

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
Facultad de Ciencias Químicas

**LA DOBLE ACCION DEL ESTRADIOL SOBRE LA
COLESTEROLEMIA DE LA RATA**

T E S I S
Que para obtener el título de:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
p r e s e n t a:
BLANCA N. GUERRERO GUTIERREZ

México, D. F.

1966



Universidad Nacional
Autónoma de México



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 esta 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.

A mis Padres

Con gratitud y eterno cariño.

A mis hermanos

y

Amigos.

~~01734~~

~~01734~~

02607

**El agradecimiento al
Dr. Juan José Mandoki bajo
cuya dirección realice esta
Tesis.**

INDICE.

	pag.
Introducción	1
Material y Método	3
Plan general de estudio	12
Resultados	13
Resumen	37
Discusión	40
Conclusiones	43
Bibliografía	44

INTRODUCCION.

La aterosclerosis es una enfermedad caracterizada por depósitos abundantes de grasa y colesterol en las paredes arteriales.

Este proceso constituye uno de los problemas cuya importancia ha ido creciendo en los últimos años. Estadísticas de los Estados Unidos de Norte América demuestran que las muertes de tipo cardiovascular y renal de origen aterosclerótico fueron 800,000 en 1955 y excedieron en 100,000 al número total de defunciones provocadas por todas las demás causas (37).

Es indiscutible que el depósito de colesterol y de otros lípidos juega un papel importante en el desarrollo de la aterosclerosis. Las placas ateroscleróticas se sabe desde hace años que contienen principalmente colesterol (21). Los grupos de población con valores bajos de colesterol sérico son menos propensos a la aterosclerosis (20).

Estudios estadísticos (9) demuestran que cuando los valores de colesterol son mayores, aumenta la frecuencia en el hombre de enfermedades coronarias ateromatosas.

Por otra parte estudios experimentales en animales de laboratorio (1,19,21,39) muestran que un aumento de colesterol sérico puede producir lesiones ateromatosas.

Los procedimientos terapéuticos para reducir la colesterolemia en forma considerable, no son satisfactorios. Se ha observado que los estrógenos disminuyen la concentración de colesterol sérico en el hombre (11,22,25,30) y en animales de laboratorio (3,5,6,7,17,18,23,24,26,32,33,36,38) sin embargo la utilidad de estos agentes es limitada debido a que poseen efectos feminizantes. Los esfuerzos para alterar químicamente los estrógenos con el fin de separar sus efectos sobre el colesterol sanguíneo del efecto sobre las características sexuales sigue en marcha.

No obstante las observaciones anteriores del efecto hipocolesterolemizante de los estrógenos, la evidencia al presente es insuficiente. La acción de los estrógenos sobre la con-

centración de colesterol sérico de la rata ha sido estudiada en numerosas investigaciones con resultados aparentemente contradictorios(2,4,5,6,13,17,24,27,28,29,31,32,34,35,36). En cada una de ellas se observó efecto distinto, administrando el mismo estrógeno 17 beta estradiol a ratas sometidas a una dieta standard.

Diferentes investigadores han observado que la administración de estradiol determina un incremento en la concentración de colesterol sérico(2,13,28,31,34) que no tiene efecto(27,35) ó que produce una disminución de la colesterolemia (4,5,17,23,29).

El presente estudio tiene el propósito de tratar de aclarar estas observaciones aparentemente contradictorias de la acción del estradiol sobre la concentración de colesterol sérico de la rata, haciendo una exploración más amplia y minuciosa.

MATERIAL Y METODO .

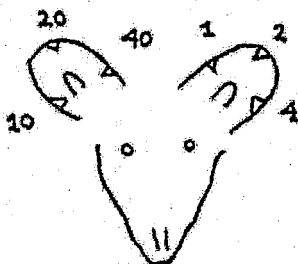
Para este estudio fueron utilizadas ratas macho adultas procedentes de la cepa Wistar. Estos animales viven y se alimentan bajo condiciones uniformes que son controladas en la Casa de Animales del Instituto Nacional de Cardiología.

Las ratas se alimentan con una dieta comercial(Purina Laboratory Chow) compuesta de : proteínas 23 %, grasa 5% carbohidratos 44 %, fibra cruda 6 % y humedad 9 %. Los animales pueden beber con libertad el agua de la llave que se encuentra en los bebederos.

Preparación de Lotes.

Se escogen ratas macho, se pesan y se les va asignando su número en forma progresiva, este número se les marca de la siguiente manera : con una pinza especial denominada sacabocado de estrella, se hacen pequeñas muescas en diferentes partes del borde de las orejas de acuerdo con la clave utilizada en este laboratorio.

A continuación se hace un esquema de la rata para ilustrar la posición que llevan las muescas en el borde de las orejas y el número que representa cada una de ellas según la clave.



Las unidades están representadas en la oreja izquierda de la rata y las decenas en la oreja derecha. Las muescas se enumeran siguiendo el sentido de las manecillas del reloj y cada una de ellas según la posición en que se encuentre representa un número. Las ratas que corresponden a los números 1, 2, 4

solo llevan una muesca en la posición que indica el dibujo; la rata que le corresponde el # 3 lleva dos muescas la que corresponde al # 1 y la que corresponde al # 2 y así se suma lo que represente cada una de las muescas para obtener el número de asignación correspondiente, por ejemplo la rata representada en el esquema le corresponde el # 77, pues la suma de las muescas hechas en la oreja que representa las decenas ($10 + 20 + 40$) nos da el # 70 y la suma de las muescas hechas en la oreja que representa las unidades ($1 + 2 + 4$) nos da el # 7.

Cuando a el animal se le hacen 4 perforaciones ; en la oreja de las unidades representa el # 8 y en la oreja de las decenas representa el # 80. El número máximo que podemos representar es el 88.

Marcado el animal y anotado su peso se procede a ordenar los pesos de menor a mayor para después distribuir a las ratas en los diversos lotes (n lotes) de la manera siguiente: las n ratas más ligeras se distribuyen en orden progresivo - del lote # 1 a el lote n ; las n ratas siguientes son asignadas en orden de peso progresivo, en sentido inverso comenzando en el lote n y terminando en el lote # 1. Este procedimiento será repetido cuantas veces sea necesario, invirtiendo cada vez el orden de asignación hasta que todas las ratas han sido distribuidas .

Los tratamientos que corresponden a los diversos lotes son asignados al azar. Cuando el experimento es repetido se asigna en un orden diferente pero siempre al azar (40). Las ratas con diferente tratamiento se les coloca en jaulas diferentes.

El estrógeno estudiado fué el 17 beta estradiol el cual se administraba a las ratas por inyección subcutánea disolviéndole previamente en aceite de sésamo ó 1,2,propanodiol. Las soluciones fueron preparadas a las concentraciones que permitieran inyectar un volumen siempre igual de 0.1 ml por 100 g. de peso corporal. Los animales testigo recibieron el solvente, al mismo tiempo que las otras ratas recibieron el estradiol.

Método empleado para la Determinación de Colesterol Total Sérico.

El método empleado para la determinación de colesterol total sérico es el Micrométodo Fluorométrico de Carpenter y colaboradores(8) que a continuación se describe:

Instrumental.-Fluorómetro de Farrand equipado con filtro primario No.4010 y secundario No 2424.

Celdillas de 9 mm X 75 mm.

Material. - Tubos de centrifuga con tapón esmerilado de 15 ml (Pirex).

Tubos de ensayo de 15 X 75 mm.

Pipetas de hemoglobina de 0.02 ml.

2 pipetas graduadas de 10 ml.

Pipetas volumétricas de 2ml.

1 pipeta volumétrica de 4 ml .

1 matraz volumétrico de 100 ml.

1 matraz volumétrico de 200 ml.

1 bureta de 25 ml.

Tubos capilares de 1.5-2 X 100 mm (Kimax).

Reactivos.- 1.-Solución standard de colesterol puro Baehringer recristalizado según el método de Fieser(14) y disuelto en alcohol de 95 % a las concentraciones de 200,100,50 y 25 mg por 100 ml.

2.-Solución acuosa de hidróxido de potasio al 33%

3.-Solución alcoholica de hidróxido de potasio, esta debe ser preparada el mismo día en que se utiliza a partir de la solución anterior en la siguiente forma:

Solución de KOH al 33 % 6 ml

Alcohol absoluto (Gadir) 94ml.

4.- Hexano

5.-Mezcla de anhídrido acético-tricloroetano.

Se prepara en el momento de usarse en la siguiente forma :

1,1,2. tricloroetano 5 vols.

anhídrido acético 1 vol.

5. ácido Sulfúrico R.A concentrado

Lavado del Material.

Al adaptarse esta tecnica en el laboratorio se encontro que el contacto de detergentes ó jabones con el material de vidrio, deja contaminantes difíciles de eliminarse que interfieren grandemente en la determinación fluorométrica del colesterol. Un procedimiento satisfactorio fué el lavado con mezcla sulfonítrica.

Preparación de la mezcla:

Acido sulfúrico concentrado 3 partes.

Acido Nítrico concentrado 1 parte.

Tecnica de lavado:

Tubos de centrifuga.- Aprovechando la potasa alcohólica que contienen se lavan por agitación con agua de la llave diez veces, se secan y se introducen a recipientes de plástico que contienen la mezcla sulfonítrica un mínimo de 24 horas, se sacan y se enjuagan en un recipiente que contiene agua de la llave, enseguida se colocan en una cuba de plástico donde se lavan 30 veces continuas con agua de la llave y por último se enjuagan una vez con agua destilada.

Tubos de ensayo.- Se desecha el contenido y se lavan con agua de la llave 10 veces, para después introducirlos 24 horas a la mezcla sulfonítrica, se sacan y se sigue el procedimiento de lavado anterior.

Pipetas volumétricas y graduadas.- Después de usadas se ponen directamente en la mezcla 24 horas, se enjuagan y se les coloca en un lavador de pipetas donde permanecen lavándose 2 horas y media, se enjuagan con agua destilada y después se secan.

Pipetas de hemoglobina.- Inmediatamente después de usadas se se enjuagan 3 a 4 veces con agua de la llave, se escurren y se colocan en un vaso de precipitado que contiene la mezcla sulfonítrica, se hierven por espacio de 15 minutos en el interior de la campana, ya enfriadas se enjuagan con agua de la llave y se colocan en lavadores de pipetas donde se lavan 6 veces con agua corriente y una con agua destilada.

Los matraces y los vasos de precipitado se enjuagan varias veces con agua corriente, se mantienen 24 horas en la mezcla sulfonítrica, se sacan y las 30 lavadas se les hace individualmente.

El material de vidrio que por primera vez se va a utilizar, se hierve durante 15 minutos en la mezcla sulfonítrica. Si el material es grande se mantiene en la mezcla 8 días, se saca y se sigue la técnica de lavado.

Procedimiento de Obtención del Suero Sanguíneo.

Para obtener el suero sanguíneo de la rata, se envuelve a esta en un trapo dejando al descubierto la cola que se calienta por espacio de aproximadamente 3 minutos para producirle vasodilatación; para esto se utiliza un baño maría que este aproximadamente a 42 grados centígrados, se seca perfectamente la cola, se coloca sobre una superficie de vidrio y con una hoja de rasurar se corta una pequeña porción de su parte terminal.

La sangre se colecta en tubos capilares llenándoles aproximadamente un 80 % de su volumen, el final del tubo capilar que no contiene sangre es cerrado usando un soplete que puede improvisarse con un mechero y una aguja de inyecciones que dirige aire comprimido directamente a la flama.

Los capilares se colocan en tubos de ensayo que llevan en el fondo una torunda de algodón (para protección del capilar) y se llevan a centrifugar por 10 minutos a 2000 r.p.m. para separar el suero en el que se hace la determinación.

Procedimiento para la Determinación de Colesterol Total Sérico .- Se basa en los siguientes puntos :

- A) Hidrólisis del colesterol esterificado.
- B) Extracción del colesterol con hexano.
- C) Evaporación de una parte alícuota del hexano.
- D) Redisolución del extracto en tricloroetano - anhídrido acético.
- E) Desarrollo de la fluorescencia con Ac. sulfúrico.
- F) Lectura de la fluorescencia.

A) Hidrólisis del colesterol esterificado.-Se preparan tubos de centrifuga con tapón esmerilado tantos como determinaciones se vayan a hacer, más los que corresponden a los standard de colesterol.

Las soluciones standard y los sueros son procesados de acuerdo con el siguiente orden: primero una serie de soluciones standard comenzando con el de más alta concentración y terminando con el blanco, enseguida todos los sueros que corres-

ponden a las ratas en orden de peso creciente y finalmente la segunda serie de soluciones standard; comenzando con el blanco y terminando con el standard de más alta concentración.

A estos tubos de centrifuga se les añade 1 ml de potasa alcoholica (3), enseguida de cada una de las soluciones standard se toma una pequeña cantidad con un tubo capilar y de allí se miden directamente con la pipeta de hemoglobina 0.02 ml que se depositan en el fondo del tubo de centrifuga que contiene la potasa alcoholica. Se enjuaga 2 a 3 veces la pipeta en la solución.

Se manipula de igual manera las soluciones standard y los sueros problema, para obtener mayor exactitud en las determinaciones. Se utiliza una pipeta diferente para cada solución standard y suero problema.

Los tubos de centrifuga contentiendo la solución y perfectamente tapados se mantienen en baño maria a 40 grados centígrados durante 55 minutos para que la potasa alcohólica actúe hidrolizando los esteres del colesterol. Los tubos se dejan enfriar a temperatura ambiente.

B) Extracción del colesterol con hexano.- Se agrega a cada uno de los tubos de centrifuga 1 ml de agua destilada y 4 ml de hexano medidos exactamente con una pipeta volumétrica; al mismo tiempo se van tapando los tubos sellando los tapones con agua destilada para evitar que escape el hexano al agitarlos. La extracción se hace en un agitador tipo Vortex (se debe procurar que el remolino producido llegue hasta el fondo del tubo, pues el hexano debe extraer completamente todo el colesterol). La agitación se hace en 19 segundos aproximadamente.

C) Evaporación de una parte alícuota del hexano.- Separadas las dos fases liquidas se toma de la fase superior (hexano) 2 ml usando una pipeta volumétrica para cada determinación. Estos 2 ml se transfieren a los tubos de ensayo correspondientes y se evaporan en baño maria a 80 grados centígrados durante 15 minutos, los tubos contentiendo el extracto se retiran del baño maria.

D) Redisolución del extracto.- El extracto se disuelve agregando a cada tubo 2 ml de la mezcla anhídrido acético-tricloroetano(5) en la forma siguiente: la pipeta volumétrica que contiene los 2 ml de la mezcla se coloca en la boca del tubo de ensayo y se gira este en el momento de ir agregando la solución, con el fin de que la mezcla arrastre todo el colesterol que haya quedado adherido a las paredes del tubo. Se agitan los tubos energicamente y se dejan reposar por 15 minutos para que en este tiempo el agua que pudiese contener reaccione con el anhídrido acético y se obtenga un medio anhidro.

E) Desarrollo de la Fluorescencia con Ac.Sulfúrico.La fluorescencia se obtiene al agregar ácido sulfúrico concentrado, dejando caer de una bureta de 25 ml, 3 gotas de ácido a cada uno de los tubos de ensayo conteniendo el extracto en la mezcla de anhídrido acético tricloroetano.Las 3 gotas caen en 7 segundos y equivalen aproximadamente a 0.08 ml.

F) Lectura de la Fluorescencia.- Añadido el ácido sulfúrico se prende la lámpara de mercurio del fluorómetro y media hora después se ajusta a que la solución standard de colesterol de 200 ng por 100 ml lea 95, se comprueba cada 10 a 15 lecturas que con esta solución standard se siga leyendo 95 unidades, si ha habido un pequeño cambio en la sensibilidad se corrige esta .

Siempre que se llevan a cabo las determinaciones de colesterol total sérico se hace una curva de calibración completa por duplicado.Esta curve es suficientemente extensa, de tal manera que los valores experimentales quedan comprendidos dentro de ella, evitando así tener que obtener valores por extrapolación.

Los resultados se expresan como colesterol total en ng por 100 ml de suero. Los valores representados en las gráficas de este estudio corresponden a la media aritmética $\pm$ el error standard de cada media. La prueba de Student-Fisher se usó para determinar la significación estadística de los valores experimentales (15).

Purificación del Colesterol por el Método de Fieser.

Substancias:

Colesterol Boehringer	100 g.
Acido acético glacial	200 c.c.

Procedimiento.

En un vaso de precipitado se coloca el colesterol y por separado se calienta el ácido acético agitándolo, cuando se inicia la ebullición se transfiere a el vaso que contiene el colesterol y se agita vigorosamente hasta disolución completa.

Es conveniente que se sumerja en hielo picado el vaso que contiene el colesterol disuelto, para que la cristalización se realice en un tiempo mínimo sin dar oportunidad a que los cristales engloben impurezas. Se continúa agitando hasta alcanzar la temperatura de 25 grados centígrados.

Se filtra al vacío y se recrystaliza 3 veces más siguiendo el procedimiento anterior.

En la última filtración se lavan los cristales con alcohol metílico para eliminar el exceso de ácido acético. Se determina el punto de fusión.

PLAN GENERAL DE ESTUDIO.

Para aclarar los resultados aparentemente contradictorios obtenidos por los diversos autores mencionados anteriormente, se decidió hacer una investigación más amplia y minuciosa de la acción del Estradiol sobre la colesterolemia, de la que se había hecho con anterioridad. Esta investigación comprendió los siguientes estudios:

I.- Efecto de una sola inyección de Estradiol.

A) Relación dosis-respuesta.

1.- Efecto a las 24 horas.

2.- Efecto a los 7 días.

B) Curso Temporal de la Respuesta.

II.- Efecto de inyecciones repetidas.

A) Relación dosis-respuesta. Administración diaria de estradiol :

1.-Durante 3 días.

2.-Durante 9 días.

B) Respuesta a la administración de estradiol 2 veces por semana durante 6 semanas.

C) Relación dosis-respuesta. Administración semanal del estrógeno durante 3 semanas. Determinación de la concentración de colesterol total sérico 7 días después de la última inyección .

RESULTADOS.

I.- Estudio del efecto de una sola inyección de Estradiol.

Relación dosis - respuesta.

1.- Efecto a las 24 horas.

Para este estudio se utilizaron 244 ratas macho adultas con un peso promedio de 443 ± 3.4 g. Estos animales fueron distribuidos en los 11 grupos siguientes:

Testigos sin tratamiento.- Los animales pertenecientes a este lote no recibieron ningún tratamiento, constituyendo así un grupo testigo.

Testigos tratados con el solvente (1,2,propanodiol). Las ratas de este grupo recibieron solamente el solvente para determinar la influencia que pudiera tener la administración de este en los resultados .

Los 9 lotes restantes recibieron el estradiol a las dosis siguientes por kg de peso corporal: 1.58 ug, 5 ug, 15.8 ug, 50 ug, 158 ug, 0.5 mg, 1.58 mg, 5 mg, 15.8 mg y 50 mg.

La colesterolemia se determinó a todos los animales 24 horas después de la inyección .

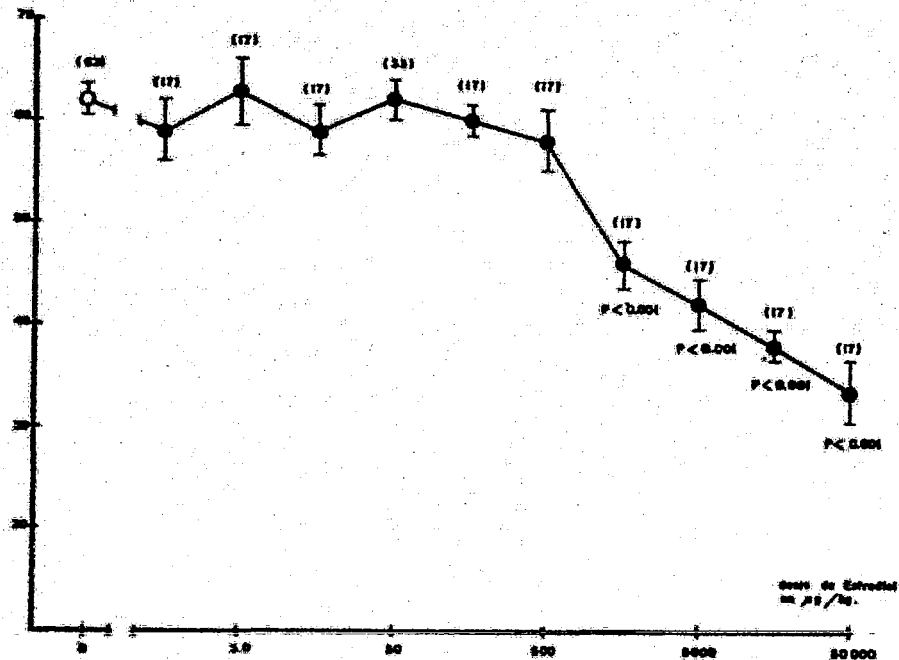
Los resultados se presentan en la figura y tabla # 1. Se observa que las dosis menores de estradiol no produjeron efectos significativos sobre la concentración de colesterol sérico; solamente dosis mayores de 500 ug produjeron efectos hipocolesterolemiantes significativos ($P < 0.001$).

2.- Efecto a los 7 días.

Se utilizaron 108 ratas macho adultas con un peso promedio de 384 ± 8.8 g. que fueron distribuidas en los 7 grupos siguientes: testigos no tratados, testigos que recibieron el solvente (1,2, propanodiol) y ratas que recibieron el estradiol a las dosis siguientes por kg de peso: 0.5 mg, 1.58 mg, 5 mg, 15.8 mg y 50 mg.

figura No. 1

Concentración total
de mg / 100 ml
de suero

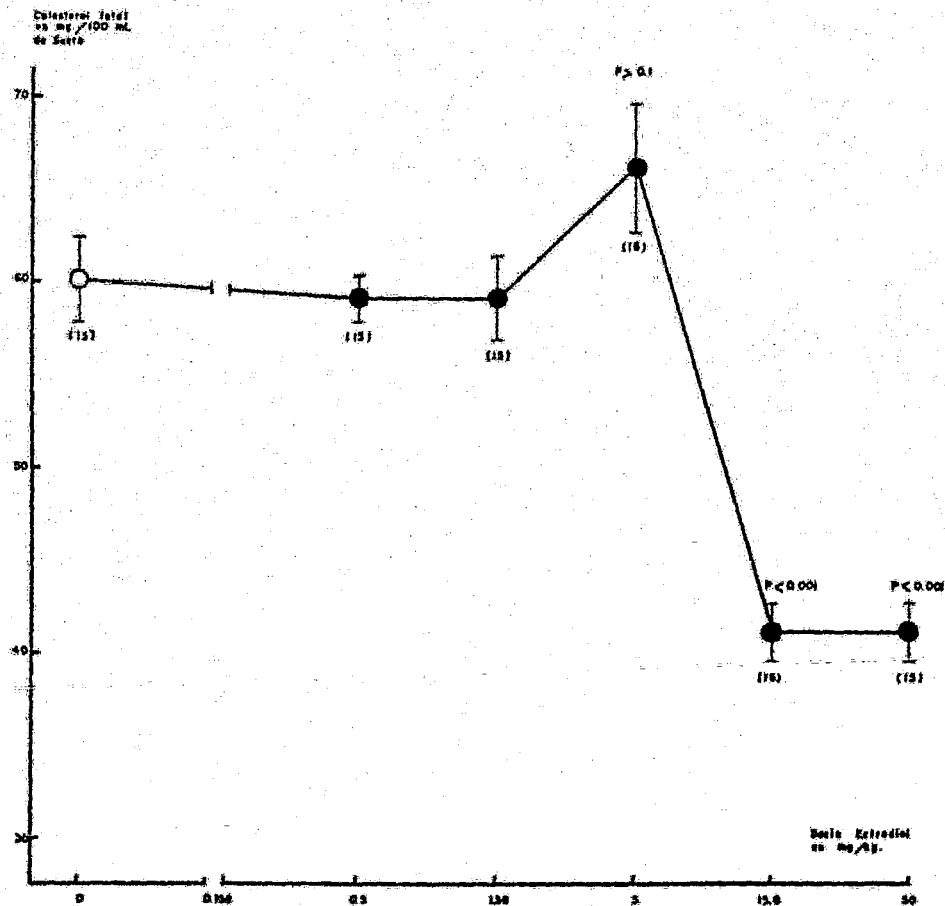


RELACION DOSES-RESPUESTA 24 HORAS DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE UNA INYECCION DE ESTRADIOL.

TABLA # 1

Lote	Tratamiento	# de ratas	Peso $\pm$ e.s.	Concentración de Colesterol Total en ug/100ml $\pm$ e.s.	Cambio Porcentual en relación al Control	Lote de Comparación	t	P
A	Control Absoluto	30	445 9.8	62 1.82				
B	Control Propilen	33	442 14.6	60 3.22	-3 %	A		
	Controles Reunidos	63		62 1.29				
	<u>Estradiol</u>							
2	1.58 ug/kg	17	439 13.8	59 2.74	-5 %	1	1.0454	>0.3
3	5 ug/kg	17	440 13.6	63 3.05	2 %	1	.3397	>0.7
4	15.8 ug/kg	17	438 12.9	59 2.88	-5 %	1	1.0353	>0.3
5	50 ug/kg	33	450 9.2	62 1.74	0 %	1	-	-
6	158 ug/kg	17	442 12.4	60 1.53	-3 %	1	.7640	>0.4
7	500 ug/kg	17	437 12.8	58 3.06	-6 %	1	1.357	>0.1
8	1580 ug/kg	17	436 12.8	46 2.25	-26 %	1	5.817	<0.001
9	5000 ug/kg	17	435 12.3	42 2.50	-32 %	1	7.1281	<0.001
10	15800 ug/kg	17	437 12.9	38 1.57	-39 %	1	9.1455	<0.001
11	50000 ug/kg	12	445 12.7	34 3.59	-46 %	1	8.5276	<0.001

figura No 2



RELACION Dosis-RESPUESTA 7 DIAS DESPUES DE LA ADMINISTRACION DE UNA INYECCION DE ESTRADIOL.

TABLA # 2

Lote	Tratamiento	# de ratos	Peso $\pm$ e.s	Concentración de Colesterol Total en mg/100ml $\pm$ e.s	Cambio Porcentual en relación al Control	Lote de Comparación	t	P
1	Control Absoluto	16	383 8.9	57 1.88				
2	Control Propilen Dosis de Estradiol	15	384 9.1	60 2.27	5 %	1	1.0222	> 0.3
3	0.500 mg / kg	15	384 8.7	59 1.30	- 2 %	2	.4963	> 0.6
4	1.58 mg / kg	15	384 8.8	59 2.32	- 2 %	2	.3081	> 0.7
5	5 mg / kg	16	384 8.8	66 3.63	10 %	2	1.3802	> 0.1
6	15.8 mg / kg	16	383 8.7	41 1.59	- 32 %	2	6.9246	< 0.001
7	50 mg / kg	15	384 8.9	41 1.67	- 32 %	2	6.7365	< 0.001

La colesterolemia se determinó a todos los animales siete días después de la inyección de estradiol ó de solvente.

Los resultados correspondientes a este estudio se presentan en la figura y tabla # 2. Las dosis de 0.5 mg y 1.58 mg por kg no produjeron ningun efecto en la concentración de colesterol sérico; la dosis de 5 mg produjo una pequeña elevación no significativa de la colesterolemia(10 %, $P > 0.1$). Con las dosis de 15.8 y 50 mg por kg se observó un efecto -- hipocolesterolemiante de gran magnitud (32 %, $P < 0.001$).

B) CURSO TEMPORAL DE LA RESPUESTA.

Para este estudio fueron seleccionadas dos dosis de estradiol; la dosis menor fué de 500 ug por kg, siendo la otra dosis de estradiol 10 veces mayor (5 mg por kg). Cada dosis fué estudiada en experimento distinto por lo tanto no son estrictamente comparables.

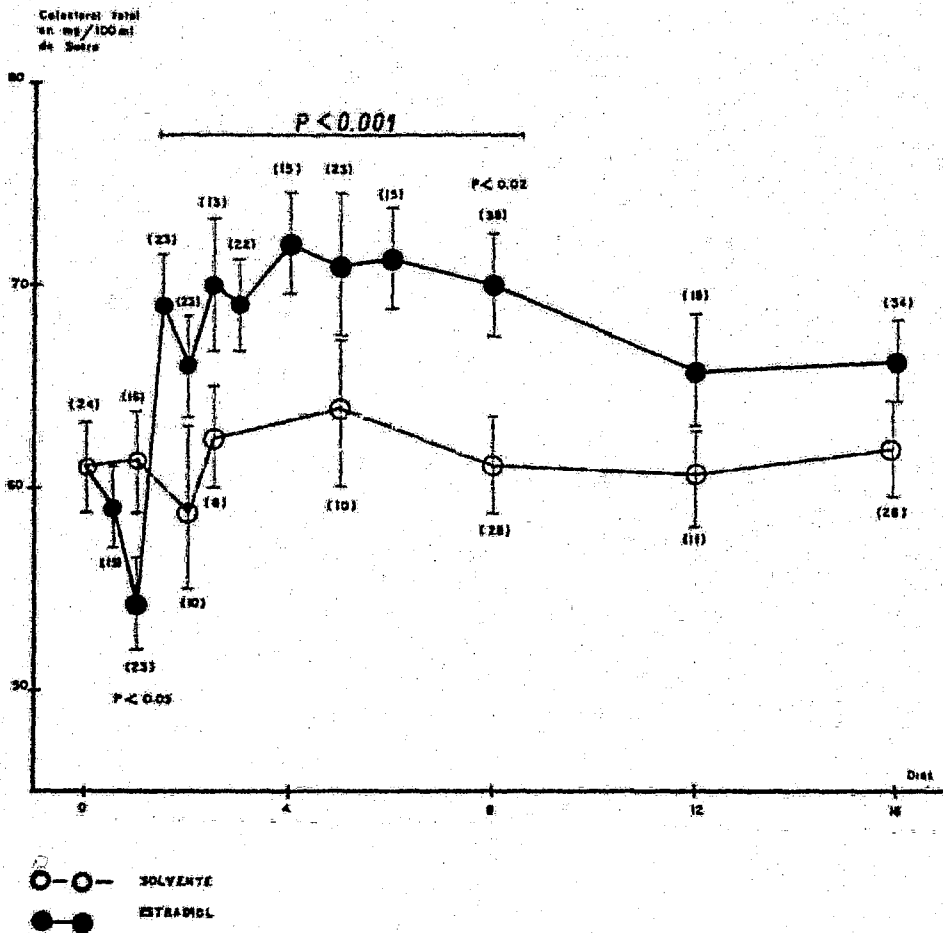
Curso Temporal de la Respuesta a la dosis de Estradiol de 500 ug por kg.

En este estudio se utilizaron 396 ratas macho adultas con un peso promedio de 364 ± 3.0 g. Las ratas recibieron una sola inyección de estradiol a la dosis de 500 ug por kg ó de solvente (aceite de sésamo).

La colesterolemia se determinó a todos los grupos simultáneamente, lo que varió para cada uno de ellos fué la hora y fecha de la inyección . La inyección precedió a la determinación de la colesterolemia desde 12 horas hasta 16 días para los diferentes grupos de ratas.

Tomando en cuenta la concentración de colesterol sérico observada y al intervalo de tiempo entre la inyección y la toma de sangre para la determinación de la colesterolemia se reconstruyó el curso temporal de la respuesta que aparece en la figura # 3 . Los resultados se expresan también

figura No 3



CURSO TEMPORAL DE LA RESPUESTA A LA ADMINISTRACION DE UNA INYECCION DE ESTRADIOL
A LA DOSES DE 500 μ g POR Kg.

TABLA # 3

Tiempo.	# de ratas	Peso $\pm$ e.s.	Concentración de Colesterol total en mg/100ml $\pm$ e.s.	Cambio Porcentual en relación al control.	Lote de Comparación	Lote	t	P
<u>0 días</u> <u>Control</u> <u>Aceto</u>	24	361 15.4	61 2.24			1		
1 día	16	368 13	61 2.40			2		
1½ días	10	368 18.9	65 3.36			3		
2 días	10	373 14.8	59 3.94			4		
2½ días	8	395 12.8	62 2.50			5		
5 días	10	398 14.2	64 3.81			6		
8 días	28	383 8.0	61 2.31			7		
12 días	11	393 13.9	61 2.76			8		
16 días	26	396 12.5	62 2.32			9		
<u>Estradiol</u>								
12 horas	15	316 11.9	59 1.95					
1 día	23	340 11.8	54 2.32	-12 %	2		2.042	<0.05
1½ días	23	343 11.1	69 2.57	6 %	3		.8914	>0.3
2 días	23	344 10.4	66 2.64	12 %	4		1.4633	>0.1
2½ días	13	377 11.9	70 3.29	12 %	5		1.6127	>0.1
3 días	22	347 11.1	69 2.33					
4 días	15	319 10.9	72 2.51					
5 días	23	344 10.5	71 3.46	12 %	6		1.2672	>0.2
6 días	15	318 9.9	71 2.45					
8 días	38	368 8.6	70 2.50	15 %	7		2.4696	<0.02
12 días	19	393 15.6	66 2.70	8 %	8			
16 días	34	396 11.7	66 1.91	6 %	9			

en la tabla # 3 . Se observa que a las 24 horas de la administración de una sola inyección de estradiol a la dosis de 500 ug por kg , se produjo una pequeña disminución de la concentración de colesterol sérico (12 %) que fué significativamente estadística ($P < 0.05$). Doce horas más tarde se observó una elevación pequeña que fué aumentando en los siguientes días.

En el octavo día la colesterolemia fué 15 % más alta que el valor control ($P < 0.02$) este efecto hipercolesterolemizante - disminuyó al 12° y 16° día de la administración de estradiol.

Curso Temporal de la Respuesta a la dosis de Estradiol de 5 mg por kg.

Para este estudio se utilizaron 270 ratas macho adultas con un peso promedio de 335 ± 4.5 g. que fueron distribuidas en los 15 grupos siguientes: un grupo sirvió de testigos sin tratamiento, de los 14 grupos de animales restantes, la mitad recibió una sola inyección de estradiol a la dosis de 5 mg por kg y la otra mitad una inyección de solvente (aceite de sésamo) .

Igual que para el estudio de la dosis de 500 ug por kg la colesterolemia se determinó a todos los grupos simultáneamente, lo que varió para todos ellos fué la fecha de la inyección. Para los distintos grupos de ratas la inyección precedió de 1 día a 16 días a la determinación de la colesterolemia.

El curso temporal de la respuesta que se presenta en la figura # 4 se reconstruyó de igual manera que en el experimento anterior , en la tabla # 4 se expresan los resultados . Se observa que la reducción producida por una inyección de estradiol a la dosis de 5 mg por kg, fué mayor (22%, $P < 0.001$) y más sostenida que la producida por la dosis de 500 ug por kg ; la hipocolesterolemia continuó aún con mayor inten-

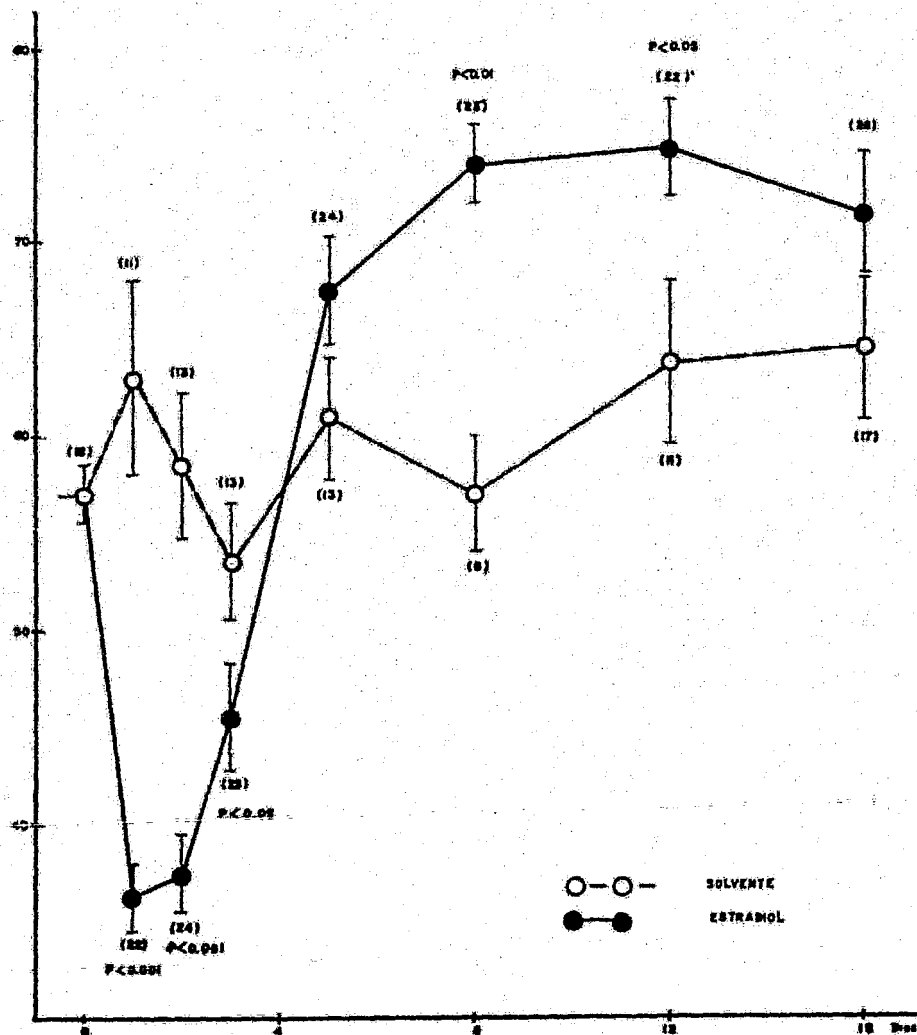
sidad el 2^o día (36 %, $P < 0.001$) disminuyendo este efecto en el 3^{er} día (15% , $P < 0.05$), aunque siguió siendo significativo el efecto .

En el 5^o día de la colesterolemia fué 11 % más alta que el valor control, este efecto hipercolesterolemizante alcanzó el máximo valor en el 8^o día (30 %, $P < 0.01$). El efecto persistió aunque de menor magnitud en el 12^o día (17 %, $P < 0.05$), en el 16^o día el aumento de la concentración de colesterol sérico fué aún menor (10.5 %) no siendo ya estadísticamente significativo el efecto ($P > 0.1$) .

Estos experimentos demuestran que el estradiol produce inicialmente un efecto hipocolesterolemizante relativamente breve, seguido de un efecto hipercolesterolemizante prolongado. En cuanto mayor es la dosis, mayor y más sostenido es el efecto de disminución de la concentración de colesterol sérico. También el aumento tardío de la colesterolemia aumenta al incrementarse la dosis.

Colostrado total
en mg/100 ml
de leche

figura No 4



CURSO TEMPORAL DE LA RESPUESTA A LA ADMINISTRACION DE UNA INYECCION DE ESTRADIOL

A LA DOSE DE 5 Mg POR Kg.

TABLA # 4

Tiempo	# de ratas	Peso $\pm$ e.s.	Concentración de Colesterol Total en mg/100ml $\pm$ e.s.	Cambio Porcentual en relación al Control	Lote de Comparación	Lote	t	P
<u>0 días</u> <u>Control</u> <u>Aceto</u>	18	385 15.7	57 1.65			1		
1 día	11	368 10.8	63 4.98			2		
2 días	13	325 19.6	58 3.67			3		
3 días	13	355 9.4	54 2.93			4		
5 días	13	321 17.9	61 3.10			5		
8 días	8	376 14.9	57 2.92			6		
12 días	11	381 14	64 4.24			7		
16 días	17	390 16.5	65 3.49			8		
<u>Estradiol</u>								
1 día	22	309 15.4	36 1.66	-22 %	2		6.366	< 0.001
2 días	24	301 13	37 1.86	-36 %	3		5.726	< 0.001
3 días	23	303 14.1	45 2.76	-15 %	4		1.892	< 0.05
5 días	24	309 13.4	68 2.86	11 %	5		1.550	> 0.1
8 días	23	311 11.7	74 2.04	30 %	6		2.8966	< 0.01
12 días	22	363 16.8	75 2.57	17 %	7		2.3484	< 0.05
16 días	28	373 20.6	71 3.27	10.5 %	8		1.359	> 0.1

II.-Efecto de Inyecciones repetidas

A) Administración diaria de estradiol

1.-Durante 3 días.

Se utilizaron 107 ratas macho adultas con un peso promedio de 392 ± 3.9 g. que fueron distribuidas en los 9 grupos siguientes: testigos sin tratamiento, testigos que recibieron el solvente (1,2, propanodiol) y los 7 lotes restantes que recibieron el estradiol a las dosis siguientes por kg de peso corporal: 158 ug, 500 ug, 1.58 mg, 5 mg, 15.8 mg, 50 mg y - 158 mg.

Las ratas recibieron una inyección diaria de estradiol ó de solvente durante 3 días. La determinación de la colesteroemia se les hizo a todos los animales 24 horas después de la última inyección .

Los resultados correspondientes a este estudio, se presentan en la figura y tabla # 5 . Las dosis de estradiol corresponden a las dosis totales inyectadas .

Con la dosis total más pequeña que se administró(500 500 ug por kg) ya se observa una concentración de colesterol menor a la de los testigos que recibieron el solvente, aunque esta diferencia no fué significativa (8 %, $P > 0.1$), este efecto aumentó con incremento de la dosis. A partir de la dosis de 1.58 mg por kg el efecto hipocolesterolemiaante fué significativo(27 %, $P < 0.001$) comparado con el valor de las ratas testigos; hasta alcanzar el máximo descenso con la dosis de 500 mg por kg (59 %, $P < 0.001$).

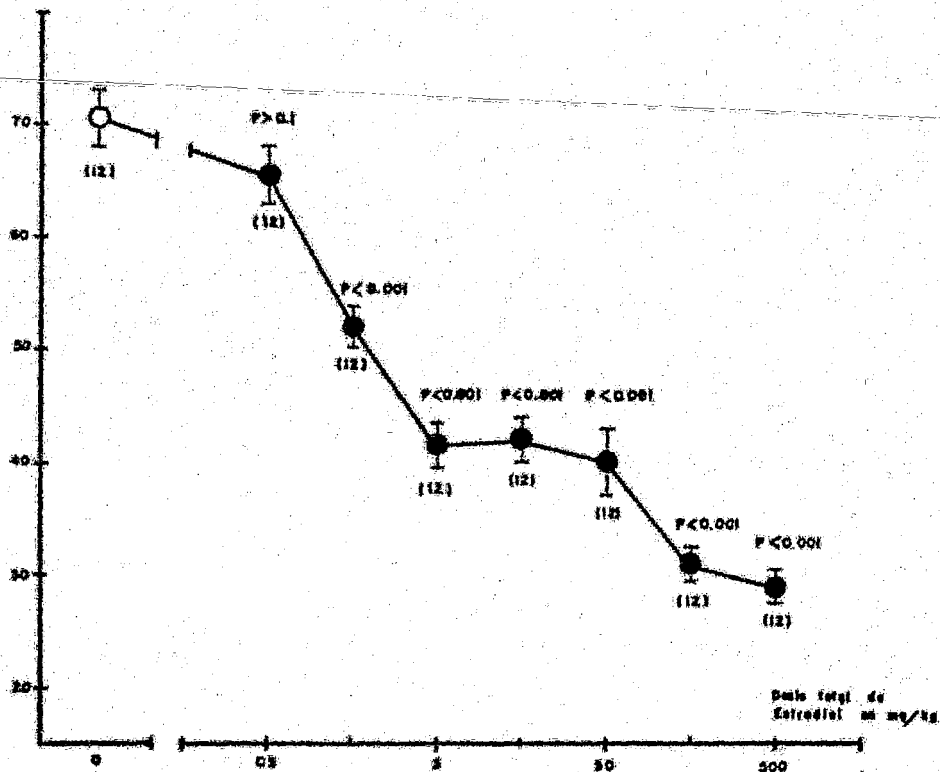
2.- Administración diaria durante 9 días.

a) Dosis de estradiol de 5 ug por kg por día, hasta 500 ug por kg por día.

Para este estudio fueron utilizadas 98 ratas macho adultas, con un peso promedio de 370 ± 4.4 g. Estos animales se distribuyeron en los 7 grupos siguientes: testigos sin --

Concentrația de Colesterol
Total în mg/100 ml

figura No. 5



Relația dintre concentrația de Colesterol Total și doza de Estradiol administrată zilnic timp de 3 zile.

TABLA # 5

Lote	Tratamiento	# de ratas	Peso $\pm$ s.e.	Concentración de Colesterol Total en $\mu\text{g}/100\text{ml} \pm$ s.e.		Cambio Porcentual en relación al Control	Lote de Comparación	t	P
1	Control Absoluto	11	388 10.2	60	1.3				
2	Control Propileno	12	393 11.7	71	2.5	17 %	1		
	Dosis de Estradiol								
3	158 $\mu\text{g}/\text{kg}$	12	396 12.5	66	2.7	- 8 %	2	1.483	>0.1
4	500 $\mu\text{g}/\text{kg}$	12	394 12.8	52	1.7	- 27 %	2	6.2706	< 0.001
5	1.58 mg/kg	12	394 12.6	42	2.1	-41 %	2	9.057	< 0.001
6	5 mg/kg	12	393 12.3	42	1.8	-42 %	2	9.421	< 0.001
7	15.8 mg/kg	12	394 12.5	40	2.8	-44 %	2	8.293	< 0.001
8	50 mg/kg	12	384 10.8	31	1.6	-56 %	2	13.579	< 0.001
9	158 mg/kg	12	393 11.3	29	1.3	-59 %	2	14.730	< 0.001

tratamiento, testigos que recibieron el solvente (aceite de sésamo) y los 5 grupos restantes recibieron una inyección diaria de estradiol durante 9 días, a las dosis siguientes por kg de peso corporal : 5 ug, 15.8 ug, 50 ug, 158 ug y 500 ug. La determinación de la colesterolemia se hizo a todos los animales 24 horas después de la última inyección.

Los resultados se expresan en la figura # 6 y tabla # 6 . La dosis de 5 ug por kg produjo un aumento significativo de la concentración de colesterol sérico(12 %, $P < 0.05$). Este efecto hipercolesterolemizante se incrementó aún más con la dosis de 15.8 ug por kg(15.5 %, $P < 0.01$). Las dosis de estradiol de 50 y 158 ug por kg produjeron un aumento menor que no fué significativo ($P > 0.1$).

b) Dosis de estradiol de 5 mg por kg por día.

En este experimento se estudió el efecto del estradiol a la dosis de 5 mg por kg por día, comparándole con animales testigo que recibieron solamente el solvente(aceite de sésamo).

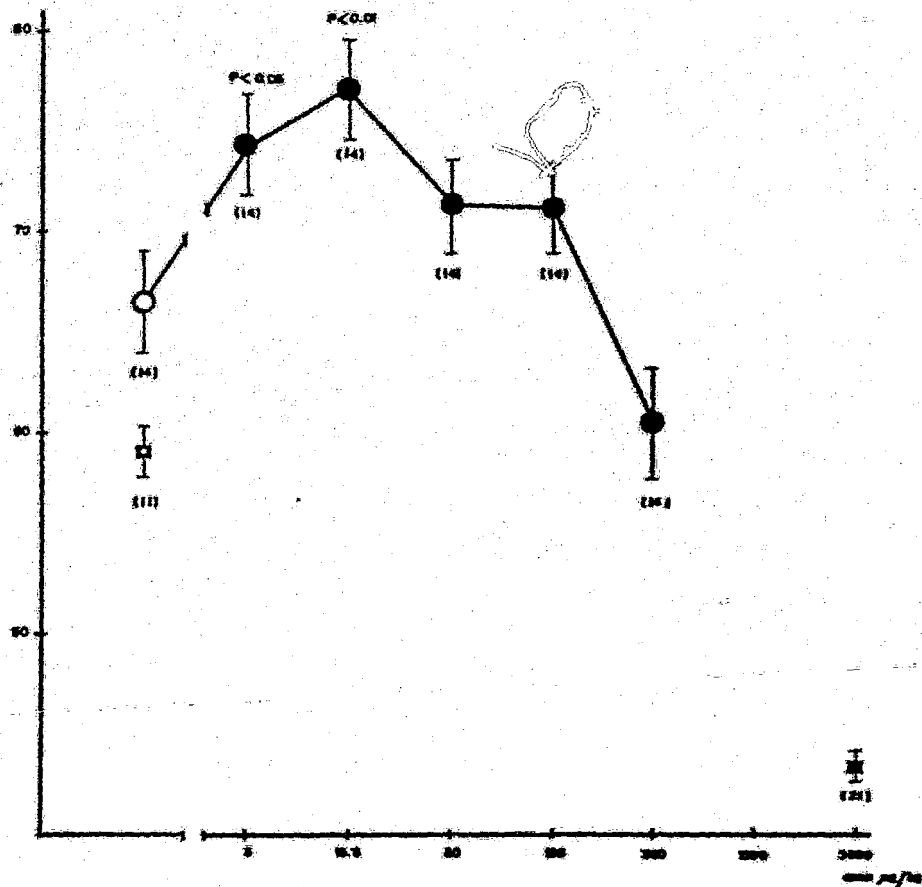
Se utilizaron 32 ratas macho adultas con un peso promedio de 348 ± 8.2 g. que fueron distribuidas en los 2 grupos siguientes: testigos tratados con el solvente y ratas que recibieron el estradiol a la dosis de 5 mg por kg por día.

Todas las ratas recibieron una inyección diaria de estradiol ó de solvente durante 9 días. La determinación de la colesterolemia se hizo 24 horas después de la última inyección .

Los resultados se expresan separadamente en la figura y tabla # 6. Se observa que el estradiol a la dosis de 5 mg por kg, produjo un efecto hipocolesterolemizante significativo (26.5 %, $P < 0.01$).

figure No 6

Colorectal total
en mg/100ml
de Sero



RELACION Dosis-RESPUESTA A LA ADMINISTRACION DIARIA DE ESTRADIOL
DURANTE 8 DIAS.

TABLA # 6

Lote	Tratamiento	# de ratas	Peso $\pm$ s.e.	Concentración de colesterol total en mg/100ml $\pm$ s.e.	Cambio Porcentual en relación al Control	Lote de Comparación	t	P
1	Control Absoluto	14	369 10.1	63 1.56				
2	Control Aceite	14	371 10	66 2.57	6 %	1	1.3289	> 0.1
	Dosis de Estradiol							
3	5 ug/kg	14	369 10.4	74 2.51	12 %	2	2.1714	< 0.05
4	15.8 ug/kg	14	370 10.2	77 2.59	15.5 %	2	2.8234	< 0.01
5	50 ug/kg	14	370 10.1	71 2.21	7 %	2	1.4163	> 0.1
6	158 ug/kg	14	370 10.2	71 2.18	7 %	2	1.3649	> 0.1
7	500 ug/kg	14	371 10.	60 2.67	-9 %	2	1.6562	> 0.1
A	Control Absoluto	10	349 12	65 0.79				
B	Control Aceite	11	347 10	59 0.92		A		
	<u>Estradiol</u>							
C	5 mg/kg	21	349 6.5	43 0.63	-26.5 %	B	3.4176	< 0.01

B) Respuesta a la administración de estradiol 2 veces por semana, durante 6 semanas.

Se utilizaron 46 ratas macho adultas con un peso promedio de 418 ± 13 g. que fueron distribuidas en los tres grupos siguientes : testigos que recibieron el solvente (1,2, propanodiol) y los dos lotes restantes, recibieron el estradiol a las dosis de 50ug. y 500 ug. por kg. de peso respectivamente.

En este experimento el estradiol era inyectado dos veces por semana (martes y jueves) como en los experimentos de Fillios (1957). El tratamiento fué continuado durante 6 semanas y la determinación de la colesterolemia se hizo 4 días después de la última inyección (lunes).

Los resultados correspondientes a este estudio se presentan en la figura y tabla #7 . El estradiol a la dosis de 50 ug. por kg., produjo un aumento de 18 % en la concentración de colesterol sérico ($P < 0.01$), este efecto fué aún mayor con la dosis de 500ug. por kg. (29 % , $P < 0.001$).

C) Relación dosis - respuesta a la administración semanal del estrógeno durante 3 semanas.

En este estudio se utilizaron 110 ratas macho adultas con un peso promedio de 383 ± 8.8 g. que fueron distribuidas en los 7 grupos siguientes: testigos sin tratamiento, testigos que recibieron el solvente(1,2, propanodiol). Los grupos siguientes recibieron una inyección semanal de estradiol durante 3 semanas, al mismo tiempo se inyectaron con solvente las ratas testigo .

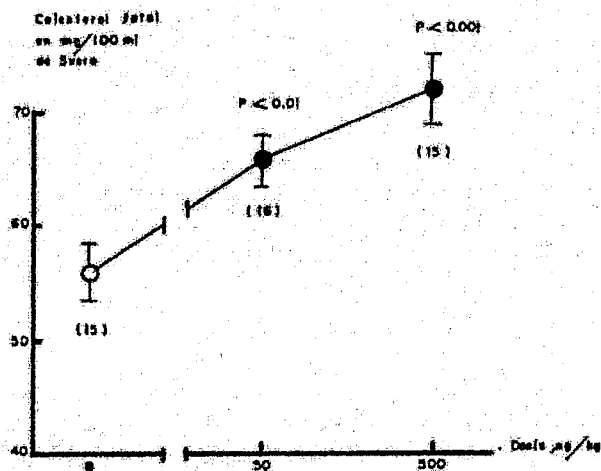
Las dosis de estradiol en mg por kg de peso fueron las siguientes: 0.158, 0.500, 1.58 , 5 y 15.8.

Los resultados correspondientes a este experimento se expresan en la figura y tabla # 8 . Las dosis de estradiol de 0.158 mg y 0.500 mg por kg, produjeron ligeras variaciones,

que no fueron significativas. Con la dosis de 1.58 mg por kg se observó un aumento significativo de la colesterolemia - (20 %, $P < 0.01$) este efecto hipercolesterolemizante se incrementó aún más con la dosis de 5 mg por kg (25 %, $P < 0.001$).

Aún cuando la dosis de 15.8 mg por kg es mayor que las anteriores, produjo un aumento menor y no significativo (12 % $P > 0.1$). Esto podría deberse a que la acción hipocolesterolemizante de estas dosis elevadas , persiste durante un tiempo prolongado (véase figura # 2).

figura No. 7

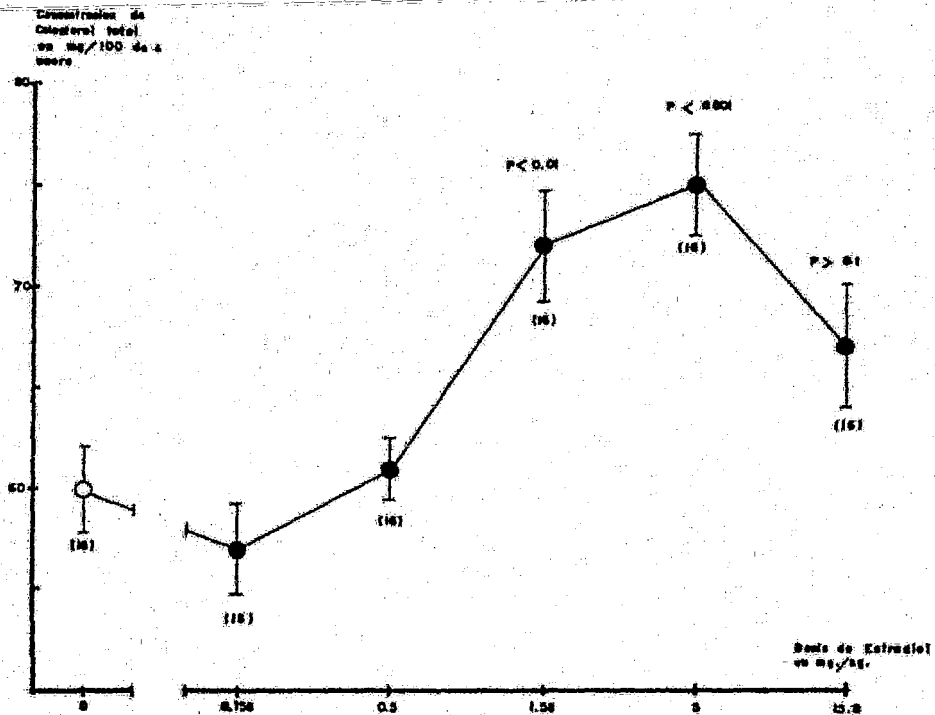


RESPUESTA A LA ADMINISTRACION DE ESTRADIOL DOS VECES POR
SEMANA DURANTE 6 SEMANAS.

TABLA # 7

Lote	Tratamiento	# de ratas	Peso $\pm$ e.s.	Concentración de Colesterol Total en mg/100ml $\pm$ e.s.	Cambio Porcentual en relación al Control	Lote de Comparación	t	P
1	Control Propileno Dosis de Estradiol	15	442 17.3	56 2.50				
2	50 ug/kg	16	420 11.6	66 2.29	18 %	1	2.91	< 0.01
3	500 ug/kg	15	392 10.6	72 3.17	29 %	1	3.91	< 0.001

figura No. 8



RELACION DOSES-RESPUESTA A LA ADMINISTRACION DE ESTRADIOL UNA VEZ POR SEMANA
DURANTE 3 SEMANAS.

TABLA # 8

Lote	tratamiento	# de ratas	Peso $\pm$ e.m.	Concentración de Colesterol Total en mg/100ml $\pm$ e.m.	Cambio Porcentual en relación al Control	Lote de Comparación	t	P
1	Control Absoluto	16	383 8.9	57 1.88				
2	Control Propilen	15	384 9.1	60 2.27	5 %	1	1.6222	> 0.3
	Dosis de Estradiol							
3	0.158 mg/kg	15	383 8.8	57 2.33	-5%	2	.9224	> 0.3
4	0.500 mg/kg	16	383 8.7	61 1.64	2 %	2	.4322	> 0.6
5	1.58 mg/kg	16	383 8.8	72 2.92	20 %	2	3.2171	< 0.01
6	5 mg/kg	16	383 8.9	75 2.87	25 %	2	4.063	< 0.001
7	15.8 mg/kg	16	383 8.8	67 3.44	12 %	2	1.6745	> 0.1

RESUMEN

El presente estudio tuvo el propósito de tratar de aclarar las observaciones contradictorias que aparecen en la literatura, respecto a la acción del estradiol sobre la colesterolemia de la rata. Se utilizaron ratas macho adultas procedentes de la cepa Wistar y el colesterol se cuantificó siguiendo el micrométodo fluorométrico de Carpenter y colaboradores.

Se hizo una exploración más amplia y minuciosa la cuál comprendió los siguientes estudios:

I.- Efecto de una sola inyección de estradiol.

1.- Efecto a las 24 horas .- En la determinación de la colesterolemia 24 horas después de la inyección de estradiol, se observó que dosis mayores de 500 ug por kg produjeron descensos significativos de la colesterolemia.

2.- Efecto a los 7 días.- En este estudio se trató de ver si el efecto hipocolesterolemiante producido por dosis grandes de estradiol a las 24 horas, perduraba después de una semana. Solo con las dosis de estradiol de 15.8 mg y 50 mg por kg, el efecto hipocolesterolemiante persistió al cabo de este tiempo.

3.- Curso Temporal de la Respuesta.- Para este estudio fueron seleccionadas dos dosis de estradiol y el efecto de cada una de ellas fue estudiado separadamente. En la dosis de estradiol de 500 ug por kg la inyección precedió a la determinación de la colesterolemia desde 12 horas hasta 16 días . En la dosis de 5 mg por kg la inyección precedió de 1 día a 16 días a la determinación.

El curso temporal de la respuesta en ambas dosis se reconstruyó tomando en cuenta la concentración de colesterol sérico observada y el intervalo de tiempo en-

tre la inyección y la toma de sangre para la determinación de la colesteroemia.

En una y otra dosis se observó que el estrógeno produce inicialmente un efecto hipocolesterolemiante relativamente breve, seguido de un efecto hipercolesterolemiante prolongado. En cuanto mayor fué la dosis, mayor y más sostenido fué el efecto de disminución de la concentración de colesterol sérico, también el aumento tardío de la colesteroemia aumentó al incrementarse la dosis.

II.- Efecto de Inyecciones Repetidas de Estradiol.

- 1.-Respuesta a la administración diaria de estradiol durante 3 días.- En la determinación de la colesteroemia 24 horas después de la tercera inyección, se observó que dosis grandes de estradiol (de 1.58 a 500 mg por kg) produjeron efectos hipocolesterolemiantes significativos. A medida que la dosis aumentó el efecto hipocolesterolemiante fué siendo mayor.
- 2.-Respuesta a la administración diaria de estradiol durante 9 días.- Al hacer la determinación de la colesteroemia 24 horas después de la última inyección, se observó con dosis pequeñas de estradiol (de 5 ug a 158 ug por kg) un aumento en la concentración de colesterol sérico de la rata. Este efecto hipercolesterolemiante fué significativo con las dosis de 5 ug y 15.8 ug por kg.
- 3.-Respuesta a la administración de estradiol 2 veces por semana durante 6 semanas.- Igual que en el estudio anterior las dosis pequeñas de estradiol (50 ug y 500 ug por kg) produjeron efectos hipercolesterolemiantes significativos. La determinación de la colesteroemia se hizo 4 días después de la última inyección.
- 4.-Respuesta a la administración de estrógeno una vez por

semana durante tres semanas.- En la determinación de la colesterolemia 7 días después de la última inyección, se observó con dosis grandes de estradiol -- (1.55 mg y 5 mg por kg) un aumento significativo de la colesterolemia.

DISCUSION.

Los resultados obtenidos en este estudio muestran que el estradiol puede producir tanto una disminución como un aumento en la concentración de colesterol sérico. Las condiciones experimentales determinan cuál de las dos acciones es la que se observa.

Comparación de las dos acciones del estradiol sobre la colesterolemia.

Las dos acciones del estradiol se diferencian no solo en el sentido que modifican la concentración de colesterol sérico, sino también en los siguientes parámetros. En la Latencia ó sea el tiempo que transcurre entre la administración del estrógeno y el principio de la respuesta. En la duración de los efectos. En las dosis necesarias para producirlos, así también como en la magnitud de cada efecto. A continuación se discuten estas diferencias.

Latencia.— Al estudiar el curso temporal de la respuesta después de una inyección única de estradiol (figura # 3 y figura # 4) se puede observar el efecto hipocolesterolemizante a las 24 horas de la administración de estrógeno. El efecto — hipercolesterolemizante se manifiesta posteriormente a las 36 horas en el experimento que se ilustra en la figura # 3 y a los 5 días en el experimento que corresponde a la figura # 4.

Duración de los efectos.— La respuesta hipocolesterolemizante es de duración breve. Con la dosis de estradiol de 500 ug por kg (figura # 3) la disminución de la colesterolemia se observa a las 24 horas de la inyección y 12 horas más tarde ya ha desaparecido este efecto y por el contrario la concentración de colesterol sérico ya está aumentada. El aumento de la colesterolemia dura aproximadamente 6 días.

Con la dosis de 5 mg por kg (figura # 4) la respuesta hipocolesterolemizante también se observa a las 24 horas de

la inyección y persiste 3 días el efecto. La respuesta hipercolesterolemia que le sucede tiene una duración de 7 días.

Con dosis mayores de estradiol la respuesta hipocolesterolemia fué aún más duradera, persistiendo este efecto a los 7 días de haber administrado el estrógeno (figura # 2).

Dosis necesaria para producir los efectos.- Los resultados de este estudio sugieren que para producir efectos hipocolesterolemias se requieren dosis mayores de estradiol de las que son necesarias para observar efectos hipercolesterolemias .

En la figura # 6 se observa que las dosis menores de estradiol (5 ug y 15.8 ug por kg) produjeron un efecto hipercolesterolemia; con dosis mayores (50 ug y 158 ug por kg) este efecto fué disminuyendo de tal manera que con la dosis de 500 ug por kg, no solo desapareció el efecto hipercolesterolemia sino que se produjo una ligera disminución de la colesterolemia por debajo del valor correspondiente a los animales testigo; con una dosis aún mayor (5 mg por kg) se observó un efecto hipocolesterolemia de gran magnitud - (26.5 %, $P < 0.01$).

Relación entre la dosis y su efecto.- Las dosis mayores de estradiol produjeron disminuciones mayores de la colesterolemia . Obsérvese en la figura # 1 y # 5, como con las dosis mayores el efecto hipocolesterolemia fué mayor.

Esto mismo se observó con respecto a dosis menores de estradiol, que produjeron efectos hipercolesterolemias. En la figura # 6 la dosis mayor de estradiol 15.8 ug por kg produjo un efecto hipercolesterolemia mayor que la dosis de 5 ug por kg. Así también en la figura # 7 con la dosis de estradiol de 500 ug por kg, se observó un aumento de la colesterolemia mayor que a la dosis de 50 ug por kg.

Magnitud de cada uno de los efectos.- Como se ha señalado anteriormente dosis pequeñas de estradiol producen efectos hipercolesterolemias, sin que se observen efectos hipocoles-

terolemiantes. Esta circunstancia favorece que a dosis relativamente pequeñas el efecto hipocolesterolemiante sea mayor (figura # 6) . Sin embargo a dosis elevadas el efecto inicial hipocolesterolemiante es de magnitud considerablemente mayor, que el efecto hipercolesterolemiante tardío, (véase figura # 3 y figura # 4).

CONCLUSIONES.

El estradiol posee dos efectos sobre la colesterolemia, cada uno de estos efectos posee características diferentes en cuanto a: latencia, magnitud, duración del efecto, dosis necesarias para producir el efecto y relación dosis efecto.

Los estudios publicados en la literatura en ratas con dieta normal a las cuales se determinó la colesterolemia a las 24 horas de la última administración de estradiol, muestran un descenso de la concentración de colesterol sérico - (4, 17, 23, 29). En cambio cuando las determinaciones de colesterol sérico se llevaron a cabo varios días después de la última inyección, se observó una elevación de la colesterolemia (13, 28, 31, 34).

Estas observaciones concuerdan con las obtenidas en este estudio en el sentido de que el efecto hipocolesterolemizante se observa a las 24 horas de la inyección; mientras que la elevación de la colesterolemia se observa preferentemente varios días después de la administración del estrógeno.

La manera como actuó el estradiol sobre la colesterolemia, depende en mucho de las condiciones experimentales en las que se realice el estudio; por lo tanto los diversos autores observaron uno u otro de los dos efectos que produce el estradiol.

Los resultados de este estudio permiten integrar los hallazgos de todos los autores, en un concepto más completo de la acción del estradiol sobre la colesterolemia de la rata.

BIBLIOGRAFIA.

- 1.- Anitschkow N. Über die Veränderungen der Kaninchen. Aorta bei experimental-cholesterin steatosa. Beitrax path. Anat. u. s. All. Path 56: 379. 1913.
- 2.- Bixxi A, Veneroni S, Garattini S. Journal Atheroscler Res 3: 121-8, 1963.
- 3.- Boyd E.M. and Connell W.F. Quart. F. Med. 5: 455. 1936.
- 4.- Boyd J.S. Endocrines in Lipid Metabolism. Fed. Proc. 20 : 152-60. 1961.
- 5.- Boyd J.S. Effect of Linoleate and estrogens on cholesterol metabolism. Fed. Proc. 21.4 Pt. 2: 86-92. 1962.
- 6.- Boyd J.S. and W. Mac Guire. Biochem J. 62.19 p. 1958.
- 7.- Bricaire H. Estrogens and Atherosclerosis. Coeur Med. Intern 2: 15-20 Jan. 1963.
- 8.- Carpenter K.J; A gotsis and D.M. Hegsted. Estimation of total cholesterol in serum by micromethod. Clin Chem. 3: 233-38. 1957
- 9.- Dauber T.R. and Kanell W.B. Suceptibility to Coronary heart Disease Modern Concepts of Cardiovascular Disease. Heart Bull. 8: 82. 1959.
- 10.- Engelberg H. and Glass S. Influence of phisiologic doses of sex steroids hormones on serum lipids and lipoproteins in humans. Metabolism 4: 298 . 1955
- 11.- Estrogens in the treatment of Atherosclerosis. J. A. M. A. 183: 682. Feb 1963.
- 12.- Feldman J.D. and Demovsky. Effect of estrogens on the metabolism on proteins blood. Endocrinology 59: 463-71. 1956
- 13.- Fillios L.C. The gonadal regulation of cholesterolemia in the rats. Pag 22-9. Endocrinology 60(1). Jan 1957.
- 14.- Fieser L. J. Am Chem. Soc. 75: 4395. 1953.
- 15.- Fisher and Yates. Statistical Tables for Biological Agricultural and Medical Research. Edimburg London & Great.
- 16.- Garattini S. and Paoletti R. Drugs affecting Lipid Metabolism.
- 17.- Gordon S. and Poll E.F. Celentak U. Albers J. Mauer S. Stolar

S.M.

- S.M. and S. Bernstein. Steroid and Lipid Metabolism. The hypocholesterolemic effect of estrogens metabolites. Steroids and International Journal .Pag 267. 1964.
- 18.-Kato H. Estrogens and Lipid Metabolism .Folia Endocrinology (Jap) 38:648-92, Oct 1962.
- 19.-Katz L.H. and Stamler J. Experimental Atherosclerosis. Springfield III. Charles C. Thomas Publisher 1952. pag 258
- 20.-Katz L.H. and Pick R. Hipercholesterolemia and Heart Disease. Heart Bull. 8:82 1959.
- 21.-Kaplan M.B. and Gruness J. Emotional Aspects of estrogens therapy in men with coronary atherosclerosis.
- 22.-Kinmerling M.W. Concepts ,Theory and Treatment of atherosclerosis. J. Amer .Geriatric Soc. 10: 865-76. 1962.
- 23.-Kiyohisa U. Kadowaki M. and T. Miyake .Endocrinology 76: 706-70 . April 1965.
- 24.-Levin L. Endocrinology 37: 34. 1945.
- 25.-Macaluso M; Guarini G. Estrogens therapy in atherosclerosis Vasculopathies. Sicilia Sanit. 14: 500-2, Dic 1961.
- 26.- Halinow M.R. and Moguilevsky J.A. Effect of estrogens on atherosclerosis. Effect of incubate arteries on estradiol containig media. Nature (London) 190: 423-24. April 1961.
- 27.-Halinow M.R. and Pellegrino A.A. The effect of estradiol on spontaneous and experimental atherosclerosis in the rat A.M.A. Archives of Pathology. Pag 47-55. 65(1). Jan 1958.
- 28.-Moskowitz M.S; Moskowitz A.A. and Wisler R.W. Changes in serum lipids and coronary arteries of the rat in response to estrogens . A.M.A. Arch .Path. Vol 61. Pag 245. 1956.
- 29.-Moskowitz M.S. and Wisler R.W. Some Biological Aspects of estrogens in male rats with special reference to blood - lipids and vascular sudanophilia. Journal Atheroscler Res 1: 423-33. Sept-Dec .1961.
- 30.-Jwen D. Efficacy of drugs in lowering blood cholesterol

Clin Med.N.Amer. 4:347-53 . March 1964.

- 31.- Okey R and Lyman M. Food intake and oestrogenic hormones, effect on serum and tissue cholesterol.*J.Nutr*, 60 (65), 1956.
- 32.- Pekkarinen A.Kerpola I and PetrolR. *Acta Endocrinology* Kbh 10: 3 Jul. 1952.
- 33.- Pick R. Stamler J. and Katz L.N. Influence of estrogens on lipids and atherosclerosis in experimental animals in hormones and atherosclerosis. Edited by G.Pincus New York, Academic press Inc. Chap 18. Pag 229. 1955.
- 34.- Priest R.E; Schroeder M.T; Rasmussen R. and Wisler R.W. Quantitative study of influence of estrogenic substances on serum lipids of rat fed atherogenic diet. Pag 228. *Proc. Soc. Exper.Biol (N.Y)* 96: 2 Nov 1957.
- 35.- Ray H. Rosenman; M.D. Meyer; Friedman M.D. and Sanford O. Byers P.H.D. The effect of various hormones upon the - synthesis of cholesterol in rats. *Endocrinology* 51:142 1952.
- 36.- Rivin A. and Dimitroff S.P. The incidence and severity of atherosclerosis in estrogens treated males and in females with and hypoestrogenic or a hyperestrogenic State. *Circulation* 9 : 533. 1954.
- 37.- Robbin S.R. and Dack S. Atherosclerosis. A review of - predisposing factor and the problem of treatment. *J.M.T Sinai Hosp.* 22: No 1. 34 .1955.
- 38.- Uchida K. and T. Miyake . *Ann Rep.Shionogy Res. Lab II* pag 119 . 1961.
- 39.- Wissler R.W; Ellert M.L; Schoeder M.A. and Cohen L. Productions of lipomatous and ateromatous arterial lesions in the albino rats A.M.A. *Arch. Path.* 57: 339. 1954
- 40.- Williams G. Cochran and Gertrude M. Cox. *Experimental Designs . Second Edition.*