 116-123.
84. Bingham, S.A., *Biomarkers in nutritional epidemiology*. *Public Health Nutrition*, 2002. **5**(6A): p. 821-828.
85. Torres-Sánchez, L., et al., *Dieta y cáncer de mama en Latinoamérica*. *Salud Publica Mex*, 2009. **51**(2): p. s181-s190.
86. Yamamoto, S., et al., *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): p. 2741-2747.
87. Cajaraville, M.P., et al., *The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach*. *The Science of the total environment*, 2000. **247**(2-3): p. 295-311.
88. Lauwerys, R.R. and P. Hoet, *Industrial chemical exposure: guidelines for biological monitoring*. 2001: CRC.
89. Repetto, M. and G. Repetto, *Toxicología Fundamental* ed. C. Edición. 2009: Díaz de Santos
90. Grace, P.B., et al., *High throughput quantification of phytoestrogens in human urine and serum using liquid chromatography/tandem mass spectrometry (LC-MS/MS)*. *Journal of Chromatography B*, 2007. **853**: p. 138-146.
91. Cao, J., et al., *The relationship between fasting plasma concentrations of selected flavonoids and their ordinary dietary intake*. *Br J Nutr*, 2009. **103**(02): p. 249-255.
92. Manach, C., et al., *Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. I. Review of 97 bioavailability studies*. *Am J Clin Nutr*, 2005. **81**(1): p. 230S-242S.
93. Horner, N.K., et al., *Dietary determinants of plasma enterolactone*. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2002. **11**(1): p. 121-126.
94. Kilkkinen, A., et al., *Intake of lignans is associated with serum enterolactone concentration in Finnish men and women*. *J Nutr*, 2003. **133**(6): p. 1830-1833.
95. Bobe, G., et al., *Flavonoid intake and risk of pancreatic cancer in male smokers (Finland)*. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2008. **17**(3): p. 553-562.
96. Cao, Y., et al., *Isoflavones in urine, saliva, and blood of infants: data from a pilot study on the estrogenic activity of soy formula*. *Journal of Exposure Science and Environmental Epidemiology*, 2009. **19**(2): p. 223-234.

97. Zeleniuch-Jacquotte, A., et al., *Reliability of serum measurements of lignans and isoflavonoid phytoestrogens over a two-year period*. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 1998. **7**(10): p. 885-889.
98. Hedlund, T.E., et al., *Long-term dietary habits affect soy isoflavone metabolism and accumulation in prostatic fluid in Caucasian men*. *J Nutr*, 2005. **135**(6): p. 1400-1406.
99. Owen, R.W., et al., *Identification of lignans as major components in the phenolic fraction of olive oil*. *Clin Chem*, 2000. **46**(7): p. 976-988.
100. Wu, A.H., et al., *Epidemiology of soy exposures and breast cancer risk*. *Br J Cancer*, 2008. **98**(1): p. 9-14.
101. Peeters, P.H.M., et al., *Variations in plasma phytoestrogen concentrations in European adults*. *J Nutr*, 2007. **137**(5): p. 1294-1300.
102. Valentin-Blasini, L., et al., *Urinary phytoestrogen concentrations in the U. S. population (1999-2000)*. *J Expo Anal Environ Epidemiol*, 2005. **15**(6): p. 509-523.
103. Hughes, R.J., et al., *A tandem mass spectrometric study of selected characteristic flavonoids*. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2001. **210**(1-3): p. 371-385.
104. Falk, R.T., et al., *Reproducibility and validity of radioimmunoassays for urinary hormones and metabolites in pre- and postmenopausal women*. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 1999. **8**(6): p. 567-577.
105. Hampl, R., et al., *Radioimmunoassay analysis of phytoestrogens of isoflavonoid series*. *Chemicke Listy*, 1998. **92**(1): p. 44-50.
106. Stumpf, K., et al., *Changes in serum enterolactone, genistein, and daidzein in a dietary intervention study in Finland*. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2000. **9**(12): p. 1369-1372.
107. Pietinen, P., et al., *Serum enterolactone and risk of breast cancer: A case-control study in eastern Finland*. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*, 2001. **10**(4): p. 339-344.
108. Milder, I.E.J., et al., *Optimization of a liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for quantification of the plant lignans secoisolariciresinol, matairesinol, lariciresinol, and pinoresinol in foods*. *J Agric Food Chem*, 2004. **52**(15): p. 4643-4651.
109. March, R.E., et al., *High-energy and low-energy collision-induced dissociation of protonated flavonoids generated by MALDI and by electrospray ionization*. *International Journal of Mass Spectrometry*, 2007. **262**(1-2): p. 51-66.
110. CDC, *Phytoestrogens in Urine in NHANES 1999-2000*. 2000, Environmental Health
111. FDA, U.S., *Guidance for industry: bioanalytical method validation*. Rockville, MD: CDER, 2001.
112. Marcano, D. and M. Hasegawa, *Fitoquímica orgánica*. 2° ed. Colección Estudios ed. U.C.d. Venezuela. 2002: Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico.
113. Kuhnle, G.G.C., et al., *Extraction and quantification of phytoestrogens in foods using automated solid-phase extraction and LC/MS/MS*. *Anal Chem*, 2007. **79**(23): p. 9234-9239.
114. Coward, L., et al., *Analysis of plasma isoflavones by reversed-phase HPLC-multiple reaction ion monitoring-mass spectrometry*. *Clin Chim Acta*, 1996. **247**(1-2): p. 121-142.

115. Freiser, H. and Q. Jiang, *Optimization of the enzymatic hydrolysis and analysis of plasma conjugated [gamma]-CEHC and sulfated long-chain carboxychromanols, metabolites of vitamin E*. Analytical biochemistry, 2009. **388**(2): p. 260-265.
116. Sigma-Aldrich, *Guide to Solid Phase Extraction* 1998. p. 1-12
117. Teijón-Rivera, J.M., J.M. Teijón, and C. López-Tejón, *Bioquímica estructural*. 2001: Editorial Tébar.
118. De Rijke, E., et al., *Liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization and electrospray ionization mass spectrometry of flavonoids with triple-quadrupole and ion-trap instruments*. J Chromatogr A, 2003. **984**(1): p. 45-58.
119. Doerge, D.R., et al., *Analysis of soy isoflavone conjugation in vitro and in human blood using liquid chromatography-mass spectrometry*. 0090-9556, 2000. **28**(3): p. 298.
120. Yasuda, S., et al., *Simultaneous determination of isoflavones and bisphenol a in rat serum by high-performance liquid chromatography coupled with coulometric array detection*. Bioscience Biotechnology and Biochemistry, 2004. **68**(1): p. 51-58.
121. Franke, A.A., et al., *Liquid chromatographic-photodiode array mass spectrometric analysis of dietary phytoestrogens from human urine and blood*. Journal of Chromatography B, 2002. **777**(1-2): p. 45-59.
122. Kuijsten, A., et al., *A validated method for the quantification of enterodiol and enterolactone in plasma using isotope dilution liquid chromatography with tandem mass spectrometry*. Journal of Chromatography B, 2005. **822**: p. 178-184.
123. Franke, A.A. and L.J. Custer, *High-performance liquid chromatographic assay of isoflavonoids and coumestrol from human urine*. Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications, 1994. **662**(1): p. 47-60.
124. Gilbert, J., *Applications of mass spectrometry in food science*. 1987: Elsevier Applied Science.
125. Koller, E. and O.S. Wolfbeis, *Syntheses and spectral properties of longwave absorbing and fluorescing substrates for the direct and continuous kinetic assay of carboxylesterases, phosphatases, and sulfatases*. Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly, 1985. **116**(1): p. 65-75.
126. Al-Kady, A.S., et al., *Kinetics of catalyzed hydrolysis of 4-methylumbelliferyl caprylate (MUCAP) salmonella reagent*. Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy, 2011.
127. Taylor, J.I., P.B. Grace, and S.A. Bingham, *Optimization of conditions for the enzymatic hydrolysis of phytoestrogen conjugates in urine and plasma*. Analytical biochemistry, 2005. **341**(2): p. 220-229.
128. Grace, P.B. and P. Teale, *Purification of the crude solution from Helix pomatia for use as [beta]-glucuronidase and aryl sulfatase in phytoestrogen assays*. Journal of Chromatography B, 2006. **832**(1): p. 158-161.
129. Wang, C.C., J.K. Prasain, and S. Barnes, *Review of the methods used in the determination of phytoestrogens*. Journal of Chromatography B, 2002. **777**(1-2): p. 3-28.
130. Shamah-Levy, T., S. Villalpando-Hernández, and J. Rivera-Dommarco, *Resultados de Nutrición de la ENSANUT 2006*. Instituto Nacional de Salud Pública, 2007.
131. INEGI, *Censo de Población y Vivienda*. 2010.

132. Ortega, M. and M. Valencia, *Measuring the intakes of foods and nutrients of marginal populations in North-west Mexico*. Public Health Nutrition, 2002. **5**(6a): p. 907-910.
133. Radtke, J., J. Linseisen, and G. Wolfram, *Fasting plasma concentrations of selected flavonoids as markers of their ordinary dietary intake*. Eur J Nutr, 2002. **41**(5): p. 203-209.
134. Erlund, I., et al., *Plasma concentrations of the flavonoids hesperetin, naringenin and quercetin in human subjects following their habitual diets, and diets high or low in fruit and vegetables*. Eur J Clin Nutr, 2002. **56**(9): p. 891.
135. Arai, Y., et al., *Comparison of isoflavones among dietary intake, plasma concentration and urinary excretion for accurate estimation of phytoestrogen intake*. Journal of epidemiology/Japan Epidemiological Association, 2000. **10**(2): p. 127.
136. Fraser, G.E., et al., *Reliability of serum and urinary isoflavone estimates*. 1354-750X, 2010. **15**(2): p. 135-139.
137. Bolca, S., et al., *Microbial and Dietary Factors Are Associated with the Equol Producer Phenotype in Healthy Postmenopausal Women*. J Nutr, 2007. **137**: p. 2242-2246.
138. Kuhnle, G.G.C., et al., *Phytoestrogen Content of Foods of Animal Origin: Dairy Products, Eggs, Meat, Fish, and Seafood*. J Agric Food Chem, 2008. **56**(21): p. 10099-10104.
139. Setchell, K.D.R. and C. Clerici, *Equol: history, chemistry, and formation*. The Journal of nutrition, 2010. **140**(7): p. 1355S-1362S.
140. INEGI, *Encuesta Nacional de Ingresos y Gastos del los Hogares 2010* 2011.
141. INEGI, *Encuesta Nacional de Ingresos y Gastos de los Hogares 2005*.
142. Thompson, L.U., et al., *Phytoestrogen content of foods consumed in Canada, including isoflavones, lignans, and coumestrol*. Nutrition and Cancer-an International Journal, 2006. **54**(2): p. 184-201.
143. Bhakta, D., et al., *Phyto-oestrogen intake and plasma concentrations in South Asian and native British women resident in England*. Br J Nutr, 2006. **95**(6): p. 1150-1158.
144. Boker, L.K., et al., *Intake of dietary phytoestrogens by Dutch women*. the Journal of Nutrition, 2002. **132**(6): p. 1319.
145. Kay, C.D., *The future of flavonoid research*. Br J Nutr, 2010. **104**(S3): p. S91-S95.
146. Marshall, J.R., *Methodologic and statistical considerations regarding use of biomarkers of nutritional exposure in epidemiology*. The Journal of nutrition, 2003. **133**(3): p. 881S.
147. Kuijsten, A., et al., *Pharmacokinetics of Enterolignans in Healthy Men and Women Consuming a Single Dose of Secoisolariciresinol Diglucoside*. J Nutr, 2005. **135**: p. 795 - 801.

LIMITACIONES Y FORTALEZAS DEL ESTUDIO

Una de las limitaciones del estudio fue la aplicación de sólo un recordatorio de 24 h para determinar el consumo de fitoestrógenos. Otra de las limitaciones fue la falta de información del contenido de los fitoestrógenos en algunos de los alimentos, principalmente de los regionales. Asimismo, las tablas de composición de alimentos contienen información incompleta de la concentración de fitoestrógenos. Además, los métodos de análisis de fitoestrógenos en alimentos no son homogéneos por lo que se presentan variaciones en el contenido de los fitoestrógenos.

Una de las fortalezas del estudio fue el método de análisis de fitoestrógenos en suero. Éste cuantifica un gran número de fitoestrógenos en un tiempo relativamente corto, por lo que puede aplicarse en estudios epidemiológicos. Además, presentó una alta sensibilidad y selectividad. Otra fortaleza fue el diseño del muestreo, lo que permitió contar con una muestra heterogénea y representativa de la población.