



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS BÁSICAS E INGENIERÍA

ÁREA ACADÉMICA DE QUÍMICA

Doctorado en Química

TÍTULO:

"Evaluación ecotoxicológica del estradiol y sus metabolitos primarios liberados al ambiente, a través de la actividad ganadera"

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN QUÍMICA

PRESENTA

M. en C. Juan Carlos Gaytán Oyarzún

ASESOR:

DR. ALBERTO JOSÉ GORDILLO MARTÍNEZ

Marzo 2006

AGRADECIMIENTOS

A Vero:

Por su confianza, paciencia y apoyo incondicional

y

Por ser pieza indispensable para la realización de este sueño

A mis Hijos (Ivan, Jair y Karla)

Por ser el principal motivo de mi existir

A mi madre

Que aunque ya no esta aquí, es parte de este logro

Y

A todos aquellos que de una u otra forma han contribuido en mi formación
y han creído en mí

¡Gracias!

Al Dr. Gordillo

Por su dirección de este trabajo, por su confianza depositada en mi,
por la transmisión de su gran saber
y sobre todo por su amistad

A mis sinodales

Por enseñarme que siempre vale la pena esforzarse cada vez más
y por que sin sus consejos este logro no sería una realidad

A la Dra. Miriam Meléndez y las técnicas Claudia Romo y Yolanda Mormolejo

Por su tiempo, apoyo y sobre todo paciencia para apoyarme
en los análisis cromatográficos

Al Dr. Scott Monks, la Dra. Griselda Pulido y al Químico Rene Bernardo Cabrera

Por su apoyo, confianza y amistad

A la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo y en particular al Centro de
Investigaciones Químicas (CIQ) y al Centro de Investigaciones Biológicas (CIB)
a través del PAU-2002

Por su apoyo para la realización de esta investigación

ÍNDICE

Contenido	Páginas
RESUMEN	5
ABASTRAC	6
1. ANTECEDENTES	7
1.1 Uso en la actividad ganadera	7
1.2 Esteroides y estrógenos	8
1.3 Cinética de los contaminantes ambientales	14
1.4 Técnicas analíticas para la detección de contaminantes ambientales	17
1.5 Determinación de la calidad ambiental a través del impacto biológico	20
1.6 Bioensayos para la evaluación del potencial genotóxico	21
2. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo general	28
2.2 Objetivos particulares	28
3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL	29
3.1 Análisis químico	29
3.2 Selección de animales y dosificación	30
3.3 Técnicas de muestreo en sangre, leche y orina	33
3.4 Pruebas preliminares de toxicidad	36
3.5 Potencial genotóxico en haba (<i>Vicia faba</i>)	37
3.6 Potencial genotóxico en la mosca de la fruta (<i>Drosophila melanogaster</i>)	44
4. ANÁLISIS DE RESULTADOS	44
4.1 Selección de la técnica analítica más adecuada	45
4.2 Evaluación de las tres hormonas en fluidos corporales	54
4.3 Evaluación del efecto biológico a través del daño genotóxico	63
5. CONCLUSIONES	70
5.1 Técnica analítica y método de purificación	71
5.2 Toxicodinámica del estradiol y su excreción	72
5.3 Efecto biológico	73
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

ÍNDICE DE FIGURAS

Contenido	Páginas
Figura 1.- Estructura química del estradiol y sus metabolitos (Devore y Muñoz, 1985).	8
Figura. 2.- Transformación de estradiol a semiquinonas y quinonas.	11
Figura. 3.- Metabolismo del estradiol.	12
Figura. 4 Cinética de contaminantes ambientales.	14
Figura. 5 Cinética de un agente químico dentro de un organismo.	16
Figura. 6 Cromatograma de estradiol y sus metabolitos a través de la técnica de masas gases (CG/MS) (Catalogo Altech, 2001).	18
Figura. 7 Micronúcleo inducido por agentes químicos en haba (<i>Vicia faba</i>).	21
Figura. 8 Discos imágales en <i>Drosophila melanogaster</i> (Klug Kummings, 2002).	24
Figura. 9 Formación de un clon celular en el ala de <i>Drosophila melanogaster</i> .	25
Figura. 10 Tipos de manchas o clones celulares en el ala de <i>Drosophila melanogaster</i> .	26
Figura. 11 Tipos de manchas o clones celulares en el ojo de <i>Drosophila melanogaster</i> .	26
Figura. 12 Área de estudio y ubicación con base a la Cd. de Pachuca, Hidalgo.	29
Figura. 13 Animal seleccionado en la fase experimental.	30
Figura. 14 Presentación comercial del estradiol.	30
Figura 15. Vaca adulta para tratamiento.	31
Figura 16. Habas germinando.	37
Figura 17. Haba en tratamiento.	39
Figura 18. Micronúcleos inducido por agentes químicos en haba (<i>Vicia faba</i>).	41
Figura 19. Cromatograma en el que se muestra la concentración menor en la que se detecta al estradiol (0.00125 ppm) mediante la técnica de CG/MS.	45
Figura 20. Cromatograma en el que se muestra la concentración menor en la que se detecta al estrona (0.001 ppm) mediante la técnica de CG/MS.	46
Figura 21 Cromatograma en el que se muestra la concentración menor en la que se detecta al estriol (1.0 ppm) mediante la técnica de CG/MS.	47
Figura 22 Cromatograma en el que se muestra la mezcla de estradiol, estrona y estriol a 1 ppm mediante la técnica de CG/MS.	47

Figura 23.	Espectrofotometría UV, en donde se detecta al estradiol y sus dos principales metabolitos a 220 nm.	49
Figura 24.	Cromatograma en el que se detecta el estradiol a 100 ppm mediante la técnica de HPLC.	50
Figura 25.	Cromatograma en el que se detecta el estriol a 100 ppm mediante la técnica de HPLC.	50
Figura 26.	Cromatograma en el que se detecta el estrona a 100 ppm mediante la técnica de HPLC.	51
Figura 27.	Cromatograma en el que se detecta la mezcla de las tres hormonas a 100 ppm mediante la técnica de HPLC.	51
Figura 28.	Cromatograma en el que se detecta al acetonitrilo (disolvente) mediante la técnica de HPLC.	52
Figura 29.	Cromatograma en el que se detecta las tres hormonas a 10 ppm mediante la técnica de HPLC.	53
Figura 30.	Cromatograma en el que se detecta las tres hormonas a 1.0 ppm mediante la técnica de HPLC.	53
Figura 31.	Cromatograma en el que se detecta las tres hormonas a 0.1 ppm mediante la técnica de HPLC.	53
Figura 32.	Cromatograma en el que muestra la concentración menor a la que se detectan simultáneamente las tres hormonas (0.01 ppm) mediante la técnica de HPLC.	54
Figura 33.	Curva de calibración en HPLC del estradiol y sus dos principales metabolitos en sangre y leche.	55
Figura 34.	Toxicodinámica del estradiol y sus dos principales metabolitos en sangre.	56
Figura 35.	Curva de calibración del estradiol y sus dos principales metabolitos a través de la técnica de HPLC.	57
Figura 36.	Excreción del estradiol y sus dos principales metabolitos en orina a través de la técnica de HPLC.	60
Figura 37.	Toxicodinámica y excreción del estradiol y sus dos principales metabolitos.	61

ÍNDICE DE TABLAS

Contenido	Páginas
Tabla I. Listado de efectos nocivos provocados por estrógeno.	13
Tabla II. Sensibilidad de la CG/MG al estradiol y sus metabolitos.	46
Tabla III. Concentración expresada a través de la relación área-altura bajo la curva del estradiol y sus dos principales metabolitos en sangre a través de HPLC.	57
Tabla IV. Parámetros estimados de la toxicodinámica del estradiol y sus dos principales metabolitos en sangre.	57
Tabla V. Concentración expresada a través de la relación área-altura bajo la curva del estradiol y sus dos principales metabolitos en orina a través de HPLC.	61
Tabla VI. Parámetros estimados de la excreción del estradiol y sus dos principales metabolitos con HPLC en orina.	61
TABLAVII. Índice mitótico obtenido con tres concentraciones de estradiol, estrona y estriol en células meristemáticas de la raíz del haba (<i>Vicia faba</i>) con 4 horas de tratamiento y 2 horas de recuperación.	64
Tabla VIII. Frecuencia de alteraciones anafásicas y micronúcleos inducidas por el estradiol y sus dos principales metabolitos a 10 ppm en células meristemáticas de haba (<i>Vicia faba</i>).	65
Tabla IX. Índices de sobrevivencia en larvas de <i>Drosophila melanogaster</i> al ser tratadas con estradiol.	66
Tabla X. Frecuencia de manchas por ala al tratar crónicamente con estradiol a larvas transheterocigóticas (mwh + / + flr ³) de <i>Drosophila melanogaster</i> .	67
Tabla XI. Frecuencia de manchas por ala al trata crónicamente con estradiol y sus dos principales metabolitos a larvas transheterocigóticas (mwh + / + flr ³) de <i>Drosophila melanogaster</i> .	68
Tabla XII. Frecuencia de clones celulares en ojo de <i>Drosophila melanogaster</i> al ser tratada con estradiol.	69
Tabla XIII. Frecuencia de clones celulares en ojo de <i>Drosophila melanogaster</i> al ser tratada con estradiol y su dos principales metabolitos.	69

RESUMEN

La inducción de tumores por estradiol y sus esteres se describió poco antes de 1930 por Lipschutz y Vargas en cobayos, desde ese momento, se han publicado múltiples artículos sobre la inducción tumoral por los estrógenos y se han desarrollado varios modelos tumorales en roedores. Pese a su potencial carcinógeno, los estrógenos se han considerado benéficos, en función de su gran variedad de efectos hormonales y por lo tanto terapéuticos. Sin embargo, en los últimos veinte años los estudios epidemiológicos han relacionado en repetidas ocasiones a éstos compuestos con el aumento de riesgo de tumores mamarios o uterinos asociados a estrógenos y sus metabolitos.

En la parte preliminar del presente trabajo se cuantificó la bioacumulación en sangre y la posible liberación a través de orina y leche, del estradiol y/o de sus dos principales metabolitos (estrone y estriol); para ello se partió de evaluar las ventajas y desventajas entre la cromatografía de gases masas (CG/MS) y la cromatografía de líquidos (HPLC) en cuanto a su capacidad para detectar y cuantificar de manera simultánea y a bajas dosis a las tres hormonas en fluidos corporales de vacas expuestas al estradiol de manera terapéutica en tratamientos sucesivos.

Encontrándose, a la cromatografía de líquidos con más sensibilidad y especificidad, permitiendo identificar y cuantificar al mismo tiempo a cada una de las tres hormonas hasta la concentración de 0.01 ppm; observándose que solo en orina y no en la leche, existía una importante liberación de las tres hormonas; siendo la estrone la más importante por sus alta concentración, lo que evidencia, en tratamientos sucesivos una posible bioacumulación; por otra parte, se evaluó el efecto genotóxico de estos compuestos en dos bioensayos (habas y la mosca de la fruta), con dos pruebas genotóxicas en cada uno; encontrándose evidencias de daño a dosis bajas en ambos organismos en las cuatro pruebas evaluadas, siendo más significativo el efecto del estriol que del estradiol que es la hormona original, lo que significa que el principal mecanismo de acción es de manera indirecta a través de al menos uno de sus metabolitos, debido a que el otro metabolito (la estrone) fue inocuo, al menos a las concentraciones y en las condiciones evaluadas.

1. ANTECEDENTES

1.1 Uso en la actividad ganadera

La regulación de la actividad sexual está representada en el organismo por el sistema hipotálamo-hipófisis-ovárico. La interrelación entre estos componentes dirigentes se realiza a través de la vía neuro-hormonal, donde la mayor importancia se encuentra en el proceso hormonal. El conocimiento de esos procesos e interacciones, representa un punto focal mediante el cual el hombre puede influir sobre su entorno económico y social (Duarte, 1999).

Los mecanismos y procesos que regulan la actividad sexual en humanos, así como en otros mamíferos domésticos, no están completamente aclarados, sin embargo, los resultados alcanzados en los trabajos experimentales clínicos, endocrinológicos, morfológicos e histomorfológicos, brindan una valiosa información que posibilita una concreta imaginación teórica sobre el dinamismo y mecanismo de los procesos de regulación durante el ciclo sexual, aplicables a la terapia de ciertos padecimientos humanos y al mejoramiento, así como para la sobre-explotación de ciertos caracteres en la ganadería, entre otros (Duarte, 1999).

Para el uso de hormonas en la ganadería contemporánea, es necesario entender la teoría de la regulación de las funciones sexuales, porque sólo desde éste punto de vista es posible dirigir y organizar concretamente la crianza, así como valorar y resolver con éxito las perturbaciones reproductivas del ganado, desde el punto de vista etiológico, terapéutico y profiláctico (Duarte, 1999).

Las hormonas sexuales son segregadas por los órganos sexuales a través de un estímulo químico a partir del lóbulo anterior de la hipófisis, el cual es de naturaleza esteroidea; cabe mencionar que la estrona es la primera hormona de este tipo que fue aislada, desencadenándose a partir de este momento una gran cantidad de estudios relacionados con la síntesis e identificación de estas hormonas (Devore y Muñoz, 1985).

El colesterol un importante precursor de las cinco clases principales de hormonas esteroideas, como son el progestágeno, el estrógeno, el andrógeno, la mineralocorticoides y los glucocorticoides (Bhagaban, 1990).

1.2 Esteroides y estrógenos

Los esteroides pertenecen a un grupo de compuestos de origen natural que tienen un sistema de tres anillos fusionados de seis miembros y uno de cinco, por ejemplo el colesterol. Estos son de origen vegetal o animal y sus funciones están perfectamente establecidas, muchos esteroides son mensajeros químicos, los cuales se producen en un órgano y desencadenan una respuesta en otro, como el caso de las hormonas sexuales (Fox y Whitesell, 2000).

En los seres humanos las hormonas sexuales se agrupan en tres categorías: estrógenos (femeninos), andrógenos (masculinos) y progestinas (del embarazo) (Fox y Whitesell, 2000).

Los estrógenos en particular, son una de las hormonas sexuales más importantes fisiológicamente hablando, en donde la palabra estrógeno se deriva del termino estro, que proveniente del griego *oistro* (tábano), el cual se refiere al estado de excitabilidad o respetabilidad sexual que presentan las hembras de diversas especies. Actualmente la palabra estrógeno se designa a cualquier grupo de compuestos que ocasionan la feminización, en los caracteres sexuales primarios y secundarios. Se han aislado tres tipos de estrógenos en los tejidos ováricos y en la orina de la especie humana: estradiol (E2), estrona (E1) y estriol (E3) (Fig. 1) (Bhagaban, 1990).

El estradiol es la principal hormona de la secreción ovárica y es la más potente de las tres, es el primer estrógeno producido por los ovarios, y en condiciones terapéuticas las concentraciones máximas en plasma se alcanzan entre 4 y 6 h en humanos después de la ingesta, recuperándose los niveles previos 2 ó 3 días después de la suspensión del tratamiento. Las otras dos hormonas son

productos metabólicos de éste y se producen a través de la conjugación

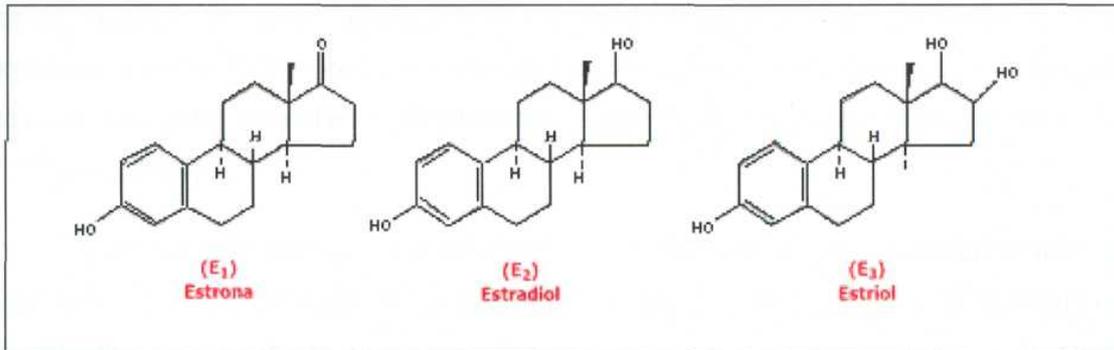


Figura. 1 Estructura química del estradiol y sus metabolitos (Devore y Muñoz, 1985).

La estrona se produce por oxidación del estradiol antes de ser excretada en la orina, se considera un estrógeno débil, el cual es extremadamente abundante durante la menopausia.

El estriol se produce principalmente en el hígado, a partir del estradiol y de la estrona, aumentando su concentración de manera significativa durante el embarazo y el parto. Se eliminan a través de bilis y orina; su medición en orina, es un índice indirecto para conocer la producción de estrógenos a nivel corporal (Bhagaban, 1990)

Los metabolitos del estradiol son excretados con una vida media de aproximadamente 24 h, aproximadamente el 89% a través de la vías urinarias, el 10% por la bilis y de manera muy limitada cerca del 1% por leche (Fox y Whitesell, 2000).

El estradiol es la fracción estrogénica activa fisiológicamente más importante en los rumiantes. Es producido por el folículo ovárico en la hembra, siguiendo un patrón cíclico y provocando los cambios de conducta observados durante el estro, en el macho es producido en pequeñas cantidades por las glándulas adrenales ([Internet 1 y 2](#)).

Los estrógenos en general parecen actuar a través de diversas hormonas que controlan el metabolismo de la energía. Después del tratamiento de rumiantes

con estrógenos, se elevan las concentraciones plasmáticas de insulina y de la hormona del crecimiento. Esto resulta en aumento de la síntesis de proteína muscular, lo que se evidencia por un incremento de la captación de aminoácidos. Por tanto, los efectos de los estrógenos no serían directos sobre la célula muscular, sino mediados a través principalmente de la hormona del crecimiento, resultando en un balance nitrogenado positivo, aumento acumulación de proteínas, además de una mayor retención de calcio y fósforo ([Internet 2](#)).

El efecto neto de todos los esteroides es incrementar la ganancia de proteínas, acumulación que se produce en las células musculares. Esto determina un aumento de la ganancia diaria de peso, de la eficiencia en la conversión alimenticia y en la proporción de carne magra sobre la grasa corporal en la carcaza. Estas respuestas son mayores en los animales castrados que en los animales enteros, dado el mayor nivel de hormonas circulantes de estos últimos. Se observa lo mismo en los animales jóvenes con respecto a los viejos. Los estrógenos son más efectivos en los machos enteros, mientras que los animales castrados requieren una combinación de estrógenos y andrógenos para que se evidencien los efectos máximos ([Internet 2](#)).

Los estrógenos son absorbidos por todas las vías, debido a su liposolubilidad, son metabolizados principalmente en el hígado donde son conjugados para su excreción final, existiendo una intensa circulación enterohepática, lo que hace que sólo una fracción de lo administrado por la vía oral sea efectivamente distribuido en el resto del organismo. El estradiol exógeno no difiere en absoluto del producido por el animal, por lo que su metabolismo y excreción son idénticos ([Internet 2](#)).

Los estrógenos han sido clasificados como carcinógenos epigenotóxicos, en función de su incapacidad de producir mutaciones en bacterias y mamíferos, así como a su asociación con múltiples evidencias con la inducción de ciertos tipos de proceso cancerígenos (Liehr, 2000).

El mecanismo de acción de un agente epigenotóxico según Li y sus colaboradores, se refiere a que el agente químico que no participa en interacciones directas (covalentes) con el material genético pero que, sin

embargo, es capaz de suscitar variaciones heredables por mecanismos alternativos (Liehr, 2000).

La inducción de tumores por estradiol y sus esteres se describió a finales de los años treinta por Lipschutz y Vargas en cobayos y por Gardner a principios de los años cuarenta en ratones. Desde ese momento, se han publicado varios artículos sobre la inducción tumoral por los estrógenos y se han desarrollado múltiples modelos tumorales en roedores (IARC, 1999). Por el contrario, la potencialidad carcinógena de las medicaciones que contienen estrógenos en seres humanos no se ha reconocido durante años. En general, los estrógenos se han considerado benéficos, en función de su gran variedad de efectos hormonales y por lo tanto terapéuticos. Sin embargo en los últimos veinte años, en los estudios epidemiológicos han relacionado en repetidas ocasiones a los estrógenos y sus metabolitos con el aumento de riesgo de tumores mamarios o uterinos (Liehr, 2000), debido a lo cual se hace necesario realizar más estudios que complementen el conocimiento acerca de los efectos biológicos de los estrógenos y sus metabolitos.

Los estudios genotóxicos se basan en metabolitos catecolestrogénicos, debido a que éstos y las hidroquinonas pueden oxidarse de forma constante a quinonas y semiquinonas (Fig. 2), las cuales son reactivas con el ADN, además de que en estudios recientes se ha encontrado que el 4-hidroxiestradiol es nueve veces más carcinógeno que el estradiol, mientras que el 2-hidroxiestradiol es casi tan carcinógeno como el estradiol (Liehr, 2000).

La 2-hidroxilación de los estrógenos es la principal oxidación metabólica de las hormonas estrogénicas, en la mayoría de las especies de mamíferos, ocurre en el hígado, está catalizada por enzimas del citocromo P450 3A; mientras que las enzimas del citocromo P4501A actúan a nivel extrahepático y de manera particular también se ha encontrado que la enzima P450 1B es específica para esta función a nivel de glándulas mamarias, ovario y útero (Martucci, 1993).

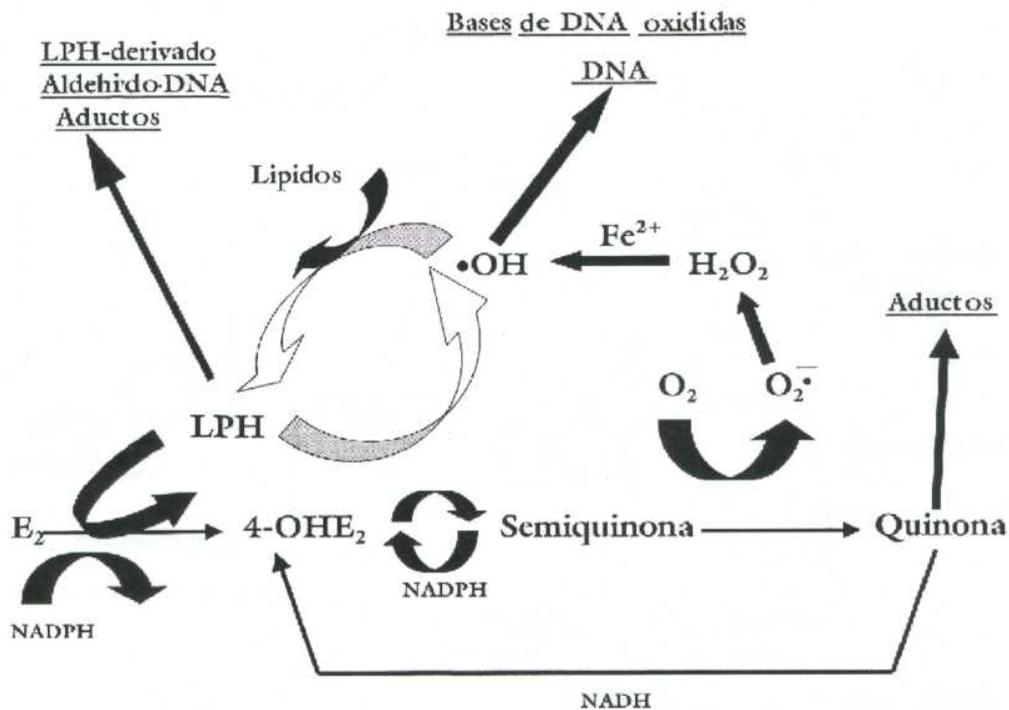


Figura. 2 Transformación de estradiol a semiquinonas y quinonas.

Las hidroxilasas del citocromo P450 3A y 1A convierten a los estrógenos en un 80-85% en 2-hidroxiestradiol, y debido a falta de especificidad de las enzimas, también convierten al 15 y 20% restante en 4 hidroxiestradiol, mientras que la hidroxilasa P4501B, principalmente transforma los estrógenos en la 4-hidroxiestradiol, reportándose a ésta ultima, en algunos sistemas tan o más carcinógena que el estradiol (Fig. 3) (Martucci, 1993).

Los datos reportados por Liehr en el 2000 (Tabla I), demuestran que la hormona natural β -estradiol (E2) es carcinógeno en seres humanos y animales, que produce múltiples alteraciones al ADN en condiciones *in vitro*; además produce

una baja frecuencia de mutaciones génicas, demostrándose que sus metabolitos también originan múltiples alteraciones a la molécula del ADN después de haber sido metabolizados a intermedios reactivos quinónicos (Cavaliery et al., 2000; Lierh, 2000, Thompson, 2000; Yager, 2000).

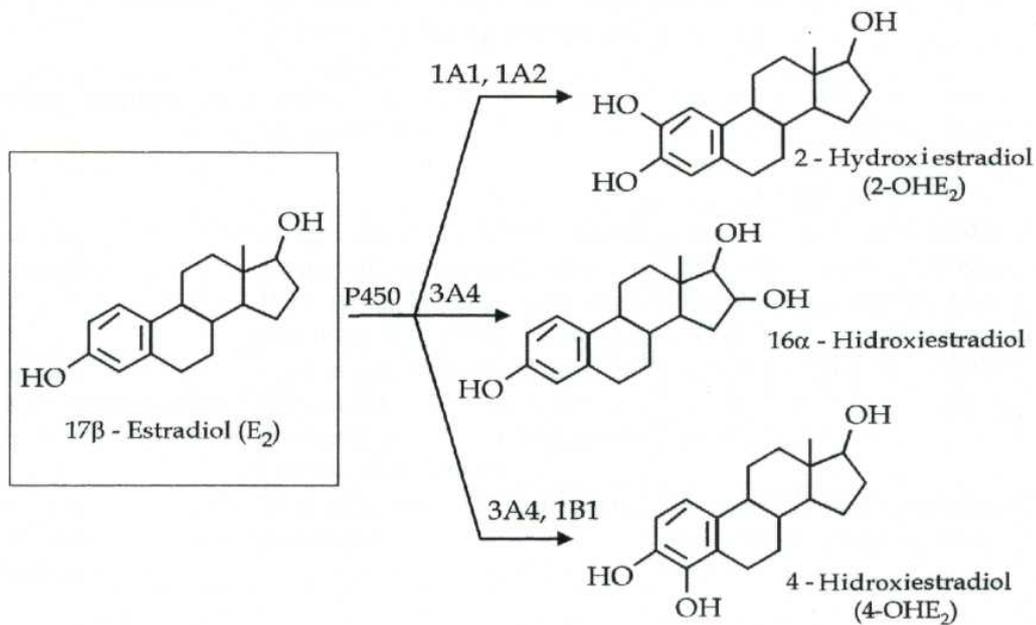


Figura. 3 Metabolismo del estradiol.

Las quinonas de los estrógenos, la 4-hidroxiestradiol y la 4-hidroxiestrona pueden reaccionar con el ADN induciendo sitios apurínicos mediante la formación de metabolitos electrofílicos, además de que varios tipos de daños indirectos pueden ocurrir al ADN, mediante la síntesis de aldehídos reactivos derivados de la hiperoxidación de lípidos (Tabla I y Fig. 2) (Cavaliery et al., 2000).

Tabla. I Listado de efectos nocivos provocados por estrógeno.

Efecto reportado / Organismo	Cita
Carcinógeno en humanos	-Aumento de riesgo de cáncer en útero y mama, epigenotóxico en humanos.
Formación de tumores en animales	-Bernstein (1988) y Liehr (2000)
-Ratas, ratones y hámster (criceto chino)	-Huseby (1980); Li (1996); Shull et al., (1977); IARC (1999); Liehr (2000) y Yager (2000).
Mutagénesis (genotóxicidad)	-Negativos en bacterias (Ames) y mamíferos (criceto chino) e ICH en humanos, mutaciones puntuales, inducción de aductos
-Hámster (criceto chino), no disyunción y aneuploidias, desorganiza microtúbulos (veneno metabólico)	-Lang y Reiman, (1993); Rahag y Pento (1995); Hundal et al., (1997) y Liehr (2000).
Aberraciones cromosómicas numéricas	Tsutsui y Barret (1997); Cavalieri et al., (2000) y Liehr (2000).
Aberraciones cromosómicas estructurales	Translocaciones y mutaciones puntuales
	Cavalieri (2000); Devanesan et al. (1999) y Liehr (2000)

1.3 Cinética de los contaminantes ambientales

Aunado a los efectos por las hormonas esteroideas, existen los llamados "estrógenos ambientales", los cuales son un grupo de sustancias naturales y sintéticas ampliamente distribuidas en el medio, que se comportan como "estrógenos naturales" y que a pesar de que presentan diferencias estructurales, podría activar los mismos genes asociados a éstos, e incluso inducir su síntesis. El estudio de estos compuestos permite elucidar los posibles efectos de los de origen natural, demostrando que desempeñan un papel importante en el crecimiento o la función normal de muchos órganos, incluyendo el pecho, hueso, hígado, los órganos del sistema reproductor y del sistema cardiovascular; lo que hace necesario conocer el efecto de estos compuestos y su posible distribución en los ecosistemas (McLachlan y Steven, 1996) además de manifestar una gran cantidad y diversidad de daños en el ecosistema como son:

- Disfunción de la tiroides en aves y peces.
- Fertilidad disminuida en aves, peces, crustáceos y mamíferos.
- Deformidades congénitas en aves, tortugas y peces.
- Feminización y masculinización en aves, peces y mamíferos.

(World Resources Institute, 1995).

La movilidad y la acumulación de sustancias en el ambiente aumentan la probabilidad de exposición del ser humano durante algún periodo de su vida incluyendo la gestación, ya sea de manera directa o indirecta, o a través de exposiciones agudas o crónicas (Fig.4) (Vega, 1985).

La movilidad de los residuos tóxicos de un sistema biológico a otro, a través del ambiente depende de su emisión, sus propiedades físicas y químicas, así como de factores ambientales a los que esté expuesto, los cuales se verán reflejados de manera secundaria en su acumulación, persistencia y/o degradación, denominándose a este proceso "Cinética de los contaminantes en el ambiente" (Vega, 1985).

identificación, cuantificación y caracterización de los compuestos a evaluar (Vega, 1985)

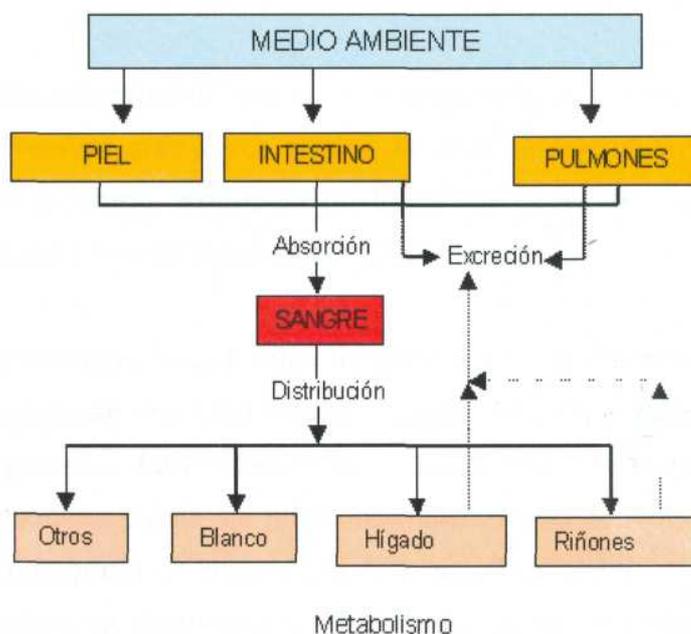


Figura 5 Cinética de un agente químico dentro de un organismo.

1.4 Técnicas analíticas para la detección de contaminantes ambientales:

Actualmente se han desarrollado varios métodos analíticos de alta sensibilidad para detectar y cuantificar en el ambiente la presencia de sustancias potencialmente tóxicas, en donde los resultados de estos han sobrepasado la capacidad para determinar el significado toxicológico, genético y/o evolutivo de la exposición corta o prolongada a estos agentes químicos (Vega, 1985).

La cromatografía es la técnica analítica más ampliamente utilizada y se puede definir como un método físico de separación en el cual los componentes se distribuyen entre dos fases. Los procesos cromatográficos tienen lugar como resultado de repetidas adsorciones y desorciones durante el movimiento de los

componentes de la muestra a lo largo del lecho estacionario, alcanzándose la separación gracias a las diferencias en los coeficientes de distribución de los distintos componentes de la muestra (Yost et al., 1980).

Se utiliza "lecho estacionario" como término general para denominar cualquiera de las diferentes formas en que puede usarse la fase estacionaria, que puede estar empaquetada en una columna, extendida en forma de capa, etc., en donde la fase móvil puede ser gaseosa o líquida (Yost et al., 1980).

Las técnicas cromatográficas modernas se valen de la diferencia de solubilidad de las distintas moléculas en una fase móvil en relación con una fase estacionaria. En la cromatografía de gases la fase móvil es un gas acarreador (un gas inerte como el Argón) y la fase estacionaria puede ser un sólido o bien sólido recubierto con un líquido no volátil, en la cromatografía de líquidos la fase móvil (eluyente) es un líquido, que puede ser elegido entre una diversidad de disolventes acuosos y orgánicos, y la fase estacionaria es un sólido compuesto de partículas pequeñas en torno a las cuales fluye el líquido. Las diferencias de fuerzas de interacción de los diversos componentes de la mezcla con la fase estacionaria son un factor importante en todas las técnicas cromatográficas. Por consiguiente, es importante que la fase estacionaria tenga un área superficial tan grande como sea posible. Cuanto más pequeño es el tamaño de las partículas, mayor es el área superficial; por esta razón es frecuente el uso de partículas muy finas de un sólido para las separaciones más difíciles (Fox y Whitesell, 2000).

En particular, en la cromatografía de gases se pueden separar los compuestos de una mezcla en estado gaseoso, haciéndolos pasar sobre una fase estacionaria sólida-líquida. La separación se debe a las interacciones de los componentes de la muestra con la fase estacionaria. Aunque las separaciones en fase gaseosa fueron descritas a comienzos del siglo XX, el verdadero potencial de la cromatografía de gases no se desarrolló hasta 1952. Desde entonces, esta técnica se ha perfeccionado hasta el punto de aplicarse actualmente a casi todas las áreas de las ciencias físicas y químicas. Tiene varias ventajas, tales como poder aplicarse al análisis cualitativo o cuantitativo, el corto tiempo de análisis, la

sencillez del instrumental, la elevada sensibilidad y que es aplicable a un 60 % de todos los compuestos orgánicos conocidos (Skoog y Leary, 1994).

En cuanto a la cromatografía de líquidos, se utiliza con una fase estacionaria sencilla de albúmina o gel de sílice, en forma de suspensión en una columna de vidrio, en la parte superior se aplica la mezcla a separar y una fase móvil o eluyente, se permite que fluya; si no es bueno el grado de separación o resolución entre las bandas, y por lo tanto de los componentes de la mezcla, éste se puede resolver, a través de una cromatografía de líquidos de alto rendimiento, que también se conoce como la cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC), en el cual la fase móvil se impulsa por una columna sellada por medio de una bomba mecánica, lo que permite emplear partículas más pequeñas y una mejor separación de los elementos de una mezcla (Fox y Whitesell, 2000).

La determinación del estradiol y de sus dos principales metabolitos, la estrona y el estriol está calibrada y aceptada por la Agencia de Protección Ambiental de los Estados Unidos (EPA) a través del método 1625 (Fig. 6)

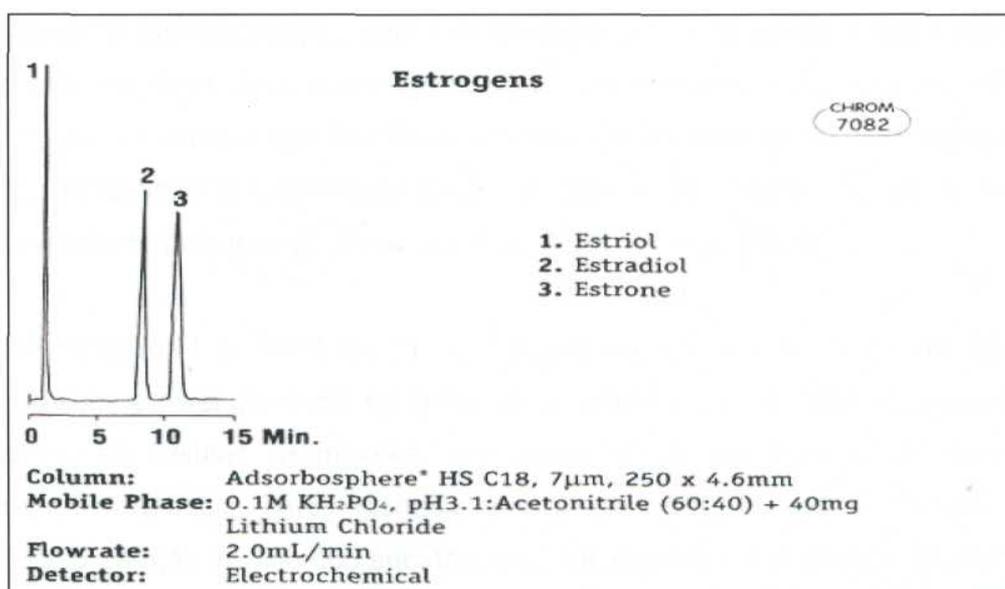


Figura. 6 Cromatograma a través de la técnica de masas gases (CG/MS) de estradiol y sus metabolitos (Catalogo Altech, 2001).

1.5 Determinación de la calidad ambiental a través del impacto biológico

La actual decadencia de la calidad ambiental aunado al sin número de compuestos y mezclas a las que están expuesto todos los sistemas biológicos del planeta, crea la necesidad de determinar el impacto biológico en los diferentes niveles que se pueden presentar, como el reproductor, tóxico, genético y evolutivo, entre otros (Sienra, 2001).

Con base en lo anterior el papel de la ecotoxicología no se limita a la identificación del agente contaminante, sino además a la correlación del dato y sus consecuencias, para lo cual es necesario delimitar la naturaleza, probabilidad y magnitud de los efectos adversos que puedan existir sobre un ecosistema al exponerse a un cierto estrés ambiental (Sienra, 2001).

La detección de posibles biomonitores *in situ* en áreas contaminadas (organismos sensibles en el área de estudio), que permitan detectar y ubicar fuentes de contaminación de una manera sencilla y práctica, son una de las principales herramientas de la ecotoxicología; para determinar el potencial riesgo a la exposición a ciertos agentes químicos de una manera confiable, se requiere corroborar los estudios ecotóxicológicos en campo con estudios genotóxicos en laboratorio con organismos específicos, denominados bioensayos para establecer una relación entre la calidad ambiental y el efecto biológico (Butterworth et al., 2000; Sienra, 2001).

En la actualidad la rama de la toxicología que evalúa el efecto de agentes químicos y físicos a nivel genético, es la genética toxicológica, la cual se encarga de detectar daño en células germinales, somáticas e incluso durante el desarrollo embrionario (mutagénesis, carcinogénesis y teratogénesis); así como determinar el efecto biológico de más de 100,000 sustancias distintas, que se producen anualmente, denominado a éste, "Impacto al ambiente", el cual puede repercutir de muy diversas formas en las poblaciones humanas; la evaluación de dichos efectos

es mediante el uso de bioensayos que nos dan información acerca de los mecanismos de acción y su peligrosidad en términos de inducción de daño genotóxico, y nos permiten tomar decisiones en cuanto a su uso, producción y eliminación (reglamentación) (Reyes y Almeida, 1992; Butterworth et al., 2000).

1.6 Bioensayos para la evaluación del potencial genotóxico

El uso de organismos (bioensayos) en condiciones controladas *in vivo* e *in vitro* ofrece múltiples ventajas en estudios de toxicología y en específico en el área de la toxicología genética; estos organismos van desde los más simples hasta los más cercanos en la escala evolutiva al ser humano, incluyendo el cultivo de tejidos humanos; pasado por diferentes niveles, y están enfocados a tratar de explicar los mecanismos de interacción que hay entre el ser humano y los miles de compuestos químicos que existen actualmente en el ambiente (Gaytán, 1993).

a) *Vicia faba* (haba)

Ha existido un creciente interés en el uso de sistemas vegetales para la identificación de agentes físicos y químicos con potencial mutagénico. En 1978, el taller organizado por el Instituto Nacional de Ciencias Ambientales y de la Salud de EUA, revisó la utilidad de diversas plantas para la detección del daño genético inducido por agentes mutagénicos ambientales (de Serres 1992). En estos organismos es posible observar un espectro amplio de alteraciones genéticas que incluyen mutaciones génicas y aberraciones cromosómicas. Además, tienen gran diversidad de aplicaciones en el estudio del ambiente, como la *determinación de materiales mutagénicos de desecho* provenientes de industrias que los descargan en arroyos y ríos (Villalobos-Pietrini *et al.*, 1994, Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini, 1994), así como de contaminantes atmosféricos en medios rurales y urbanos. Los vegetales no sólo son capaces de elucidar la mutagenicidad del compuesto original sino también de sus metabolitos, muchos de los cuales son similares a aquellos encontrados en animales.

Otra de las ventajas de las plantas superiores como sistema de prueba es que no están restringidas al laboratorio y son empleadas también en el campo como biomonitores (de Serres 1992), es de mencionarse que la evaluación ambiental con plantas, económica, son organismos de fácil manejo y se pueden utilizar para el monitoreo de mutágenos ambientales tanto de tipo físico (radiaciones ionizantes) como químico (metales, disolventes, plaguicidas, etc.) (Valencia-Quintana *et al.*, 1993, Villalobos-Pietrini *et al.*, 1993).

En contraste con las más de 500 especies que han sido empleadas en estudios de mutagénesis, relativamente pocas se han usado para establecer si un compuesto en particular es clastogénico (capaz de romper cromosomas) o **turbagénico** (provoca alteraciones del huso tales como C-mitosis). Idealmente las plantas que tienen una cantidad baja de cromosomas, de buen tamaño, lo que las hace ideales para el análisis microscópico y por consiguiente para el estudio de aberraciones cromosómicas (Fig. 7).



Figura. 7 Micronúcleo inducido por agentes químicos en haba (*Vicia faba*).

Después de los tratamientos con un agente clastogénico, se puede observar rupturas e intercambios en los cromosomas, que puedan involucrar aberraciones subcromatídicas, cromatídicas o cromosómicas. Los estados celulares de metafase y/o anafase son los más frecuentemente utilizados para el análisis de las aberraciones inducidas.

- Las que aparecen en metafase pueden usarse para el análisis de las aberraciones y los sitios precisos donde fueron inducidas.
- Las que aparecen en anafase pueden ser registradas con mayor facilidad que las de metafase, proveen un medio rápido para estimar el daño cromosómico y proporcionan datos sobre la formación de cromosomas con el centrómero inactivado y de anafases multipolares, que no aporta la observación de las metafases (Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini 1985, Gómez-Arroyo *et al.*, 1983, 1986, Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini, 1994).

Es muy común que las investigaciones sobre los efectos mutagénicos de agentes químicos se lleven a cabo con el haba (*Vicia faba*) más que con cualquier otra especie, debido a que sus cromosomas grandes, y por lo tanto ideales para la observación de los efectos de radiaciones y agentes químicos; aunado a que éste bioensayo ha presentado buena correlación con bacterias y mamíferos en cuanto a la detección de daño genético inducido (de Kergommeaux *et al.*, 1983).

Su cariotipo está constituido por seis pares de cromosomas que son designados de acuerdo con la posición del centrómero, como metacéntricos (con el centrómero en la parte media) que poseen un gran satélite en uno de sus brazos y con una longitud casi del doble de la de los otros cinco pares denominados subacrocéntricos (con el centrómero en posición subterminal).

Para los análisis de las aberraciones cromosómicas, es importante establecer la sensibilidad de las diversas etapas del ciclo celular y determinar el comportamiento de los agentes físicos y químicos, ya que siguiendo lo propuesto por Kihlman (1966) se les ha clasificado, considerando el momento en que aparecen las aberraciones, como:

1. De efecto no retardado cuando se presentan 3 horas después de iniciado el tratamiento y su frecuencia máxima está entre las 4 y las 10 horas, su expresión es independiente de la síntesis de ADN y a los agentes que producen este tipo de efecto se les conoce como S- independientes, ya que si la aberración se provoca en profase es subcromatídica y la unidad de rompimiento es la media cromátida, en

S y en G2 es cromatídica siendo su origen la cromátida y en G1 cromosómica, cuando el cromosoma es la unidad. A este grupo pertenecen los rayos X, los antibióticos como bleomicina, pleomicina, estreptomycin y las oxipurinas metiladas (Kihlman y Andersson, 1984).

2. Si las aberraciones surgen 8 horas después del tratamiento y su mayor valor se manifiesta entre las 24 y las 48 horas, se consideran de efecto retardado debido a que las lesiones sobre los cromosomas pueden suceder en cualquier período del ciclo celular pero su manifestación requiere de la síntesis de ADN y siempre son de tipo cromatídico, a los agentes que actúan de esta manera se les considera como S-dependientes, como por ejemplo los alquilantes, la radiación ultravioleta, la mitomicina C, entre otros (Kihlman y Andersson, 1984).

b) *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta)

El bioensayo de *Drosophila melanogaster* (mosca de la fruta) ha resultado ser uno de los más sensibles y de amplio rango en la detección de daño genético inducido, permitiendo detectar efectos a nivel somático (carcinogénesis), germinal (mutagénesis) y/o a lo largo del desarrollo embrionario (teratogénesis), además de poder detectar cambios desde una sola base nitrogenada, hasta grandes aberraciones cromosómicas, tanto numéricas como estructurales; *Drosophila*, posee un paquete enzimático semejante al del hígado de mamíferos (Cit. P450) que le permite evaluar efectos genotóxicos directos e indirectos en sistemas *in vivo*, y además recientemente se está utilizando como un biomonitor de contaminantes ambientales *in situ* (Hernández, 1993).

Una de las pruebas más recientes que se han implementado con este organismo para la caracterización de promutágenos y mutágenos, tanto de acción directa como indirecta es la prueba de "Mutación y Recombinación Somática (SMART)", la cual es una de las pocas pruebas somáticas *in vivo*, que no utilizan mamíferos, y que se pueden correlacionar con procesos carcinogénicos y recombinogénicos (Hernández, 1993).

La prueba de SMART se basa en la presencia de discos imágales en la larva de *Drosophila* los cuales son conjuntos de células indiferenciadas que se están dividiendo en la etapa larva y a través de la metamorfosis dan lugar a estructuras bien definidas en el organismo adulto (Fig. 8).

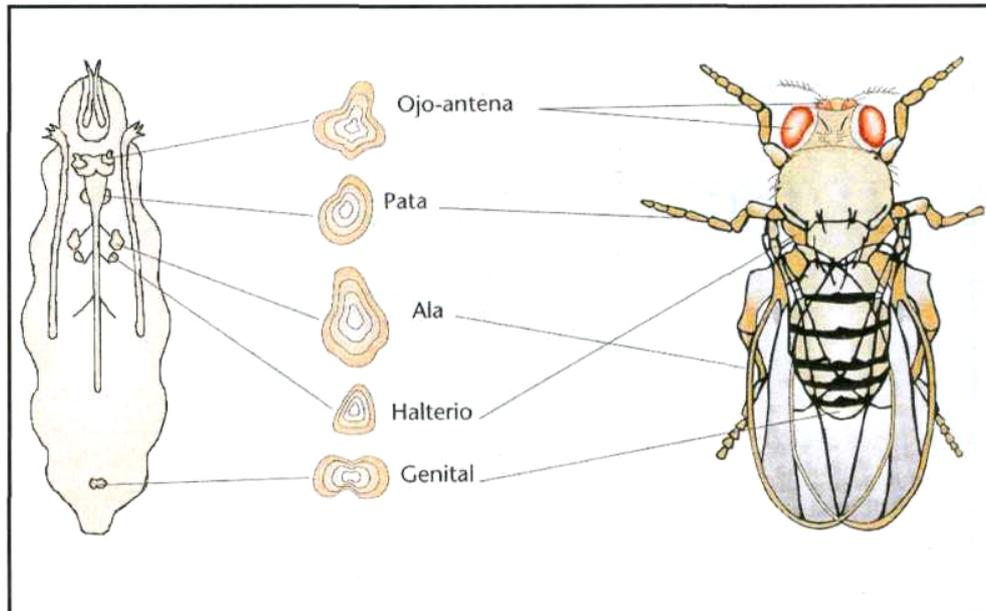


Figura. 8 Discos imágales en *Drosophila melanogaster* (Klug y Cummings, 2002).

Las células dañadas heredan su alteración a las células hijas y dependiendo del número de divisiones es el tamaño de paquete de células con información alterada, el cual se le denomina clon celular y cuando expresan se ven como una mancha o paquete de células con otro fenotipo que las demás (Fig. 9).

Para que el clon celular sea evidente en el fenotipo se utilizan marcadores genéticos fáciles de identificar y se produce a través de cruzas específicas organismos heterocigóticos, que porten una información recesiva, la cual no se expresara a menos de que exista un daño genético (Gaytán, 1993).

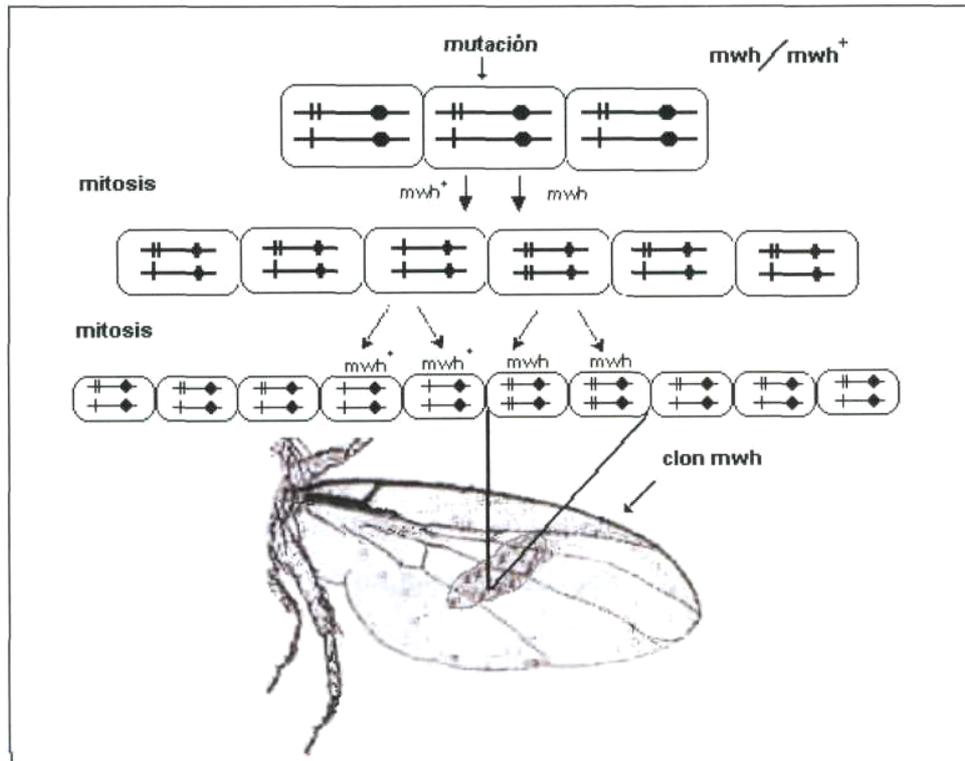


Figura. 9 Formación de un clon celular en el ala de *Drosophila melanogaster*.

En el caso de la técnica de SMART en *Drosophila*, existen dos variantes la prueba en ala y ojo:

En la prueba de ala, utiliza dos marcadores genéticos para obtener larvas transheterocigóticas:

mwh (3- 0.0) fenotipo múltiples pelos en ala

flr³/TM3 (3- 38.8) fenotipo flama y un balanceador TM3 que se requiere para el mantenimiento de la línea (Gaytán, 1993)

Se cruza macho **mwh** con hembras **flr³, TM3** y se obtiene larvas transheterocigóticas **mwh + /flr³ +**, y se evalúan en el ala los fenotipos **flr³** y **mwh** por separado como manchas sencillas y juntos como manchas dobles (Fig. 10).

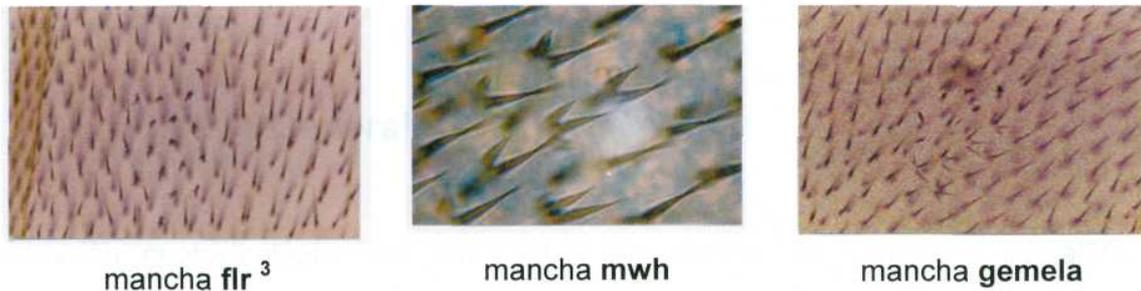


Figura. 10 Tipos de manchas o clones celulares en ala de *Drosophila melanogaster*.

En la prueba de ojo, se utiliza solo el marcador genético w (1-0.0) con fenotipo de ojos blanco contra la forma silvestre w^+ con fenotipo de ojos color rojo, formando larvas heterocigóticas (w / w^+) evaluando solo manchas blancas sobre un contexto silvestre en el ojo de los organismos adultos (Fig. 11).



Figura. 11 Tipos de manchas o clones celulares en el ojo de *Drosophila melanogaster*.

Con los dos bioensayos y con base en lo antes mencionado se pueden realizar estudios que complementen el conocimiento acerca de los efectos biológicos de los estrógenos y sus metabolitos, y determinar su vida media y cinética en el ambiente, además de las intrincadas formas de exposición a las cuales puede estar sujeto el ser humano.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo General:

Evaluación ecotoxicológica del estradiol y sus metabolitos primarios liberados al ambiente, a través de la actividad ganadera

2.2 Objetivos particulares:

1. Determinar la mejor técnica de cromatografía que permita detectar y cuantificar simultáneamente al estradiol y a sus dos principales metabolitos (estriol y estrona).
2. Evaluar la posible liberación al ambiente del estradiol y de sus dos principales metabolitos (estriol y estrona), mediante la técnica de cromatografía elegida, determinando la presencia y concentración de cada hormona en sangre, leche y orina.
3. Determinar la capacidad genotóxica del estradiol y de sus dos principales metabolitos (estriol y estrona) en un bioensayo vegetal, a través del análisis de alteraciones anafásicas y micronúcleos en haba (*Vicia faba*)
4. Determinar la capacidad genotóxica del estradiol y de sus dos principales metabolitos (estriol y estrona) en un bioensayo animal, a través de la Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART) en ojos y alas de la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*)

3. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

3.1 Análisis Químico:

Para la valoración de los compuestos químicos en los diferentes substratos, se analizó primero la sensibilidad de las cromatografías de líquidos y de gases respectivamente, partiendo de las recomendaciones de la Agencia de Protección al Ambiente (EPA) de los Estados Unidos.

Para calibrar ambas cromatografías se utilizó estradiol y sus dos principales metabolitos (estrone y estriol) en grado reactivo, Estradiol (E8875), Estriol (E1253) y Estrone (E9750) de marca Sigma- Aldrich.

Las condiciones experimentales en las que se montó la cromatografía de gases masas GC/MS fueron las recomendadas por el proveedor (Muñoz-Guerra *et al.*, 2003), las cuales son:

Técnica:	GC/MS
Software:	6.1.2.0.1:D19
Instrumento:	Serie 2000 Perkin Elmer
Columna:	Capilar CO-SIL 5, 25m x 0.25mm
Flujo:	1ml/min.
Inyector de temperatura:	280° C.
Modo y volumen de Inyección:	Manual /1.0 µl
Tiempo:	15 min.
Línea de transferencia:	300° C.
Programa de calentamiento:	120° C por 1.6 seg, 50° C por min hasta llegar a 200° C, entonces calentar 2° C/ min hasta llegar a 245° C, posteriormente calentar a 25° C / min hasta llegara 300° C y dejar 5 min.

Las condiciones experimentales en las que se montó la cromatografía de líquidos HPLC, de igual forma fueron las recomendadas por el proveedor (aplicación Variant 1487-2003):

Técnica:	HPLC
Columna:	Intersil % ODS-3
Fase móvil:	Acetonitrilo/ agua (50-50)
Flujo:	1ml/min.
Temperatura:	40° C.
Detector:	UV-detector, $\lambda = 220$ nm.
Modo y volumen de Inyección:	Manual /10 μ l
Tiempo:	15 min.

3. 2 Selección de animales y dosificación

a) Selección de animales

Los organismos experimentales se seleccionaron del "Rancho Universitario" de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, ubicado en los linderos de la ciudad de Tulancingo, Hidalgo, conocida también como la ex hacienda la Aquetzalpa, el cual produce leche y derivados lácteos (Fig.12).

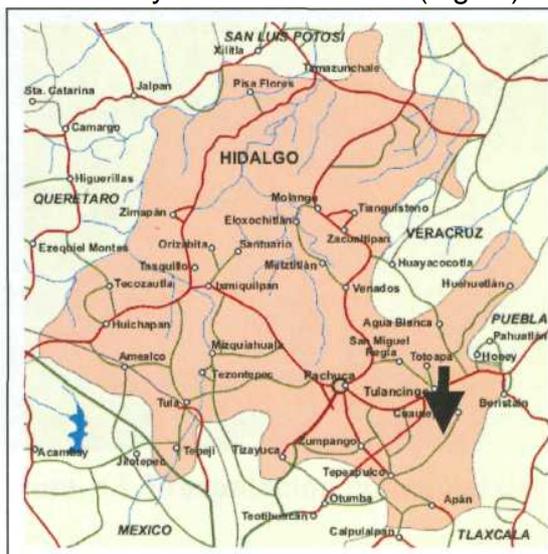


Figura. 12 Área de estudio y ubicación con base a la Cd. de Pachuca, Hidalgo.

Se trato experimentalmente a cinco vacas adultas que no estaban en calor (estro) y que no se pensaba sacrificar en un periodo mínimo de 70 días, permitiendo que ocurra la desintoxicación completa (Fig.13).

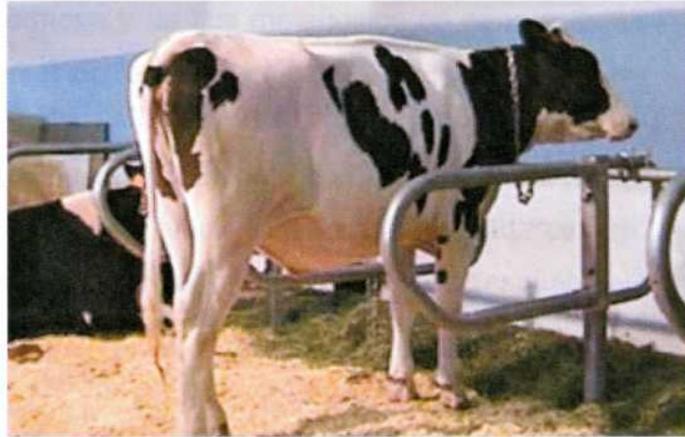


Figura. 13 Animal seleccionado en la fase experimental.

b) Tratamiento en vacas

La presentación comercial del medicamento es en ampolleta de estradiol (Wittney de México), la cual contiene 2 mg de cipionato de estradiol por cada 10 ml, y la dosis recomendada en vacas adultas en ausencia de calor es de 2.5 ml diarios por vía intravenosa por cinco días (Lawrence, 1999) (Fig. 14).



Figura. 14 Presentación comercial del estradiol.

Con base en lo anterior se diseñaron dos tratamiento consecutivos de cinco días de cada uno, con cinco días de recuperación entre el primer y segundo tratamiento, y cinco días al final; con el objetivo de evaluar como aumenta y disminuye la concentración de la hormona y de sus metabolitos en sangre, orina y leche durante el tratamiento y su recuperación toxicodinámica.

El objetivo del segundo tratamiento con su respectiva recuperación fue evaluar las concentraciones y el posible efecto acumulativo de cada una de las tres hormonas, en el caso de que no se regresara a los niveles basales después del primer tratamiento.

El muestreo de sangre, orina y leche se inició antes del primer tratamiento, lo que se denomino tiempo cero (T_0) y se tomó como testigo negativo, el cual permitió conocer los niveles basales del estradiol y sus metabolitos para poder determinar si existe o no incremento de alguna de las hormonas al finalizar cualquiera de los dos tratamientos. Para evidenciar lo anterior, se muestreo cada 24 horas después del día cero durante los 20 días siguientes, que abarcan los dos tratamientos y sus respectivos periodos de recuperación (Fig. 15).



Figura. 15 Toxicodinámica del estradiol en el organismo experimental.

3.3 Técnicas de muestreo en sangre, leche y orina

- **Sangre:** Se inmovilizó al animal, posteriormente se desinfectó la superficie de inyección con alcohol al 70% en la región cervical sobre la cánula de la yugular, se localizó la yugular mediante presión para provocar la dilatación de ésta, se colocó el vacutainer en posición de uso (sin perforar el tapón), se introdujo una aguja calibre 21 ó 22 en el interior de la vena y se vació la sangre por escurrimiento en un tubo de ensaye con heparina y se mantuvo en congelación a -20° C para su posterior análisis.

Cada una de las muestras se preparó de acuerdo a una modificación de la técnica descrita (Britain *et al.* 1993) a través de una extracción clorofórmica (que separó la fase lipídica de la sangre en donde se encuentran las hormonas a evaluar), la cual consistió en:

- 1) Se tomaron 3 ml de sangre que se colocaron en un tubo vacutainer con K₃EDTA para evitar coagulación y posteriormente la sangre se congeló a -20° C para su transportación y análisis.
- 2) Una vez en el laboratorio, se procedió a descongelar la sangre a 20° C en baño María.
- 3) Para la extracción clorofórmica se tomaron 2 ml de sangre y se le agregaron 4 ml de cloroformo grado reactivo en una proporción de 1:2, homogeneizándose con una pipeta Pasteur.
- 4) Posteriormente se centrifugó a 1300 revoluciones por minuto (rpm) por 5 minutos, separándose la masa celular del cloroformo, el cual quedo en la parte inferior del tubo conteniendo los compuestos a evaluar.

5) El tejido celular se separó con una pipeta Pasteur agregándole 2 ml de cloroformo y se repitió la centrifugación. Posteriormente, se eliminó el tejido celular y se conservó el cloroformo al igual que en la etapa anterior.

6) Se juntaron los dos sobrenadantes de cloroformo en un tubo de ensaye agregándose 0.5 g de sulfato de sodio para eliminar el exceso de agua y con una pipeta Pasteur se transfirió el cloroformo sin tocar el precipitado a un nuevo tubo.

7) El cloroformo se dejó evaporar a sequedad para concentrarlo, a baño María a una temperatura máxima de 40°C.

8) Una vez eliminado el cloroformo de la muestra, se restituyó con 1 ml de cloroformo o acetonitrilo HPLC y se derivatizó con bis-Trimetilsililtrifluoroacetamida (BSFTA) con 1% de Trimetilclorosilano (TMCS) - Cat Sigma t6381- como catalizador.

- **Leche:** Se tomó el primer litro de la ordeña de cada uno de los 21 días de experimentación, los cuales se mantuvieron en congelación a -20° C para su posterior análisis.

Cada una de las muestras de leche se calentó a no más de 40°C durante 15 minutos para inducir la separación de la fase lipídica (nata) en donde se encuentran las hormonas a evaluar; a ésta, se le realizó una extracción clorofórmica, de igual forma que a las muestras de sangre.

- **Orina:** Se inmovilizó al animal, posteriormente se realizó una desinfección en zona vulvar mediante solución concentrada de yodo, y a través de estimulación manual se indujo orinar al animal, en el momento en el que se observó salida de orina se recolectó en frascos estériles debidamente

etiquetados y finalmente se mantuvo en congelación a -20° C para su transportación y posterior análisis.

Las muestras se prepararon de acuerdo a la técnica descrita por la CNA (1989) y por Schánzer y Donike (1993), la cual consistió en:

1. A 3 ml de orina, se le adicionaron 250 μ l de solución estándar de metiltestosterona (10 ng/ml disuelta en metanol)
2. La solución estándar con la orina se pasó a través de una pipeta Pasteur (230 x 7 mm), a la cual se le adicionó 20 mm de resina sintética Serdolit AD-2, la cual fue previamente enjuagada con 2 ml de agua desionizada.
3. Se eluyó la muestra con 2 ml de metanol y se evaporó hasta que seque.
4. El residuo se disolvió en 1 ml de solución amortiguadora de fosfatos de sodio 0.2 M a pH 7 con 25 μ l de Beta-glucoronidasa de *Escherichia coli.*, y esta mezcla se incubó por una hora a 55° C.
5. El producto hidrolizado fue colectado a temperatura ambiente y se le adicionó 250 μ l de solución de carbonato de potasio al 7% entre pH 9 y 10.
6. La mezcla se extrajo con 5 ml de éter di-etílico en un secador mecánico por 5 minutos.
7. La fase orgánica se centrifugó al vacío a 1500 rpm por 5 minutos.

8. El residuo seco se derivatizó por 30 minutos a 60° C con 50µl de MSTFA /NH₄ / ditioeritritol en una proporción (1000:2:4 v/p/p) y finalmente se restituyó a 3 ml con cloroformo HPCL.

Tanto en sangre, leche y orina se realizó una curva de calibración de tres mililitros con concentraciones de 100, 10, 1, 0.1 y 0.01 ppm con todas las condiciones antes mencionadas para poder establecer la concentración de cada una de las tres hormonas evaluadas.

3.4 Pruebas preliminares de toxicidad

Tanto para el haba (*Vicia faba*) como para la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) se elaboró una curva de toxicidad con al menos tres concentraciones para determinar dosis subtóxicas.

- En *Vicia faba* se midió la citotóxicidad, para determinar, si a través de la toxicidad se encubre un efecto genotóxico, esta se estableció a través de un análisis del índice mitótico (IM), el cual consiste en un tratamiento corto de 4 horas de exposición y 2 de recuperación, evaluándose el número de células en división para detectar el daño fisiológico provocado por agentes xenobióticos que pueda encubrir los efectos genotóxicos a través de la inhibición de la división celular.

El índice mitótico se calcula a partir de la siguiente fórmula:

$$\text{IM} = \text{Número de células en división} / \text{número de células totales}$$

Dicho tratamiento contempla un testigo negativo de solución salina al 5% y tres concentraciones experimentales seleccionadas arbitrariamente (Lechuga et al., 2002) de 1, 10, y 100 ppm por cada

hormona y su análisis estadístico es a través de la prueba de diferencia de proporciones (Valencia, 1992).

- En el caso de la mosca de la fruta, se determinó la toxicidad a través del "índice de sobrevivencia", el cual se identifica con el porcentaje de individuos sobrevivientes a las 24 horas por concentración de compuesto. Este último se realizó a través de un tratamiento agudo a larvas de 72 horas de edad, Posteriormente se colocaron las larvas en un tubo de ensaye con sacarosa y el compuesto a evaluar durante 24 horas, la sacarosa proporcionó palatabilidad a la solución (un sabor agradable) asegurando la ingesta de ésta por las larvas (Gaytán, 1993).

Las larvas se obtuvieron a partir de un cultivo con gradiente de glucosa al 60%, lo que provoca que éstas floten y por decantación se puedan atrapar con un embudo y una malla fina.

El índice de sobrevivencia, mencionado anteriormente, permite establecer la concentración letal (CL) la cual está determinada por:

$$CL = \text{Número de sobrevivientes} / \text{Número de individuos tratados}$$

3.5 Potencial genotóxico en Haba (*Vicia faba*).

Se identificó alteraciones anafásicas y micronúcleos en interfase de células del meristemo apical de la raíz del haba previamente tratadas, valorando principalmente la actividad clastogénica, estandarizándose la capacidad de detección inicial con el compuesto puro (estradiol) y sus metabolitos (estrone y estriol) a dosis subtóxicas.

a) Germinación

Se lavan en agua corriente durante 2 horas, posteriormente se sumergen en agua por 24 horas a 21 °C en oscuridad y se vuelven a lavar durante 10 minutos, después se colocan entre dos capas de algodón humedecido y se mantienen en oscuridad nuevamente a 21 °C hasta que aparecen las radículas, en ese momento se quita la testa para evitar la contaminación por hongos. Cuando las raíces alcanzan de 4 a 5 cm de longitud se separan en lotes de 5 a 6 plántulas (Fig. 16).



Figura. 16 Habas germinando.

b) Tratamiento

El criterio para seleccionar la concentración de 10 ppm para ser evaluado su efecto genotóxico independientemente de sus citotóxicidad se sustentó en un índice de comparación con el otro bioensayo experimental en valoración simultánea. Para determinar la inducción de aberraciones cromosómicas en anafase y micronúcleos en interfase se montaron los siguientes experimentos (Fig. 14):

- El primero consistió en 1 hora de tratamiento sin recuperación para verificar si hay efecto en la profase, el cual se manifiesta en anafase como aberraciones subcromatídicas y únicamente se origina por un agente S-independiente (efecto no retardado).

- El segundo consistió en 4 horas de tratamiento y dos de recuperación para evaluar el daño provocado en G2, el cual se expresa como aberraciones cromatídicas y solamente son inducidas por agentes S-independientes.
- El tercer experimento consistió de un tratamiento de 4 horas con 14 de recuperación para evaluar el daño inducido en G1, el cual se manifiesta como una aberración cromosómica (se produce por agentes S-independientes) o cromatídica (se induce por un agente S dependiente).
- El cuarto experimento consistió de un tratamiento de 4 horas y 44 de recuperación, el cual permitió evaluar el daño inducido en G2 por un agente S-dependiente, el cual se expresa como aberración cromatídica.

En todos los experimentos las raíces se expusieron de manera independiente a 10 ppm de cada una de las tres hormonas (estradiol, estriol y estrona) por triplicado con un testigo negativo de solución salina al 5% (Fig.17). Se obtuvo un total de 30 lotes experimentales, los cuales se mantuvieron con aireación constante a 20°C en oscuridad absoluta, para favorecer la división celular ([Gómez-Arroyo y Villalobos-Pietrini 1994](#)).



Figura. 17 Haba en tratamiento.

c) Fijación

Tanto a las raíces tratadas con las hormonas como a los testigos, se les cortaron 2 mm de la punta (meristemo apical), se fijaron en etanol-ácido acético (3:1) y se dejaron en el congelador en frascos envueltos con papel aluminio por 24 horas.

d) Tinción

Se colocaron los meristemas en etanol al 70% durante 15 minutos. Se hidrolizaron con ácido clorhídrico 5 N a 28°C durante 25 minutos con agitación continua. Posteriormente, se decantó el excedente del ácido y se lavaron los meristemas 3 veces con agua destilada. A partir de aquí se inició la tinción. Se colocaron los meristemas en portaobjetos excavados, se agregó reactivo de Schiff dejando 15 minutos en oscuridad, después se transfirieron a portaobjetos planos etiquetados, se agregó ácido acético al 45% y sobre el cubreobjetos se realizó el aplastamiento en monocapa denominado "squash".

e) Análisis microscópico

Antes de dar inicio a este análisis, se requiere reetiquetar las preparaciones para realizar el análisis ciego.

Para la determinación del índice mitótico se cuantificaron al menos 1000 células, registrándose tanto aquellas que se encuentran en cada una de las etapas de la mitosis como en interfase.

Para el registro de alteraciones cromosómicas Se realizó con un aumento de 400X revisando toda la laminilla y contando al menos 500 células en anafase, así como registrando alteraciones tales como: fragmentos sencillos y dobles, puentes cromosómicos sencillos y dobles, cromosomas con el centrómero inactivado e isocromosomas.

Para el análisis de micronúcleos, se determino la frecuencia de éstos, mediante su identificación en 1000 células en interfase, a través de la siguiente fórmula:

$$fMN = nMN / (nMN + nCM)$$

donde:

fMN = frecuencia de micronúcleos en células meristemáticas

nMN = número de micronúcleos en células meristemáticas

nCM = número de células meristemáticas

f) El análisis estadístico:

Para las aberraciones cromosómicas se aplicó la prueba de diferencia de proporciones.

Para la evaluación de micronúcleos, cuando tienen un comportamiento binomial se les aplica la prueba de ji-cuadrada (χ^2) para determinar la significatividad estadística (Fig. 18).

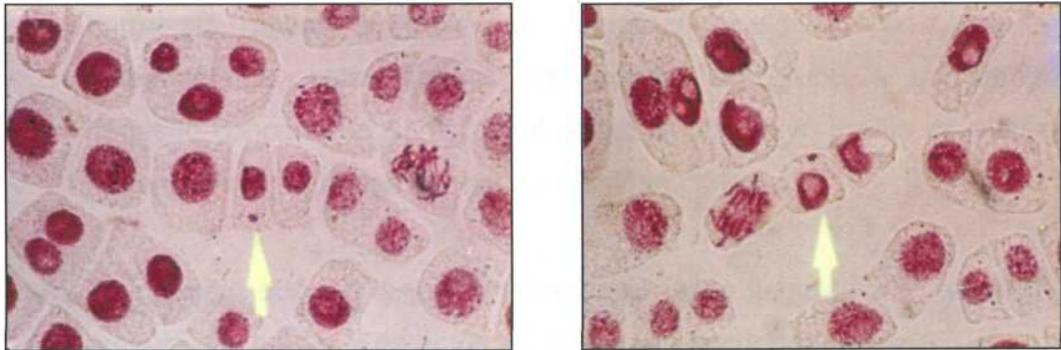


Figura.18 Micronúcleos inducido por agentes químicos en haba (*Vicia faba*).

3.6 Potencial genotóxico en la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*)

Para esta fase experimental, se utilizó la prueba de mutación y recombinación somática (SMART) en moscas de la fruta (*Drosophila melanogaster*) en ojo y en ala de manera independiente. Para determinar el potencial genotóxico del estradiol y de sus dos principales metabolitos, se realiza a través de la frecuencia y tamaño del clones celulares; en el caso de ojo con fenotipo **w** (ojo color blanco) y en el caso de ala con fenotipos **flr³** (pelos en el ala en forma de flama), **mwh** (múltiples pelos en el ala) o ambos (Gaytán, 1993).

- La crucea progenitura en ojo, fue hembras (**w / w**) con machos (**w⁺ / Y**) y en ala, fue hembras (**mwh / mwh**) y machos (**flr³ / TM3 Ser**).
- En ambas cruces, se obtuvieron larvas heterocigóticas a los 10 días después de la crucea, las cuales se separaron a través de un gradiente con sacarosa al 60%, y se colocaron en frascos con medio de cultivo con estradiol a tres concentraciones subtóxicas (CL₁₀, CL₂₀ y CL₅₀).
- A partir de la concentración más genotóxica del estradiol en el primer tratamiento, se eligió ésta para exponer a las larvas con las tres

hormonas, para evaluar su efecto genotóxico de manera independiente, colateralmente se expuso un grupo a un testigo negativo concurrente con alcohol etílico al 5%, cuyo medio de cultivo no tenía ninguna de las hormonas (Gaytán, 1993).

- Se permitió que las larvas antes mencionadas llegaran a la etapa de organismos adulto, y en éstos, se evaluó el efecto genotóxico:
- En el caso de ojos, se evaluaron con un microscopio estereoscópico con un lente auxiliar 4X, sumergiendo a las moscas en un solución de alcohol etílico al 96% y glicerina en una proporción 2:1 para hacer más evidente los clones celulares de una o dos células y evitar reflejos, analizando como mínimo la superficie de 500 ojos por concentración.
- En el caso de alas, se montó inicialmente en un porta objetos 20 pares de alas en solución Faüre, se prensan con un cubre objetos, se dejó por 48 horas, posteriormente se eliminó el exceso de solución Faüre y se analizó ambas superficies del ala con microscopio óptico a 4000x hasta completar como mínimo un total de 120 alas por concentración (Gaytán, 1993).
- El tamaño y frecuencia de dichos clones celulares permite determinar los mecanismos y el potencial genotóxico. En cambio el tipo de clon indica el mecanismo genético bajo el cual se ejerce el daño, según la técnica establecida por Frei y Würngler (Graf, 1984; Gaytán, 1993; Graf,1994)

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

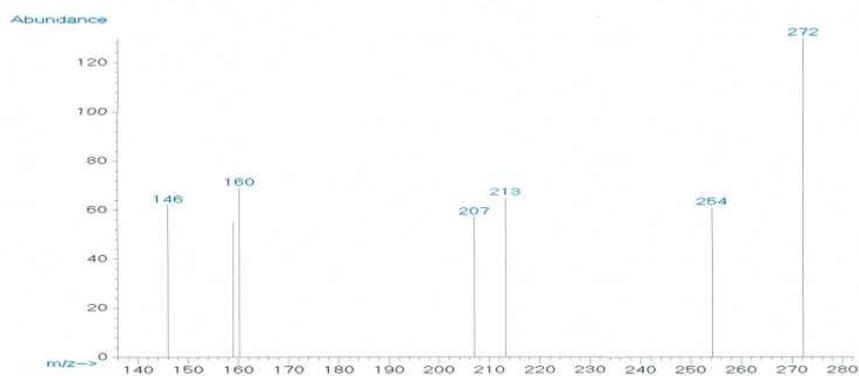
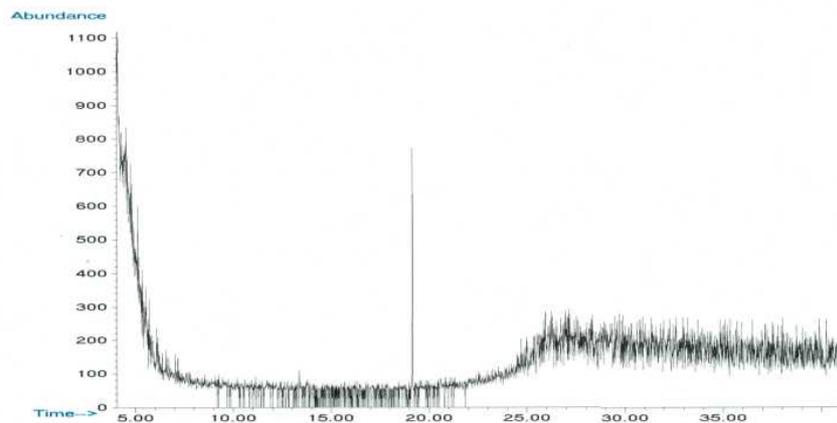
La presente investigación esta construida con una visión multidisciplinaria, en la primera etapa se hace uso de técnicas analíticas, mismas que permiten detectar y cuantificar la presencia de la hormona estradiol y sus dos principales metabolitos (estrone y estriol) en fluidos corporales de vacas tratadas terapéuticamente. En una segunda etapa, se evaluó el efecto genotóxico de las hormonas y/o sus metabolitos excretados a través de leche y orinal.

4.1 Selección de la técnica de analítica más adecuada

a) Cromatografía de gases masas GC/MS

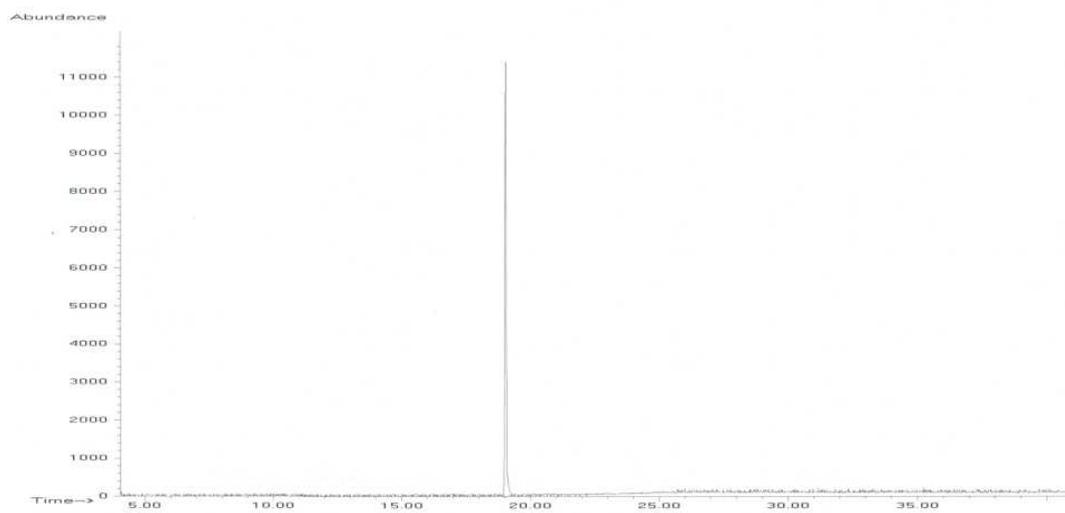
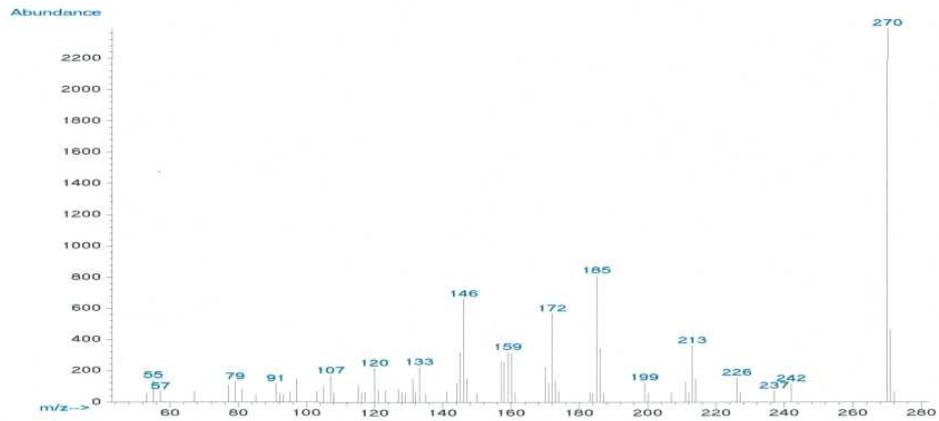
El análisis de residuos y contaminantes en fluidos corporales y en alimentos, conlleva a determinar sustancias que se encuentran en cantidades muy pequeñas en el orden de $\mu\text{g}/\text{Kg}$. o menores; con base en lo anterior, los resultados esperados en este trabajo, son en primer orden, la búsqueda de la mejor técnica cromatográfica a utilizar, basándose en su capacidad de detectar, cuantificar y diferenciar a las tres hormonas de manera simultánea.

Como se mencionó en la metodología, se partió de las especificaciones recomendadas por la casa comercial para la detección del estradiol, donde se puede observar en las figuras 19, 20 y 21 y en la tabla II en la que se muestra las concentraciones a las que pudieron ser detectadas bajo esta técnica. Evidenciando para el caso del estradiol una buena sensibilidad por GC/MS (0.00125 ppm). Para el caso de la estrone, se detectó hasta una sensibilidad de 0.1 ppm; mientras que para el estriol se detectó a partir de 1 ppm, lo que es una limitante, ya que, se busca detectar a concentraciones bajas y de manera simultánea a las tres hormonas.



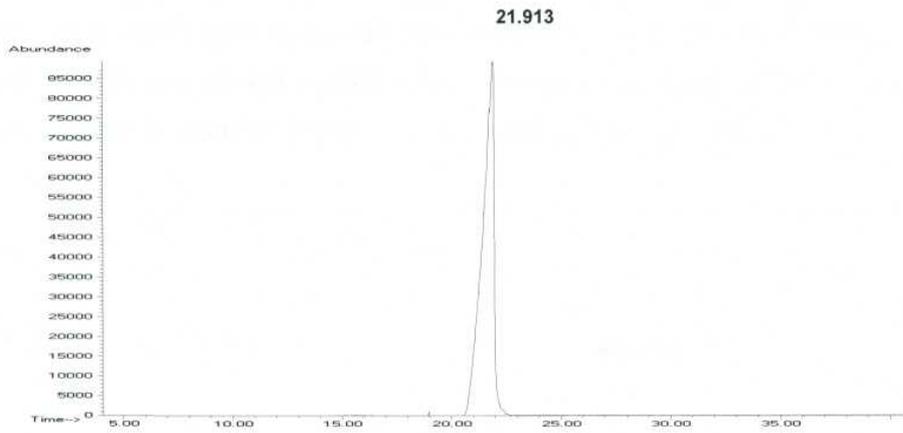
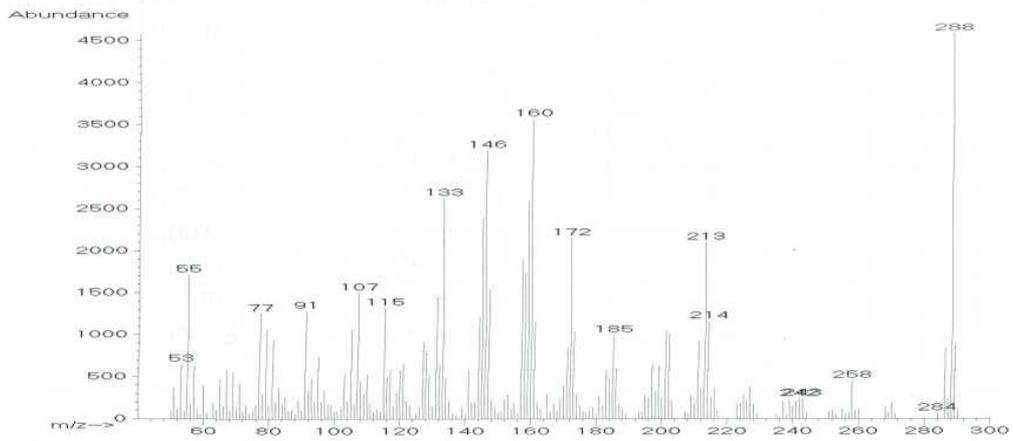
Tiempo de retención	Área	Área %	Radio %
19.158	16410	85.925	100.000

Figura. 19 Cromatograma en el que se muestra la concentración menor en la que se detecta al estradiol (0.00125 ppm) mediante la técnica de CG/MS.



Tiempo de retención	Área	Área %	Radio %
19.054	472752	100.000	100.000

Figura. 20 Cromatograma en el que se muestra la concentración menor en la que se detecta al estrona (0.001 ppm) mediante la técnica de CG/MS.



Tiempo de retención	Área	Área %	Radio %
21.913	33311176	100.000	100.000

Figura. 21 Cromatograma en el que se muestra la concentración menor en la que se detecta al estriol (1.0 ppm) mediante la técnica de CG/MS.

Tabla II. Sensibilidad de la CG/MG al estradiol y sus metabolitos.

Concentración (ppm)	Estradiol	Estrona	Estriol
100	Detectada	Detectada	Detectada
10	Detectada	Detectada	Detectada
1	Detectada	Detectada	Detectada
0.1	Detectada	Detectada	X
0.01	Detectada	Detectada	X
0.001	Detectada	Detectada	X
0.0005	Detectada	X	X
0.00025	Detectada	X	X
0.000125	Detectada	X	X

Con base a lo anterior, se eligió la concentración de 1ppm como la mínima para detectar simultáneamente las tres hormonas, tal y como se observa en la figura 23. Al usar esta concentración se evidencio que se traslapan los picos de las curvas de dos de ellas (pese a que aplicó una rampa de temperatura tratando de separarlas, lo cual no fue posible) lo que era de esperarse debido a que el principio a través del cual se separan, es su peso molecular; lo cual nuevamente limita esta técnica.

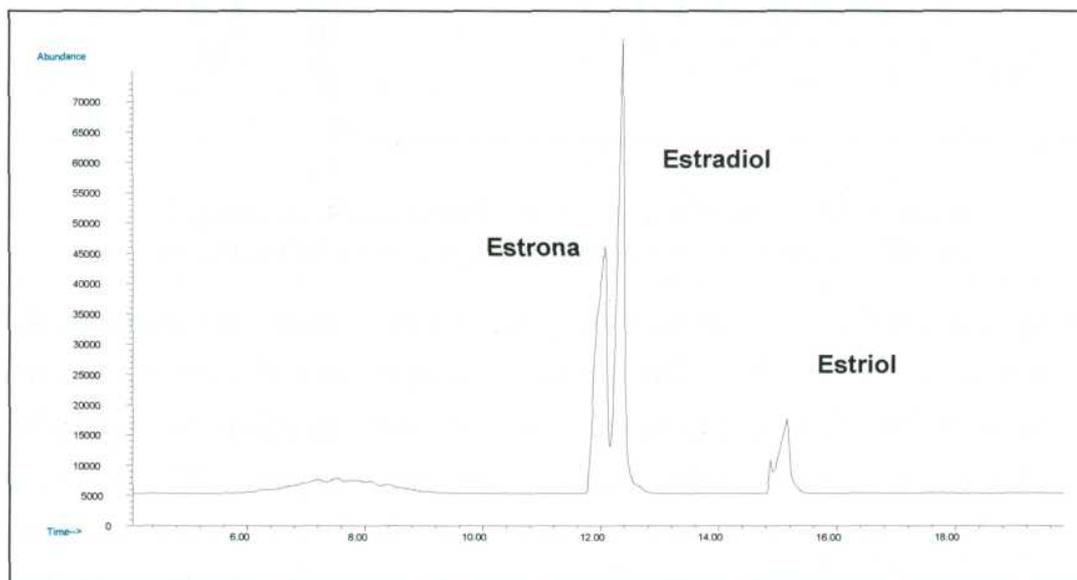


Figura. 22 Cromatograma en el que se muestra la mezcla de estradiol, estrona y estriol a 1 ppm mediante la técnica de CG/MS.

b) Cromatografía de líquidos HPLC

Con base en los resultados anteriores, se procedió a evaluar una segunda técnica, siendo la cromatografía de líquidos (HPLC) acoplada a la detección con disposición ultravioleta-fotodiodo, debido a que la bibliografía la recomienda para la cuantificación de fito estrógenos en muestras biológicas (Franke y Custer, 1997 y Variant, 2003), partiendo de una exploración preliminar de UV, para corroborar si a 220 nm, era la longitud de onda óptima para detectar a las tres hormonas (Fig. 23).

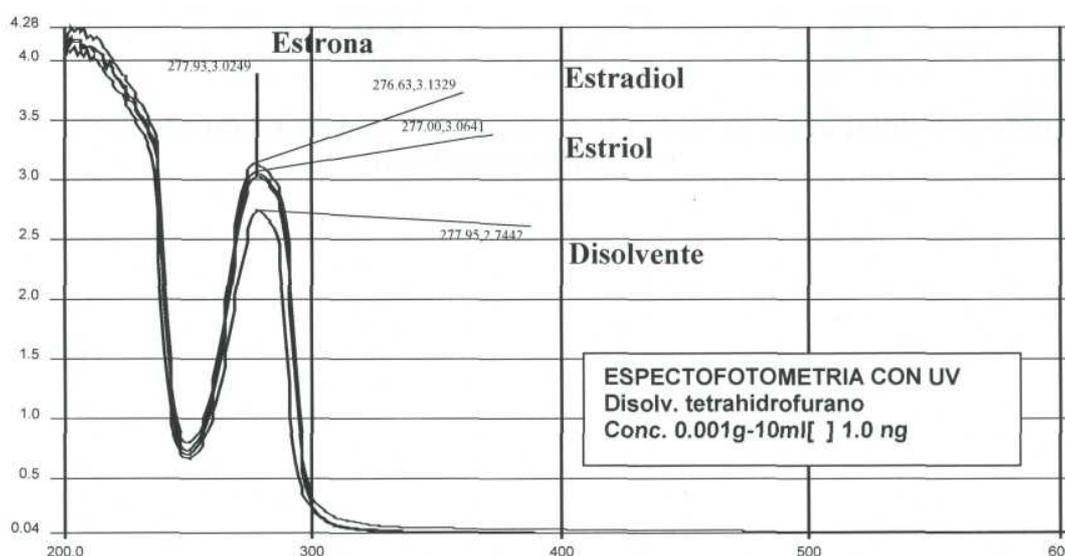
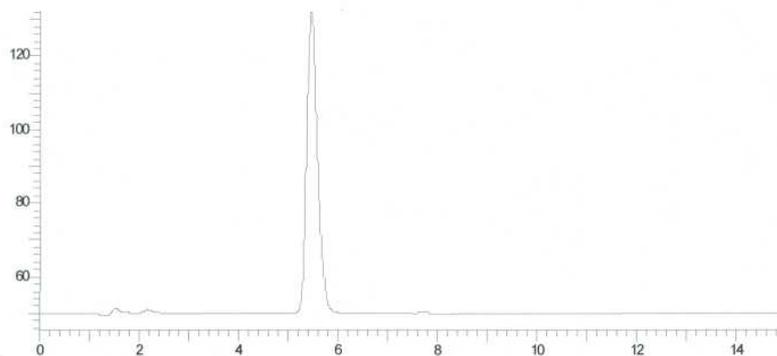


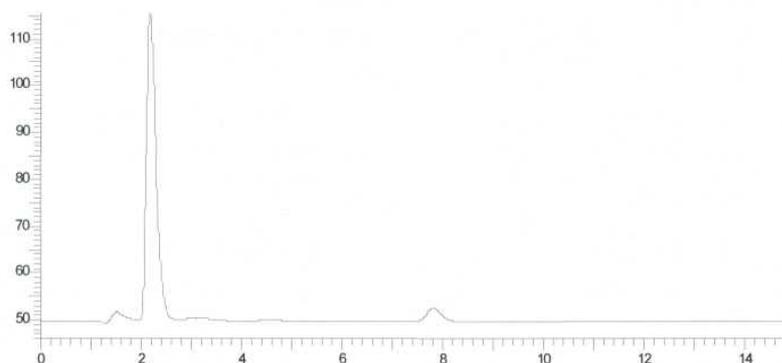
Figura. 23 Espectrofotometría UV, en donde se detecta al estradiol y sus dos principales metabolitos a 220 nm.

De los resultados experimentales con la técnica de HPLC, se pueden observar en las figuras 24, 25 y 26 que se pudo detectar perfectamente a la concentración de 100 ppm a cada una de las tres hormonas simultáneamente (Fig.27), y en esta última a diferencia de la CG/MS se puede delimitar con exactitud el área bajo la curva de cada una y por ende su concentración. Al correrse de manera independiente al acetonitrilo, el cual es el disolvente que se utilizó en esta cromatografía, se detectó (Fig. 28) que el disolvente presentaba un pico a los 7.6 minutos de retención, que se traslapa con el pico de la estrona (7.8 minutos), pero al restar el área bajo la curva del pico del disolvente al de la estrona, se puede calcular el área real para la hormona y por lo tanto su concentración.



PICO	TIEMPO (MIN.)	ÁREA	ÁREA (%)
1	5.467	1257186.70	95.22

Figura. 24 Cromatograma en el que se detecta el estradiol a 100 ppm mediante la técnica de HPLC.



PICO	TIEMPO (MIN.)	ÁREA	ÁREA (%)
1	2.188	889422.87	87.95

Figura. 25 Cromatograma en el que se detecta el estriol a 100 ppm mediante la técnica de HPLC.

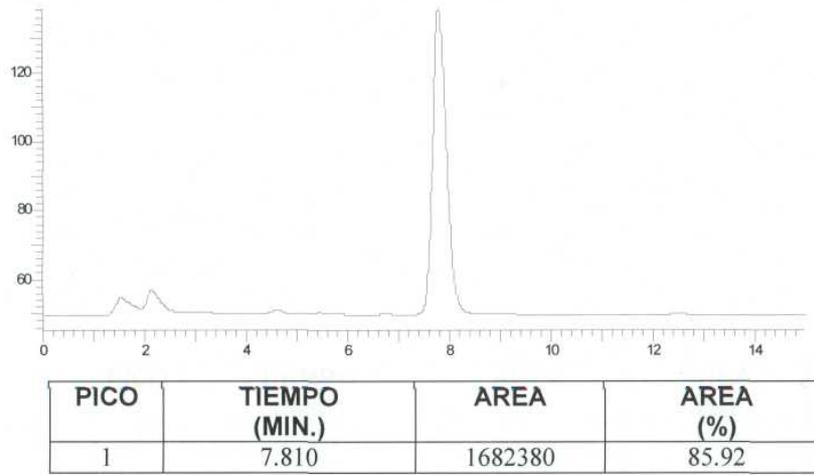


Figura. 26 Cromatograma en el que se detecta el estrona a 100 ppm mediante la técnica de HPLC.

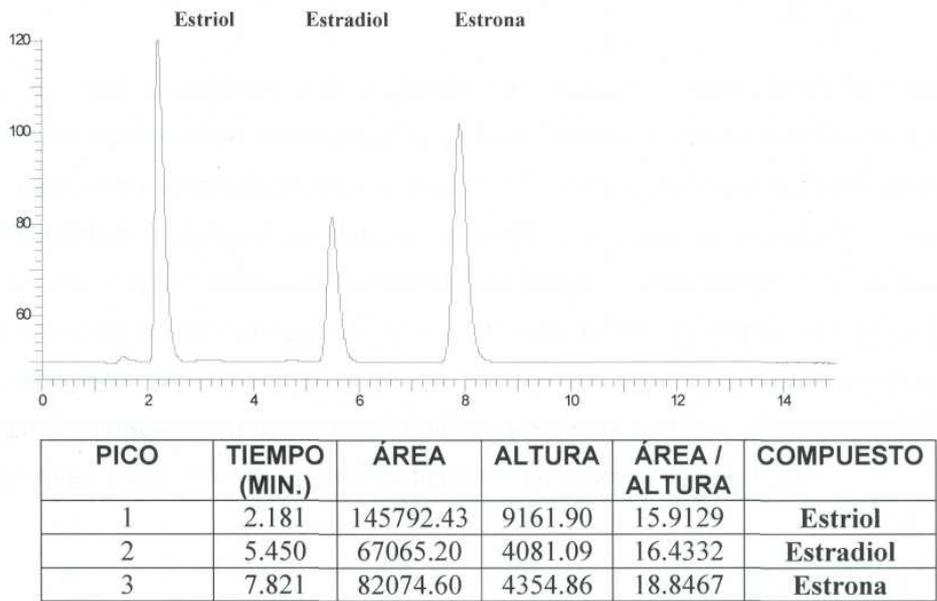
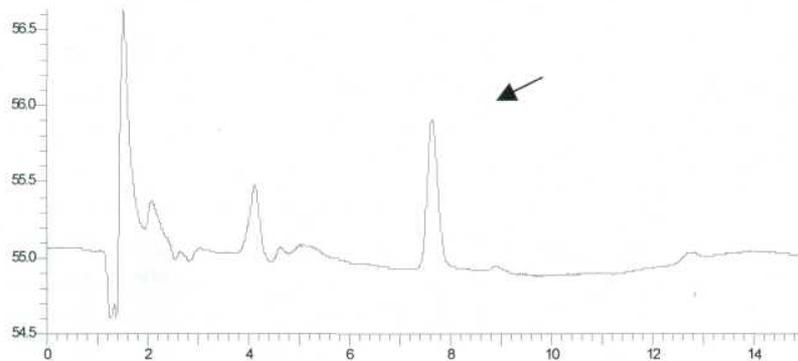


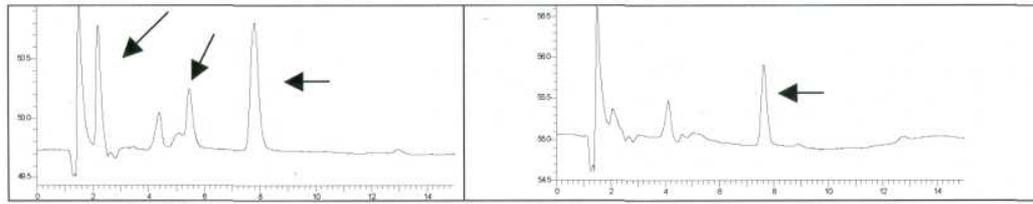
Figura. 27 Cromatograma en el que se detecta la mezcla de las tres hormonas a 100 ppm mediante la técnica de HPLC



PICO	TIEMPO (MIN.)	ÁREA	AREA (%)
1	1.526	32420	46
2	2.087	13533	19.46
3	4.137	6636	9.54
4	7.648	14105.8	20.28

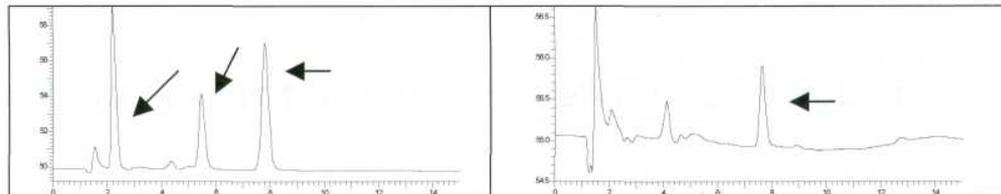
Figura. 28 Cromatograma en el que se detecta al acetonitrilo (disolvente) mediante la técnica de HPLC

Una vez que se estableció la capacidad de detectar y diferenciar de manera simultánea a los compuestos, se procedió a realizar diluciones con la mezcla de las tres hormonas, evaluando al mismo tiempo al disolvente, hasta determinar la concentración menor (sensibilidad) a la cual se detecta con HPLC a cada una de las hormonas presentes en una mezcla, sin que la lectura del disolvente impida conocer con exactitud la concentración de la estrona, que en este caso es la hormona problema; por lo que, como se puede observar en las figuras 29 a la 32, que la concentración de 0.01 ppm, es donde se puede establecer la mínima sensibilidad para esta técnica, nuevamente HPLC presenta ventajas sobre CG/MS en donde dicha concentración fue de 1 ppm.



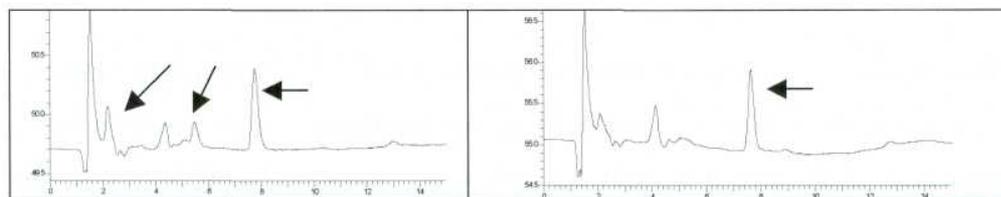
PICO	TIEMPO (MIN.)	ÁREA	ALTURA	ÁREA /ALTURA		COMPUESTO
1	2.204	16535.36	1189.59	13.9000		Estriol
2	5.478	7509.62	476.47	15.7610		Estradiol
3	7.811	20609.40	1063.47	19.3794	4.944	Estrona
4	7.648	14105.80	977.17	14.4354		Disolvente

Figura 29. Cromatograma en el que se detecta las tres hormonas a 10 ppm mediante la técnica de HPLC



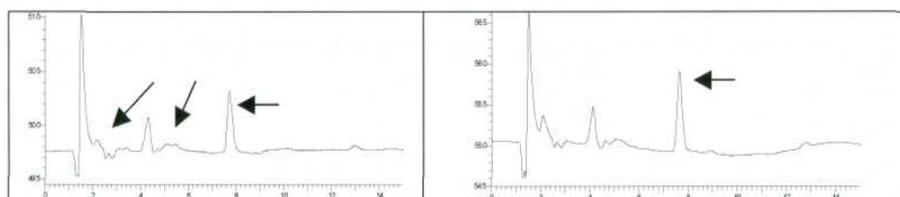
PICO	TIEMPO (MIN.)	ÁREA	ALTURA	ÁREA /ALTURA		COMPUESTO
1	2.205	117853.73	933.89	12.6264		Estriol
2	5.465	64945.48	4235.74	15.3327		Estradiol
3	7.804	128781.20	7186.29	17.9204	3.485	Estrona
4	7.648	14105.80	977.17	14.4354		Disolvente

Figura 30. Cromatograma en el que se detecta las tres hormonas a 1.0 ppm mediante la técnica de HPLC



PICO	TIEMPO (MIN.)	ÁREA	ALTURA	ÁREA /ALTURA		COMPUESTO
1	1.537	20296.80	1361.17	14.9112		Estriol
2	5.484	2536.80	181.57	13.9717		Estradiol
3	7.757	11126.90	678.59	16.3972	1.9618	Estrona
4	7.648	14105.80	977.17	14.4354		Disolvente

Figura 31. Cromatograma en el que se detecta las tres hormonas a 0.1 ppm mediante la técnica de HPLC



PICO	TIEMPO (MIN.)	AREA	ALTURA	AREA /ALTURA		COMPUESTO
1	2.173	1663.80	123.77	136522		Estriol
2	5.087	187.50	16.88	11.1051		Estradiol
3	7.723	8507.40	565.54	15.0431	0.6077	Estrona
4	7.648	14105.80	977.17	14.4354		Disolvente

Figura 32. Cromatograma en el que muestra la concentración menor a la que se detectan simultáneamente las tres hormonas (0.01 ppm) mediante la técnica de HPLC

4.2 Evaluación de las tres hormonas en fluidos corporales

a) Evaluación en sangre

Elegida la cromatografía de líquidos HPLC, para la evaluación simultánea del estradiol y sus metabolitos, aun existe variables por determinar. Una de ellas se presenta cuando se busca la detección de compuestos presentes en fluidos corporales en matrices complejas como en: orina, sangre y leche. La especificada del método de detección se vuelve altamente importante, para ello se requieren procedimientos extensos de purificación para eliminar compuestos no deseados antes de su análisis (Barnes 1997).

En el caso de la evaluación de la concentración del estradiol y sus metabolitos en sangre, fue a través de una modificación de la técnica descrita Britain y col. (1993) como ya se mencionó anteriormente; para ello, se realizó previamente una curva de calibración (Fig. 33), a través de someter muestras a los procesos de purificación con concentraciones conocidas en sangre del día cero (sin tratamiento), para poder determinar la concentración basal de cada hormona, así como para poder conocer algunos parámetros de su toxicodinámica, como por ejemplo: la concentración plasmática máxima para una dosis y para más de una dosis, el índice de acumulación,

la constante de eliminación y la vida media del compuesto; lo que nos permite conocer que tanto del compuesto se está acumulando o que tan rápido se esta eliminado.

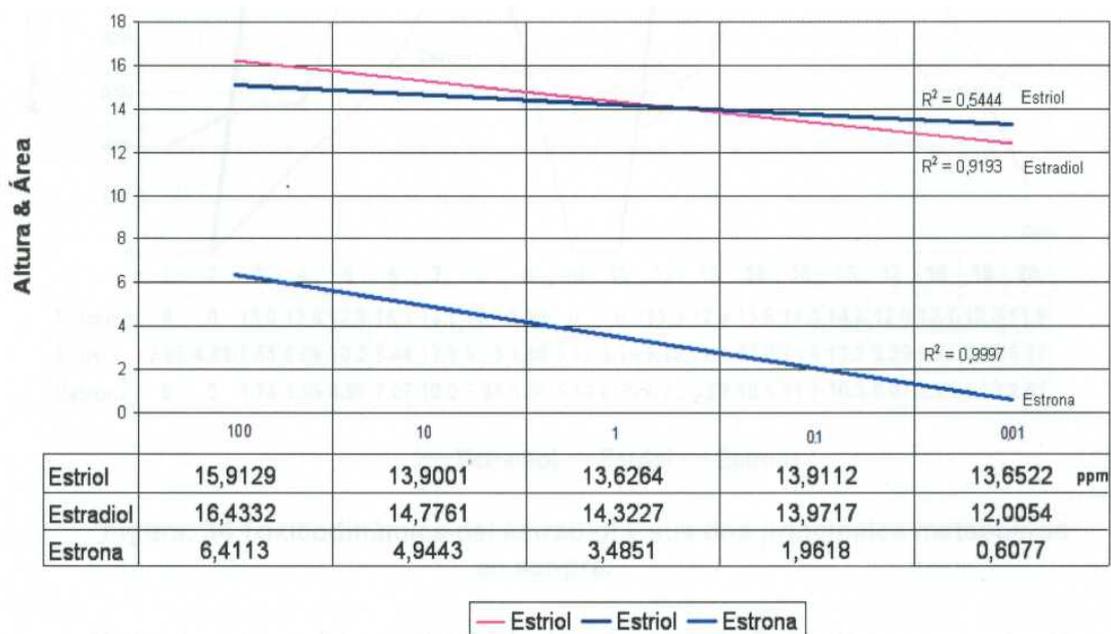


Figura. 33 Curva de calibración en HPLC del estradiol y sus dos principales metabolitos en sangre y leche

El área bajo la curva del estradiol y de sus dos principales metabolitos están reportados en la figura 34 y en la tabla III, donde se observa como el éste, aparece en sangre a partir del inicio del tratamiento, encontrando su concentración mayor en el primer tratamiento el día 6, disminuyendo entre el día 9 y 10 que equivalen al término del primer periodo de recuperación. Posteriormente, en el segundo tratamiento vuelve a aumentar la concentración hasta el día 14, disminuyendo nuevamente en el periodo de recuperación hasta el día 19, sin llegar a sus límites basales, pero en una clara decadencia, lo que permite asumir que en 5 ó 6 días el estradiol aparentemente sí se elimina al menos en sangre.

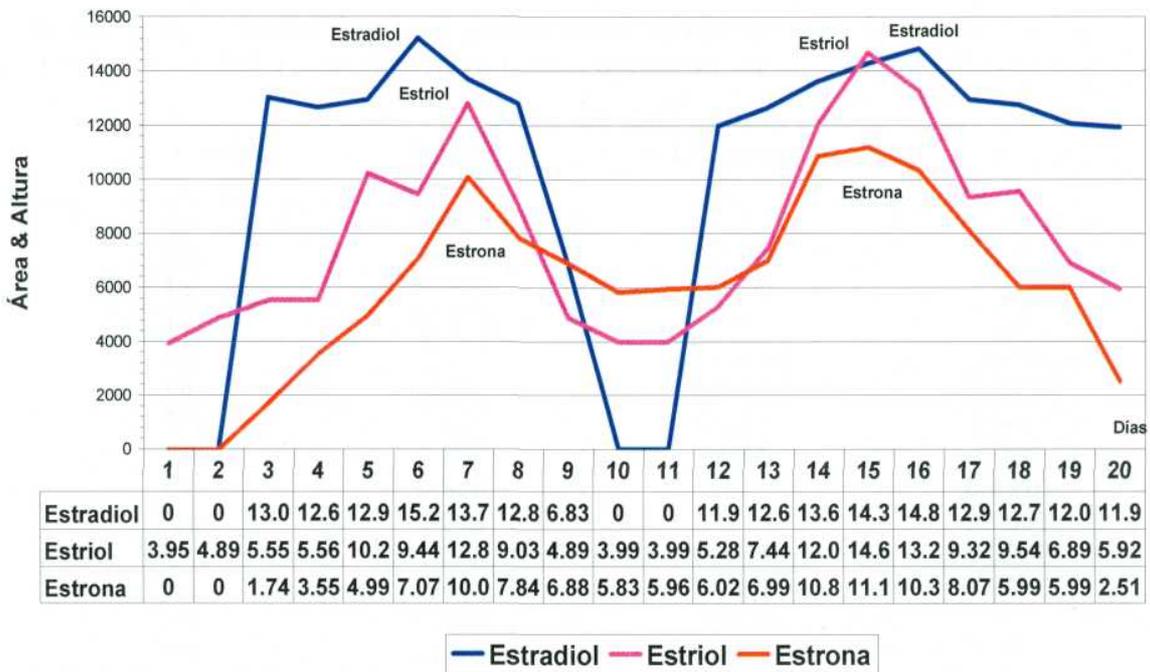


Figura. 34 Toxicodinámica del estradiol y sus dos principales metabolitos en sangre.

Ahora bien, si se observa al estriol y la estrona en la figura 34, su concentración máxima en sangre se alcanza después de la del estradiol, como productos de su metabolismo de este último, manteniéndose éstas en el primer tratamiento por debajo de la concentración de la hormona original, pero no bajando a los límites basales en el primer periodo de desintoxicación, por lo que, en el segundo tratamiento es evidente una bioacumulación principalmente del estriol, tal como se observa en la tabla IV a través su índice de acumulación; en donde, si la concentración plasmática para una dosis (C_{po}) es menor que la concentración plasmática máxima ($C_{p \text{ máx.}}$) para más de una dosis, existe acumulación de la sustancia para un modelo de tratamientos sucesivos; lo cual es congruente, con la vida media de cada una de las tres hormonas, en donde ésta aumenta considerablemente del tratamiento 1 al 2, y es inversamente proporcional a su constante de eliminación; por lo que, se puede concluir que en 5 días de recuperación, aparentemente, son suficientes para eliminar al estradiol en sangre después de un tratamiento. Sin embargo no así la de sus metabolitos; en donde, éstos al no tener un tiempo suficiente para ser eliminados, se bioacumulan al momento de un segundo tratamiento.

Tabla III. Concentración expresada a través de la relación área y altura bajo la curva del estradiol y sus dos principales metabolitos en sangre a través de HPLC

Experimental	Relación área y altura bajo la curva		
	Estriol	Estradiol	Estrona
To	3.950	0	0
T1	4.890	4.12	0
T2	5.556	13.039	1.7437
T3	5.562	12.666	3.5591
T4	10.229	12.968	4.9973
T5	9.448	15.232	7.0733
T6	12.801	13.704	10.0744
T7	9.034	12.820	7.8471
T8	4.892	6.834	6.889
T9	3.998	0	5.8310
T10	3.999	0	5.9656
T11	5.286	11.984	6.0260
T12	7.441	12.657	6.9996
T13	12.034	13.636	10.8631
T14	14.672	14.304	11.1840
T15	13.260	14.821	10.3403
T16	9.327	12.959	8.0733
T17	9.546	12.748	5.9999
T18	6.897	12.065	5.999
T19	5.925	11.933	2.512

Tabla IV. Parámetros estimados de la toxicodinámica del estradiol y sus dos principales metabolitos en sangre

Parámetros	Formula	Compuesto		
		Estriol	Estradiol	Estrona
Concentración plasmática para una dosis	(C _{Po})	12.801 (0.001 ppm)	14.352 (1 ppm)	10.074 (10 ppm)
Concentración plasmática máxima	(C max)	14.672 (10 ppm)	14.821 (5 ppm)	11.184 (7 ppm)
Índice de acumulación	(R) = C _p max / C _{po}	1.46	1.03	1.11
Constante de eliminación	(K _e) = y ₁ -y ₂ / x ₁ -x ₂	-1.97	-1.22	-1.41
Vida media	(T _{1/2}) = Ln 2 / K _e	0.35	0.67	0.49
Constante de eliminación	(K _e) = y ₁ -y ₂ / x ₁ -x ₂	-0.87	-0.36	-1.7
Vida media	(T _{1/2}) = Ln 2 / K _e	0.79	1.92	0.40

b) Evaluación en leche

En éste caso se utilizó al igual que en sangre, la técnica descrita Britain y colaboradores (1993); utilizando la misma curva de calibración (Fig. 32), en donde no se encontró a ninguna de las tres hormonas en los 20 días que abarcó el periodo experimental (datos no mostrados), lo que podría estar corroborando lo reportado bibliográficamente, en donde aproximadamente: el 90% de los metabolitos del estradiol son eliminados a través de la vías urinarias, el 10% por la bilis, y de manera muy limitada del orden de menos 0.01% por través de la leche (Fox y Whitesell, 2000).

c) Evaluación en orina

Para la evaluación de las tres hormonas, se utilizó la técnica descrita por Schánzer y Donike (1993), al igual que la sangre y la orina se determinó previamente una curva de calibración (Fig. 35), a través de someter a los procesos de purificación, muestras con concentraciones conocidas con orina del día cero (sin tratamiento), para poder determinar la concentración basal de cada hormona.

EL área bajo la curva del estradiol y de sus dos principales metabolitos se pueden ver en la figura 36 y en la tabla V, el primero en aparecer es el estriol al tercer día, posteriormente al cuarto el estradiol y finalmente al quinto la estrona. La posible explicación del porque aparecen en orina primero uno de los metabolitos es debido a que es metabolizado principalmente en el hígado, donde se conjuga para su excreción final, pero además existe una intensa circulación enterohepática, lo que hace que lo administrado sea nuevamente biotransformado y por lo tanto efectivamente distribuido en el resto del organismo, lo que culmina en una difícil eliminación del compuesto original (Internet; Fox y Whitesell, 2000).

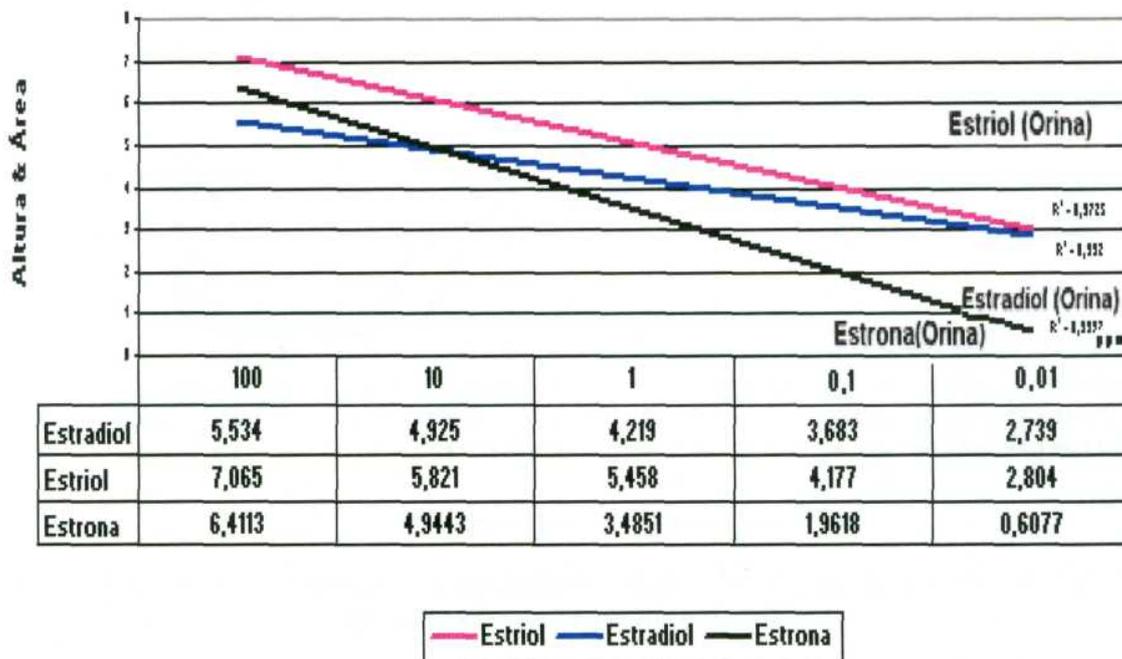


Figura. 35 Curva de calibración del estradiol y sus dos principales metabolitos a través de la técnica de HPLC.

Después del primer tratamiento (Fig. 36), se puede observar que la concentración en orina de la estrona (el segundo metabolito) es muy por encima del estradiol y del estriol. Además de que en el segundo tratamiento la eliminación de la estrona aumenta aun más, posiblemente por que el estradiol puede biotransformarse tanto en estrona como en estriol, y éste último, también puede biotransformarse en estrona. Lo que estaría evidenciando una importante liberación de las tres hormonas al ambiente a través de la orina, aunque principalmente de la estrona que pasa de concentraciones en orina de 1 ppm a 10 ppm de un tratamiento a otro (Tabla V y VI).

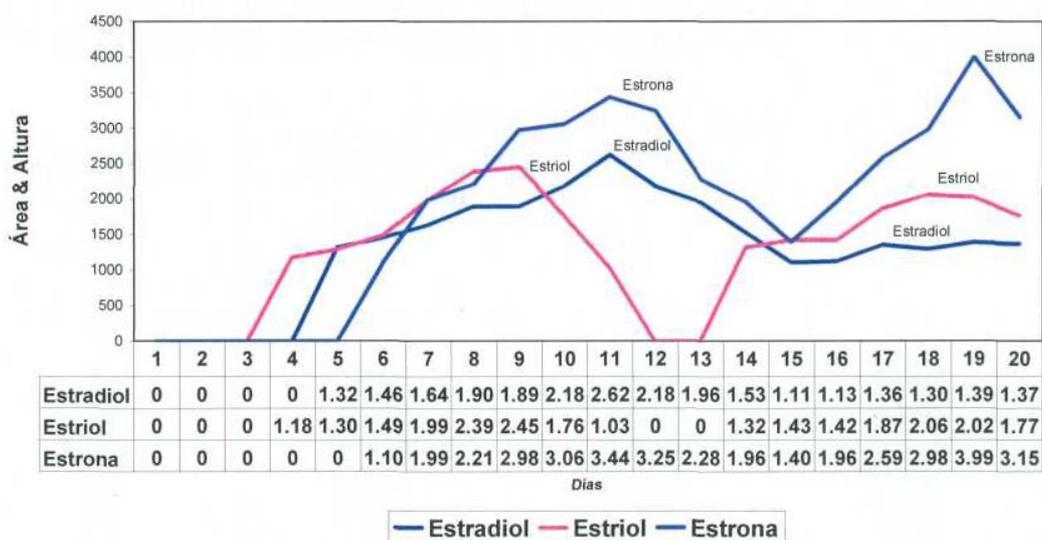


Figura 36. Excreción del estradiol y sus dos principales metabolitos en orina a través de la técnica de HPLC.

Lo anterior es de una alta preocupación, al asociarlo a ranchos ganaderos, en donde el estradiol se puede usar de manera cotidiana, para tratamiento de infertilidad o para aumentar la masa corporal del ganado, que al ser liberado éste junto con sus metabolitos a través de orina y llegar a canales de riego; queda claro el riesgo toxicológico por existir la posibilidad de contacto con otros organismos, con hortalizas e incluso con el propio ser humano, ya sea de manera directa o indirecta a través de rutas tróficas.

Los ensayos metabólicos, están destinados a establecer: el destino, velocidad de absorción, distribución, acumulación, así como su excreción, entre otros parámetros, depende notablemente de puedan influenciar en la toxicidad y/o efectos secundario de una sustancia, y variar significativamente de un individuo a otro, de una especie a otra, así como de un estado metabólico a otro; por lo que, se debe ser muy cauteloso al momento de interpretar resultados de este tipo de trabajos, sobre todo si requieren extrapolar al hombre.

Tabla V. Concentración expresada a través de la relación área / altura bajo la curva del estradiol y sus dos principales metabolitos en orina a través de HPLC.

Experimental	Relación área y altura bajo la curva		
	Estradiol	Estriol	Estrona
To	0	0	0
T1	0	0	0
T2	0	0	0
T3	0	1.184	0
T4	1.326	1.302	0
T5	1.463	1.495	1.107
T6	1.648	1.992	1.995
T7	1.903	2.399	2.218
T8	1.899	2.458	2.985
T9	2.188	1.765	3.069
T10	2.626	1.036	3.445
T11	2.181	0	3.255
T12	1.963	0	2.284
T13	1.536	1.324	1.969
T14	1.112	1.433	1.403
T15	1.132	1.428	1.965
T16	1.363	1.874	2.592
T17	1.300	2.062	2.988
T18	1.396	2.029	3.999
T19	1.370	1.770	3.152

Tabla VI. Parámetros estimados de la excreción del estradiol y sus dos principales metabolitos con HPLC en orina.

Parámetros	Formula	Compuesto		
		Estriol	Estradiol	Estrona
Concentración máxima de excreción para una dosis	Cu po	0.01 ppm	0.01 ppm	1.0 ppm
Concentración máxima acumulativa para dos dosis	Cu max	0.001 ppm	0.001 ppm	10 ppm
Índice de acumulación	(Ru) = Cu max / Cu po	0.01	0.01	10

En humanos el ciplaniato de estradiol es absorbido de manera rápida y completa, debido a su liposubilidad como ya se mencionó, inmediatamente se produce un éster esteroide que es disociado en estradiol y ácido valérico durante la absorción de éste, (primer paso hepático), al mismo tiempo, el estradiol es sometido a un metabolismo

adicional extenso (circulación enterohepática), que lo transforma en estrona, estriol y sulfato de estrona, lo que explica por que se encontró casi inmediatamente tanto estriol como estrona en sangre y orina (Fig. 34, 36 y 37), en donde también se puede explicar la diferencia en concentraciones entre los niveles circundantes en sangre y los excretados en orina.

La estrona, como metabolito estrogénico adicional en humanos, alcanza concentraciones plasmáticas aproximadamente 8 veces más elevadas que el estradiol del cual se originó según la bibliografía, en el caso del ganado vacuno en el presente trabajo sólo se observó en el segundo tratamiento un ligero incremento del 10% en sangre (Fig. 34) y del 100% en orina, donde aparentemente ya se esta excretando en grandes cantidades (Fig. 36), y aun no es significativo, debido a que la bibliografía refiere a un tratamiento con dosis múltiples, y en este trabajo solo se expuso a dos dosis consecutivas con un periodo de tiempo de recuperación de 5 días, en el cual se recuperó el nivel basal del estradiol, por lo que posiblemente si hubieran sido más tratamientos, se pudieran alcanzar los valores reportados en la bibliografía (Bhagaban, 1990).

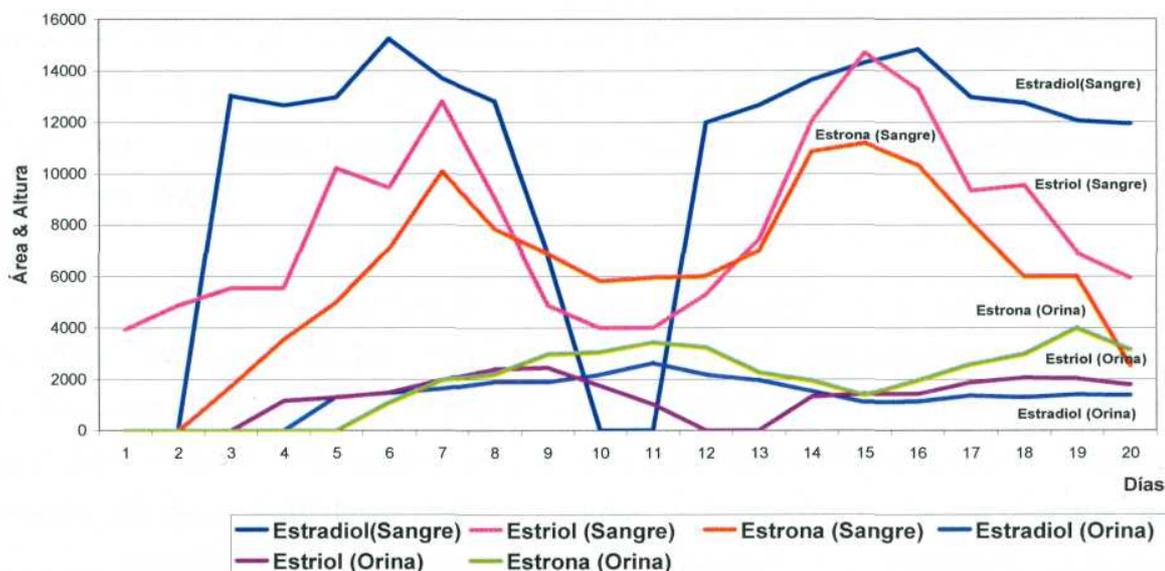


Figura. 37 Toxicodinámica y excreción del estradiol y sus dos principales metabolitos.

4.3 Evaluación del efecto biológico a través del daño genotóxico

El impacto biológico se midió en dos bioensayos: en habas (*Vicia faba*) a través de dos pruebas validadas en la bibliografía, la de inducción de alteraciones anafásicas y la inducción de micronúcleos; y como segundo bioensayo, a la mosca de la fruta (*Drosophila melanogaster*) con las pruebas de Mutación y Recombinación Somática (SMART), tanto en alas como en ojos.

a) Daño genotóxico en habas (*Vicia faba*)

En cuanto al efecto citotóxico en las células meristemáticas de la raíz del haba, a través del índice mitótico se observa en la tabla VII, que el estradiol, el cual es la hormona principal y el estriol, que es uno de los metabolitos, se manifiestan en un ligero efecto negativo sobre la proliferación celular en concentraciones menores (10 y 1 ppm); por otro lado con la estrona, que es el otro metabolito del estradiol, se observa que en ninguna de las tres concentraciones se manifiesta un efecto estadísticamente significativo capaz de inhibir la división celular; esto se puede explicar debido a que los estrógenos son fuertes inhibidores de la mitosis debido a su interacción con el huso acromático (microtúbulos y centriolos), al ADN y a proteínas reguladoras; el cual se puede ver afectado y/o favorecido dependiendo de la concentración y de su interacción con receptores biológicos y con iones metálicos; de ahí, que los estrógenos pueden actuar como hormonas o como agentes genotóxicos (efecto dual) (Markides et al., 1998; Lieh, 2000).

En cuanto a la capacidad de manifestar daño genotóxico por parte de las tres hormonas evaluadas (Tabla VIII), se analizaron las alteraciones anafásicas y micronúcleos en interfase, a través de cuatro grupos experimentales y un testigo, observándose que no hay resultados significativos en los tratamientos cortos, lo que de acuerdo al criterio de Kihlman (1966) y Kihlman y Andersson (1984) se descarta que estos compuestos tengan un comportamiento S-independiente y efectos no retardados en cuanto a la aparición de las aberraciones. Sin embargo, por el hecho de aparecer aberraciones de tipo cromatídico a las 14 y 44 horas de recuperación con dos de las

tres hormonas (estradiol y estriol), se sugiere que actúan como agentes S-dependiente y con efecto retardado.

TABLA VII. Índice mitótico obtenido con tres concentraciones de estradiol, estrona y estriol en células meristemáticas de la raíz del haba (*Vicia faba*) con 4 horas de tratamiento y 2 horas de recuperación.

Compuesto	Concentración (ppm)	I.M. (%)	Valor de Z
Testigo		20.15	
Estradiol	100	20.90	0.19 ns
	10	15.46	3.81 *
	1	9.67	9.30 *
Testigo		17.50	
Estrona	100	16.66	0.22 ns
	10	16.8	0.21 ns
	1	17.29	-0.18 ns
Testigo		19.01	
Estriol	100	18.00	0.24 ns
	10	12.50	6.02 *
	1	6.10	12.31 *

Z (0.1)= ±1,282 (*) Efecto inhibitor (ns) Efecto no significativo

Comparando los efectos entre las dos hormonas que resultaron positivas entre las 14 y 44 horas de recuperación; el estriol que es un metabolito de la primera, indujo ligeramente más aberraciones que la hormona original (estradiol) tanto para aberraciones totales como en la producción de alteraciones a nivel del centrómero; en general se encontró en promedio una alteración por anafase, pero en ocasiones hay más de una. Existiendo cierta correlación en cuanto al índice mitótico y el efecto genotóxico en anafase para estas dos hormonas, nuevamente existiendo una correlación con los efectos reportados debido a que el origen de las aberraciones cromosómicas esta relacionado principalmente con la capacidad de los estrógenos de interactuar con el huso acromático, con los centriolos y con el ADN, así como su efecto oxidante a bajas dosis, dependiendo de su interacción limitada con iones metálicos, pudiendo producir alteraciones directas de estos componentes celulares por metabolitos estrogénicos, por vía de unión covalente o indirecta o por generación de radicales libres (Tsutsui et al., 1997; Lierh, 2000).

Tabla VIII. Frecuencia de alteraciones anafásicas y micronúcleos inducidas por el estradiol y sus dos principales metabolitos a 10 ppm en células meristemáticas de haba (*Vicia faba*).

Concentración compuesto	Horas de tratamiento	Horas recuperación	Total Anafases	% Anafases anormales	% Aberraciones totales	% Alteraciones centroméricas	% Micronúcleos
Exp. 1							
Testigo	1	0	1000	0.87	0.91	0.25	0.01 (ns)
Estradiol	1	0	1000	0.76 (ns)	0.86 (ns)	0.39 (ns)	0.00 (ns)
Estrona	1	0	1000	0.66 (ns)	0.73 (ns)	0.24 (ns)	0.05 (ns)
Estriol	1	0	1000	1.18 (ns)	1.19 (ns)	0.20 (ns)	0.01 (ns)
Exp. 2							
Testigo	4	2	1000	0.77	0.80	0.30	0.00 (ns)
Estradiol	4	2	1000	0.40 (ns)	0.40 (ns)	0.29 (ns)	0.10 (ns)
Estrona	4	2	1000	0.63 (ns)	0.91 (ns)	0.34 (ns)	0.03 (ns)
Estriol	4	2	1000	1.38 (ns)	1.48 (ns)	0.38 (ns)	0.01 (ns)
Exp. 3							
Testigo	4	14	1000	0.59	0.60	0.20	0.02 (ns)
Estradiol	4	14	1000	4.11 *	4.30 *	2.10 *	0.87 (ns)
Estrona	4	14	1000	0.97 (ns)	0.99 (ns)	0.20 (ns)	0.10 (ns)
Estriol	4	14	1000	6.41 *	4.15 *	3.40 *	0.99 (ns)
Exp. 4							
Testigo	4	44	1000	0.91	1.01	0.22	0.00 (ns)
Estradiol	4	44	1000	6.26 *	6.33 *	3.60 *	1.01 (ns)
Estrona	4	44	1000	1.06 (ns)	1.11 (ns)	0.35 (ns)	0.00 (ns)
Estriol	4	44	1000	8.76*	6.20*	6.20 *	1.50 (ns)

(*) Significativo (ns) No significativo P ≤0.001

Alteraciones centroméricas: cromosomas retardados e isocromosomas

Aberraciones totales: Puentes anafásicos, sencillos, fragmentos acéntricos, cromosomas retardados, isocromosomas y cromosomas en anillo.

La estrona no manifestó ningún efecto estadísticamente positivo en tratamientos cortos (sin recuperación y con 2 horas), ni en tratamientos largos (con 14 y 44 horas de recuperación), al menos en las condiciones experimentales probadas en esta investigación.

En cuanto a la inducción de micronúcleos, se observó bajas frecuencias y en los experimentos con 14 y 44 horas de recuperación, que existe aparentemente relación entre las alteraciones a nivel del centrómero y en la inducción de éstos, pero sin una significatividad estadística.

b) Daño genotóxico en la mosca de la fruta (*D. melanogaster*)

Los primeros datos, partieron de establecer tres concentraciones letales subtóxicas del estradiol (Tabla IX), las cuales equivalen a LC-m, LC20 y LC50 correspondientes a la concentraciones de 10, 100 y 1000 ppm, respectivamente en una cepa silvestre (C-S).

Tabla IX. Índices de sobrevivencia en larvas de *Drosophila melanogaster* al ser tratadas con estradiol.

Concentración ppm	Índice de sobrevivencia	Concentración letal
0 (control)	10/10	LC ₀
1	9/10	LC ₁₀
10	8.5/10	LC ₁₅
100	8/10	LC ₂₀
500	7/10	LC ₃₀
1000	5/10	LC ₅₀

En cuanto a la detección del potencial genotóxico en ala, se puede observar en la tabla X que al tratar a las larvas transheterocigóticas con tres concentraciones subtóxicas de estradiol, existe un respuesta inversa con respecto a la concentración, en donde la menor de 10 ppm evidenció tener efecto genotóxico mayor con respecto a las concentraciones más altas, tanto en manchas simples como gemelas; en el caso de las manchas simples el efecto fue significativo solo para manchas pequeñas, lo que sugiere que es un metabolito el que está actuando y no la hormona original, hallándose un efecto similar a lo encontrado en el tratamiento en células meristemáticas de haba, y en lo reportado en la bibliografía del posible efecto a bajas dosis como agente oxidante y altas dosis como antioxidante; dependiendo de la capacidad limitada que tiene a bajas dosis de interactuar con los receptores biológicos y con iones metálicos, en donde éstos últimos actúan como catalizadores (Lierh,2000).

Tabla X. Frecuencia de manchas por ala al tratar crónicamente con estradiol a larvas transheterocigóticas (mwh + / + fir³) de *Drosophila melanogaster*.

Comp. []	# Alas	Manchas por ala(Número de manchas)			Total
		Sencillas		Gemela Manchas	
		Chica (1-2 Cel.) m = 2.0	Grande (>2 Cel.) m = 5.0		
Testigo				m = 5.0	m = 2.0
Etanol 5%	114	0.18 (21)	0.03 (3)	0.020 (2)	0.23 (26)
Estradiol 10 ppm	118	0.37 (44)+	0.04 (5)-	0.080 (10)+	0.54 (64)+
100 ppm	120	0.26 (31)i	0.02 (2)-	0.025 (3) i	0.30 (36)-
1000 ppm	120	0.13 (16)-	0.03 (3)-	0.025 (3) i	0.18 (22)-

& Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Würgler (1988).
 (+) = positivo, (-) = negativo, (i) = Indeterminado (d⁺) = débil positivo, (m) = factor de multiplicación.
 Nivel de probabilidad: alfa = beta = 0.05 (Prueba estadística de una cola)

Lo anterior, junto con lo reportado bibliográficamente, permite asumir que uno de los posibles mecanismos de acción genotóxica del estradiol, es a través de sus metabolitos, y como se sabe, estos pueden ser transformados a hidroquinonas, y a vez, estos pueden oxidarse de forma constante a quinonas y semiquinonas (Liehr, 2000 y Samuni et al., 2003); las cuales son moléculas reactivas al DNA; con base a lo anterior se diseñó un segundo experimento para determinar cual de los metabolitos primarios es el responsable de dicho efecto genotóxico.

Como se puede observar en la tabla XI se trató a las larvas de *Drosophila* con el estradiol y con sus dos principales metabolitos, el estriol y la estrona, a la concentración de 10 ppm, que tuvo un efecto positivo en el primer experimento.

En el segundo experimento, el efecto genotóxico del estriol fue mayor al del estradiol que es la hormona original; en cambio la estrona no mostró tener efectos genotóxicos, al menos a las concentraciones probadas; en cuanto al efecto entre estradiol y estriol, éste último, muestra un mayor efecto tanto en manchas chicas, grandes y gemelas, lo que sugiere un mecanismo de acción directo e indirecto como lo menciona la bibliografía.

Tabla XI. Frecuencia de manchas por ala al tratar crónicamente con estradiol y sus dos principales metabolitos a larvas transheterocigóticas (mwh + / + flr³) de *Drosophila melanogaster*.

Manchas por ala(Número de manchas) Diagnostico estadístico &					
Comp. []	# Alas	Sencillas		Gemela Manchas	Total
		Chica (1-2 Cel.) m = 2.0	Grande (>2 Cel.) m = 5.0		
Testigo				m = 5.0	m = 2.0
Etanol 5%	120	0.16 (20)	0.02 (3)	0.020 (2)	0.25 (25)
Estradiol 10 ppm	118	0.37 (44)+	0.04 (5)-	0.084 (10)+	0.54 (64)+
Estriol 10 ppm	120	0.41 (50)+	0.06 (7)+	0.125 (15) +	0.61 (72)+
Estrona 10 ppm	120	0.21 (26)-	0.02 (3)-	0.033 (4)d+	0.27 (33)-

& Diagnóstico estadístico de acuerdo a Frei y Wurgler (1988),
 (+) = positivo, (-) = negativo, (i) = Indeterminado (d+) = débil positivo, (m) = factor de multiplicación.
 Nivel de probabilidad: alfa = beta = 0.05 (Prueba estadística de una cola)

En el caso de la inducción de manchas en el ojo de *Drosophila*, el procedimiento fue similar que en el caso de alas, en donde se trató inicialmente con estradiol a las concertaciones de 10, 100 y 1000 ppm (Tabla XII). Para evidenciar si el efecto era directo o a través de metabolitos, encontrándose un efecto similar, es decir a la contracción menor de 10 ppm, la cual fue la que manifestó un efecto positivo, lo que evidencia que si hay un daño genotóxico real, debido a que no solo se expresó en la técnica de alas, descartando una sensibilidad especial al ser tratado con dos linajes celulares diferentes; por otro lado, nuevamente hay una mayor frecuencia de manchas chicas que grandes, lo que sugiere nuevamente una participación de sus metabolitos en el efecto genotóxico.

Con base en lo anterior, y emulando la metodología que se aplicó con la técnica de SMART en ala, se realizó un segundo experimento para determinar cual de los metabolitos primarios es el responsable de dicho efecto genotóxico, tratando a las larvas con las tres hormonas a la concentración de 10 ppm.

Tabla XII. Frecuencia de clones celulares en ojo de *Drosophila melanogaster* al ser tratada con estradiol.

Conc.	# ojos	Número de manchas						% de manchas		
		1-2	3-4	5-8	9-64	64-	Total	Chi	Gran	Total
Testigo										
Etanol 5%	500	34	4	5	3	0	46	7.6	1.6	9.2
Estradiol (ppm.)										
1000	500	39	12	1	1	0	53	9.4 (-)	0.2 (-)	9.6 (-)
100	500	44	22	6	0	0	72	11.2 (-)	1.0 (-)	12.2 (-)
10	500d	49	22	4	6	0	81	11.5 (+)	9.9 (+)	21.4 (+)

Como se puede observar en la tabla XIII, hay un efecto positivo para la inducción de manchas totales por parte del estradiol y su metabolito el estriol, de manera semejante a como se comportó en ala, de igual forma la estrona aparentemente a estas concentraciones y en esta prueba, no manifiesta ningún efecto genotóxico al igual que la prueba de ojos y el análisis de aberraciones cromosómicas y micronúcleos.

Tabla XIII. Frecuencia de clones celulares en ojo de *Drosophila melanogaster* al ser tratada con estradiol y su dos principales metabolitos.

Conc.	# ojos	Número de manchas						% de manchas		
		1-2	3-4	5-8	9-64	64-	Total	Chi	Gran	Total
Testigo										
Etanol 5%	500	34	4	5	3	0	46	7.6	1.6	9.2
Hormona (10 ppm.)										
Estradiol	500	49	22	4	6	0	81	11.5 (+)	9.9 (+)	21.4 (+)
Estriol	500	84	16	7	4	0	111	20.0 (+)	2.2 (-)	22.2 (+)
Estrona	500	29	13	0	1	0	43	8.4 (-)	0.2 (-)	8.6 (-)

5. Comentarios y Conclusiones.

En este trabajo se dio inicio con los siguientes antecedentes:

- Inicialmente se consideraba a los estrógenos como no mutagénicos desde 1930, debido a que con los bioensayos y a las concentraciones que fue evaluado, resultó ser negativo.
- Como segundo antecedente está la alta relación de los estrógenos con la inducción de varios procesos cancerígenos, asociando sus efectos a su capacidad de interacción indirecta con el ADN (epigenotóxico) y/o a su capacidad recombinogénica.
- Como tercer punto están las evidencias del efecto de este tipo de compuestos, que a bajas concentraciones pueden tener un efecto oxidante y a altas un efecto antioxidante dependiendo de su interacción con iones metálicos.
- Además hay un gran número de reportes científicos que relacionan a los metabolitos del estradiol con un efecto genotóxico y/o carcinogénico.
- Finalmente, existe preocupación ante un mal uso de estos compuestos en actividades como la ganadería aunado a la posible liberación de la hormona y/o de sus metabolitos a través de orina y de manera muy limitada por leche.

Lo anterior fundamenta una discusión con los resultados del presente trabajo si se contempla que en la actualidad algunos medicamentos que contienen estrógenos, siguen siendo recetados en seres humanos y animales, debido a que se han considerado benéficos en función de su gran variedad de efectos hormonales y clínicos (Lang y Reiman, 1993; Martucci 1993; Hundal et al., 1997; Liehr, 2000 y Yager, 2000).

Con base en lo anterior se puede concluir lo siguiente:

5.1 Técnica analítica y método de purificación

- La cromatografía de gases masas (CG-MS), a pesar de estar reportada por la EPA para la evaluación de estos compuestos, en esta investigación no fue la más adecuada para la determinación simultánea del estradiol y sus dos principales metabolitos (estrone y estriol). Esto se debió a que la similitud que existe entre el peso molecular de un compuesto original y sus metabolitos es muy alta e interfiere en la correcta identificación y cuantificación de éstos; además de que la sensibilidad de la técnica solo permitió detectar a las tres hormonas al mismo tiempo hasta 1 ppm.
- La cromatografía de líquidos (HPLC) acoplado con un detector de disposición ultravioleta-fotodiodo para el análisis de muestras biológicas, mostró ser más eficiente que la CG/MS, debido a que el límite de detección simultánea permitió identificar a las tres hormonas hasta 0.01 ppm, con suficiente especificidad para distinguir y cuantificar a cada uno de los tres compuestos evaluados.
- La correcta selección de un método analítico está de la mano de una correcta selección de la metodología de purificación, sobre todo si el compuesto a evaluar está inmerso en matrices biológicas altamente complejas como sangre, orina y leche. En el presente trabajo se pudo detectar a las tres hormonas en dos de los tres fluidos corporales (sangre y orina), sin descartar que en leche, la falta de sensibilidad de la técnica se deba más a la baja concentración del analito que a una mala técnica de purificación.
- Con los resultados obtenidos en la presente investigación, se sustentan las bases para que en trabajos posteriores se optimice la técnica de detección y su proceso analítico, en donde se abarquen costo y tiempo entre otras variables.

5.2 Toxicodinámica del estradiol y su excreción

Los resultados del presente trabajo permiten establecer el destino metabólico del estradiol y corroborar lo reportado, así como justificar tratamientos y periodos de recuperación.

Sangre

- Con base a los análisis cromatográficos con HPLC se demuestra la presencia del estradiol, estriol y estrona en sangre. Se encontró que el estradiol y estriol están presentes a concentraciones de 1 ppm y 0.001 ppm respectivamente, mientras la estrona presenta un valor de 10 ppm en tratamientos con dosis única.
- Para tratamientos sucesivos se determinó un aumento en la concentración de dos de las tres hormonas, observándose 5 ppm para el estradiol y 1ppm para el estriol. La estrona se mantuvo en un valor de 10 ppm
- De igual forma, se observó que el estradiol aparentemente regresó a su nivel basal con dosis únicas lo cual ya no sucedió tratamientos con dosis sucesivas. Esto posiblemente se deba al metabolismo enterohepático de las vacas, el cual hace que lo administrado sea nuevamente metabolizado y por lo tanto efectivamente distribuido en el organismo, resultando más fácil encontrar metabolitos excretados que la hormona original.
- Junto con lo anterior, también se observó que el periodo de recuperación recomendado terapéuticamente no es suficiente para la eliminación de los metabolitos evaluados, los cuales se bioacumulan del primer al segundo tratamiento.

Orina

- Con base a los análisis cromatográficos con HPLC se demuestra la presencia de las tres hormonas en orina. Encontrándose que el estradiol y estriol están presentes a concentraciones de 0.01 ppm, mientras la estrona presenta un valor de 1 ppm en tratamientos con dosis única.
- Con respecto a tratamientos sucesivos, las concentraciones del estradiol y estriol pueden llegar hasta 0.001 ppm mientras que para la estrona es de 10 ppm. Lo anterior se podría explicar debido a que tanto el estradiol como el estriol pueden transformarse en estrona. Esto es relevante debido a que la orina puede diluirse o concentrarse en canales de desagüe y formar parte de las aguas utilizadas para riego agrícola.

Leche

- La no detección de ninguna de las tres hormonas en leche, después de dos tratamientos permite inferir que puede ser utilizado este fluido sin ningún riego potencial.

5.3 Daño genotóxico

Para evidenciar el efecto genotóxico positivo o negativo de un compuesto, se requiere de investigar con distintos receptores biológicos a diferentes concentraciones y por diversas vías de administración. Por lo tanto, los resultados del presente trabajo, en cuanto al efecto biológico, son una primera aproximación que sustenta seguir investigando con otras variables.

- Se demostró que tanto en haba como en la mosca de la fruta, a bajas concentraciones, el estradiol y al menos uno de sus metabolitos (estriol) manifiestan una capacidad genotóxica, lo cual se puede explicar apoyado en la teoría de Albrech y Liehr, quienes proponen efecto genotóxico a bajas concentraciones debido principalmente a su interacción con iones metálicos (Liehr, 2000).

- El estradiol y el estriol mostraron un efecto citotóxico y genotóxico simultáneamente en ambos bioensayos, mientras que la estrona, no lo tuvo, al menos a las condiciones y concentraciones investigadas (Samuni et al., 2003).
- Se reporta por vez primera, un efecto genotóxico *in vivo* para estas hormonas en un sistema vegetal (*Vicia faba*), similar a lo reportado en la bibliografía pero en otros bioensayos animales.
- Lo anterior está sustentado en los daños encontrados en haba, observándose la capacidad del estradiol de alterar el material genético de manera directa por medio de la inducción de aberraciones cromosómicas en anafase como fragmentos, cromosomas en anillo y puentes anafásicos sencillos. También se evidenció la capacidad de alterar la información genética de manera indirecta a través del estriol al inhibir o alterar la función de centrómero, evidenciándolo por la aparición de cromosomas retardados e isocromosomas en anafase.
- El estradiol y el estriol manifestaron efectos genotóxicos similares en la mosca de la fruta y en haba, lo que sugiere un efecto genotóxico real al descartar una posible sensibilidad particular por parte de los bioensayos evaluados, descartando falsos positivos.

Los resultados de esta investigación justifican la actual preocupación acerca de los posibles efectos genotóxicos de esta hormona y de sus metabolitos primarios, debido a que al ser suministrados de forma terapéutica en la actividad ganadera pueden ser liberados al ambiente a través de la orina en pequeñas dosis y llegar a aguas residuales a concentraciones en las cuales se ha evidenciado un efecto citotóxico y genotóxico en el presente trabajo.

Los estrógenos se consideran carcinógenos y/o agentes perjudiciales, en función principalmente a su relación con el origen de varios tipos de tumores en diferentes órganos y por las evidencias que los relacionan con efectos nocivos en diferentes organismos, como es el caso de los resultados del presente trabajo.

Con base en el efecto genotóxico encontrado tanto el estradiol como el estriol, se pueden asociar con el origen de múltiples procesos carcinogénicos, así como con el alteraciones del ADN *in vitro* en células animales cultivadas e incluso en tejidos humanos. Además se evidenció daño genotóxico en sistemas vegetales, por lo que se sugiere seguir investigando de tal forma que se pueda monitorear alimentos y fluidos corporales de origen vacuno de una manera fácil y económica para controlar el uso de estas hormonas y minimizar sus efectos secundarios.

Independientemente de que el estradiol y sus metabolitos se han reportado como carcinógenos débiles en comparación con otros carcinógenos positivos, estos deben ser considerados en las normas de uso, producción y/o liberación al ambiente.

Por otro lado, el presente trabajo generó nueva información en cuanto a los efectos secundarios del estradiol y sus metabolitos; además apoyó teorías propuestas sobre sus efectos genotóxicos de manera directa y a través de sus metabolitos secundarios al menos a bajas concentraciones así como sobre su liberación al ambiente a través de orina proveniente de organismos tratados terapéuticamente en la actividad ganadera.

Estos resultados dan la base para evaluar otros posibles efectos secundarios en diferentes receptores biológicos y a través de otras variables; siendo más evidente la necesidad de trabajar en equipos multidisciplinarlos e interinstitucionales que permitan conocer los efectos de agentes tóxicos al ser liberados al ambiente.

Finalmente, este tipo de trabajos son de gran importancia debido a que son la base de la ciencia ambiental, la cual se sustenta en trabajos interdisciplinarios que unen esfuerzos de varias áreas del conocimiento, en donde, en cada caso, los resultados no son concluyentes sino son un eslabón más en la compleja interpretación de los factores físicos, químicos y biológicos que conforman el entorno. En donde el uso de biomonitores permita evaluar la calidad ambiental de una manera periódica, fácil, confiable, económica y que refleje los efectos adversos de una manera directa.

6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Barnes, S. (1977) **Cromatografía líquida y espectrofotometría de masas de fitoestrógenos. Simposio de Métodos de Investigación en Fitoestrógenos.** Tucson Arizona, EUA. Septiembre. 21-24

Bernstein, L. (1988) **the epidemiology of breast cancer.** LOWAC 1:7-13
Bhagavan, N. (1990) **Bioquímica.** Ed. Interamericana México. 700 pp

Butterworth, A. Gunatilaka, A. y M. Gonsebatt. (2000) **Biomonitores y biomarcadores del cambio ambiental.** Inv. Amb. de la Ciencia 56: 50-55

Devore, G. y E. Muñoz. (1985) **Química orgánica.** Publicaciones Culturales. México 734 pp

Catalogo Altech. (2001) **Chromatography sourcebook.** Ed. Altech México cat. 500 00/01 664 pp

Cavalieri, E. Kristyna, F. Liehr, G. y R. Deodutta. (2000) **Estrógenos como agentes endógenos de aducciones y mutaciones al ADN.** Monographs. 67: 7594

CNA "Centro Nacional de alimentación" (1989) **Métodos de Análisis de residuos en alimentos.** Método 5.1. Instituto de Salud "Carlos III" Ministerio de Sanidad y Consumo. Madrid, España.

de Kergommeaux, D. Grant, W. y S. Sandus (1983) **Clastogenicand physiology response of chromosomes to nine pesticides in the *Vicia faba in vivo* root tip assaysystem.** Mutat Res. 124:69-84

de Serres, F. y D. Shelby (1978) **Utilization of higher plant systems as monitors environmental mutagens.** Environ Health Perspect 27:3-6

Devanesan, P. Todorovic, R. Zhao, J. y E. Cavalieri (1999) **Formation of catechol estrogen adducts in kidney of male hamster treated with 4-hidroxiestradiol.** Proc Am Assoc Cáncer 40: 46 (Abstrae).

Duarte, A. (1999) **Mecanismos neuroendocrinales de regulación de la reproducción en mamíferos domésticos.** Curso de reproducción avanzada. <http://fomt1.aut.mx/investigacion/alfabetico/MAMIFEROSDOMESTICOS1.pdf>.

Dufus, J. (1983) **Toxicología ambiental.** Ed. Omega España. 173 pp

Franke, A. y L. Custer (1997) **Aplicación de HPLC acoplado a la detección ultravioleta-fotodiado para el análisis de fitoestrógenos en muestras biológicas.**

Simposio de Métodos de Investigación en Fitoestrógenos. Tucson Arizona, EUA. Septiembre: 21-24.

Frei, H. y F. Würigler (1988) Statical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila melanogaster* assay indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutation Res* 203:297-308

Fox, M. A. y J. Whitesell (2000) **Química orgánica** Ed. Person Educación. México. 829 pp.

Gaytán, J. (1993) **Modulación del efecto genotóxico de la mitomicina C (MMC) por las vitaminas A y C en células meristemáticas de ala en *Drosophila melanogaster***. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias (Biología). Universidad Nacional Autónoma de México. México. 80 pp

Gómez-Arroyo, S. y R. Villalobos-Pietrini (1983) **Chromosomal alterations induced by some chromiun salts**. *Cytologia* 48:185-195

Gómez-Arroyo, S. Baíza, A. López, y R. Villalobos-Pietrini (1985) **A comparative study of the cytogenetic effects of the insecticides heptachlor, malation and methyl parathion in *Vicia faba***. *Rev Int Contam Ambient* 1:7-16

Gómez-Arroyo, S. Castillo-Ruiz, P. y R. Villalobos-Pietrini (1986) **Chromosomal alterations induced in *Vicia faba* by different industrial solvents, thinner, toluene, benzene, n-hexane, n-heptane and athyl acetate**. *Cytologia* 51:133-142

Graf, U. Würigler, F. Katz, H. y G. Kale (1984) **Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster***. *Environ Mut* 6:153-188

Graf, U. (1994) **La situación actual de SMART (Prueba de mutación y recombinación somática) en *Drosophila melanogaster***. *Rev Int Contam Ambient* 1:5-7

Hernández, A. (1993) **Relación estructura química actividad genotóxica de 7 compuestos en células somáticas de los ojos de *Drosophila melanogaster*, utilizando cepas con y sin actividad metabólica incrementada**. Tesis para obtener el título de Biólogo. UNAM. México. 68 pp

IARC (1999) **International Agency for research on cáncer**. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Hormonal Contraception and postmenopausal hormone therapy. IARC. Lyon France Vol. 72: 65-70

INTERNET 1 **Carta técnica de Progyluton (estradiol/norgesterol)** PLM latina .com (www.fcmed.unam.mx/bmnd/plm/productos/1812.htm)

INTERNET 2 (www.facmed.mx/usoveterinario/1825.htm)

Hundal, S. Dhillon, V. y S. Sidhu (1997) **Genotoxic potential of estrogens.** Mutation Reserch 389: 173-181

Huseby, R. (1980) **Demonstration of a direct carcinogenic effect of estradiol on Leyding cell of the mouse.** Cáncer Res 40: 1006-1013

Kihlman, B (1966) Actions of Chemicals on dividing cells. Prentice Hall, New Jersey. 143-157 pp.

Kihlman, B. y C. Andersson (1984) Root tips of *Vicia faba* for study of the induction of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges. In Handbook of mutagenicity test procedures. Eds. Kilbey, B. Legator, W. y C. Rammel. Elsevier Science Publishers.

Klug, H y S. Cummmings. (2002) **Conceptos de genética.** Ed. Prentice Hall, Nueva York. 570 pp.

Lang, R. y R. Reiman (1993) **Studies for a genotoxic potential of some endogenous and exogenous sex steroids I.** Communication: examination for the induction of gene mutations using the Ames Salmonella7microsome test and the HGPRT test in V79 cells. Environ Mol Mutagen 21:272-304

Lawrence, H. (1999) **EPA's Sampling and analysis methods.** ED. Lewis Publisher.Nueva York. 1000 pp

Lechuga, V. (2002) **Estudios de daños genotóxicos en tejidos celulares sensibles por la presencia de arsénico en aguas y suelos de Zimapan, Hgo.** Tesis para obtener el título de Química. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. México. 64 pp.

Lierh, J. (2000) **¿Estradiol es un carcinógeno mutagénico genotóxico?** Endocr Rev 21:40-54

Li, J. (1996) **Perspectives in hormonal carcinogenesis. Animal models to human disease.** In: Huff, J. Boyd, J. y J. Barret (Eds) Cellular and Molecular Mechanisms of Hormonal Carcinogenesis: Environmental Influences. Wiley-Lis, Filadelfia. 447-454

Liehr, J., Gladek, A. Macatee, H. Randerath, E. y K, Randerath. (1991) **DNA adduct formation in liver and kidney of male Syrian hamsters treated with estrogen** and/or alpha-naphthoflavone. *Carcinogénesis* 12: 385-389

Liehr, J., (2000) **Is Estradiol a Genotoxic Mutagenic Carcinogen?** *Endoc Revs* 21:40-50

Markides, C Roy, D. y J. Liehr, (1998) **Concentration dependence of pro-oxidant and antioxidant properties of catacholestrogens.** *Arch Biochem Biophys* 360:105-112

Martucci, C, (1993) **P450 enzymes of estrogen metabolism.** *Pharmacol Ter* 57:237-257

McLachlan, J. y F. Steven (1996) **Estrógenos Ambientales.** *American Scientist*, Septiembre-Octubre. 15-17

Muñoz -Guerra, D. Carrera, C. Soriano, C. y R. Cortés (2003) **GC/MS/MS Análisis for anabolic steroids in urine for athletic testong.** *Note Variant Aplicación* 60 p. 1-3

Rhag, T. y J. Pento (1995) **The mutagenic potential of antiestrogens at the HPRT locus in V79 cells.** *Res Commun Mol Pathol Pharmacol* 89:5-92

Reyes, F. y W. Almeida (1992) **Toxicología prospectiva y seguridad química.** Ed. Programa Internacional de seguridad de las sustancias químicas (PISSQ/PNUMA-OIT-OMS). México 231 pp

Samuni, A. Chiang, E Krishna, M. DeGraff, W. y J. Mitchell (2003) **Semiquinone radical intermediate in catecholic estrogen-mediated cytotoxicity and mutagenesis.** *PNAS* 29:5390-5395

Shull, J. Spady, T. Zinder, M y K. Pennington (1997) **Ovary intact, but not ovariectomized female ACI rats treated with 17 p estradiol rapidly develop mammary carcinoma.** *Carcinogénesis* 18: 1595-1601

Sienra, E. (2001) **Desarrollo de un modelo experimental para investigar genotóxicidad en un invertebrado acuático.** Tesis Profesional para obtener el título de Biólogo. Universidad Nacional Autónoma de México. México. 43pp

Skoog, D. y J. Leary, (1994) **Análisis instrumental.** Ed. Me Graw Hill. México 555 pp

Thompson, C. (2000) **Epidemiología molecular de polimorfismos genéticos en el estrógeno que metaboliza las enzimas en cáncer de pecho humano.** *Mographs* 27: 125-134

Tsutsui, T. y J. Barret (1997) **Neoplastic transformations of cultured mammalian cells by estrogens and estrogen-like chemical**. Environ Health Prospect 105:619-634

Tsutsui, T. Taguchi, S. Tabaka, Y. y J. Barrett (1997) **17 β -Estradiol, diethylbestrol, Tamoxifen, Toremifene and ICI 164,384 induce morphological transformaron and aneuploidy in cultured Syrian hamster embryo cells**. Int J Cáncer 70:188-193

Valencia. R. (1992) **Efectos de los insecticidas carbámicos sobre los cromosomas de las células meristemáticas de la raíz de *Vicia faba***. Tesis Profesional para obtener el grado de Biólogo. Facultad de ciencias Diversidad Nacional Autónoma de México, México. 135 pp

Variant (2003) Note **Application chrompac 147- HPLC**

Vega, S. (1985) **Evaluación epidemiológica de riesgos causados por agentes químicos ambientales** (Toxicología I: Cinética y efecto de los contaminantes tóxicos del ambiente). Ed. Centro Panamericano de Ecología Humana y Salud, Organización Panamericana de la Salud y Organización Mundial de la Salud. México. 133 pp.

Villalobos-Pietrini, R. Flores-Márquez y S. Gómez-Arroyo (1994) **Cytogenetic effects in *Vicia faba* of the polluted water from rivers of the Tlaxcala Hydrological, México**. Rev Int |Contam Ambient 10:83-88

World Resources Institute (1995) **Amenazas de los estrógenos ambientales**
<http://translate.google.com/translate?hl=es&sl=en&http://www.wri.org/health/estrogen.html&prev=/search%3Fq%3Deffects%2Bof%2Benvironmental%2Bestrogens%26hl%3Des%26lr%3D%26ie%3DUTF-8%26sa%3DG>

Yager, J. (2000) **Estrógenos endógenos como agentes carcinógeno con activación metabólica**. Mongraphs 27: 67-73

Yost, R. Ettre, L. y R. Conlon (1980) **Introducción a la cromatografía líquida practica**. Ed. Perkin Elmer. EUA. 263 pp.

EL PRESENTE TRABAJO GENERO Y O APOYO LOS SIGUIENTES PRODUCTOS ACADÉMICOS:

PONENCIAS EN CONGRESOS EN LOS ÚLTIMOS

2005. Primer simposio de áreas naturales protegidas de Hidalgo, México. Uso de bioensayos para evaluar la calidad del agua en "Estado de Hidalgo, México" dentro del Primer Simposio de Áreas Naturales protegidas de Hidalgo, organizado por el Cuerpo Académico de Biología General". Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, 24 de Octubre. Pachuca, Hidalgo, México.

2005. X Congreso Nacional y IV Internacional de Ciencias Ambientales. "Determinación del estradiol y sus dos principales metabolitos por cromatografía de gases masas (GC/MS) y por cromatografía de líquidos (HOLC)". Gordillo- Martínez J.A., J.C. Gaytán-Oyarzún. Chetumal, Quintana Roo, México.

2004. Congreso Nacional de Genética 2004. "Análisis comparativo potencial genotóxico del estradiol y sus metabolitos primarios a través de la prueba de mutación y recombinación somática (SMART) en alas de *Drosophila melanogaster* y del análisis de estructuras anafásicas y micronúcleos en Haba (Vicia faba). Juan Carlos Gaytán Oyarzún, Gómez Arroyo, Sandra y Alberto José Gordillo Martínez. 5 al 9 de octubre. Ixtapan de la Sal, Edo. de México, México.

2003. Foro sobre la problemática del agua en la región centro sur de la República mexicana "Determinación del potencial genotóxico en *Drosophila melanogaster* del Estradiol y sus metabolitos primarios a través de la Prueba de Mutación y Recombinación Somática (SMART) " Juan Carlos Gaytán Oyarzún y Alberto José Gordillo Martínez, Acapulco, Guerrero, México 4-6 de junio.

2003. II Congreso Internacional de Ciencias Ambientales y VIII Congreso Nacional de Ciencias Ambientales "Determinación del potencial genotóxico en *Drosophila melanogaster* del estradiol y sus metabolitos primarios a través de la prueba de mutación y recombinación somática (SMART). Juan Carlos Gaytán Oyarzún y Alberto José Gordillo Martínez. 13 de mayo, Querétaro, México.

ARTÍCULOS DE REVISTAS ARBITRADAS

2006 (Enviado Num. Ref. JEMA-D-06-00041) Bioindicators of water quality: an applied method for the use of helminth parasites as bioindicators with the Reserve of the Biosphere Barranca de Metztitlán, Hidalgo, México, as an example en Journal of Environmental Management.

2005 (Publicado) Gutiérrez Cabrera E, Pulido Flores G., Scott Moks William y Gaytán Oyarzún J.. Presencia de *Bothriocephalus acheilognathi* Yamaguti, 1934 (Cestoides: Bothriacephalidae) en peces de Metztitlán, Hidalgo, México. Hidrobiologica. 15 (3) 283-288.

2005 (Enviado) Gaytán-Oyarzún. J. C. y J. A. Gordillo- Martínez. Estudio genotóxico en *Drosophila melanogaster* mediante la prueba de mutación y recombinación somática

(SMART) del estradiol y sus metabolitos primarios liberados al ambiente a través de la actividad ganadera. Rev. Toxicología Esp.

2005 (Enviado) Gaytán-Oyarzún. J. C, Gómez -Arroyo Sandra y J. A. Gordillo-Martínez. Determinación en haba (*Vicia jaba*) del potencial citotóxico y genotóxico del estradiol y sus metabolitos primarios liberados al ambiente a través de la actividad ganadera. Rev Int. Contam Ambient.

CAPÍTULOS EN LIBROS

2006 (En prensa Num. Ref. CA-BG11) Uso de técnicas de química analítica para evaluar la calidad del agua y su impacto biológico en el Estado de Hidalgo, México, en: Estudio biológicos en las áreas naturales y reservas de la biosfera del Estado de Hidalgo, México. Juan Carlos Gaytán Oyarzún y Alberto José Gordillo Ed. Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Pachuca, Hgo. México.

2006 (En prensa Num. Ref. CA-BG09) Evaluación de la calidad del Agua en la reserva de la Biosfera " Barranca de Metztitlan, Hidalgo" en México, a través de la inducción de malformaciones de columna vertebral en pez cebrá (*Danio rerio*, Hamilton 1822) en: Estudio biológicos en las áreas naturales y reservas de la biosfera del estado de Hidalgo, México. Juan Carlos Gaytán Oyarzún Juan Carlos Griselda Pulido Flores, Scott Moks William y Gordillo Martínez Alberto.