

2ej



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

EVALUACION DEL EFECTO ESTROGENICO DE LOS
PARABENOS POR LA TECNICA DEL E-SCREEN.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO
P R E S E N T A
JULIO CESAR RIVERA LEYVA

MEXICO D.F.

1999.

246265

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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 Eréndida Páez Aguirre
Secretario	Prof. Cristina Lemini Guzmán
1er. Suplente	Prof. Ana María Vázquez Álvarez
2o. Suplente	Prof. Atonatiú Edmundo Gómez Martínez

Sitio donde se desarrolló el tema:

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

Asesor:



M. en C. Cristina Lemini Guzmán

Sustentante:



Julio César Rivera Leyva.

El presente trabajo se llevó a cabo en el Departamento de la Farmacología de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la dirección de la M. en C. Cristina Lemini Guzmán con el apoyo financiero del proyecto de DGAPA IN205396.

Solo unas cuantas palabras...

El pueblo que olvida su pasado, está condenado a repetirlo...

A Dios, pues sin Él nada es posible.

Para mi Madre, Angeles Leyva a quién deseo Dios me ayude a conservar.

A Bertha y Sandra, por su amor y cariño.

A Raymundo, deseando que Dios lo acompañe por siempre.

A Alejandro y Nati, por haberme soportado.

No olvidemos que también existen los niños...

Toño, Ale, Adilene, Jesús y Lupita.

... y no debo olvidar que mi familia es lo más importante para mí.

Un agradecimiento especial a quienes me apoyaron y aún lo siguen haciendo:

Paty Trejo, gracias.
Vicky Guzmán.
Conchita Montes.
Felipe García.
Armando Tazos
Emilio Hernández
Paty González.

Jaqueline Avonza.
Angeles Hernández.
Ana Laura Ortega.
Elvia Hernández.
Karla Mendoza.

A Dora, con cariño.
Yolanda Romero, gracias.
Silvia López.
Lucecita, por poco la olvido.

*Un recuerdo especial para Jenny Madeleine
y Juan Sebastián, aunque estén lejos.*

¿Porqué no decirlo? A Elvira también.

Para mi amiga Greys, un saludo y un abrazo. Gisela Riveron, gracias.
Para Silvia Citlali, gracias. Adriana Angel.
Marina, ¿que habría hecho sin tí? Claudia Sánchez.
A Lolita Soriano. Isabel Sánchez Serratos.
Angélica Pablo, ¿dónde andas? Los cuates:
Rivelino, Ramoncito, mi Sensei José Luis y
Jorge Sandín.
Gaby Meza, un beso. Ruth Jaimez, gracias.
Atenea, gracias.

Un agradecimiento especial a Germán Espinoza por su apoyo total.

A Carlos Cabrera, por su inutilidad.

*¿ Cómo olvidarte, si has sido un motivo para vivir, para pensar, para llorar o reír?
Fuiste una ilusión, un cariño, una luz y en parte oscuridad. He vivido pensando en ti,
acompañándote a cada momento, sintiendo que me haces falta, pero has estado aquí,
cada instante sin separarte de mí. Por eso no puedo olvidarte, no puedo dejarte,
aunque no estés conmigo.*

Con cariño, para Vero.

INDICE

1. INTRODUCCION

- 1.1 LAS HORMONAS ESTEROIDES
- 1.2 FUNCIÓN
- 1.3 BIOSÍNTESIS
- 1.4 EL RECEPTOR DE LAS HORMONAS ESTEROIDES Y SU MECANISMO DE ACCIÓN
- 1.5 ESTRÓGENOS AMBIENTALES
- 1.6 EFECTOS ADVERSOS DE LOS ESTRÓGENOS AMBIENTALES
- 1.7 ORIGEN DE LOS ESTRÓGENOS AMBIENTALES
- 1.8 EL EFECTO ESTROGÉNICO
- 1.9 EVALUACIÓN DEL EFECTO ESTROGÉNICO
- 1.10 EL E-SCREEN

2. HIPOTESIS

3. OBJETIVOS

4. MATERIAL Y METODOS

- 4.1 MATERIALES UTILIZADOS
- 4.2 ACTIVACION DE CARBON
- 4.3 PREPARACION DEL SUERO HUMANO SIN ESTEROIDES CON MEZCLA DE CARBON-DEXTRAN
- 4.4 MANTENIMIENTO RUTINARIO DE CELULAS
 - 4.4.1 Preparación del medio de proliferación
 - 4.4.2 Prueba de esterilidad
 - 4.4.3 Cultivo de células
- 4.5 CONGELAMIENTO Y DESCONGELAMIENTO DE CELULAS
 - 4.5.1 Congelación
 - 4.5.2 Descongelación
- 4.6 BIOENSAYOS EN EL E-SCREEN
 - 4.6.1 Preparación de soluciones
 - 4.6.2 Adhesión de células
 - 4.6.3 Cuenta inicial de células
 - 4.6.4 Adhesión de células en placas de cultivo
 - 4.6.5 Estimulación
 - 4.6.6 Evaluación de la proliferación celular
 - 4.6.7 Cuenta en contador Coulter
 - 4.6.8 Cuenta celular utilizando azul de tetrazoleo (MTT)

5. RESULTADOS Y DISCUSION.

- 5.1 CALIBRACIÓN DEL CONTADOR COULTER
- 5.2 LINEARIDAD EN LA TECNICA DE MTT
- 5.3 CURVA DE CRECIMIENTO DE CELULAS MCF-7
- 5.4 ESTIMACION DE LA INFLUENCIA DE LOS PBENS SOBRE LA PROLIFERACION DE CELULAS MCF-7 UTILIZANDO EL CONTADOR COULTER
- 5.5 ESTIMACION DE LA INFLUENCIA DE LOS PBENS SOBRE LA PROLIFERACIÓN CELULAR UTILIZANDO LA TÉCNICA DE MTT

6. CONCLUSIONES

7. BIBLIOGRAFIA

1. INTRODUCCIÓN

1.1 LAS HORMONAS ESTEROIDES

Una hormona es una sustancia producida por un tejido glandular y que después de su transporte por el medio interno, actúa sobre otro órgano distante desencadenando una serie de actividades específicas (1).

Las hormonas pueden clasificarse por su composición química, su solubilidad, la ubicación de sus receptores y la naturaleza de las señales usadas para mediar su acción dentro de la célula; de esta manera, se han clasificado en dos grupos :

Hormonas Tipo I : Son lipofílicas y derivan del colesterol, como las hormonas esteroideas, cuyo núcleo estructural es el ciclopentanoperhidrofenantreno (CPPF). Se unen a las proteínas transportadoras en el torrente sanguíneo y son liberadas posteriormente antes de entrar a la célula. La hormona libre atraviesa con facilidad la membrana plasmática de todas las células y encuentra receptores en el citosol o en el núcleo de las células blanco. Se asume que el complejo ligando receptor es el mensajero intracelular en este grupo.

Hormonas Tipo II: Son hormonas hidrosolubles que se unen a la membrana plasmática de la célula blanco. Las hormonas que se fijan a la superficie celular se comunican con los procesos metabólicos intracelulares a través de moléculas intermediarias llamadas segundos mensajeros que son generados como consecuencia de la interacción entre ligando y receptor. En esta categoría se incluyen las catecolaminas, angiotensina II, hormona adrenocorticotrópica (ACTH), hormona antidiurética (ADH), hormona luteinizante (LH), vasopresina, insulina, hormona del crecimiento (GH), y prolactina (PRL) (2).

Los compuestos derivados del CPPF se denominan esteroideas y pueden clasificarse en:

a) ácidos biliares, b) esteroides y c) hormonas esteroideas. Las hormonas esteroideas naturales desempeñan un papel esencial en la regulación de múltiples procesos biológicos en los mamíferos entre los que destacan homeostasis hidroelectrolítica, dimorfismo sexual y función reproductora. La mayoría de estas hormonas se biosintetizan en las glándulas de secreción

interna (suprarrenales, ovario y testículo) y en otros órganos que también tienen actividad esteroideogénica como la placenta y el hígado fetal (3).

De acuerdo con su actividad biológica, las hormonas esteroides se clasifican en los 5 grupos siguientes:

- a) Glucocorticoides (C_{21}).
- b) Mineralocorticoides (C_{21}).
- c) Progestinas naturales (C_{21}).
- d) Andrógenos (C_{19}).
- e) Estrógenos (C_{18}).

1.2 FUNCIÓN

A continuación se señalan las principales funciones de las hormonas esteroides:

Glucocorticoides

A. Metabolismo intermedio

1. Gluconeogénesis. Las hormonas glucocorticoides reciben su nombre de su capacidad de promover la síntesis de glucosa. Esto se realiza en una acción conjunta que abarca varios tejidos, vías bioquímicas y acciones anabólicas y catabólicas. Los glucocorticoides promueven la producción hepática de glucosa al incrementar la velocidad de la gluconeogénesis liberando los aminoácidos de los tejidos periféricos como el músculo y el tejido linfoide. Inhiben la captación de glucosa en tejidos extrahepáticos, dando como efecto neto una alta concentración plasmática de glucosa, esta acción es contrarrestada por la liberación de insulina (2, 4).

2. Síntesis de glucógeno. Los glucocorticoides incrementan el depósito de glucógeno en el hígado de animales en ayunas o alimentados al promover la conversión de la glucógeno sintasa de su forma inactiva a su forma activa.

3. Metabolismo de lípidos. Promueven la lipólisis en algunas áreas del cuerpo (extremidades) y la lipogénesis en otras (cara y tronco).

4. Metabolismo de proteínas y aminoácidos. Por lo general tienen efectos anabólicos sobre el metabolismo de proteínas y del RNA en el hígado, y efectos catabólicos en otros sitios, incluyendo músculo, tejidos linfoides, tejido adiposo, piel y hueso.

B. Efecto de los glucocorticoides sobre los mecanismos de defensa del huésped.

1. Respuesta inmunitaria. Las concentraciones altas de glucocorticoides suprimen la respuesta inmunitaria del hospedero. Destruyen los linfocitos y causan regresión del tejido linfoide. Afectan la respuesta proliferativa de los linfocitos a los antígenos y en menor grado a los mitógenos. Parecen afectar el procesamiento del antígeno por los macrófagos, la producción de anticuerpos por linfocitos B, las acciones de los linfocitos T supresores y auxiliares y el metabolismo de los anticuerpos (2).

2. Respuesta antiinflamatoria. En el hombre, los glucocorticoides reducen el número de linfocitos, monocitos y eosinófilos circulantes, por un desplazamiento de las células de la circulación a sitios como la médula ósea, el tejido linfoide y el bazo. Estimulan la liberación de polimorfonucleares desde médula ósea, aumentando su número en circulación. Inhiben la acumulación de los leucocitos en el sitio de la inflamación y provoca que las sustancias que intervienen en la respuesta inflamatoria (cininas, factor activador de plasminógeno, histamina y prostaglandinas) sean liberadas de los leucocitos. Inhiben la proliferación de fibroblastos en el sitio de una respuesta inflamatoria y pueden inhibir funciones fibroblásticas, como la producción de colágeno y fibronectina. La combinación de estos efectos explica la curación deficiente de las heridas, el aumento en la susceptibilidad a la infección y la respuesta inflamatoria disminuida, características en los pacientes con exceso de glucocorticoides (2, 4).

C. Efectos de los glucocorticoides sobre otras funciones.

1. Función cardiovascular. Son necesarios para el mantenimiento de la presión sanguínea y el gasto cardiaco normales.

2. Metabolismo de líquidos y electrolitos. Los humanos con deficiencia de glucocorticoides son incapaces de excretar normalmente el agua. Se relaciona este hecho con el incremento en la secreción de ADH y la retención de agua en pacientes con deficiencia en la producción de glucocorticoides.

Mineralocorticoides

La corteza suprarrenal sintetiza dos clases de esteroides: los corticosteroides (mineralocorticoides y glucocorticoides), con 21 átomos de carbono y los andrógenos con 19. Las hormonas mineralocorticoides actúan en el riñón para estimular el transporte activo de Na^+ por los túbulos contorneados distales y los túbulos colectores, siendo el resultado neto la retención de Na^+ . Inducen también la secreción de K^+ , H^+ y NH_4^+ por el riñón y afectan al transporte de iones de otros tejidos epiteliales, incluyendo las glándulas sudoríparas, la mucosa intestinal y las glándulas salivales. Como el mineralocorticoide natural más potente, la aldosterona realiza casi toda esta acción en los humanos. El cortisol, bastante menos potente, tiene una tasa de producción mucho mayor y su efecto en la retención de Na^+ y la excreción de K^+ es significativo. Forman parte de este grupo de hormonas la aldosterona, corticosterona, la 11-desoxicorticosterona y el cortisol (3, 4).

Progestágenos

La progesterona es la hormona esteroide que realiza la preparación morfofuncional del endometrio para la nidación del huevo fertilizado, el mantenimiento de la gestación y el desarrollo alveolar de la glándula mamaria, esencial para la lactancia. En forma conjunta con los estrógenos, modula un número importante de efectos primordiales en el sistema nervioso

central y órganos periféricos durante la etapa reproductora de la vida. Los principales órganos de producción de progesterona son el cuerpo lúteo del ovario y la placenta. La corteza suprarrenal y el testículo también biosintetizan progesterona como intermediario en la formación de otras hormonas esteroides (5).

Andrógenos

El andrógeno más importante, la testosterona, es sintetizada en los testículos, en los ovarios y la corteza suprarrenal. En la circulación la testosterona actúa como un precursor en la formación de dos clases de esteroides: los andrógenos reducidos en la posición 5α , que intervienen como mediadores intracelulares en muchas de las acciones de los andrógenos y los estrógenos. De esta forma el efecto neto de la acción de los andrógenos endógenos es la suma de los efectos de la hormona secretada (testosterona), su metabolito 5α reducido (dehidrotestosterona, DHT), y su derivado estrogénico (estradiol). Los andrógenos cumplen diferentes funciones en distintas etapas de la vida. Durante el período embrionario virilizan el tracto urogenital del embrión masculino y su acción es capital para el desarrollo del fenotipo masculino. En la pubertad, las hormonas actúan transformando al niño en hombre. La mínima secreción de andrógenos por los testículos prepúberes y por la corteza suprarrenal suprime la secreción de gonadotrofinas hasta que a una edad variable, esta se hace menos sensible a la inhibición por retroalimentación y los testículos empiezan a aumentar de tamaño. Poco después inicia el crecimiento del pene y el escroto y aparece el vello pubiano. Inducen simultáneamente un aumento de la estatura y el desarrollo de la musculatura esquelética y con ello un aumento en el peso corporal. Por acción de los andrógenos, la piel se hace más gruesa y oleosa a causa de la proliferación de las glándulas sebáceas. Crece el vello axilar, además de que existe en el cuerpo una distribución del mismo en forma típicamente masculina. Por crecimiento de la laringe cambia el tono de voz, volviéndose más grave. En algunos casos, se manifiestan fenotipos asociados al sexo, como la calvice. Los andrógenos también son los responsables en parte, del comportamiento agresivo en animales y sexual masculino en animales y humanos (4, 5).

Estrógenos.

En los humanos, los estrógenos, son las hormonas que participan en la diferenciación sexual durante la gestación y de las modificaciones que tienen lugar en las niñas durante la pubertad. En la diferenciación sexual, los estrógenos estimulan una serie de cambios en las células de Sertoli y células de Leydig dando forma a los órganos sexuales masculinos accesorios, epidídimo y vesícula seminal. Mediante una acción directa causan el crecimiento y el desarrollo de la vagina, el útero, y las trompas de Falopio. Inducen al aumento de tamaño de las mamas al promover el crecimiento ductal, el desarrollo del estroma y la acumulación de grasa. Contribuyen a moldear el contorno corporal, dando forma al esqueleto y produciendo cambios en los huesos largos (5).

Otros cambios que estimulan los estrógenos son el crecimiento de vello axilar y pubiano, y la pigmentación de la piel de los pezones, areolas y región genital, hay cambios que están condicionados a la acción de los estrógenos, aunque no de manera específica, como son los efectos fisiológicos y emocionales. El ciclo menstrual es también responsabilidad de los estrógenos y resultado de la periodicidad cíclica de éstos. De esta forma se explica la proliferación cíclica de la mucosa vaginal y uterina, aumento de la secreción de las glándulas del cuello uterino y turgencia mamaria. La declinación de la actividad progestacional y estrogénica al final del ciclo induce la menstruación. Los principales estrógenos naturales son estrona (E_1), 17- β estradiol (E_2), y estriol (E_3), los cuales se biosintetizan en el ovario, placenta y en menor proporción en el testículo (3).

1.3 BIOSÍNTESIS

La biosíntesis de hormonas esteroideas se lleva a cabo a partir de colesterol, compuesto de 27 átomos de carbono (Figura 1). Esta implica una serie sucesiva de cambios inducidos enzimáticamente, que da como resultado su transformación a compuestos de 21 átomos de carbono (progesterona, glucocorticoides y mineralocorticoides), 19 átomos de carbono (andrógenos) y 18 átomos de carbono (estrógenos); por otro lado, la biosíntesis de *novo* de todas estas hormonas se inicia a partir de acetil-CoA y utiliza el colesterol (C_{27}) como intermediario obligatorio (4).

En las glándulas suprarrenales son sintetizadas las hormonas esteroideas a partir del colesterol que se deriva en su mayor parte del plasma, una porción pequeña es sintetizada *in situ* a partir de acetilCoA vía mevalonato y escualeno. Gran parte del colesterol es esterificado en la glándula suprarrenal y almacenado en gotitas citoplásmicas de lípidos. Bajo la estimulación de la suprarrenal por la hormona adrenocorticotrópica (ACTH) se activa una esterasa y el colesterol libre formado es transportado al interior de la mitocondria donde una enzima de escisión de cadena lateral citocromo P-450 (P450_{SCC}) lo convierte a pregnenolona. La separación de la cadena lateral comprende hidroxilaciones en secuencia, primero en C₂₂ y después en C₂₀, seguidas por la escisión de la cadena lateral (eliminación del fragmento de seis carbonos, isocaproaldehído) para formar un esteroide de 21 carbonos. Una proteína dependiente de ACTH puede unirse y activar al colesterol o al P450_{SCC}. Las hidroxilasas, que requieren oxígeno molecular y NADPH son esenciales y en algunos pasos, también son necesarias deshidrogenasas, una isomerasa y una liasa (2).

Biosíntesis de mineralocorticoides.

La síntesis de la aldosterona se realiza en la zona glomerulosa de las glándulas suprarrenales. La pregnenolona es convertida a progesterona por la acción de dos enzimas del retículo endoplasmático liso, la 3β-hidroxiesteroide deshidrogenasa (3β-OHSD) y la Δ^{5,4} isomerasa. La progesterona es hidroxilada en la posición C₂₁ para formar 11-desoxicorticosterona (DOC) que es un mineralocorticoide activo (produce retención de Na⁺). La hidroxilación siguiente, en C₁₁, produce corticosterona, que tiene actividad de glucocorticoide y es un mineralocorticoide débil. La hidroxilación en C₂₁ es necesaria para la actividad de mineralocorticoide, pero la mayor parte de los esteroideos con un grupo hidroxilo en C₁₇ tienen más acción glucocorticoide que mineralocorticoide. En la zona glomerulosa, donde no hay enzima 17α-hidroxilasa, existe una 18-hidroxilasa mitocondrial. La 18-hidroxilasa actúa sobre la corticosterona para formar la 18-hidroxicorticosterona, que es modificada a aldosterona por la conversión del alcohol 18 a un grupo aldehído (3, 6).

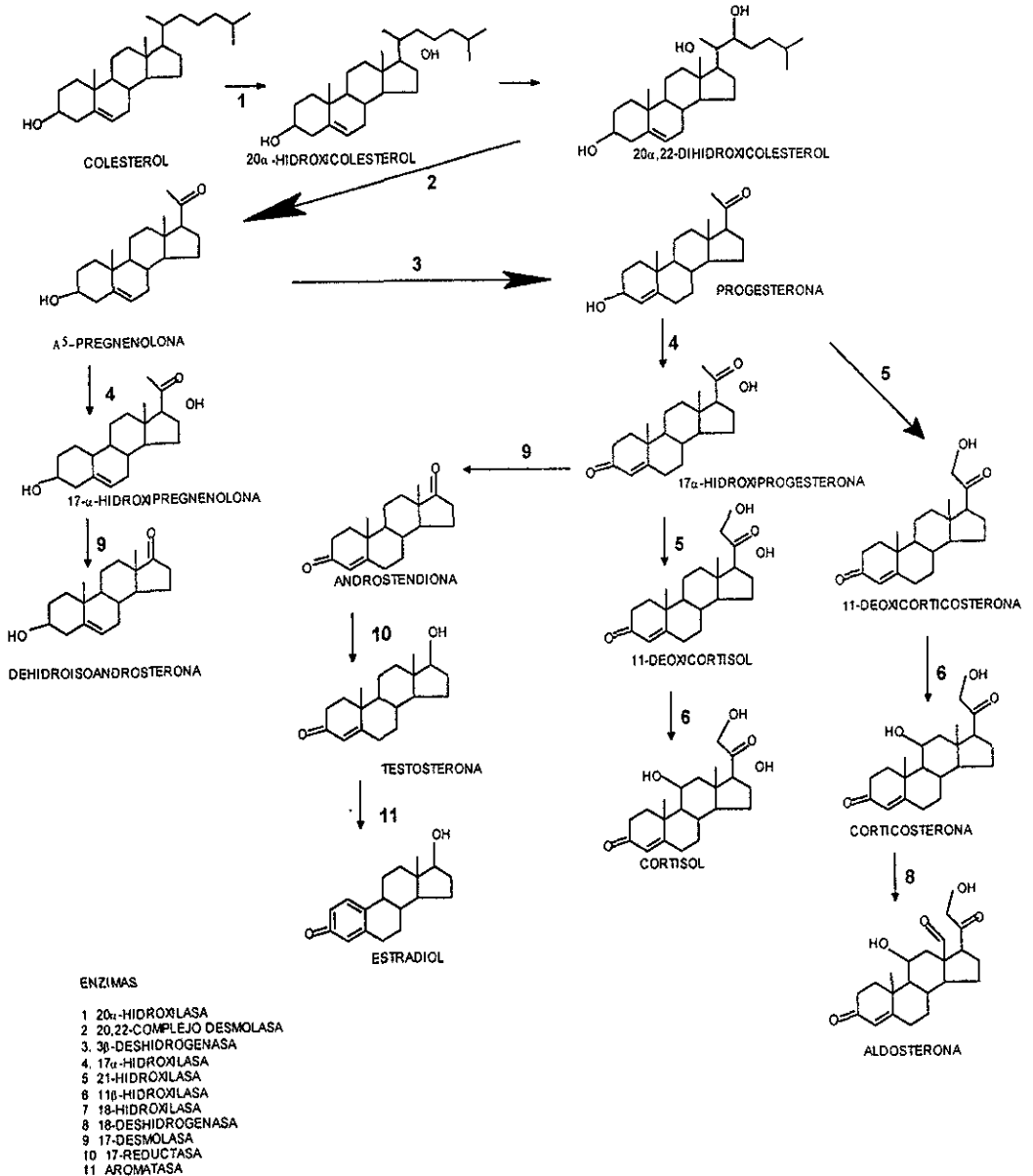


Figura 1. Biosíntesis de hormonas esteroides (3, 4).

Biosíntesis de glucocorticoides.

La biosíntesis de cortisol requiere tres hidroxilasas que actúan en secuencia sobre las posiciones C₁₇, C₂₁ y C₁₁. Las dos primeras reacciones son rápidas, en tanto que la hidroxilación en C₁₁ es relativamente lenta. Si la posición C₂₁ es hidroxilada primero, se impide la acción de la 17 α -hidroxilasa y se sigue la vía de los mineralocorticoides (formando corticosterona o aldosterona, en zona glomerular o reticular). La 17 α -hidroxilasa es una enzima de retículo endoplásmico liso que actúa ya sea sobre la progesterona, o más comúnmente sobre la pregnenolona. La 17 α -hidroxiprogesterona es hidroxilada en el C₂₁ para formar 11-desoxicortisol, el cual es hidroxilado en C₁₁ para formar cortisol, la hormona glucocorticoide más potente en los humanos. La 21-hidroxilasa es una enzima del retículo endoplásmico liso, en tanto que la 11 β -hidroxilasa es una enzima mitocondrial (2).

Biosíntesis de progestinas.

La biotransformación del colesterol a progesterona implica tres cambios estructurales en la molécula: pérdida de un fragmento de seis átomos de carbono de la cadena lateral en la posición C₁₇, oxidación del grupo alcohol en posición C₃ y migración del doble enlace del anillo B al anillo A (Figura 1). El primer paso es la hidroxilación sucesiva en C₂₀ y en C₂₂ que resulta en la formación de un diol vicinal. Este proceso es el paso limitante en la formación de progesterona y está catalizado por 20 α 22 β -hidroxilasas, enzimas de localización mitocondriales que requieren obligatoriamente la presencia del citocromo P-450. Las hidroxilaciones del colesterol resultan de oxidaciones y reducciones alternas del citocromo P-450, de una proteína llamada adrenoxina y una flavoproteína deshidrogenasa dependiente de NADPH. La oxidación posterior del diol vicinal por medio de un sistema enzimático mitocondrial similar conocido como 20,22-liasa que requiere NADPH y O₂, da lugar a la rotura de la unión C₂₀-C₂₂, lo cual resulta en la formación de pregnenolona y de aldehído isocapróico. La formación de progesterona a partir de pregnenolona requiere al inicio la deshidrogenación del grupo alcohólico β en C₃ formándose la 5-pregne-3,20-diona.

Subsecuentemente, por medio de un proceso de isomerización de este compuesto, que implica migración del doble enlace 5-6 a la posición 4-5, se forma la progesterona. Estos dos procesos se catalizan mediante dos enzimas de localización microsomal estrechamente relacionadas entre sí, la Δ^5 - 3β -hidroxiesteroide deshidrogenasa dependiente de NADPH y la 3 -cetoesteroide Δ^4 - Δ^5 -isomerasa (2, 3, 4).

Biosíntesis de andrógenos.

El andrógeno principal o precursor producido por la corteza suprarrenal es la dehidroepiandrosterona (DHEA). La mayor parte de la 17 -hidroxipregenolona sigue la vía de los glucocorticoides, pero una fracción pequeña está sujeta a fisión oxidativa y eliminación de la cadena lateral de dos carbonos a través de la acción de la $17,20$ -liasa. Esta enzima que se encuentra en las suprarrenales y en las gónadas, actúa exclusivamente sobre las moléculas que contienen 17α -hidroxi. La producción suprarrenal de andrógenos aumenta de manera notable si se impide la biosíntesis de glucocorticoides por la carencia de una de las hidroxilasas. La mayor parte de la DHEA es modificada con rapidez por la adición de sulfato, proceso que se realiza aproximadamente por partes iguales en la suprarrenal y en el hígado. El sulfato de DHEA es inactivo como andrógeno, pero la eliminación del sulfato reactiva al compuesto. La DHEA es en realidad una prohormona, dado que las acciones de la 3β -OHSD y la $\Delta^{5,4}$ isomerasa convierten al andrógeno débil DHEA en uno más potente, la androstenediona, de la que también se forman pequeñas cantidades en la suprarrenal por la acción de la liasa sobre la 17α -hidroxiprogesterona. La reducción de la androstenediona en la posición C_{17} produce testosterona, el andrógeno suprarrenal más potente. La fuente principal de andrógenos son los testículos (4).

Biosíntesis de estrógenos.

Los estrógenos son una familia de hormonas sintetizadas principalmente en el ovario. El 17β -estradiol es el estrógeno principal de origen ovárico. En algunas especies, la estrona es más abundante pero es de origen extraovárico. En el embarazo, se produce una cantidad relativamente mayor de estradiol, producido en la placenta (2, 3). La vía general y la

localización subcelular de las enzimas que actúan en las primeras etapas de la síntesis de estradiol son las mismas que se encuentran en las glándulas suprarrenales y en los testículos.

Los estrógenos se forman por aromatización de los andrógenos en un proceso complejo con tres hidroxilaciones, cada una de las cuales requiere O_2 y NADPH. Se piensa que el complejo enzimático incluye una oxidasa P-450 de función mixta (Figura 1)(3). Si el sustrato para este complejo enzimático es testosterona, se forma estradiol; en tanto que la estrona se debe a la aromatización de la androstenediona. Las células tecales son la fuente principal de 17α -hidroxiprogesterona y de androstenediona mientras que las células de la granulosa lo son del estradiol. En la aromatización periférica de los andrógenos se producen cantidades significativas de estrógenos. Los catecoles son los metabolitos principales de los estrógenos en todas las especies de mamíferos. Proceden de la hidroxilación en la posición 2 y 4 del anillo aromático. Los catecoles tienen actividad estrógenica débil pero son agentes potentes en el sistema nervioso central, uniéndose a receptores tipo alfa y beta adrenérgicos (2, 3).

1.4 EL RECEPTOR DE LAS HORMONAS ESTEROIDES Y SU MECANISMO DE ACCIÓN

Las hormonas esteroides fueron las primeras hormonas en ser caracterizadas estructuralmente. En los años 60's se propuso un posible mecanismo de actividad de éstas a través de receptores intracelulares con acción a nivel de transcripción de los genes. La acción de las hormonas esteroides a través de receptores intracelulares ha permitido explicar algunos desordenes causados por mutaciones en los receptores, entendiéndose con mayor claridad su función y estructura (7).

Los receptores hormonales esteroides se caracterizar por tener:

- a) Un dominio central conservado para enlazarse al DNA.
- b) Un dominio que incluye regiones involucradas en el enlace a la hormona, la dimerización y la activación transcripcional.
- c) Un dominio de longitud variable que no se une al DNA. Presumiblemente, esta variación en la longitud provee las bases para la unión a una hormona específica y la respuesta

celular para diferentes receptores.

Se ha reconocido la actividad dual de los receptores de hormonas. mientras estimulan la expresión de unos genes pueden reprimir la expresión de otros. En la Figura 3 se representa el modelo propuesto para la interacción de las hormonas y el receptor de estrógenos.

La hormona atraviesa la membrana celular y se enlaza al receptor en el citoplasma o en el núcleo formando un dímero. Después de la unión, el receptor es "activado", dando como resultado un cambio conformacional, mostrando nuevas regiones de la proteína para interactuar con otros factores intracelulares.

La unión de la hormona al receptor promueve el traslado del dímero al núcleo, en donde el receptor se une a genes específicos. El proceso de translocación involucra la disociación de proteínas, así como cambios en la fosforilación del receptor y/o proteínas asociadas. Algunos receptores (por ejemplo el de glucocorticoides) regresan al citoplasma en un proceso que parece involucrar cambios en la fosforilación. Otros receptores se localizan siempre en el núcleo y están asociados con el DNA en ausencia de la hormona. El enlace del dímero hormona-receptor induce la activación o represión transcripcional dependiendo de la naturaleza del gen blanco y las proteínas regulatorias asociadas. Debe indicarse que a menudo, los receptores inducen una cascada de eventos en los cuales los genes blancos activan o reprimen otros genes. En una regulación positiva, el resultado final es la transcripción y formación de una nueva molécula de mRNA (7, 8)

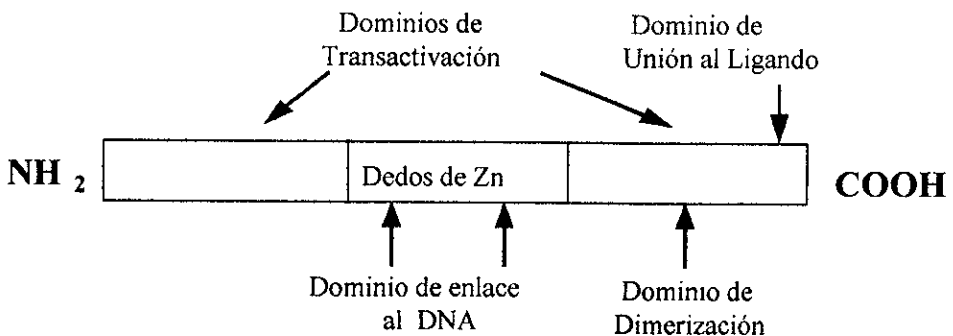


Figura 2. Estructura de los receptores esteroidales.

El funcionamiento correcto de las gónadas, que depende de su integridad estructural y hormonal, es crítico para la reproducción y, por lo tanto, para la supervivencia de las especies. Las hormonas de las gónadas tienen otras acciones importantes; por ejemplo, son anabólicas y por lo tanto se requieren para regular el metabolismo en piel, huesos y músculos (2, 3).

El sistema reproductor femenino y masculino dependen de las hormonas para su funcionamiento, y en gran medida son las hormonas esteroides las que regulan dichos procesos. Cabe mencionar que son esenciales para la estimulación de la espermatogénesis, funcionamiento de las vesículas seminales, elaboración del semen, regulación del ciclo menstrual en la mujer, maduración del óvulo, proliferación y crecimiento de células específicas del cuerpo y responsables del desarrollo de la mayoría de los caracteres sexuales masculinos y femeninos.

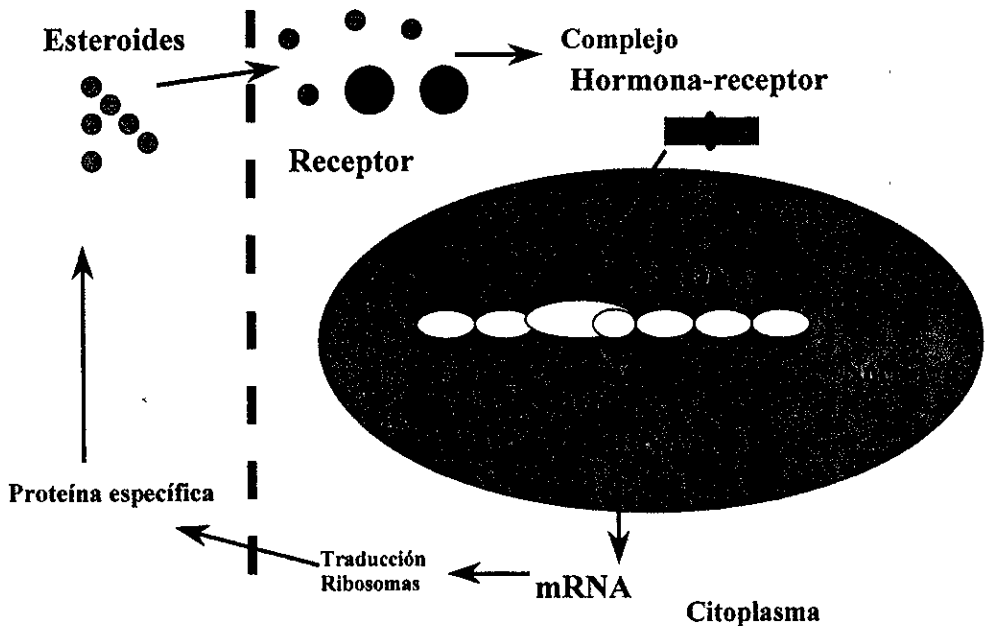


Figura 3. Mecanismo de acción de hormonas esteroides.

Cuando los testículos no son funcionales durante la vida fetal o cuando existe ausencia genética de los receptores de andrógenos en las células blanco, no se desarrollan los órganos sexuales masculinos. El criptorquidismo puede ser producido por la falta de testosterona a causa de anomalías genéticas (8).

En las mujeres, una secreción hormonal ovárica inferior a la normal puede ser consecuencia de ovarios mal formados, de la falta de ovarios o de ovarios genéticamente anormales y que secreten hormonas no funcionales porque faltan enzimas en las células secretoras. Existen casos en los cuales existe una hipersecreción extrema de hormonas ováricas, a causa de un tumor de células de la granulosa, provocando hipertrofia del endometrio uterino y sangrado irregular

La manifestación de anomalías en los procesos reproductivos suelen estar relacionados con un metabolismo anormal de las hormonas esteroideas (8), cuyo origen puede ser genético o adquirido. En el primer caso, las alteraciones pueden presentarse por exposición a agentes mutagénicos durante la gestación o por herencia. En el segundo caso, las manifestaciones anormales en procesos reproductivos pueden adquirirse por exposición a factores ambientales, como son los desechos procedentes de productos agrícolas, pesticidas, desechos radioactivos, contaminación en el aire, en el agua y desechos sólidos.

1.5 ESTRÓGENOS AMBIENTALES

Con la modernización de nuestra sociedad, ha aumentado la producción de materiales sintéticos y gran parte de ellos son utilizados en nuestra vida cotidiana como artículos de consumo común. Una amplia variedad de estos compuestos son elaborados a partir de derivados del petróleo, que por su naturaleza química tienden a ser poco degradables y su persistencia en el ambiente los ha convertido en contaminantes muy difundidos, ya sea en el aire, el agua o en la tierra. Entre estos compuestos se encuentran pesticidas, herbicidas, detergentes y agentes con acción terapéutica. Ejemplos de este tipo de contaminantes son los pesticidas organoclorados, bifenilos policlorados, dibenzodioxinas, alquilfenoles y ftalatos plastificantes. Por su origen antropogénico, este tipo de contaminantes tienden a acumularse en sitios densamente poblados o industrializados, son generalmente desechados por los

drenajes caseros, efluentes industriales y dirigidos al cauce de ríos, lagos y mares. En el caso de los insecticidas y pesticidas, estos se distribuyen a través del aire y son fácilmente arrastrado por el viento, distribuyéndose a nivel global. En otros casos, se acumulan por deposición en la tierra, donde se filtran a mantos acuíferos, que son utilizados como fuente de agua potable en muchos países (9).

La exposición continua y crónica a este tipo de compuestos en peces, mamíferos y aves ha permitido relacionarlos con una serie de disturbios a nivel de sistema y ciclo reproductivo (10, 11, 12) observaciones anteriores se han realizados en la mayor parte de los casos por casualidad. Generalmente las alteraciones en animales se han observado después de exposiciones catastróficas a contaminantes. En diferentes estudios realizados en el hombre durante el período de 1938 a 1990 se ha mostrado la existencia de alteraciones en el aparato reproductor, como la disminución en el volumen de semen y concentración de esperma. Durante este mismo período se observó un marcado aumento en la incidencia de cáncer testicular (11, 12). De estas observaciones se ha inferido que el origen de los desórdenes a nivel reproductivo podrían deberse a factores ambientales. En los años 60's se reportaron anomalías en tracto reproductivo de hombres, cuyas madres recibieron tratamiento a base de estrógenos durante su embarazo; estos efectos se han demostrado experimentalmente en animales de laboratorio, indicando que algunos de los contaminantes químicos ambientales pueden tener efecto estrogénico, y que un factor de riesgo puede ser la exposición a ellos durante el período fetal (10, 11, 12, 15).

En las mujeres se ha observado un incremento en la incidencia de cáncer de mama, infertilidad, endometriosis y otro tipo de cánceres en tracto reproductivo (9, 13). Los cambios encontrados en los machos de vida silvestre incluyen feminización, disminución de la fertilidad o disfunciones en la producción hormonal (13, 14). En peces machos de los lagos y ríos de Gales e Inglaterra se observó un aumento de vitelogenina, una proteína muy abundante en el plasma de los peces hembras (9, 14, 15).

De las observaciones anteriores se generó un concepto relativamente nuevo, el cual implica la acción de contaminantes ambientales sobre las funciones reproductivas de animales, peces y humanos. Se conoce como Estrógeno Ambiental (EA) a todo contaminante químico de origen sintético o natural, que puede actuar o simular la actividad de un estrógeno

endógeno (efecto estrogénico) en el organismo (16).

1.6 EFECTOS ADVERSOS DE LOS ESTRÓGENOS AMBIENTALES

Se ha reconocido desde tiempo atrás que la exposición de humanos y animales a la acción de los EA puede resultar en cambios adversos en el desarrollo reproductivo. La sospecha de que los estrógenos ambientales son los causantes de los desordenes en el sistema reproductivo se deriva del incremento de este tipo de disfunciones a la par que proliferan en el ambiente contaminantes estrogénicos, a los que estamos expuestos día con día. Algunos de los desordenes mas comúnmente detectados son:

a) Incremento de alteraciones a nivel reproductivo en los hombres: disminución en el volumen de esperma, cáncer testicular, malformaciones en genitales externos, y testículos sin descender (criptorquidismo) (17, 18).

b) Cambios en la salud reproductiva de hombres por exposición a xenoestrógenos durante el período fetal o neonatal, por efecto adverso de las terapias con base en estrógenos recibidas por las madres (9, 18).

c) En animales domésticos, se ha encontrado criptorquidismo e hipospadias (9).

d) En Estados Unidos, así como en el Oeste de Europa se ha notado un incremento de cáncer de mama en mujeres (19).

Se conoce que en el período de 1948 a 1971, de 2 a 6 millones de mujeres recibieron tratamiento con dietilestilbestrol (DES) para prevenir el aborto; posteriormente se observó que una pequeña fracción (0.1 %) de las hijas de estas mujeres, entre los 15 y 20 años, presentaron un raro tipo de cáncer conocido como adenocarcinoma vaginal (9, 19).

En los lagos de Florida, Louis J. Guillette, un endocrinólogo de la Universidad de Florida, ya había detectado variaciones en el periodo de incubación de los huevos de cocodrilo. Observó que el grado de incubación y la sobrevivencia de los huevos provenientes del Lago de Apopka era significativamente menor al de los huevos provenientes de otros lagos. En estudios posteriores se determinó que en los huevos del Lago de Apopka los niveles de DDE- el metabolito activo del DDT- eran de 6 ppm. En el año de 1980, ocurrió un derrame de dicofol, el cual contenía un 15 % de DDT (20, 22). Los cocodrilos machos del Lago de Apopka producían elevados niveles de estrógenos, mientras que la producción de

testosterona, la hormona masculina, estaba disminuida.

Se encontró también que los machos tenían vesículas seminales anormales, y que las hembras, con altos niveles de estrógenos naturales, contenían en sus ovarios huevos anormales (9, 20, 21).

Un año después Guillette reprodujo experimentalmente en el laboratorio algunas de las anomalías de los cocodrilos del Lago de Apopka, encontrando que el estradiol incrementaba la tasa natal de hembras, mientras que el DDE afectaba el sexo de las crías, produciendo incluso animales asexuados. Guillette estudió a los cocodrilos adultos del lago de Apopka, encontrando machos con penes de tamaño disminuido, considerándolos sexualmente incompetentes (9, 20, 21, 22).

En otros casos, se han detectado efectos adversos del DDT: En las costas del sur de California se derramaron 1.9 millones de kg. de este producto, produciendo alteraciones en los huevos de pelícanos (23). En la Isla de Santa Barbara, el Dr. Michael Fry determinó un incremento en la población de hembras de las grullas, mientras que en la población de machos, la infertilidad fue frecuente. En otras poblaciones de aves se han detectado problemas similares, incluyéndose alteraciones en los embriones y órganos reproductores incompletos en los machos. En el ecosistema de estas poblaciones es común encontrar un alto nivel de contaminación de productos como los bifenilos policlorados (9, 15).

En los peces machos de los ríos de Inglaterra se ha detectado un incremento de vitelogenina, una proteína abundante en el plasma de los peces hembras, y que es producida por el estímulo de estrógenos. El agua de estos ríos es continuamente alimentada por efluentes de la plantas de tratamiento. Se encontró que los niveles de vitelogenina eran hasta 500 veces mayor a los niveles normales en la población de peces cercana a los efluentes, mientras que los niveles eran normales en la población alejada. Los contaminantes que se encontraron en altas concentraciones en los efluentes fueron el octil y nonilfenol, productos de la hidrólisis bacteriana de los alquilfenoles utilizados como detergente, y espermicidas (19, 24).

En un estudio realizado por Mary S. Wolf se determinó que la incidencia de cáncer de mama en mujeres se incrementaba conforme aumentaba la concentración de DDT en el tejido graso de las pacientes (9). En otros estudios epidemiológicos se ha determinado que el riesgo de contraer cáncer de mama se incrementa cuando se aumenta la exposición al DDT y otro

tipo de compuestos químicos con actividad estrogénica (9).

1.7 ORIGEN DE LOS ESTRÓGENOS AMBIENTALES

Los EA se consideran productos de desecho que derivan a su vez de productos de uso común en la industria, aunque algunos provienen del metabolismo microbiano de otros compuestos químicos de desecho. Existen productos químicos muy difundidos en el ambiente y de uso común en la población, que aunque no son desechos, se consideran contaminantes ambientales debido a su persistencia en el ambiente después de su utilización como plaguicidas y herbicidas (14). La síntesis química de nuevos de compuestos con efectos potencialmente estrogénicos es muy variada, e involucra a la industria química como una de las principales fuentes de compuestos estrogénicos (15).

Pesticidas organoclorados.

Los pesticidas organoclorados incluyen a los diclorodifenilalcanos (DDT;DDD;DDE), ciclodienos, hexaclorobencenos y hexaclorociclohexanos. El DDT fue ampliamente utilizado hasta los años 60's, antes prohibido su uso en Estados Unidos. Posteriormente, el hexaclorobenceno fué utilizado hasta 1985. Muchos de estos compuestos aún se encuentran circulando en el ambiente o bioacumulados en los tejidos grasos del cuerpo. La eliminación de ellos es muy lenta y sus efectos son muy persistentes. El DDT tiene una vida media hasta de 60 años en el ambiente. La actividad estrogénica del DDT comparada con la del estradiol (E_2) es mucho más baja, pero su largo tiempo de vida media y sus propiedades de bioacumulación indican que los niveles de exposición humanos pueden ser suficiente para inducir efectos estrogénicos en ciertas circunstancias (15, 25)

Bifenilos policlorados.

Los bifenilos policlorados (PBC's) son productos químicos industriales utilizados desde 1929 como fluidos hidráulicos y de transferencia de calor, adhesivos, retardantes de flama, fluidos dieléctricos para capacitores y transformadores. Se encuentran comercialmente

en mezclas de distintos congéneres. Su producción y uso fué prohibida en 1977, pero persisten en el ambiente por su alta bioacumulación y por su baja biodegradación (26, 27).

Polietoxilatos de alquilfenoles.

Los alquilfenoles y compuestos relacionados están presentes en las superficies acuosas y en sedimentos acuáticos. Son el producto de la degradación microbiana de los polietoxilatos de alquilfenoles (APE's) por actividad microbiana. Son utilizados como surfactantes industriales en detergentes, pinturas, herbicidas, pesticidas y cosméticos. Más de 300 millones de kilogramos de APE's son producidos anualmente y liberados a ambientes acuáticos en forma de APE's de cadenas pequeñas. Los alquilfenoles son relativamente persistentes y son bioacumulables en el tejido graso de organismos vivientes (28, 29, 33).

Fitoestrógenos.

Los fitoestrógenos son compuestos naturales presentes en las plantas e ingeridos diariamente en el orden de mg. Las sustancias activas son isoflavonas (genisteína y daidzina) y cumestanos. Algunos de los productos ricos en fitoestrógenos incluyen espinacas y frijol de soya. El frijol de soya es considerada una rica fuente de estrógenos y utilizada en la industria alimenticia como fuente de proteínas, incluyéndose como sustituto en la formulación de leche infantil. Normalmente los fitoestrógenos son biodegradables, ya que pueden ser metabolizados y excretados. Se les ha encontrado actividad antiestrogénica, por lo que se le atribuye actividad protectora contra cáncer dependiente de estrógenos. En algunos casos de consumo excesivo de fitoestrógenos se ha encontrado disminución en la cuenta espermática (30, 31).

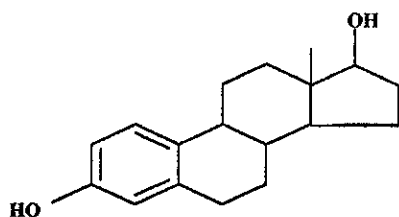
Otros xenoestrógenos.

El bisfenol-A, es un monómero liberado de los frascos de policarbonato durante la esterilización en autoclave, que se utiliza extensamente como plastificante también ha mostrado actividad estrogénica. Otros productos químicos utilizados en la industria del plástico incluyen ésteres de ftalato butilbencilftalato y di-n-butilftalato. Los ftalatos son muy abundantes como contaminantes ambientales producidos por el hombre, e ingresan al

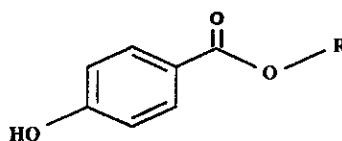
organismo humano a través de distintas vías, principalmente en la dieta (32, 33, 34).

1.9 LOS PARABENOS

Los compuestos esterificados derivados del ácido p-hidroxibenzoico (APHB), conocidos como parabenos (Pbens), se utilizan comúnmente en la industria de alimentos y de cosméticos como conservadores por sus propiedades antimicrobianas (35, 36). Los ésteres metílico (MePben), etílico (EtPben), propílico (PrPben) y butílico (ButPben) del APHB son utilizados en preparaciones líquidas orales, en soluciones oftálmicas, shampoos y cosméticos en concentraciones de 0.02 a 0.2%.



17 β-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 4. Estructura de los derivados del ácido p-hidroxibenzoico (Pbens).

Recientemente se describió la actividad estrogénica del APHB, metabolito de este grupo de sustancias (37). Los Pbens producen efectos estrogénicos en roedores probablemente debido a que su estructura química cuenta con un anillo fenólico que puede unirse al receptor de estrógenos y actúan imitando su acción (36, 37). Aunque la relación entre desordenes a nivel reproductivo y la actividad estrogénica de algunos contaminantes ambientales aún no es muy clara, se ha considerado el potencial estrogénico de estos

contaminantes y su actuación en los organismos como mimetizantes de los estrógenos naturales.

1.8 EL EFECTO ESTROGÉNICO

Se ha hipotetizado que ciertos compuestos químicos naturales o sintéticos pueden modular el funcionamiento del sistema endócrino como mimetizantes o bloqueadores. Una de las hipótesis más apoyadas es la actuación de los xenoestrógenos a través del receptor de estrógenos aumentando o disminuyendo la actividad normalmente controlada por las hormonas endógenas (34, 35).

Se piensa que los xenoestrógenos pueden causar alteraciones de tipo endócrino y reproductivo por varios mecanismos:

- a) Mimetizantes de hormonas endógenas, como son estrógenos y andrógenos.
- b) Efectos antagonistas de hormonas endógenas.
- c) Alteración del patrón de síntesis y metabolismo de hormonas naturales.
- d) Modificación de los niveles de receptores hormonales.

El efecto estrogénico de los xenoestrógenos no ha podido ser determinado basándose única y exclusivamente en la estructura química del compuesto en cuestión. Se ha encontrado un gran número de contaminantes ambientales que han demostrado tener efecto estrogénico con una gran variedad de estructuras químicas. M. D. Shelby y cols., ensayaron 10 compuestos con actividad estrogénica conocida o con sospecha de ella, entre los que se encuentran el 17- β estradiol, DES, tamoxifén, 4-hidroxitamoxifen, metoxicloro, edulsofan, o,p'-DDT, 2,2-bis(p-hidroxifenil)-1,1,1-tricloroetano (HPTE), nonilfenol y la kepona; encontrando que todos los compuestos ensayados fueron estrogénicos (16). La variedad de estructuras químicas puede observarse en la Figura 5.

Teniendo en cuenta la diversidad de estructuras químicas y la variedad de mecanismos de actuación de los xenoestrógenos, se han generado una amplia gama de ensayos para identificar su efecto estrogénico.

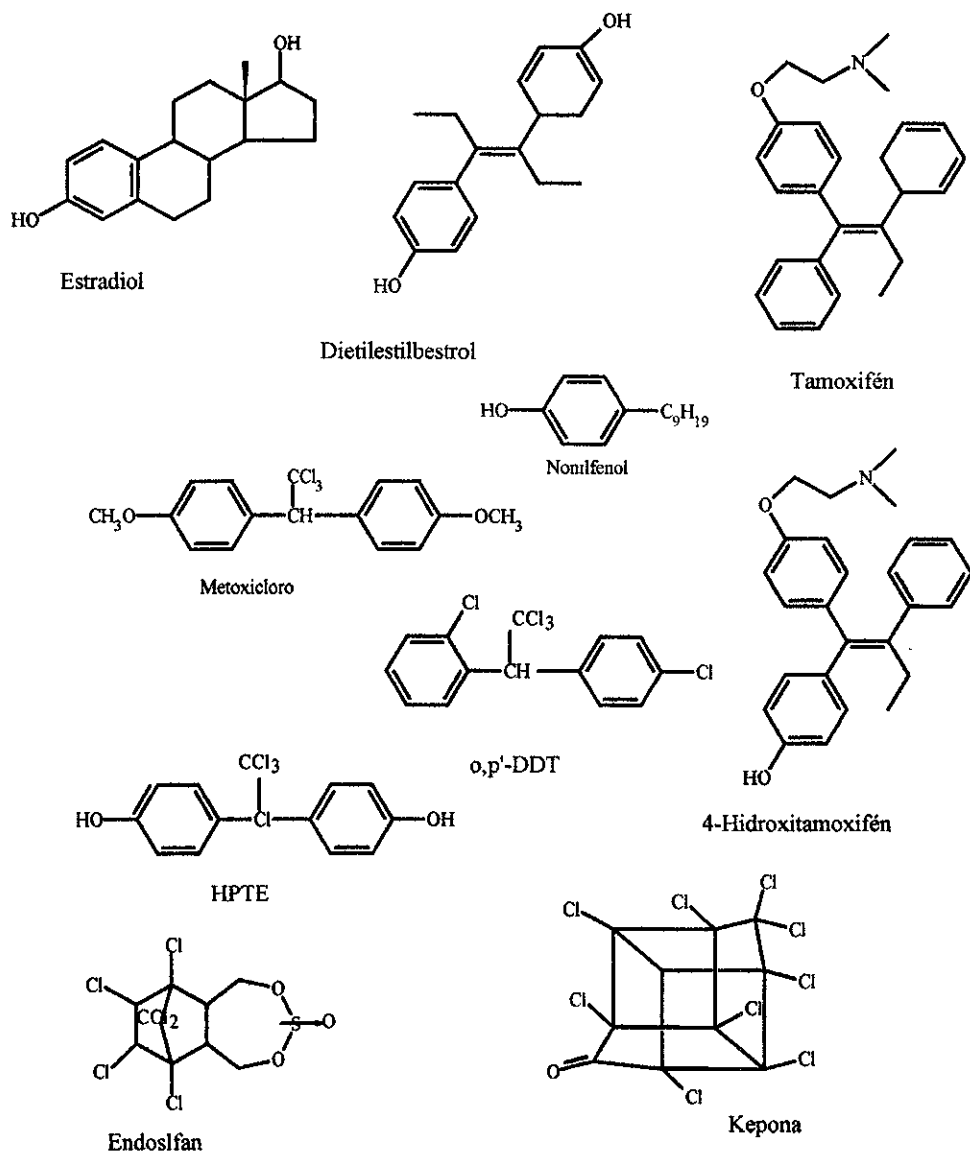


Figura 5. Estructura de 10 compuestos estrogénicos

Los humanos están expuestos a los estrógenos ambientales por diferentes vías como son : la dieta, el agua potable, el aire y el contacto a través de la piel. Algunos de los xenoestrógenos exhiben una fuerte actividad estrogénica, además de que son bioacumulables en la grasa y se ha sugerido que gran parte de ellos tienen efectos aditivos (9, 34). Algunos de estos compuestos están presentes en altas concentraciones en el ambiente, tales como los ftalatos, mientras que los pesticidas y PCB's se encuentran en pequeñas concentraciones (9, 32).

La complejidad de los químicos ambientales se incrementa continuamente y no es posible detectar todas las repercusiones de estos compuestos al ser liberados al ambiente. Sin embargo, se deben utilizar los métodos disponibles, o incluso desarrollar nuevas alternativas para monitorear los efectos adversos posibles de compuestos químicos sintéticos y naturales sobre el sistema reproductivo del hombre y la fauna silvestre. El sistema reproductivo de machos es muy sensible a la influencia de un exceso de estrógenos, por ello mismo, los estrógenos ambientales son los primeros sospechosos de causar desórdenes a nivel reproductivo en los hombres y machos de especies silvestres (9, 16).

Se requieren métodos para detectar los efectos estrogénicos de los compuestos químicos considerando los ensayos de mayor reproducibilidad. También es necesario analizar el mecanismo de acción de los compuestos estrogénicos y finalmente, es importante asegurar la toxicidad a nivel reproductivo de dichos compuestos químicos para predecir sus efectos en el ambiente, comunidades y ecosistemas (38).

1.9 EVALUACIÓN DEL EFECTO ESTROGÉNICO

La presencia de estrógenos conocidos o EA en el medio ambiente ha sido detectada por métodos analíticos como cromatografía de gases, espectroscopía de masas y HPLC. Para determinar la estrogénicidad de un compuesto existe una serie de ensayos. Estos se pueden dividir en dos grupos: ensayos en modelos animales (*in vivo*) y los ensayos *in vitro* (9, 15, 39).

a) Modelos animales: Se utiliza una amplia variedad de animales de laboratorio en las pruebas de estrogénicidad: aves, roedores y reptiles. El ensayo más común en roedores es la

estimación de la producción de cornificación vaginal y la determinación del incremento del peso uterino, sin embargo esta medición es costosa, laboriosa y no puede ser adaptada para ensayos en gran escala. A la fecha se está tratando de estandarizar el protocolo del ensayo uterotrófico.

Los mamíferos pueden ser utilizados para estudios donde existe exposición a bajas concentraciones de xenoestrógenos durante el período fetal o neonatal y las consecuencias reproductivas se manifiestan en la vida adulta. Se han analizado los mecanismos de disrupción inducida por xenoestrógenos en el desarrollo reproductivo en roedores (9, 15).

Ensayo con huevos de reptiles: La diferenciación sexual de los reptiles es dependiente de la temperatura y de estrógenos. La exposición de huevos de tortuga a xenoestrógenos por contacto directo en el interior o barnizando con ellos los huevos, da como resultado una alta frecuencia de feminización o productos asexuales, cuando la incubación se realiza a una temperatura a la cual se deben de producir un 100 % de machos. Este ensayo es aceptado para estudios de exposición a xenoestrógenos en la vida silvestre (15).

b) Ensayos *in vitro*. Pueden estudiarse dos aspectos complementarios en los ensayos *in vitro*: la proliferación de una línea celular estrogendependiente y la inducción de una función controlada por estrógenos. En el primer caso, el número de células y la incorporación de timidina radioactiva son los parámetros de medición. En el segundo caso, existen muchas posibilidades. En un inicio se utilizó la producción de prolactina (PRL) por células de hipófisis en respuesta a un compuesto estrogénico, como indicio de actividad estrogénica en un ensayo *in vitro*, pero el ensayo fue abandonado por no ser específico. En estos días, los ensayos *in vitro* más comunes utilizan células ZR-75, MCF-7 y células de levaduras recombinantes (7, 15, 34, 35).

Línea celular MCF-7: Las líneas celulares de cáncer de mama humano que son sensibles a la acción de los estrógenos, han sido utilizadas como modelos para probar efectos los estrogénicos de los productos químicos. El ensayo también llamado E-SCREEN está basado en la relación dosis-respuesta entre la proliferación de las células MCF-7 y la cantidad de estrógenos a la cual están expuestas durante 6 días de cultivo. El estradiol es utilizado como

estándar y por comparación de los efectos del xenoestrógeno y el del estradiol, se puede obtener la potencia estrogénica relativa del compuesto.

Línea celular ZR-75: Este es otro tipo de línea celular similar a la MCF-7 es utilizada en bioensayos de estrogénicidad (proliferación).

Líneas de células de levaduras recombinantes: Es una línea celular de levaduras (*Sacharomyces cereviceae*) transformada con plásmidos que codifican para receptor de estrógenos y un promotor de respuesta a estrógenos fusionado al gen estructural para β -galactosidasa. Este ensayo detecta niveles de estradiol 100 veces mas bajo que el método de radioinmunoensayo. Sin embargo, la sensibilidad a otras hormonas diferentes al estradiol es muy baja (35, 39).

Vitelogénesis: La vitelogenina es una proteína producida normalmente en el hígado de hembras de peces bajo control de estrógenos. En cantidades muy pequeñas puede ser detectada en la sangre de peces machos. Sin embargo, la exposición a xenoestrógenos activa el gen de vitelogenina, dando como resultado un incremento de los niveles de vitelogenina en el plasma de los peces machos. La vitelogénesis puede ser utilizada en estudios *in vitro*. La concentración de vitelogenina es determinada por un radioinmunoensayo específico (7, 15).

El criterio de evaluación.

En el congreso de Carolina del Norte en 1996 (39), en donde se discutieron las metodologías utilizadas para determinar estrogénicidad, también se confirmaron los criterios de evaluación, como parámetros de detección de estrogénicidad. En esta reunión, se analizaron más de 50 formas de evaluar el efecto estrogénico en técnicas *in vivo* e *in vitro*. Entre estas se encuentran, en las técnicas *in vivo*, el peso de los órganos reproductivos y su histología, niveles de hormonas en suero, activación de genes *in vivo*, síntesis de proteínas, crecimiento, desarrollo y el mantenimiento de la fertilidad. En los métodos *in vitro* se incluye la proliferación celular, enlace a receptor de andrógenos y estrógenos, síntesis de

hormonas/enzimas esteroideogénicas, ensayo de genes reporteros utilizando células transfectadas. De cada uno de estos criterios de evaluación se analizó la sensibilidad (definida como la respuesta del ensayo a bajas concentraciones), especificidad (característico para un mecanismo de acción), simplicidad relativa, problemas, confusiones y limitaciones de la prueba. Para los ensayos *in vitro* se consideró la capacidad metabólica de los cultivos celulares y la solubilidad de los compuestos químicos en los medios de cultivo como factores de gran importancia (39).

Los ensayos *in vivo* e *in vitro* son complementarios. Los ensayos *in vitro* pueden proveer valiosa información sobre los mecanismos de acción. Los ensayos *in vivo* permiten la detección de los efectos resultantes de los múltiples mecanismos, dan indicación de los efectos fisiológicos, sin embargo revelan muy poco acerca de los mecanismos de actividad estrogénica (15, 16, 39).

Ventajas de los ensayos *in vivo*:

- a) Consideran los procesos farmacocinéticos del xenoestrógeno.
- b) Son excelentes métodos aceptados por décadas por estar bien definidos.
- c) Estos métodos son utilizados para pruebas de toxicidad.
- d) Incorporan un amplio rango de mecanismos.
- e) Proveen perspectivas comparativas hacia otros criterios de evaluación para toxicidad.

Ventajas de los ensayos *in vitro*:

- a) Sensibilidad a bajas concentraciones, incrementando su detectabilidad.
- b) Especificidad en la respuesta.
- c) Costo más bajo que los ensayos *in vivo*.
- d) Requiere pequeñas cantidades de material.
- e) Los ensayos *in vitro* pueden ser automatizados.
- f) Se pueden procesar grandes cantidades de ensayos a la vez.
- g) Pueden ser utilizados para mezclas complejas.

1.10 EL E-SCREEN

Se ha mencionado que los xenoestrógenos pueden actuar por diferentes mecanismos para producir efectos a nivel de tracto reproductivo y que existe variabilidad de estructuras químicas en los compuestos estrogénicos (16). A lo largo de los últimos 60 años, los métodos para determinar la estrogénicidad de xenoestrógenos se han basado en los ensayos *in vivo*, utilizando la mayoría de las veces, la cornificación vaginal y el incremento del peso uterino de roedores (16, 38). Para disminuir los problemas inherentes a las pruebas con animales, se han utilizado los bioensayos cuantitativos con células en cultivo. Se ha mencionado que el criterio de evaluación más adecuado para medir la estrogénicidad es la proliferación celular (35). En algunos ensayos *in vivo*, se requiere de la medición del incremento de actividad mitótica en tejidos del tracto reproductivo de hembras después de la administración de un xenoestrógeno. Esta metodología no es adaptable para ensayos en gran escala. El E-SCREEN es un método que se ha desarrollado utilizando una línea celular de adenocarcinoma humano, cuya proliferación es dependiente de estrógenos. Este ensayo evalúa el incremento de células MCF-7 inducido por estrógenos y se considera el equivalente al incremento de la actividad mitótica en el endometrio de roedores (34, 35).

Entre las ventajas que el E-SCREEN ofrece como un método de detección de actividad estrogénica, es la rapidez y sensibilidad con la cual se puede identificar a los xenoestrógenos ambientales. Con ello, se elimina la desventaja de no poder predecir la estrogénicidad utilizando solamente la estructura química de un compuesto. Otra de las ventajas ofrecidas, es la identificación de agentes causales de efectos estrogénicos, ya que es fácilmente adaptable para la realización de bioensayos a gran escala, lo cual no se ha logrado con los ensayos *in vivo*. No debe olvidarse que la mayoría de los agentes químicos con actividad estrogénica se han detectado de manera casual.

En los ambientes acuáticos, la concentración de vitelogenina en el plasma de los peces machos puede ser utilizada como un marcador de la contaminación del ecosistema por xenoestrógenos, pero entre los mamíferos no existe un marcador similar. De esta forma, el E-SCREEN representa una excelente alternativa para resolver la evaluación de efectos estrogénicos en mamíferos (35).

Se han utilizado diversos ensayos para medir la estrogenicidad. Alen y Doisy y otros pioneros utilizaron ratones y ratas midiendo la cornificación vaginal (34, 35, 40, 47); otros investigadores adoptaron el ensayo uterotrófico utilizando dosis únicas o múltiples de estrógenos durante períodos de 24-72 hrs. en ratones y ratas ovacteriomizadas o inmaduras (39). Esta diversidad de criterios, como se mencionó anteriormente, no permite la comparación de los estudios ya que no se ha definido la manera más adecuada para determinar la acción de estrógenos en los animales. El E-SCREEN se ha propuesto como una de las mejores alternativas para establecer un estándar cuantitativo de actividad estrogénica.

De acuerdo a ensayos realizados por Soto y cols (34, 35, 41, 42), la proliferación de células MCF-7 es parámetro de evaluación suficiente para determinar actividad estrogénica. Las diferencias encontradas entre los ensayos en animales y en células MCF-7 se debe principalmente a la diferencia del criterio de evaluación, pero ambas metodologías muestran la actividad estrogénica de la misma serie de compuestos evaluados (35).

Una de las mayores ventajas del E-SCREEN es que puede ser utilizado para ensayar la actividad estrogénica de productos químicos antes de que sean liberados al ambiente.

Uno de los puntos que ha sido considerado de mayor relevancia en el E-SCREEN, es que puede ser utilizado para determinar el efecto estrogénico de mezclas de contaminantes ambientales, siendo esta determinación aún más aceptable que la determinación del efecto estrogénico de los componentes individuales (34, 35, 39). Recientemente se ha postulado que los xenoestrógenos son un factor de riesgo para cáncer de mama, y midiendo la capacidad estrogénica de un solo xenoestrógeno puede no ser un indicador suficiente de exposición, dado que diferentes personas tienen dietas diferentes y están expuestos a xenoestrógenos diferentes. Por lo tanto, la medición total de los efectos de los componentes de una mezcla son confiables para asegurar la relación entre los xenoestrógenos y el cáncer de mama. El E-SCREEN puede ser utilizado para este fin (35).

Las bases del E-screen

La regulación de la proliferación celular por estrógenos aún no se ha aclarado totalmente. Se han formulado diferentes hipótesis:

a) La hipótesis directa que propone que los estrógenos *per se* inducen la multiplicación de las células blanco.

b) La hipótesis indirecta positiva que propone que los estrógenos inducen la síntesis y/o liberación de factores de crecimiento, los cuales estimulan la proliferación de las células blanco.

c) La hipótesis indirecta negativa, que propone el bloqueo de la síntesis o liberación de un inhibidor específico de células dependientes de estrógenos por parte del E_2 , y que es secretado por un órgano intermediario.

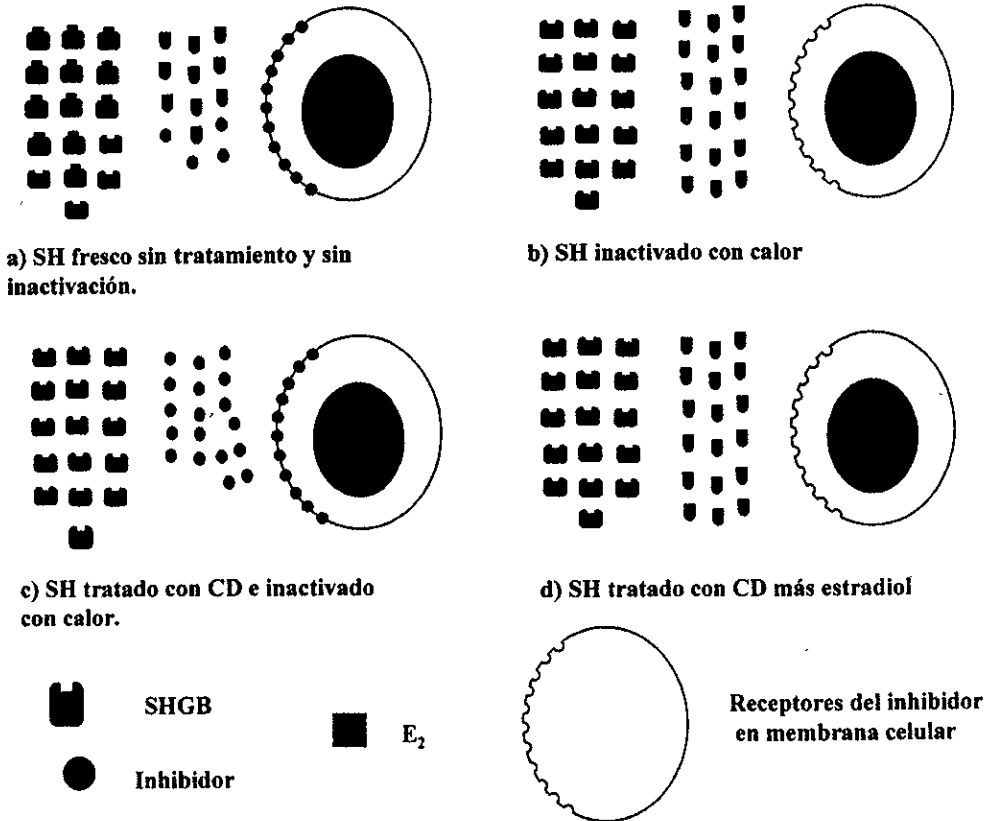


Figura 6. Modelo propuesto para la actividad inhibitoria de la estrocolina.

En base a variados ensayos, se ha encontrado que las células MCF-7 son estrógenodependientes, y que tanto el suero humano (SH) como el suero fetal bovino (SFB), tratados con una mezcla de carbón-dextrán para eliminar esteroides tienen un efecto inhibitorio en la proliferación de dichas células (34, 35, 39, 41). Otros resultados apoyan la hipótesis indirecta negativa, sugiriendo que: a) el SH y el SFB contienen un inhibidor específico de la proliferación de células dependientes de estrógenos (estrocolina I), y b) Los estrógenos promueven la proliferación celular por la neutralización de este inhibidor. Aunque aún no se comprende el mecanismo por el cual actúa el inhibidor, se ha propuesto un posible modelo para explicar este efecto que se muestra Figura 6:

Figura 6.a En el animal, los estrógenos (E) están unidos a proteínas transportadoras (SHGB, albúmina, etc) y a la estrocolina. Solamente las estrocolinas libres son reconocidas por las células dependiente de E_2 , inhibiendo su proliferación. El enlace del E_2 al inhibidor puede convertirlo en un inhibidor inactivo biológicamente.

Figura 6.b En condiciones de cultivo, la inactivación por calor destruye la SHGB y por lo tanto, existe mayor cantidad de E_2 libre para enlazarse al inhibidor, las células dependientes de E_2 proliferan óptimamente en medio suplementado con suero inactivado con calor.

Figura 6.c El tratamiento de suero con carbón-dextrán (S-CD) elimina al E_2 y las estrocolinas libres inhiben la multiplicación celular.

Figura 6.d Finalmente, la adición de E_2 al medio suplementado con S-CD permite la unión del E_2 y las estrocolinas, y se asegura la proliferación celular. (41).

El mantenimiento de la respuesta dependiente de E_2 en células MCF-7 depende de tres factores primarios. la subclona de células MCF-7, las condiciones de cultivo y el diseño propio del experimento. Algunas células MCF-7 no clonadas han mostrado una independencia de los estrógenos para su proliferación después de múltiples pasajes en cultivo. De esta manera, se han preferido las subclonas que han mantenido su respuesta proliferativa a estrógenos para realizar estos ensayos (39).

Cuantificación de la proliferación celular.

La cuantificación de células MCF-7 en el ensayo de proliferación puede ser determinada por una serie de métodos como la cuenta de núcleos en un contador Coulter, utilizando índices de proliferación incluyendo la reducción metabólica de MTT soluble (34, 35, 43, 44), la incorporación de timidina tritiada y cuantificando proteínas seguido de la tinción de células fijadas con sulforodamina-B (34). La utilización de diferentes índices de proliferación celular requiere de mayores consideraciones, ya que la precisión y la exactitud pueden variar con cambios en la metodología (39). Uno de los parámetros que deben de contemplarse en la elección de un método de cuantificación celular es la simplicidad del método así como la manipulación de la muestra.

2. HIPOTESIS

Los parabenos (Pben's), compuestos utilizados ampliamente en la industria alimentaria como conservadores, tienen en su estructura un anillo fenólico con un hidroxilo en posición *para*, guardando una estrecha relación con la estructura del anillo A del estradiol, hormona implicada en los procesos reproductivos de animales y seres humanos; lo que ha dado lugar a pensar que estas sustancias pueden simular los efectos estrogénicos del estradiol.

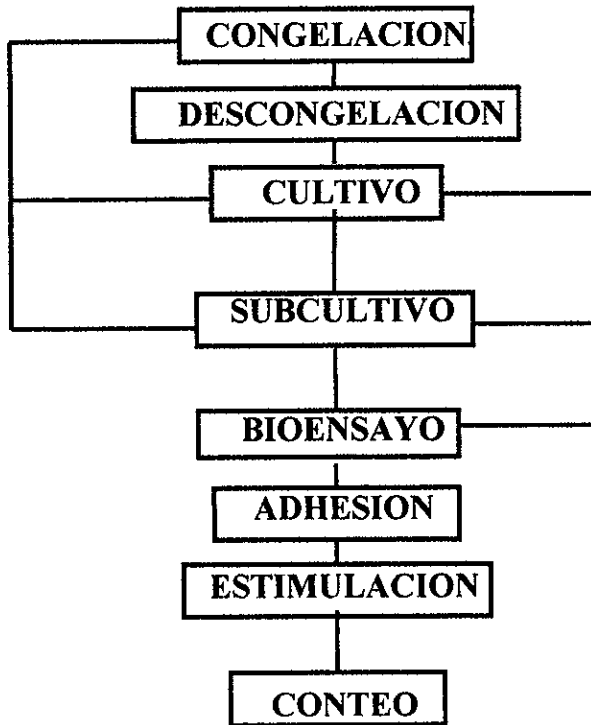
3. OBJETIVOS

En el presente trabajo se pretende:

- ◆ Realizar la estandarización de la técnica del E-SCREEN.
- ◆ Evaluar la actividad estrogénica de los parabenos (Pbens) utilizando la técnica del E-SCREEN.

4. MATERIAL Y METODOS

La metodología utilizada en los bioensayos puede resumirse en el siguiente diagrama:



4.1 MATERIALES UTILIZADOS

Células MCF-7 ATCC HTB-22 donadas por la Dra. Angelina Quintero del Laboratorio de Cancerología, Departamento de Bioquímica, Facultad de Química, UNAM.

Células MCF-7 ATCC HTB-22 donadas por el Dr. Raúl Barrera, del Departamento de Investigación de Cáncer del Pulmón de Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), SSA.

Suero Humano donado por el Instituto Nacional de la Nutrición "Dr. Salvador Zubirán"

Acido clorhídrico de Baker, S.A.

Aminoácidos no esenciales de Sigma-Aldrich Co., LTD.

Antibiótico-antimicótico (Penicilina-Estreptomicina y Anfotericina B) de Gibco, S.A.

Azul de tetrazoleo (Bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoleo; MTT) de Sigma-Aldrich Co., LTD.

Bromuro de etilhexadecildimetilamonio (EHDMA) de Fluka Chemie.

Buffer HEPES de Sigma-Aldrich Co., LTD.

Butilparabeno de Sigma-Aldrich Co., LTD.

Carbón activado de Baker, S.A.

Cloruro de magnesio de Baker, S.A

Cloruro de sodio de Baker, S.A.

Dextrán T70

Dietilestilbestrol de Merck, SA.

DMSO para cultivo celular de Sigma-Aldrich Co., LTD.

Etanol GR de Baker, S.A.

Etilparabeno de Sigma-Aldrich Co., LTD.

Estradiol de Syntex, S.A.

Fosfato dibásico de sodio, de Baker, S.A.

Fosfato monobásico de sodio de Baker, S.A.

Glutamina de Sigma-Aldrich Co., LTD.

Hidróxido de sodio de Baker, S.A.

Isopropanol de Baker, S.A.

Isoton II de Coulter Electronics, Inc.

Medio Eagle Modificado Dulbecco (DMEM).con rojo fenol de Gibco, S.A.

Medio Eagle Modificado Dulbecco (DMEM).sin rojo fenol de Gibco, S.A.

Metilparabeno de Syntex, S.A.

Piruvato de sodio de Sigma-Aldrich Co., LTD.

Propilparabeno de Syntex, S.A.

Suero fetal bovino (SFB) de Gibco, S.A.

Tripsina -EDTA marca Gibco, S.A.

Triton X

4.2 ACTIVACIÓN DE CARBÓN

Este procedimiento se realiza con el fin de tener una mayor superficie de adsorción en las partículas de carbón. Se utiliza en el tratamiento de suero humano en presencia de Dextrán T70, para la eliminación de esteroides presentes en dicha muestra de suero. Esto nos permite asegurar la ausencia de estrógenos que promueven el crecimiento de la línea celular MCF-7.

Materiales :

Tubos para centrifuga de 50 ml.
Pipetas graduadas de 10 ml.
Vaso de precipitados de 50 ml.
Gradilla.
Centrifuga .
Mufla.
Potenciómetro.
Agitador magnético.
Barras magnéticas.

Reactivos:

Carbón activado.
Acido clorhídrico 0.1 N
Hidróxido de sodio 0.1 N
Solución buffer de fosfatos pH 7,4 y 10.

Procedimiento

Se pesan 10 g de carbón activado en un vaso de precipitados y se adicionan 50 ml de ácido clorhídrico 0.1 N, se mezcla la suspensión preparada, y se dispone en tubos de centrifuga de 50 ml. procurando mantener el carbón suspendido. Se centrifuga la mezcla a 5000 rpm durante 10 min. Se elimina el sobrenadante con una pipeta, se adicionan 50 ml de hidróxido de sodio 0.1 N y se resuspende el carbón.

Se centrifuga la mezcla a 5000 rpm durante 10 min. Se elimina el sobrenadante con una pipeta, y se procede a lavar el carbón con agua destilada. Se adicionan 50 ml de agua destilada, se resuspende el carbón y se centrifuga a 5000 rpm. El sobrenadante se decanta con una pipeta y a éste se le determina el pH. Los lavados se repiten hasta obtener un pH de 7.0 .

Se procede a secar el carbón a 120°C durante 2 hr. y posteriormente se coloca en una mufla a 600 °C durante 3 hr. Se deja enfriar a temperatura ambiente y se guarda en un recipiente cerrado hasta su uso (34).

4.3 PREPARACIÓN DEL SUERO HUMANO SIN ESTEROIDES CON MEZCLA DE CARBÓN 'DEXTRÁN

El suero humano que se utiliza en la técnica del E-SCREEN debe ser tratado con una mezcla de carbón-dextrán para eliminar los esteroides presentes en dicho suero. El método es aplicable a suero fetal bovino (SFB) cuando se requiera.

Materiales:

Matraz Erlenmeyer de 250 ml.
Probeta de 100 ml.
Tubo de centrifuga de 50 ml.
Pipeta graduada de 10 ml.
Propipeta.
Centrifuga.
Balanza granataria.
Sistema de filtración Millipore con membrana de poro de 0.44 μm y 0.22 μm estériles.

Reactivos:

Carbón activado, previamente tratado.
Dextrán T70.
Suero humano (SH) proveniente de un banco de sangre autorizado o suero fetal bovino (SFB).

NOTA: Debe utilizarse una mezcla de SH de distintos pacientes (pool) para minimizar la variación individual.

Procedimiento

Se prepara una suspensión carbón-dextrán (CD) multiplicando la cantidad de suero que se tratará por 1.1. Las proporciones utilizadas de carbón y dextrán son las siguientes:

Cantidad de carbón: 5.0 % del Suero.

Cantidad de dextrán: 0.5% del Suero.

Nota: Conservar siempre las mismas proporciones.

Después de multiplicar la cantidad del suero por 1.1, se llena un tubo de centrifuga de 50 ml con agua purificada con el volumen calculado y se marca el recipiente. Se pesa el carbón y se coloca en el tubo de centrifuga, se adiciona agua destilada hasta la marca y se mezcla. Se centrifuga a 2000 rpm por 2 min.

Se elimina el agua con una pipeta, se adiciona agua nuevamente hasta la marca y se resuspende por agitación ó con vórtex. Se centrifuga nuevamente a 2000 rpm 2 min y se elimina el agua con una pipeta.

Se adiciona el dextrán T70, agua destilada hasta la marca, se resuspende por agitación o en vórtex y se centrifuga la suspensión a 5000 rpm durante 5 min.

Se elimina el agua con pipeta y se adiciona el suero a la mezcla, se cubre con un

parafilm y se resuspende. La mezcla se coloca en un matraz y se procede a incubar agitando a 6 rpm, a 37°C durante 60 min.

Alternativamente, se puede dejar en agitación a 6 rpm en un cuarto frío a 4 °C durante 12 hr.

Al finalizar el período de incubación, se centrifuga a 3000 rpm durante 20 min. y se decanta el suero sobrenadante a un recipiente limpio Si se requiere se puede centrifugar nuevamente en las mismas condiciones. El suero tratado se esteriliza por filtración, en campana de flujo laminar, inicialmente a través de una membrana 0.44 μm , y después por membrana de 0.22 μm . Una vez estéril puede guardarse en congelación a -20°C hasta el momento de su utilización. El suero se mantiene en buenas condiciones hasta por un año (45).

4.4 MANTENIMIENTO RUTINARIO DE CELULAS

Todo cultivo celular requiere de condiciones especiales y específicas para su proliferación. Las células MCF-7 requieren de una superficie para su adherencia, y una apropiada es la que ofrece las placas de 25 y 75 cm² marca Corning.

Materiales :

- Frascos de cultivo de 25 cm² Corning No. de catálogo 25100-25.
- Pipetas graduadas estériles.
- Matraz Erlenmeyer 1 L estéril.
- Equipo de filtración Millipore estéril con membrana de 0.45 y 0.22 μm .

Reactivos:

- Medio Eagle Modificado Dulbecco (DMEM).con rojo fenol
- Suero fetal bovino (SFB) Hyclone catálogo A-1111-L .
- Antibiótico-antimicótico Gibco BRL No. catálogo 15245012 (penicilina 10000 UI/ml -estreptomomicina y anfotericina B 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$.)
- Buffer HEPES 1 M Sigma No. catálogo H-0887.
- Acido clorhídrico concentrado.
- Tripsina-EDTA al 0.1 % en solución salina isotónica.
- Piruvato de sodio In Vitro No. catálogo 950215 (100 mM)
- Aminoácidos no esenciales Sigma , No. catálogo m-7145 (100x)
- Glutamina Sigma, no. catálogo

4.4.1 PREPARACIÓN DEL MEDIO DE PROLIFERACIÓN

En un matraz de 1 lt. se adicionan 800 ml. de agua purificada, se agrega el contenido de un sobre de DMED con rojo fenol al matraz. Se enjuaga con un poco de agua el sobre para arrastrar el polvo residual. Adicionar 3.7 g de bicarbonato de sodio, si el fabricante no proporciona otras indicaciones. Se adiciona 10 ml de buffer HEPES para tener concentración de 10 mM. Se adicionan 10 ml de piruvato de sodio (concentración final de 1 mM) y 10 ml de aminoácidos no esenciales (concentración final de 1 mM). Se completa el volumen del medio

a 1 litro con agua purificada, se procede a ajustar el pH con HCl conc. a 7.3 (con una variación de ± 0.1 unidades). Se adicionan 10 ml de antibiótico-antimicótico (100 UI de penicilina /ml)

Se realiza la inactivación del suero fetal bovino colocando 50 ml en un tubo Falcon e incubando a 57°C ($\pm 1^\circ\text{C}$) durante 30 min. Se filtra el suero a través de una membrana de 0.44 μm , posteriormente se filtra el DMEM recién preparado adicionando el SFB a través de una membrana de 0.22 μm (DMEM con SFB al 5 %). El almacenamiento se debe realizar de 4-8°C. El medio DMEM debe suplementarse con glutamina después de 20 días hasta una concentración de 2 mM.

4.4.2 PRUEBA DE ESTERILIDAD

Colocar 5 ml de medio recién preparado en un frasco de 25 cm^2 e incubar a 37°C y 5 % de CO_2 durante 48 hrs. Al término de este período, verificar si existe crecimiento microbiano, en caso de resultado positivo, desechar el medio.

4.4.3 CULTIVO DE CÉLULAS

En un frasco de 25 cm^2 se adicionan 4-5ml de medio a temperatura de 37 °C y se adiciona el inóculo de células (10^4 a 10^6 células/ml). Se procede a incubar el cultivo a 37 °C y 5 % de CO_2 . El medio deberá cambiarse cada tercer día:

- a) Eliminar el medio del frasco succionando con una pipeta Pasteur estéril conectada a un sistema de vacío.
- b) Realizar un enjuague con 1 ml de medio de cultivo y eliminarlo posteriormente.
- c) Realizar un segundo enjuague en la forma mencionada.
- d) Adicionar 5.0 ml de medio nuevo con una pipeta estéril.

Se debe vigilar el crecimiento celular, y cuando se observe un recubrimiento total de la superficie del frasco, el cultivo debe ser desprendido de la superficie de este con tripsina-EDTA:

- a) Se absorbe el medio con una pipeta Pasteur conectada a un sistema de vacío
- b) Se adiciona 1.5 ml de tripsina, se gira lentamente el frasco para permitir la humectación de toda la capa celular.
- c) Se absorbe la tripsina y se adicionan 1.5 ml más, exponiendo las células a la acción de la tripsina durante 1 a 2 min.
- d) Observar el desprendimiento de las células al microscopio, si es necesario golpear el frasco ligeramente para acelerar el proceso, se adicionan 4 ml de medio de cultivo para neutralizar al acción de la tripsina.
- e) Se succiona y se expelle varias veces con una micropipeta la suspensión celular para eliminar cúmulos.
- f) Se adicionan 2-3 ml de la suspensión celular a otros 2 frascos nuevos a los cuales se les ha adicionado previamente 5 ml de medio de cultivo.

Cuando las células han crecido a través de dos pasajes sucesivos, estas pueden ser

utilizadas para los experimentos.

4.5 CONGELAMIENTO Y DESCONGELAMIENTO DE CÉLULAS

El proceso de congelamiento de células permite el mantenimiento de una línea celular, conservando sus características biológica. Las condiciones requeridas son temperaturas bajas para favorecer un metabolismo lento, y reducir las probabilidades de mutaciones .

Materiales :

Tubos Falcon de 15 ml.
Tubos para congelación Falcon de 1.2 ml (Criotubos).
Micropipetas de 1000, 200, 100 μ l.
Puntas para micropipeta estériles.
Centrifuga.
Tanque de nitrógeno líquido o ultracongelador REVCO a -80 °C.

Reactivos:

Tripsina-EDTA al 0.1 % en solución salina isotónica .
Medio DMEM con rojo fenol y SFB al 5%.
Dimetilsulfóxido (DMSO) al 10 % en DMEM con rojo fenol:

Vaciar el contenido de una ampollita de DMSO para cultivo celular (Sigma No. Catalogo D-2650) en un tubo Falcon de 15 ml estéril. Diluir con DMEM con rojo fenol de acuerdo a la cantidad de tubos a congelar, hasta la concentración de 10 % de DMSO.

4.5.1 CONGELACIÓN

Se toma un frasco de 25 cm² con cultivo de células que estén cubriendo toda la superficie, y se elimina el medio DMEM con rojo fenol, se enjuaga con 1 ml de tripsina y se elimina esta con una pipeta Pasteur estéril. Se adicionan nuevamente 1.5 ml de tripsina y se agita suavemente la placa para acelerar el desprendimiento de las células, verificándose esto al microscopio. Inmediatamente se adicionan 3.0 ml de DMEM con rojo fenol nuevo, se realiza una cuenta celular en cámara de Neu Bauer y se procede a centrifugar la suspensión celular a 800 rpm durante 10 min.

Se elimina el sobrenadante y se adiciona medio DMEM con DMSO al 10 % hasta lograr una concentración celular de 10⁶ células/ml y resuspender el paquete celular. Adicionar 1.0 a 1.2 ml de la mezcla en cada criotubo previamente etiquetado con el nombre de la línea celular, la fecha y número de pasaje; colocar inmediatamente en los contenedores para refrigerar 2 hr a 4 °C, posteriormente 2 hr a -20 °C y finalmente almacenar en el tanque de nitrógeno líquido (-170 °C) o en un ultracongelador a -80 °C.

4.5.2 DESCONGELACIÓN

Se adicionan 5 ml de DMEM con rojo fenol y SFB al 5 % a un frasco de 25 cm². Sacar un criotubo y colocarlo en un baño de agua a 37°C para iniciar el descongelamiento durante un par de minutos. Cuando se desprenda el paquete celular sacar del baño (sin descongelación total) y agregar el contenido del criotubo al frasco recién preparado. Incubar a 37°C y 5 % de CO₂ durante 24 hrs. Al final del periodo, proceder a cambiar el medio DMEM con rojo fenol y SFB al 5 % por medio nuevo verificando la adherencia de las células.

Finalmente, se mantiene el cultivo cambiando el medio cada 3 o 4 días.

4.6 BIOENSAYOS EN EL E-SCREEN

El E-SCREEN es un método que se ha propuesto para la evaluación de los efectos estrogénicos de diversos xenoestrógenos ambientales (34, 35). Dicho ensayo se realiza utilizando células MCF-7 y el punto final a detectar es la máxima proliferación celular durante los 6 días que dura el experimento.

Materiales:

Placas Falcon de 96 pozos.
Micropipetas de 20, 100, 200, 1000 µl.
Pipetas estériles de 10 ml.
Cámara de Neu Bauer.
Tubos Eppendorf de 100 µl estériles.
Contador Coulter.
Lector de ELISA con filtro de 570 nm y 620 nm.

Reactivos:

Azul de tetrazoleo (Bromuro de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazoleo; MTT).
Tripsina -EDTA marca Gibco BRL, N° Catálogo 15402-012 (Tripsina al 0.5%, EDTA 4Na 5.3 nM).
Antibiótico-antimicótico Gibco BRL No. Catálogo 15245-012 (penicilina - estreptomina 10000 UI/ml y anfotericina 25 µg/ml).
Serie de Compuestos a evaluar.
Medio DMEM sin rojo fenol con SH-CD al 5 %.
Medio DMEM con rojo fenol con SFB al 5 %.
Suero humano tratado con carbón-dextran (SH-CD).
Solución de Azul de tetrazoleo (2 mg/ml):
Solución lizante.
Isoton II para contador Coulter.
Isopropanol acidulado (HCl 0.04 M en Isopropanol) o DMSO.

4.6.1 PREPARACIÓN DE SOLUCIONES

Tripsina-EDTA al 0.05 %.

Se reconstituye un frasco de Tripsina-EDTA con 20 ml de agua purificada estéril, se coloca 1 ml de esta solución en 20 tubos Falcon de 15 ml y se diluye agregando 9 ml de agua purificada estéril a cada tubo. La conservación de las soluciones preparadas es en refrigeración a -20° C hasta el momento de uso.

Suero Humano tratado con carbón-dextran (SH-CD).

Preparar de acuerdo al procedimiento de preparación descrito previamente.

Medio DMEM con SH-CD al 5 % estéril.

Se coloca el contenido de un sobre de DMEM sin rojo fenol marca Gibco BRL con No. de catálogo 13000-21 en 800 ml de agua purificada en un matraz Erlenmeyer de 1000 ml. Se agita hasta disolución completa, al sobre se la adicionan 10 ml de agua para disolver el polvo residual y se vierten al matraz. Adicionar 3.7 g de bicarbonato de sodio, si el fabricante no proporciona otras indicaciones. Se adiciona 10 ml de buffer HEPES para tener concentración de 10 mM. Se adiciona 10 ml de piruvato de sodio (concentración final de 1 mM) y 10 ml de aminoácidos no esenciales (concentración final de 1 mM). Se completa el volumen del medio a 1 litro con agua purificada, se procede a ajustar el pH con HCl conc. a 7.3 (con una variación de ± 0.1 unidades). Se adicionan 10 ml de antibiótico-antimicótico.(100 UI de penicilina /ml) y se ajusta el volumen del medio a 1L con agua purificada.

El SH-CD previamente preparado se inactiva a 57 °C ($\pm 1^{\circ}\text{C}$) durante 30 min. El DMEM sin rojo fenol se coloca en el equipo Millipore con membrana de 0.2 μm y se conecta a un sistema de vacío. Se adicionan 50 ml de SH-CD y se procede a la filtración. Se realiza la prueba de esterilidad. El DMEM con 5 % de SH-CD recién filtrado se coloca en un frasco estéril y se etiqueta con los siguientes datos: nombre del medio, contenido de SH-CD, concentración de suplementos, nombre de quien lo preparó y fecha.

Medio DMEM con rojo fenol con SFB al 5%.

Preparar de acuerdo al procedimiento de reconstitución proporcionado en el sobre de envoltura del fabricante o al método de propagación de células

Solución Lizante:

Pesar los siguientes reactivos:

Fosfato monobásico de sodio	689.95 mg.
Fosfato dibásico de sodio	709.8 mg.
Cloruro de sodio (15 mM)	877.0 mg
Cloruro de magnesio (2 mM)	406.6 mg.

Disolver en 100 ml de agua purificada calidad HPLC o ultrapura.

Bromuro de etilhexadecildimetilamonio EHDAB (1 %)

10 g.

Disolver en 100 ml de agua purificada calidad HPLC.

Triton X-100 (0.5%) 5 ml.

Isopropanol (2 %) 2 ml.

Mezclar las soluciones preparadas y aforar a un volumen final de 1000 ml.

Isoton II para Contador Coulter.

Filtrar a través de una membrana de 0.45 µm.

Solución salina isotónica estéril.

Se pesan 9 g de NaCl y se disuelven en 1L de agua purificada. Se esteriliza en autoclave. Una vez fría la solución, se procede a filtrar a través de membrana de 0.2 µm.

Solución de MTT (2 mg/ml).

Se pesan 25 mg de MTT en un vidrio de reloj y se transfiere a un tubo de ensayo de 12 x 75 cubriéndolo con papel aluminio para evitar exposición a la luz, se adicionan 5 ml de la solución salina isotónica recién preparada y estéril. Se agita hasta disolución en un vórtex, y se procede a esterilizar la solución utilizando un swinex con membrana de 0.2 µm de poro estéril. El recipiente se guarda en refrigeración a 2 a 8 °C hasta el momento de utilizarse.

Isopropanol acidulado (HCl 0.04 M en Isopropanol) o DMSO.

Se adicionan 0.5 ml de HCl conc. a 60 ml de isopropanol y se mezcla.

Serie de Compuestos a evaluar.

Se preparan las soluciones Stock disolviendo en etanol grado Reactivo Analítico (RA), y las diluciones posteriores en DMEM sin rojo fenol estéril.

4.6.2 ADHESIÓN DE LAS CÉLULAS

El día del experimento, se toma un frasco con células que se encuentre listo para ser tripsinizado. Se realiza la tripsinización como se ha descrito anteriormente para la propagación de células, se adicionan 3 ml de DMEM con rojo fenol con suero fetal bovino al 5 %, y se procede a realizar la cuenta de células en la suspensión recién preparada.

4.6.3 CUENTA INICIAL DE CÉLULAS

En la cámara de Neu Bauer se coloca una gota de la suspensión celular y se procede a contar los 4 cuadrantes de las esquinas exteriores del área cuadrada al microscopio con un aumento de 40X. El número de células por ml se obtiene de acuerdo a la siguiente relación, considerando que los cuadros contados miden 1 mm de longitud por lado:

$$\text{No. de Células /ml} = (C/4) \times 1 \text{ mm}^2 \times 0.1 \text{ mm} \times 100,000$$

4.6.4 ADHESION DE CÉLULAS EN PLACAS DE CULTIVO

Para proceder a la fijación de células, se prepara una suspensión celular con DMEM con rojo fenol y 5 % de SFB con una concentración celular de 4000 células/200 µl. Para ello, se puede tomar 300,000 células de la suspensión utilizada para la cuenta, depositando este volumen en un tubo Falcon de 15 ml. Se diluye a 15 ml con DMEM con rojo fenol y se homogeniza invirtiendo el tubo ligeramente varias veces. Debe evitarse la agitación violenta. En cada pozo de la placa se colocan 200 µl de la nueva suspensión celular en cada pozo de una placa de 96 pozos, homogeneizando periódicamente el tubo. Se agita la placa con movimientos circulares para permitir la distribución homogénea de las células. Realizado lo anterior se incuba la placa a 37 ° C y CO₂ al 5 % durante 24 hrs.

4.6.5 ESTIMULACIÓN

Después de 24 hrs, se verifica que las células se encuentren adheridas al fondo de la placa. En área estéril se realiza un lavado de la placa, eliminando el medio con rojo fenol de cada uno de los pozos utilizando una pipeta Pasteur estéril. Se realiza un lavado utilizando 200 µl DMEM sin rojo fenol en cada pozo y eliminándolo posteriormente, verificando que se retire completamente el medio de enjuague. Con una micropipeta de 1000 µl se adicionan 200 µl de DMEM sin rojo fenol en cada pozo de la serie de controles, y 190µl en la serie de pozos para evaluar el compuesto químico. Se adicionan 10 µl de las diferentes soluciones del fármaco a evaluar. Se agita suavemente la placa con movimientos circulares para homogeneizar el contenido del pozo. La placa se incuba a 37°C y CO₂ al 5 % durante 5 días, al final de los cuales se realiza el conteo celular.

4.6.6 EVALUACION DE PROLIFERACION CELULAR

4.6.6.1 CUENTA CELULAR CON CONTADOR COULTER

Calibración del Contador Coulter.

Se enciende el equipo y se registran las condiciones de trabajo:

Tubo de Conteo: 50 µm.

Límite Superior: 18 µm.

Límite Inferior: 6 μm .
Volumen de Conteo: 0.1 ml.

En una celda de conteo se colocan 5.0 ml de Isoton II filtrado y se colocan unas gotas del calibrador no. 10. Se realiza la calibración de acuerdo al protocolo del fabricante.

Se preparan las celdas a ocupar en la cuenta, colocando en ellas 5.0 ml de Isoton II recién filtrado, y se realiza la determinación del contenido de partículas en cada celda. La cuenta se realiza por triplicado.

Al finalizar el período de 5 días, se toma la placa del bioensayo, se elimina el medio de cultivo con una pipeta, verificando que no queden residuos en cada pozo. Se adiciona 200 μl de solución lizante y se procede a raspar el fondo del pozo a contar con la punta de la micropipeta utilizada, con movimientos circulares. Se succiona un volumen de líquido y se expele varias veces para lograr una homogeneización y garantizar la lisis celular.

Se toman 100 μl de la solución de lisis y se colocan en las celdas de conteo ya preparadas. Se procede a realizar la cuenta por triplicado para cada celda.

Se recomienda realizar la lisis celular solo en 2 a 4 pozos a la vez. Los resultados se calculan con la siguiente relación:

Células/pozo = Cuenta del Coulter X Factor de Dilución.

El factor de dilución en las condiciones mencionadas es 100.

4.6.6.2 CUENTA CELULAR CON AZUL DE TETRAZOLEO (MTT)

El MTT es una sal de tetrazoleo soluble en agua que da un color amarillo cuando es preparada en medio o soluciones salinas libres de rojo fenol. El MTT disuelto es convertido a un formazán insoluble en agua, de color púrpura, por la actividad de las enzimas deshidrogenasas. Este formazán insoluble puede ser solubilizado en isopropanol u otros disolventes, y la solución puede ser medida espectrofotométricamente, utilizando la absorbancia como una medida de la concentración del colorante consumido.

Reactivos:

Solución de PBS estéril:

Isopropanol acidulado (HCl 0.04 M en Isopropanol) o DMSO.

Materiales:

Vidrio de reloj.

Filtro Swinex con membrana de 0.2 μm estéril.

Tubo de ensayo de 12 x 75.

Espátula.

Micropipetas de 20, 100 y 200 μl .

Lector de ELISA con filtro de 570 nm.

Agitador de placas de cultivo.

Procedimiento:

En el momento en que se realice la cuantificación de la proliferación celular, se toma la placa y se elimina el medio de cada pozo absorbiéndolo con una pipeta Pasteur. Se adicionan a cada pozo 20 µl de la solución de MTT y se procede a incubar por un período de 4 hrs. a 37 °C. Al finalizar la incubación, se adiciona a cada pozo 200 µl de isopropanol acidulado o DMSO y se reposa durante 5 min. Al término de este período, se realiza una agitación en el agitador de placas a 6 rpm durante 10 min. La lectura de absorbancia se realiza en un lector de ELISA utilizando el filtro de 570 nm y restando el blanco obtenido a 630-690 nm.

Los resultados de absorbancia pueden expresarse en % de actividad mitocondrial utilizando la siguiente relación:

Se obtiene el promedio geométrico de las absorbancias correspondientes al grupo control.

$$ABS_{prom} = \Sigma ABS/n$$

donde n es el número de muestras en el grupo control.

$$\% \text{ Actividad Mitocondrial} = (ABS_{muestra} / ABS_{prom}) \times 100$$

5. RESULTADOS Y DISCUSION.

Antes de iniciar los bioensayos se procedió a estandarizar el conteo de las células MCF-7 utilizando un contador Coulter y la técnica del MTT para poder hacer un análisis de correlación entre ambos métodos.

Para la calibración del contador Coulter se realizó una cuenta comparativa con una cámara de Neu Bauer, lo que permitió encontrar la sensibilidad y linealidad de la cuenta celular. La estimación de la proliferación celular con la técnica de MTT se llevó a cabo mediante una curva de calibración, relacionando el número de células con la absorbancia obtenida en un lector de ELISA después de exponer durante cuatro horas a las células MCF-7 al colorante azul de tetrazoleo que es transformado a formarán por enzimas mitocondriales.

La evaluación del efecto proliferativo producido por los Pbens en la línea celular MCF-7 fue estimado utilizando tanto el contador Coulter como la técnica del MTT.

5.1 CALIBRACIÓN DEL CONTADOR COULTER.

La calibración contador Coulter fue realizada utilizando diferentes volúmenes (10 a 60 μL) de un estándar de partículas de látex de diámetro de 10 μm (estándar L10). El número de partículas fue contado utilizando simultáneamente una cámara de Neu Bauer y el contador Coulter, obteniéndose los parámetros de comparación para establecer la sensibilidad del contador. En la Figura 7 se puede observar las regresiones lineales de los datos obtenidos por estos dos métodos.

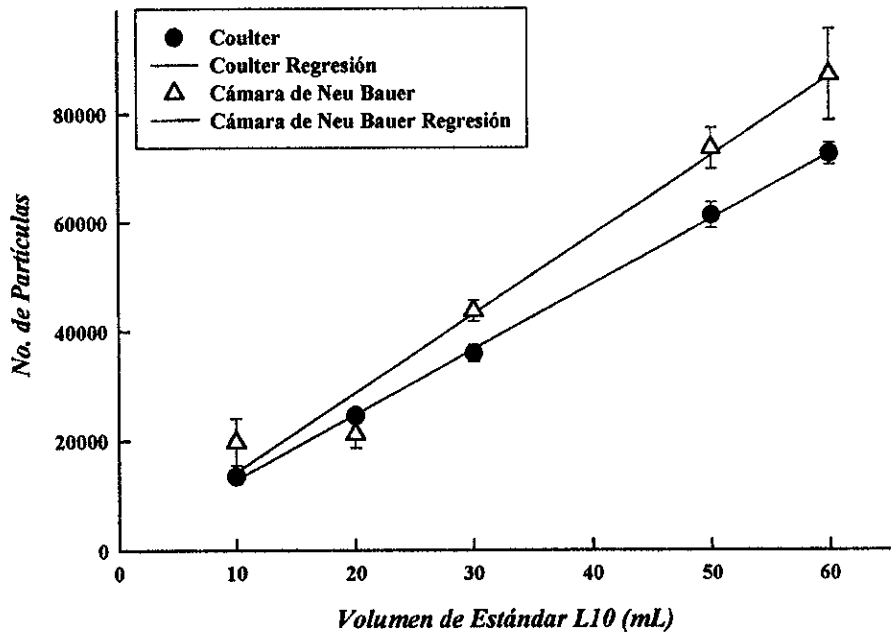


Figura 7. Calibración del Contador Coulter.

Los resultados obtenidos nos muestran que las cuentas son mayores cuando se utiliza la cámara de Neu Bauer (Figura 7), lo que se refleja en la pendiente correspondiente de cada línea de regresión siendo mayor la correspondiente a la cámara de Neu Bauer (Tabla 1). El coeficiente de correlación es mayor en los datos de regresión del contador Coulter indicando que la dispersión entre cuentas repetidas es menor por éste método.

TABLA 1. Regresión Lineal en la cuenta de partículas de látex del estándar L10.

Parámetro	Cámara de Neu Bauer	Contador Coulter
m	1451	1197
b	-261	883
r²	0.9202	0.9893

Correlación entre la cuenta celular en cámara de Neu Bauer y el Contador Coulter.

Linearidar. El análisis de correlación entre las cuentas celulares obtenidas del contador Coulter y la cámara de Neu Bauer se realizó preparando una serie de muestras con número variable de células (Figura 8).

TABLA 2. Parámetros obtenidos de la regresión lineal de la correlación entre la cuenta celular en cámara de Neu Bauer y el Contador Coulter.

Parámetro	
m	0.7453
b	2470
r²	0.9748

Esto nos permitió conocer el límite de sensibilidad del contador Coulter (la ordenada al origen, tabla 2), que fue de un mínimo de 2500 células y muestra un comportamiento lineal a un número celular mayor. Por otro lado se confirmó que la cuenta con cámara de Neu Bauer es mayor que la realizada con el contador Coulter.

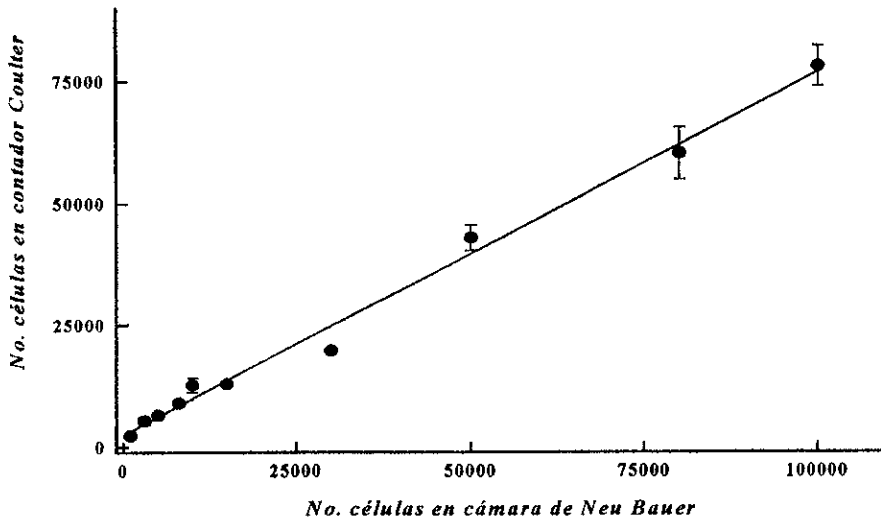


Figura 8. Correlación en la cuenta de células entre el contador Coulter y la cámara de Neu Bauer

5.2 LINEARIDAD EN LA TÉCNICA DE MTT

La Figura 9 muestra una curva de la relación de población celular y absorbancia obtenida después de exposición de las células MCF-7 al azul de tetrazoleo por 4 horas. La linealidad de esta técnica está en un rango de medición de la población celular entre 1000 a 70000 células.

Por el valor del coeficiente de correlación obtenido, podemos inferir que a valores mayores de 70,000 células, ya no se encuentra un aumento proporcional entre los valores de absorbancia y población celular.

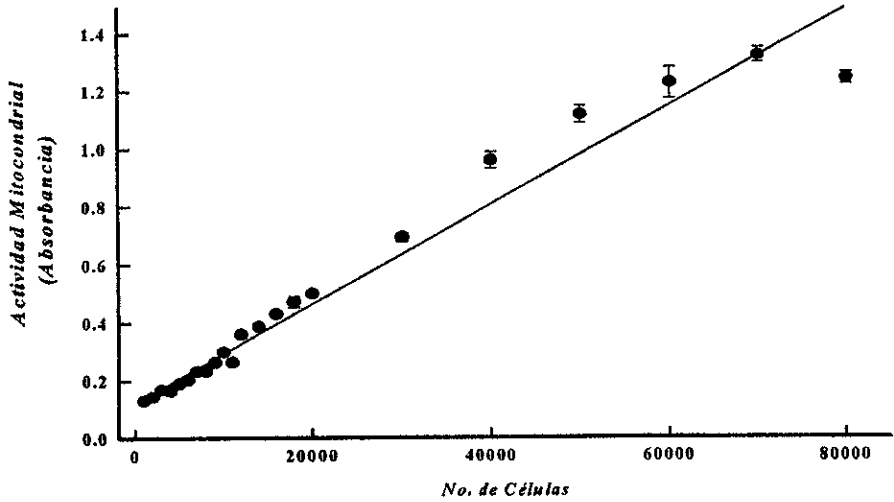


Figura 9. Linearidad de la Técnica de MTT.

TABLA 3. Parámetros obtenidos de la regresión lineal del número de células MCF-7 y actividad mitocondrial.

Parámetro	
m	1.716
b	0.9566
r²	0.95

5.3 CURVA DE CRECIMIENTO DE CÉLULAS MCF-7 ATCC

Se determinó el tiempo de duplicación poblacional de la línea celular MCF-7 ATCC proveniente del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Química. La curva de crecimiento se realizó utilizando placas de 96 pozos, en DMEM con rojo fenol y 5 % de SFB. La cuenta inicial de las células se llevó a cabo utilizando una cámara de Neu Bauer, se colocaron 2000 células en cada pozo y se realizaron 2 cuentas diarias durante 6 días, el número de células se determinó utilizando el método de conteo celular con contador Coulter.

En la Figura 10 se muestra la curva de crecimiento de las células MCF-7, la cual tiene una fase de latencia de 70 horas, y posteriormente se observa su fase de proliferación logarítmica (fase log) que se mantiene hasta las 126 horas. Después de este tiempo se presenta la fase estacionaria, posiblemente debida a la sobrepoblación en cada uno de los pozos.

Tiempo de generación media (t_D)

Se determinó el tiempo de generación media (t_D), que se define como la medida de la velocidad de proliferación y es el intervalo de tiempo en el cual un cultivo en crecimiento exponencial duplica su número celular. El parámetro t_D se calcula con la siguiente ecuación (34), utilizada por Soto y cols. para éste propósito:

$$\alpha = (1/t) \ln (C_t/C_0)$$

donde:

C_0 = Es el número inicial de células.

C_t = Es el número de células al tiempo t.

α = Es la constante de proliferación celular instantánea.

t_D = Es el valor de $\ln (C_t/C_0)$ cuando $C_t = 2 C_0$.

Para las células MCF-7 ATCC

$$\alpha = 0.030$$

Cuando $C_t = 2 C_0$

$$\alpha = (1/t_D) \ln 2$$

$$t_D = (1/\alpha) \ln 2$$

$$t_D = 23.10 \text{ hrs.}$$

TABLA 4. Cuenta celular en la curva de crecimiento de células MCF-7 ATCC.

Tiempo (hrs)	0	4	8	20	27	46	53.5	67.5	72	92	96	119	126
1ª Det.	2000	3500	1733		2300	3600	5500	12300	4800	48200	59500	94200	130800
2ª Det.		1500	3000	2750	4050	3400		7100	4700	38000	64500	111800	111100
3ª Det.	1620		3600	1200	2650	3400	3600		7800		32000		
Prom.	1800	2291	2655	1816	2910	3465	4449	9345	5603	42797	49706	102623	120548

El tiempo de generación media t_d de las células MCF-7 ATCC obtenido nos indica que cada 23 horas se duplica la población celular cuando esta se encuentra en su fase logarítmica

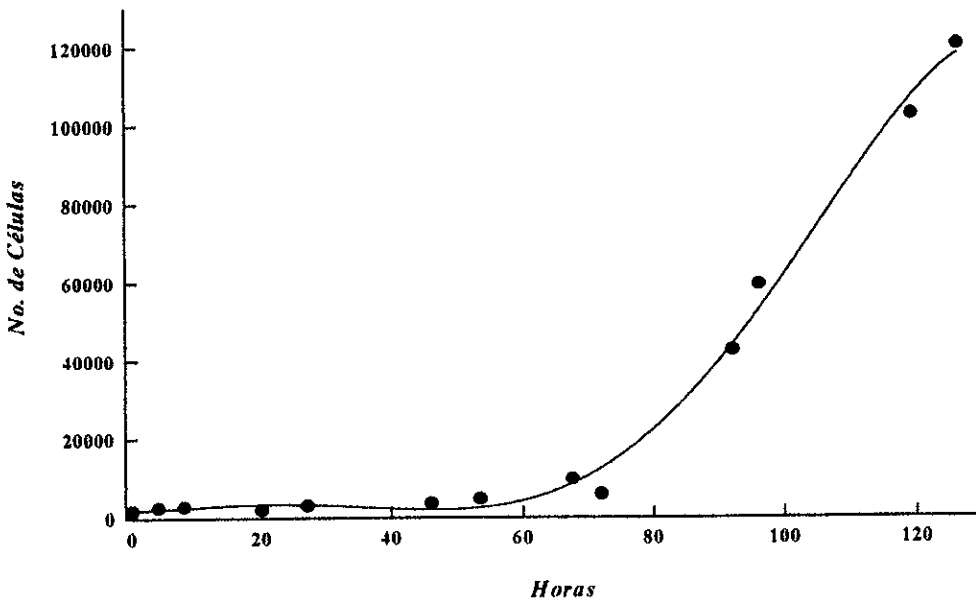


Figura 10. Curva de Crecimiento de Células MCF-7 ATCC.

Después de establecer la curva de crecimiento celular se procedió a estimar el efecto de los ésteres del APHB, MePben, EtPben, PrPben y ButPben sobre la proliferación de las células MCF-7 empleando los dos métodos de conteo disponibles.

5.4 ESTIMACION DE LA INFLUENCIA DE LOS PBENS SOBRE LA PROLIFERACION CELULAR UTILIZANDO EL CONTADOR COULTER

En los bioensayos se compararon los efectos proliferativos de los cuatro Pbens, E₂ y el vehículo. Cuando se utilizó el procedimiento de conteo celular para contador Coulter (Figuras 11 y 12) la evaluación se llevó a cabo en un rango de concentraciones del compuesto de 10⁻⁵ a 10 nM. La estimación de la proliferación celular se realizó contando las células contenidas en cada pozo (células/pozo). Para la normalización en cada ensayo se utilizó la relación :

M / C = promedio de células en los pozos tratados / promedio de células de los pozos control

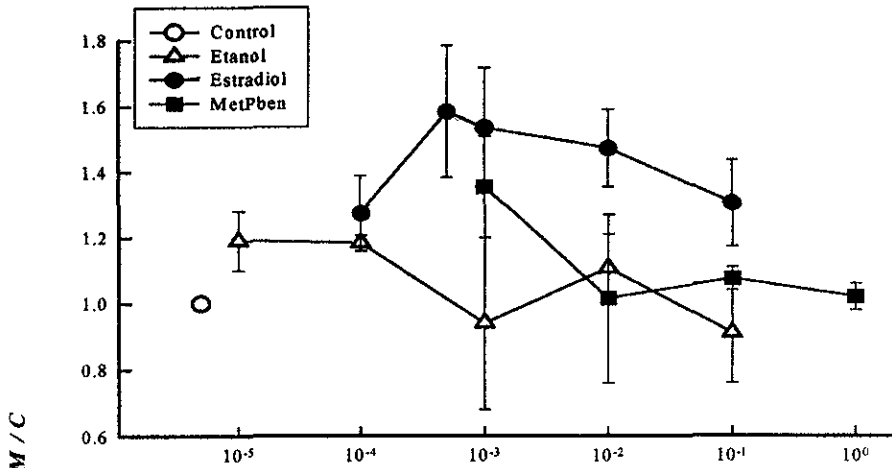
que indica el número de veces en que proliferaron las células estimuladas en relación al grupo control de acuerdo al método utilizado por Soto y cols. (34, 35, 41).

El análisis de varianza (ANOVA) no mostró diferencias significativas entre el número de células de diferentes muestras con respecto al control. Esto posiblemente es debido a que la variación intermuestral es muy amplia en cada punto de evaluación. La estimación de la proliferación celular con contador Coulter toma como base la cuenta de los núcleos celulares y la existencia de células MCF-7 multinucleadas produce una alta variabilidad en cada determinación. Existen otros factores que pueden influir en la estimación de la proliferación celular, como son la presencia de residuos de la lisis celulares (membrana celular) y la mayor manipulación de las muestras con respecto a la técnica del MTT.

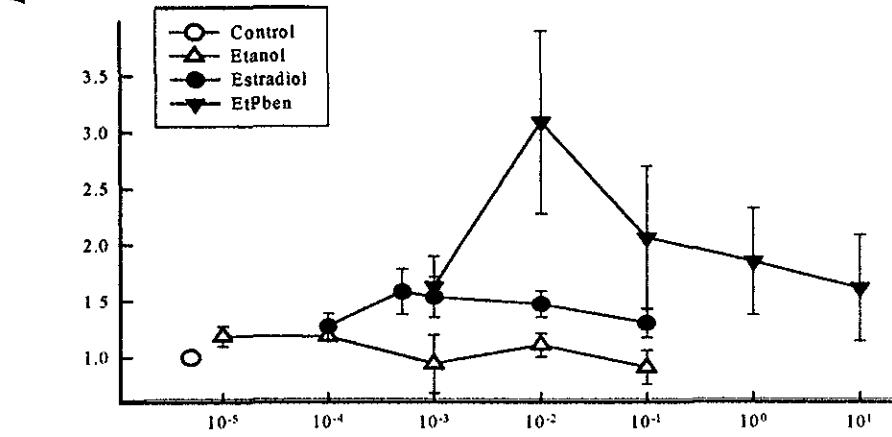
TABLA 5. Promedios de la Relación (M/C) de los Pbens.

Conc nM	10^{-5}	10^{-4}	5×10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}	1.0	10.0	n
Etanol	1.19	1.18		0.94	1.54	1.10	0.91	*	4
E2	*	1.27	1.58	1.53	1.47	1.30	*	*	12
MetPben	*	*	*	1.35	1.01	1.075	1.02	1.13	2
EtPben	*	*	*	1.62	3.088	2.062	1.58	1.61	2
PrPBen	*	*	*	1.30	1.18	1.50	1.06	1.09	2
ButPben	*	*	*	0.76	1.59	1.50	2.73	*	3

*Concentraciones no evaluadas.



(a)



(b)

Log Concentración (nM)

Figura 11. Efecto proliferativo de Metpben (a) y EtPben (b) en células MCF-7 ATCC. Cuenta celular en contador Coulter. * $p < 0.05$

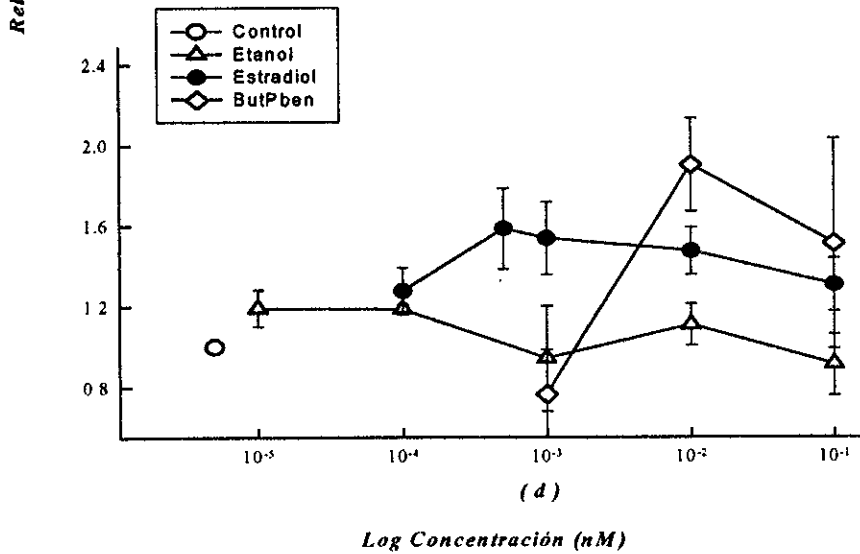
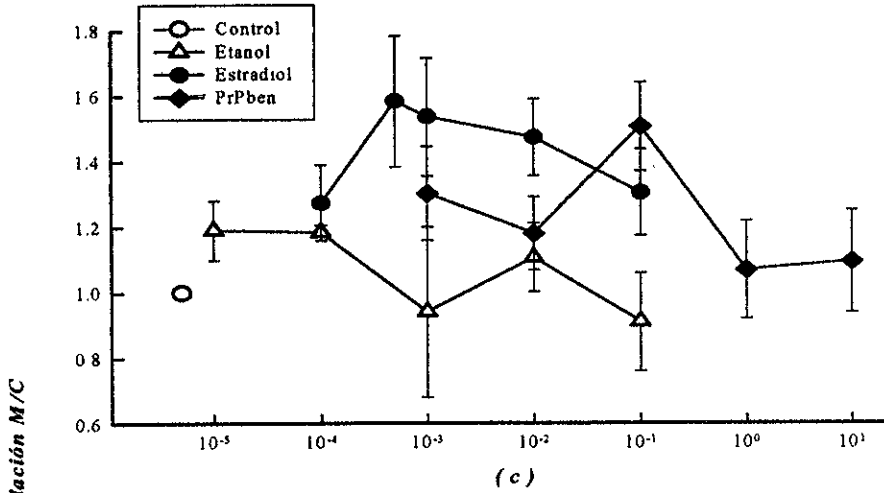


Figura 12. Efecto proliferativo de PrPben (c) y ButPben (d) en células MCF-7 ATCC. Cuenta celular en contador Coulter. * $p < 0.05$

Estimación de la respuesta proliferativa y la potencia proliferativa de los Pbens.

El efecto proliferativo (EP) de un compuesto también se ha descrito como la relación de la proliferación máxima obtenida con un fármaco y la correspondiente al grupo control.

Efecto proliferativo (EP) :

$$\text{EP} = \text{Proliferación máxima inducida por el fármaco} / \text{Proliferación en el control}$$

El efecto proliferativo relativo (EPR) indica la relación del EP del fármaco y el EP del E₂ (35).

Efecto proliferativo relativo (EPR) :

$$\text{EPR} = (\text{EP del compuesto de prueba} / \text{EP del E}_2) \times 100$$

La potencia proliferativa relativa (PPR) nos indica la concentración mínima del compuesto evaluado para obtener una máxima proliferación, con relación a la concentración mínima del E₂ para obtener un efecto proliferativo máximo (35).

Potencia proliferativa relativa (PPR):

$$\text{PPR} = (\text{Dosis de E}_2 / \text{dosis del compuesto evaluado}) \times 100$$

Los parámetros EP, EPR y PPR correspondientes a los Pbens se pueden apreciar en la tabla 6. El EPR de los Pbens es variable con respecto al del E₂. El MetPben y PrPben tienen un efecto proliferativo menor al del E₂ (85 y 94 % respectivamente), mientras que el EtPben y el ButPben ejercen un efecto proliferativo mayor al del E₂ (195 y 172 % respectivamente).

La respuesta proliferativa máxima del E₂ se produce a una concentración de 5 x 10⁻³ nM. Los Pbens tienen una PPR menor, indicando que se requieren mayores concentraciones de Pbens para producir un efecto semejante al de E₂. El orden de potencia de los Pbens es como sigue: el ButPben es el compuesto que produce un efecto proliferativo máximo a concentraciones altas (1 nM) con la menor potencia relativa. Los demás Pbens, MetPben, EtPben y PrPben tienen un efecto proliferativo máximo a concentraciones mayores que el E₂ pero menores que el ButPben.

Orden de potencia relativa obtenida con el contador Coulter:

E2 >EtPbenButPben>>PrPben>MePben

TABLA 6. Respuesta estrogénica de células MCF-7 ATCC al E₂, MetPben, EtPben, PrPben y ButPben.

COMPUESTO	CONCENTRACION nM ^I	Ep ^{II}	EPR %	PPR %
E2	0.0005	1.58	100	100
MetPben	0.001	1.35	85	50
EtPben	0.01	3.09	195	5
PrPben	0.1	1.5	94	0.5
ButPben	1	2.73	172	0.005

I Concentración mínima necesaria para máxima proliferación celular.

II Efecto proliferativo: Relación entre la máxima proliferación celular obtenida con el compuesto químico y el control.

5.5 ESTIMACION DE LA INFLUENCIA DE LOS PBENS SOBRE LA PROLIFERACION CELULAR UTILIZANDO LA TECNICA DEL MTT

En las Figuras 13 y 14 se muestra el efecto proliferativo inducido por E₂, vehículo y los Pbens evaluados utilizando la técnica de MTT. El E₂ produce la máxima proliferación de células MCF-7 ATCC a una concentración de 10⁻¹ nM, el vehículo no produce ningún efecto proliferativo significativo en todo el rango de evaluación (Figura 13). En la concentración de 0.01 pM el E₂ produce una proliferación de 123 % en relación al grupo control. A esta misma concentración, la proliferación de los Pbens varía entre 110 % y 126 %. Cuando se exponen las células a concentraciones mayores de 0.01 nM de E₂ se induce una mayor proliferación (240 % a 0.1 nM, 166 % a 10 nM y 215 % a 0.1 μM); con una exposición a concentraciones mayores a 0.1 μM se observa una disminución de la proliferación celular. Este mismo patrón de comportamiento se observó en los casos de MePben, EtPben y PrPben.

El MePben solo indujo una proliferación significativa del 134.2 % con exposición de las células a una concentración de 1 nM, encontrándose una disminución de la proliferación a concentraciones mayores (Figura 13 a). El EtPben no indujo una proliferación significativa en todo el rango de la evaluación, alcanzando solamente una proliferación máxima de 130 % con 0.1 nM (Figura 13 b). El PrPben presenta su mayor efecto proliferativo a una concentración de 1 pM (139.8 %), en concentraciones mayores no se observa un incremento en la proliferación (Figura 14.a).

En contraste, ButPben induce un efecto proliferativo en la población celular a partir de una concentración de 1 nM (137 %), incrementándose hasta alcanzar un efecto máximo a una concentración de 10 μM (158 %, Figura 14 b).

En la Tabla 8 se puede apreciar el Efecto Proliferativo Relativo (EPR) inducido por los Pbens y E₂, y donde se muestra que el mayor efecto proliferativo es inducido por E₂, continuando en orden descendente, ButPben (65.9 %) y PrPben (58 %), mientras que los que presentan menor efecto proliferativo son el MetPben y EtPben. De acuerdo con estos resultados, se podría considerar que el efecto proliferativo puede estar relacionado con

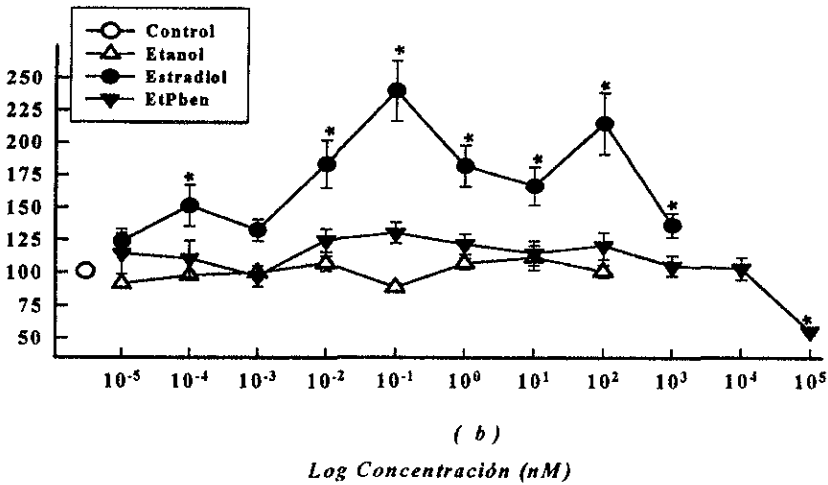
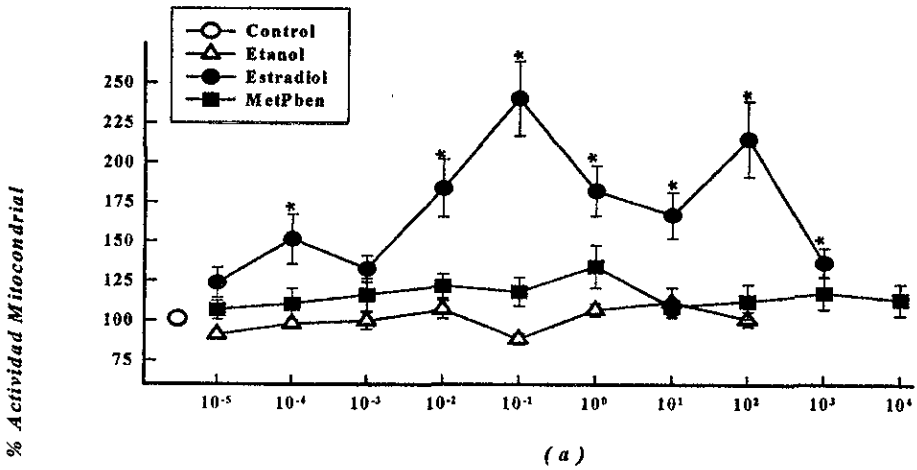


Figura 13. Efecto proliferativo de MetPben (a) y EtPben (b) en células MCF-7 ATCC. Cada punto es el promedio \pm EE de 3 bioensayos con 6 pozos de cultivo cada uno. * $p < 0.05$.

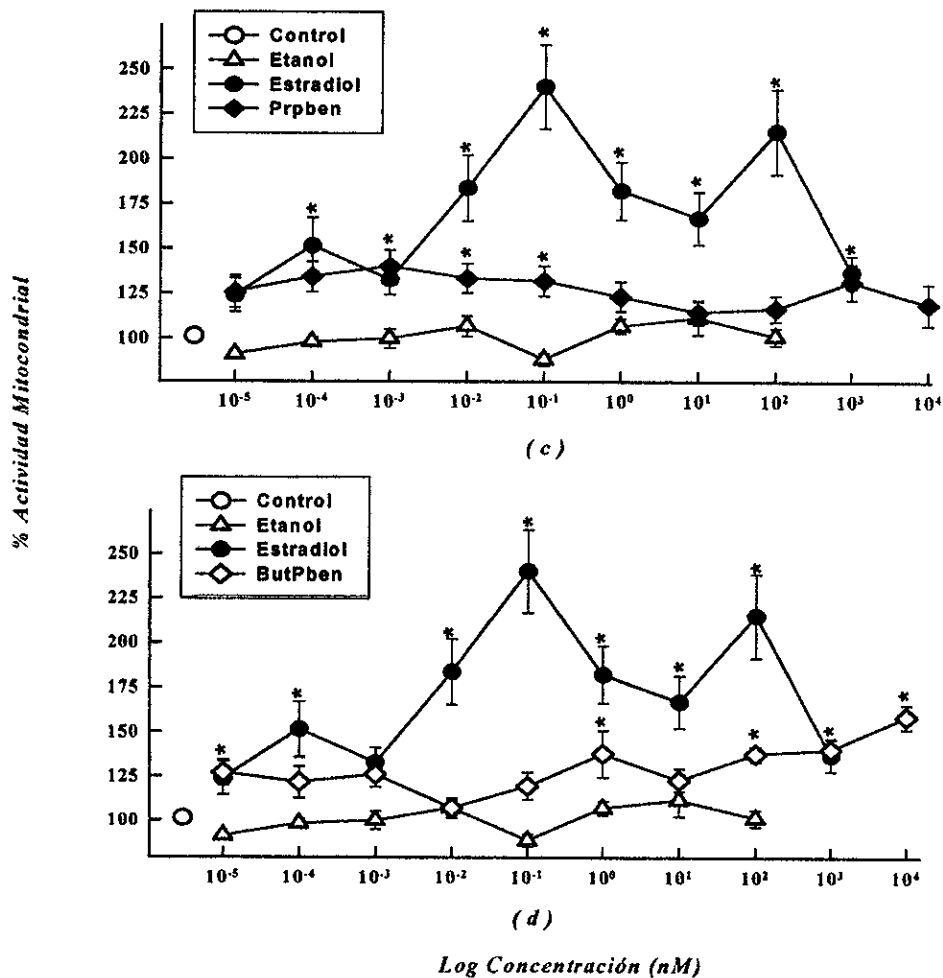


Figura 14. Efecto proliferativo de PrPben (c) y ButPben (d) en células MCF-7 ATCC. Cada punto es el promedio \pm EE de 3 bioensayos con 6 pozos de cultivo cada uno. * $p < 0.05$

el número de carbonos del sustituyente en la cadena alquílica, ya que conforme aumenta el número de átomos de carbono, aumenta el efecto proliferativo del Pben.

TABLA 7. Promedios de las evaluaciones del efecto proliferativo de los Pbens (% actividad mitocondrial).

Conc. NM	Cont.	10^{-7}	10^{-6}	10^{-5}	10^{-4}	10^{-3}	10^{-2}	10^{-1}	1.0	10	100	10^3	10^4	10^5	n
Etolol	100	96	91	98	99	106	88	106	115	101					12
E2	105	138	184	123	151	132	183	240	182	166	215	136			18
MetPben	101			106	116	121	118	134	108	112	117	113	75		18
EtPben	101			114	110	97	124	130	121	115	120	105	103	55	18
PrPben	96			125	134	139	133	131	123	114	116	131	119	52	18
ButPben	100			126	121	126	107	118	137	122	137	140	158		18

Estos compuestos han mostrado un efecto inhibitorio de la proliferación celular a altas concentraciones ($1 \mu\text{M}$ o mayores), como en el caso del MetPben y EtPben, que disminuyen significativamente la proliferación con respecto al control a una concentración de $10 \mu\text{M}$. Este efecto inhibitorio podría estar relacionado con la actividad antimicrobiana de los Pbens.

La Tabla 8 muestra la Potencia Proliferativa Relativa (PPR) de los Pbens evaluados. De estos datos no se puede establecer ninguna correlación estructural de los compuestos.

TABLA 8. Respuesta estrogénica de células MCF-7 ATCC al E2, MetPben, EtPben, PrPben y ButPben.

COMPUESTO	CONCENTRACION nM ^I	EP ^{II}	EPR %	PPR %
E2	0.1	2.48	100	100
MetPben	1.0	1.34	55	10
EtPben	0.1	1.30	54	100
PrPben	0.01	1.39	58	10000
ButPben	10000	1.58	65.9	0.001

I Concentración mínima necesaria para máxima proliferación celular.

II Efecto proliferativo. Relación entre la máxima proliferación celular obtenida con el compuesto y el control.

La evaluación del efecto proliferativo de los Pbens por las técnicas utilizadas muestra algunas tendencias paralelas:

Los valores de EP y EPR presentan una relación directa con el número de carbonos del sustituyente alquílico por ambas técnicas. Los valores más altos de EP y EPR corresponden al ButPben, los valores menores corresponden al MePben, EtPben y PrPben se encuentra en un rango de valores intermedios. Los valores de EP y EPR tienden a ser mas altos cuando se utiliza el contador Coulter, sin embargo, el EtPben, no tiene esta tendencia. Esta variación probablemente es producida por ser un número de muestra pequeño adicional a la variabilidad intermuestral obtenida con el contador Coulter.

Dado que el efecto máximo observado para cada compuesto fue diferente en ambas técnicas de conteo, los valores obtenidos de PPR no muestran ninguna correlación entre las dos técnicas utilizadas.

6. CONCLUSIONES

A partir de los resultados obtenidos, podemos concluir:

El contador Coulter modelo Z-1 proporciona una cuantificación confiable ($r^2=0.9893$) de partículas. Las cuentas obtenidas con el contador Coulter son menores que las obtenidas en cámara de Neu Bauer (Figura 9), sin embargo el intervalo de linealidad mediante el contador Coulter es más amplio (1000 a 100,000 células).

La línea celular MCF-7 ATCC utilizada, tiene un tiempo de proliferación medio (t_D) de 23 hrs, muy cercano al valor obtenido de la línea celular MCF-7 BUS utilizada por Soto A.M. cuyo t_D es de 20.4 hr.

La evaluación de los parámetros de proliferación EPR y PPR utilizando el contador Coulter nos permite caracterizar el intervalo de concentración en el cual se puede presentar el posible efecto estrogénico del compuesto evaluado. La Técnica de MTT permite una evaluación confiable de la proliferación celular y realizar un mayor número de ensayos a la vez, cuando se tiene una población celular máxima de 70000 células. Mediante este método la manipulación de las muestras es menor con respecto a la técnica con el contador Coulter.

En los bioensayos en que se expusieron células MCF-7 a diferentes concentraciones de Pbens y se evaluaron los resultados utilizando el contador Coulter no se observaron diferencias significativas entre el número de células de los grupos tratados con Pbens y E_2 con respecto al grupo control. Esto posiblemente se debe a que las células MCF-7 son multinucleadas y dan como resultado una gran variación en los valores.

La evaluación del efecto proliferativo de los Pbens mediante los dos métodos de conteo nos indicó que todos los Pbens inducen una proliferación celular menor que la del E_2 .

Del grupo de Pbens estudiado, PrPben y ButPben son los compuestos que producen un mayor efecto proliferativo de las células MCF-7. El efecto proliferativo de este grupo de fármacos puede estar relacionado directamente con la longitud de la cadena alquílica de los Pbens, esto probablemente sea debido a que la interacción con los receptores de estrógenos se vea favorecida cuando se tiene grupos propilo o butilo como sustituyente.

Existe una disminución en la proliferación celular cuando se utilizan altas concentraciones de Pbens, posiblemente este efecto se relacione con la actividad antibacteriana de estos compuestos.

7. BIBLIOGRAFIA.

1. Lender R., Delavault A., Le Moigne A. Diccionario de Biología, edit. Grijalbo, Barcelona, pag 116-117, 1982.
2. Murray R. K. Bioquímica de Harper, edit El Manual Moderno, S.A.; 11ª Edición México, pag 511-543, 1988.
3. Brody T. M., Laner J. Human Pharmacology, Molecular to Clinical, Edit Mosby, 2ª Edition; USA, pag 482-513, 1994.
4. Díaz Zagoya J.C. Bioquímica, Edit. Interamericana-McGraw Hill, 2ª Edición, México, pag 606-638, 1995.
5. Goodman L.S., Goodman G.A. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica, Edit. Médica Panamericana, 7ª Edición, Argentina, pag 1340-1410, 1988.
6. Tortora J.G. Principios de Anatomía y Fisiología, Edit. Harla S.A., México, pag 500-532, 1981.
7. Rang H.P., Dale M. Pharmacology; Churchill Livingstone, 3ª Edition, USA, 417-422, 1995.
8. Guyton A.C., Hall J.E. Tratado de Fisiología Médica, Edit. Interamericana-McGraw Hill, México, 1099-1132, 1997.
9. Hilleman B. Environmental Estrogens linked to reproductive abnormalities. Cancer. Science Technology. 1994.
10. Arai Y., Mori T., Suzuki Y., Bern H.A. Long-term effects of perinatal exposure to sex steroids and diethylstilbestrol on the reproductive system of male mammals. Int. Rev. Cytol. 84:235-268, 1983.
11. McLachlan J.A. Rodent Models for perinatal exposure to diethylstilbestrol and their relation to human disease in the mal. In: Developmental Effects of diethylstilbestrol (DES) in Pregnancy (Herbot A.L., Bern H.A. eds.) New York, pag 148-157, 1981.
12. Newbold R.R., McLachlan J.A. Diethylstilbestrol associated with defects in murine genital tract development. New York, Elsevier, pag 288-318, 1985.
13. Davis D.L., Bradlow H.L., Wolff M. Medical Hypothesis: Xenoestrogens as preventable causes of breast cancer. Environ. Health Perspec. 101:372-377, 1993.
14. Colborn T., Von Saal F.S., Soto A.M. Developmental effects of endocrine-disrupting

- chemicals in wildlife and humans. *Environ. Health Perspec.* 101:378-384, 1993.
15. Toppari J., Larsen J. Male reproductive health and environmental xenoestrogens. *Env. Health Perspec.*, 104:741-803, 1996.
 16. Shelby M.D., Retha R.N. Assessing Environmental Chemicals for Estrogenicity Using a Combination of in vitro and in vivo Assay. *Environ. Health Perspec.* 4:1296-1230, 1996.
 17. Campbell D.M., Webb J.A., Hargreave T.B. Cryptorchidism in Scotland. *Br. Med. J.* 295:1237-1238, 1987.
 18. Sweet R.A., Schort H.G., Kurland R., Culp O.S. Study of the incidence of hypospadias in Rochester, Minnesota, 1940-1970 and a case-control comparison of possible etiologic factors. *Mayo Clin. Proc.* 49:52-58 1974.
 19. White R., Hoare S.A., Sumpter J.P. Environmentally Persistent Alkylphenolic Compounds are Estrogenic. *Endocrinology* 135:175-182, 1994.
 20. Guillette L.J. Endocrine-disrupting environmental contaminants and reproduction: lesson from the study of wild life. In: *Womens Health Today: Perspective on Current Research and Clinical Practice* (Popkin D.R. Peddle L.J. eds.) New York, 201-207, 1994.
 21. Guillette L.J.J., Gross T.S., Masson G.R., Matter J.M. Developmental abnormalities of the gonad and abnormal sex hormone concentrations in juvenile alligators from contaminated or control lakes in Florida. *Environ. Health Perspec.* 102:680-688, 1994.
 22. Guillette L.J.J., Gross T.S., Gross D.A. Gonadal steroidogenesis in vitro from juvenile alligators obtained from contaminated or control lakes. *Environ. Health Perspec.* 103:31-36, 1995.
 23. Bitman J., Cecil H.C. Estrogenic activity of DDT analogs and polychlorinated biphenyls. *J. Agr. Food Chem.* 1970.
 24. Purdom C.E., Hardinan P.A., Sumpter J.P. Estrogenic effects of effluents from sewage treatment works. *Chem. Ecol.* 8:275-285, 1994.
 25. Thomas K.B., Colborn T. Organochlorine endocrine disrupters in human tissue In: *Chemically-induced alterations in sexual and functional Development: The Wildlife/Human Connection.* *Environ. Toxicol.* 21:265-294 1992.
 26. Safe S.H. Polychlorinated biphenyls (PCBs), dibenzo-p-dioxines (PCDDs), dibenzofurans, and related compounds: environmental end mechanistic considerations which support the development of toxic equivalency factors (TEFs). *Crit. Rev. Toxicol.* 21:51-88, 1990.

27. Ahlborg U.G., Hanberg A., Kennet K. Risk assessment of polychlorinated biphenyls (PCBs). Nord 11996:26 Copenhagen: Nordic Council of Ministers 1992.
28. Ahel M., Conrad J., Giger W. Persistent Organic Chemicals in sewage effluents.3: Determination of nonil carboxilic acids by higt resolution gas chromatography. Environ. Sci. Technolo 21:623-625, 1984.
29. Giger W., Brunnel P.H., Schaffner C. 4-nonilphenol in sewage sludge: acumulation of toxic from nonionic surfactants. Science 225:623-625, 1984.
30. Verdeal K., Ryan S. Naturally occurring estrogens in plants foodstuff. J. Food Prot 42: 577-583, 1979.
31. Kaldas R.S., Hughes G.L. Reproductive and general metabolic effects of phytoestrogens in mammals. Reprod Toxicol Rev. 3:81-89, 1989.
32. Sumpter J.P. Jobbling S. A variety of environmentally persistent chemicals, including some phtalate plasticizers, are weakly estrogenic. Environ. Health Perspec. 103:582-587, 1995.
33. Sumpter J.P., Routledge E. Structural Features of Alkylphenolic Chemicals Associated with estrogenic activity. J. Biol. Chem. 272:3280-3288, 1997.
34. Soto A.M., Sonnenschein C., The E-SCREEN Assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. Environ. Health Perspec 103:113-122, 1995.
35. Villalobos M., Olea N. The E-SCREEN Assay: A comparation of differet MCF-7 Cell Stocks. Environ. Health Perspec. 103:9-15, 1995.
36. Inai K., Aoki Y., Tumorigenicity study of butyl and isobutyl p-hidroxibenzoates administred orally to mice. Fd. Chem. Toxic 23:575-578, 1985.
37. Lemini C., Silva G. Timmosi C, Luque D., Valverde A., González Martínez M., Hernández A., Rubio-Poo C., Chávez Lara B., Valenzuela F., Estrogenic Effect of p-Hidroxybenzoic Acid in CD- 1 Mice . Environ. Research 75:130-134, 1997.
38. O'Connor J.C., Cook J.C. An in vivo battery for identifying endocrine modulators that are estrogenic or dopamine regulators. Fund. App. Toxicol. 33:183-195, 1996.
39. Endocrine Screening Methods Workshop; Chemicals Manufacturers Association, World Wildlife Fund. and USEPA. North Caroline, USA. Jul. 1996.
40. Reel J.R., Lamb J.C. Survey and Assessment of mammalian estrogen biological assay for

hazard characterization. *Fund. App. Tox.* 34:288-305, 1996.

41. Renne M.S., Soto A.M. A plasma -borne specific inhibitor of the proliferation of human estrogen-sensitive breast tumor cells (Estrocolyone-I). *J. Steroid. Biochem. Molec. Biol.* 43:703-712, 1992.
42. Soto A.M., Fernández M.F. Developing a Marker of exposure to xenoestrogen mixtures in human serum. *Environ. Health Perspec.* 105:647-654, 1997.
43. Muller F. Rolay. H. Nitroblue Tetrazolium reduction in monocytes and monocyte-derived macrophages. *AMPIS* 97:490-496, 1989.
44. Levitz S.M., Diamond R.D. A rapid Assay of fungal viability with the tetrazolium salt MTT. *J. Infec. Diss.* 152:938-945, 1985.
45. Soto A.M., Sonnenschein C. The role of estrogens on the proliferation of human breast tumor cells (MCF-7). *J. Steroids Biochem.* 23:87-94, 1985.
46. Davis J.M. *Basic Cell Culture, The Practical Approach Serie*, Great Britain, IRL, 1994.
47. Allen E., Doisy E.A. An ovarian hormone. *J. Am. Med. Assoc.* 81:819-821 (1923).