

BIBLIOTECA FAC. DE QUIMICA



LA AUSENCIA DE RESPUESTA HIPOCOLESTERO-
LEMIANTE A LOS ESTROGENOS EN EL RATON

TESIS PROFESIONAL

MARIA ESTELA CALDERON ORTEGA

MEXICO, D. F.

1969



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO.

FACULTAD DE QUÍMICA.

LA AUSENCIA DE RESPUESTA HIPOCOLESTEROLEMIANTE

A LOS ESTROGENOS EN EL RATÓN.

MARIA ESTELA CALDERON ORTEGA.

1969.

PRESIDENTE	Prof. JUAN J. MANDOKI WEISTNER
VOCAL	Prof. ANA L. VALERO IBARRA.
SECRETARIO	Prof. CONSUEL RUBIO POO.
1er. SUPLENTE	Prof. SOCORRO RECINAS PEREZ.
2do. SUPLENTE	Prof. ALFREDO GARZON SERRA.

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA,
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA
DE LA FACULTAD DE MEDICINA.

SUSTENTANTE	MARIA ESTELA CALDERON ORTEGA
ASESOR DEL TEMA	JUAN J. MANDOKI WEISTNER.
SUPERVISOR TECNICO.	CONSUELO RUBIO POO.

A MIS PADRES

A MIS HERMANOS

A MIS MAESTROS:

DR. JUAN JOSE MANDOKI

Y

CONSUELO RUBIO.

AGRADEZCO AL DR. RAMON PEREZ CIRERA
JEFE DEL DEPTO DE FARMACOLOGIA DE -
LA FACULTAD DE MEDICINA, EL HABER -
PERMITIDO LA REALIZACION DEL PRESENT
TE ESTUDIO.

CONTENIDO.

- I. - INTRODUCCION
- II. - PLAN GENERAL DEL ESTUDIO.
- III. - MATERIAL Y METODO.
- IV. - RESULTADOS OBTENIDOS.
- V. - DISCUSION Y CONCLUSIONES.
- VI. - REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

INTRODUCCION.

La aterosclerosis es una enfermedad caracterizada por depósitos y otros líquidos en las paredes arteriales, y constituye la principal causa de muerte en los países de gran desarrollo económico, debido a su abundante alimentación (31).

Estudios estadísticos en humanos, han demostrado que -- existe una correlación entre la hipercolesterolemia y el aumento en la frecuencia de enfermedades ateromatosas (23,24,27,30). En estudios de laboratorio, efectuados en animales se ha demostrado que dietas que elevan la concentración de colesterol sérico, producen aterosclerosis (34).

Hasta ahora, no se conoce un agente terapéutico eficaz para disminuir la concentración de colesterol total sérico. Se sabe que los estrógenos producen un efecto hipocolesterolemizante en el hombre y en diversos animales, sin embargo su uso en la terapéutica es muy limitado debido a sus indeseables efectos colaterales, principalmente a su efecto feminizante. El descubrimiento de un agente terapéutico de gran eficacia cuyos efectos colaterales fueran mínimos, sería de suma importancia.

El contar con un animal de laboratorio que pueda adquirirse fácilmente en gran número y que responda a los agentes hipocolesterolemizantes en forma semejante al género humano, es un factor muy importante que permite la búsqueda en gran escala de

agentes hipocolesterolemiantes con mínimos efectos colaterales.

Existen numerosos estudios respecto a la acción de estrógenos sobre la colesterolemia de la rata (2,3,4,6,11,13,14, - 15,18,19,20,21,24). También se ha estudiado la acción de estrógenos en el conejo (5,7,10,29), en el cobayo (29) y en el humano (17,27).

La acción de estas hormonas en los diversos mamíferos - estudiados parece corresponder al siguiente patrón: Dosis elevadas producen un descenso en la concentración de colesterol sérico. Además ciertos estrógenos (estradiol, estriol, etinilestradiol metil eter) administrados a dosis pequeñas durante periodos prolongados producen un aumento en la concentración del colesterol sérico.

Siendo el ratón uno de los mamíferos más fáciles de tener en laboratorio en gran número, y en vista de que ya existen micrométodos para la cuantificación de colesterol en volúmenes muy pequeños de suero (0.02 ml), ésta especie podría ser particularmente útil en la búsqueda de agentes hipocolesterolemiantes para uso eventual en la terapéutica humana. Por todo esto - resulta sorprendente que una búsqueda cuidadosa en la Literatura, no halla permitido localizar ningún trabajo en que se estudio el efecto de estrógenos sobre la colesterolemia del ratón.

para obtener esta información, se llevó a cabo el presente estudio.

PLAN GENERAL DEL ESTUDIO.

La acción de los estrógenos sobre la colesterolemia de la rata ha sido ampliamente estudiada en México por Mandoki y colaba. (6,14,15,30). Se han llevado a cabo diversos experimentos en los cuales se han estudiado los diferentes parámetros - que intervienen en el mecanismo de la acción, tales como:

Latencia. - Se ha podido observar un efecto hipocolesterolemizante a las 24 H. de administrado el estrógeno, así como un efecto hipercolesterolemizante que se manifiesta una vez que ha pasado el efecto hipocolesterolemizante. El período de latencia depende también de la dosis utilizada.

Duración de los efectos. - Cuando las dosis del estrógeno son pequeñas (500 ug/Kg) la respuesta hipocolesterolemizante es de breve duración, aproximadamente 12 horas, en tanto -- que la respuesta hipercolesterolemizante dura aproximadamente -- 6 días. Con dosis mayores, la respuesta hipocolesterolemizante -- persiste aún después de más de 12 días de administrado el estrógeno.

Dosis necesaria para producir los efectos. Dosis de estrógenos de 5 - 15.8 ug/Kg producen un efecto hipercolesterolemizante cuando se administran durante 9 días seguidos; con dosis mayores este efecto va disminuyendo hasta desaparecer totalmente y con dosis de 5 ug/Kg se logra una respuesta hipoco

lesterolemiante de gran magnitud.

Como un ejemplo ilustrativo se presentan en la tabla I - los resultados obtenidos en un experimento en el cual se trató - un grupo de ratas de la cepa Wistar con tres estrógenos: ostra - diol, hexestrol y dietilestilbestrol, observándose que los tres - estrógenos producen una respuesta hipocolesterolemiante a las - 24 horas de administrados.

Con el objeto de determinar si el ratón presenta una -- respuesta hipocolesterolemiante a la acción de los estrógenos, - se realizó este estudio que comprende los siguientes puntos:

1o.- Determinación de la colesterolemia del ratón, 24 - horas después de la administración de estrógenos.

2o.- Determinación de la colesterolemia del ratón des-- pués de tres días de tratamiento con estrógenos.

3o.- Determinación de la colesterolemia del ratón des-- pués de 10 días de tratamiento con estrógenos.

Los experimentos anteriores fueron llevados a cabo con ratones blancos de cepa de origen cr. Con el objeto de diluci-- dar si los resultados obtenidos fueron debidos a una caracterís-- tica propia de la cepa empleada y no de la especie, se llevó a-- cabo un último experimento:

4o.- Determinación de la colesterolemia de ratones ne-- gros de cepa de origen desconocida, después de tres días de tra-- tamiento con estrógenos.

TABLA I

Tratamiento.	Dosis en mg por Kg o ml por Kg.	Número de animales	Peso corporal en g $\pm$ e.t.r.	Concentración de colesterol total en mg. por 100 ml de suero $\pm$ e.t.r.	Disminución en porcentaje	P
Estradiol Solvente	5	68	333 ± 11	37 ± 1.2	60	< 0.001
	1	69	335 ± 11	62 ± 2.0		
Hexestrol Solvente	5	15	279 ± 6.3	39 ± 1.9	34	< 0.001
	1	24	273 ± 5.3	59 ± 2.5		
Dietilestilbestrol Solvente	5	59	273 ± 8.1	36 ± 1.0	36	< 0.001
	1	41	266 ± 12	59 ± 1.4		

Acción de diversos estrógenos sobre la colesterolemia de la rata.

MATERIAL Y METODO.

Se utilizaron ratones blancos de la cepa de origen CF_1 y ratones negros de cepa de origen desconocida, todos ellos provenientes de la colonia del Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina, y con un peso corporal entre 18-30 g.

La distribución de los animales en los diferentes lotes, se llevó a cabo de la siguiente manera:

A cada ratón se le asigna un número individual y se marca este número haciendo muescas en el borde libre de las orejas del animal, de acuerdo con la clave usada en el laboratorio. A continuación se pesan los animales, se ordenan en orden decreciente de pesos y se distribuyen en el número de lotes necesario.

Si n es el número de lotes necesario, el primer ratón de la lista (el más pesado) se coloca en el lote número 1, el ratón que sigue en el lote número 2, etc. hasta llegar al lote número n . El siguiente animal se colocará nuevamente en el lote número n , el siguiente en lote número $n-1$, etc. hasta llegar al lote número 1. Los animales restantes, se distribuyen nuevamente del lote número 1 al lote número n , y así sucesivamente hasta distribuir todos los animales.

De ésta manera se lograron obtener grupos de ratones comparables, con peso promedio muy semejante entre sí. Los pesos promedio se expresan en gramos $\pm$ error tipo de la media.

Cada grupo de animales se colocó en una jaula y se le dió libre acceso a agua de la llave y alimento.

Los estrógenos probados fueron: estradiol, hexestrol y dietilestilbestrol y como vehículo se utilizó aceite de maíz -- (Mazola).

La vía de aplicación fue la subcutánea en todos los casos.

Las determinaciones de la concentración de colesterol-total sérico se llevaron a cabo siguiendo el micrométodo fluorométrico de Carpenter y colabs., el cual podemos resumir en los siguientes puntos:

- 1.- Dilución del suero en potasa alcoholica.
- 2.- Hidrolisis del colesterol esterificado.
- 3.- Extracción del colesterol con hexano.
- 4.- Evaporación de una parte alícuota del extracto.
- 5.- Disolución del residuo en una mezcla de tricloroetano-anhidrido acético.
- 6.- Desarrollo de la fluorescencia con ácido sulfúrico.
- 7.- Lectura de la fluorescencia desarrollada.

Este método presenta las siguientes ventajas sobre otros métodos colorimétricos:

- a).- Requiere cantidades muy pequeñas de suero (0.02 ml)
- b).- La fluorescencia se estabiliza y pueden efectuarse las lecturas 12 horas después de que se ha desa--

Cada grupo de animales se colocó en una jaula y se le dió libre acceso a agua de la llave y alimento.

Los estrógenos probados fueron: estradiol, hexestrol y dietilstilbestrol y como vehículo se utilizó aceite de maíz -- (Mazola).

La vía de aplicación fue la subcutánea en todos los ca sos.

Las determinaciones de la concentración de colesterol-total sérico se llevaron a cabo siguiendo el micrométodo fluorométrico de Carpenter y colabs., el cual podemos resumir en los siguientes puntos:

- 1.- Dilución del suero en potasa alcoholica.
- 2.- Hidrolisis del colesterol esterificado.
- 3.- Extracción del colesterol con hexano.
- 4.- Evaporación de una parte alícuota del extracto.
- 5.- Disolución del residuo en una mezcla de tricloroetano-anhidrido acético.
- 6.- Desarrollo de la fluorescencia con ácido sulfúrico.
- 7.- Lectura de la fluorescencia desarrollada.

Este método presenta las siguientes ventajas sobre otros métodos colorimétricos:

- a).- Requiere cantidades muy pequeñas de suero (0.02 ml)
- b).- La fluorescencia se estabiliza y pueden efectuarse las lecturas 12 horas después de que se ha desa---

enrollado, sin que haya variaciones en las lecturas, lo que reduce notablemente los errores en comparación con otros métodos colorimétricos que emplean el mismo reactivo (Lieberman-Buchard) y en los cuales hay que hacer las lecturas a un tiempo fijo, debido a las variaciones en la intensidad de color.

c).- El número de determinaciones que pueden llevarse a cabo simultáneamente es mayor, en relación al reducido número de determinaciones que se pueden efectuar con métodos en los que hay que hacer lecturas a un tiempo fijo.

MATERIAL USADO.

Fluorómetro de Farrand equipado con filtros primarios (Corning) que permiten el paso de luz a 5461 Å de longitud de onda y filtro secundario (Corning) que permite el paso de luz a 5900 Å de longitud de onda.

Celdillas de vidrio de 9 x 75 mm.

Tubos de centrifuga de 15 ml con tapón esmerilado.

Tubos de ensayo de 15 x 75 mm.

Pipetas de hemoglobina de 0.02 ml.

Pipetas graduadas de 10 ml.

Pipetas volumétricas de 2 ml.

Pipetas volumétricas de 4 ml.

Matraces volumétricos de 100 ml.

Probetas graduadas de 100 ml.

Probetas graduadas de 50 ml.

Bureta de 25 ml.

Vasos de precipitados de 50 ml.

Tubos capilares de 1.5-2.0 x 100 mm.

REACTIVOS.

1.- Soluciones patrón de colesterol puro Boehringer, re-
cristalizado de acuerdo con el método Fieser y di-
suelto en alcohol de 96%, a las concentraciones de-
200, 100, 50 y 25 mg / ml.

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

3.- Solución alcohólica de hidróxido de potasio, la cual
se prepara el mismo día que se utiliza, de acuerdo-
a la siguiente fórmula:

Solución acuosa de hidróxido de potasio al 33%.....6 ml.

Alcohol absoluto (Merck).....94 ml.

4.- Hexano

5.- Mezcla tricloroetano-anhidrido acético, preparada--
en el momento de emplearse, en la siguiente rela---
ción:

1,1,2 Tricloroetano.....5 vol.

Anhidrido acético.....1 vol.

6.- Acido sulfúrico concentrado.

METODO.

OBTENCION DEL SUERO EN EL RATON.

Se toma el animal de su jaula, se sujeta firmemente, se introduce la cola en un baño María a 42°C durante 3 minutos --- aproximadamente, con el objeto de producir vasodilatación y facilitar el sangrado. Se saca la cola, se seca perfectamente y se coloca sobre una superficie de vidrio. Con una hoja de rasurar se secciona una pequeña porción de su parte terminal.

La sangre se recoge por capilaridad en los tubos capilares, hasta llenar aproximadamente las dos terceras partes de la capacidad del capilar. El otro extremo del capilar (que no contiene sangre) se cierra la flama por medio de un soplete.

Los capilares ya sellados se colocan en tubos de ensaye que llevan en el fondo una torunda de algodón para protección del capilar, a este tubo se le coloca en el exterior una etiqueta con el número del ratón correspondiente al suero.

Una vez sangrados todos los animales, se dejan en reposo todos los capilares durante 30 minutos aproximadamente, con el objeto de facilitar la sedimentación del paquete globular e impedir la posible hemólisis que se producirá al centrifugar de inmediato.

Se centrifugan durante 10 minutos a 2,000 r.p.m. y se obtiene así el suero para las determinaciones de colesterol total.

DETERMINACION DE COLESTEROL TOTAL SERICO.

Hidrólisis del colesterol esterificado.- En una gradilla se colocan los tubos de centrifuga con tapón esmerilado, en un número igual al número de determinaciones de colesterol que se realizarán y diez más que corresponderán a dos series de las soluciones patrón de colesterol.

El objeto de estas dos series de soluciones patrón que se llevan a cabo en cada uno de los experimentos efectuados, es el de obtener una curva de calibración por duplicado, que nos permitirá determinar la dispersión de nuestros valores y la linealidad de la curva obtenida con dichos valores.

Las soluciones tipo y los sueros se procesan de la siguiente manera: primero una serie de soluciones patrón, empezando con la de mayor concentración y terminando con un blanco (agua destilada), después todos los sueros y finalmente la segunda serie de soluciones patrón, empezando con un blanco y terminando con la solución de mayor concentración.

En cada uno de los tubos de centrifuga se coloca 1 ml. de potasa alcoholica recientemente preparada (reactivo 3).

De cada solución patrón, y en el orden ya descrito, se toma una pequeña cantidad con un capilar y de aquí se toman 0.02 ml con una pipeta de hemoglobina, a continuación se depositan en los tubos de centrifuga que contienen la potasa alcoholica, em-

pleando una pipeta de hemoglobina y un capilar diferente para cada solución patrón, en seguida se procesan los sueros de los animales de la siguiente manera: en cada capilar tendremos la sangre totalmente separada en dos fases: el suero y el paquete globular, ayudados por una sierrita, se secciona el capilar lo más cerca posible del paquete globular, de tal manera que éste quede en una parte del capilar y en la otra quede exclusivamente el suero, de aquí tomamos 0.02 ml con una pipeta de hemoglobina y los depositamos en los tubos con potasa alcohólica, por último se procesa la segunda serie de soluciones patrón de colesterol, de igual manera que la primera.

Se tapan los tubos de centrifuga y se colocan en baño María a 40° durante 55 minutos para hidrolizar los esteres del colesterol.

EXTRACCION DEL COLESTEROL CON HEXANO.- Se sacan los tubos del baño María, se dejan enfriar a temperatura ambiente, se agregan 4 ml de hexano a cada tubo medidos con pipeta volumétrica, se tapan nuevamente sellando el tapón esmerilado con agua destilada, para evitar pérdidas durante la agitación. A continuación se agita durante 10 segundos aproximadamente en un agitador tipo vortex, para lograr la extracción.

Se dejan reposar los tubos hasta obtener la separación de las dos fases líquidas.

EVAPORACION DE UNA PARTE ALICUOTA DEL EXTRACTO.- Con una

pipeta volumétrica de 2 ml se toma 2 ml de hexano de cada uno de los tubos y se transfieren a tubos de ensayo, cuidando de emplear una pipeta diferente para cada tubo. En un baño María a 85°C o más se evaporan a sequedad las alícuotas tomadas, se dejan enfriar a temperatura ambiente una vez evaporadas.

DISOLUCION DEL EXTRACTO. - Se prepara la mezcla tricloroetano-anhídrido acético en la forma ya descrita (Reactivo 5) y se agregan 2 ml de esta mezcla a cada uno de los tubos de ensayo, haciendo resbalar el líquido por las paredes del tubo con el objeto de arrastrar el extracto adherido a ellas.

DESARROLLO DE LA FLUORESCENCIA. - En una bureta de 25 ml se coloca ácido sulfúrico concentrado y se dejan caer tres gotas de ácido en cada tubo (aproximadamente 0.08 ml) evitando que el ácido escurra por las paredes del tubo, con el fin de obtener el mismo volumen de ácido en cada uno de los tubos. Se agitan vigorosamente y se dejan reposar durante 20-30 min. para desarrollar y estabilizar la fluorescencia.

LECTURA DE LA FLUORESCENCIA. - las lecturas se llevan a cabo en el Fluorómetro de Farrand (Ratio-fluorometer).

Aproximadamente 30 minutos antes de efectuar las lecturas, deberá encenderse la lámpara de mercurio del fluorómetro, para evitar errores en las lecturas.

Con la solución patrón de mayor concentración (200 mg/100 ml) se ajusta la sensibilidad del aparato, de tal manera -

que se obtenga el 100 de la escala y con el blanco se lleva a 0 en la escala. A continuación se efectúan todas las lecturas, verificando cada 10-12 lecturas la sensibilidad del aparato en el 100 y en el 0.

Los resultados obtenidos con las soluciones patrón de colesterol, se llevan a una gráfica y los valores correspondientes a nuestras determinaciones de colesterol total sérico pueden obtenerse por interpolación en las curvas de calibración obtenidas con los valores correspondientes a las dos series de soluciones patrón.

Los resultados se expresan en mg. de colesterol por 100 ml de suero.

La significación estadística de los resultados obtenidos se determina comparando las varianzas (Prueba de F) y aplicando la prueba de t de Student-Fisher para varianzas homogéneas y la modificación de Cochran para varianzas heterogéneas.

LAVADO DEL MATERIAL.

El lavado del material de vidrio, empleado en esta técnica, requiere de una atención especial.

Los detergentes y jabones empleados de ordinario, dejan residuos de fluorescencia muy variables, que interfieren grandemente en nuestras determinaciones. Se han logrado buenos resultados lavando el material con mezcla sulfonáfrica o con mezcla crómica.

RESULTADOS OBTENIDOS.

COLESTEROLEMIA DEL RATON 24 HORAS DESPUES DE LA ADMINISTRACION-
DE ESTROGENOS.

Para este experimento se utilizaron ratones blancos, machos, adultos de la cepa de origen CF_1 con un peso corporal -- promedio de 25g, los cuales se distribuyeron en tres grupos.

El primer grupo, el testigo, fue tratado con el solvente (Aceite de caña) a una dosis de 2 ml / Kg de peso corporal.

El segundo grupo recibió una inyección de estradiol a una dosis de 100 mg/Kg de peso corporal.

El tercer grupo fue tratado con hexestrol a una dosis-- de 100 mg. / Kg.

24 horas después de la administración, se determinó la colesterolemia de los animales de los tres grupos. Los resultados obtenidos se presentan en la tabla II.

TABLA II

Tratamiento	Dosis en mg por Kg o ml por Kg.	Número de animales	Peso corporal en g. $\pm$ S.E.	Concentración de colesterol total en mg. por ml. de suero $\pm$ S.E.	P
Estradiol	100	5	25 $\pm$ 1.3	106 $\pm$ 6.3	>0.6
Hexestrol	100	5	25 $\pm$ 1.3	103 $\pm$ 6.1	>0.9
Solvente	2	5	25 $\pm$ 1.3	103 $\pm$ 7.3	

La colesterolemia del ratón 24 horas después de la administración de estrógenos.

Como se puede observar, al comparar los resultados obtenidos para el grupo testigo, con los obtenidos para el grupo -- tratado con estradiol no se produjo ningún efecto significativo. La concentración del colesterol sérico promedio en el grupo tratado con estradiol es un poco mayor que la del grupo testigo, - pero esta diferencia no es estadísticamente significativa.

Lo mismo se observa al comparar los resultados obtenidos en el grupo testigo con los obtenidos en el grupo tratado con - hexestrol, en este caso el valor promedio de la colesterolemia - en ambos grupos es muy semejante entre sí, con una $P > 0.9$, que nos indica una ausencia de respuesta sobre la colesterolemia - después del tratamiento con hexestrol.

LA COLESTEROLEMIA DEL RATON DESPUES DE TRES DIAS DE TRATAMIENTO
CON ESTROGENOS.

Se llevaron a cabo dos experimentos.

En el primero de ellos se utilizaron ratones blancos, -- machos, adultos, de la cepa de origen CF_1 con un peso corporal -- promedio de 20-21 g, los cuales se distribuyeron en tres grupos.

Uno de ellos, el testigo, recibió durante tres días, una dosis diaria de 2 ml de aceite de maíz por Kg. de peso corporal.

Un segundo grupo se trató con estradiol a una dosis diaria de 100 mg por Kg de peso, durante tres días.

El tercer grupo recibió una inyección diaria de hexestrol a una dosis de 100 mg por Kg de peso, durante tres días.

24 horas después de la última inyección, se determinó la colesterolemia de todos los ratones.

Para el segundo experimento se utilizaron también ratones blancos CF_1 , adultos, machos, con un peso corporal promedio de 24 g. Se distribuyeron en dos grupos. Uno de ellos fue tratado con el solvente (aceite de maíz) durante tres días a una dosis de 2 ml por Kg; el segundo grupo recibió una inyección diaria de dietilestilbestrol a una dosis de 100 mg. por Kg de peso durante tres días.

24 horas después de la última inyección se determinó la colesterolemia de los ratones de ambos grupos.

Los resultados obtenidos en ambos experimentos se presentan en la tabla III.

Tabla III

Tratamiento	Dosis en mg. o ul por kg. por día.	Número de animales	Peso corporal en g. $\pm$ r.e.m.	Concentración de colesterol total en mg por 100 ml de suero $\pm$ r.e.m.	P
Estrodiol	100	4	20 $\pm$ 1.1	176 $\pm$ 2.4	> 0.7
hexestrol	100	5	21 $\pm$ 0.6	106 $\pm$ 6.4	> 0.1
Solvente	2	4	21 $\pm$ 1.5	130 $\pm$ 4.2	
Dietildilbestrol	100	16	24 $\pm$ 0.6	126 $\pm$ 4.2	> 0.05
Solvente	2	16	24 $\pm$ 0.7	112 $\pm$ 6.8	

La colesterolina del suero después de tres días de tratamiento con estrógenos.

Como podemos observar no se produjo efecto significativo en la colesterolemia de los grupos tratados con estrógenos.- El grupo tratado con hexestrol presenta una colesterolemia promedio menor que la del grupo testigo pero esta disminución no fue estadísticamente significativa ($P > 0.1$).

LA COLESTEROLEMIA DEL RATON DESPUES DE DIEZ DIAS DE TRATAMIENTO CON ESTROGENOS.

Para este experimento se utilizaron ratones blancos CF_1 , machos, adultos, con un peso corporal promedio de 28 g.

Se distribuyeron los animales en tres grupos. Uno de ellos no fue sometido a ningún tratamiento; el segundo grupo recibió un tratamiento con el solvente (aceite de maíz) a una dosis de 2 ml por Kg. de peso durante diez días; el tercer grupo recibió una dosis diaria de 28 mg. por Kg de peso corporal de diotilestilbestrol, durante diez días.

La colesteroemia de los animales de los tres grupos se determinó 24 horas después de la última inyección.

Los resultados obtenidos se presentan en la tabla IV.

TABLA IV

Tratamiento	Dosis en mg o ml por kg por día	Número de animales.	Peso corporal en g $\pm$ e.s.d.	Concentración de colesterol to- tal en mg por 100 ml de suero $\pm$ e.s.d.	?
Diethylstilbestrol	20	7	26 ± 0.9	120 ± 3.7	> 0.1
Solvente	2	6	26 ± 0.7	109 ± 3.1	> 0.7
Ninguno.	•	6	26 ± 0.7	112 ± 3.2	

La colesterolemia del ratón des, uña de diez días de tratamiento con estrógenos.

Podemos observar que el solvente (aceite de maíz) no — produjo ningún efecto sobre la colesterolemia del ratón (P 0.7) el grupo tratado con dietilestilbestrol, presentó una colesterolemia promedio mayor que la del grupo control absoluto y que la del grupo tratado con el solvente, sin embargo, esta diferencia no fue significativa.

Como se ha visto en los experimentos anteriores, los ratones sometidos a un tratamiento con estrógenos durante 24 ho--ras, durante tres días y durante diez días, no presentaron respuesta alguna en la concentración de colesterol total sérico, - que fuese significativa desde el punto de vista estadístico.

Para determinar si esta falta de respuesta, es una característica privativa del ratón CF₁ o si era una característica - de la especie, se procedió a estudiar la influencia del hexes--trol sobre la colesterolemia de una cepa de ratón negro.

LA COLESTEROLEMIA DE UNA RAZA DE RATON NEGRO DESPUES DE TRES --
DIAS DE TRATAMIENTO CON ESTROGENOS.

Para este experimento se utilizaron ratones negros, machos, adultos, de cepa de origen desconocida y ratones blancos, machos, adultos, de cepa de origen CF_1 , todos ellos con un peso corporal promedio de, 20-21g.

Tanto los ratones blancos como los ratones negros por separado se distribuyeron en dos grupos. Uno de ellos en ambos casos, fue tratado con el solvente (aceite de maíz) durante --- tres días, con una dosis de 2 ml por Kg de peso corporal y el otro fue tratado con hexestrol a una dosis diaria de 20 mg. por Kg de peso durante tres días.

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

En la tabla V se presentan los datos obtenidos.

Observamos que tanto en el grupo de ratones negros como en el de ratones blancos CF_1 el hexestrol no produjo efectos sobre la concentración del colesterol total sérico ($P > 0.7$ y $P > 0.8$ respectivamente).

Tabla V

Raza	Tratamiento	Dosis en mg o ml por kg por día	Número de animales	Peso corporal en g $\pm$ e.f.e. $\pm$ s.f.e.	Concentración de colesterol total en mg por 100 ml de suero $\pm$ e.f.e.	P
Ratón Negro	Hexoestrol	20	6	21 $\pm$ 0.6	137 $\pm$ 6.6	> 0.7
Ratón Negro	Solvente	2	6	21 $\pm$ 0.8	142 $\pm$ 6.1	
Ratón albino CF ₁	Hexoestrol	20	8	20 $\pm$ 0.7	120 $\pm$ 6.2	> 0.8
Ratón albino CF ₁	Solvente	2	8	20 $\pm$ 0.8	122 $\pm$ 6.9	

La colesterolemia después de tres días de tratamiento con estrógenos, en una raza de ratón negro.

DISCUSION Y CONCLUSIONES.

Los datos obtenidos en este estudio indican que el ratón no modifica su colesterolemia en forma significativa, como resultado de la administración de estrógenos. En esto difiere en forma notable de la rata, el cobayo, el conejo y el humano. - llama la atención el hecho de que mientras mamíferos de especies tan diversas responden en forma semejante a la administración de estrógenos, una especie tan próxima a la rata, como es el ratón, se comporta en forma tan diferente en lo que se refiere a la respuesta de la colesterolemia después de la administración de estrógenos. Estas observaciones sugieren que el ratón en una fase reciente de su evolución ha perdido su capacidad de responder a la acción de los estrógenos sobre la colesterolemia. Conviene hacer resaltar sin embargo, que otras acciones de los estrógenos se conservan en el ratón en forma semejante a la de otros mamíferos. Desde luego los efectos estrogénicos (cornificación vaginal, hipertrofia uterina, etc.) de los estrógenos, son bien conocidos en el ratón. Además la estimulación de la fagocitosis al administrarse dosis elevadas de estrógenos se observa en el ratón, aún más precozmente que en la rata (8).

Recientemente Tepperman y colabs. (12) han desarrollado un método para producir cálculos biliares experimentales en el-

ratón, mediante la administración de dietas hipercolesterolémiantes. En la rata esto no ha sido posible por cateterizar esta especie de vesícula biliar. Estos estudios de Tepperman y colaboradores, plantean la posibilidad de utilizar su método para producir cálculos biliares como modelo experimental para buscar agentes capaces de inhibir la producción de cálculos biliares, y de promover su redisolución una vez formados. Siendo el colesterol y su metabolismo un factor primordial en la producción de cálculos biliares, el hecho de que la colesterolemia del ratón, no responde a la administración de estrógenos, en contraste con lo que ocurre en la rata y en el humano, hace inútil el estudio de estrógenos o compuestos derivados de ellos, en el modelo experimental de Tepperman que utiliza al ratón en la búsqueda de agentes, antilitiásicos para ser empleados en la terapéutica humana.

CONCLUSIONES.

La administración de estrógenos a dosis suficientes para producir una respuesta clínica de disminución de la colesterolemia en la rata, no produjo en el ratón albino CF_1 ni en otra cepa de ratón (negro) respuesta en la colesterolemia aún cuando se prolongó el período de tratamiento durante 10 días.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.

- 1.- Arnold A, G.O. Potts, J.P. Mc Auliff, R.G Christiansen, T.C. Miller. An orally hypocholesterolemic steroid, with reduced-uterotrophic effect. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 131 - 4 1966.
- 2.- Boyd G.S., and, W.B. Mc Guire. The effect of hexoestrol on - cholesterol metabolism in the rat. Biochem. J. 62: 19p, 1956.
- 3.- Boyd G.S. Endocrines in lipid metabolism. Fed. Proc. 20: 152-160. 1961.
- 4.- Boyd G.S. Effect of linoleate and estrogen on cholesterol metabolism. Fed. Proc. 21 : 85-92. 1962
- 5.- Collins, William S. Variation in capacity of rabbits to handle ingested cholesterol. Angiology. 8 : 513. 1957.
- 6.- Cabrera Pérez Rodolfo. Las dos acciones de estradiol sobre la colesterolemia y sus modificaciones por una dieta hipercolesterolemiante. Tesis profesional. U.N.A.M. 1967.
- 7.- Cook Robert B. Cholesterol. Chemistry, Biochemistry and Pathology. Academic Press Inc. Publishers New York. 1958.
- 8.- Covarrubias H.B. La estimulación fagocitaria por medio del estradiol en ratas y ratones adultos e infantiles. Tesis profesional. U.N.A.M. 1969.
- 9.- Fillios L.C., R. Kaplan, R.S. Martin and F.J. Stare. Some aspects of the gonadal regulation of cholesterol metabolism. Am. J. Physiol. 191 : 47-51. 1956.
- 10.- Fillios L.C., G.U. Mann. The importance of sex in the variability of the cholesterolemic response of rabbits fed cholesterol. Circulation Research 4 : 406-12. 1956.
- 11.- Fillios L.C. The gonadal regulation of cholesterolemia in the rat. Endocrinology. 60 : 22-27. 1957.
- 12.- Gamboa E.P. Estimulación de la fagocitosis por medio del estradiol en el ratón. Relación dosis-respuesta. Tesis profesional U.N.A.M. 1969.

- 13.- Gordon, Cantrall, Cokleniak, Albers, Mauer, Stolar, and Bernstein. Steroid and lipid metabolism. The hypocholesterolemic effect of estrogen metabolites. *Steroids and International Journal*. 267-311. 1964.
- 14.- Guerrero G.P. La doble acción del estradiol sobre la colesterolémia de la rata. Tesis profesional U.N.A.M. 1966.
- 15.- Gutierrez R.V. La tiroides y el efecto hipocolesterolémico de los estrógenos. Tesis profesional U.N.A.M. 1965.
- 16.- Heller J.H., M.H. Meier, R. Zucker, and G.W. Mast. The effect of natural and synthetic estrogens on reticulo-endothelial system function. *Endocrinology*. 61 : 235-41. 1957.
- 17.- Kritchevsky D. Cholesterol. John Wiley & Sons Inc. 205-206.-- 1958.
- 18.- Kritchevsky D., A. Shirley, S. Ezra, and M. Whitehouse, Influence of sex and sex hormones on the oxidation of cholesterol-26-³H 14 by rat liver mitochondria. *J. Lipid Research*. 4 : 188-92. 1963.
- 19.- Levin L. The effects of several varieties of Stress on the cholesterol content of the adrenal glands and of the serum of rats. *Endocrinology*. 37 : 34-43. 1954.
- 20 - Lyman R. L., R.J. Krueger. Comparative effects of estradiol and coumestrol diacetate, a nonsteroid estrogenic substance - on lipid metabolism in the male rat. *J. Nutrition*. 73 : 391-96. 1961.
- 21.- Mandoki JJ., J. V. Douglas, C. Rubio, D. Skromne, P. Cabrera, E. Asua, V. Gutiérrez. The two actions of estradiol-17^B on the serum cholesterol concentration of the rat. The unresponsive-ness of the infantile rat and the influence of a hypercholesterolemic diet. *Memorias. IV Congreso Mundial de Cardiología. México*. 5 : 93-95. 1963.
- 22.- Merola A.J., A. Arnold. Estrogen inhibition of cholesterol biosynthesis at the mevalonic acid stage. *Science* 144 : 301.- 1964.
- 23.- Moskowitz M.S., A.A. Moskowitz, W. Bradford Jr., R. W. Wissler. Changes in serum lipids and coronary arteries of the rat in response to estrogens. *A.M.A. Archives of Pathology*. 61 : 245-51. 1956.

- 24.- Moskowitz M.S., R.W. Kissler. Some biological actions of estronegens in male rats, with special reference to blood lipids and vascular sudanophilic Journal of Atherosclerosis Research. 1 : 423-33. 1961.
- 25.- Nicol T., G. L. Pilbey, J. Godingley, C.Druce. Response of the reticulo endothelial system to stimulation with Oestrogen. Nature. 192 : 978-79. 1961.
- 26.- Nicol T. S.C. Quantick and B. Vernon-Roberts. Stimulation of phagocytosis in relation to the mechanism of action of oestrogens. Nature. 205 : 1142-43. 1965.
- 27.- Parsons W. B.J.B.M.D. Pharmacological agents and lipid metabolism. Geriatrics. 18 : 31-36. 1963.
- 28.- Pedreira P., and J. Temperman. High flow rate and cholesterol content in mice fed a cholesterol-inducing diet. Annals of Physiol. 106 : 435-41. 1964.
- 29.- Bekkerling H. Kervinle. Vetro studies on the effect of the Dietrich's control on the serum cholesterol and liver phosphorus concentrations in different groups of experimental rat animals. Acta Endocrin. 11 : 111-11. 1962.
- 30.- Wilson J.A. M.D. Thompson. L. Karmali. F. E. Edwards. Quantitative study of the effects of estrogens on cholesterol levels in rats fed cholesterol. Comp. Biochem. Physiol. 30B : 111-11. 1961.
- 31.- Karmali F. and L. Thompson. Estrogen-induced changes in serum cholesterol levels and the activity of cholesterol oxidase. Nature. 192 : 111-11. 1961.
- 32.- Thompson L. and L. Karmali. The effect of estrogen on the activity of cholesterol oxidase in rats fed cholesterol. Comp. Biochem. Physiol. 30B : 111-11. 1961.

13.- Vega F. G. Estimulación de la fagocitosis por estradiol en ratones suprarrenalectomizados. Tesis profesional U.N.A.M. 1967.

14.- Wissler R.W., M.L. Elert, M. A. Schoeder and L. Cohen. Productions of lipomata and atheromatous arterial lesions in the albino rats. A.M.A. Arch Path. 57 : 339. 1954.