



02062  
UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS

4  
2ej

EFECTO DEL LEVONORGESTREL SOBRE EL  
CONTENIDO Y LA SINTESIS DE LIPIDOS A  
PARTIR DE GLUCOSA <sup>14</sup>C EN LA GLANDULA  
SEBACEA DEL HAMSTER HEMBRA, SOLO O  
EN COMBINACION CON TESTOSTERONA

FALLA DE ORIGEN

T E S I S  
PARA OBTENER EL TITULO DE  
MAESTRO EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA  
P R E S E N T A  
MARISA CABEZA SALINAS



## **UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso**

### **DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

TESIS DE MAESTRIA.

EFFECTO DEL LEVONORGESTREL SOBRE EL CONTENIDO Y LA SINTESIS  
DE LIPIDOS A PARTIR DE GLUCOSA U  $^{14}$ C EN LA GLANDULA SEBACEA  
DEL HAMSTER HEMBRA, SOLO O EN COMBINACION CON TESTOSTERONA.

MARISA CABEZA SALINAS.

T - TESTOSTERONA (17 beta- hidroxil- 4 androsten- 3 ona)

L - LEVONORGESTREL(D (1)- 13 beta- etil- 17 beta- hidroxigon-  
4 en -3 ona)

5 $\alpha$ DHT - DIHIDROTESTOSTERONA ( 17 beta-hidroxil- 5 $\alpha$  androstan-  
3 ona)

T+L - TESTOSTERONA + LEVONORGESTREL.

TV -TRATADO CON VEHICULO

n - N° DE EXPERIMENTOS REALIZADOS.

NI - ACIDO GRASO NO IDENTIFICADO.

C<sub>12</sub> - ACIDO LAURICO.

C<sub>14</sub> - ACIDO MIRISTICO.

C<sub>16</sub> - ACIDO PALMITICO.

C<sub>16</sub><sup>=</sup> - ACIDO PALMITOLEICO.

C<sub>16</sub><sup>2=</sup> - ACIDO PALMITOLENICO.

C<sub>18</sub> - ACIDO ESTEARICO.

C<sub>18</sub><sup>=</sup> - ACIDO OLEICO.

C<sub>18</sub><sup>2=</sup> - ACIDO LINOLEICO.

C<sub>20</sub> - ACIDO ARAQUIDICO.

## INTRODUCCION:

Los órganos del flanco son estructuras sebáceas que se presentan por pares en la región dorsal del hamster dorado (Mesocricetus auratus). Al igual que otras glándulas del mismo origen en especies diferentes, es capaz de responder a hormonas sexuales (1); sin embargo los mecanismos bioquímicos involucrados en dicha respuesta no han sido descritos.

Los órganos del flanco, también conocidos como glándulas costovertebrales, miden 8 mm de diámetro en los machos y se encuentran fuertemente pigmentados y cubiertos con un pelo espeso y oscuro. En la hembra dichas estructuras miden 2 mm de diámetro, son ligeramente pigmentadas y no presentan pelos oscuros - cubriéndolas. (Fig.2)

Observan cambios morfológicos en respuesta a hormonas sexuales similares a aquellos que presentan el resto de las glándulas sebáceas. La castración de los animales machos causa una disminución de los nódulos costovertebrales la cual puede ser revertida con inyecciones subcutáneas de testosterona (2).

Inyecciones intraperitoneales de testosterona marcada isotópicamente con tritio, muestran que el metabolito que se encuentra en mayor abundancia en la glándula sebácea del hamster macho es la 5- $\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT) (3). En los animales castrados se ha observado que la captación de este metabolito disminuye después de 3 semanas, lo que se acompaña de una atrofia de la glándula y la disminución de enzimas que participan en la vía glucolítica, como la hexocinasa, fosfofructocinasa, aldolasa, gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa. También se encuentra disminuida la actividad de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa que es una enzima que participa en el ciclo de las pentosas (3). Cuando se inyectan 20 mg de testosterona (T) a los machos castrados se encuentra que la vía glucolítica se restablece ya que la glucosa  $^{14}\text{C}$  es capaz de transformarse a lactato marcado en un porcentaje mayor que cuando no se ha aplicado la T (10).

En el año de 1974, Adachi demostró la presencia de receptores a andrógenos - tanto en el citosol como en el núcleo de las glándulas sebáceas del hamster macho. La castración en estos animales disminuye la capacidad de unión de los andrógenos a su receptor. Dicha capacidad puede ser recuperada con una dosis de 20 mg de T ó de DHT.

Se ha informado (4) que la aplicación tópica de esteroides androgénicos sobre la glándula sebácea del hamster hembra causa un aumento en el diámetro de ésta y que cuando se aplican antiandrogénicos concomitantemente con esteroides androgénicos por esta vía, la acción de estos últimos puede ser inhibida. Estos datos coinciden con los de Clanachan y su grupo (5).

Por otro lado Hsia y Voigt, han demostrado que el ácido 4 androsten-3-ona 17 $\beta$  carboxílico aplicado tópicamente es un antiandrogénico que inhibe a la 5 $\alpha$  reductasa y disminuye los lípidos del citoplasma de las células de las glándulas sebáceas de los órganos del flanco tratados con testosterona (8). Existen otras sustancias como el acetato de ciproterona y el acetato de clormadinona que poseen acción antiandrogénica; sin embargo cuando estas sustancias se aplican -- junto con testosterona, la grasa intracelular no disminuye como cabría esperar (9). Para determinar la acción de estos compuestos se han llevado a cabo experimentos inyectando testosterona marcada isotópicamente in vivo por vía intraperitoneal conjuntamente con acetato de ciproterona o con otro compuesto de acción antiandrogénica conocido como R07/2340 a hamster macho. Los datos muestran que la cantidad de 5 $\alpha$  DHT marcada obtenida a partir de testosterona (T) y -- cuantificada en el núcleo de las células experimentales es similar a la cantidad de este metabolito en los núcleos de las células control, lo que indica -- que los principios activos no actúan sobre la enzima 5 $\alpha$  reductasa que convierte testosterona a su metabolito 5 $\alpha$  reducido (DHT); estos datos explican los -- hallazgos de Burdick (9) en lo que se refiere al contenido de grasa intracelular (8) cuando estos antiandrogénicos se aplican junto con la T.

Estudios in vitro (10) demuestran que estos antiandrogénicos compiten con el sitio del receptor nuclear, ya que cuando se incubaba DHT-tritiada y uno de los -- antiandrogénicos con homogenado de glándula sebácea de hamster, la formación del complejo andrógeno - receptor queda completamente inhibida; esta inhibición es dependiente de la concentración del antiandrogénico. 600  $\mu$ g de acetato de ciproterona inyectados simultáneamente con 20 mg de T a machos castrados inhiben la glucólisis aumentada por la T de 4.8% a 2.8%. El porcentaje de incorporación a lípidos según estos autores, disminuye de 0.009 a 0.007 en la tratada.

Estos experimentos demuestran que el acetato de ciproterona y el R07/2340 en altas concentraciones bloquean la unión de DHT a su receptor, sin embargo aun -- que los procesos metabólicos parecen disminuir por el tratamiento con antian-

drógenos no se bloquean completamente ya que el porcentaje de incorporación de precursores de la glucólisis a lípidos disminuye solamente en un 0.002%.

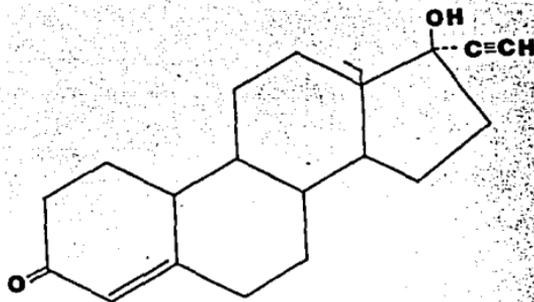
Además de los mencionados, han sido reportados varios esteroides con propiedades antiandrogénicas que inhiben la producción de sebo estimulada por andrógenos en animales (6,7,12,13,14) y en el hombre (11,15,16).

El acné una enfermedad andrógeno dependiente, que se produce cuando la cantidad de DHT aumenta en el tejido (27), ha sido tratada con algunos de los esteroides antes mencionados; sin embargo los resultados informados en la literatura son confusos y difíciles de interpretar (16,17,18,19) con excepción del D(11)-13 $\beta$ -etinil-17 $\beta$  hidroxigon-4-en 3 one (levonorgestrel-L- Fig.1) que mejora en un 90% el acné (11) cuando se aplica por vía tópica.

El levonorgestrel es una progestina sintética (20) que se utiliza como anti-conceptivo oral en combinación con el etinil estradiol. Es un compuesto que no posee actividad estrogénica (21) ni es convertido a estrógenos in vivo, no presenta efectos androgénicos, mineralocorticoides o glucocorticoides.

Estudios realizados por Fotherby (22) en humanos muestran que el levonorgestrel se absorbe a través del tracto gastrointestinal, su vida media en el plasma es de 19 a 26 horas. El L por tener la estructura  $\Delta^4$ -3 ceto en el anillo A (Fig.1) es similar a la T, por lo cual podría competir con ella como sustrato para la 5 $\alpha$  reductasa; sin embargo se ha visto que el L aplicado conjuntamente con la T al órgano del flanco del hamster hembra, disminuye el crecimiento y el contenido de gotas de grasa en el citoplasma de las células de esta glándula incrementado por la T. Cuando el L se aplica por la misma vía junto con la DHT, disminuye el crecimiento y el contenido de gotas de grasa en el citoplasma de las células incrementado por la DHT, esto indica que el L no compete con la testosterona como sustrato (6). El L posee un grupo etinilo como substituyente en la posición 17 $\alpha$ , por lo que la enzima podría no reconocerlo como sustrato, esto explicaría los resultados anteriormente descritos.

Por otro lado, ha sido reportado que la biosíntesis in vitro de lípidos a partir de glucosa aumenta en acné severo tanto en la epidermis como en la dermis (23). Este dato también ha sido observado en glándulas de prepucio de ratón-



**LEVONORGESTREL**

FIGURA 1. Molécula de levonorgestrel.



FIGURA 2. Organo del flanco de hamster hembra de 4 semanas de edad.

(26). En este tejido el aumento de la incorporación de glucosa  $^{14}\text{C}$  a lípidos se acompaña de un aumento de la oxidación de glucosa 1,2  $^{14}\text{C}$ . La marca se incorpora más rápidamente a ácidos grasos y ésteres de ceras que a triglicéridos en respuesta a la estimulación con andrógenos. La actinomicina D bloquea la lipogénesis mientras que el estradiol conjuntamente con testosterona producen un efecto mayor que esta última por separado.

Se ha informado que la cantidad de L-glicerol 3 fosfato, que se produce durante el catabolismo de la glucosa por la vía de las pentosas, juega un papel importante en la regulación de la lipogénesis en piel (24,25) lo que demuestra que la síntesis de lípidos está sujeta a regulaciones fisiológicas.

Otro componente que controla la lipogénesis en la piel es el NADPH que se forma durante el ciclo de las pentosas fosfato. Esta vía contribuye con el 60% del NADPH necesario para la lipogénesis (28,29) en tejido adiposo y con el 57% en la piel de rata, el resto del nucleótido parece ser suministrado por la enzima málica.

Algunos esteroides inhiben la actividad de la glucosa 6 fosfato deshidrogenasa (31,32,33,34) en la glándula mamaria. En piel la dehidroepiandrosterona es capaz de bloquear la formación de  $^{14}\text{CO}_2$  formado a partir de glucosa  $^{14}\text{C}$  (30). Dado que el carbono 1 de la glucosa es descarboxilado para formar  $\text{CO}_2$  por la vía de las pentosas fosfato, entonces la dehidroepiandrosterona puede inhibir la actividad de la 6 fosfogluconato deshidrogenasa (6 fosfo-D-gluconato:NADP-oxidoreductasa-descarboxilasa EC 1.1.1.4). Este esteroide también es capaz de bloquear a la 6 fosfato deshidrogenasa en piel de ratas tratadas. Como consecuencia de esto la cantidad de NADPH formado por la enzima disminuye en un 98%. Altas concentraciones de NADPH adicionadas a cortes de piel *in vitro* junto con la dehidroepiandrosterona, son capaces de revertir el efecto inhibitorio producido por el esteroide; sin embargo el NADPH, no estimula la síntesis de lípidos, lo que indica que el nucleótido no es el factor limitante, ya que solamente lo es cuando su efecto es bloqueado por la dehidroepiandrosterona. Como consecuencia de este efecto la síntesis de lípidos se ve disminuida significativamente sobre todo la fracción de esteroides que se reduce en un 71%, mientras que la de ácidos grasos únicamente disminuye el 46%. (30)



Estudios realizados en tejido adiposo indican que la T pero no la DHT estimulan la lipólisis mediada por catecolaminas (33,36). Este efecto puede ser inducido también por isoproterenol, que es un agonista  $\beta$  adrenérgico y la nor epinefrina agonista  $\alpha_2$  y  $\beta$  adrenérgico. La alta capacidad lipolítica de las catecolaminas en células tratadas con T va unida al aumento de los receptores  $\beta$  adrenérgicos en las células sin que se observen cambios en la afinidad, lo que indica que la T induce la síntesis o la externalización de receptores  $\beta$  adrenérgicos.

Tanto la T como la DHT estimulan la lipólisis mediada por forskolina (análogo del  $AMP_c$ ) sugiriendo que el efecto androgénico podría ser a nivel de la subunidad catalítica de la adenilato ciclasa en este tejido. Este efecto no desaparece en presencia de aromatasa, lo que indica que no está mediado por estrógenos sino por la unión a receptores específicos (36).

Es conocido que las hormonas esteroides se unen a proteínas receptoras en el citoplasma o núcleo. La conjunción con la hormona activa al receptor permitiéndole unirse con alta afinidad a secuencias específicas de DNA aumentando la transcripción del gene. Los productos de algunos de estos genes activados podrían en su oportunidad activar a otros y producir una respuesta secundaria aumentando el efecto hormonal (37,38). La misma proteína receptora regula diferentes genes en las distintas células blanco, probablemente debido a que las proteínas receptoras que se unen al DNA requieren de una transcripción genética diferente en estas células (39).

El efecto de andrógenos en la piel, no parece ser estimulando la lipólisis - contrariamente a lo que sucede en el tejido adiposo, prueba de ello es la acumulación de grasa en el acné y el aumento de gotas de grasa en las células de la glándula sebácea del hamster tratadas con andrógenos; sin embargo no excluye la posibilidad de un mecanismo similar involucrado.

Dados los antecedentes anteriormente descritos fué de interés estudiar el efecto del levonorgestrel sobre la síntesis de lípidos estimulada por andrógenos-- en la glándula sebácea del hamster hembra. También fue de interés estudiar el efecto de esta hormona sobre el contenido de grasa de la glándula. (Fig. 3)

## MATERIAL Y METODO.

Para determinar el efecto del levonorgestrel sobre la síntesis de lípidos se realizaron 2 tipos de experimentos:

1. para determinar la cantidad de lípidos contenida en la glándulas sebáceas del hamster hembra, así como su composición.
2. Para determinar la síntesis de lípidos a partir de glucosa.

Ambos experimentos se realizaron bajo el mismo esquema general por lo que el primero se describe con los números secuenciales 1,2,3 y el segundo con los romanos I,II,III.

## SUJETOS.

Hamster de la especie dorada hembras entre 130 y 150 g de peso, fueron proporcionados por el Bioterio de la UAM/X.

Se utilizaron 6 grupos de 22 animales cada uno que se subdividieron en 5 grupos pequeños y se mantuvieron en condiciones de bioterio con comida y agua ad libitum. Ambos flancos fueron rasurados con máquina eléctrica antes del experimento y cada 3 días durante el desarrollo de éste. El efecto de los esteroides se evaluó sobre el órgano del flanco derecho, el izquierdo se mantuvo como control de la absorción sistémica del principio activo. El efecto sobre el diámetro, peso, contenido y composición de lípidos así como la síntesis de éstos se determinó mediante aplicaciones diarias por vía tópica de los esteroides durante 3 semanas. Al órgano control se le aplicó únicamente el solvente respectivo. Durante el experimento se siguió el siguiente esquema:

GRUPOS 1 y I recibieron 5 ug de testosterona (T) en 50 ul de acetona.

GRUPOS 2 y II recibieron 5 ug de levonorgestrel (L) en 50 ul de cloroformo.

GRUPOS 3 y III recibieron 5 ug de T + 5 ug de L en sus solventes.

## APARATOS Y REACTIVOS.

Los esteroides fueron proporcionados por los laboratorios Proquina de México. Se utilizó un cromatógrafo de gas Perkin Elmer 900 de inyección automática AS 41, con una columna de 2m de largo y 4.1 mm de diámetro empacada al 5% con Silar 10C y diatomita M 85-100 (J.J. Chromatography Ltd. Norkfolk, England). Se

utilizó nitrógeno como gas de arrastre con una velocidad de 60 ml/min y con temperatura programada de 35 a 190°C/min. Los tiempos iniciales y finales-- fueron de 6 a 16 minutos. El efluente de la columna fué dividido en una pro porción de 1:9. Una parte fué conducida al detector de llama de ionización - y 9 partes se calentaron a 700°C sobre CuO sólido mezclado con metano al 33% y contado en un contador de corrido de 80 ml (Berthold Wilbard, West Germany).

La glucosa U <sup>14</sup>C de actividad específica de 340 mCi/mmol fué proporcionada - por New England Nuclear Co. (Boston Mass.U.S.A). Los reactivos y solventes - fueron obtenidos a través de Sigma de México.

Se utilizó un contador de centelleo líquido modelo tri-carb 3390 de Packard.

#### PROCEDIMIENTO.

Los animales fueron anestesiados con éter y sacrificados. Ambas glándulas fue ron medidas y disecadas en una biopsia que medía 5 mm aproximadamente. 4 glán- dulas de los animales de cada grupo fueron fijadas en formaldehído al 10% y teñidas con hematoxilina-eosina. Las glándulas de los grupos 1,2,3 no re- queridas para preparaciones histológicas fueron pesadas y colocadas en gru- pos de 4 glándulas cada uno en 5 ml de solución de Folch (40). El procedimien- to para cuantificar e identificar los lípidos se muestra en la figura 3". Los experimentos con los grupos 1,2,3 fueron repetidos con la finalidad de tener mayor cantidad de material para obtener un mejor análisis por cromatografía de gas (tabla 2).

Con la finalidad de evaluar el efecto de esteroides tópicos sobre la incorpo- ración de glucosaU<sup>14</sup>C a lípidos in vitro por la glándula sebácea del hamster hembra, las glándulas de los grupos I,II,III fueron pesadas y colocadas en - grupos de 4 glándulas cada uno e incubados en presencia de 3 ó 5 µCi de gluco- saU<sup>14</sup>C por 2 horas a 37°C en 3 ml de Krebs-Ringer glucosa a pH de 6 y 150 mg de albúmina como ha sido previamente descrito ( 41).A cada grupo se agregó - el esteroide correspondiente al medio de incubación, para determinar su efec- to in vitro sobre el tejido. Al término de la incubación, los tejidos fueron- colocados en 5 ml de solución de Folch por 24 hrs. a temperatura ambiente y - más tarde se agregaron 10 ml de agua destilada durante 12 horas con la fina- lidad de dializar la muestra. El agua fue removida por succión al vacío y el extracto calentado a sequedad. Los lípidos fueron pesados y la radioactividad

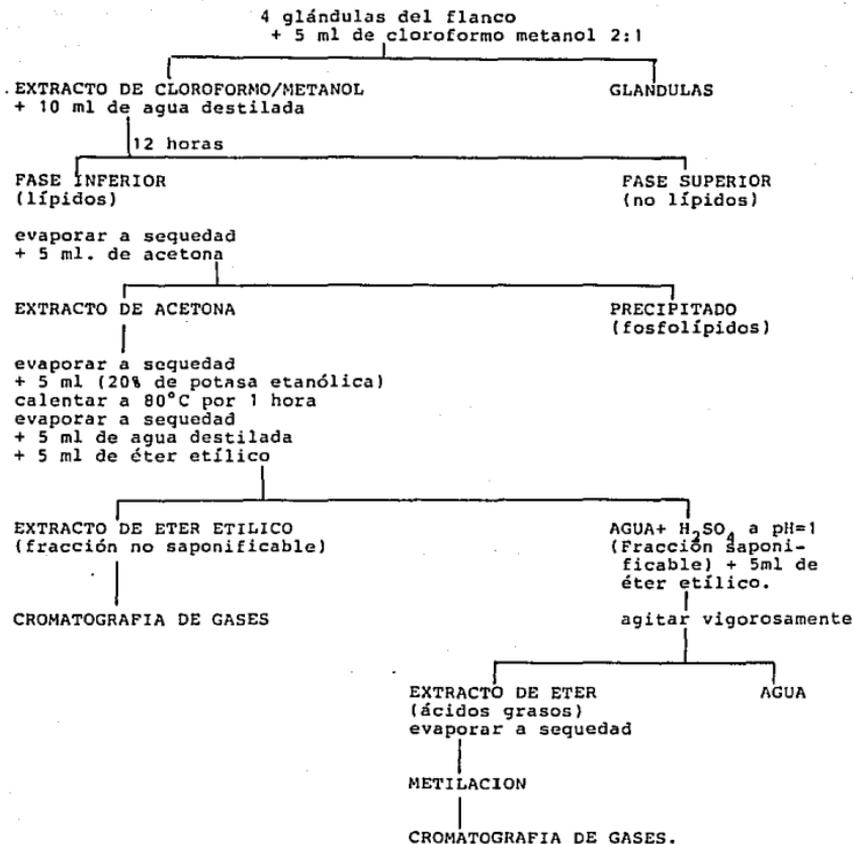


FIGURA 3ª.-Extracción de ácidos grasos y compuestos no saponificables, separación e identificación de éstos.

determinada en el contador de centelleo líquido utilizando tolueno centellante que contenía 4 g de 2,5-difenil-oxazole (PPO) y 50 mg de 1,4 bis (2-(5-difeniloxazolil) benceno (POPOP)/lt. Se calculó la actividad específica de los lípidos aislados.

#### ANALISIS ESTADISTICO.

Cada experimento fué realizado 5 veces con la finalidad de obtener exactitud y precisión en los resultados.

Aunque los animales fueron mantenidos en idénticas condiciones, se observó una gran variación en el peso, tamaño y contenido de lípidos entre las glándulas del flanco; sin embargo no se observaron diferencias significativas entre las glándulas derechas e izquierdas de los mismos animales por lo que la información únicamente puede ser comparada en esta forma. Se utilizó la prueba de  $\chi^2$  con la finalidad de tener significación de los resultados.

El órgano del flanco izquierdo sirvió como medida basal de tamaño, peso y contenido de lípidos así como de índice de absorción sistémica. Tomando en cuenta que ambas glándulas deben medir, pesar y tener el mismo contenido de lípidos, cualquier diferencia significativa entre ellas, se debe al estímulo de los esteroides. Las glándulas de los animales no tratados nos dan una idea de lo que está sucediendo con las glándulas tratadas, y las utilizadas como control.

**RESULTADOS:**DIAMETRO, PESO Y CONTENIDO DE LIPIDOS.

Las medidas de diámetro, peso y contenido de lípidos siguiendo aplicaciones tópicas de los esteroides, se muestran en la tabla 1.

Existen diferencias significativas entre las glándulas derechas e izquierdas de los animales tratados con T ( $P < 0.01$ ) (Fig. 4); sin embargo no se observan cambios significativos en el diámetro de las glándulas tratadas con L ó con T+L y sus respectivos controles tratados con vehículo.

El L aplicado por vía tópica reduce significativamente ( $P < 0.01$ ), el peso y el contenido de lípidos desde la segunda semana de aplicación si se compara con el control tratado con vehículo y con el no tratado ( Fig 5).

ANALISIS HISTOLOGICO.

El análisis histológico muestra que las glándulas tratadas con L son de menor tamaño y contienen menor cantidad de gotas de grasa en el citoplasma de las células que el control tratado con el vehículo. Las diferencias se muestran en las figuras 8A y 8B. La administración tópica de T produjo un aumento en el tamaño y contenido de las gotas de grasa, mientras que el tratamiento con T+L produjo una disminución en el contenido de gotas de lípidos de las células (Fig.6 y 7).

ANALISIS POR CROMATOGRAFIA DE GAS.

El efecto del L en las fracciones saponificadas y no saponificadas de los controles no tratados, los estimulados con T y los tratados con T+L se muestran en la tabla 2. El contenido de fosfolípidos en las fracciones analizadas fué siempre por debajo de 1 mg. La testosterona aumentó significativamente las fracciones saponificables y no saponificables ( $P < 0.001$ ) mientras que el L ó la T+L no las incrementaron ( $P > 0.05$ ).

El análisis por cromatografía de gas de los lípidos extraídos de las glándulas sebáceas del hamster hembra se muestran en las figuras 9,10,11,12. La gráfica de T muestra que ésta aumenta el contenido de ácidos grasos y que cambia su patrón de secreción en comparación con su control. Las cantidades de ácido palmítico,  $C_{17}$ , esteárico, palmitoléico, oléico y araquídico aumentan con el estímulo de dicho andrógeno, mientras que el L disminuye la cantidad de ácidos grasos con excepción de los ácidos palmítico y oléico que aumentan en comparación a su control tratado con vehículo y con el no tratado. El tratamiento con T+L produce una disminución en el contenido de ácidos grasos que componen el sebo producido por esta glándula.

La gráfica de la fracción no saponificable muestra que el cloroformo aumenta ligeramente los niveles de  $C_{16}$ ,  $C_{18}$  y un compuesto no identificado en comparación con los órganos del flanco no tratados; sin embargo no aumenta la cantidad de fracción total no saponificable sino solamente la proporción de los compuestos indicados antes.

La gráfica 11 muestra el perfil de compuestos no saponificables obtenidos de glándulas del flanco tratadas con T. La cantidad de estos compuestos fué mayor que en su control, en los cuales solo se encontraron trazas (datos no mostrados). El contenido de compuestos no saponificables obtenido a partir de extractos de glándulas tratadas con L indica que no existen diferencias marcadas con el control y con las no tratadas excepto que en las tratadas se observa un aumento en la proporción de  $C_{18}$ , que muestra un aumento en comparación con los controles; sin embargo la cantidad pesada de esta fracción es muy semejante a la control. Los tratados con T+L muestran una disminución en el contenido de compuestos no saponificables en comparación con el control no tratado y con los tratados con vehículo.

#### INCORPORACION DE GLUCOSA U $^{14}C$ A LIPIDOS in vitro.

La síntesis de lípidos a partir de glucosa (tablas 3,4,5) fué incrementada por la T, cuando ésta se agregó al medio de incubación, mientras que el L no tuvo efecto sobre la síntesis cuando se comparó con su control. Sin embargo cuando esta progestina se agrega junto con la T al medio de incubación, parece anular el efecto de aumento producido por la T, con una diferencia estadísticamente

TRATAMIENTO	MEDIDA DEL DIAMETRO EN mm DE LAS GLANDU LAS DEL FLANCO (TV) n=20	MEDIDA DEL DIAMETRO EN mm DE LAS GLANDU LAS TRATADAS. n=20	PESO DE LAS GLANDULAS IZ. EN mg (TV). n=20	PESO DE LAS GLANDULAS DE. EN mg TRATA DAS . n=20	PESO DE LIPIDOS EN mg. (TV)n=20	PESO DE LIPIDOS EN mg. TRATADAS n=20
CONTROL	2.1 $\bar{\pm}$ 0.5	2.1 $\bar{\pm}$ 0.6	28 $\bar{\pm}$ 8	27 $\bar{\pm}$ 7	18 $\bar{\pm}$ 5	17 $\bar{\pm}$ 5
T	2.2 $\bar{\pm}$ 0.5	5 $\bar{\pm}$ 0.72	31 $\bar{\pm}$ 7	42 $\bar{\pm}$ 6	22.5 $\bar{\pm}$ 5.2	31.3 $\bar{\pm}$ 8.5
L	2.6 $\bar{\pm}$ 0.5	2.4 $\bar{\pm}$ 0.5	24.3 $\bar{\pm}$ 6.6	16.55 $\bar{\pm}$ 5.6	18.2 $\bar{\pm}$ 2.9	12.2 $\bar{\pm}$ 35
T+L	2.5 $\bar{\pm}$ 0.6	2.6 $\bar{\pm}$ 0.8	23.3 $\bar{\pm}$ 8	24.5 $\bar{\pm}$ 10	15.3 $\bar{\pm}$ 3	17.3 $\bar{\pm}$ 6

TABLA 1.-Muestra el efecto de 5 ug de T, 5 ug de L y el efecto de la combinación de ambos esteroides en el órgano derecho del flanco del hamster hembra. El tamaño del órgano, así como su peso y su contenido de lípidos presentan un aumento estadísticamente significativo cuando se trata con T en comparación con su control tratado con vehículo y con el control no tratado; sin embargo no se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los tratados con L y su control ó con los no tratados. Esto mismo se observó en las glándulas tratadas con la combinación de T+L .

TV= TRATADO CON VEHICULO.

n= n° de individuos utilizados en el experimento.

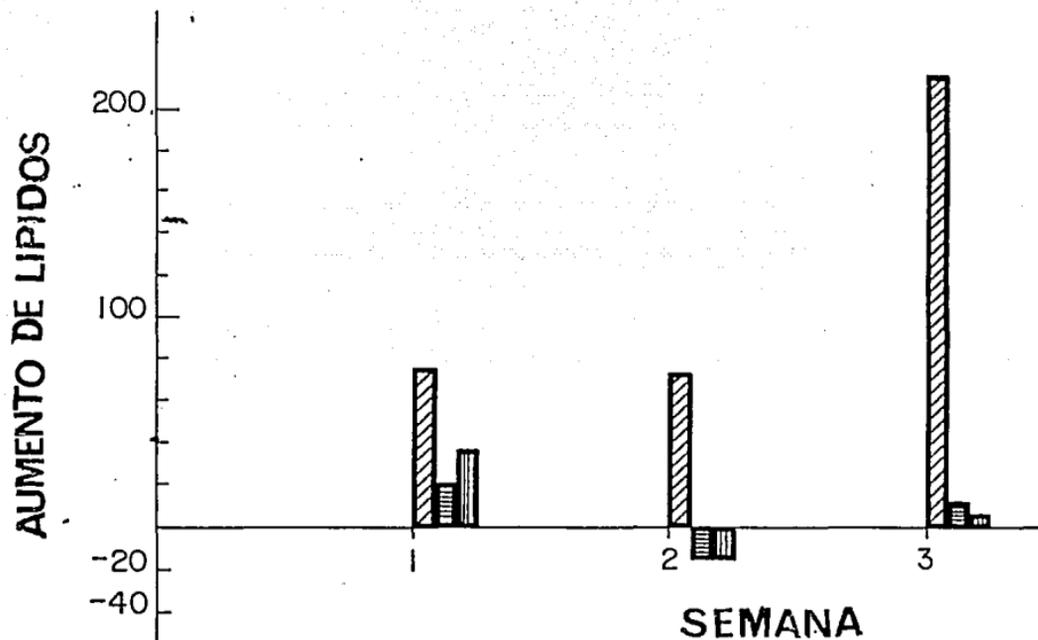


FIGURA 5.- Aumento del porcentaje de lípidos contenidos en el órgano del flanco derecho del hamster hembra a diferentes tiempos de tratamiento comparado con las glándulas control. T , L , T+L .



FIGURA 4.- Órgano del flanco derecho tratado con T 5 ug en 3ul de acetona se aplicaron diariamente por un espacio de 3 semanas, mientras que el izquierdo solo recibió acetona.



FIGURA 6.- Microfotografía de una sección del órgano del flanco derecho tratado con T. Puede notarse que la T induce un aumento de las gotas de grasa en comparación con el control. (Hem/eosina. x 400).

TRATAMIENTO	PESO DE LA FRACCION NO SAPONIFICABLE OBTENIDA DE ORGANOS DEL FLANCO EN mg, n=5		PESO DE LA FRACCION SAPONIFICABLE OBTENIDA DE ORGANOS DEL FLANCO EN mg, n=5	
	IZQUIERDA TV	DERECHA	IZQUIERDA TV	DERECHA
CONTROL	7.7 ± 5	8.7 ± 7	20.7 ± 3	19.7 ± 5
TESTOSTERONA	2.6 ± 5.5	13.8 ± 5	68.8 ± 15	143.9 ± 20
LEVONORGESTREL	35.4 ± 5	35.33 ± 10	35.6 ± 8	35 ± 10
T+L	25.8 ± 7	20.7 ± 5	20.2 ± 6	16.0 ± 4

TABLA 2.- Efecto del levonorgestrel sobre la fracción saponificable y no saponificable de glándulas sebáceas del hamster hembra intactas, estimuladas con T y con T+L. El estímulo con T produjo un aumento estadísticamente significativo ( $P \leq 0.001$ ) de la fracción saponificable y la no saponificable. El L ó la combinación T+L no produjeron diferencias estadísticamente significativas con su control en ninguna de las fracciones obtenidas. ( $P \geq 0.05$ )

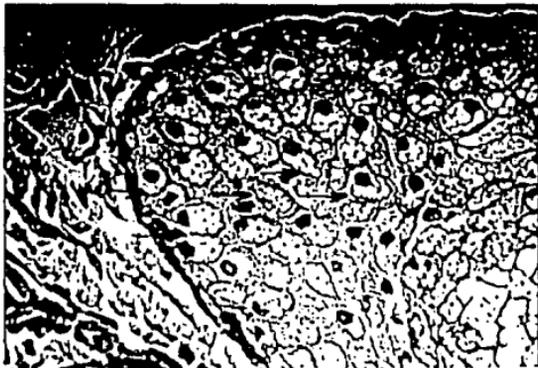


FIGURA 7.- Microfotografía de una sección del órgano derecho del flanco tratado con T+L. Las gotas de grasa son más pequeñas que en el tratado con T o con vehículo.

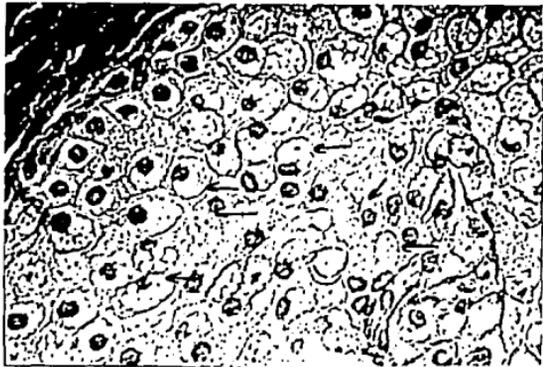


FIGURA 8.- A Microfotografía de la glándula derecha del hamster tratada con L. Existen pocas gotas de grasa en el citoplasma de las células. B Glándula izquierda del hamster trata con vehículo

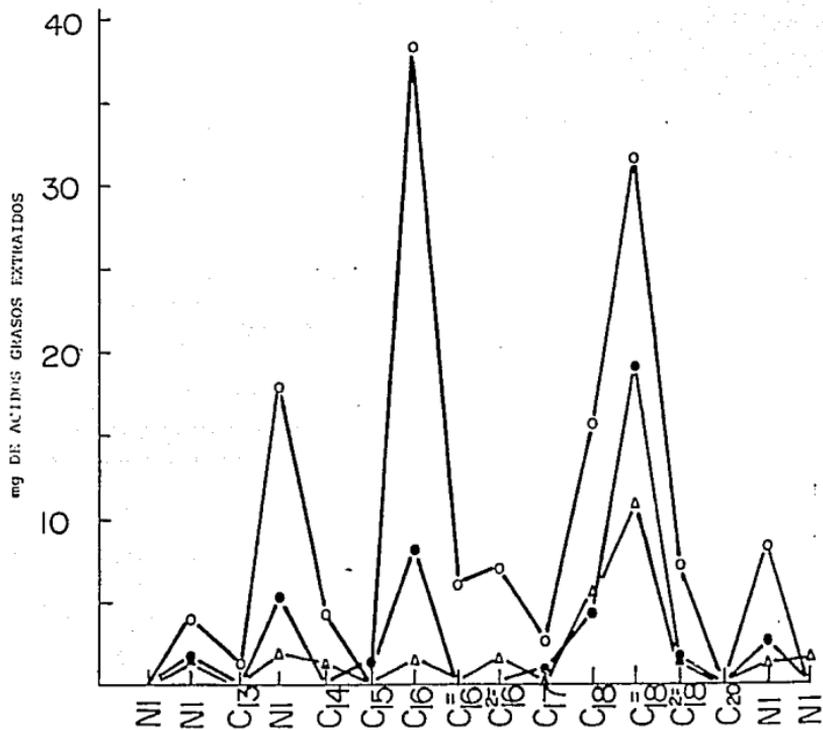


FIGURA 9.- Análisis por cromatografía de gas de la fracción de ácidos grasos extraídos de las glándulas sebáceas -- tratadas con T ○----○, con L ●----● ó con T+L △----△

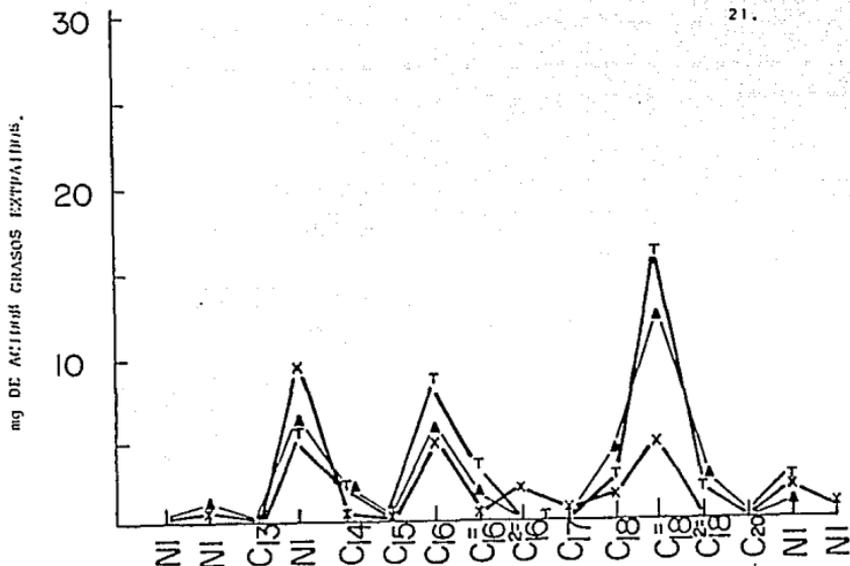


FIGURA 10.- Análisis por cromatografía de gas de la fracción de ácidos grasos extraídos de las glándulas sebáceas tratadas con acetona T----T cloroformo ▲----▲ y no tratadas X----X.

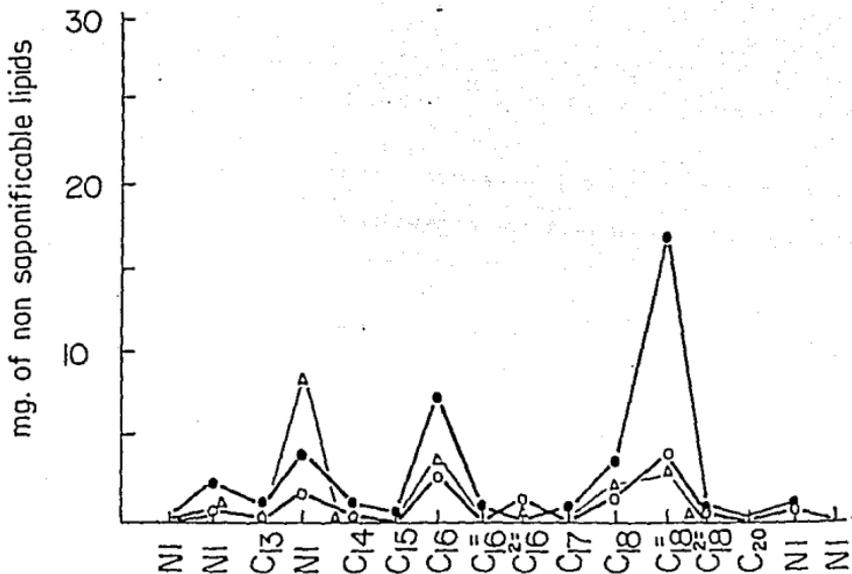


FIGURA 11.- Análisis por cromatografía de gas de la fracción de compuestos no saponificables extraídos de las glándulas sebáceas tratadas con T o----o, con L ●-----●, ó con T+L Δ----Δ.

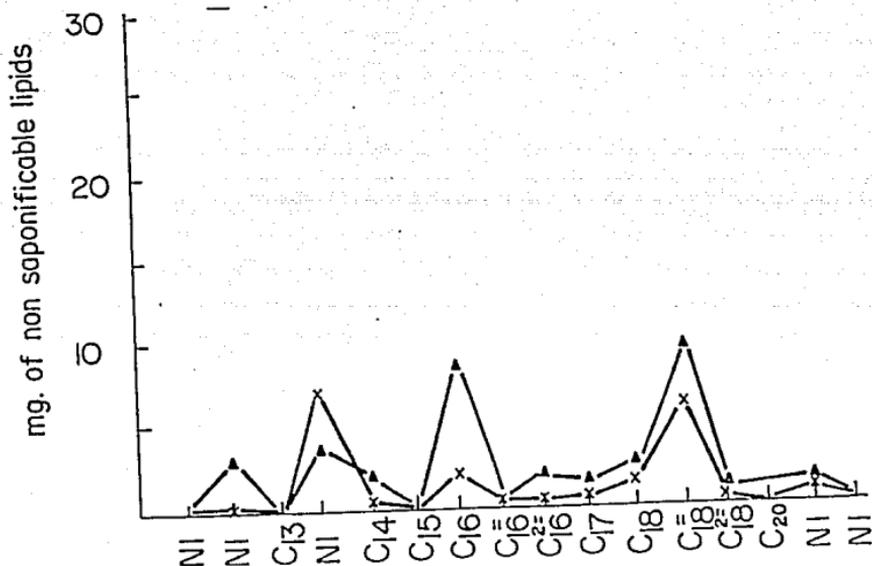


FIGURA 12.- Análisis por cromatografía de gases de la fracción de compuestos no saponificables extraídos de las glándulas sebáceas tratadas con cloroformo ▲---▲, y las no tratadas X---X. La cantidad de compuestos no saponificables extraídos de los controles tratados con acetona muestran una disminución (datos no mostrados).

TRATAMIENTO	$\bar{X}$ DEL PESO EN mg n=5	HORMONA AGREGADA AL MEDIO DE INCUBACION.	GLUCOSA $^{14}\text{C}$ AGREGADA AL MEDIO DE INCUBACION EN uCi.	$\bar{X}$ DEL PESO DE LIPIDOS EXTRAIDOS EN mg n=5	$\bar{X}$ DE GLUCOSA MARCADA INCORPORADA EN CPM. n=5	$\bar{X}$ DE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA
DERECHA TV	67.5 $\pm$ 3.6	---	5.0	26.0 $\pm$ 2.6	12,375 $\pm$ 0	476 $\pm$ 1.20
IZQUIERDA T	85.0 $\pm$ 6	---	5.0	35.6 $\pm$ 2.6	14,541 $\pm$ 1	400 $\pm$ 3.15
DERECHA TV	56.0 $\pm$ 0.63	T	5.0	19.0 $\pm$ 0.36	18,146 $\pm$ 7	955 $\pm$ 0
IZQUIERDA T	83.14 $\pm$ 3.80	T	5.0	27.0 $\pm$ 3.6	23,735 $\pm$ 23	879 $\pm$ 0

TABLA 3.- Existe una diferencia estadísticamente significativa ( $P \leq 0.001$ ), cuando se agrega testosterona (T) al medio de incubación en la radioactividad incorporada a los lípidos. En condiciones experimentales, la T estimula la formación de lípidos a partir de glucosa  $^{14}\text{C}$ .

TRATAMIENTO	$\bar{X}$ DEL PESO EN mg n=5	HORMONA AGREGADA AL MEDIO DE INCU- BACION.	GLUCOSA <sup>14</sup> C AGREGADA AL MEDIO DE IN- CUBACION EN uCi.	$\bar{X}$ DEL PESO DE LIPIDOS EXTRAIDOS EN mg n=5	$\bar{X}$ DE GLUCO- SA MARCADA INCORPORADA EN CPM. n=5	$\bar{X}$ DE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA
DERECHA TV IZQUIERDA L	49.8 $\pm$ 5.5 33.0 $\pm$ 2.8	--- ---	3.0	15.7 $\pm$ 1.9 16.1 $\pm$ 1.7	16,018 $\pm$ 1,186 18,923 $\pm$ 1,600	817 $\pm$ 142 995 $\pm$ 86
DERECHA TV IZQUIERDA L	47.6 $\pm$ 7.1 33.1 $\pm$ 11.7	L L	3.0	16.7 $\pm$ 3.9 19.3 $\pm$ 3.9	16,133 $\pm$ 1,157 16,442 $\pm$ 1,860	966 $\pm$ 102 852 $\pm$ 162

TABLA 4.- El levonorgestrel no produce efecto sobre la incorporación de la radioactividad a lípidos comparado con su control, o con los esteroides presentes en el medio.

TRATAMIENTO	$\bar{X}$ DEL PESO EN mg n=5	HORMONA AGREGADA AL MEDIO DE INCUBACION.	GLUCOSA $^{14}C$ AGREGADA AL MEDIO DE INCUBACION EN uCi.	$\bar{X}$ DEL PESO DE LIPIDOS EXTRAIDOS EN mg n=5	$\bar{X}$ DE GLUCOSA MARCADA INCORPORADA EN CPM. n=5	$\bar{X}$ DE LA ACTIVIDAD ESPECIFICA
DERECHA TV	53.0 $\pm$ 12.5	----	3.0	16.3 $\pm$ 2.3	12,596 $\pm$ 399	817 $\pm$ 112
IZQUIERDA T+L	62.7 $\pm$ 10.5	----		18.4 $\pm$ 5.8	12,597 $\pm$ 715	995 $\pm$ 86
DERECHA TV	60.9 $\pm$ 14.0	T+L	3.0	14.8 $\pm$ 3.16	14,230 $\pm$ 1,039	966 $\pm$ 102
IZQUIERDA T+L	59.4 $\pm$ 13.7	T+L		16.2 $\pm$ 8	13,070 $\pm$ 1,235	852 $\pm$ 162

TABLA 5.- No existen diferencias estadísticamente significativas en la cantidad de radioactividad incorporada a lípidos entre el control y el tratado ó en presencia o ausencia de los esteroides en el medio de incubación.

significativa.

Este hecho es indicativo de que el L interfiere con el mecanismo de acción utilizado por la T para incrementar la síntesis de lípidos.

## DISCUSION:

En las condiciones experimentales el L es capaz de inhibir el crecimiento de la glándula sebácea del hamster hembra inducido por andrógenos así como el contenido y acumulación de grasas. El L fué incapaz de inhibir la síntesis de lípidos a partir de glucosa U  $^{14}\text{C}$  en las glándulas tratadas en comparación con su control tratado con vehículo y en presencia de esta progestina en el medio de incubación; sin embargo cuando se aplica simultáneamente con T, y se incuban las glándulas en presencia de los 2 esteroides, no se observa un aumento de la síntesis de lípidos como cabría esperar produce la T, lo que indica que el levonorgestrel anula el efecto estimulativo de la T. Si se comparan los controles de las 3 tablas, da la impresión de que podría haber un efecto sistémico del L sobre las glándulas tratadas con vehículo y que este efecto podría ser estimulando la síntesis de lípidos en la misma forma que la T, sin embargo, los datos del contenido de lípidos en comparación con el control (Fig. 5) parecen descartar esta posibilidad, por lo que probablemente la explicación sea a través de la gran variación observada entre las glándulas, por lo que lo más exacto sería compararlas entre los grupos de glándulas derechas e izquierdas.

El efecto de acumulación de grasa producido por la T se hace evidente en las preparaciones histológicas en donde se observa un mayor contenido de gotas de grasa que en el control y en los tratados con L ó con T+L. La evaluación de la microestructura, ya ha sido previamente reportada (1,6,9,42).

Estos descubrimientos coinciden con los resultados obtenidos en humanos (11) en los que el I disminuyó en un 90% el acné en pacientes tratados. El estímulo con T produjo un aumento significativo en el contenido de lípidos; de éstos la fracción de ácidos grasos estuvo aumentada al igual que la fracción de compuestos no saponificables que presentó un ligero aumento en comparación con su control por lo tanto la T altera el patrón de secreción de lípidos de la glándula sebácea del hamster hembra tratada por 3 semanas y su efecto parece ser el de producir una acumulación de grasa y el de cambiar el patrón de secreción de ácidos grasos.

Estos resultados sugieren que en humanos, hacia la pubertad, la testosterona secretada por las glándulas sexuales (15,19) cambia la secreción y la composición del sebo por las glándulas sebáceas y en la patología del acné, el patrón de ácidos grasos podría ser completamente anormal y estar aumentado. Las aplicaciones unilaterales a los órganos del flanco de T+L revierten el efecto de la T lo que sugiere que si la T aumenta la acumulación de lípidos y la hiperplasia de la glándula sebácea del hamster hembra entonces el efecto del levonorgestrel parece ser sobre la degradación de éstos.

Dado que la T incrementa la actividad de la 6 fosfato deshidrogenasa en la glándula sebácea del hamster macho (3) y que la dehidroepiandrosterona es capaz de bloquear esta enzima en piel (30) podría pensarse que el L actuara a través de algún mecanismo en forma semejante a éste esteroide que impida la transcripción de esta enzima o de la 6 fosfogluconato deshidrogenasa, disminuyendo la cantidad de NADPH y por lo tanto de glicerol 3 fosfato, mecanismo necesario para la formación de acilglicérols; sin embargo en el tejido estudiado no se observa que el L produzca una inhibición de la síntesis de lípidos, como es el caso de la dehidroepiandrosterona, sino solamente la anulación del efecto aumentativo producido por la T. Este dato unido a los reportados por Adachi (4) en el sentido de que antiandrogénos como el acetato de ciproterona o el acetato de clormadinona, que bloquean la unión de androgénos con su receptor no produzcan, en este tejido, una disminución importante en la síntesis de lípidos o en el contenido de grasa citoplasmática (9) indican que el bloqueo no se encuentra probablemente a nivel de la transducción genética de enzimas metabólicas sino por otro mecanismo aún no entendido.

Por otro lado, el dato de que la T produce un efecto de acumulación de grasa que aumenta con el tiempo de tratamiento (Fig. 5), indica que el mecanismo de acción de este andrógeno es diferente en la glándula sebácea del hamster hembra que en el reportado en tejido adiposo (36) o en piel de prepucio de rata (26); sin embargo estos datos no descartan la posibilidad de que el efecto esté mediado por AMP<sub>c</sub>, ya que la lipólisis estimulada por androgénos en tejido adiposo está mediado por este compuesto. En la glándula sebácea el AMP<sub>c</sub> o el Ca<sup>+2</sup> podrían actuar como segundos mensajeros activando proteínas cinasas (A ó C) que fosforilaran y en esta forma activaran gran cantidad de copias enzimáticas que producirían a su vez una mayor cantidad de lípidos.

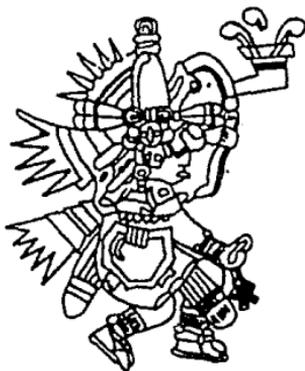
## BIBLIOGRAFIA.

1. Hamilton, J.B. and Montagna, W. 1950. Am. J. Anat. 86:191.
2. Takayasu, S and Adachi, K. 1972. Endocrinology. 90:73.
3. Takayasu, S and Adachi, K. 1970. J. Invest. Derm. 55(1):13.
4. Frost, P and Gómez, E.C. 1969. In: Montagna, W; Van Scott, E.J. and Stoughton, R.B. (eds.). Advances in biology of skin, vol. 12 Appleton-Century-Crofts, New York: 403.
5. Clanachan, M; Devitt, H; Foreman, M.I; Picton, W. 1985. Br. J. Dermatol. - 112(3): 329.
6. Cabeza, M y Jaimes, R. 1986. Rev. Mex. Cienc. Farm. 17(2):30.
7. Ebling, F.J. 1967. Acta Endocr. 38:181.
8. Voight, W. and Hsia, S.L. 1973. Endocrinology 92(4):1216.
9. Burdick, K.H. and Hill, R. 1970. Br. J. Dermatol. 8(82, suppl. 6):19.
10. Adachi, K. 1974. J. Invest. Derm. 62 (3):217.
11. Cabeza, M; Vargas, E. y García, B. 1984. Rev. Mex. Cienc. Farm. 14(4):29.
12. Ebling, F.J. 1963. Acta Endocr. 72:361.
13. Ziboh, V.A.; Dreize, M.A. and Hsia, S.L. 1970. J. Lipid Res. 11:346.
14. Green, M.J.; Tiberi, R.; Draper, R.W.; Carlon, E.; Neri, R.O.; Kung, T.T.; Mc. Phail, A.T. and Onan, K.D. 1983. J. Med. Chem. 26:78.
15. Strauss, J.S.; Pochi, P.E.; Sarda, I.R.; Wotiz, H.H. 1969. J. Invest. Derm. 52:95.
16. Wenkler, L.; Schaefer, H. 1973. Arch. Dermatol. Forsch. 247:257.
17. Zarate, A.; Mahesh, V.B. Greenblatt, R.B.J. 1966. J. Clin. Endocrinol. 26: 1394.
18. Pria, S.D.; Greenblatt, R.B.J. 1969. J. Invest. dermatol. 52:348.
19. Cunliffe, W.J. and Shuster, S. 1969. Lanat 1:685.
20. Stanczyk, F.Z. and Roy, S. 1990. Contraception 42 (1):67.
21. Edgrin, R.A.; Jones, R.C.; Clancy, D.P. and Magra, C.L. 1968. J. Reprod. Fertil. Suppl. 5:13.
22. Fotherby, K.; Kamyab, S.; Littleton, P. and Klopper, A.I. 1968. J. Reprod. Fertil. Suppl. 5:51.
23. Shuster, S.; Cooper, M.F.; Mc. Gibbon, D. and Wilson, W. 1980. Br. J. Dermatol. 103:127.

24. Ziboh, V.A. and Hsia, S.L. 1969. Fed. Proc. 28:913.
25. Ziboh, V.A. and Hsia, S.L. 1969. Arch. Biochem. Biophys. 131:153.
26. Sasone, G.; Davidson, W.; Cummins, B. and Reisner, R.M. 1971. J. Invest. Derm. 64:412.
27. Pierce, V.H. 1975. Arch. Dermatol. 111:1496.
28. Flatt, J.P. and Ball, E.G. 1964. J. Biol. Chem. 239:675.
29. Wise, E.M. Jr. and Ball, E.G. 1964. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 152:1255.
30. Ziboh, V.A.; Dreize, M.A. and Hsia, S.L. 1970. J. Lipid Res. 2:135.
31. Marks, P.A. and Banks, J. 1960. Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A 46:447.
32. Mc. Kerns, K.W. and Keleita, M. 1960. Biochem. Biophys. Res, Commun. 2:344.
33. Tsutsui, E, A.; Marks, P.A. and Reich, P. 1962. J. Biol. Chem. 237:3009.
34. Levy, H.R. 1963. J. Biol. Chem. 238:775.
35. Pecquery, R.; Lenevew, M.C.; Giudicelli, Y. 1988. Endocrinology 122:2590.
36. Xu, X.; De Pergola, G and Bjorntorp, P. 1990. Endocrinology 126 (2):1229.
37. Gehring, U. 1987. Biochem. Sci. 12:399.
38. Yamamoto, K.R. 1985. Annu. Rev. Genet. 19:209.
39. Attardi, B. Ohro, S. 1978. Endocrinology 103:760.
40. Folch, J. and Less, M. 1957. J. Biol. Chem. 226:497.
41. Garcia-Sainz, A.; Amador, G.A.; Piña, E. and Chagoya, V. 1975. Biochemical Pharm. 24:891.
42. Lutsky, B.N. ; Budak, M. Koziol, P; Monaham, I. and Neri, R.O. 1975. J. Invest. Derm. 64:412.

## QUETZALCOATL

Quetzalcóatl, fue quizás el más complejo y fascinante de todos los Dioses mesoamericanos. Su concepto primordial, sin duda muy antiguo en el área, parece haber sido el de un monstruo serpiente celeste con funciones dominantes de fertilidad y creatividad. A este núcleo se agregaron gradualmente otros aspectos: la leyenda lo había mezclado con la vida y los hechos -- del gran Rey sacerdote Topiltzin, cuyo título sacerdotal era el propio nombre del Dios del que fue especial devoto. En el momento de la conquista, Quetzalcóatl, considerado como Dios Único desempeñaba varias funciones: Creador, Dios del viento, Dios del planeta Venus, héroe cultural, arquetipo del sacerdocio, patrón del calendario y de las actividades intelectuales en general, etc. Un análisis adicional es necesario para poder desentrañar los hilos aparentemente independientes que entran al tejido de su complicada personalidad.



IMPRESO EN LOS TALLERES DE:  
**EDITORIAL QUETZALCOATL, S. A.**  
MEDICINA No. 37 LOCALES 1 Y 2 (ENTRADA POR PASEO DE LAS  
FACULTADES) FRENTE A LA FACULTAD DE MEDICINA DE C. U.  
MEXICO 20, D. F. TELEFONOS 658-71-66 Y 658-70-88

ESTE TRABAJO FUE REALIZADO EN EL LABORATORIO DE HORMONAS  
DEL DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS DE LA UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA METROPOLITANA UNIDAD XOCHIMILCO.

AGRADEZCO AL DR GREGORIO PEREZ PALA\_  
CIOS SUBDIRECTOR DE INVESTIGACION Y  
JEFE DEL DPTO DE BIOLOGIA DE LA REPRO\_  
DUCCION DEL INNSS Y TUTOR DE ESTE TRA\_  
BAJO SU APOYO Y CONFIANZA DURANTE EL \_  
DESARROLLO DE ESTA TESIS DE MAESTRIA.

MI MAYOR RECONOCIMIENTO AL COMITE TUTORIAL POR SUS EVALUA\_  
CIONES CRITICAS, SUS DISCUSIONES Y SU APORTE DE MATERIAL--  
RADIOACTIVO PARA EL CORRECTO DESARROLLO DE ESTA TESIS DE--  
MAESTRIA EN INVESTIGACION BIOMEDICA BASICA.

COMITE TUTORIAL:

- 1.DRA. VICTORIA CHAGOYA DE SANCHEZ, INVESTIGADAORA DEL INS-  
TITUTO DE FISIOLOGIA CELULAR UNAM.
- 2.DRA.ANA ELENA PEREZ-PALACIOS INVESTIGADORA DEL INSTITUTO  
NACIONAL DE LA NUTRICION SALVADOR SUBIRAN.
- 3.DR. LINO DIAZ DE LEON HERNANDEZ, SECRETARIO ACADEMICO E  
INVESTIGADOR DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMEDICAS.

ABSTRACT.

The hamster flank organ is an acceptable model to determine topical efficacy of agents which affect sebaceous gland function. Unilateral applications of testosterone to the intact-- female hamster flank organs daily for 15 days increased the organs weight and sebum production at doses as low as 5 ug compared with the control. In vitro lipid synthesis, was--- evaluated incubing the tissue with 5  $\mu$ Ci of  $^{14}$ C-U- glucose and 5  $\mu$ Ci of testosterone for 2 hours. The results show--- that testosterone increased significatly the lipid synthesis compared with control. Unilateral applications of levonorgestrel to the intact female flank organs daily for 15 days alone or in combination with testosterone, reduced the organ weight and sebum production at doses as low as 5 ug. Specific activities, obtained from the in vitro lipid synthesis, show that levonorgestrel treated flank organs were the same that vehicle-treated cases. In combination with-- testosterone, levonorgestrel in the incubation medium-- appear to void the testosterone increasing effect.

## RESUMEN.

El órgano del flanco es un modelo aceptable para determinar la eficacia de agentes que actúan sobre la función de la glándula sebácea. Aplicaciones unilaterales diarias con 5ug de testosterona a los órganos del flanco del hamster hembra por un tiempo de 15 días producen un aumento en el peso, diámetro y contenido de lípidos en comparación con su control. Se evaluó la síntesis de lípidos *in vitro* incubando el tejido con 5uCi de glucosa uniformemente marcada con  $^{14}\text{C}$  y 5ug de testosterona por 2 horas. Los resultados muestran que la testosterona aumenta significativamente la síntesis de lípidos en comparación con su control. Aplicaciones diarias unilaterales con 5ug de levonorgestrel o con 5ug de testosterona más 5 ug de levonorgestrel a órganos del flanco del hamster hembra reducen el peso y la producción de sebo de esta glándula en comparación con su control. Las actividades específicas muestran que la síntesis *in vitro* de los órganos del flanco tratados con levonorgestrel fué la misma que en las glándulas control tratadas con vehículo. En combinación con la testosterona, el levonorgestrel en el medio de incubación parece anular el efecto de la testosterona, ya que no se observan diferencias significativas con el control.