



Efecto Fitoestrogénico del Extracto Metanólico de Frutos de *Prosopis torquata* (Cav. ex Lag.) en Ratas Wistar Hembras Púberes

Mirta CARRASCO ^{1*}, Adriana P. SALINAS ¹, Antonio M. MANGIONE ² & Esteban R. GIL ¹

¹ Departamento de Bioquímica y Ciencias Biológicas.
Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia. UNSL.
Chacabuco y Pedernera, (5700) San Luis. Argentina.

² Área de Ecología. Departamento de Bioquímica y Ciencias Biológicas.
Universidad Nacional de San Luis. Instituto Multidisciplinario de Investigaciones Biológicas (IMIBIO).
Centro Científico y Tecnológico San Luis. Ejército de Los Andes 950, (5700) San Luis, Argentina.

RESUMEN. Los fitoestrógenos, compuestos de estructura química diversa, actúan sobre la función reproductiva de los mamíferos. Se investigaron los efectos del extracto metanólico (ExM) de frutos de *Prosopis torquata* sobre las funciones reproductivas de la rata Wistar hembra, inyectadas en el período neonatal. Las crías fueron distribuidas al azar en cuatro grupos. Tres grupos, alimentados con dieta libre de fitoestrógenos, fueron inyectados con ExM, E (estradiol) y vehículo (Clf), respectivamente; el restante fue alimentado con alimento comercial (Cf) e inyectado con vehículo. Se midieron: tiempo hasta apertura vaginal y valores séricos de progesterona, hormona luteinizante y estradiol. Se estudió además la histología de los ovarios. Las hembras de ExM mostraron apertura vaginal más temprana que las del grupo Clf, pero no difirieron de Cf. Los ovarios respondieron diferencialmente a los tratamientos. El ExM, actúa como disruptor endocrino, alterando el ciclo estral de la rata, debido a la posible presencia de fitoestrógenos.

SUMMARY. "Phytoestrogenic Effect of the Methanolic Extract of *Prosopis torquata* (Cav. ex Lag.) Fruits in Pubertal Female Wistar Rats". Phytoestrogens are a chemically diverse group of compounds, with impact on the reproductive function of mammals. In this study the effects, of the methanolic extract (ExM) of fruits of *Prosopis torquata* on the reproductive functions of female Wistar rats, were studied by injection of ExM to neonates. Pups were distributed randomly among four groups. Three of them, fed with a phytoestrogen free diet, were injected with ExM, E (Estradiol) and vehicle (Clf) respectively and the other fed with a commercial diet (Cf) was injected with vehicle. Time to vaginal opening, serum levels of progesterone, luteinizing hormone and estradiol, were measured. Ovary histology was also studied. Females on ExM, showed an earlier vagina opening compared to Clf, but it did not differ with Cf. Ovaries, responded to treatments. The ExM acts as a natural endocrine disruptor affecting the estrous cycle of female rats, due to the possible presence of phytoestrogens.

INTRODUCCIÓN

Los fitoestrógenos son compuestos naturales no esteroideos que se encuentran presentes en una amplia variedad de plantas ^{1,2}. Numerosos estudios indican que los fitoestrógenos ejercen tanto efectos beneficiosos como adversos sobre la fisiología reproductiva de los animales ^{3,4}. Algunos de los efectos beneficiosos se observaron en la regulación del ciclo reproductivo de conejos y ratones de campo ^{5,6}, y en la terapia de reemplazo hormonal en mujeres menopáusicas, en el cáncer de mama y en el tratamiento de los desórdenes metabólicos ⁷⁻¹². Entre los efectos

adversos se incluyen infertilidad, persistente cornificación vaginal, aparición de folículos ováricos hemorrágicos, apertura vaginal temprana y partos prematuros. Dichos efectos se han observado en ovejas que forrajearon *Trifolium subterraneum*, especie de trébol rica en isoflavonas (formononeteína), produciéndoles una severa disminución de la tasa de nacimientos ¹³; también en *Microtus montanus*, roedor que requiere del fenol 6 metoxi benzoxazolinona (MBOA) para estimular su ciclo reproductivo ¹⁴.

Los fitoestrógenos consumidos en la dieta materna durante la preñez están presentes en el

PALABRAS CLAVE: Extracto metanólico, Fitoestrógenos, *Prosopis torquata*, Ratas Wistar.

KEY WORDS: Methanolic extract, Phytoestrogens, *Prosopis torquata*, Wistar rats.

* Autor a quien debe dirigirse la correspondencia. E. mail: mcarras@unsl.edu.ar

líquido amniótico formando parte del ambiente del feto humano a partir del segundo trimestre del embarazo y debido a que el neonato es más susceptible que los adultos a las variaciones en los niveles de hormonas sexuales en el medio, estos compuestos pueden afectar las funciones de los tejidos blancos en la vida adulta. Además, los fitoestrógenos son transferidos a través de la leche materna al recién nacido, presentando un alto riesgo en tejidos inmaduros sensibles a estrógeno, tal como el desarrollo del tracto reproductivo¹⁵. Normalmente, la diferenciación sexual de la rata en la función cerebral, ocurre durante el período perinatal. Tanto la ciclicidad estral como el comportamiento sexual son controlados por el hipotálamo: área preóptica para la primera y núcleo hipotalámico ventromedial y el septum para la segunda función^{16,17}.

La exposición neonatal a fitoestrógenos como genisteína y cumestrol, que mimetizan la acción de estrógenos, provocan alteración en el tiempo de destete, en la distancia anogenital y en el inicio de la pubertad además, de un aumento en el tamaño del núcleo dimórfico preóptico en la zona del hipotálamo y alteración en la respuesta pituitaria a la GnRh^{16,18}. Estos compuestos adelantan la maduración hipotalámica al actuar como disruptores endocrinos¹⁹.

Los fitoestrógenos más estudiados son las isoflavonas, los cuales son compuestos difenólicos ampliamente presentes en la familia de las fabáceas^{1,2,8,20-22}. *Prosopis* es un género de la familia Fabaceae que se encuentra ampliamente distribuido en América. La mayoría de las especies del género son nativas, 35 de ellas concentradas en América del Sur y sólo nueve en América del Norte²². Una de las especies del género es *P. torquata* (Cav. ex Lag.) DC, utilizada eventualmente en la alimentación ya que posee frutos de gran valor nutritivo aunque esta característica no es aprovechada por algunos animales en razón de su baja digestibilidad²⁴. Las plantas del género *Prosopis* son conocidas por su valor medicinal y esta característica se encuentra asociada a la presencia de flavonoides entre otros metabolitos secundarios²⁵⁻²⁷. Algunos de ellos, con actividad fitoestrogénica, han sido documentados para *P. alba* y *P. flexuosa*^{28,29} especies simpátricas a *P. torquata*, pero sobre esta última no existen estudios al respecto.

El objetivo de este estudio fue investigar la acción estrogénomimica del extracto metanólico de frutos de *Prosopis torquata* en el sistema reproductor de ratas Wistar hembras púberes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Recolección del material

Los frutos de *P. torquata* fueron colectados del suelo durante la estación seca (invierno), debido a que éstos son los frutos disponibles para el consumo de animales. El lugar de recolección fue el Parque Nacional Sierra de las Quijadas situado en el noroeste de la provincia de San Luis, Argentina (32° 20' y 32° 47' de latitud sur y los 67° 10' y 66° 58' de longitud oeste). Esta región es un ecotono entre las Provincias Fitogeográficas del Chaco y del Monte³⁰ y constituye una de las zonas más áridas de la provincia, con precipitaciones de 250 mm anuales³¹. Un ejemplar del material vegetal se encuentra depositado en el Herbario de la Universidad Nacional de San Luis con el número #6021.

Obtención del extracto

Los frutos se colocaron en estufa a 40 °C hasta peso seco constante para luego ser pulverizados en molino de anillos hasta polvo fino. El mismo fue sometido a una extracción en frío con solventes de polaridad creciente (éter de petróleo, diclorometano, acetato de etilo y metanol). El extracto metanólico con mayor concentración de glicósidos flavonoides fue utilizado en el ensayo^{32,33}.

Animales

Se utilizaron ratas Wistar hembras procedentes del Bioterio de la Universidad Nacional de San Luis. En 30 ratas se realizaron exudados diariamente hasta estabilidad del ciclo estral. Las hembras que se encontraron en la etapa del ciclo Proestro se aparearon durante una noche, a la mañana siguiente se verificó presencia o ausencia de espermatozoides en las hembras apareadas. La presencia de espermatozoides en los exudados se consideró como el día cero de preñez. Las ratas preñadas se distribuyeron en dos grupos: I) alimentadas con dieta comercial que contiene fitoestrógenos derivados de harina de soja y II) alimentadas con dieta libre de fitoestrógenos. Inmediatamente después del nacimiento, madres y crías hembras se distribuyeron en cuatro grupos finales de la siguiente manera: los animales que provienen del grupo I continuaron con el alimento comercial, se consideraron como control positivo de la ingesta de fitoestrógeno, a los que se les administró s.c. vehículo (Cf) y los animales que provenían del grupo II se los distribuyó a su vez en 3 grupos: a) control positivo, a los que se les administró s.c.

estradiol (E), b) *control negativo*, a los que se les administró s.c. Vehículo (Clf) y c) *tratamiento* a los que se les administró s.c. extracto metanólico (ExM).

Todos los animales se mantuvieron en ambiente de luz controlada (12:12), temperatura controlada (23-25 °C) y con ingesta de alimento y agua *ad libitum*. Todos los experimentos fueron realizados de acuerdo al protocolo aprobado por el CICUA ³⁴. (Resol N°1126/08 y Resol. N°1127/08).

La dieta libre de fitoestrógenos se realizó según "Nutrient Requirements of Laboratory Animals of Institute for Laboratory Animal Research". La proteína vegetal se reemplazó por proteína de pescado. La dieta de Cf es alimento comercial Rata/Ratón, que contiene soja como suplemento del contenido proteico. Los alimentos en base a soja, contienen fitoestrógenos en cantidades biológicamente activos ³⁵⁻³⁸.

El extracto metanólico, estradiol y vehículo fueron administrados subcutáneamente a partir del tercer día de nacidas y durante 5 días (período perinatal). Al grupo ExM (n = 5) se le administró 1,7 mg/100g peso/día del extracto metanólico y al grupo E (n = 5) 2 mg de 17β-estradiol/100g peso/día (Fluka AG, CH-9470 Buchs) suspendidos en el vehículo (0.020 ml de aceite de sésamo y 0,175 ml DMSO). A los grupos Cf y Clf, se les administró solo el vehículo.

El experimento finalizó con la apertura vaginal (fin del periodo peripuberal). Todos los animales fueron sacrificados por punción cardíaca bajo anestesia. Se registró el peso del animal y el peso de los órganos reproductivos. El suero fue extraído y almacenado a -20 °C hasta la determinación de hormonas. Los ovarios fueron pesados y fijados para observar la presencia de folículos y cuerpos lúteos.

Concentración sérica de hormonas

Los niveles séricos de progesterona (P) se determinaron por RIA (Radioinmunoensayo) utilizando un anticuerpo antiprogesteroa obtenido del suero de conejo provisto por el Laboratorio de Reproducción y Lactancia de Mendoza, Argentina. El estradiol (Es) fue medido por el kit, "Ultra-sensitive estradiol RIA-DSL-4800 Diagnostic systems Laboratorios, Inc. OBI-DSL Chervell Innovation Centre, Upper Heyford, Oxon OX25 5HD UK". Los valores se expresaron en pg/ml de suero. Por último la Hormona Luteinizante (LH) fue medida por RIA utilizando un kit provisto por NIADDK de NIH. Los resultados fueron expresados en ng/ml de suero.

Estudios histológicos

Inmediatamente después del sacrificio de los animales, los ovarios fueron extraídos, pesados y fijados en formol al 10%. A continuación fueron incluidos en parafina y los cortes de 8 μm de espesor se colorearon con hematoxilina y eosina.

Análisis estadístico

Los efectos de los tratamientos (E, ExM, Cf, Clf) sobre las variables tiempo de apertura vaginal, peso corporal, niveles de hormona luteinizante, progesterona y estradiol en suero, se evaluaron mediante análisis de la varianza de una vía (ANOVA) y el Test de significancia de Tukey para determinar diferencias entre tratamientos. Valores de p menores o iguales a 0,05 fueron considerados significativos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La administración del extracto metanólico provocó una modificación en el inicio de la pubertad, evidenciado en la apertura vaginal temprana ($F_{2,19} = 21,4$, $p < 0,001$) y aparición de cuerpos lúteos siendo, esta última característica, no observable en el resto de los tratamientos. Por otro lado, existe un efecto de los tratamientos sobre la masa corporal final de las ratas, probablemente vinculado a los tiempos de permanencia en el experimento (tiempo hasta apertura vaginal) (ver Tabla 1 y Fig. 1).

La apertura vaginal promedio de las hembras del grupo ExM (Tabla 1) fue semejante al grupo Cf y la mitad que Clf, lo cual sugiere que el ExM posee compuestos con posible actividad estrogenomímica. Durante la etapa neonatal los fitoestrógenos alterarían mecanismos fisiológicos que aceleran la maduración hipotalámica lo cual se manifiesta en el adelanto de la pubertad ³. Al tener en cuenta, que las madres de las crías del grupo Clf, estuvieron alimentadas durante 40 días, desde el día cero de preñez hasta el destete, con dieta libre de fitoestrógenos, se espera que los mecanismos que regulan el inicio de la pubertad se modifiquen de tal manera que resultan en apertura vaginal tardía. Esta situación supone además, que estos animales normalmente presentan una actividad fisiológica del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas estimulada por la ingesta, durante generaciones, de fitoestrógenos presentes en la soja utilizada como suplemento proteico en el alimento comercial rata-ratón y que actuarían como disruptores endocrinos ³⁹.

La exposición a estrógenos durante los periodos críticos del desarrollo presenta numero-

Tratamiento	N° de ratas	AV (días de edad)	Peso corporal (g)	LH (ng/ml)	P (ng/ml)	E (pg/ml)
Control (Clf)	7	53,28 ± 3,45 a	105,5 ± 4,08 b	4,39 ± 0,643	66,59 ± 31,55	4,92 ± 1,51
Estradiol (E)	5	30,2 ± 0,96 b	85,26 ± 7,67 a	4,94 ± 0,370	7,423 ± 1,408	8 ± 1,56
Extracto (ExM)	5	36,4 ± 0,98 b	113 ± 3,51 b	3,644 ± 0,193	37,69 ± 15,59	4,24 ± 1,445
Alimento Comercial (Cf)	6	36,66 ± 1,03 b	92,33 ± 3,8 a,b	4,73 ± 0,46	28,79 ± 15,2	3,72 ± 1,34

Tabla 1. Efecto de la administración subcutánea, del extracto metanólico de frutos de *Prosopis torquata*, en la etapa neonatal en ratas hembras sobre la apertura vaginal (AV), peso corporal y niveles séricos de Estradiol (E), Progesterona (P) y Hormona Luteinizante (LH). Los valores representan media y un error estándar. Letras diferentes significan diferencias entre tratamientos según Test de Tukey. Ninguna de las hormonas presenta diferencias entre los tratamientos.

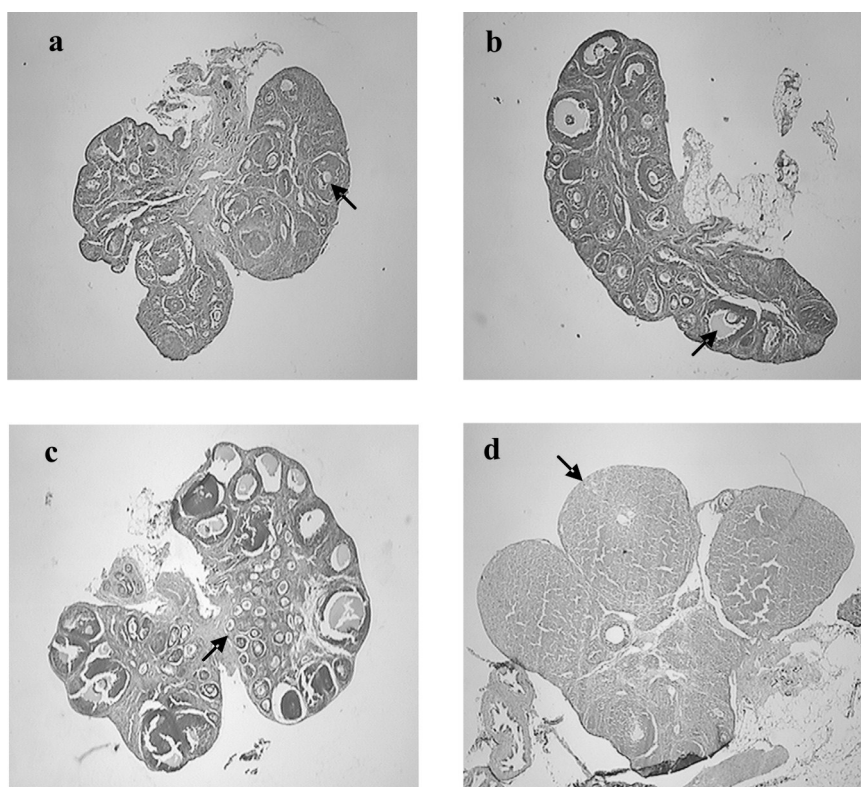


Figura 1. Fotomicrografías de cortes histológicos de ovarios de ratas que representan los distintos grupos estudiados. **a) Control**, la flecha indica presencia de folículos en los primeros estadios de su desarrollo, **b) Soja**, ovario caracterizado por un equilibrado número de folículos (flecha) en distinto estados de maduración, **c) Estradiol**, ovario con numerosos folículos en la última etapa de maduración en corteza y en la médula, folículos en los primeros estadios (flecha), **d) Extracto**, ovario con cuerpos lúteos (CL) como estructura dominante (flecha). Amplificación 100X.

sas consecuencias a largo plazo sobre el sistema reproductor de hembras y machos de numerosas especies, incluido roedores y humanos ⁴⁰. En trabajos previos, se demuestra que tanto la administración de estradiol como de fitoestrógenos en la etapa neonatal aceleran la apertura vaginal y provocan aciclicidad y baja actividad lúdica en ratas hembras ¹⁶. En este trabajo, la administración sc de 1mg de Estradiol adelantó la apertura vaginal de las hembras del grupo E, y fue significativamente menor al resto de los grupos (Tabla 1).

Compuestos con actividad estrogénica actuarían como disruptores endócrinos a través de la afinidad que presentan por los receptores de estrógeno presentes en el cerebro neonatal

modulando selectivamente las respuestas estrogénicas mediante su unión con ambos receptores de estradiol, RE α y RE β , ligándose con mayor afinidad a los primeros ^{7,9,41-47}. Además se ha comprobado que los receptores de estrógeno facilitan mecanismos que promocionan la maduración folicular desde el estado antral temprano al estado preovulatorio ⁴⁸. En el caso específico de fitoestrógenos, ratas tratadas perinatalmente con genisteína, por un lado están expuestas a altos niveles séricos de la forma aglicona de genisteína, compuesto con alta afinidad por los receptores de estrógeno y por otro, alteran la función ovárica dependiendo de la dosis, estimulándola a bajas dosis e inhibiéndola a altas dosis ³⁸.

Del análisis de los valores séricos de las hormonas sexuales y los cortes histológicos de los ovarios surge que estos valores corresponden a la fase del ciclo estral en que se encontraban los animales al momento del sacrificio ⁴⁹. Todos los valores séricos promedio de LH estuvieron por encima de 0.5 ng/ml (valor basal de referencia) y por debajo del pico máximo preovulatorio de 35-40 ng/ml (valor de referencia), que determina la etapa proestro de la fase folicular del ciclo ⁵⁰. Estos valores indicarían que las hembras se encuentran en estro de la fase folicular o en diestro de la fase luteal.

Los valores de referencia de Progesterona en el ciclo estral varían entre un valor basal de 5-10 ng/ml hasta 25-30 ng/ml en el pico preovulatorio. En el grupo Clf los valores de Progesterona encontrados (66,6 ng/ml) y la ausencia de cuerpos lúteos en el corte histológico (Fig. 1) indican etapa proestro de la fase folicular. Estos resultados junto con los valores de LH (4.4 ng/ml) y el de Estradiol (4,92 pg/ml) aunque más bajos que los esperados, confirman inicio del proestro. Sin embargo P, LH y E no difieren significativamente ($F_{3,17} = 1,24$; $p = 0,32$), ($F_{3,15} = 1,69$; $p = 0,20$) y ($F_{3,16} = 1,43$; $p = 0,27$) respectivamente, del resto de los grupos (Tabla 1).

La morfología ovárica, concuerda con la acción de fitoestrógenos. De esta manera, mientras que los ovarios de las ratas ExM, se encuentran en fase luteal, el resto se manifiesta distintas etapas de la fase folicular. Así en el grupo ExM (Fig. 1) los cuerpos lúteos ocupan una gran proporción de la masa ovárica. Mientras que en Clf existen numerosos folículos en los primeros estadios de su desarrollo. Por su lado los ovarios de las hembras del grupo E, presentan folículos en la última etapa del desarrollo y desorganización funcional debida a la migración folicular hacia la corteza del ovario, característica de la etapa folicular.

CONCLUSIONES

Con este estudio se suma evidencia sobre el efecto estrogenomímico que poseen ciertas especies de plantas. En este caso *P. torquata* no es tan ampliamente utilizada como otras especies de algarrobo ^{27,28} en Argentina, pero el efecto biológico demostrado en este trabajo, amplía su potencial uso. Estos resultados advierten la necesidad de tener en cuenta los compuestos que integran las dietas de tanto animales en condiciones silvestres, como en animales de laboratorio, que se utilizan en diseños experimentales para estudiar procesos hormonales,

especialmente, cuando a los animales controles se les suministra dietas suplementadas con soja y alfalfa ricas en fitoestrógenos.

Agradecimientos. A la Med.Vet. Glenda Panont, Pedro Arroyuelo y Manuel Arroyuelo Personal del Bioterio de la Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia de la UNSL. A la Dra Graciela Jhan del LARLAC-IMBECU CCT Mendoza. A la Familia Jofré. Este manuscrito fue enviado a publicar luego de la muerte de nuestro compañero y coautor de este trabajo Esteban Gil, entrañable colega y amigo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Labov, J.B. (1977) *Comp. Biochem. Phys. A.* **57**: 3-9.
2. Perez-Rivero, J., A. Aguilar-Setién, J. Martínez-Maya, M. Pérez-Martínez, & H. Serrano (2007) *Agr. Tec.* **67**: 325331.
3. Gallo, D., F. Santelmo, M. Distefano, C. Ferlini, G.F. Zannoni, A. Riva, P. Morazzoni, E. Bombardelli, S. Mancuso, & G. Scambia (1999) *Food Chem. Toxicol.* **37**: 493-502.
4. Rodriguez-De Lara, R., C.A. Herrera-Corredor, M. Fallas-López, R. Rangel-Santos, V. Mariscal-Aguayo, P.A. Martínez-Hernández & J.G. García-Muñiz (2007) *Anim. Reprod. Sci.* **99**: 145-155.
5. Poole, W.E. (1960) *CSIRO Wild Res.* **5**: 21-43.
6. Pinter, A.J. & N.C. Negus (1965) *Am. J. Physiol.* **208**: 633-8.
7. Beck, V., U. Rohr & A. Jungbauer (2005) *J. Steroid Biochem.* **94**: 499-518.
8. Tolleson, W.H., D.R. Doerge, M.I. Churchwell, M.M. Marques, & D.W. Roberts (2002) *J. Agr. Food. Chem.* **50**: 4783-96.
9. Burton, J. L & M. Wells (2002) *J. Clin. Pathol.* **55**: 401-7.
10. Baird, D., D. Umbach & L. Lansdell (1995) *J. Clin. Endocr. Metab.* **80**: 1685-90.
11. Christopher R. & S.N. Cederroth (2009) *Mol. Cell. Endocrinol.* **304**: 30-42.
12. Setchell K.D.R. & A. Cassidy (1999) *J. Nutr.* **129**: 758S-767S.
13. Bennetts, H. N., E.J. Underwood & F.L. Shien (1946) *Aust. J. Agr. Res.* **22**: 131-8.
14. Sanders, E. H., P. D. Gardner, P. J. Berger & N.C. Negus (1981) *Science* **214**: 67-9.
15. Hughes, C.L. (2004) *Exp. Biol. M.* **229**: 108-117.
16. Kouki, T., M. Okamoto, S. Wada, M. Kishitake & K. Yamanouchi (2005) *Brain Res. Bull.* **64**: 449-54.
17. Freeman, M.E. (1994) "The neuroendocrine control of the ovarian cycle of the rat", in "The Physiology of Reproduction", (E. Knobil, J.D. Neill, eds.) second ed. Raven Press, New York, 613-58.

18. Negus, N.C. & P.J. Berger (1977) *Science* **196**: 1230-2.
19. Herger, S & S. Ojeda (2007) "Control Puberty in rodents. Special focus on the female", in "When Puberty is precocious: scientific and clinical aspects". (O.H. Pescovitz y E.C. Walvoord, eds.) Human press Inc. Totowa, NJ., 3-33.
20. Seguin, P. & W. Zheng (2006) *J. Sci. Food Agr.* **86**: 765-71.
21. Kim, J. A., S.B. Hong, W.S. Jung, C.Y. Yu, K.H. Ma, J.G. Gwag & I.M. Chung (2007) *Food Chem.* **102**: 738-44.
22. Waffo, A.F., P.H. Coombes, D.A. Mulholland, A.E. Nkengfack & Z.T. Fomum (2006) *Phytochemistry* **67**: 459-63.
23. Simpson, B. B. & O.T. Solbrig (1977) "Mesquite, its biology in two desert scrub ecosystems". (B.B. Simpson, eds.). US/IBP Synthesis series, Dowden, Hutchinson y Ross, Inc. Pennsylvania, 1-26.
24. Mucciarelli, S. I., M.B.Molins, M.A.Lucas & C.E.Guardia (1982) *Revista A.B.A.* **46**: 1-10.
25. Vajpeyi, R., N. Shukla & K. Misra (1981) *Phytochemistry* **20**: 339-40.
26. Bhardwaj, D. K., M.S. Bisht, C.K. Metha & G.C. Sharma (1979) *Phytochemistry* **18**: 355-6.
27. Bhardwaj, D. K., M.S. Bisht, R.K. Jain & G.C. Sharma (1980) *Phytochemistry* **19**: 1269-70.
28. Gianinetto, I.B., J.L. Cabrera, J.C. Oberti & H.R. Juliani (1975) *Lloyd.* **38**: 265-7.
29. Gitelli, A. M., J.L. Gianinetto, J.L.Cabrera & H.R.Juliani (1981) *An. Assoc. Quim. Argentina* **69**: 33-6.
30. Cabrera, A.L. & A.Willink (1980) "Biogeografía de América Latina". (Programa Regional de Desarrollo Científico y Tecnológico, Dep. de Asuntos Científicos, Secretaría General de la Organización de los Estados Americanos ed.) 2º edición, Washington DC.
31. Peña Zubiarte C.A., D.L. Anderson, M.A. Demmi, J.L. Saenz & A. D'Hiriart (1998) *Carta de suelos y vegetación de la Provincia de San Luis*. Estación experimental Agropecuaria. San Luis.
32. Filho, V.C. & R.A.Yunes (1997) *Quim. Nova* **21**: 99-105.
33. Molnár-Perl, I. & Z. Füzfai (2005) *J. Chromatogr A.* **1073**: 201-27.
34. www.unsl.edu.ar. "CICUA" (Comité de cuidado y uso de animales de laboratorio). Ordenanza CD. Nº 9/06. Facultad de Química, Bioquímica y Farmacia. Universidad Nacional de San Luis.
35. Informe del Comité Científico de la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) en relación con los consumos asociados del consumo de isoflavonas Nº de referencia: AESAN 2007-002.
36. Dibb, D.W., T.L. Roberts & R.M.Welch (2005) *Informaciones Agronómicas* **28**: 1-8.
37. Kuhnle G. C., C. Dell'Aquila, S.A. Runswick, S.A.Bingham (2009) *Food Chem.* **113**: 1184-7.
38. Eldrige A.C., & W.F.Kwolek (1983) *J. Agr. Food Chem.* **31**: 394-6.
39. McCarthy Margaret. (2008) *Physiol. Rev.* **88**: 91-134.
40. Jefferson, W. N., E. Padilla Banks & R.R. Newbold (2007) *Reprod. Toxicol.* **23**: 308-16.
41. Craig Jordan, V. (1998) *Investigación y Ciencia* **267**: 16-24.
42. Casanova M., L.You, K.Gaido, S.Archibeque-Engle, D. Janszen & H. Heck (1999) *Toxicol. Sci.* **51**: 236-4.
43. Selvaraj, V., M. Zakroczymski, A. Naaz, M. Mukai, H.Young, D. Doerge, J.Katzenellenbogen, W. Helferich & P.Cooke (2004) *Biol. Reprod.* **71**: 966-972.
44. Ryökkönen A., P. Nieminen, A.M.Mustonen, T.Pyykönen, J.Asikainen, S. Hänninen, J.Mononen & J. Kukkonen (2005) *Toxicol. Appl. Pharm.* **202**: 132-139.
45. Bradbury R.B. & D.E.White (1954) *Vitam. Horm.* **12**: 207-233.
46. Baker, M. (1995) *P. Soc. Exp. Biol. Med.* **208**: 131-138.
47. Martin M. E., M. Haourigui, C. Pelissero, C.Benassayag & E.A. Nunez (1995) *Life Sci.* **58**: 429-436.
48. Uzumcu,M. & R. Zachow (2007) *Reprod. Toxicol.* **23**: 337-352.
49. Ojeda S.R. & H.F.Urbansky (1994) "Puberty in the rat". "The Physiology of Reproduction". (E. Knobil J.D. Neill, eds.) second ed. Raven Press, New York, 363- 409.
50. Smith M.S, M.E. Freeman & J.D. Neill (1975) *Endocrinology* **96**: 219-226.