

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE  
MÉXICO



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.

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO

RECIBIDO EN  
BIBLIOTECA  
AJ 30  
173  
R152

FACULTAD DE QUÍMICA

"EFECTO ESTROGENICO DEL  
ACIDO P-HIDROXI BENZOICO  
EN RATON CD1"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO

P R E S E N T A

ALFREDO VALVERDE ARVIZU

ASESOR: M. EN C. CRISTINA LEMINI GUZMÁN

México, D. F.

2000



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUÍMICA

**Jurado asignado:**

|                      |                                            |
|----------------------|--------------------------------------------|
| <b>Presidente</b>    | <b>Prof. Ana María Vázquez Álvarez</b>     |
| <b>Vocal</b>         | <b>Prof. Elia Brosla Naranjo Rodríguez</b> |
| <b>Secretario</b>    | <b>Prof. Cristina Lemini Guzmán</b>        |
| <b>1er. Suplente</b> | <b>Prof. Pérez Severiano Francisca</b>     |
| <b>2o. Suplente</b>  | <b>Prof. Griselda Silva Leal</b>           |

**Sitio donde se desarrolló el tema:**

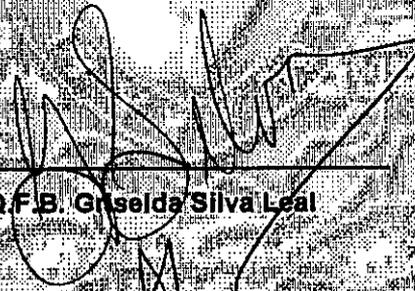
**Departamento de Farmacología  
Facultad de Medicina de la UNAM.**

**Asesor:**



**M. en C. Cristina Lemini Guzmán**

**Supervisor Técnico:**



**Q.F.B. Griselda Silva Leal**

**Sustentante:**



**Alfredo Valverde Arvizu**

**EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN LAS  
INSTALACIONES DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA  
DE LA FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNAM, BAJO LA  
DIRECCIÓN DE LA M. EN C. CRISTINA LEMINI GUZMÁN CON  
EL APOYO FINANCIERO DE LOS PROYECTOS DE DGAPA  
IN205396 Y CONACYT 2400PM**

## AGRADECIMIENTOS

A TANTOS MAESTROS VALIOSOS QUE CONOCÍ A LO LARGO DE MI CARRERA ACADÉMICA, ASÍ COMO A LAS ESCUELAS DONDE CURSE MI VIDA ESTUDIANTIL.

A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, DE LA CUAL ME SIENTO MUY ORGULLOSO DE SER EGRESADO.

A LA FACULTAD DE QUÍMICA, QUE ME DIO LA OPORTUNIDAD DE APRENDER Y VER CULMINADO MI ANHELO DE SER PROFESIONAL EN EL AREA QUÍMICO BIOLÓGICA Y ADEMÁS, CONOCER A TANTOS Y TAN BUENOS AMIGOS Y MAESTROS, CUYA CALIDAD HUMANA ENALTECEN A LA INSTITUCIÓN.

A MI ASESOR, LA M. EN C. CRISTINA LEMINI GUZMÁN, A QUIEN DEBO TANTO PARA PODER VER REALIZADO ESTE TRABAJO Y QUE SIN SUS CONSEJOS Y ESA FRASE QUE SIEMPRE ME DECÍA: "DEBES CULMINAR LO QUE EMPIEZAS"; NO LO HUBIERA LOGRADO.

A MI MAESTRA GRISELDA SILVA LEAL, A LA QUE DEBO EN GRAN MEDIDA TODO EL APOYO TÉCNICO PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO.

A MIS PADRES, ARTURO VALVERDE ZAVALA Y MA. MARTHA ARVIZU GUTIERREZ, POR QUE DEPOSITARON SU CONFIANZA EN MI Y ME DIERON LA OPORTUNIDAD DE CONTAR CON MAS ARMAS PARA ENFRENTARME A LA VIDA.

A MI ESPOSA KATYA MÉNDEZ PACHECO, DE QUIEN SOLO RECIBO MUESTRAS DE APOYO Y ALIENTO PARA SEGUIR ADELANTE.

A MI HIJO, ARTURO VALVERDE MÉNDEZ, A QUIEN SOLO CON VERLO ME MUESTRA LO HERMOSO QUE ES LA VIDA Y QUE MOTIVOS COMO EL , HACEN QUE CUALQUIER OBSTÁCULO SEA INSIGNIFICANTE..

A MI FUTURO BEBE, QUE ES LA CONSOLIDACIÓN DEL CARIÑO ENTRE MI FAMILIA Y QUE REPRESENTA NUEVAMENTE LA VALIOSA OPORTUNIDAD DE TRASCENDER FORMANDO HOMBRES DE BIEN.

A MIS HERMANOS, ALEJANDRO Y ALBERTO, A QUIENES LES TENGO UN GRAN CARIÑO Y QUE SIEMPRE ESTÁN CUANDO LOS NECESITO.

A MIS ABUELITAS, QUIENES SON CULPABLES EN GRAN MEDIDA DE QUE ESCRIBA ESTE TRABAJO.

A MI SUEGRA, GEORGINA PACHECO GONZÁLEZ Y A MIS CUÑADOS, ROGER Y TZEITEL, DE QUIENES RECIBO MUCHO APOYO.

A MIS AMIGOS, QUE ME ENSEÑAN LO IMPORTANTE QUE ES VIVIR COMPARTIENDO EN SOCIEDAD.

## **DEDICATORIAS**

♦POR QUE ES UNA FORTUNA SER SU HIJO A MI MAMA, MARTHA Y A MI PAPA. ARTURO:

CUANDO SE ES PADRE, SE OLVIDA UNO DE SU PERSONA PARA PODER PROVEER DE BIENESTAR A SUS HIJOS.

GRACIAS PAPAS POR SU AMOR Y APOYO EN TODAS LAS ETAPAS DE MI VIDA, GRACIAS POR ESTA OPORTUNIDAD; QUIERO QUE SEPAN QUE ESTE DOCUMENTO ES EN GRAN MEDIDA PROPIEDAD DE USTEDES, YA QUE ME ENSEÑARON QUE LO MÁS IMPORTANTE ES HACER LAS COSAS, PERO SIN OLVIDARSE DE LAS PERSONAS.

EN FIN, GRACIAS POR SER MIS PADRES.

♦A MI ESPOSA Y MIS HIJOS, YA QUE SON EL CENTRO DE MI VIDA Y MI GRAN RAZON PARA SEGUIR DE FRENTE.

♦A LA MAESTRA CRISTI, POR QUIEN SIENTO UN CARÍÑO MUY ESPECIAL, UN PROFUNDO RESPETO Y UNA GRAN ADMIRACIÓN, GRACIAS POR QUE NO ME DEJO OLVIDAR ESTE PASO FINAL.

♦A LA MAESTRA GRIS, POR QUE SU CARÍÑO Y CONSEJOS SIEMPRE ESTUVIERON PRESENTES, CLARO SIN OLVIDAR SU SINGULAR ALEGRIA PARA AFRONTAR LA VIDA.

A TODOS USTEDES, GRACIAS POR SU APOYO Y CONFIANZA.

**ALFREDO.**

## INDICE

|       |                                                                  |    |
|-------|------------------------------------------------------------------|----|
| I.    | PRÓLOGO                                                          | 1  |
| II.   | INTRODUCCIÓN                                                     |    |
|       | <i>i.</i> Regulación de Hormonas Gonadales                       | 3  |
|       | <i>ii.</i> Biosíntesis de Hormonas Gonadales                     | 5  |
|       | <i>iii.</i> Mecanismo de Acción de Estrógenos                    | 6  |
|       | <i>iv.</i> Evaluación de la Actividad Estrogénica <i>In Vivo</i> | 6  |
|       | <i>v.</i> Ciclo Reproductivo del Ratón                           | 7  |
|       | <i>vi.</i> Estrógenos Ambientales                                | 8  |
| III.  | PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS                           | 11 |
| IV.   | OBJETIVOS                                                        | 13 |
| V.    | MATERIAL Y MÉTODOS                                               | 14 |
| VI.   | RESULTADOS Y DISCUSIÓN                                           | 17 |
| VII.  | CONCLUSIONES                                                     | 20 |
| VIII. | BIBLIOGRAFÍA                                                     | 21 |
| IX.   | ANEXOS                                                           | 24 |

## I. PROLOGO

La diferenciación sexual, desarrollo embrionario, el control y mantenimiento de la función reproductiva en mamíferos son procesos cuya regulación está a cargo del eje hipotálamo-hipófisis-gónadas. Por estímulos externos el hipotálamo produce la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH), que estimula a la adenohipófisis liberando las hormonas; foliculo estimulante (FSH) y luteinizante (LH), las cuales estimulan la biosíntesis de los estrógenos, andrógenos y progestágenos en los tejidos blanco para ejercer su acción (1).

En años recientes se han encontrado numerosas sustancias de origen natural o sintético que pueden interferir con diferentes procesos endocrinos. Entre estos se encuentran una serie de compuestos que no tienen una relación estructural evidente con la de los estrógenos naturales, sin embargo, simulan los efectos producidos por  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ). También, pueden interferir en su biosíntesis y/o el metabolismo, y tienen la capacidad de unirse al receptor de estrógenos produciendo efectos agonistas o antagonistas (2).

Estas acciones dan como resultado que este grupo de fármacos puedan interferir con los procesos normales de reproducción. Algunos de ellos se encuentran presentes en el ambiente, formando parte de la contaminación ambiental por lo que se les denomina estrógenos ambientales (EA). En este grupo, están incluidos pesticidas como el DDT, herbicidas, bifenilos policlorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos, dioxinas y alquilfenoles (2-5).

La exposición crónica de EA sobre la ecología es un motivo de gran preocupación ya que EA como el DDT, algunos alquilfenoles y dioxinas, son compuestos bioacumulables y se han asociado con la aparición de anormalidades en el aparato reproductor de diversas especies de animales, que han conducido al deterioro de su reproducción, y están contribuyendo a su extinción. En el hombre la exposición ambiental de EA, se ha asociado a una mayor incidencia de anormalidades congénitas, disminución de la fertilidad y mayor frecuencia en la aparición de cáncer de mama, próstata y testículos (6-8)

Por otro parte, estudios recientes han mostrado que el ácido benzoico (AB), fármaco utilizado como conservador de alimentos, produce efectos estrogénicos en roedores (10). La potencia estrogénica relativa del AB con respecto al estradiol es muy baja, sin embargo este fármaco se utiliza en concentraciones del 0.1 al 1% (11).

El ácido p-hidroxibenzoico (APHB) es un derivado del AB que se ha descrito como producto metabólico de un grupo de compuestos que son utilizados ampliamente como conservadores y que se conocen como Pbens. Este compuesto contiene en su estructura química un anillo fenólico que en los estrógenos naturales ha sido reconocido como un factor de gran importancia en el inicio de la unión al receptor (12-13).

Debido a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar la actividad estrogénica del APHB mediante los métodos clásicos de cornificación vaginal de Allen-Doisy(14) y el incremento de peso uterino por administración de estrógenos descrito por Evans, Varney y Koch (15) en ratón hembra inmadura y adulta ovariectomizada (Ovx) CD1. Los resultados obtenidos indican que la administración de APHB en el ratón CD1, produce efectos de cornificación del epitelio vaginal y aumentos de peso uterino dosis-dependientes tanto en ratonas hembra infantiles como ratonas adultas ovariectomizadas, de lo que se infiere que el APHB posee actividad estrogénica.

Las implicaciones que estos datos pueden tener en el humano se desconocen en este momento y dependerán de numerosos factores, uno de gran importancia es el conocimiento de la farmacocinética de este grupo de sustancias y su relación con los efectos estrogénicos, así como de la exposición que se tenga a este grupo de fármacos.

## II. INTRODUCCIÓN

### i. Regulación de Hormonas Gonadales.

La periodicidad reproductiva observada en las hembras de los mamíferos son el resultado de una serie de cambios debidos a la producción de estrógenos y progestágenos que afectan la morfología, el control de la actividad metabólica del útero y otros tejidos sexuales accesorios. En los roedores, regulan aspectos de la conducta sexual y las actividades fisiológicas esenciales para la reproducción de la especie (1). Los cambios fisiológicos antes mencionados son regulados por hormonas secretadas por el eje hipotálamo-adenohipófisis-gónadas. La porción hipotalámica del cerebro es la fuente de la hormona liberadora de gonadotrofinas (GnRH) que pasan a través de la vena porta a la adenohipófisis, donde estimulan la liberación de la hormona foliculo estimulante (FSH) y de la hormona luteinizante (LH). La FSH actúa en los ovarios sobre las células de la granulosa y de los folículos; y LH en los testículos sobre las células de Sertoli y de Leydig, como se observa en al figura 1 (1).

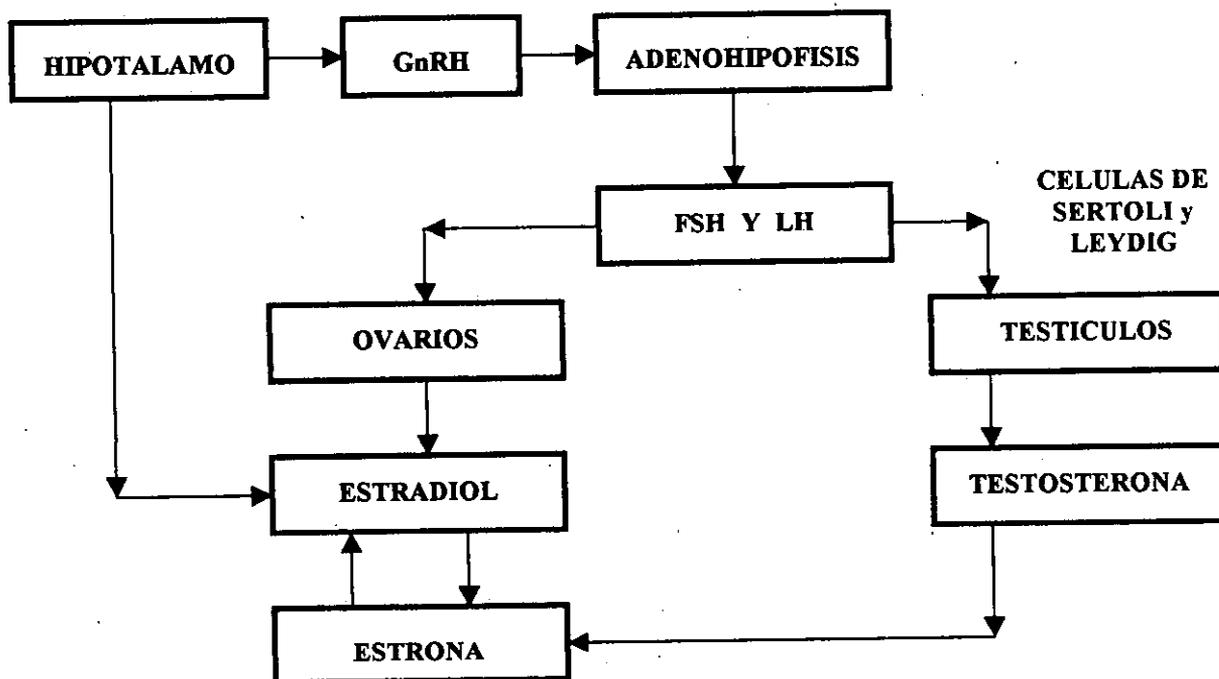


Figura 1. Control hormonal de la biosíntesis de estrógenos y andrógenos. (1)

En los ovarios, la LH se une a su receptor en células de la Teca, esta unión estimula la producción de adenosin 3',5'-monofosfato cíclico (cAMP) activando la biosíntesis de androstendiona y testosterona. Posteriormente estas difunden a la células de la granulosa, que en presencia de FSH, y cAMP conducen a la aromatización de los andrógenos a estrógenos, produciendo estrona y estradiol (figura 2).

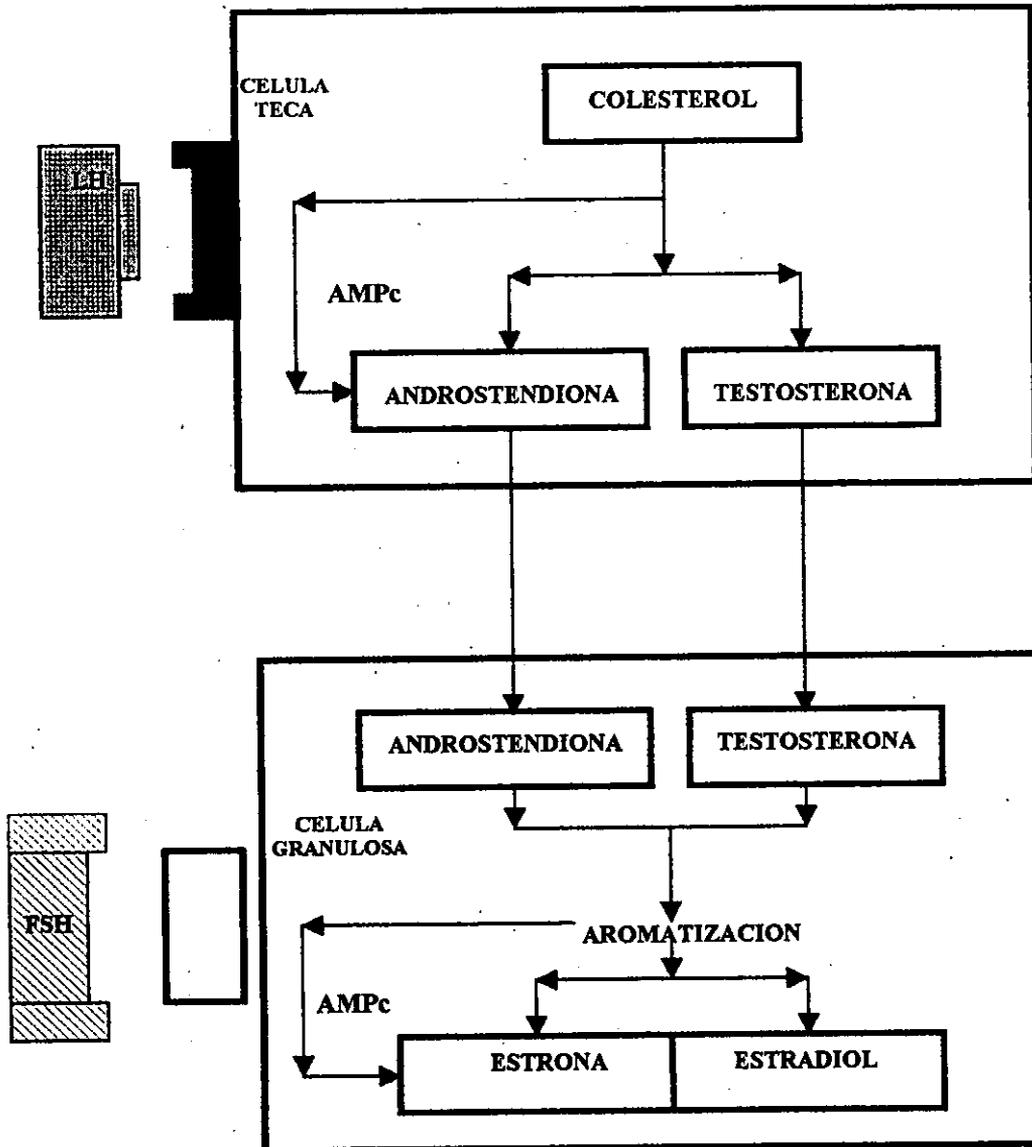


Figura 2. Biosíntesis de estrógenos y andrógenos en el ovario.(17)

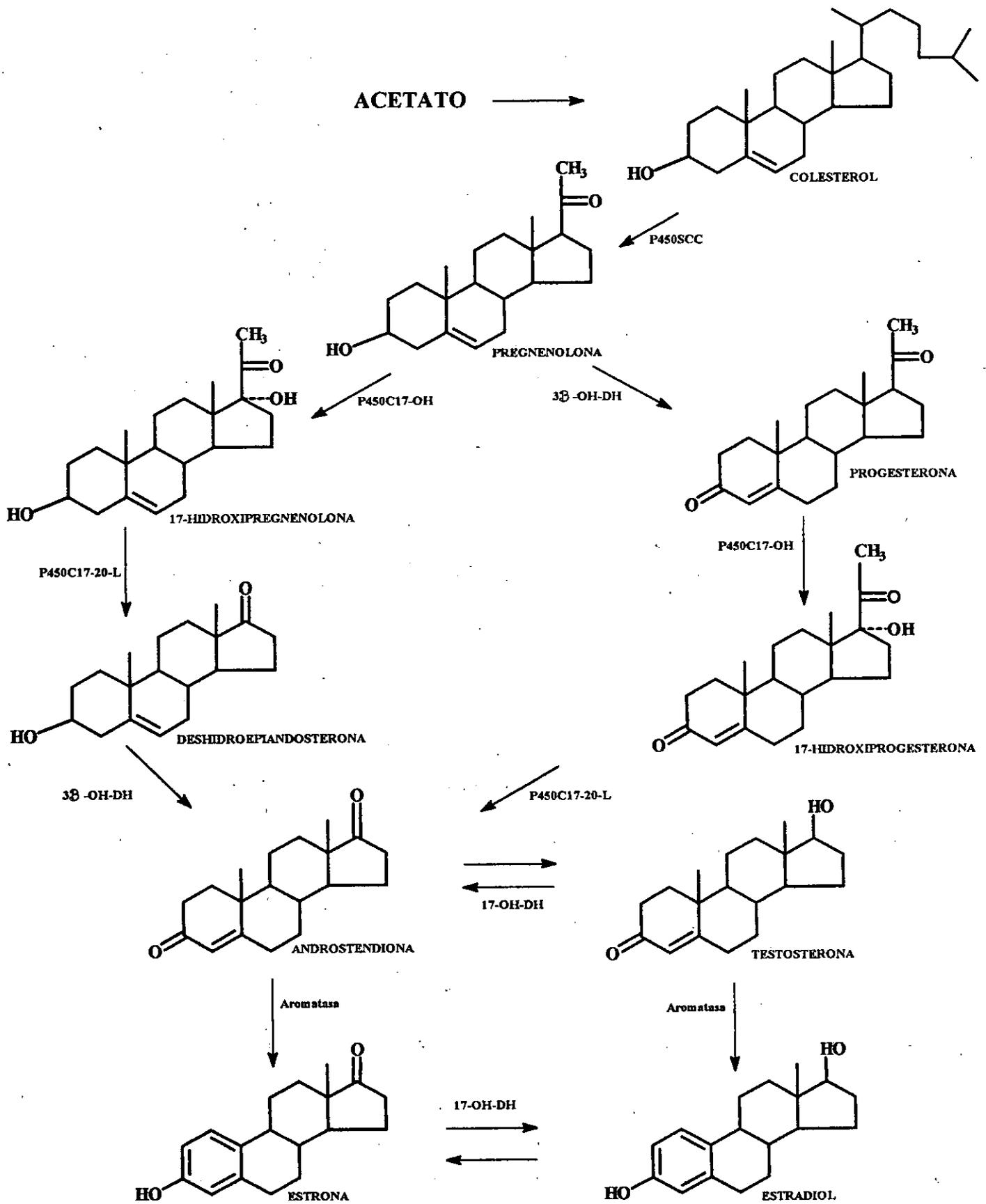


Figura 3. Biosíntesis de estrógenos y andrógenos (17).

La actividad hipotalámica es condicionada en gran parte por los estímulos del ambiente externo, y por la concentración de las hormonas sexuales de la circulación, que es modulada por un proceso de retroalimentación positiva o negativa. Los órganos sexuales accesorios y la mayor parte de los caracteres sexuales secundarios, así como la conducta sexual en animales están bajo control directo de la concentración de las hormonas gonadales, andrógenos, estrógenos y progestágenos (1, 17).

## **ii. Biosíntesis de Hormonas Gonadales**

Las hormonas esteroidales tienen como núcleo estructural al ciclopentano perhidrofenantreno. La biosíntesis de estas hormonas, tiene como precursor al colesterol, del cual se derivan las cinco clases diferentes de hormonas esteroides: andrógenos, estrógenos, progestágenos, glucocorticoides y mineralcorticoides (1, 17). Estas hormonas contienen de 18 a 21 átomos de carbono. En la primera etapa de su biosíntesis se lleva a cabo la eliminación de seis átomos de la cadena lateral del colesterol que conduce a la pregnenolona. En los procesos de formación de estas hormonas, participan un grupo de enzimas que forman parte de un complejo de oxidasas denominado citocromo P450 que se localizan en las mitocondrias o en el retículo endoplásmico.

La pregnenolona puede seguir dos rutas de biotransformación: la vía  $\Delta^5$ -3 $\beta$ -hidroxi, y la vía  $\Delta^4$ -3-cetona. En la primera ruta, se forma 17 $\alpha$ -hidroxipregnenolona y posteriormente dehidroepiandrosterona, ambas reacciones están catalizadas por el citocromo P450C17-hidroxilasa (P450C17-OH) y/o 17,20-liasa (P450C17-20L). En la segunda, la acción de la 3 $\beta$ -hidroxi dehidrogenasa (3 $\beta$ OHDH), sobre la pregnenolona, dá lugar a progesterona, que también bajo la influencia de P450C17-OH produce la 17 $\alpha$ -hidroxiprogesterona (1, 17).

Posteriormente, por un lado, la dehidroepiandrosterona, por acción de la  $3\beta$ OHDH y por otro lado la 17-hidroxiprogesterona, por acción de la P450C17-20L, producen la androstendiona que es transformada a testosterona. La androstendiona y la testosterona, se transforman en estrona y estradiol respectivamente, por acción de la P450 aromatasa (P450Ar). En la figura 3 se ilustra la secuencia de estas biotransformaciones (17).

### **iii. Mecanismo de Acción de Estrógenos**

Los órganos blanco para los estrógenos son: útero, vagina, glándula mamaria, adenohipófisis e hipotálamo, a los que se fijan de manera específica debido a la presencia de receptores proteicos intracelulares en estos tejidos. Su mecanismo de acción se ilustra en la figura 4 y consiste en la difusión simple del estrógeno a través de la membrana celular y su paso posterior a la membrana nuclear. En el núcleo se une al receptor de estrógenos, formando el complejo hormona receptor que interacciona con elementos de respuesta (ER) específicos de estrógenos en el DNA. Estos eventos dan como consecuencia la síntesis de RNA mensajero, el cual se transporta hacia los ribosomas y estimula la síntesis de proteínas que da como resultado la activación celular específica (1).

### **iv. Evaluación de la Actividad Estrogénica "in vivo"**

La evaluación de la actividad estrogénica "*In Vivo*" es indispensable cuando se sospecha o se tienen evidencias de experimentos "*In Vitro*" de producción de efectos estrogénicos de alguna sustancia. Un modelo ampliamente reconocido para la evaluación de actividad estrogénica es el desarrollado por Allen y Doisy (14) que consiste en la extirpación quirúrgica de los ovarios en la rata produciendo atrofia del útero por la carencia de producción de estrógenos endógenos. Este modelo permite llevar a cabo la terapia de sustitución con la administración (exógena) de  $E_2$  que restaura las funciones gonadales. Así mismo permite comparar los efectos producidos por  $E_2$  con el producido por otras sustancias de las que se sospeche puedan tener efecto estrogénico. El modelo de Allen-Doisy utiliza como parámetro de evaluación, los cambios histológicos que se presentan durante el ciclo reproductivo que pueden detectarse en el exudado vaginal de los roedores.

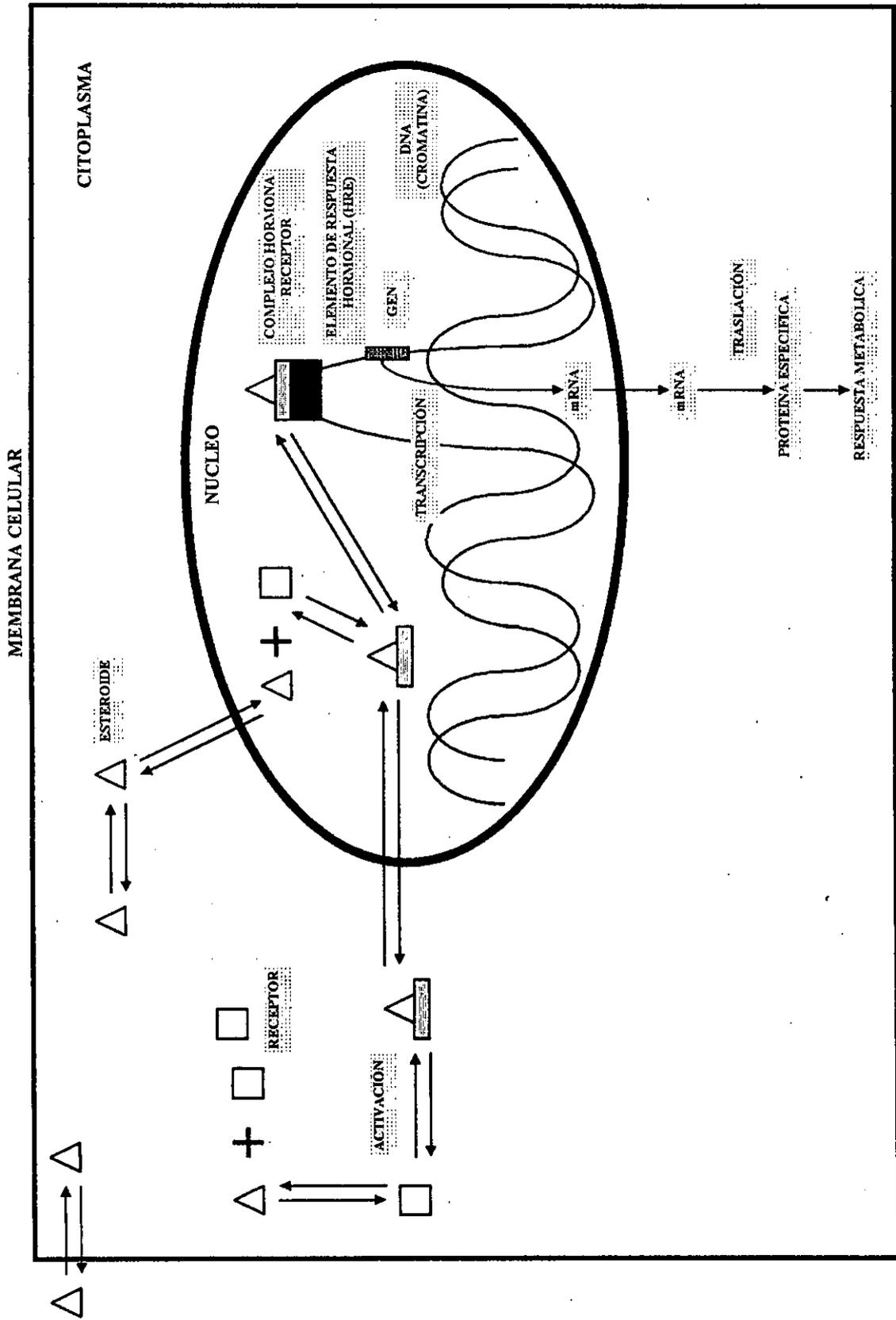


Figura 4. Modelo general de acción estrogénica. La hormona se enlaza con un receptor intracelular en el citoplasma o en el núcleo y causa un cambio conformational. El complejo hormona receptor se une a una región específica del DNA denominado elemento de respuesta hormonal (HRE). Esta interacción da como resultado la activación o represión de un restringido número de genes (17).

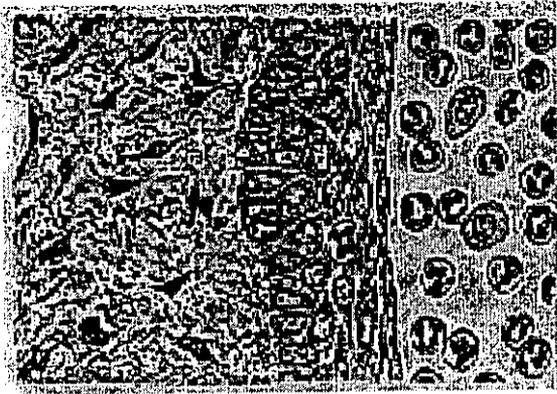
## v. **Ciclo Reproductivo del Ratón.**

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

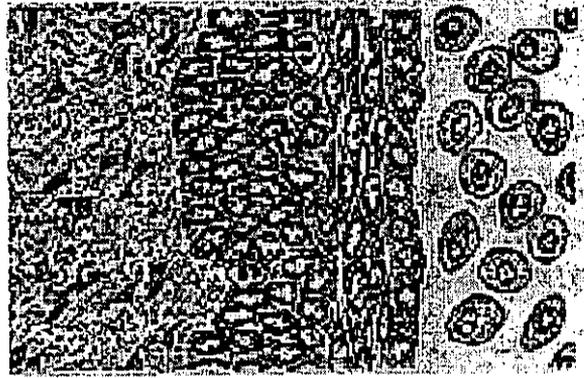
Durante el desarrollo se producen cambios cíclicos en las hembras que culminan en el estro, fase de la ovulación donde se presenta la receptividad sexual al macho y con ello la fecundación. Se denomina ciclo estral al período que transcurre entre dos estadios de estro cuya duración es variable dependiendo de la especie. El ciclo estral de los roedores se divide de manera general en cuatro fases, las cuales tienen características citológicas, histológicas y conductuales bien definidas. Estas son: estro, metaestro, diestro y proestro. A continuación se describirán estas fases tratando solo las características más relevantes del estadio (16).

**Estro:** se caracteriza como la fase de receptividad sexual y en la que ocurre la ovulación. Los cambios conductuales comprenden: vibración de las orejas, lordosis o arqueo en respuesta al manejo o al aproximarse el macho. En esta etapa el ovario presenta folículos maduros, debido a la acción de la FSH que incrementa su concentración y estimula la producción de estrógenos. En el endometrio aumenta la proliferación glandular, el útero aumenta de tamaño y se distiende debido a la acumulación del líquido intraluminal. Se presenta aumento de mitosis en la mucosa vaginal, y a medida que se acumulan nuevas células las capas superficiales se queratinizan, volviéndose escamosas y cornificadas (figura 5A).

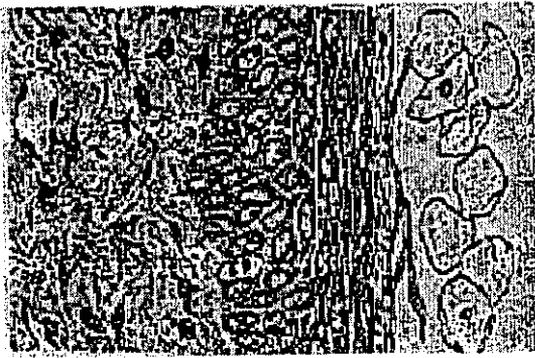
**Metaestro:** se presenta poco después de la ovulación, en esta fase ya no se presenta receptividad sexual. Se caracteriza por desarrollo del cuerpo lúteo y pequeños folículos, el ovario, empieza a secretar progesterona por influencia de la LH, y los niveles de estrógenos disminuyen. También disminuye la vascularización y contractilidad del útero, aparecen leucocitos en la luz vaginal junto con unas cuantas células cornificadas, esta fase es distinguible también por que además se secreta mucina, la cual da un aspecto sucio a las preparaciones de exudado vaginal (figura 5B).



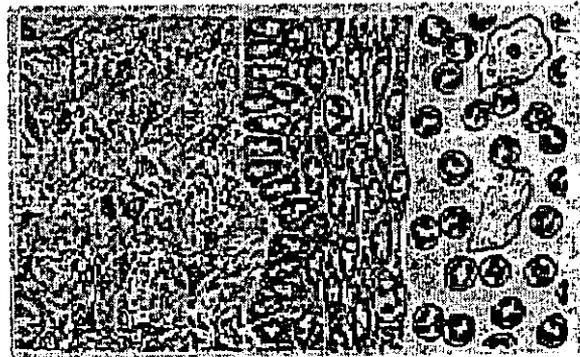
A



B



C



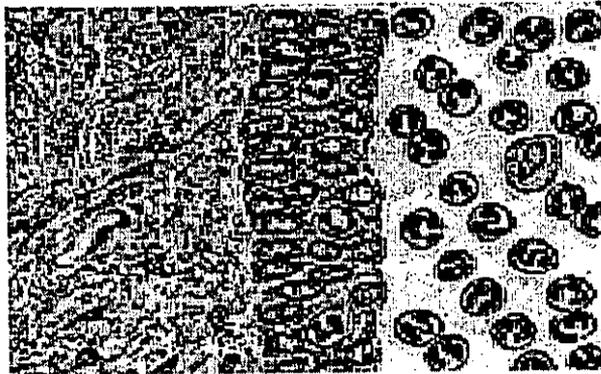
D

Porcion de la pared vaginal

Estroma

Epitelio

Tipos de células presentes en el lumen vaginal.



E

Figura 5.- Ciclo Reproductivo del Ratón

**Diestro:** durante esta fase también se rechaza al macho, frecuentemente se le clasifica como fase del cuerpo amarillo, predomina la influencia de la progesterona sobre las estructuras sexuales accesorias, los niveles de estrógenos disminuyen notablemente. En el ovario se encuentran uno o más cuerpos amarillos. Los úteros son pequeños y levemente contráctiles. La mucosa vaginal es delgada y los leucocitos migran a través de ella, dando al frotis una imagen que consiste casi en su totalidad de este tipo de células. Al finalizar esta etapa, los niveles de estradiol y progesterona disminuyen considerablemente (figura 5C).

**Proestro:** fase en la que la hembra empieza a tener receptividad al macho. Esta antecede a la ovulación. En el ovario se inicia la maduración de los folículos, el endometrio inicia la proliferación glandular, los niveles de progesterona disminuyen, la liberación de la FSH estimula el crecimiento del folículo y los niveles de estrógenos se elevan. Aumenta la retención de líquido en los úteros y su contractilidad. El frotis vaginal se caracteriza por la presencia de células redondas nucleadas (figura 5D).

Otro modelo utilizado para evaluar la actividad estrogénica es el desarrollado por Evans Varney y Koch (15) que se basa en el efecto uterotrópico que produce el E<sub>2</sub> en roedores cuando estos son tratados con estrógenos. Este método puede ser utilizado tanto en animales adultos como en animales inmaduros y constituye un parámetro muy confiable para evaluar estrogénicidad.

#### **vi. Estrógenos Ambientales**

En los últimos 50 años con el advenimiento de la era industrial, ha habido un incremento considerable de la producción de compuestos químicos que son liberados después de su utilización al ambiente, esto ha conducido a un desequilibrio ecológico y está contribuyendo de manera importante a la extinción de un gran número de especies (18).

Los contaminantes ambientales se encuentran de manera casi constante en cualquier ecosistema, algunos tienen la propiedad de bioacumularse produciendo efectos fisiológicos sobre los sistemas inmunológico, cardiovascular, y endocrino entre otros. Sus efectos sobre el sistema endocrino pueden producir interferencia con los procesos normales de reproducción y como consecuencia en el desarrollo de algunas especies animales y del hombre (18).

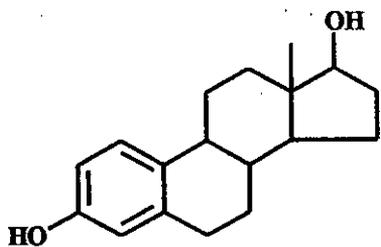
Entre los contaminantes del ambiente se encuentra un grupo de sustancias a las cuales se les ha denominado simuladores hormonales o estrógenos ambientales (EA).

Estos productos son de origen natural o sintético de estructura química muy diversa que no guarda relación aparente con las hormonas naturales, sin embargo, poseen actividad estrogénica (figura 6). Los EA tienen la capacidad de unirse al receptor del estradiol, y de esta manera simular o bloquear los efectos de los estrógenos naturales produciendo efectos agonistas o antagonistas estrogénicos (19). Por otra parte también pueden interferir en algún paso de la biosíntesis o interferir con el metabolismo de los estrógenos naturales (20-23).

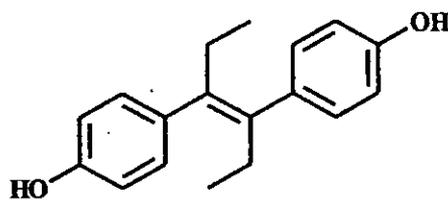
Algunos ejemplos de ellos son el DDT, policlorobencenos (PCBs), dioxinas, p-alquilfenoles y dietilestilbestrol (DEB) de los que dada su importancia describiremos a continuación.

Se estima que se ha liberado en el ambiente cerca de 100 millones de Kg de DDT. Este fármaco produce efectos estrogénicos en mamíferos, aves, y reptiles (2, 3). Tanto el DDT como su producto de biotransformación el DDE se unen al receptor de estrógenos, y producen inhibición de su biosíntesis (4-7). La exposición a estos fármacos en aves, reptiles y mamíferos se ha relacionado con infertilidad y efectos carcinogénicos (8).

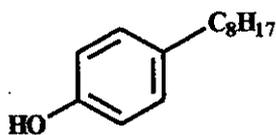
Los PCBs son compuestos relacionados estructuralmente con el DDT, que fueron utilizados entre 1929 y 1977, en la producción de plásticos, resinas, pinturas, pegamentos, jabones y cosméticos, años en los cuales se calcula que hubo una producción de 540,000 toneladas, de las cuales se estima que más de la mitad se encuentra en el ambiente (3, 8). En algunas especies de



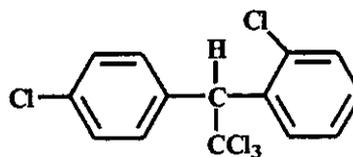
17β-Estradiol



Dieldrin (DDE)

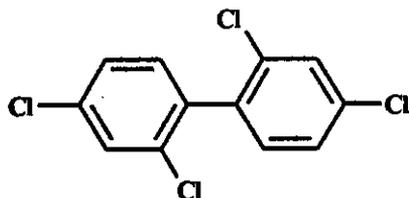


Octilfenol

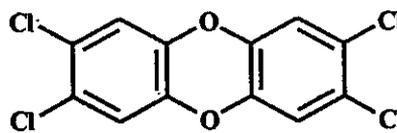


Diclorodifeniltricloroetano

o, p-DDT



Bifenilos policlorados



Dioxinas

Figura 6. Estructura de algunos estrógenos ambientales (18).

aves en extinción como; águilas, pelicanos, cuervos, gaviotas y golondrinas que han sido estudiadas se han detectado PCBs en sus huevos cuyos productos hembras y machos son estériles (8).

Las dioxinas son sustancias que tienen propiedades herbicidas potentes y de alta toxicidad y carcinogenicidad. La administración prenatal de dioxinas en roedores produce en las crías macho reducción en el peso testicular, de la cuenta espermática, y del número de células de Sertoli, también se manifiesta con mayor frecuencia criptorquidia (8).

Otro compuesto muy importante debido al amplio uso que se le dio entre 1945 y 1971, para prevenir el aborto en el primer trimestre del embarazo, es el dietilestilbestrol (DEB). Se calcula que entre 1 y 4.5 millones de niños y niñas nacidos en estos años estuvieron expuestos al DEB en el útero. Sus efectos no fueron evidentes en los recién nacidos, sin embargo en la vida adulta, estos presentaron trastornos el tracto reproductor. En mujeres adolescentes que habían sido expuestas prenatalmente al DEB se observó un aumento de casos raros de adenocarcinoma cervical. En los varones, pudo observarse disminución de la fertilidad, anormalidades en la cantidad y calidad del espermatozoide, así como, un incremento en la frecuencia de quistes epididimales y criptorquidia (8, 18). En las madres no se encontró correlación de su uso y cáncer de útero o mama, siendo el feto más sensible a los efectos dañinos del DEB.

Son de particular interés los hallazgos recientes de la actividad estrogénica que pueden producir los alquil fenoles. Este grupo de EA provienen de la degradación de detergentes, que finalmente llegan a los ríos y lagos en concentraciones altas. Sin embargo, estudios recientes realizados por Sumpter en Inglaterra han demostrado la presencia de un grupo de alquilfenoles, entre los cuales el octilfenol y el nonilfenol produjeron efectos estrogénicos en peces, ranas y roedores (5, 21-23).

Experimentos *In Vitro* han demostrado que el octilfenol es capaz de competir con el E<sub>2</sub> por su receptor; produce un aumento en el crecimiento de células tumorales de mama y aumenta la transcripción de células tumorales MCF-7, línea celular cuyo crecimiento es dependiente de estrógenos (5, 23, 24).

### III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA E HIPÓTESIS

Los hallazgos anteriores han dado como resultado que se incremente la investigación dirigida a la detección de sustancias con actividad estrogénica que estén presentes en el ambiente o bien sustancias a las cuales estemos expuestos de manera constante con el objeto de alertar el posible riesgo de que interfieran con el desarrollo y reproducción de animales y humanos.

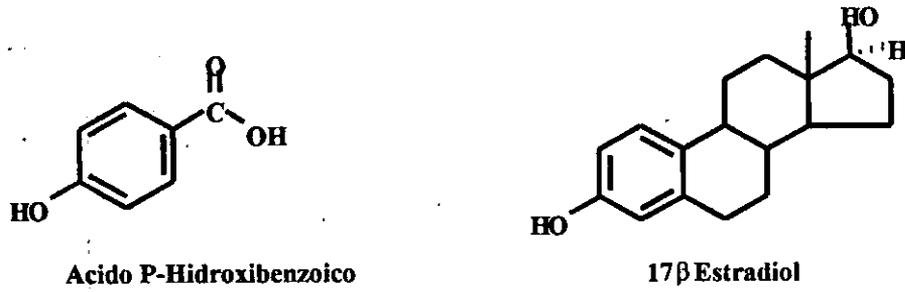
Una de las características comunes del grupo de sustancias consideradas como EA es su alta liposolubilidad, por lo que se acumulan en tejido adiposo tanto de animales como de humanos permaneciendo por periodos prolongados. Su excreción es lenta sin embargo, se favorece durante la lactancia encontrándose en la leche materna, lo que constituye un motivo de gran preocupación ya que diversos estudios muestran que estas sustancias pueden interferir en los procesos de reproducción de roedores, aves, peces, monos y el humano (18).

En estudios recientes, se encontró que la administración de ácido benzoico (AB) produjo efectos estrogénicos débiles en roedores. Este fármaco se utiliza de manera muy frecuente como conservador, principalmente en alimentos, debido a sus propiedades antibacterianas y antifúngicas (11).

Por otra parte aunque se conoce desde los años 30 que compuestos fenólicos son capaces de producir efectos estrogénicos en roedores, en los últimos años se han incrementado los estudios de relación estructura-actividad estrogénica basados en datos de cristalografía de rayos X y modelos moleculares en los que se señala la importancia del anillo aromático fenólico del estradiol como un requisito inicial para su unión al receptor y producción de los cambios conformacionales de eventos que desencadenen la respuesta estrogénica (12-13).

El ácido p-hidroxibenzoico (APHB) contiene en su estructura química un hidroxilo en posición para, que guarda una relación estructural con el E<sub>2</sub> (figura 7) lo que condujo a pensar que el APHB puede tener actividad estrogénica. Este fármaco es producto de biotransformación de un grupo de sustancias que se emplean ampliamente como conservadores de cosméticos, productos

farmacéuticos y de alimentos, conocidos como parabenos (Pbens) por lo que su evaluación estrogénica es de gran importancia (25-27).



**Figura 7. Estructuras de ácido p-hidroxi benzoico y estradiol**

#### **IV. OBJETIVOS**

Evaluar el efecto estrogénico del ácido p-hidroxibenzoico (APHB) en experimentos in vivo utilizando ratones hembra CD1 adultas Ovx e inmaduras.

Evaluar los efectos producidos por la administración de diferentes dosis de APHB en ratón hembra inmadura sobre cornificación vaginal y peso uterino.

Evaluar los efectos producidos por la administración de diferentes dosis de APHB en ratón hembra adulta Ovx sobre cornificación vaginal y peso uterino.

Calcular la potencia estrogénica del APHB relativa al estradiol.

## V. MATERIAL Y MÉTODOS

**Fármacos y Disolventes.** Las sustancias utilizadas en los experimentos, fueron: estradiol (3-hidroxi-estra-1,3,5(10)trien-3,17 $\beta$ -diol, E<sub>2</sub>) obtenido de Syntex, S.A. México D.F. y ácido p-hidroxibenzoico (APHB). Este último fue preparado mediante hidrólisis básica del éster metílico del ácido p-hidroxibenzoico las constantes físicas y espectroscópicas del producto obtenido fueron comparadas con las descritas en la literatura y también con una muestra auténtica proveniente de Sigma Chemical Company, St. Louis, MO, USA. Todos los compuestos fueron solubilizados en aceite de maíz Mazola que fue utilizado como vehículo (V).

**Animales.** Los experimentos se llevaron a cabo en ratones hembra inmaduras de 20 días de nacidas, con peso de 9-12g y ratones hembra adulta de 25-30g de la cepa CD1 procedentes del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Los ratones hembra adultas fueron ovariectomizadas (OVx) tres semanas antes de iniciar el estudio. A los animales OvX se les tomaron muestras de exudados vaginales para certificar la intervención quirúrgica antes de iniciar el tratamiento. Los animales fueron mantenidos a temperatura constante de 20-22° en períodos de luz-oscuridad de 12h-12h y se alimentaron con nutricubos de la marca Purina y agua *ad libitum*. Los animales fueron marcados de manera individual para su identificación, mediante pequeñas muescas hechas en el borde de las orejas siguiendo la clave empleada en el laboratorio.

**Diseño Experimental.** La actividad estrogénica del APHB fue evaluada por los métodos de cornificación vaginal de Allen-Doisy (23) y peso uterino de Evans, Varney y Koch (24). En cada bioensayo, cinco grupos de animales con un mínimo de 6 animales por lote se distribuyeron en base a un arreglo de cuadrados latinos, en estratos basados en el peso corporal y se asignaron a los diferentes tratamientos al azar.

En experimentos preliminares, cinco grupos de ratonas OvX fueron inyectados por vía subcutánea diariamente por tres días, con: el vehículo (aceite de maíz, V, 10 ml/Kg), E<sub>2</sub> (10 $\mu$ g/Kg) y APHB en diferentes dosis (5, 50, 500  $\mu$ g/Kg). Los exudados vaginales fueron obtenidos en los días 0 (antes del tratamiento) y los días 1, 2, 3 y 4 después del tratamiento.

En experimentos posteriores, a los diferentes grupos se les administraron por vía subcutánea, durante tres días consecutivos: APHB en dosis de 50, 500 y 5000  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso corporal/día, el control positivo estradiol  $\text{E}_2$ , 10  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso corporal/día y el vehículo aceite de maíz (V), 10 ml/Kg de peso corporal/día. Al cuarto día se tomaron muestras de exudado vaginal, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical, removiendo los úteros, eliminando el líquido intraluminal y pesándolos. Los exudados vaginales fueron teñidos y fijados con solución de Harris y las preparaciones observadas al microscópio. La abundancia de células redondas anucleadas, poligonales, cornificadas, y leuco citos en los frotis se evaluó en escala de +1,+2,+3,+4; posteriormente, estos resultados se expresaron en porcentaje. Los resultados del peso uterino fueron calculados por 100g de peso corporal.

**Análisis Estadístico.** Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y pruebas de comparaciones múltiples utilizando los métodos de Student-Newman-Keuls o Dunnet. Se consideraron diferencias significativas entre los grupos cuando los valores de P fueron menores de 0.05 (29)

#### **Técnicas Utilizadas en los Experimentos.**

**Ovariectomía.** Esta intervención quirúrgica se llevó a cabo en ratonas hembra adultas en las que se indujo la anestesia con hidrato de cloral (7mg/Kg; solución al 4%). Posteriormente se rasuró y desinfectó el campo quirúrgico del dorso del animal. Se hizo una incisión transversal de aproximadamente 1 cm y una segunda incisión bilateral longitudinal en el músculo, a una distancia aproximada de 0.5 cm de los músculos espinales dentro de la cavidad peritoneal. Se localizaron los ovarios en el tejido graso, procediendo a su disección. Se suturó en los diferentes planos. Los animales se dejaron recuperar por tres semanas, después de las cuales se tomaron frotis vaginales para certificar la intervención quirúrgica. Solo fueron incluidos en los experimentos animales que presentaban abundancia de leucocitos y escasas de células cornificadas (figura 5).

**Frotis Vaginal.** El frotis vaginal se tomó en las ratonas Ovx antes de iniciar el experimento, en experimentos iniciales durante el tratamiento y en todos los casos al término de éste. En las ratonas infantiles solo se tomó al finalizar el tratamiento.

Para la obtención del exudado vaginal o frotis vaginal, se sujetó al ratón y se introdujo en el orificio vaginal una asa estéril impregnada de solución salina, posteriormente la muestra impregnada del exudado vaginal se depositó sobre un portaobjetos, y dejó secar para proceder a la tinción de la muestra empleando el procedimiento de Harris (10). Los frotis se observaron en el microscopio, realizando un barrido del portaobjetos en forma "s" para evaluar la abundancia relativa de células cornificadas, poligonales, redondas y leucocitos presentes en la muestra empleando una escala de +1 a +4.

**Técnica de Tinción de Harris.** La muestra de exudado vaginal obtenida anteriormente se procesó de la manera siguiente:

- 1) Sumergió en alcohol de 96° durante 10 minutos;
- 2) lavó con agua destilada;
- 3) sumergió en solución de hematoxilina durante 8 min;
- 4) lavó con agua destilada;
- 5) pasó rápidamente por alcohol ácido;
- 6) lavó con agua destilada;
- 7) sumergió en agua amoniacal hasta que la preparación viró a un color azul;
- 8) sumergió en eosina alcohólica de 30 a 60 segundos;
- 9) sumergió en alcohol de 96° durante 10 segundos;
- 10) sumergió en alcohol absoluto aproximadamente durante 10 segundos;
- 11) dejó secar al aire;
- 12) observó en el microscopio a 40X y evaluó.

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

## VII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### **Curso temporal de la producción de cornificación vaginal en animales Ovx por la administración de E<sub>2</sub> y APHB.**

En la grafica 1, se ilustra la evolución de la producción de cornificación vaginal por la administración diaria de diferentes dosis de APHB comparada con los efectos producidos por E<sub>2</sub> y el vehículo (aceite de maíz, V) en el ratón hembra Ovx. Cuando se administran dosis de 5 y 50µg/Kg/día aumenta la producción de células cornificadas en el epitelio vaginal de la ratona castrada sin embargo, la administración de 500µg/Kg/día de APHB produce diferencias mayores que son estadísticamente significativas ( $p < 0.05$ ). Las respuestas de cornificación vaginal producidas por el APHB son dependientes de la dosis administrada como se observa en la grafica 1 y la tabla 1.

Por otra parte, la administración de 10µg/Kg/día de E<sub>2</sub> produce un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) de células cornificadas desde el segundo día de administración. El APHB produce estos efectos en la cornificación vaginal después de tres días de la administración de 500µg/Kg/día. En las gráficas de la figura 1 puede apreciarse claramente que el patrón de respuesta observado con el APHB es semejante al del E<sub>2</sub>.

Es interesante ver la relación que existe entre los leucocitos y las células cornificadas en los animales administrados con APHB y E<sub>2</sub> ya que a medida que se aumentan los días de administración tanto en los frotis de los animales tratados con E<sub>2</sub> como en los que recibieron APHB se produce una disminución de leucocitos y un aumento de células cornificadas, que está en función de la dosis administrada (5, 50 y 500µg/Kg/día). La respuesta producida por la dosis de 500µg/Kg/día de APHB y la de E<sub>2</sub>, tienen un comportamiento semejante. En el tercer día, muestran una caída considerable de la cantidad de leucocitos presentes y un gran aumento en la cantidad de células cornificadas. Este fenómeno representa un estadio de estro en los animales tratados, que se caracteriza por abundancia de células cornificadas, y que solo ocurre cuando hay estrógenos presentes.

Los efectos mencionados anteriormente contrastan con los producidos por la administración del vehículo en los animales Ovx, ya que durante todo el seguimiento de este experimento no se presentó un aumento significativo de células cornificadas.

### **Curvas Dosis-Efecto de APHB en Animales Inmaduros (I) y Ovariectomizados Ovx.**

En la gráfica 2 se muestran la comparación de los resultados obtenidos de diferentes experimentos en los que fueron administradas diferentes dosis de APHB y una sola dosis de E<sub>2</sub> en animales inmaduros y Ovx. La administración de 5000 µg/Kg de APHB, produjo cornificación vaginal en el 85% de los animales inmaduros y 60% de los animales Ovx. Estos resultados son muy cercanos a los obtenidos con E<sub>2</sub> el cual produjo cornificación vaginal en un 89% de los animales OVx y 72% en inmaduros. En todos los casos estas diferencias fueron estadísticamente significativas (p<0.01). Los datos señalados se muestran en las tablas 2 y 3.

### **Evaluación del efecto de la administración de APHB comparado con el efecto producido por E<sub>2</sub> en el peso uterino de animales inmaduros y animales Ovx.**

La evaluación del peso uterino se llevó a cabo al final de todos los experimentos. En la gráfica 3, se muestran las curvas dosis-efecto, en las que se presentan los resultados de la administración de APHB a diferentes dosis, E<sub>2</sub> y el grupo control. Estos resultados se muestran en las tablas 4 y 5.

De manera semejante al efecto de cornificación vaginal producido por APHB y E<sub>2</sub> se observaron diferencias significativas (p<0.01) en el peso uterino cuando se administró la dosis más alta de APHB (5000µg/Kg/día). Estas diferencias fueron establecidas comparando el promedio del peso uterino del vehículo administrado con los promedios de los animales bajo tratamiento. En los animales Ovx tratados con APHB el peso uterino se incremento en un 83% y en los animales inmaduros el incremento fue de 107%. El E<sub>2</sub> dio una respuesta de 134% en animales Ovx y 110% en animales inmaduros.

El aumento en el peso uterino, fue dosis dependiente y como se ve en la gráfica 3, la respuesta de la dosis más alta en animal inmaduro es prácticamente igual a la del E<sub>2</sub>. En estos experimentos se observaron incrementos en el peso uterino por la administración de las dosis de 50 y 500 µg/Kg/día tanto en animales inmaduros como en Ovx, sin embargo, el análisis de estos datos señala que estas diferencias no fueron significativas.

Los efectos observados por la administración de APHB muestran que este fármaco es capaz de producir respuestas semejantes a las producidas por E<sub>2</sub>. Esto probablemente sea debido a que este compuesto se una al receptor de E<sub>2</sub> y produzca los cambios alostéricos necesarios para su activación desencadenando los eventos que conduzcan a la proliferación del endometrio. Estos resultados están de acuerdo a los recientemente obtenidos por otros grupos de investigación (5, 12-13) que señalan que compuestos que contengan grupos fenólicos como substituyentes en posición para, pueden tener la capacidad de generar respuestas semejantes al E<sub>2</sub>.

**ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

## VIII. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos en este trabajo podemos concluir que el APHB produce efectos estrogénicos en ratones hembra adulta e inmadura CD1. Estos efectos son dependientes de la dosis administrada.

La respuesta estrogénica de: cornificación vaginal y aumento de peso uterino que se producen por la administración de dosis altas de APHB en animales inmaduros es semejante y muy cercana a la que produce el  $E_2$ . De forma similar la administración de APHB en ratonas adultas Ovx produce los mismos efectos estrogénicos.

La potencia estrogénica relativa del APHB con respecto al  $E_2$  es de 100 a 0.1 esto significa una potencia de estrogénicidad mil veces menor que la de  $E_2$ . Sin embargo, aunque su efecto estrogénico es menor, es un metabolito de sustancias que se usan en concentraciones hasta del 0.1 %.

El significado que estos resultados tengan en ejercer sus efectos en animales y humanos dependerá de la exposición que se tenga a este grupo de fármacos. Es necesario conocer el efecto que estas sustancias pueden producir por otras vías de administración, así como conocer su farmacocinética para poder estimar el riesgo que implica estar constantemente expuestos a ellos.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

1. Goodman and Gilman's. The pharmacological basis of therapeutics. 1996. 9a. edición. Goodman Gilman A., (eds) en: Estrogens and progestins pp 1411-1440. McGraw-Hill, new York.
2. Bitman, J. and Cecil, H.C.: Estrogenic activity of DDT analogs and polychlorinated biphenyls. *J. Agr. Food Chem.* 18:1108-1112, 1970.
3. Nelson, J.A., Struck R.F. and James, R.: Estrogenic activities of chlorinated hydrocarbons. *J. Toxicol. Environ. Health* 4:325-339, 1978.
4. Hertz, R.: The estrogen problem-retrospect and prospect. In: Estrogens in the Environment II (McLachlan J.A. ed) New York, Elsevier, 1-11, 1985.
5. White, R., Jobling, S., Hoare, S.A., Sumpter, J.P., and Parker, M.G.: Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic. *Endocrinology*, 135:175-182, 1994.
6. Sharpe, R.M. and Skakkeback, N.E.: Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet*, 1:1392-1395, 1993.
7. Henderson, B.E. Ross, R.K. and Pike, M.C.: Towards the primary prevention of cancer. *Science* 254:1131-1138, 1991.
8. Hileman, B. and Washington E.N.: Environmental estrogens linked to reproductive abnormalities, cancer. *Chem Eng. News*, Enero, 19-23, 1994.
9. Heuze, Y., Lemini, C. and Perusquia, M.: Stimulation of female sex behavior in rats with benzoic acid. *Abst. International Conference on Hormones*, 1994.
10. Lemini, C., Silva, G., Rubio-Póo, C. and Perusquia, M.: Uterotrophic activity of benzoic acid as compared with estradiol and estradiol benzoate in CD1 mice. *Med. Sci. Res.* 23:257-258, 1995.
11. Martindale. The Extra Pharmacopoeia. 1989. 29a. edition. In: Reynolds, E.P., Prfitt, K., K. Parsons, A.V. and Sweedman, S.C. (eds). Preservatives pp 1355-1358. The Pharmaceutical Press, London.
12. Jordan, VC., Mittall, S., Gosden, R.K. and Liberman, M.E.: Structure-activity relationships of estrogens. *Environ. Health Perspect.* 61:97-110, 1985.
13. Duax, W.L., Griffin, J.F., Weeks, C.M. and Korach, K.S.: Molecular conformation, receptor binding, and hormone action of natural and synthetic estrogens and antiestrogens. *Environ. Health Perspect.* 61:111-121, 1985.

14. Allen, E., and Doisy, E.A.: An ovarian hormone. *J. Am. Med. Assoc.* 81:819-821, 1923.
15. Evans, J.S., Varney, R.F., and Koch, F.C.: The mouse uterine weight method for assay of estrogens. *Endocrinology* 28: 747-752, 1941.
16. Zarrow, M.X., Yochim, J. M., McCarthy, J.L. and Sanborn, R.C., en: *Experimental Endocrinology a sourcebook of basic techniques*. En: *The estrogens* p 28-30 Academic Press New York and London 1964.
17. Bowman, W.C. y Rand, M.J. 1984. en: *Farmacología. bases bioquímicas y patológicas. Aplicaciones clínicas*. Bowman, W.C., y Rand, M.J. (eds). en: *sistema reproductor y drogas que lo afectan*. pp 20.1-20.52. Editorial Interamericana, Barcelona, España.
18. Colborn, T. and Clement, C. (ed) In: *Chemically-induced alterations in sexual and funcional development. the wildlife/human connection*. Princeton Scientific, Princeton, pp 1-403, 1992.
19. Mueller, G. and Kim, U.H.: Displacement of estradiol from estrogens receptors by simple alkylphenols. *Endocrinology* 102:1429-1435, 1978.
20. Soto, A.M., Sonnenschein, C., Chung, K.L., Fernández, M.F., Olea, N. and Olea Serrano F.: The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenic environmental pollutants. *Environ. Health Perspect.* 103:113-122 1995.
21. Soto, A.M., Justicia, H., Wray, J.W., Sonnenschein C.: p-Nonylphenol: an estrogenic xenobiotic released from "modified" polystyrene. *Environ. Health Perspect* 92:167-173, 1991.
22. Krishnan, A.V., Stathis, P., Permuth, S.F., Tokes, L. and Feldman, D.: Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology* 132:2279-2286, 1993.
23. Bicknell, R.J., Herbison A.E. and Sumpter J.P.: Oestrogenic activity of an environmentally persistent alkylphenol in the reproductive tract but not the brain of rodents. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.* 54:7-9, 1995.
24. Soto, A.M., Lin, T.M., Justicia, H. and Silvia, R.M., Sonnenschein C.: An "in culture" bioassay to asses the estrogenicity of xenobiotics (E-SCREEN). In Colborn, T., Clement, C.: *In Advances in modern enviromental toxicology, chemically-induced alterations in sexual and funcional development: The wildlife/human connection*. Princeton Scientific, Princeton vol 21:295-309, 1992.
25. Rastogi, S.C., Schouten, A., De Krudf N. and Wedland J.W.: Contents of methyl-, ethyl-, propyl-, and benzylparaben in cosmetic products. *Contact Dermatitis* 32:28-30 1995.

26. Bao-Liang, S., Hai-Ying, L., Dun-Ren, P.: *In vitro* spermicidal activity of parabens against human spermatozoa. *Contraception* 39:331-335 1989.
27. Matthews, C., Davidson J., Bauer, E., Morrison, J.L. and Richardson, A.P.: p-hydroxybenzoic acid esters as preservatives II. Acute and chronic toxicity in dogs rats and mice. *J. Am. Pharm.* 45:260-267, 1956.
28. Maddedu, L., Legros, N., Devleeschouwer, N., Bosman, C., Piccart, M. and Leclercq, G.: Estrogen receptor status and estradiol sensitivity of MCF-7 cells in exponential growth phase. *Eur. J. Cancer Clin. Oncol.* 24:385-390, 1988.
29. Snedecor, G.W., and Cochran, W.G.: *Statisticals Methods*, 8a. ed., Iowa State University Press, Ames, 96-98, 1989

**X. ANEXOS**

**Tabla 1. Abundancia relativa de células presentes en los frotis vaginales de ratonas adultas Ovx tatadas con APHB y E<sub>2</sub>.**

**Tabla 1a. Tratamiento: aceite de maíz (10 ml/Kg/día).**

| FROTIS EN EL DIA | LEUCOCITOS | CELULAS REDONDAS | CELULAS POLIGONALES | CELULAS CORNIFICADAS |
|------------------|------------|------------------|---------------------|----------------------|
| 0                | 65±3       | 14±3             | 33±2                | 11±2                 |
| 1                | 70±9       | 15±6             | 30±9                | 20±5                 |
| 2                | 65±10      | 25±8             | 30±9                | 20±5                 |
| 3                | 65±6       | 5±5              | 5±5                 | 15±6                 |
| 4                | 55±5       | 20±9             | 20±9                | 20±5                 |

**Tabla 1b. Tratamiento: E<sub>2</sub> (10 µg/Kg/día)**

| FROTIS EN EL DIA | LEUCOCITOS | CELULAS REDONDAS | CELULAS POLIGONALES | CELULAS CORNIFICADAS |
|------------------|------------|------------------|---------------------|----------------------|
| 0                | 63±3       | 14±3             | 33±2                | 10±2                 |
| 1                | 33±5       | 0±0              | 29±4                | 25±0                 |
| 2                | 25±0       | 4±4              | 29±10               | 46±10                |
| 3                | 4±4        | 58±12            | 0±0                 | 58±5                 |
| 4                | 0±0        | 0±0              | 4±4                 | 69±4                 |

**Tabla 1c. Tratamiento: APHB (5 µg/Kg/día)**

| FROTIS EN EL DIA | LEUCOCITOS | CELULAS REDONDAS | CELULAS POLIGONALES | CELULAS CORNIFICADAS |
|------------------|------------|------------------|---------------------|----------------------|
| 0                | 67±5       | 14±3             | 33±2                | 11±9                 |
| 1                | 50±9       | 17±8             | 33±5                | 12±3                 |
| 2                | 62±6       | 0±0              | 75±6                | 46±8                 |
| 3                | 0±0        | 17±5             | 17±8                | 33±5                 |
| 4                | 54±4       | 17±5             | 12±5                | 42±8                 |

**Tabla 1. Abundancia relativa de células presentes en los frotis vaginales de ratonas adultas Ovx tatadas con APHB y E<sub>2</sub> (continuación).**

**Tabla 1d. Tratamiento: APHB (500µg/Kg/día)**

| FROTIS EN EL DIA | LEUCOCITOS | CELULAS REDONDAS | CELULAS POLIGONALES | CELULAS CORNIFICADAS |
|------------------|------------|------------------|---------------------|----------------------|
| 0                | 67±5       | 14±3             | 33±2                | 12±3                 |
| 1                | 50±6       | 21±8             | 33±5                | 35±6                 |
| 2                | 50±9       | 8±8              | 25±6                | 46±12                |
| 3                | 58±5       | 17±8             | 17±8                | 40±6                 |
| 4                | 54±8       | 8±5              | 17±5                | 42±5                 |

**Tabla 1e. Tratamiento: APHB (500µg/Kg/día)**

| FROTIS EN EL DIA | LEUCOCITOS | CELULAS REDONDAS | CELULAS POLIGONALES | CELULAS CORNIFICADAS |
|------------------|------------|------------------|---------------------|----------------------|
| 0                | 65±7       | 14±3             | 33±2                | 12±3                 |
| 1                | 58±5       | 21±8             | 33±5                | 33±5                 |
| 2                | 54±10      | 12±6             | 25±16               | 50±13                |
| 3                | 17±8       | 25±11            | 44                  | 71±4                 |
| 4                | 29±8       | 21±8             | 8±5                 | 60±6                 |

**Tabla 2. Comparación del porcentaje de células cornificadas presentes en los frotis vaginales de ratonas inmaduras CD1 por la administración de APHB y E<sub>2</sub>.**

| TRATAMIENTO    | DOSIS/RATON/DIA<br>( $\mu\text{g/Kg}$ ) | N  | PESO DE RATON<br>(g $\pm$ esm) | % DE CELULAS<br>CORNIFICADAS | DIFERENCIA<br>% |
|----------------|-----------------------------------------|----|--------------------------------|------------------------------|-----------------|
| Vehículo       | 10 mL                                   | 10 | 9 $\pm$ 0.5                    | 28 $\pm$ 7                   | -----           |
| E <sub>2</sub> | 10                                      | 10 | 9 $\pm$ 0.6                    | 85 $\pm$ 5                   | 203*            |
| APHB           | 50                                      | 10 | 10 $\pm$ 0.6                   | 44 $\pm$ 7                   | 57              |
| APHB           | 500                                     | 10 | 9 $\pm$ 0.5                    | 53 $\pm$ 9                   | 89              |
| APHB           | 5000                                    | 10 | 9 $\pm$ 0.6                    | 71 $\pm$ 9                   | 153*            |

\* Comparado con el vehículo por el método de Dunn (  $p < 0.05$  ).

**Tabla 3. Comparación del porcentaje de células cornificadas presentes en los frotis vaginales de ratonas adultas CDI Ovx, por la administración de APHB y E<sub>2</sub>.**

| TRATAMIENTO    | DOSIS/RATON/DIA<br>(µg/Kg) | N | PESO DE RATON<br>(g ± esm) | % DE CELULAS<br>CORNIFICADAS | DIFERENCIA<br>% |
|----------------|----------------------------|---|----------------------------|------------------------------|-----------------|
| Vehículo       | 10 mL                      | 6 | 28±2                       | 25±0                         | -----           |
| E <sub>2</sub> | 10                         | 6 | 29±0                       | 67±5                         | 168*            |
| APHB           | 50                         | 6 | 28±3                       | 33±5                         | 32              |
| APHB           | 500                        | 6 | 28±4                       | 42±5                         | 68*             |
| APHB           | 5000                       | 6 | 30±0                       | 54±8                         | 116*            |

\* Comparado con el vehículo por el método de Dunn ( p<0.05).

Tabla 4. Comparación del efecto de APHB y E<sub>2</sub> sobre el peso uterino de ratonas hembras inmaduras.

| TRATAMIENTO    | DOSIS/RATON/DIA<br>(µg/Kg) | N  | PESO DE RATON<br>(g± esm) | PESO UTERINO<br>(mg/100g±esm) | DIFERENCIA<br>% |
|----------------|----------------------------|----|---------------------------|-------------------------------|-----------------|
| Control        | -----                      | 12 | 11.5±0.5                  | 274±18                        | -----           |
| Vehículo       | 10 mL                      | 12 | 11.9±0.4                  | 315±18                        | -----           |
| E <sub>2</sub> | 10                         | 12 | 11.7±0.7                  | 544±25                        | 73*             |
| APHB           | 50                         | 12 | 11.2±0.6                  | 335±17                        | 6               |
| APHB           | 500                        | 12 | 11.2±0.6                  | 380±46                        | 21*             |
| APHB           | 5000                       | 12 | 11.7±0.6                  | 535±36                        | 70*             |

\* Comparado con el vehículo por el método de Student-Newman-Keuls (p<0.05).

**Tabla 5. Comparación del efecto de APHB y E<sub>2</sub> sobre el peso uterino de ratonas hembras Ovx.**

| TRATAMIENTO    | DOSIS/RATON/DIA<br>( $\mu$ /Kg) | N  | PESO DE RATON<br>(g $\pm$ esm) | PESO UTERINO<br>(mg/100g $\pm$ esm) | DIFERENCIA<br>% |
|----------------|---------------------------------|----|--------------------------------|-------------------------------------|-----------------|
| Control        | -----                           | 10 | 36.3 $\pm$ 1.5                 | 180 $\pm$ 23                        | -----           |
| Vehículo       | 10 mL                           | 10 | 37.9 $\pm$ 1.0                 | 203 $\pm$ 14                        | -----           |
| E <sub>2</sub> | 10                              | 10 | 36.7 $\pm$ 1.4                 | 407 $\pm$ 29                        | 100*            |
| APHB           | 5                               | 10 | 39.0 $\pm$ 1.6                 | 251 $\pm$ 18                        | 24              |
| APHB           | 50                              | 10 | 36.3 $\pm$ 1.5                 | 272 $\pm$ 25                        | 34              |
| APHB           | 500                             | 10 | 36.3 $\pm$ 1.5                 | 292 $\pm$ 30                        | 44*             |
| APHB           | 5000                            | 10 | 36.8 $\pm$ 1.0                 | 318 $\pm$ 49                        | 57*             |

\* Comparado con el vehículo por el método de Student-Newman-Keuls (p<0.05).