

32
24.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

"EVALUACION DE ESTERES DEL ACIDO p-HIDROXIBENZOICO EN UTERO DE RATON CD1"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

ATENEA HERNANDEZ ALONSO

ASESOR: M. en C. CRISTINA LEMINI GUZMAN.

SUPERVISOR TECNICO: DR. ANDRES ELIU CASTELL RODRIGUEZ



MEXICO, D. F.

1998



269617

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

EXAMENES PROFESIONALES FAC. DE QUIMICA



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).

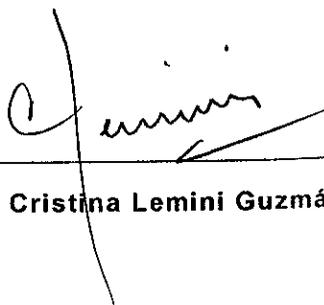
El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición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

Jurado asignado:

Presidente	Prof. Griselda Silva Leal
Vocal	Prof. Rosa María Erendira Páez Aguirre
Secretario	Prof. Cristina Lemini Guzmán
1er. Suplente	Prof. Elia Brosla Naranjo Rodriguez
2o. Suplente	Prof. Héctor Antonio Ponce Monter

**Departamento de Farmacología y Departamento de Biología
Celular y Tisular de la Facultad de Medicina de la UNAM.**

Asesor:



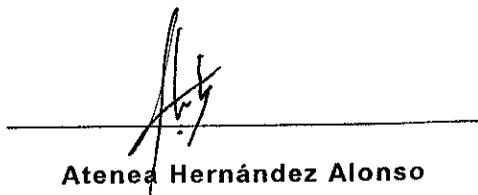
M. en C. Cristina Lemini Guzmán

Supervisor Técnico:



Dr. Andrés Eliú Castell Rodríguez

Sustentante:



Atenea Hernández Alonso

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UNAM, bajo la dirección de la M. en C. Cristina Lemini Guzmán con el apoyo financiero de los proyectos de: DGAPA IN205396 y CONACYT 2400PM.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Nacional Autónoma de México

A la Facultad de Química

Al Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina, UNAM.

A mi asesor de Tesis, M. en C. Cristina Lemini Guzmán, con admiración por su dedicación a la ciencia, por la oportunidad que me brindó de colaborar en este proyecto, su apoyo, enseñanzas y tiempo que dedicó a la realización de la Tesis, pero sobre todo por contagiarme los deseos e introducirme al maravilloso mundo de la investigación y por lo más valioso que me brindó: su amistad y cariño.

A la Q.F.B. Griselda Silva Leal, por su ayuda, orientación y tiempo que dedicó a la realización de este trabajo de investigación, por sus consejos, travesuras y ese abrazo con el que me recibió el primer día, por ser el alma del laboratorio y compartir su manera alegre de ver la vida, pero sobre todo por su amistad y cariño.

A mis compañeros de laboratorio Ruth, Diana, Inés y Julio por su paciencia y por los momentos que hemos compartido.

Al Dr. Fermín Valenzuela por su gran apoyo a nuestro equipo de investigación.

Al Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, UNAM.

En especial al Dr. Andrés Eliu Castell Rodríguez, por su valioso apoyo académico, orientación, dedicación y tiempo en la asesoría y revisión en la realización de este trabajo de investigación. Por su calidad humana y brindarme su amistad.

A Judith Alvarez Pérez, Beatriz Hernández Téllez, Alberto Hernández Peñaloza y a Miguel Herrera Enriquez por su apoyo técnico para la realización de este trabajo

A la Histotecnóloga Verónica Rodríguez Mata y al Sr. Francisco Pasos Nájera del Departamento de Biología Celular y Tisular de la Facultad de Medicina, por su ayuda en la realización de los cortes histológicos y el trabajo fotográfico utilizados en esta Tesis.

ATENEA.

DEDICATORIAS

A mis padres Silvia y Anselmo con inmenso cariño y admiración por su paciencia, ayuda, sacrificios y esfuerzos realizados para formarme profesionalmente y otorgarme la mejor de las herencias, pero sobre todo por su infinito amor.

A mi hermanito Odín, por ser mi amigo y confidente, a Diana y Manuel, por su apoyo, por los buenos momentos que hemos pasado juntos, y a los tres por ser un ejemplo de superación constante.

A mi Tía Antonia con cariño por la dedicación y amor que nos brindó,
te extrañamos.

A mis tíos y tías, con admiración y cariño por su apoyo que siempre
me han brindado.

Con cariño a mis primos y primas por los buenos momentos que
hemos compartido

Con amor a mi Fer por ser el alegre y loco I.Q.M. tan especial que entró a mi vida, por su ayuda y comprensión que me ha brindado y que fueron fundamentales para concluir este trabajo, porque veamos realizados nuestros más anhelados sueños.

A Rafa, Ari y al próximo sobrino? por los padres momentos que hemos compartido, pero sobre todo por brindarme su amistad.

A Rafita mi amigochito por que se que siempre cuento contigo.

A Carlitos y a Huguito por ser unos amigos fuera de serie y apoyarme.

A Isabel por los buenos momentos que pasamos, y que a pesar de la distancia sé que estamos juntas.

A Oscar por ser mi amigo de siempre.

A Verónica por sus consejos y apoyo pero sobre todo por su amistad.

A Katya por ser la amiga que estuvo a mi lado a lo largo de mi carrera.

A mi Wendy por su cariño.

A Gaby, Sadi, Lizbeth, Carlos B., Yara, Jorge, Rosy, Ruth (mi pequeña investigadora) por las aventuras que hemos pasado juntos, pero sobre todo por su permanente amistad.

ATENEA.

ABREVIATURAS

Pbens	Parabenos
MePb	Metilparabeno
EtPb	Etilparabeno
PrPb	Propilparabeno
BuPb	Butilparabeno
CD1	tipo de cepa
Ovx	ovariectomizada
E ₁	Estrona
E ₂	Estradiol
V	Vehículo
GnRh	Hormona liberadora de gonadotrofinas
FSH	Hormona folículo estimulante
LH	Hormona Luteinizante
AMPC	Adenosin 3',5' monofosfato cíclico
HR	Complejo hormona-receptor
ERE	Elemento de respuesta para estrógenos
EA	Estrógenos ambientales
APHB	ácido <i>p</i> -hidroxibenzoico
H-E	Hematoxilina-Eosina
esm	error estandar de la media

CONTENIDO

	PAGINA
1. INTRODUCCION.	1
2. GENERALIDADES.	
2.1 Regulación de Hormonas Gonadales.	3
2.2 Biosíntesis de Hormonas Gonadales.	6
2.3 Mecanismos de Acción de Estrógenos.	8
2.4 Ciclo Reproductivo del ratón.	10
2.4.1 Estro.	10
2.4.2 Metaestro.	11
2.4.3 Diestro.	11
2.4.4 Proestro.	11
2.5 Características Histológicas del Útero	12
2.6 Evaluación de la Respuesta Uterotrófica.	13
2.7 Estrógenos Ambientales	13
2.8 Generalidades de parabenos (Pbens).	15
3. HIPOTESIS.	17
4. OBJETIVOS.	18
5. MATERIAL Y MÉTODOS.	
5.1 Fármacos y disolventes	19
5.2 Animales	19
5.3 Diseño Experimental	19
5.4 Análisis Estadístico	20
5.5 Técnicas Utilizadas en los Experimentos	
5.5.1 Ovariectomía.	20
5.5.2 Frotis Vaginal	21
5.5.3 Tinción de Harris	21
5.5.4 Extracción de Útero	22
5.5.5 Cortes Histológicos	22
5.5.6 Procesamiento de Imágenes	22
6. RESULTADOS Y DISCUSION.	
6.1 Efecto Uterotrófico	24
6.2 Morfometría Uterina	26
7. CONCLUSIONES.	38
8. TABLAS.	39
9. BIBLIOGRAFIA	41

1. INTRODUCCION

La exposición constante a estrógenos ambientales se ha asociado con la aparición frecuente de anomalías en el aparato reproductor de diversas especies animales y del hombre, y en estos últimos se han relacionado con un aumento en la aparición de diferentes tipos de cáncer en humanos (1,2).

Recientemente encontramos en el laboratorio que el ácido p-hidroxibenzoico, un metabolito de un grupo de conservadores conocidos como parabenos (PBens), produce actividad estrogénica en roedores (3). Este grupo de sustancias es utilizado ampliamente para preservar productos farmacéuticos y alimenticios, por lo que el objetivo de este trabajo fué evaluar la actividad estrogénica de los ésteres del ácido p-hidroxibenzoico: éster metílico del ácido p-hidroxibenzoico (MePb), éster etílico del ácido p-hidroxibenzoico (EtPb), éster propílico del ácido p-hidroxibenzoico (PrPb), éster butílico del ácido p-hidroxibenzoico (BuPb), en ratón CD1, utilizando dos parámetros de evaluación: 1) respuesta uterotrófica basada en el peso uterino y 2) morfometría uterina (4,5,6).

Los experimentos se llevaron a cabo en ratones hembra adultas CD1 ovariectomizadas (Ovx). A diferentes grupos de animales asignados a diferentes tratamientos al azar se les administraron por vía subcutánea, durante tres días consecutivos, PBens en las siguientes dosis diarias: MePb 6 ó 17 mg/kg; EtPb 6 ó 18 mg/Kg; PrPb 7 ó 20 mg/Kg, BuPb 7 ó 21 mg/Kg. Los controles fueron dos grupos, a uno de los cuales se le administró estradiol (E_2 , 10 μ g/Kg) y al otro el vehículo (aceite de maíz, V, 3ml/Kg). Al cuarto día los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Los úteros fueron removidos, pesados, y procesados para su estudio histológico.

Se realizaron mediciones en diferentes estructuras del útero obteniéndose la altura de los epitelios luminal y glandular y el grosor del miometrio (5), con la ayuda de un microscopio acoplado a un analizador de imágenes.

Los resultados de este estudio mostraron aumentos significativos ($p < 0.05$) del peso uterino, así como de la altura de los epitelios luminal, glandular y el grosor del miometrio en los animales tratados con los Pbens y E_2 comparados con los animales tratados con el V.

Estos datos indicaron que los ésteres del ácido p-hidroxibenzoico administrados en dosis altas producen un efecto estrogénico diferencial global sobre el útero (peso uterino, epitelios luminal y glandular y el miometrio) semejante al que produce el E_2 .

Las implicaciones que éstos resultados puedan tener en el humano se desconocen en éste momento y dependerán de muchos factores, uno de gran importancia es el conocimiento de la farmacocinética de este grupo de sustancias en relación con sus efectos estrogénicos, así como de la exposición que se tenga a éste grupo de fármacos.

2. GENERALIDADES

2.1 Regulación de Hormonas Gonadales.

La periodicidad reproductiva observada en las hembras de los mamíferos son el resultado de una serie de cambios debidos a la producción de estrógenos y progestágenos que afectan la morfología, el control de la actividad metabólica del útero y otros tejidos sexuales accesorios. En los roedores, regulan aspectos de la conducta sexual y las actividades fisiológicas esenciales para la reproducción de la especie.

Los cambios fisiológicos antes mencionados son regulados por hormonas secretadas por el eje hipotálamo-adenohipófisis-gónadas. La porción hipotalámica del cerebro es la fuente de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) que pasa a través de la vena porta-hipofisiaria a la adenohipófisis, donde estimula la liberación de la hormona folículo estimulante (FSH) y de la hormona luteinizante (LH). La FSH en la mujer, inicia el desarrollo de los óvulos e induce la secreción ovárica de estrógeno, en el varón, estimula la producción de espermatozoides por parte de los testículos. La LH en la mujer, junto con los estrógenos, estimula la ovulación y formación del cuerpo lúteo productor de progesterona, además de preparar al útero para la implantación y las glándulas mamarias para la secreción de leche; en el varón, estimula el desarrollo de las células de Leydig de los testículos y la producción de testosterona por parte de ellas (7)(Figura 1).

En los ovarios, la LH se une a su receptor en células de la teca interna, la cual estimula la producción de adenosin 3',5'-monofosfato cíclico (AMPC) activando la biosíntesis de

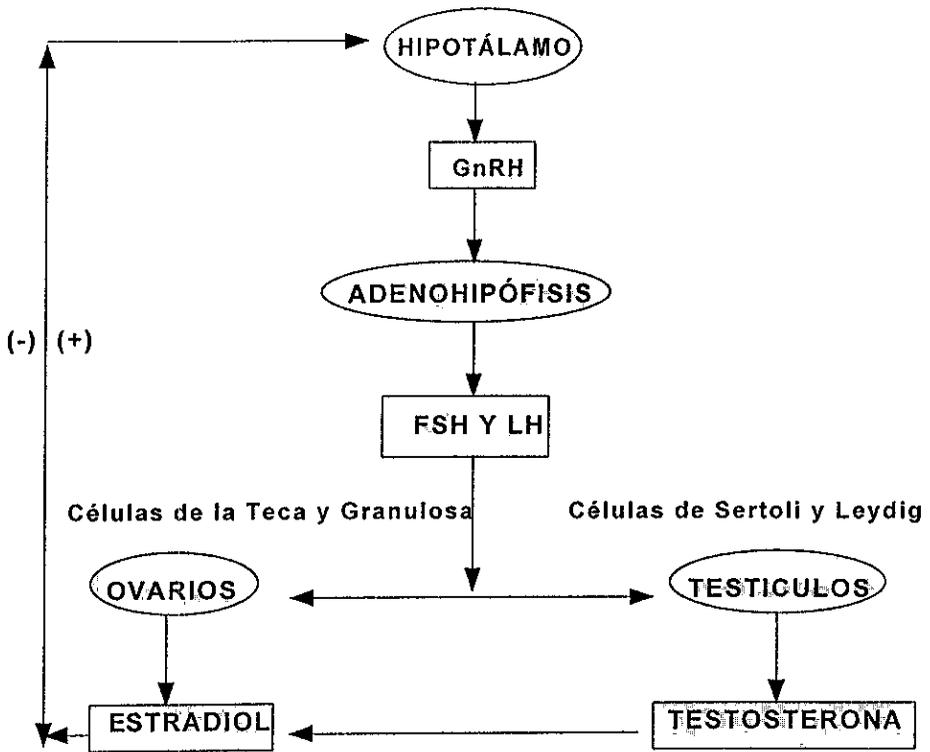


Figura 1. Control hormonal de la biosíntesis de estrógenos y andrógenos

androstendiona y testosterona que difunden a las células de la granulosa, que en presencia de FSH, y AMPc conducen a la aromatización de los andrógenos a estrógenos, produciendo estrona y estradiol (Figura 2).

La actividad hipotalámica es condicionada en gran parte por los estímulos del medio ambiente externo, y por la concentración de las hormonas sexuales de la circulación, que es modulada por un

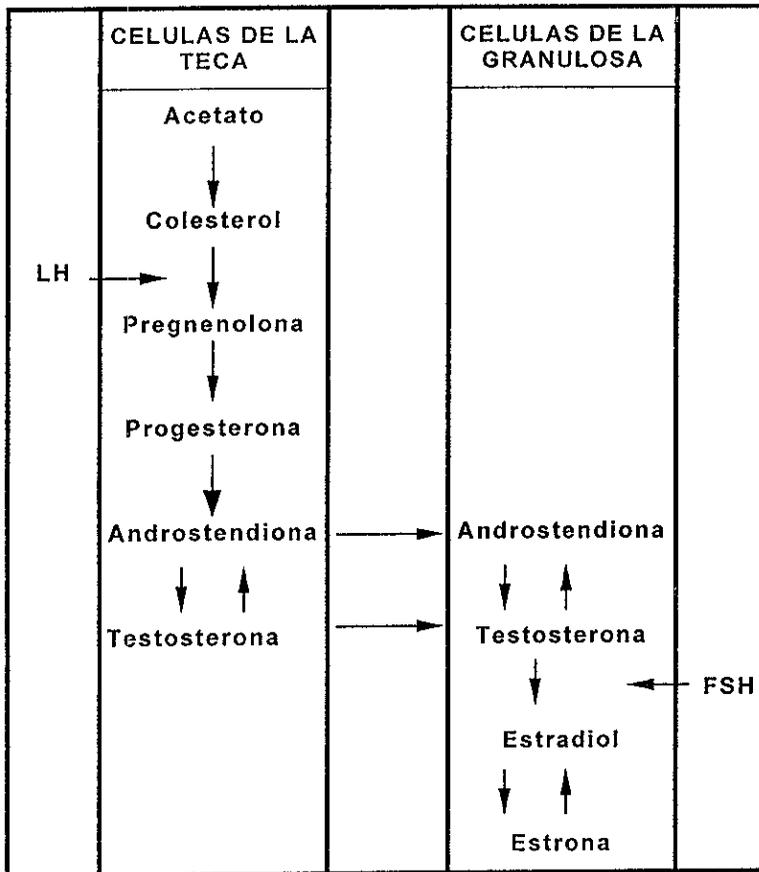


Figura 2. Biosíntesis de estrógenos y andrógenos en el ovario.

proceso de retroalimentación positiva o negativa (7,8,9,10).

Los órganos sexuales accesorios y la mayor parte de los caracteres sexuales secundarios, así como la conducta sexual en animales están bajo control directo de la concentración de las hormonas gonadales, andrógenos, estrógenos y progestágenos

2.2 Biosíntesis de Hormonas Gonadales

Las hormonas esteroides tienen como núcleo estructural al ciclopentano perhidrofenantreno. La biosíntesis de estas hormonas, tiene como precursor obligatorio al colesterol, del cual se derivan las cinco clases diferentes de hormonas esteroides: andrógenos, estrógenos, progestágenos, glucocorticoides y mineralcorticoides (9) que contienen de 18 a 21 átomos de carbono. En la mayoría de los procesos de formación de estas hormonas, participan un grupo de enzimas que forman parte de un complejo de oxidasas denominado citocromo P450 que se localizan en las mitocondrias o en el retículo endoplásmico liso.

En la primera etapa de su biosíntesis se lleva a cabo la eliminación de seis átomos carbono de la cadena lateral del colesterol que conduce a la pregnenolona.

La pregnenolona puede seguir dos rutas de biotransformación: la vía Δ^5 - 3β -hidroxi, y la vía Δ^4 -3-cetona. En la primera ruta, se forma 17alfa-hidroxipregnenolona y posteriormente dehidroepiandrosterona, ambas reacciones están catalizadas por el citocromo P450C17-hidroxilasa (P450C17-OH) y/o 17,20-liasa (P450C17-20L). En la segunda ruta, la acción de la 3β -hidroxi dehidrogenasa (3β OHDH), sobre la pregnenolona, dá lugar a la formación de progesterona, que también bajo la influencia de P450C17-OH produce la 17alfa-hidroxiprogesterona (10).

Posteriormente, por un lado, la dehidroepiandrosterona, por acción de la 3β OHDH y por otro lado la 17-hidroxiprogesterona, en presencia de la P450C17-20L, producen la androstendiona que es

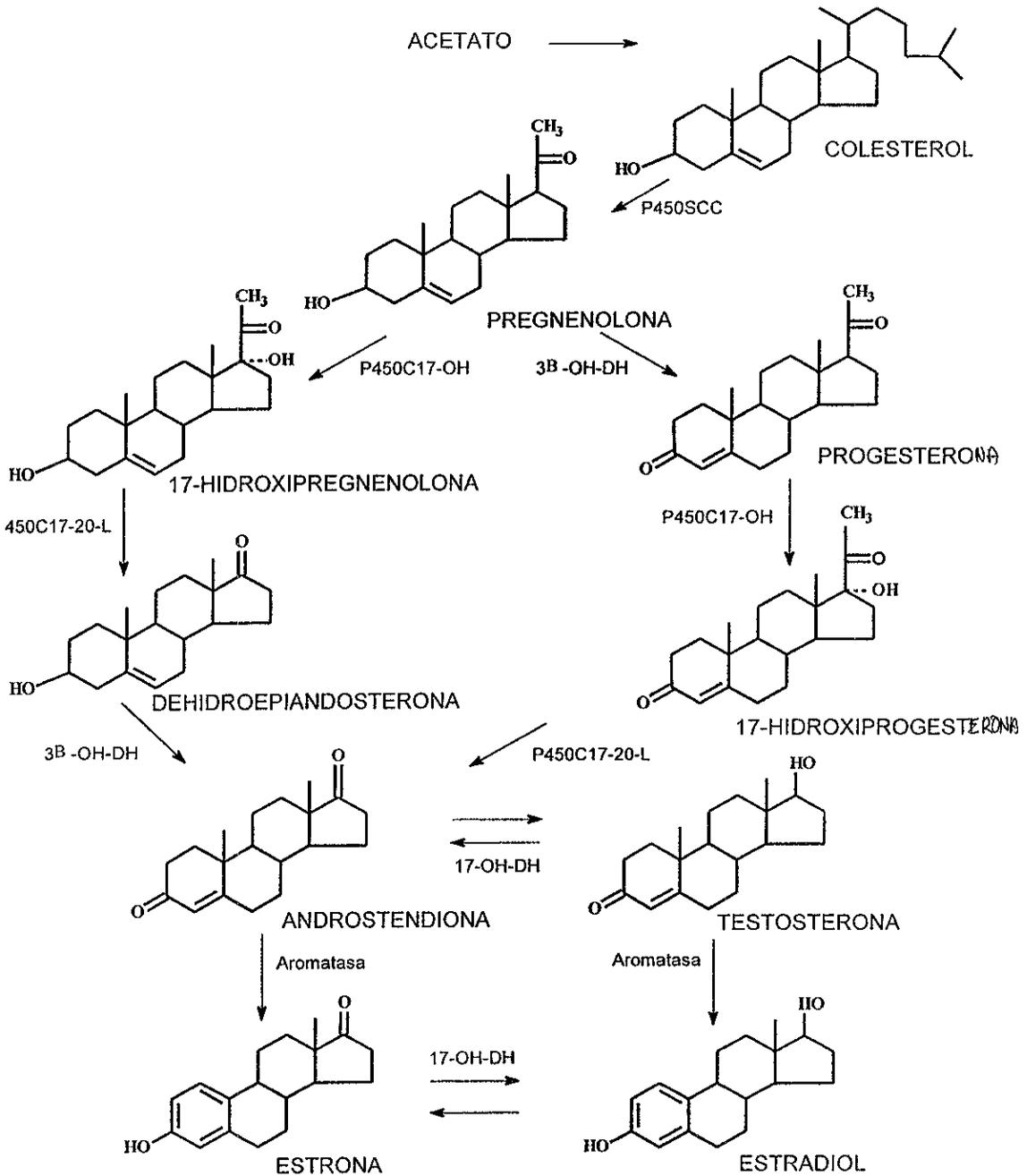


Figura 3. Biosíntesis de estrógenos y andrógenos.

transforman en estrona (E_1) y estradiol (E_2) respectivamente, por acción de la P450 aromatasas (P450Ar). En la Figura 3. se ilustra la secuencia de estas biotransformaciones.

2.3 Mecanismo de Acción de Estrógenos.

La respuesta a las hormonas estrogénicas está dada por su interacción con receptores específicos que se encuentran en órganos blanco. Los órganos blanco para las hormonas con actividad estrogénica son: útero, vagina, glándula mamaria, hipófisis e hipotálamo.

La acción de éstas hormonas está mediada por proteínas que pertenecen a una superfamilia de receptores citoplasmáticos o nucleares que funcionan como factores de transcripción.

Los estrógenos estimulan el desarrollo de los tejidos que intervienen en la reproducción. En general, las hormonas ováricas aumentan el tamaño y el número de células al incrementar la velocidad de síntesis de proteínas, RNAr, RNAt, RNAm y DNA. Bajo estímulo estrogénico, el epitelio vaginal prolifera y se diferencia; el endometrio uterino prolifera y las glándulas sufren hipertrofia y alargamiento; el miometrio desarrolla una motilidad rítmica, intrínseca, y los conductos mamarios se ramifican. El estradiol tiene también efectos anabólicos sobre los huesos y los cartílagos y por tanto es promotor del crecimiento. Al actuar sobre los vasos sanguíneos periféricos, los estrógenos en forma típica causan vasodilatación y disipación del calor. Los cambios histológicos que se presentan durante el ciclo reproductivo también pueden detectarse en el exudado vaginal de los roedores (11)

El mecanismo de acción de los estrógenos se ilustra en la Figura 4 y consiste en el paso de la hormona a través de la membrana hacia el citoplasma por difusión simple. En el citoplasma se une a su receptor específico formando un complejo hormona-receptor (HR) que se trasloca al núcleo y se une a elementos de respuesta para estrógenos (ERE) en el DNA, esta unión da como resultado la iniciación de la transcripción de RNAm. El RNAm sale del núcleo y se transporta hacia los ribosomas para iniciar la traducción de una secuencia de aminoácidos y junto con el retículo endoplásmico la biosíntesis de una proteína con actividad celular específica (12).

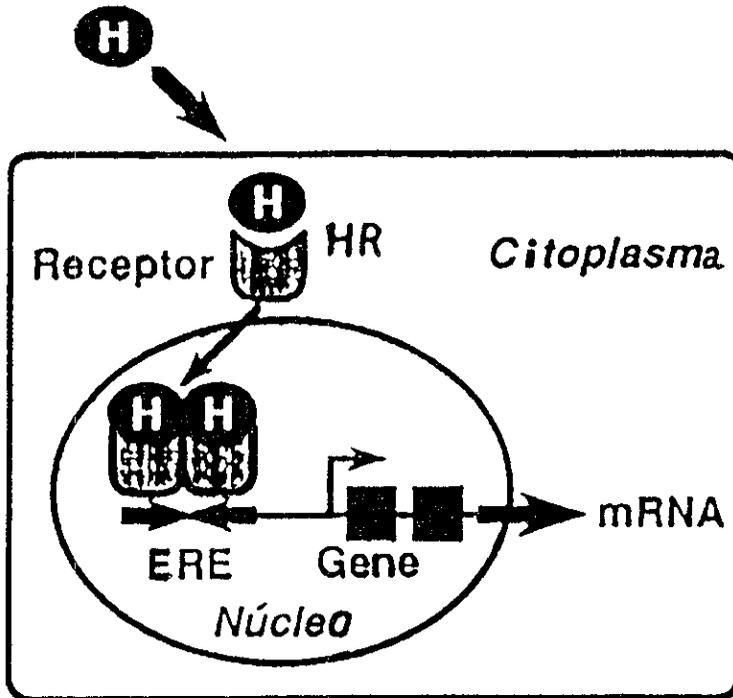


Figura 4. Mecanismo de acción para hormonas esteroides.

2.4 Ciclo Reproductivo del Ratón

El ciclo reproductivo en las hembras de los mamíferos, requiere de la participación de los órganos que integran su función en condiciones óptimas para la fecundación, la implantación y el desarrollo embrionario. Un término que abarca estos procesos es el de ciclos sexuales, que se han definido y clasificado basándose en el tipo de ovulación que presenta cada especie.

Durante el desarrollo se producen cambios cíclicos en las hembras que culminan en el estro, fase de la ovulación donde se presenta la receptividad sexual al macho y con ello la fecundación. Se denomina ciclo estral al período que transcurre entre dos estadios de estro cuya duración es variable dependiendo de la especie. El ciclo estral de los roedores se divide de manera general en cuatro fases, las cuales tienen características citológicas, histológicas y conductuales bien definidas. Estas son: estro, metaestro, diestro y proestro. A continuación se describirán estas fases tratando solo las características más relevantes del estadio (11).

2.4.1 Estro.

Se caracteriza como la fase de receptividad sexual y en la que ocurre la ovulación. Los cambios conductuales comprenden: vibración de las orejas, lordosis o arqueo en respuesta al manejo o al aproximarse el macho. En esta etapa el ovario presenta folículos maduros, debido a la acción de la FSH que incrementa su concentración y estimula la producción de estrógenos. En el endometrio aumenta la proliferación glandular, el útero aumenta de tamaño y se distiende debido a la acumulación del líquido intraluminal. Se presenta aumento de mitosis en la mucosa vaginal, y a medida que se acumulan nuevas células las capas superficiales se

queratinizan, volviéndose escamosas y cornificadas (11).

2.4.2 Metaestro.

Se presenta poco después de la ovulación, en esta fase ya no se presenta receptividad sexual. Se caracteriza por desarrollo del cuerpo lúteo y pequeños folículos, el ovario, empieza a secretar progesterona por influencia de la LH, y los niveles de estrógenos disminuyen. También disminuye la vascularización y contractilidad del útero, aparecen leucocitos en la luz vaginal junto con unas cuantas células cornificadas, esta fase es distinguible también por que además se secreta mucina, la cual da un aspecto sucio a las preparaciones de exudado vaginal.

2.4.3 Diestro.

Durante esta fase también se rechaza al macho, frecuentemente se le clasifica como fase del cuerpo amarillo, predomina la influencia de la progesterona sobre las estructuras sexuales accesorias, los niveles de estrógenos disminuyen notablemente. En el ovario se encuentran uno o más cuerpos amarillos. Los úteros son pequeños, anémicos y levemente contráctiles. La mucosa vaginal es delgada y los leucocitos migran a través de ella, dando al frotis una imagen que consiste casi en su totalidad de este tipo de células. Al finalizar esta etapa, los niveles de estradiol y progesterona disminuyen considerablemente.

2.4.4 Proestro.

Fase en la que la hembra empieza a tener receptividad al macho. Esta antecede a la ovulación. En el ovario se inicia la maduración de los folículos, el endometrio inicia la proliferación glandular, los niveles de progesterona disminuyen, la liberación de la FSH estimula el crecimiento del folículo y los niveles de estrógenos

se elevan. Aumenta la retención de líquido en los úteros y su contractilidad. El frotis vaginal se caracteriza por la presencia de células redondas nucleadas

2.5 Características Histológicas del útero

Desde el punto de vista histológico, el útero consiste en tres capas de tejido.

La externa, constituida que es el perímetro o serosa, forma parte del peritoneo visceral.

La capa intermedia ó miometrio, consta de dos capas de fibras de músculo liso una longitudinal externa y otra circular interna.

Y finalmente la capa interna del útero, o endometrio, que es una mucosa que consiste en dos capas principales; una es el epitelio luminal que esta constituido por un epitelio cilíndrico simple. La otra capa llamada tejido conectivo laxo o también lámina propia está constituida por fibroblastos, linfocitos, neutrófilos, células cebadas, vasos sanguíneos y capilares y contiene numerosas glándulas que están formadas por epitelio cúbico simple, que se originan a partir del epitelio luminal (7).



2.6 Evaluación de la Respuesta Uterotrófica.

Un modelo utilizado para la evaluación de actividad estrogénica es el que desarrollaron Evans, Varney y Koch (13). Este se basa en el efecto que produce el tratamiento con E₂ sobre el peso uterino de roedores hembra ovariectomizadas (Ovx). Generalmente los fármacos que se evalúan por este método son administrados por vía subcutánea tres días consecutivos. Al término del tratamiento se sacrifica a los animales, se les extrae el útero y se pesa. El aumento de peso de los úteros de animales tratados, con respecto a los del grupo control a los que sólo se les administra el vehículo constituye un parámetro muy confiable para evaluar estrogénicidad. Este método puede ser utilizado tanto en animales adultos como en animales inmaduros.

Una variación es el modelo desarrollado por Bulbring y Burn en 1935 (14). Estos investigadores observaron que los estrógenos producen un aumento rápido del peso uterino después de 6 horas de administración, debido a un incremento de agua en el útero, por lo que sugirieron utilizar esta propiedad para evaluar los efectos sistémicos de los estrógenos en rata o ratón ovariectomizados e inmaduros. Sin embargo el método más utilizado es después de 24 horas de la última administración eliminando el agua retenida en el útero. Esta modalidad fue la que utilizó en éste trabajo.

2.7 Estrógenos Ambientales

En los últimos 50 años con el advenimiento de la era industrial, ha habido un incremento considerable de la producción de compuestos químicos que son liberados después de su utilización al medio ambiente, esto ha conducido a un desequilibrio ecológico y

está contribuyendo de manera importante a la extinción de un gran número de especies (14).

Los contaminantes ambientales se encuentran de manera casi constante en cualquier ecosistema, algunos tienen la propiedad de bioacumularse produciendo efectos fisiológicos sobre los sistemas inmunológico, cardiovascular, y endócrino entre otros. Sus efectos sobre el sistema endócrino pueden producir interferencia con los procesos normales de reproducción y como consecuencia en el desarrollo de algunas especies animales y del hombre (14,15,).

Entre los contaminantes del medio ambiente se encuentra un grupo de sustancias a las cuales se les ha denominado simuladores hormonales o estrógenos ambientales (EA) (15-19).

Estos productos son de origen natural o sintético de estructura química muy diversa que no guarda relación aparente con las hormonas naturales, sin embargo, poseen actividad estrogénica.

Los EA tienen la capacidad de unirse al receptor del estradiol, y de esta manera simular o bloquear los efectos de los estrógenos naturales produciendo efectos agonistas o antagonistas estrogénicos (16). Por otra parte también pueden interferir en algún paso de la biosíntesis o interferir con el metabolismo de los estrógenos naturales (21-23).

La exposición crónica de EA es motivo de gran preocupación ya que EA como el DDT, algunos alquifenoles y dioxinas, son compuestos bioacumulables y se han asociado con la aparición de anomalías en el aparato reproductor de diversas especies de animales, en el hombre se han relacionado con una mayor incidencia

de anomalías congénitas, disminución de la fertilidad y mayor frecuencia en la aparición de cáncer de mama, próstata y testículos (2, 20,21).

Una de las características de los EA es su alta liposolubilidad, por lo que se acumulan en tejido adiposo tanto de animales como de humanos por períodos prolongados. Su excreción es lenta, algunos estudios han demostrado que estas sustancias pueden interferir en los procesos de reproducción de roedores, aves, peces, monos y el humano. (14).

Estudios recientes demostraron que la administración de ácido p-hidroxibenzoico (APHB) produce respuestas semejantes a las producidas por el E₂. La potencia estrogénica relativa del APHB con respecto al E₂ es baja, 1000 veces menor sin embargo se ha descrito como producto metabólico de un grupo de sustancias que son utilizados ampliamente como conservadores y que se conocen como parabenos (Pbens) (3).

2.9 Generalidades de parabenos (Pbens).

Los Pbens son compuestos con propiedades bactericidas y fungicidas. Estos presentan grandes ventajas frente a algunos otros ya que son activos en un amplio rango de pH (4-8) y generalmente son más efectivos en soluciones ácidas. Su actividad se incrementa conforme aumenta la cadena alquílica, pero disminuye su solubilidad en agua, por lo que se prefieren las sales de sodio de estos compuestos (22).

Las propiedades antes mencionadas combinadas con su falta de color, olor y sabor, hacen que éstos compuestos sean usados extensamente como conservadores.

Son utilizados en preparaciones farmacéuticas, incluyendo líquidos orales, cremas y lociones en concentraciones mayores a 0.3%. Algunas autoridades consideran que los Pbens no son conservadores adecuados en preparaciones oftálmicas por su baja eficiencia contra algunas bacterias G(-), particularmente *Pseudomonas aeruginosa*. En cosméticos y alimentos se utilizan concentraciones mayores a 0.1%.

A menudo se utilizan dos o más Pbens juntos para combinar sus espectros antimicrobianos y de solubilidad, incrementando su eficacia. El MePb y el PrPb se utilizan en inyectables, enjuagues bucales y antisépticos (22).

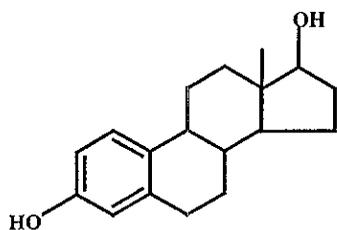
Tabla de Propiedades de los Pbens

Propiedades Físicas				
	MePb	EtPb	PrPb	BuPb
Peso Molecular	152	166	180	194
Punto de fusión (°C)	131	118	97	70
Solubilidad a 25°C en 100ml				
Agua	0.25	0.17	0.05	0.02
Agua (100°C)	2.0	.86	0.30	0.15
Metanol	59	115	124	220
Étanol	52	70	95	210
Acetona	64	84	105	240
Benceno	0.7	1.65	3.0	40
Dietil éter	23	43	50	150
Tetraclorometano	0.1	0.9	0.8	1.0
Propiedades bactericidas				
Fenol = 1	3.8	8.0	17.0	32.0

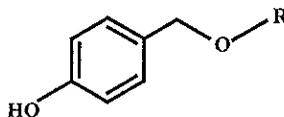
3. HIPÓTESIS

Se han incrementado los estudios que señalan que el anillo fenólico de los estrógenos a sido reconocido como un factor de gran importancia en el inicio de la unión al receptor del estradiol y producción de los cambios conformacionales de eventos que desencadenan la respuesta estrogénica (21, 24,25).

Los Pbens contienen en su estructura química un grupo fenolico en posición *para*, que guarda una relación estructural con el E₂, Figura 5, lo que condujo a pensar que estas substancias pueden tener la capacidad de producir respuestas semejantes a las producidas por el E₂. Los Pbens son utilizados ampliamente como conservadores en la industria farmacéutica, cosmética y alimenticia, por lo que su evaluación estrogénica es de gran importancia (22,23).



17β-Estradiol



Ácido p-hidroxibenzoico y sus ésteres:

R =H	APHB
R =CH ₃	MePb
R =C ₂ H ₅	EtPb
R =C ₃ H ₇	PrPb
R =C ₄ H ₉	BuPb

Figura 5. Estructuras de Estradiol y derivados de ác.p-hidroxibenzoico (Pbens).

4. OBJETIVOS

- Evaluar el efecto de la administración de éster metílico de ácido p-hidroxibenzoico (MePb), éster etílico de ácido p-hidroxibenzoico (EtPb), éster propílico de ácido p-hidroxibenzoico (PrPb), éster butílico de ácido p-hidroxibenzoico (BuPb), en úteros de ratón hembra adulta CD1 Ovx utilizando el método de aumento de peso uterino.
- Estudiar los cambios del tejido uterino utilizando la morfometría.

5. MATERIAL Y METODOS

5.1 Fármacos y Disolventes.

Estradiol (estra-1,3,5(10)trien-3,17 β -diol) ó E₂ fué donado por Syntex , S.A. México D.F., los Pbens éster metílico de ácido p-hidroxibenzoico (MePb), éster etílico de ácido p-hidroxibenzoico (EtPb), éster propílico de ácido p-hidroxibenzoico (PrPb), éster butílico de ácido p-hidroxibenzoico (BuPb) fueron obtenidos de Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA. Todos los compuestos fueron solubilizados en aceite de maíz (Mazola) que fue utilizado como vehículo (V). Se utilizó solución Zamboni para fijar los úteros (26).

5.2 Animales.

Los experimentos se llevaron a cabo en ratones hembra adulta de 25-30g de la cepa CD1 procedentes del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Los ratones hembra adultas fueron ovariectomizadas (Ovx) tres semanas antes de iniciar el estudio. Los animales fueron mantenidos a temperatura constante de 20-22°C en periodos de luz-obscuridad de 12h-12h y se alimentaron con nutricubos de la marca Purina y agua *ad libitum*. Los animales fueron marcados de manera individual para su identificación, mediante pequeñas muescas hechas en el borde de las orejas siguiendo la clave empleada en el laboratorio.

5.3 Diseño Experimental.

Los experimentos se llevaron a cabo en ratones hembra

adultas ovariectomizadas (Ovx). A diferentes grupos de animales asignados a los diferentes tratamientos al azar fueron administrados por vía subcutánea, durante tres días consecutivos con los Pbens en las siguientes dosis diarias: MePb 6 ó 17 mg/kg; EtPb 6 ó 18 mg/Kg; PrPb 7 ó 20 mg/Kg y BuPb 7 ó 21 mg/Kg. Como controles se utilizó estradiol (E₂) 10µg/Kg y aceite de maíz como vehículo (10 ml/Kg), al 4o. día los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Los úteros fueron removidos, pesados, y procesados para su estudio histológico. Se realizaron mediciones en diferentes niveles del útero obteniéndose la altura de los epitelios luminal y glandular y el grosor del miometrio con un microscopio acoplado a un analizador de imágenes (como se describe en el apartado de procesamiento de imágenes).

5.4 Análisis Estadístico.

Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA) y a pruebas de comparación múltiple comparando los promedios de los grupos tratados con los del grupo control utilizando la prueba de Tukey. Se consideraron diferencias significativas entre los grupos cuando los valores de *p* fueron menores de 0.05.

5.5 Técnicas Utilizadas en los Experimentos.

5.5.1 Ovariectomía.

Esta intervención quirúrgica se llevó a cabo en ratonas hembra adultas en las que se indujo la anestesia con hidrato de cloral (7ml/Kg; solución, al 4%). Posteriormente se rasuró y desinfectó el campo quirúrgico en la parte dorsal del animal. Se hizo una incisión transversal de aproximadamente 1 cm y una segunda incisión bilateral longitudinal en el músculo, a una distancia aproximada de

0.5 cm de los músculos espinales dentro de la cavidad peritoneal. Se localizaron los ovarios en el tejido graso, procediendo a su disección. Se suturó en los diferentes planos. Los animales se dejaron recuperar por tres semanas, después de las cuales se tomó un frotis vaginal para certificar la intervención quirúrgica. Solo fueron incluidos en los experimentos animales que presentaban abundancia de leucocitos y escasas de células cornificadas.

5.5.2 Frotis Vaginal.

El frotis vaginal se tomó en las ratonas antes de iniciar el experimento. Para la obtención del frotis vaginal, se sujetó al ratón y se introdujo en el orificio vaginal una asa estéril impregnada de solución salina. Posteriormente la muestra impregnada del exudado vaginal se depositó sobre un portaobjetos, y se dejó secar para proceder a la tinción de la muestra empleando la tinción hematoxilina y eosina. Esta técnica fué utilizada para asegurarnos de que los animales estaban bien operados y en fase diestro.

5.5.3 Técnica de Tinción Hematoxilina-Eosina (Harris).

La muestra de exudado vaginal obtenida anteriormente se procesó de la manera siguiente:

- 1) Fijación en alcohol de 96° durante 10 minutos;
- 2) lavado con agua destilada;
- 3) Tinción en solución de hematoxilina durante 8 min;
- 4) Lavado con agua destilada;
- 5) Un paso rápido por alcohol ácido;
- 6) Lavado con agua destilada;
- 7) Inmersión en agua amoniaca hasta que la preparación viró a un color azul;
- 8) Tinción en eosina alcohólica de 30 a 60 segundos;
- 9) Deshidratación en alcohol de 96° durante 10 segundos;
- 10) Deshidratación en alcohol absoluto aproximadamente durante 10 segundos;
- 11) Inmersión en xilol;
- 12) Montaje con resina sintética..

5.5.4 Extracción de Útero.

Los ratones fueron sacrificados por dislocación cervical, y se llevó a cabo una incisión longitudinal en el abdomen para la disección de los cuernos uterinos. El útero se colocó en una caja de Petri con solución salina donde se limpió el tejido eliminando la grasa. Posteriormente el órgano se secó sobre un papel filtro eliminando el líquido intraluminal con la ayuda de una espátula. Se colocó en una caja previamente pesada para obtener el peso uterino.

5.5.5 Cortes Histológicos.

Los úteros obtenidos anteriormente se procesaron de la manera siguiente:

1) Fijación en solución Zamboni por 24hrs, 2) Deshidratación de los úteros pasándolos por soluciones crecientes en concentración de alcohol (76%, 96%, absoluto); 3) Aclaramiento con Xilol; 4) Inclusión en parafina; 5) Cortes en diferentes niveles y la bifurcación del útero; 6) Encapsulamiento, en bloques de parafina; 7) Cortes, de 6-7 μ m de grosor; 8) Flotación, en un baño de agua-gelatina a 40°C para extender los cortes; 9) Desparafinado, a temperatura aproximada de 56°C por 15 minutos; 10) Hidratación, en soluciones decrecientes de concentración de alcohol (absoluto, 96%, 76%) y agua; 11) Tinción con Hematoxilina-Eosina (Harris); 12) Deshidratación con Xilol; 13) Montaje.

5.5.6 Procesamiento de Imágenes.

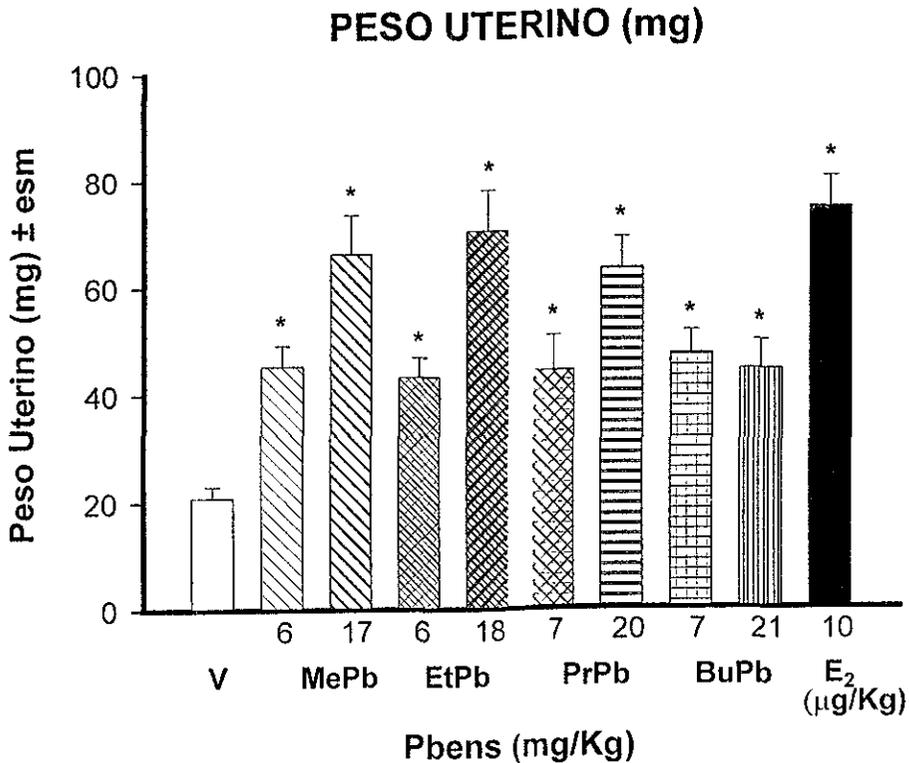
Para la medición de la altura de los epitelios luminal y glandular y del espesor del miometrio, se tomaron un mínimo de 5 a 6 lecturas por útero. Se examinaron bajo un microscopio Carl Zeiss con objetivo de 6.3x, capturando las imágenes con una cámara de video (Hitachi VKM 98 E) acoplado a una interfase de video Targa Color 620 instalada en una computadora PC 386 SX 33 Mhz y a un monitor

Panasonic GM 100. Estas mediciones se realizaron utilizando un paquete de análisis de imágenes Image Pro Plus Versión 2.0. E₂

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Efecto Uterotrófico.

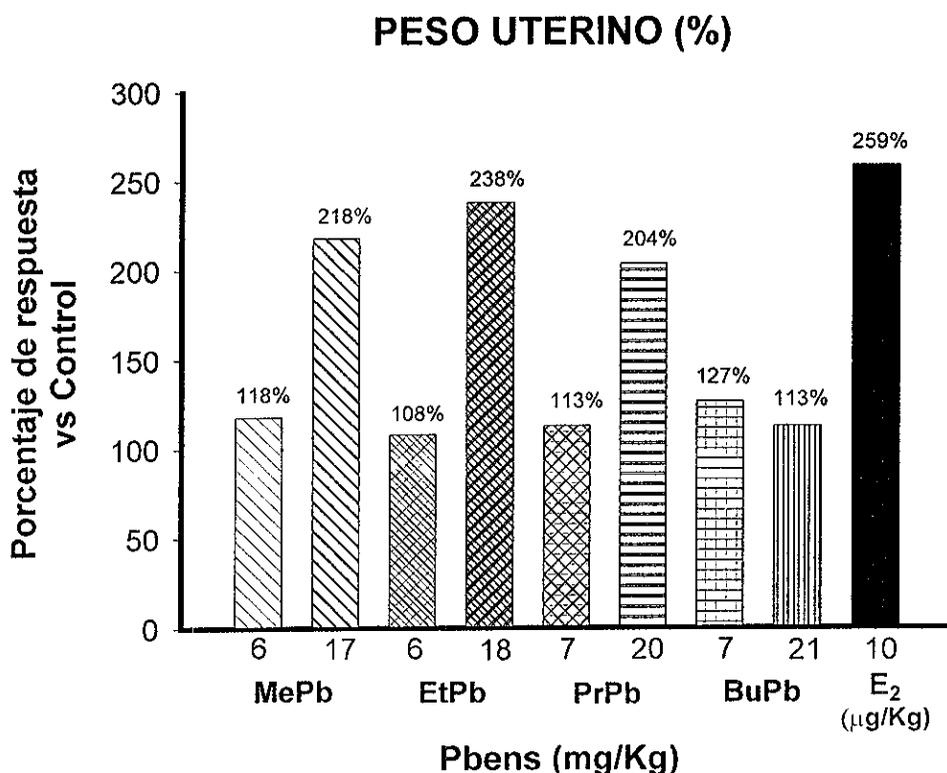
En la gráfica 1, se ilustra el efecto de la administración de dos diferentes dosis de Pbens: MePb, EtPb, PrPb, BuPb sobre el peso uterino comparados con los efectos producidos por la.



Gráfica 1. Efecto sobre peso uterino del ratón hembra Ovx CD1 por la administración de Pbens, V=aceite de maíz (10ml/Kg) y E₂=estradiol (10 µg/Kg). n=6.

administración de E₂ y el vehículo en el ratón Ovx.

Expresando los resultados anteriores en porcentaje de efecto podemos observar con claridad que en todos los casos la administración de las dosis más baja de los diferentes Pbens produce un efecto de aumento del peso uterino alrededor del 100% de forma significativa ($p < 0.05$), Gráfica 2. Con la dosis mayor se observó un efecto mayor excepto en el caso de la administración de 21mg/Kg de BuPb.



Gráfica 2. Efecto sobre peso uterino del ratón hembra Ovx CD1 por la administración de Pbens (mg/Kg) y E₂ (10 µg/Kg) expresado en porcentaje de respuesta vs control.

6.1 Morfometría Uterina.

En las siguientes figuras se ilustran los epitelios luminal y glandular, y el miometrio, los cuales fueron utilizados como parámetros para evaluar el efecto de la administración de Pbens, E₂ y V por morfometría uterina.

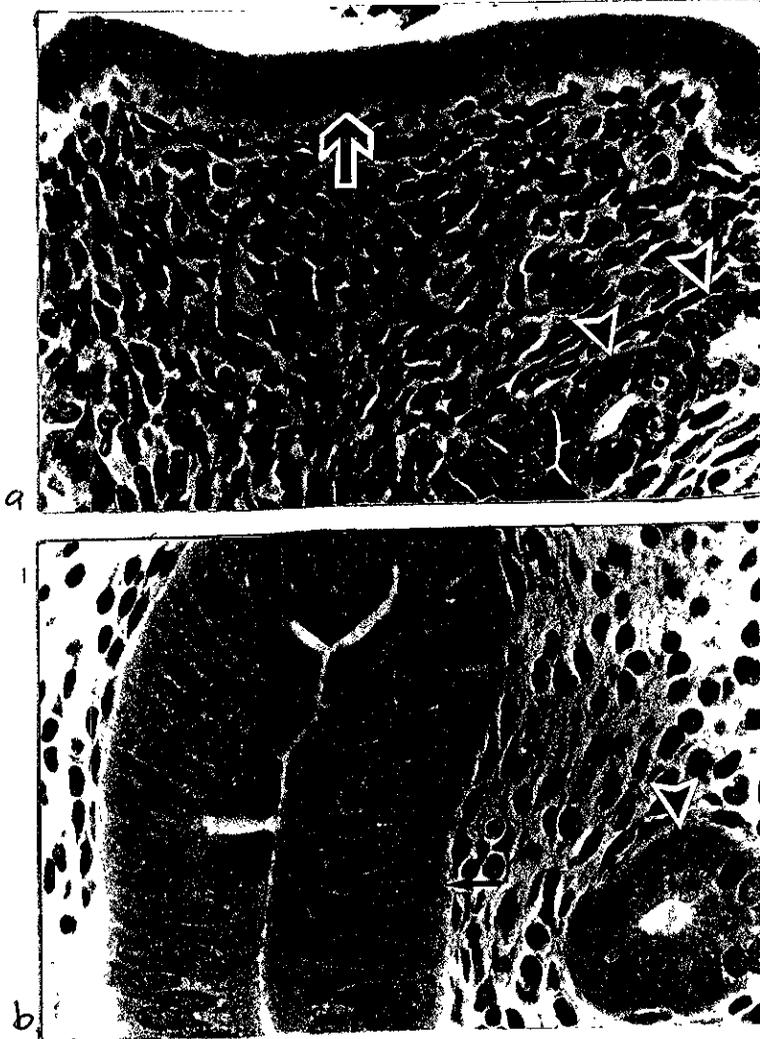
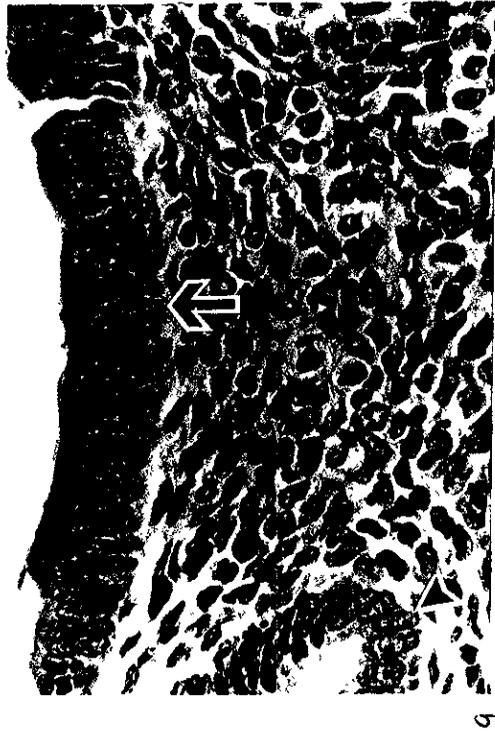


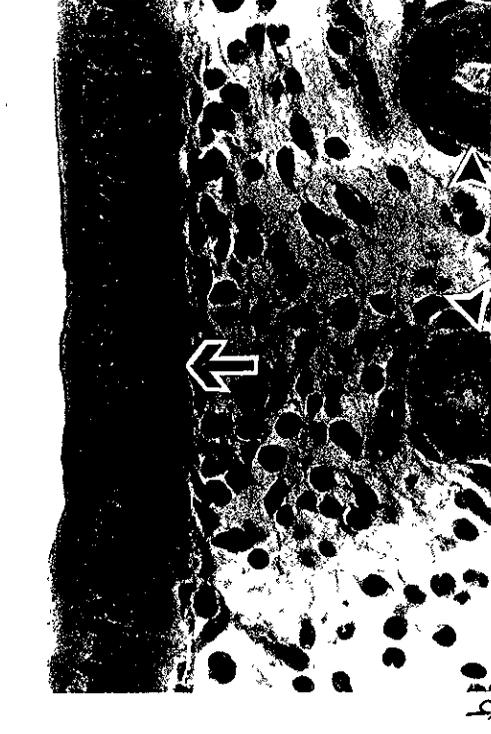
Figura 6. Utero de ratón tratado con a) V=aceite de maíz (10ml/Kg) y E₂ (10 µg/Kg). Epitelio luminal (→), epitelio glandular (▶). H-E, 40x



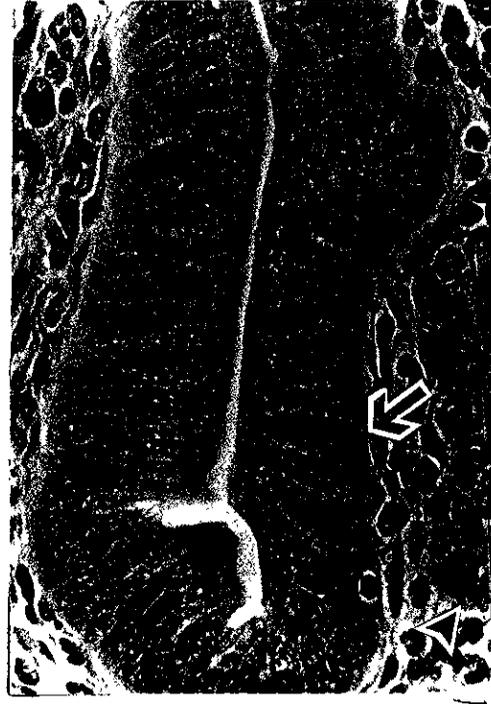
a



b

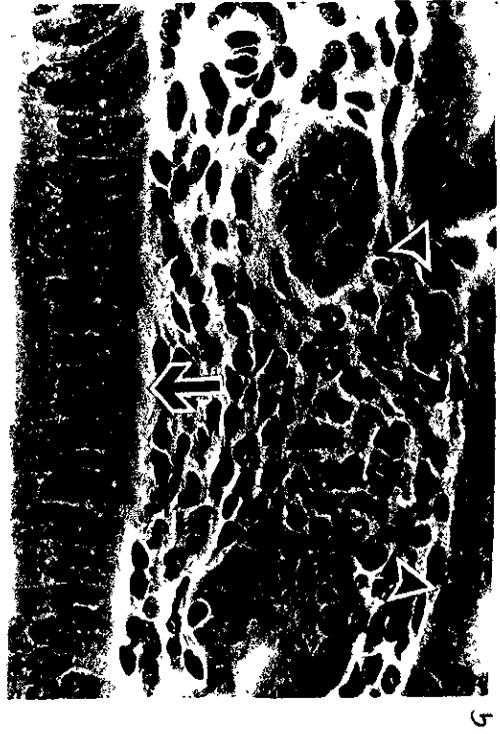


c

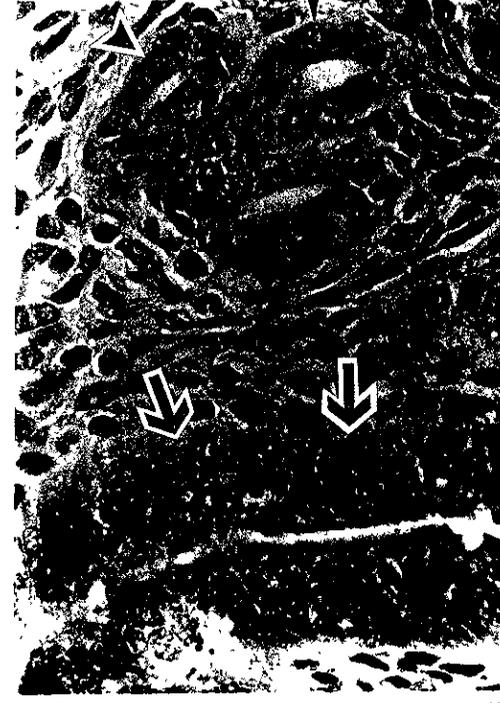


d

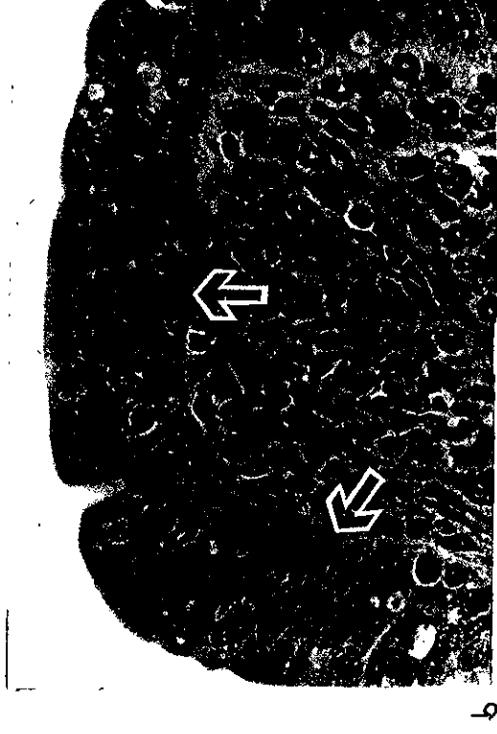
Figura 7. Utero de ratón tratado con MePb a) 6 y b) 17mg/Kg y EtPb c) 6 y d) 18mg/Kg. Epitelio luminal (→), epitelio glandular (△). Hematoxilina-Eosina, 40x.



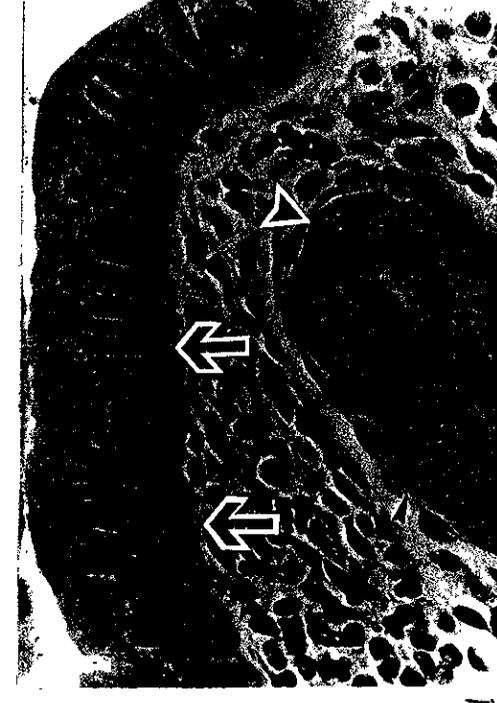
a



b



c



d

Figura 8. Utero de ratón tratado con PrPb a) 7 y b) 20mg/Kg y BuPb c) 7 y d) 21 mg/Kg. Epitelio luminal (→), epitelio glandular (▷). Hematoxilina-Eosina, 40x.

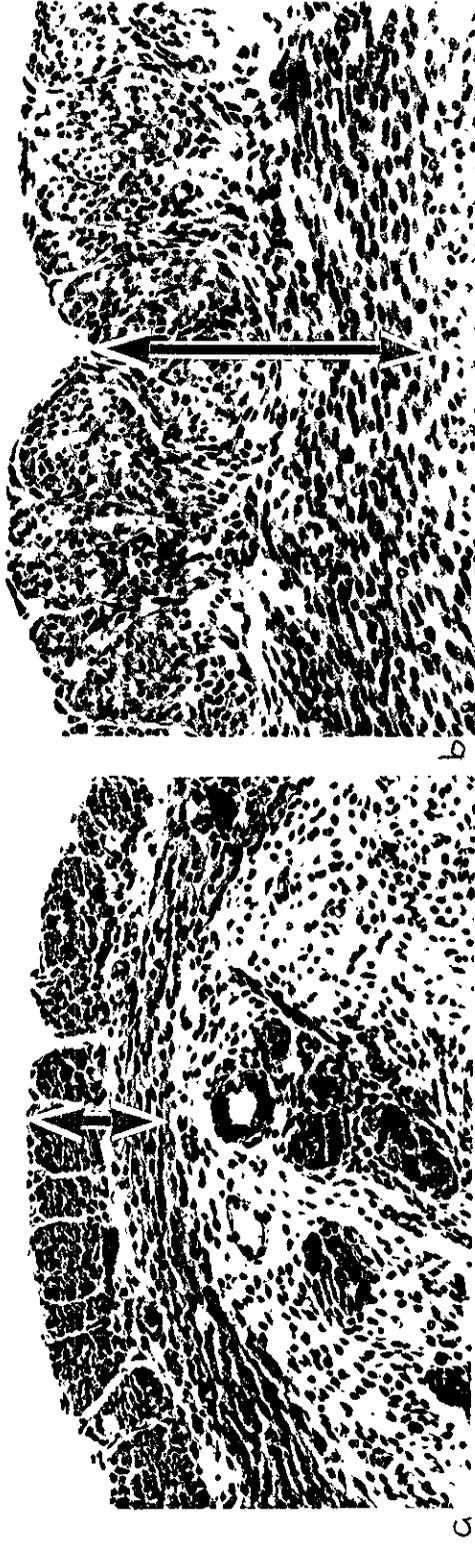
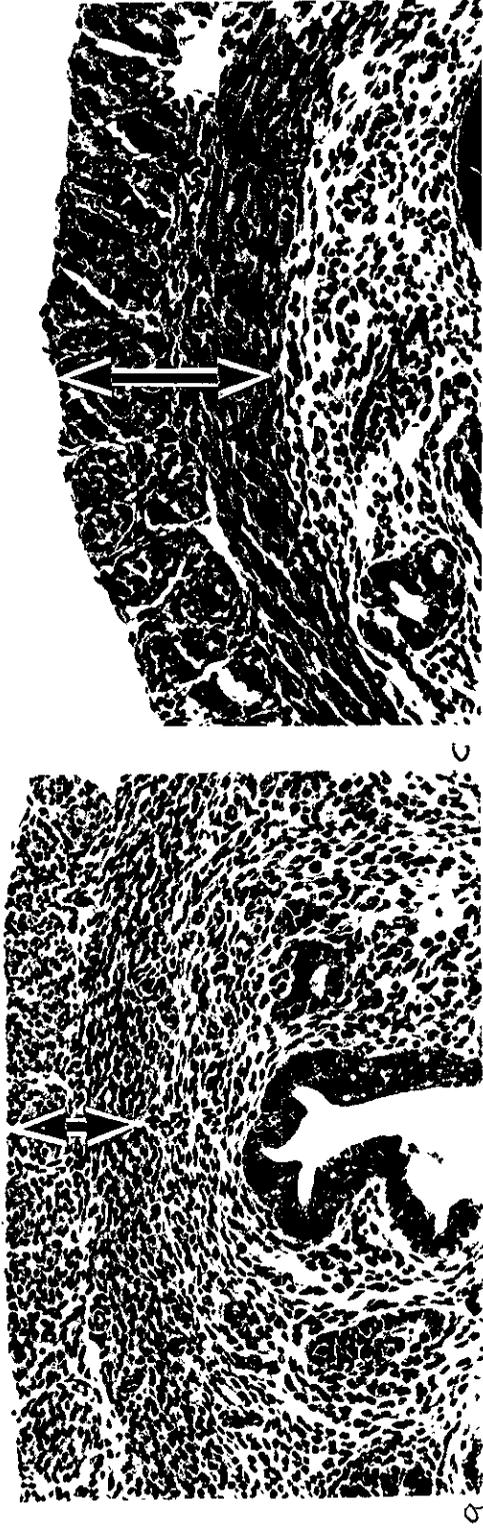
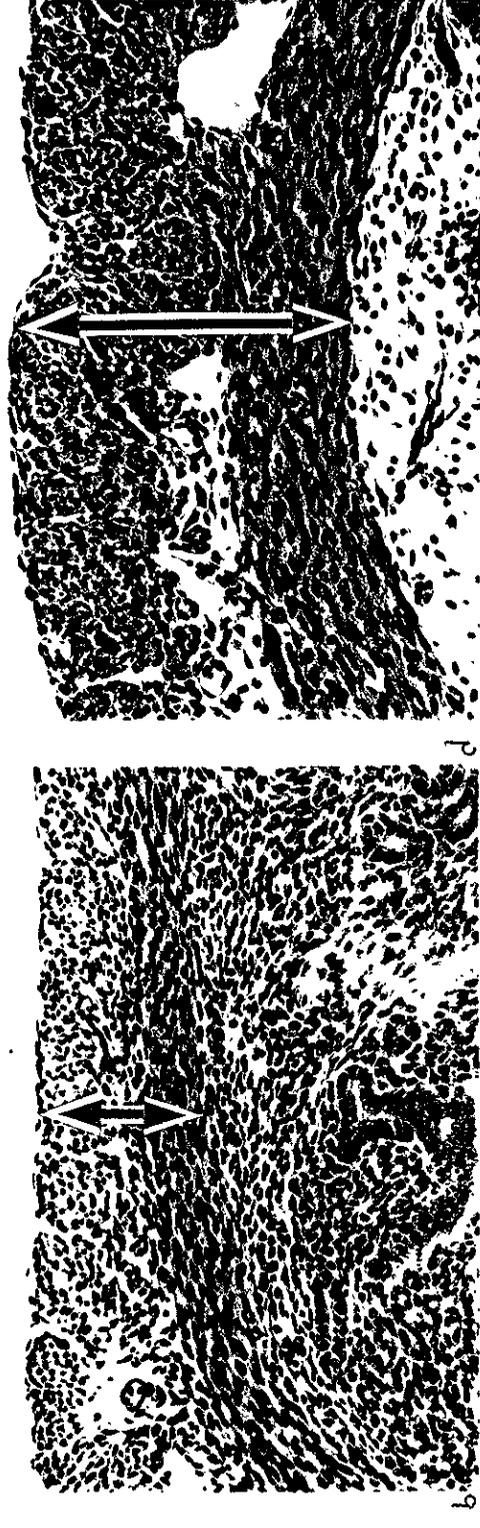


Figura 9. Utero de ratón control tratado con a) Vehículo (aceite de maíz, 10ml/Kg) y b) E₂ (10 µg/Kg). Miometrio (◄ ►). Hematoxilina-Eosina, 40x.



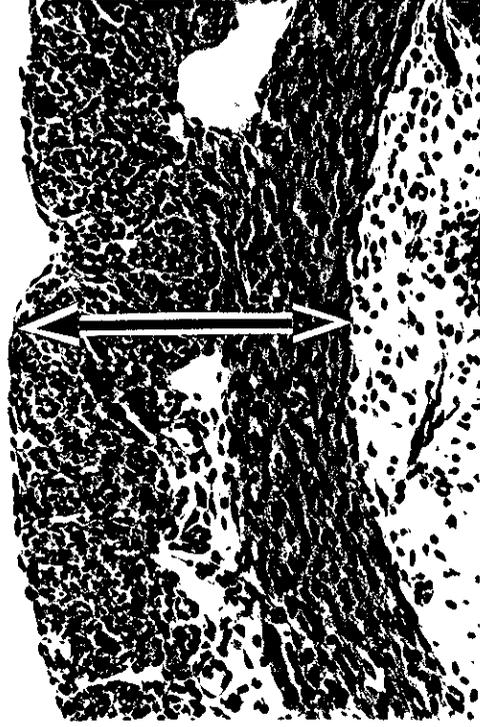
a



b

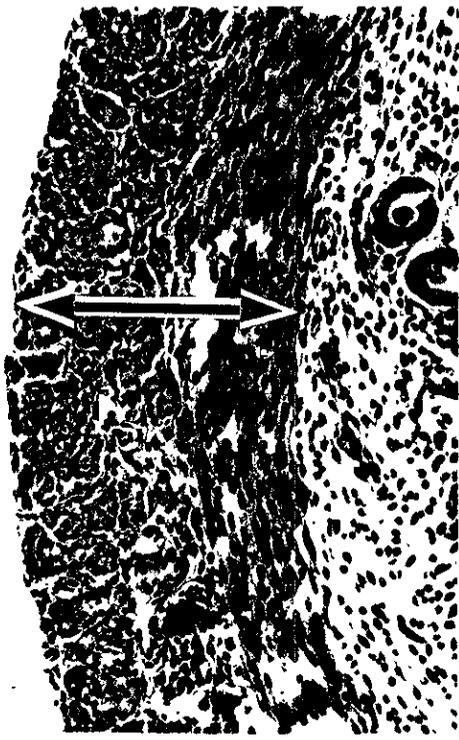


c

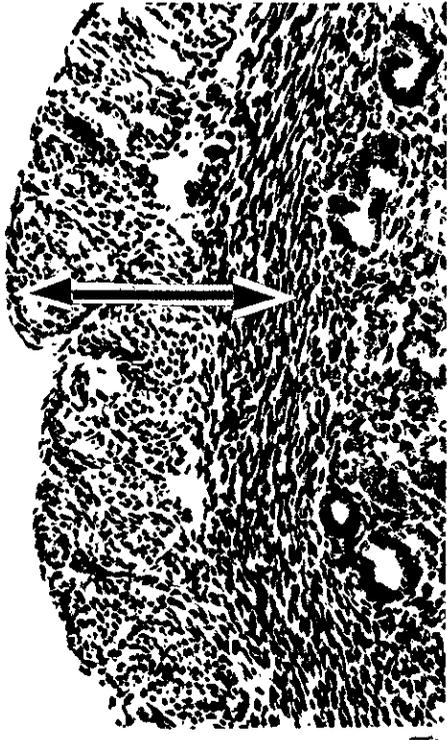


d

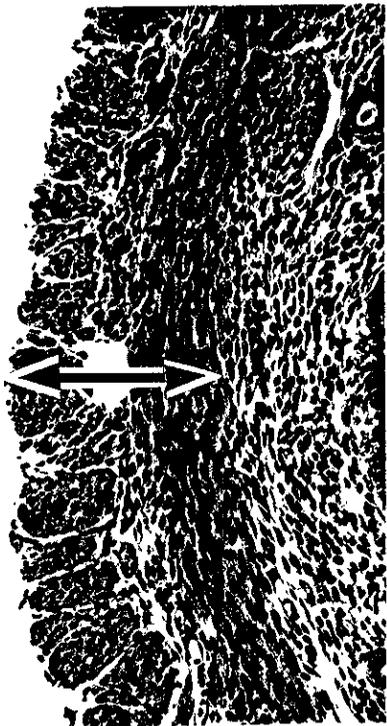
Figura 10. Utero de ratón tratado con MePb a) 6 y b) 17 mg/Kg y EtPb c) 6 y d) 18 mg/Kg. Miometrio (◄ ►). Hematoxilina-Eosina, 40x.



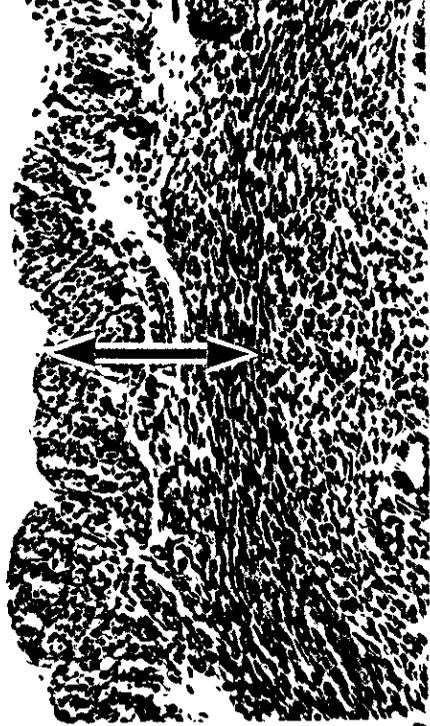
a



b



c



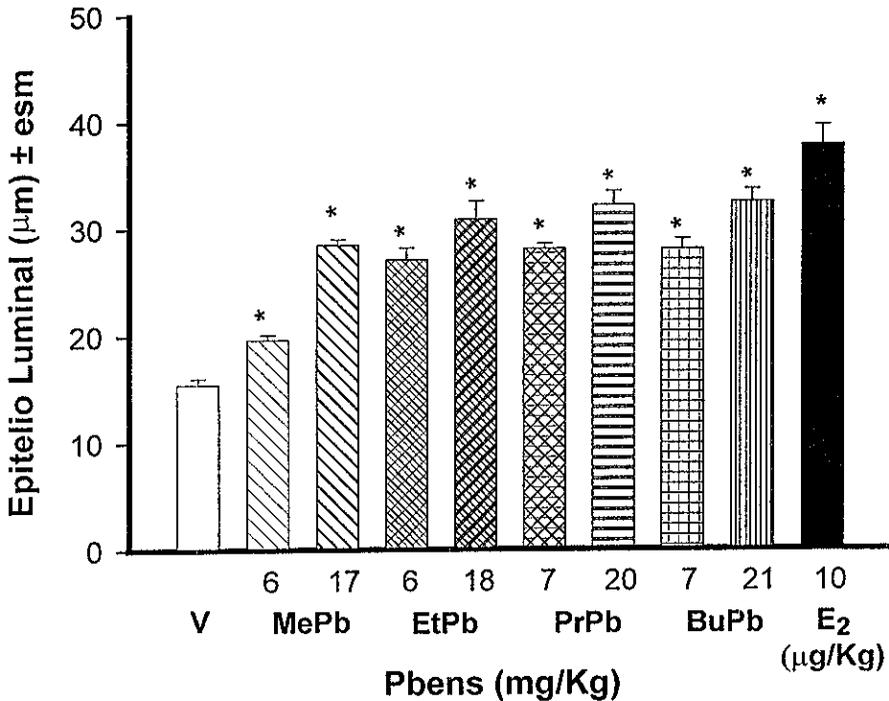
d

Figura 11. Utero de ratón tratado con PrPb a) 7 y b) 20 mg/Kg y BuPb c) 7 y d) 21 mg/Kg. Miometrio (◄ ►). Hematoxilina-Eosina, 40x.

Los efectos observados con MePb, EtPb, y PrPb son muy cercanos a los producidos por E₂.

En las gráficas 3,5,7 se ilustra el efecto en útero de ratón Ovx por la administración de las diferentes dosis de Pbens: MePb, EtPb, PrPb, BuPb sobre la altura de los epitelios luminal, glandular y el grosor del miometrio comparados con los producidos por E₂ y V.

ALTURA DEL EPITELIO LUMINAL (µm)

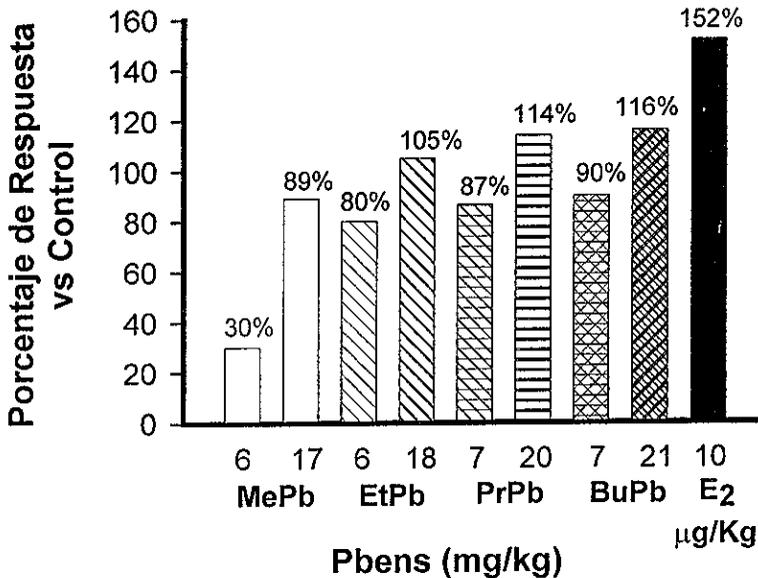


Gráfica 3. Efecto sobre altura de epitelio luminal en útero de ratón hembra Ovx CD1 por la administración de Pbens, Vaíz (10ml/Kg) y E₂ (10 µg/Kg). *p<0.05, n= 6.

Se encontró que todos los Pbens incrementan la altura del epitelio luminal de manera significativa ($p < 0.05$). En todos los casos las respuestas del aumento de la altura de epitelio luminal fueron mayores con la dosis más alta y el efecto fue muy cercano al que produce la administración de E_2 (Gráfica 3).

En la gráfica 4 se ilustra el porcentaje de respuesta del epitelio luminal relativo al grupo control por la administración de las diferentes dosis de Pbens y de E_2 .

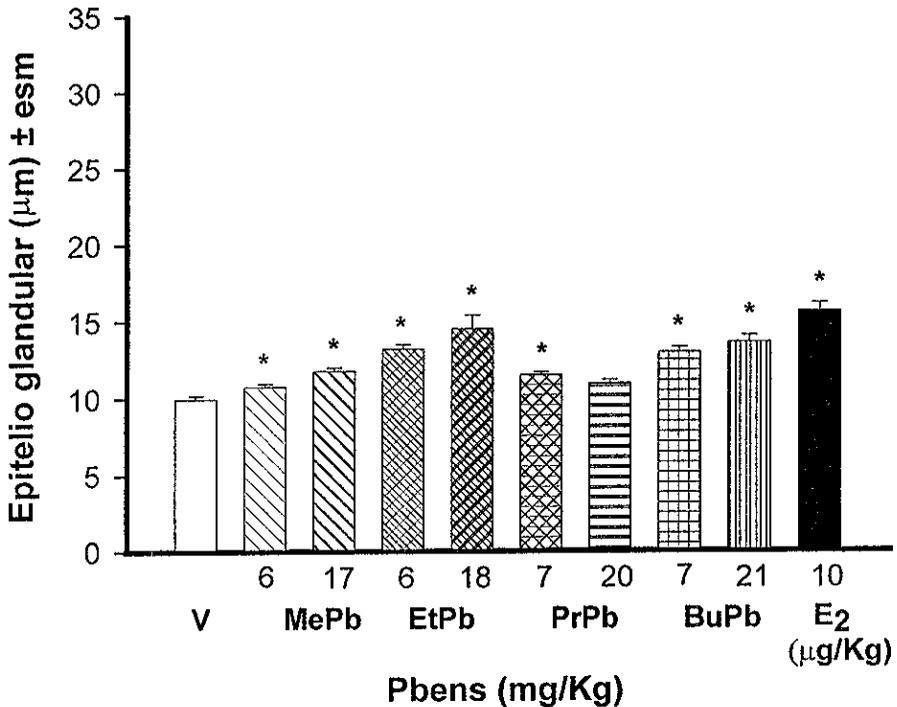
ALTURA DE EPITELIO LUMINAL (%)



Gráfica 4. Efecto sobre altura de epitelio luminal en útero de ratón hembra Ovx CD1 por la administración de Pbens y E_2 (10 $\mu\text{g/Kg}$). $n = 6$.

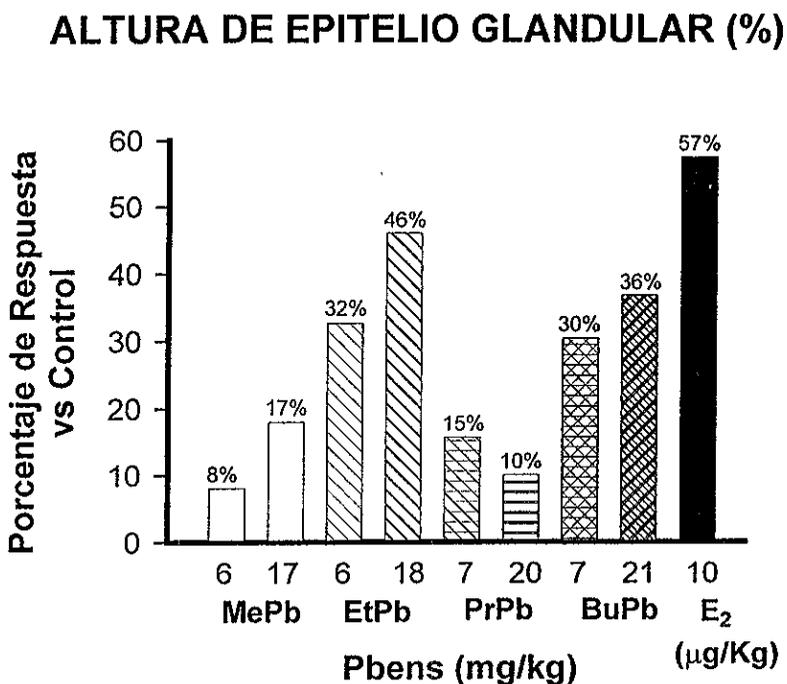
Por otra parte, la altura del epitelio glandular se incrementó de manera significativa (Gráfica 5) ($p < 0.05$) por la administración de Pbens cuando se compara con los valores del grupo control.

ALTURA DE EPITELIO GLANDULAR (μm)



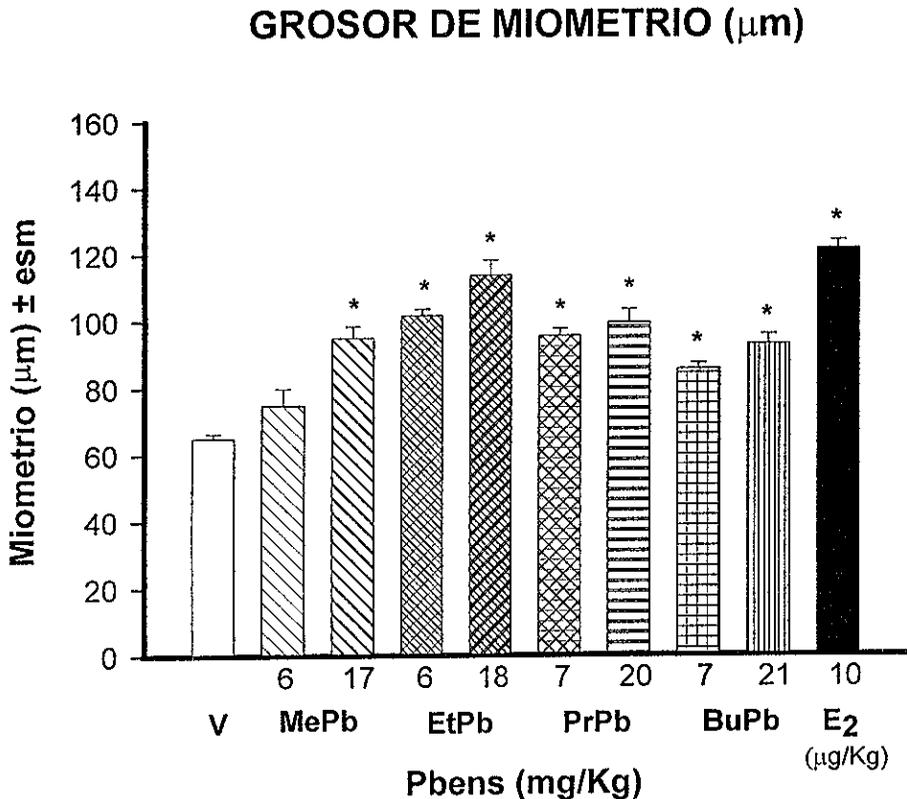
Gráfica 5. Efecto sobre altura del epitelio glandular en útero de ratón hembra Ovx CD1 por la administración de Pbens. V=aceite de maíz (10ml/Kg) y E₂=estradiol (10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$). * $p < 0.05$, n=6.

Los datos de altura de epitelio glandular expresados en porcentaje de respuesta comparados con el grupo control se ilustran en la Gráfica 6. En 18mg/kg de EtPb en epitelio glandular tiene una respuesta de 46% vs el control.



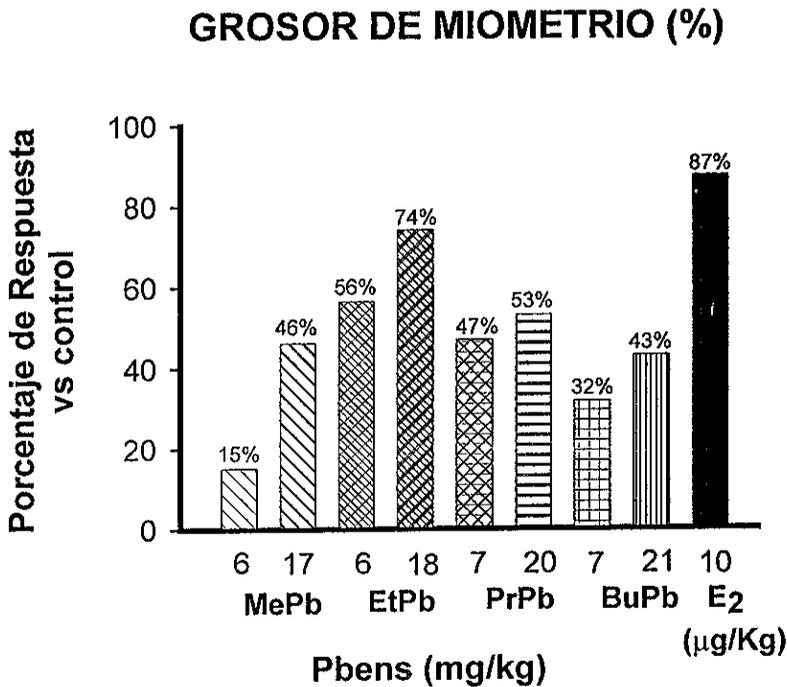
Gráfica 6. Efecto sobre altura del epitelio glandular en útero de ratón hembra Ovx CD1 por la administración de Pbens (mg/Kg) y E₂=estradiol (10 µg/Kg) expresado en porcentaje de respuesta vs control. n=6.

En las gráficas 7 y 8 se ilustra el efecto de la administración de las diferentes dosis de Pbens en el miometrio. Todos los Pbens aumentan el grosor del miometrio significativamente ($p < 0.05$), sólo en el caso de la administración de 6mg/Kg de MePb la respuesta fué no significativa.



Gráfica 7. Efecto sobre grosor del miometrio en útero de ratón hembra OvX CD1 por la administración de Pbens, V=aceite de maíz (10ml/Kg), E₂=estradiol (10 $\mu\text{g/Kg}$). * $p < 0.05$, n=6.

Las respuestas en miometrio son muy variables, en éste caso también se observó una respuesta mayor cuando se administraron dosis más altas. El EtPb presentó una respuesta de 74%, muy cercana a la de E₂ que fué de 87%, Gráfica 8.



Gráfica 8. Efecto sobre grosor del miometrio en útero de ratón hembra Ovx CD1 por la administración de Pbens y E₂=estradiol (10µg/Kg) expresado en porcentaje de respuesta vs control. n=6.

7. CONCLUSIONES

La administración de las dos dosis de Pbens en el ratón hembra adulta Ovx incrementó su peso uterino. El análisis estadístico de éstos datos mediante análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de Tukey señala que estos incrementos del útero comparados con los obtenidos de los grupos control que solo recibieron el vehículo fueron significativos ($p < 0.05$).

Los datos obtenidos por morfometría uterina, muestran incrementos significativos de altura de los epitelios luminal y glandular así como diferencias también significativas en el aumento del grosor de miometrio

La evaluación de los efectos observados por la administración de Pbens indica que éstos fármacos pueden producir respuestas semejantes a las producidas por E_2 . Esto puede deberse a que éstos compuestos posiblemente se unan al receptor de E_2 y producen los cambios alostéricos necesarios para su activación, desencadenando los eventos que conducen a un efecto agonista que se refleja en las diferencias en el incremento global del útero.

Los Pbens son de 1000 a 3000 veces menos potentes que el E_2 , sin embargo es necesario llevar a cabo estudios posteriores que nos permitan determinar el posible riesgo de este grupo de fármacos en los animales y en el humano.

8. TABLAS

Tabla 1. Efecto uterotrófico y morfometría uterina.
Valores promedio \pm esm.

Parabenos Dosis (mg/Kg)	Altura Epitelio Glandular ($m\mu$)	Altura Epitelio Luminal ($m\mu$)	Grosor de Miométrio ($m\mu$)	Peso Uterino (mg)
Vehículo 3ml/Kg	10 \pm 0.2	15 \pm 0.6	65 \pm 1	21 \pm 2
MePb 6	11 \pm 0.2	20 \pm 0.5	75 \pm 5	45 \pm 4
MePb 17	12 \pm 0.2	28 \pm 0.5	95 \pm 3	66 \pm 7
EtPb 6	13 \pm 0.3	27 \pm 1	102 \pm 2	43 \pm 4
EtPb 18	15 \pm 0.9	31 \pm 2	114 \pm 5	70 \pm 8
PrPb 7	12 \pm 0.2	28 \pm 0.5	95 \pm 2	44 \pm 7
PrPb 20	11 \pm 0.2	32 \pm 1	99 \pm 4	63 \pm 6
BuPb 7	13 \pm 0.3	28 \pm 1	86 \pm 2	47 \pm 4
BuPb 21	14 \pm 0.4	32 \pm 1	93 \pm 3	44 \pm 5
17 β -estradiol 10 μ g/kg	16 \pm 0.5	38 \pm 2	122 \pm 2	75 \pm 6

* $p < 0.05$. n=6.

ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA

**Tabla 2. Efecto uterotrófico y morfometría uterina.
Valores porcentuales.**

Parabenos Dosis (mg/Kg)	Altura Epitelio Glandular (%)	Altura Epitelio Luminal (%)	Grosor de Miometrio (%)	Peso Uterino (%)
MePb 6	8	30	15	49
MePb 17	18	89	46	192
EtPb 6	33	80	56	55
EtPb 18	46	105	74	237
PrPb 7	16	87	47	48
PrPb 20	10	114	53	199
BuPb 7	30	90	32	92
BuPb 21	37	116	43	80
17β-estradiol 10μg/kg	57	152	88	219

9. BIBLIOGRAFIA

1. Sharpe R.M., Skakkeback N.E.: Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract *Lancet*, 1:1392-1395, 1993.
2. Henderson, B.E. Ross, R.K., Pike, M.C.: Towards the primary prevention of cancer *Science* 254:1131-1138, 1941
3. Lemini C., Silva G., Timossi C., Luque D. Valverde A., Gonzalez-Manriquez M., Hernández A., Rubio PooC., Chavez Lara B., Valenzuela F.: Estrogenic effects of *p*-hydroxibenzoic acid in CD1 mice. *Environ. Res.* 75:130-134,1997.
4. Grunert G., Fernández S., Tchernitchin A.: Methods for the evaluation cell types or Regions of the uterus. *Horm. Res.* 19:253-262, 1984.
5. Branham W., Zehr D., Sheeham D.: Sensitivity of rat uterine growth and epithelium hypertrophy to estrogens and antiestrogens. *Biology and Medicine* 203:297-303, 1993.
6. O'Connor J., Cook J., Cravens S.: An in vivo battery for identifying endocrine modulators that are estrogenic or dopamine regulators. *Fundamental and applied toxicology* 33:182-185, 1996.
7. Tortora G. J., Anagnostakos N.P.:Sistema endócrino. Principios de anatomía y fisiología. Harla S.A. de C.V. eds., 1989, pp.500-518.
8. Díaz Z., Hicks G.: Metabolismo de hormonas esteroides. *Bioquímica*. Nueva Editorial Interamericana S.A. de C.V., 1995, pp.632-639.
9. Goodman G.: Estrogens and progestins. The pharmacological basis of therapeutics. Mc.Graw-Hill. en: New York, 1996, pp.1411-1440.
10. Bowman W., Rand M. en: Sistema reproductor y drogas que lo afectan. *Farmacología, bases bioquímicas y patológicas. Aplicaciones clínicas*. Bowman, W.C. y Rand, M.J. (eds). Edit. Latinoamericana Barcelona España, 1984, pp 20-52.

11. Bennett J. and Vickery B.: In reproduction and breeding techniques for laboratory animals. Rats and mice. (E.S.E. Hafez, ed.), Febiger, Philadelphia, 1970, Chap 17, pp.299-316.
12. Jameson J.: Steroid/Thyroid hormone receptors. Syllabus. The endocrine society. January 19-24, 1996.
13. Evans J.S., Varney R.F. and Koch F.C.: The mouse uterine weight method for assay of estrogens. *Endocrinology* 28:747-752, 1941.
14. Colborn, T., Clement, C.: Chemically-induced alterations in sexual and functional development. the wildlife/human connection. Colborn, T., Clement, C (ed.). Princeton Scientific, Princeton, pp 1-403, 1992.
15. Hertz R.: The estrogen problem-retrospect and prospect. In: Estrogens in the Environment II. McLachlan J.A.(ed.) New York, Elsevier, 1-11, 1985.
16. Mueller G., Kim U.H.: Displacement of estradiol from estrogens receptors by simple alkylphenols. *Endocrinology* 102:1429-1435, 1978.
17. Soto A., Justicia H., Wray J., Sunnenschein C.:p-Nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environ.Health Perspect* 92:167-173, 1991.
18. Rastogi S. C., Schouten A. De Kruift N.: Contents of methyl-, ethyl-, propyl-, butyl- and benzylparaben in cosmetic products. *Contact Dermatitis* 32:28-30, 1995.
19. Krishnan A.V., Stathis P., Permuth S.F., Tokes L., Feldman D.: Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 132:2279-2286, 1993
20. Sharpe R.M., Skakkeback N.E.: Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract *Lancet*, 1:1392-1395, 1993
21. White R., Jobling S., Hoare S.A., Sumpter J.P., and Parker M.G.: Environmentally persistent alkylphenolic compounds are

- estrogenic. *Endocrinology*, 135:175-182, 1994.
22. Martin D.; Preservatives. *The extra pharmacopea*. U.K., 199-, pp.1357, 1995.
 23. Matthews C., Davison J., Baver E., Morrison J. and Richardson A.: p-hydroxybenzoic acid esters as preservatives II, Acute and chronic toxicity in dogs in rats and mice. *J. Am. Pharm.* 45:260-267, 1956.
 24. Duax W.L., Griffin J.F., and Korach K.S.: Molecular conformation, receptor binding, and hormone action of natural and synthetic estrogens and antiestrogens. *Environ. Health. Perspect.* 61:111-121, 1985.
 25. Jordan V.C., Mitall S., Gosden R.K. and Liberman, M.E.: Structure-activity relationships of estrogens. *Environ. Health. Perspect.* 61:97-110, 1985.
 26. Zamboni L. and De Martino C.: Buffered picric acid-formaldehyde: a new rapid fixative for electronmicroscopy. *J.Cell Biol.* 35, 148A, 1965.