



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EFECTO CITOGÉNÉTICO *in vitro* DE PROGESTINA, 17-  
ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA, SOBRE  
LINFOCITOS HUMANOS”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

**ARIANNA GISELA GUTIÉRREZ BENÍTES**

DIRIGIDA POR

**Dra. MA. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER**

SANTIAGO DE QUERÉTARO, QUERÉTARO, 2007

FACULTAD DE  
QUÍMICA



BIBLOTECA



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE QUERÉTARO**

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“EFECTO CITOGÉNÉTICO *in vitro* DE PROGESTINA, 17-  
ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA, SOBRE  
LINFOCITOS HUMANOS”**

**TESIS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
**QUÍMICO FARMACÉUTICO BIÓLOGO**

PRESENTA

**ARIANNA GISELA GUTIÉRREZ BENÍTES**

DIRIGIDA POR

**Dra. MA. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER**

SINODALES

Dra. MA. GUADALUPE GARCÍA ALCOCER

DIRECTOR

Dra. LAURA CRISTINA BERUMEN SEGURA

SINODAL

Biol. MARÍA DE LA CONCEPCIÓN ADRIANA

YERENA DE VEGA

SINODAL

M. en C. ISIDRO RESÉNDIZ LÓPEZ

SINODAL

## RESUMEN

Las progestinas han sido diseñadas a imagen de la hormona natural llamada progesterona. Los anticonceptivos que contienen solo progestina alteran el equilibrio de las hormonas naturales del organismo femenino y al romper ese equilibrio bloquean una serie de señales químicas que son esenciales para completar el ciclo normal de la reproducción. Las controversias sobre el riesgo y/o beneficio de la combinación estrógeno y progesterona con relación a la prevención cardiovascular y el riesgo de cáncer de mama aún persisten hoy en día. Muchas progesteronas prescritas tienen efectos opuestos a los beneficios generados por los estrógenos sobre el perfil lipídico ya que la progesterona ha demostrado generar una regulación en los receptores de estrógeno pudiendo interferir con la acción genómica del mismo. El cariotipo es un complemento cromosómico de una célula o de un individuo. A menudo se usa para referirse a la disposición de los cromosomas metafásicos en una secuencia de acuerdo a su longitud y con la posición del centrómero. Se ha reportado que las mujeres usuarias de estrógenos, tienen un riesgo de cáncer de mama de aproximadamente 10% a los 5 años de uso. La pregunta a explorar en el presente trabajo es si el 17-acetato de medroxiprogesterona contribuye a incrementar este riesgo. Para la evaluación del daño citogenético en éste proyecto, se realizaron cultivos de linfocitos *in vitro*, a los que se aplicaron diferentes concentraciones de 17-acetato de medroxiprogesterona y se observaron las metafases, se realizó una comparación entre los resultados obtenidos por esta hormona con los de mitomicina C que fue utilizado como control positivo. Los resultados obtenidos fueron gaps y aneuploidía (trisomía). 17-MPA no induce cambios estadísticamente significativos en el estudio *in vitro* de los cromosomas humanos en linfocitos de sangre periférica.

## GRATITUDES

A DIOS Y A MI MADRE MARÍA  
POR DARME EL DON DE LA  
VIDA Y CAMINAR CONMIGO  
EN TODO MOMENTO

A MIS PADRES IRENE Y LEO  
POR SER LOS MEJORES  
PADRES QUE ME PUDO  
REGALAR DIOSITO, POR SU  
AMOR, SU APOYO  
ECONÓMICO,  
COMPRESIÓN, POR ESTAR  
CONMIGO, ENSEÑARME EL  
VALOR DE LA LIBERTAD Y  
AYUDARME A PINTAR EL  
COLOR DE MI VIDA

A MIS ABUELIAS

†MARÍA: QUIEN SIEMPRE  
QUISO PARA MÍ LO MEJOR,  
POR SU CARIÑO Y  
ATENCIONES  
AURELIA: POR SU CARIÑO Y  
AMISTAD

A MIS TÍOS ROSALINDA, PEPE  
Y MI PRIMO EL PELÓN  
POR ADOPTARME COMO SU  
HIJA, Y SER MIS SEGUNDOS  
PADRES, POR SER MIS  
CONSEJEROS, POR CONFIAR  
EN MÍ DESDE NIÑA, POR LOS  
REGAÑOS QUE ME HAN  
SERVIDO EN MOMENTOS DE  
DESICIÓN, POR ESTAR  
JUNTO A MÍ, NO IMPORTA  
DONDE ESTÉ, NI QUE HAGA,  
SIEMPRE FORMARAN PARTE  
DE ARIANNA Y MI CORAZÓN  
POR ESO Y MÁS GRACIAS  
INFINITAS.

A MI PRIMO EL PELÓN POR  
ACEPTARME COMO UNA  
HERMANA, GRACIAS.

A MIS TÍOS MARTÍN, LUPITA Y  
MI PRIMO DAVID  
POR CONFIAR Y CREER  
CIEGAMENTE EN MÍ,  
COMPRESIÓN, CARIÑO,  
POR SU APOYO MORAL,  
ECONÓMICO, GRACIAS POR

SER LOS MEJORES TÍOS Y  
PERMITIRME ENTRAR EN  
SUS VIDAS.

A MI PRIMO POR DARME SU  
ESPACIO MUCHAS VECES,  
POR BRINDARME SU AYUDA  
CUANDO LA NECESITE  
TAMBIÉN GRACIAS

A MI AMIGA, HERMANA,  
PRIMA VECINA TERE  
POR LA INFANCIA JUNTAS,  
EL APOYO QUE A PESAR DE  
LA DISTANCIA SIEMPRE HE  
SENTIDO CERCA, POR TODO  
LO VIVIDO, NO HAY  
PALABRAS PARA DESCRIBIR  
LO PADRE QUE HA SIDO  
CONOCERTE Y QUE FORMES  
PARTE DE MI MUNDO  
GRACIAS

A MI PRIMA TÍA ALFREDO,  
JACOBITO E ISAAC  
POR SU AMISTAD,  
CONFIANZA, CARIÑO,  
CONSEJOS, POR ESTAR  
CERCA CUANDO MÁS HE  
NECESITADO DE SU APOYO.

A MIS TÍOS CARLOS,  
MARGARITA, MI PRIMA  
CARMEN Y MIS SOBRINOS  
GRACIAS POR SU APOYO Y  
CARIÑO DESDE QUE ERA  
UNA NIÑA, POR CREER EN  
MÍ, Y CONVIVIR CONMIGO  
DESDE ENTONCES. GRACIAS  
POR LOS CONSEJOS Y LA  
AMISTAD QUE HASTA  
AHORA HEMOS TENIDO

A MI HERMANA MARIANA,  
MIS SOBRINOS ROSY Y EL  
BEBÉ  
GRACIAS POR ALEGRARME  
LA VIDA, POR SU  
COMPAÑÍA, Y ADEMÁS  
LLENAR ESE ESPACIO QUE  
SIEMPRE HABÍA QUERIDO  
CON UNA HERMANA Y A  
MIS SOBRINOS POR

CONVIVIR CONMIGO  
GRACIAS POR TODO

FAMILIA MORENO LAMADRID:  
SRES. JOSÉ Y EUFEMIA,  
BERTHA, ELI, ARTURO, TERE,  
JORGE  
GRACIAS POR ACEPTARME  
COMO UNA INTEGRANTE  
MÁS EN SU FAMILIA, POR SU  
APOYO, CARIÑO Y AMISTAD

A MIS AMIGAS:

CARO, LUISA, GISELA, MARLEN,  
MALENA

NO PUEDO EXPLICAR LO  
MUCHO QUE SIGNIFICAN  
PARA MÍ CADA UNA,  
GRACIAS POR SU AMISTAD,  
POR SU APOYO, COMPAÑÍA,  
ANIMO, GRACIAS POR LA  
CONFIANZA, POR  
ESCUCHARME,  
COMPRENDERME, POR  
ILUMINAR MIS DÍAS, POR  
HACERME DIVERTIDA LA  
ESTANCIA EN LA FACULTAD,  
POR SER MÁS QUE UNAS  
AMIGAS GRACIAS

SUSANA Y SEÑORA TERE  
POR SER MIS AMIGAS, POR  
SU APOYO, CONSEJOS Y  
CARIÑO, POR SER ESA VOZ  
EN LOS MOMENTOS  
DÍFICILES Y ALEGRES

JESY Y SAMI  
POR SU AMISTAD, POR TU  
APOYO EN LA TESIS QUE  
DESCRIBÍAN MOMENTOS DE  
ALEGRÍA, DE PRISA, DE  
EMOCIÓN...

LMJ PENTECOSTÉS  
NO HACE FALTA  
MENCIONARLOS PORQUE  
NO QUIERO QUE SE ME PASE  
ALGUNO, POR LOS QUE NO  
ESTAN Y LOS QUE ESTAN,  
GRACIAS POR LOS  
MOMENTOS JUNTOS DE

MISIÓN, DE ACTIVIDADES,  
QUE TODOS FUERON  
FASINANTES POR SU APOYO  
Y ORACIÓN Y POR ESE  
REGALO QUE DIOS ME DIÓ  
EN USTEDES SU AMISTAD Y  
EL AMOR...

A MIS COMPAÑEROS  
POR LA OPORTUNIDAD DE  
CONOCERLOS Y POR SU  
COMPAÑÍA GRACIAS A  
ALMA, PATY, JESI, REBEK,  
FABY, ANAHÍ, JOZE,  
RODRIGO, MOTA, MARINA,  
DONAJÍ, RICARDO, PATY  
AYALA,

A LA DRA LUPITA  
POR ACEPTARME COMO SU  
TESISTA, POR DARME EL  
APOYO MORAL,  
ECONÓMICO PARA  
REALIZARLO GRACIAS POR  
LA CONFIANZA QUE  
DEPOSITÓ EN MÍ, POR SU  
PACIENCIA, POR SU  
AMISTAD Y NUESTRAS  
VIVENCIAS HACERLAS  
SUYAS AL PONERSE EN  
NUESTRO LUGAR TANTAS  
VECES

A ISIDRO:  
POR TU AMISTAD, POR LA  
CONFIANZA QUE SIEMPRE  
ME HAS BRINDADO,  
APRECIO Y APOYO EN LO  
ACADÉMICO, EN LOS  
MOMENTOS DE CRISIS, POR  
LA DISPONIBILIDAD QUE TE  
CARACTERIZA, GRACIAS  
POR SER EL MAESTRO QUE  
TODOS DEBERÍAN SER

A LA DRA LAURA  
GRACIAS POR SU APOYO,  
CONSEJOS Y PACIENCIA  
PARA QUE PUDIERA  
REALIZAR UNA DE MIS  
METAS, TERMINAR LA TESIS  
DE LA LICENCIATURA

A MIS PROFESORES

POR LOS BUENOS DE LOS  
QUE APRENDÍ MUCHO Y  
POR EL EMPEÑO QUE LE  
PONÍAN PARA QUE YO  
APRENDIERA, A LOS MALOS  
QUE TAMBIÉN APRENDÍ DE  
ELLOS LO QUE NO DEBO  
APLICAR EN MI VIDA, PARA  
TODOS GRACIAS

A LA BIOL CONY EL  
PERSONAL DE LAB DE  
GENÉTICA DEL HOSPITAL 20 DE  
NOVIEMBRE  
GRACIAS POR SU TIEMPO,  
COMPRESIÓN Y APOYO  
PARA QUE APRENDIERAMOS  
LA TÉCNICA QUE  
UTILIZAMOS EN LA TESIS,  
CONY GRACIAS POR  
DEDICARNOS UN POCO MÁS  
DE TU VALIOSO TIEMPO

AL PERSONAL DE LA  
FACULTAD DE QUÍMICA:  
ALMACÉN, BIBLIOTECA,  
SALA DE CÓMPUTO,  
INTENDENCIA, POR QUE  
MÁS DE UNA VEZ ME  
TENDIERON LA MANO  
CUANDO NECESITABA DE SU  
AYUDA GRACIAS

A LA FAMILIA QUE AHORA ME  
FORMA:

AL AMOR DE MI VIDA: HORACIO

NO TENGO PALABRAS PARA  
AGRADECER ÉSTE AMOR TAN  
GRANDE QUE IRRADIA MI VIDA  
GRACIAS A TI, GRACIAS POR  
TU AMOR, POR TU  
COMPRESIÓN, POR SER MI  
ESPOSO, MI AMIGO, MI APOYO,  
POR LA LIBERTAD Y ALEGRIA  
QUE ME DA COMPARTIR MI  
VIDA CONTIGO, POR ESTAR  
CONMIGO DESDE AHORA,  
GRACIAS AMOR...

A NUESTRO HIJO

A ÉSTE BEBÉ QUE LLEVO EN  
MIS ENTRAÑAS QUE ES EL  
AMOR, LA FUERZA, LA  
VOLUNTAD Y UNO DE MIS  
PRINCIPALES MOTIVOS  
PARA SEGUIR ADELANTE,  
TE AMO BEBÉ, GRACIAS  
POR VENIR Y MOTIVARNOS  
PARA SEGUIR LUCHANDO  
POR LAS METAS QUE  
LOGRAREMOS JUNTOS

## ÍNDICE GENERAL

### CONTENIDO

	PÁGINA
ÍNDICE GENERAL	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
ÍNDICE DE FÍGURAS	iv
RESUMEN	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	2
II.1 Características químicas y clasificación de las progesteronas	2
II.2 Síntesis de progesterona	4
II.3 Receptor a la progesterona	4
II.4 Mecanismos de acción de la progesterona	7
II.4.1 Mecanismos de acción de las progestinas	8
II.5 Características farmacocinéticas de la progesterona	10
II.6 División celular y cromosomas	11
II.7 Características de los cromosomas	14
II.7.1 Tamaño cromosómico	14
II.7.2 Posición del centrómero	15
II.7.3 Posición de los organizadores nucleolares	15
II.7.4 Patrones de heterocromatina	16
II.7.5 Patrón de bandas	16
II.8 Estudios relacionados	17
III. HIPÓTESIS	25
IV. OBJETIVOS	26
IV.1 General	26
IV.2 Específicos	26

V. METODOLOGÍA	27
V.1 Materiales	27
V.1.1 Equipo	27
V.1.2 Reactivos	28
V.2 Método	29
V.2.1 Toma de muestra	29
V.2.2 Siembra	29
V.2.3 Cosecha	30
V.3 Diseño experimental	32
V.4 Análisis estadístico	34
VI. RESULTADOS	37
VI.1 Control negativo	37
VI.2 Control positivo	38
VI.3 Control acetato de sodio	39
VI.4 Tratamientos	40
VI.4.1 Dosis 0.022 mg/ml de 17-MPA	40
VI.4.2 Dosis 1.1 mg/ml de 17-MPA	42
VI.4.3 Dosis 2.2 mg/ml de 17-MPA	43
VII. DISCUSIÓN	46
VIII. CONCLUSIÓN <i>CONCLUSIONES</i>	53
IX. BIBLIOGRAFÍA	54
ANEXO	58

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Diseño experimental. En éste cuadro se muestran los mg aplicados al control negativo, positivo y a los diferentes grupos tratados así como las concentraciones a las que quedaron los mismos.	32
2	Curva de concentración respuesta de mitomicina C. En el cuadro se muestran los $\mu\text{g}$ de mitomicina C, y las concentraciones en cada tubo.	33
3	Control negativo. Los daños espontáneos observados se indican en las muestras analizadas sin tratamiento.	37
4	Control positivo. La mitomicina C induce alteraciones citogenéticas a una concentración de $1 \mu\text{g/mL}$ .	38
5	Tratamiento 1. 17-MPA induce cambios citogenéticas a una concentración de $0.022\text{mg/mL}$ (2 veces la dosis del fármaco).	41
6	Tratamiento 2. 17-MPA produce alteraciones cromosómicas al aplicar una concentración de $1.1 \text{mg/mL}$ equivalente a 100 veces la dosis del fármaco.	42
7	Tratamiento 3. 17-MPA produce anomalías que se encontraron al aplicar una concentración de $2.2 \text{mg/mL}$ (200 veces la dosis del fármaco).	44

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Las estructuras químicas de gestágenos naturales, sintéticos y de antigestágenos. Dentro de los derivados de la progesterona se encuentra el acetato de medroxiprogesterona.	3
2	Biosíntesis de las hormonas gonadales. Se indica la vía $\Delta^4$ que sigue la pregnenolona por la fase lútea para la formación de la progesterona, así como la síntesis de otras hormonas derivadas de ésta.	6
3	Anatomía del aparato reproductor femenino. En la figura se indican las regiones en las que actúan las progestinas: epitelio vaginal, endometrio, trompas de Falopio y en la ovulación.	11
4	Cariotipo masculino normal con resolución de 550 bandas. Es un ejemplo típico que muestra los pares de cromosomas homólogos dispuestos de acuerdo con su tamaño, patrón de bandas y posición del centrómero. Cada cromosoma puede así compararse banda por banda con su homólogo en busca de cualquier cambio que haya podido tener lugar en la estructura del cromosoma. Este cariotipo describe como 46 XY.	13
5	Cromosomas. Los cromosomas en metafase de sangre periférica se observan dispersos después de la ruptura celular.	14
6	Bandas G. Los patrones de bandas G en dos cromosomas humanos 1, X y las posiciones de los genes de los cromosomas.	17
7	Ejemplo de un caso. La partición de la suma de cuadrados total en un análisis de varianza completo al azar, donde se aplican tres tratamientos.	34
8	Cariotipo del control negativo. Los cromosomas se observan normales agrupados por número y grupo.	37

- 9 Cariotipo que muestra el efecto del grupo tratado con mitomicina C a una concentración de 1 µg/mL. Se utilizó éste clastógeno por su alta efectividad de daño, en éste cariotipo se observan gaps en los cromosomas pertenecientes al grupo C. Cariotipo con 46 cromosomas. 39
- 10 Cariotipo tratado con acetato de sodio a 2.3 mg/ml. Esta dosis de acetato de sodio es el equivalente a la concentración más alta de 17-acetato de medroxiprogesterona 2.2 mg/ml. Se indica un gap en el cromosoma perteneciente al grupo A. Cariotipo con 46 cromosomas. 40
- 11 Cariotipo que caracteriza a linfocito tratado con 17- MPA a una concentración de 0.022mg/mL (con 2 veces la dosis del fármaco). En éste cariotipo se observa la pérdida de material genético en un cromosoma perteneciente al grupo A. Cariotipo con 46 cromosomas. 41
- 12 Cariotipo que representa al grupo tratado con 1.1 mg/mL de 17-MPA equivalente a 100 veces la dosis del fármaco. En éste cariotipo se observa un cromosoma de más perteneciente al grupo B lo que podría ser trisomía y pérdida de material genético en cromosoma de grupo B. Cariotipo con 47 cromosomas. 43
- 13 Cariotipo que pertenece a linfocito tratado con 2.2 mg/mL de 17-MPA (200 veces la dosis del fármaco). En este cariotipo se observan gaps en cromosomas pertenecientes a los grupos A y C. Cariotipo con 46 cromosomas. 44
- 14 Metafases anormales. En la gráfica se indican las diferencias de los daños citogenéticos en los grupos realizados en los tres experimentos de forma general. 45
- 15 Estructura mitomicina C. Se pueden observar los grupos funcionales que conforman la mitomicina C que hacen que sea un clastógeno potente: 1) grupo aziridina, 2) quinona, 3) anillo mitosano. 48

## I. INTRODUCCIÓN

Pocos años después de la introducción de los anticonceptivos orales se utilizó la administración parenteral de hormonas esteroideas como un enfoque alternativo para la anticoncepción. Una suspensión microcristalina del acetato de medroxiprogesterona es usada extensamente alrededor del mundo como anticonceptivo, particularmente en países en vías de desarrollo.

El acetato de medroxiprogesterona MPA se ha aplicado como anticonceptivo inyectable trimestral desde aproximadamente mediados de la década de los 70. MPA es una progesterona sintética que en su forma de depósito microcristalina se puede aplicar en inyección intramuscular simple, su efectividad es muy alta y su principal problema, la irregularidad que induce en el sangrado menstrual, específicamente amenorrea.

El acetato de medroxiprogesterona es un derivado hormonal que tiene propiedades de polvo cristalino blanco; inodoro, estable al aire, y se libera en una suspensión cristalina a base de agua y el cuerpo la absorbe gradualmente. El mecanismo molecular de la acción del acetato del medroxiprogesterona sintético es relativamente no específico y aún sigue en discusión.

En este trabajo se estudiaron los efectos clastogénicos del 17-acetato de medroxiprogesterona (17- MPA), para contribuir a conocer el daño al material genético ocasionado por dicho compuesto. Para ello se llevaron a cabo cultivos de linfocitos humanos que fueron sometidos al efecto de la hormona antes mencionada y los resultados obtenidos se compararon con mitomicina C (MMC) que es un clastógeno conocido.

## II. ANTECEDENTES

### II.1 Características químicas y clasificación de las progesteronas

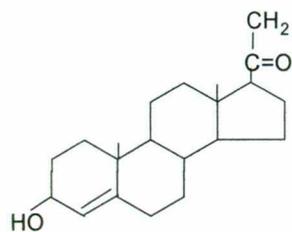
La hormona progesterona es un esteroide que participa entre otras funciones en el ciclo menstrual femenino y en combinación con estrógenos como anticonceptivo. Existen múltiples derivados sintéticos con estructura esteroidea que presentan actividad estrogénica androgénica o incluso antagonista sobre algunos receptores. La clasificación de las progesteronas es la siguiente (Figura 1):

- Derivados de la progesterona y  $17\alpha$ -hidroxiprogesterona: por vía oral, acetatos de clormadinona, megestrol y medroxiprogesterona; por vía parenteral, acetato de medroxiprogesterona, acetofénido de dihidroxiprogesterona (algestona) caproato de hidroxiprogesterona y acetofenona.
- Compuestos derivados de la testosterona: la adición de grupos alquilo en  $C_{17}$  confiere actividad progestágena y eficacia por vía oral: etisterona y dimetisterona.
- Derivados de la 19-nortestosterona: son productos que carecen del grupo metilo de la testosterona en posición  $C_{19}$ . Aunque la 19-nortestosterona es inactiva, la adición de un grupo etinilo en posición  $C_{17}$  origina sustancias con menor metabolismo hepático, activas por vía oral: noretrindona o noretisterona, el noretinodrel y el acetato de etinodiol. La tibolona es un derivado del noretinodrel.
- Otros derivados: se caracterizan por la presencia de un grupo etilo en posición  $C_{13}$  (13-etil-gonanos), entre los que se encuentran el levonorgestrel (derivado de noretinodrel), el desogestrel, el gestodeno y el norgestimato, éstos dos últimos son profármacos cuyos metabolitos activos son el 3-cetodesogestrel y el levonorgestrel, respectivamente. Finalmente éste derivado 13-metil gonano con un grupo cianometilo en posición  $C_{17}$ , el

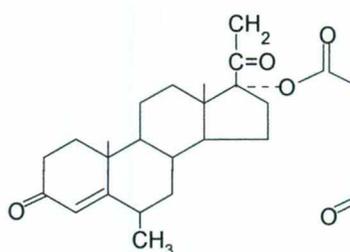
dienogest (etinilestradiol). La supresión del grupo oxi en C<sub>3</sub> origina el grupo de los estrenoles: alilestrenol y linestrenol, que también poseen sustitución en C<sub>17</sub>.

- Derivados de la 19-norprogesterona: nomegestrol.
- Antagonistas de la progesterona: mifepristona que también es un derivado 19-noresteroideo (Flórez, 2000).

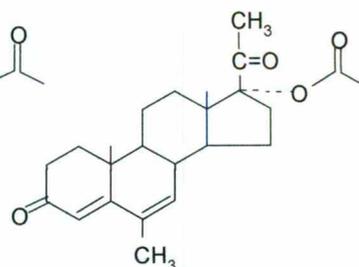
#### A. PROGESTERONA Y DERIVADOS



PROGESTERONA

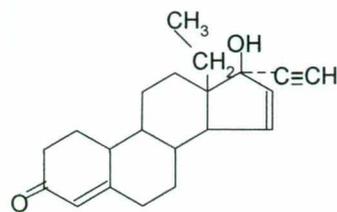


ACETATO DE MEDROXIPROGESTERONA

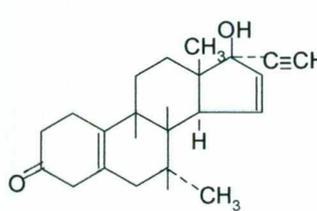


ACETATO DE MEGESTROL

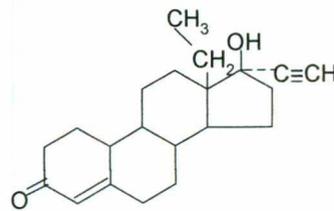
#### B. DERIVADOS DE 19-NORTESTOSTERONA



GESTODENO

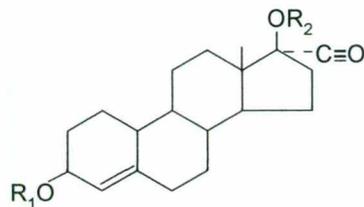


TIBOLONA



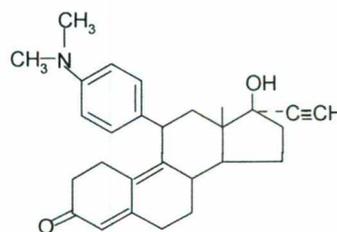
NORGESTREL

#### C. ANTAGONISTAS



R<sub>1</sub> Y R<sub>2</sub>: H = ETINODIOL

R<sub>1</sub> Y R<sub>2</sub>: CO-CH<sub>3</sub> = DIACETATO DE ETINODIOL



MIFEPRISTONA

Figura 1. Las estructuras químicas de gestágenos naturales, sintéticos, y de antigestagénicos. Dentro de los derivados de la progesterona se encuentra el acetato de medroxyprogesterona (Flórez, 2000).

## II.2 Síntesis de progesterona

La síntesis de los gestágenos se lleva a cabo en los ovarios principalmente a partir del colesterol sanguíneo o en pocas cantidades de acetil coenzima A por la combinación de diferentes moléculas para formar el núcleo esteroideo. Las primeras hormonas que se forman son la progesterona y la testosterona, posteriormente dichas hormonas se convierten en estrógenos por acción de las células de la granulosa. En la fase luteínica del ciclo se forma gran cantidad de progesterona (Guyton y Hall, 1996).

## II.3 Receptor a progesterona

Hay un gen único que codifica para receptores a progesterona, aunque en algunos tejidos se observan dos formas de receptor, las formas A y B. El receptor A es la forma más pequeña y constituye una forma truncada del receptor B. Ambos receptores se unen a la hormona y son activos como factores de transcripción, pero se desconoce la importancia fisiológica y farmacológica de las dos formas. El receptor de progesterona se expresa en vías reproductoras femeninas, glándulas mamarias, sistema nervioso central, e hipófisis, pero por lo general tiene una distribución más limitada en los tejidos que en los receptores de estrógenos u otras hormonas esteroideas (Hardman y col., 1996).

Los progestágenos pueden incluir decrementos de las concentraciones de receptores de estrógenos, aumentos del metabolismo local de estrógenos hacia metabolitos menos activos, o la inducción de productos de genes que disminuyen las respuestas celulares a compuestos estrogénicos (Hardman y col., 1996).

El control de receptores estrogénicos y receptores a progesterona se lleva a cabo con frecuencia ya que la progesterona aprecia una acción antiestrogénica, que bien habría que calificar como modificadora de la acción del estrógeno y que se explica en los mecanismos de receptores. La progesterona, en efecto, reduce la concentración de receptores estrogénicos en el citoplasma celular, así como el número de complejos estrógeno receptor en el núcleo; de éste modo la progesterona, secretada fisiológicamente después del estrógeno, evita la estimulación y el desarrollo excesivos promovidos por el estrógeno que podrían causar hiperplasia e incluso, neoplasia. Al disminuir la actividad estrogénica y puesto que ésta es favorecedora de la síntesis de receptores gestagénicos, la progesterona inhibe la producción de sus propios receptores. El acetato de medroxiprogesterona y de megestrol tienen una afinidad por el receptor gestágeno similar al de la progesterona, pero provocan mayor actividad progesterónica; ambos tienen actividad antiestrogénica, pero no tienen actividad androgénica (Flórez, 2000). Esta información no es consistente con lo reportado por Sitruk y Ware en 2002, en la que altas dosis de acetato de medroxiprogesterona presenta propiedades androgénicas, lo que podría explicar muchos de los efectos en los lípidos encontrados con ésta droga. Generalmente las progesteronas con propiedades androgénicas han mostrado una leve oposición al incremento del HDL colesterol generado por los estrógenos, más bien su efecto se ha visto en la presión arterial como se ha observado en otro estudio realizado en mujeres postmenopáusicas normotensas, utilizando un compuesto combinado continuo de estradiol transdérmico y acetato de medroxiprogesterona, se observó una reducción de la media tanto sistólica como diastólica (Sitruk y Ware, 2002).

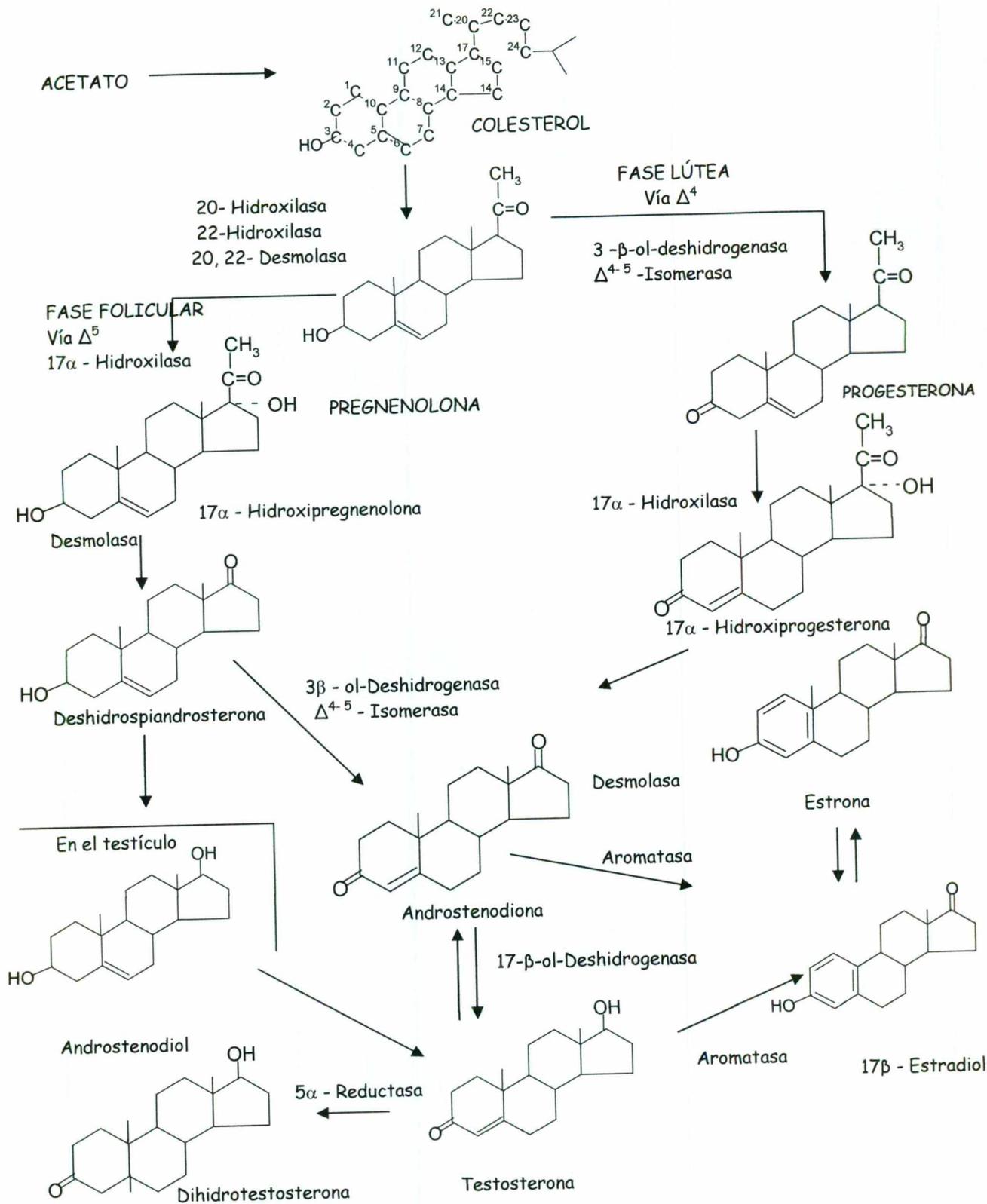


Figura 2. Biosíntesis de las hormonas gonadales. Se muestra la vía  $\Delta^4$  que sigue la pregnenolona por la fase lútea para la formación de la progesterona, así como la síntesis de otras hormonas derivadas de ésta (Flórez, 2000).

## II.4 Mecanismos de acción de la progesterona

La progesterona entra a la célula por difusión pasiva mediada por proteínas transportadoras y se unen a receptores citosólicos y nucleares específicos. El receptor experimenta un cambio alostérico de conformación convirtiendo el complejo receptor de una forma inactiva a una forma activa. La activación del complejo receptor tiene una alta afinidad por secuencias específicas nucleares, que tienen características de los elementos clásicos del reforzador. La unión hormona-receptor da lugar típicamente a la activación genética e incrementa la síntesis de mRNA que se traslada a los ribosomas citoplasmáticos de tal modo que aumenta la síntesis de proteínas, las cuales pueden modificar las funciones celulares, crecimiento o diferenciación (Maier y Herman, 2001).

En el útero previamente influido por el estradiol, la progesterona estimula el desarrollo y la actividad del endometrio secretor, pero si el endometrio no estuviera previamente estrogenizado, provocaría atrofia glandular. En el primer lugar el endometrio será receptivo al blastocisto, mientras que el segundo lo rechazará. Al descender la concentración de progesterona, la mucosa se desprende; el descenso de progesterona o de progestinas sintéticas constituye el medio más eficaz de provocar la menstruación. En el útero gestante, la progesterona deprime su excitabilidad y de éste modo reduce la contractilidad. En las glándulas endocervicales, la secreción acuosa producida por los estrógenos se transforma en secreción viscosa. En el epitelio vaginal impide la transformación que experimentan las células al perder su núcleo, convirtiéndose en placas o escamas celulares que provocan los estrógenos. En la trompa de Falopio reduce la secreción de células calciformes y aumenta la actividad de las células filiales, facilitando así el paso del óvulo. En el tejido mamario, la progesterona sinérgicamente con el estrógeno, facilita el desarrollo glandular; al término del embarazo, la lactación sobreviene bajo la acción de la prolactina, después que descienden los niveles de estrógenos y progestinas (Flórez, 2000).

La progesterona puede ocupar receptores aldosterónicos con escasa capacidad activante, por lo que se comporta como antagonista de la aldosterona, pudiendo provocar hipersecreción compensadora de aldosterona. En el eje hipotálamo hipofisiario, la progesterona inhibe la liberación de GnRH y su acción facilitadora sobre la secreción de LH en hipófisis; éste efecto es mayor cuando la progesterona está asociada a estrógenos. En el SNC, ciertos núcleos encefálicos poseen receptores progestínicos. La progesterona modifica la termorregulación, provocando un aumento de la temperatura corporal de alrededor de 0.5 °C en la segunda parte del ciclo femenino. Estimula también la respiración, observándose un descenso de la  $P_{CO_2}$  arterial. La falta de eficacia de la progesterona por vía oral promovió la síntesis de nuevos compuestos. Sin embargo la actividad biológica de estos productos difiere notablemente ya que cambian su actividad antiestrogénica y su actividad androgénica. Además ciertas modificaciones moleculares consiguen cambiar la velocidad de absorción hasta periodos muy prolongados, con niveles bajos pero suficientes para conseguir determinados efectos (Flórez, 2000).

#### II.4.1 Mecanismos de acción de las progestinas

- Mecanismo primario. En la ovulación las progestinas perturban el equilibrio de las hormonas naturales bloqueando las señales del hipotálamo y la glándula pituitaria, situada cerca del cerebro, las cuales son necesarias para la ovulación. Las hormonas son los mensajeros químicos en la sangre, y fluctúan con un patrón predecible durante el ciclo menstrual de la mujer. Se necesitan oleadas periódicas de estrógenos para que ocurra la ovulación; y los aumentos del nivel de las hormonas de la glándula pituitaria, situada en la base del cerebro, provocan la liberación del óvulo (Rodríguez y Gómez, 2003).

- Los anticonceptivos de progestinas controlan el flujo de los niveles hormonales para reducir los niveles máximos cíclicos que ocurren en las mujeres fértiles. Las progestinas apagan el hipotálamo y la glándula pituitaria, impidiendo así que envíe los mensajes necesarios para la ovulación. Como consecuencia de ello, en algunos ciclos, ningún folículo se madura lo suficiente como para liberar al óvulo. Las progestinas, por tanto, alteran centralmente los patrones de secreción; los signos de la ovulación no llegan en el momento indicado, por lo que las mujeres no ovulan normalmente. Lo único que hacemos es confundir los relojes del cerebro administrando progesterona externamente. Sin embargo, las progestinas no siempre bloquean la ovulación ni lo hacen en todas las mujeres. La suspensión de la ovulación está vinculada a la cantidad de progestina presente en el cuerpo de la mujer. Las mujeres que tienen niveles más bajos de progestina en la sangre tienen más probabilidad de ovular, y cuanto más grasa tenga la mujer, más progestina se requiere para lograr el mismo nivel de eficacia anticonceptiva. Típicamente, cuando todas las mujeres reciben la misma dosis, las progestinas son un poco menos eficaces en las mujeres que pesan más. El moco cervical juega un papel importante, su densidad fluctúa normalmente durante todo el ciclo menstrual de la mujer, haciéndose delgado y acuoso en el nivel máximo de fecundidad. La progestina mantiene espeso el moco todo el tiempo, lo cual dificulta la penetración del espermatozoide. El efecto de la progestina en el moco parece ser el mecanismo de acción menos duradero, aunque quizás sea el más inmediato (Rodríguez y Gómez, 2003).
- Mecanismos secundarios. En el endometrio las progestinas bloquean su engrosamiento, haciéndolo menos hospitalario para el óvulo fecundado. El endometrio sigue formando un revestimiento que se elimina periódicamente, causa posible del sangrado periódico o irregular asociado con los inyectables (Seuc y col., 2000). Mientras que en las trompas de Falopio se

creo que los inyectables retardan el desplazamiento del óvulo a lo largo de las trompas de Falopio desde el ovario hasta el útero, reduciendo el número de cilios, que son los filamentos que recubren las trompas y movilizan el óvulo; además, disminuye la fuerza muscular de las trompas, por lo cual las contracciones de estas se debilitan (Figura 3) (Rodríguez y Gómez, 2003).

## II.5 Características farmacocinéticas de la progesterona

La progesterona por vía oral se metaboliza con tal rapidez en el hígado que resulta ineficaz, de ahí que se deba administrar en soluciones oleosas por vía parenteral; de este modo, aunque su aclaración plasmática sea rápida, la acción en los tejidos se prolonga durante todo el día. El principal metabolito es el pregnanodiol, que se encuentra en forma libre y en forma conjugada como glucuronato o como sulfato; en su mayor parte se elimina por la orina. Los numerosos productos sintéticos tienen la ventaja de ser activos por vía oral; algunos de ellos, convenientemente preparados en solución como el acetato de medroxiprogesterona, o debido a su lento metabolismo, como ocurre con el enantato de noretisterona prolongan su acción durante 2 o 3 meses (García, 1993).

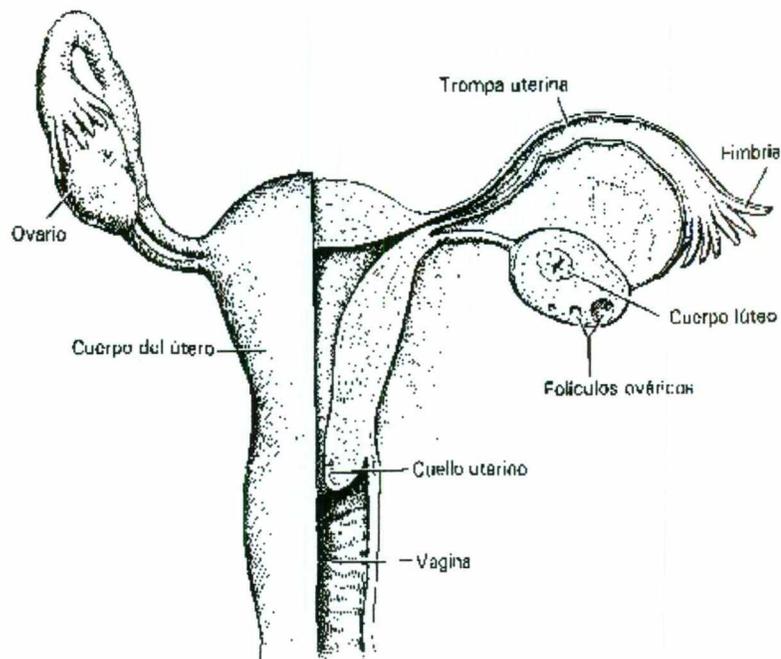


Figura 3. Anatomía del aparato reproductor femenino. En la figura se pueden observar algunas de las regiones en las que actúan las progestinas: cuerpo del útero, trompa uterina, cuerpo lúteo, folículos ováricos y vagina (Instituto de Esterilidad y Salud Reproductiva, 1996-2004).

## II.6 División celular y cromosomas

En cada ser vivo hay una sustancia que se denomina material genético, este material está constituido por un compuesto del ácido nucleico DNA. Una molécula de DNA tiene muchas unidades llamadas genes, cuyos productos dirigen todas las actividades metabólicas de las células. El DNA con su batería de genes, está organizado en cromosomas, estructuras que sirven de vehículo para la transmisión de la información genética. El modo en el que los cromosomas se transmiten de una generación celular a la siguiente, y de los organismos a sus descendientes, es extraordinariamente preciso (Klug y Cummings, 1999).

En las células eucariotas hay dos procesos importantes la mitosis y la meiosis. Aunque el mecanismo de ambos procesos es muy similar en muchos aspectos, los resultados son totalmente diferentes. La mitosis conduce a la producción de dos células, cada una con un número de cromosomas idénticos al de la célula paterna. La mitosis es aquel período del ciclo celular durante el cual los componentes hereditarios se reparten de manera precisa e igual en las células hijas. En la mayoría de los casos, los cromosomas son visibles más fácilmente en la etapa de metafase en la mitosis. Cuando las células no están en división, el material genético que constituye los cromosomas se despliega y se desespiraliza, dando lugar en el interior del núcleo a una red difusa, que en conjunto se denomina cromatina. Los cromosomas se visualizan más fácilmente en la mitosis; cuando se examinan con cuidado se observa que tienen un tamaño y forma característicos (Klug y Cummings, 1999).

El cariotipo es el resultado de la forma en la que se presenta de manera física una metafase y se valoran los diferentes aspectos de los cromosomas de un individuo y se revisan los aspectos de los mismos; tamaño comparativo, así como la forma, la morfología y otros marcadores visibles en un microscopio óptico (Figura 4). La citogenética se encarga del estudio de los cromosomas y el análisis de sus propiedades genéticas, disciplina que combina la citología con la genética (Griffiths y Gelbart, 2000).

En la mitosis la célula se divide para formar dos células hijas idénticas, no así en la meiosis en la que se forman 4 células diferentes y se realiza exclusivamente en las células germinales, los cromosomas se vuelven muy compactos durante la división celular y ocurren muchos cambios para dar lugar a las dos células hijas. Para ello los componentes de los cromosomas se condensan desde la forma muy extendida en que se encuentran en células que no están en división hasta formar estructuras más gruesas y cortas que pueden ser más fácilmente manejadas por el aparato de la división celular. Los cromosomas condensados son como se observan al microscopio (Figura 5) (Griffiths y Gelbart, 2000).

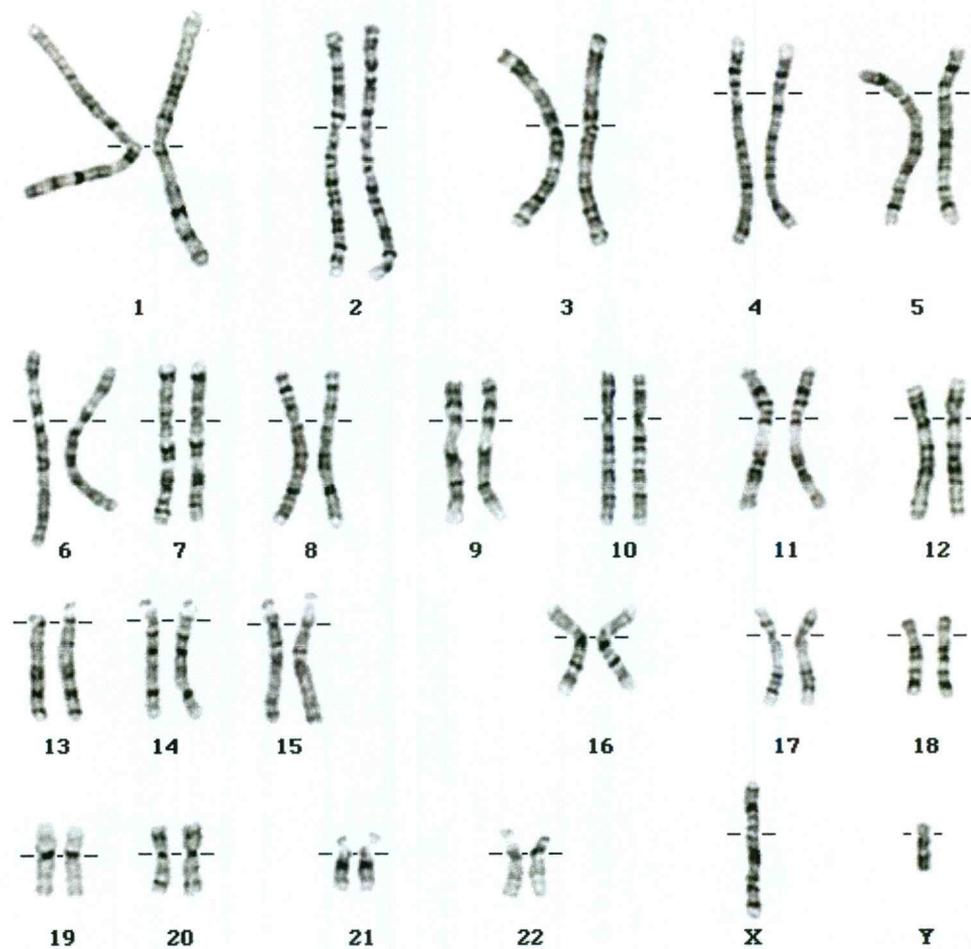


Figura 4. Cariotipo masculino normal con resolución de 550 bandas. Es un ejemplo típico que muestra los pares de cromosomas homólogos dispuestos de acuerdo con su tamaño, patrón de bandas y posición del centrómero. Cada cromosoma puede así compararse banda por banda con su homólogo en busca de cualquier cambio que haya podido tener lugar en la estructura del cromosoma. Este cariotipo describe como 46 XY (Griffiths y Gelbart, 2000).



Figura 5. Cromosomas. Los cromosomas en metafase de sangre periférica humana se observan dispersos después de la ruptura celular (Sánchez, 2006).

## II.7 Características de los cromosomas

### II.7.1 Tamaño cromosómico

Los cromosomas de un genoma concreto pueden diferir considerablemente en el tamaño. Cuando se estudian los cromosomas de una especie es necesario clasificarlos por su tamaño y posición del centrómero para asociarlos en diferentes grupos (Griffiths y Gelbart, 2000).

### II.7.2 Posición del centrómero

Cada cromosoma tiene una región condensada, o constreñida llamada centrómero, que confiere la apariencia general de cada cromosoma. A ambos lados del centrómero se sitúan los brazos cromosómicos. Dependiendo de la posición del centrómero, los brazos tienen longitudes relativas distintas. La posición del centrómero define la relación entre las longitudes de los brazos cromosómicos y es útil para identificar los cromosomas concretos. Los cromosomas se clasifican en metacéntricos, submetacéntricos y acrocéntricos o telocéntricos de acuerdo a la localización del centrómero. Por convención, el brazo más corto es el que se encuentra por encima del centrómero y se denomina brazo p. El brazo más largo se encuentra debajo y se denomina el brazo q. Las células somáticas de los individuos de una misma especie tienen el mismo número de cromosomas, es el llamado número diploide ( $2n$ ). Por esta razón casi todos los cromosomas se encuentran formando parejas. Los miembros de cada par se denominan cromosomas homólogos. Para cada cromosoma con una longitud y una situación en el centrómero específicas, existe otro cromosoma con rasgos idénticos aunque algunas veces hay excepciones a la regla (Griffiths y Gelbart, 2000).

### II.7.3 Posición de los organizadores nucleolares

Los nucleolos son estructuras esféricas que se encuentran asociadas a estrechamientos de los cromosomas llamados organizadores nucleolares. Los distintos organismos difieren con respecto al número de los organizadores nucleolares, que varían en número desde solo uno hasta muchos por serie cromosómica. Las posiciones de los nucleolos son marcadores útiles para el análisis citogenético (Griffiths y Gelbart, 2000).

#### II.7.4 Patrones de heterocromatina

Cuando los cromosomas se tratan con compuestos químicos reaccionan con el DNA y se ponen en manifiesto regiones de distinta intensidad de tinción. Las regiones que se tiñen muy densamente se conocen con el nombre de heterocromatina y reflejan un alto grado de compactación; las regiones que se tiñen menos es llamada eucromatina e indican regiones menos compactas. La mayoría de los genes activos se encuentran en la eucromatina (Griffiths y Gelbart, 2000).

#### II.7.5 Patrón de bandas

Ciertos métodos especiales de tinción cromosómica han puesto en manifiesto la existencia de series intrincadas de bandas (tiras transversales) en una amplia gama de organismos. Las posiciones y tamaños de las bandas son muy específicas de cada cromosoma, por lo que resultan muy útiles como marcadores cromosómicos. Existen bandas Q (producidas por clorhidrato de quinacrina), Bandas G (producidas por tinción Giemsa) y bandas R (bandas G invertidas) (Figura 6) (Griffiths y Gelbart, 2000).

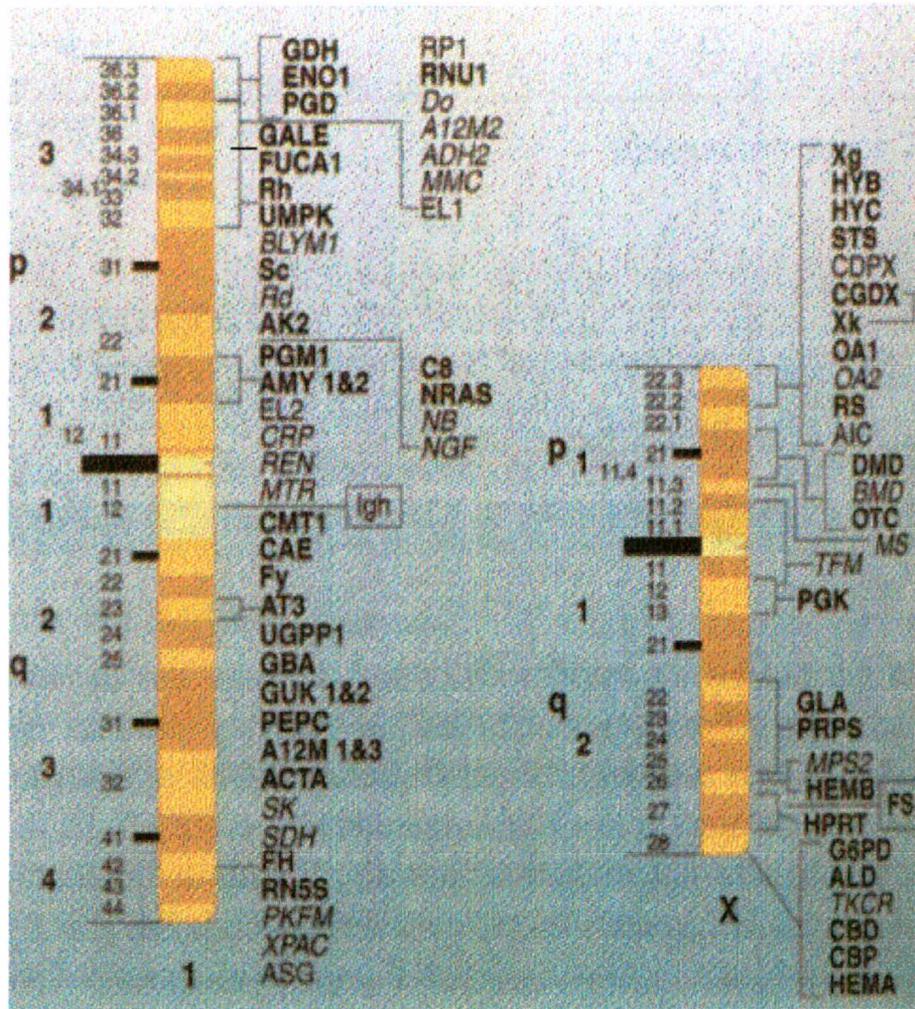


Figura 6. Bandas G. Los patrones de bandas G en dos cromosomas humanos 1, X y las posiciones de los genes de los cromosomas (Griffiths y Gelbart, 2000).

## II.8 Estudios relacionados

Rodríguez y col., 2000 midieron en suero colesterol, triglicéridos, lipoproteína de alta y baja densidad, apolipoproteínas A1 y B, hormona luteinizante, hormona foliculo estimulante, estradiol, progesterona, testosterona, globulina de la hormona esteroide en mujeres postmenopáusicas antes y después de cuatro diversas terapias de reemplazo de estrógeno-progestina para evitar interferencias genéticas o socioeconómicas cada mujer era su propio control. A los resultados que llegaron,

demonstraron que estradiol y triglicéridos aumentó perceptiblemente y disminuyeron la hormona folículo estimulante, hormona luteinizante, lipoproteína de alta densidad, apolipoproteína B, y colesterol después de todos los tratamientos en el suero. El suero P y T no cambió perceptiblemente después de cualesquiera de los tratamientos. Lipoproteína de alta densidad, la apolipoproteína A1 y globulina de la hormona esteroide aumentaron perceptiblemente de los grupos tratados con el acetato del medroxiprogesterona (MPA) pero no el grupo tratado con Norgestrel. Estos autores concluyeron que la terapia del reemplazo de la estrógeno-progestina en mujeres postmenopáusicas conduce a los cambios profundos y beneficiosos en lípidos y lipoproteínas del plasma y que los tratamientos con MPA cíclico o continuo podrían proporcionar la mayor protección contra la enfermedad cardíaca coronaria.

Estudios realizados en diferentes animales como la rata , el hámster, el conejo y el perro sugieren efectos tóxicos leves producidos por la progesterona, como disminución del peso corporal, alteraciones hepáticas y ovarios agrandados, así como atrofia en testículos y vesícula seminal (Maier y Herman 2001; Sarabia y García-Alcocer, 2002).

En ratones BALB/c se indujo carcinoma ductal mamario con el acetato del medroxiprogesterona (MPA) como agente carcinógeno, que revierten con estrógeno o antiprogestinas y fueron mantenidos por trasplantes seriales en ratones. Las variantes progestin-independiente posteriormente fueron apareciendo espontáneamente. De acuerdo con su respuesta al estrógeno o a las antiprogestinas, los subdividieron en variantes responsivas de progestin-independiente (R-PI) que revierten y los carcinomas insensibles de progestin-independiente (UR-PI) que son resistentes a ambas familias de compuestos de tal manera que investigaron la expresión del receptor de la progesterona (banda) en seis responsivas progestina-dependientes, seis R-PI, y tres tumores de UR-PI. Los tumores progestina-dependientes y de R-PI mantuvieron una expresión más alta de la isoforma de PR(A) con respecto a PR(B), así como una banda adicional del kDa 78 que no fue detectado en tejido fino uterino; todos regulados a la baja por las

progestinas. Los tumores de UR-PI expresaron niveles más bajos de todas las bandas en manchas blancas /negras occidentales, pero eran altamente reactivos por inmunohistoquímica. La expresión del RNA de la banda fue detectada en ambos, tumores de UR-PI y de R-PI. El atascamiento de la banda era comparable en tumores progestina-dependientes y de R-PI. En los tres tumores de UR-PI, solamente 29/61 (el 48%) de las muestras que evaluaron y demostraron a punto bajo niveles obligatorios, el resto era negativo. Este informe es el primero para describir en un modelo experimental del cáncer de pecho la expresión de las isoformas de la banda y de su distribución. Sus resultados sugirieron la expresión de isoformas funcionalmente alteradas en un subgrupo de carcinomas mamarios, que pueden explicar su carencia de la respuesta de la hormona (Helguero y col., 2003).

También, Krikun y col. (2004) reportaron la telomerasa en células estromales endometriales primarias (HESC) sin limitaciones para los estudios debido a la escasez del material humano y de la inhabilidad de pasar estas células en el cultivo por períodos largos. Aunque la inmortalización de estas células facilitaría grandemente los estudios; la misma da lugar a menudo a cariotipos anormales y a características funcionales aberrantes. Desarrollaron y compararon una línea inmortalizada de HESC para resolver ésta necesidad para prevenir el acortamiento normal de los telómeros observados en células somáticas del adulto durante la mitosis, encontraron que no contiene ninguna anomalía cromosómica clónica estructural o numérica, y que además al compararla con el tejido primario de las células madre la nueva línea de puntos finales bioquímicos similares exhibidas de la célula después del tratamiento con los esteroides ováricos (Krikun y col., 2004).

La respuesta clásica de la decidualización al estradiol más el acetato del medroxiprogesterona fue considerada en ambos morfológico, y la progestina fue probada para inducir o para regular la expresión de la proteína obligatoria 1 que unía a proteína-1, fibronectina, prolactina, factor del tejido fino, el activador plasminógeno inhibitor-1, y el ligando de Fas/Fas. Encontrando que la línea

inmortalizada de HESC es cariotípicamente, morfológica, y fenotípicamente similar a las células primarias de la madre, y es un recurso de gran alcance y constante para el trabajo *in vitro* (Krikun y col., 2004).

La 5a-Noretisterona (5a-NET) es un metabolito sintético que tiene alta afinidad por el receptor a progesterona e inhibe la acción de este esteroide natural. Analizaron el efecto *in vitro* e *in vivo* de 5a-NET sobre el desarrollo del ovocito desde la etapa de post-fertilización hasta la formación de la mórula. Utilizando técnicas previamente descritas, con algunas modificaciones los gametos fueron obtenidos de ratones hembras de la cepa Balb/C y de machos C57BL/6J. La fertilización la llevaron a cabo tanto *in vitro* como *in vivo* una vez que se observó la formación de los cuerpos polares, se inició la administración de 5a-NET a diferentes dosis al medio de cultivo y se incubaron a 37°C, 5% CO<sub>2</sub> y 95% aire. Los cambios en la estructura y morfología fueron analizados a diferentes tiempos de incubación por microscopio de luz (400x). Un total de 153 ovocitos fueron analizados en el modelo *in vivo* y de 142 en los experimentos *in vitro*. Obteniendo que la presencia de 5a-NET en el medio de cultivo ejerce efectos deletéreos sobre el desarrollo y morfología de los ovocitos fertilizados, reflejándose en la destrucción de los blastómeros y la aparición de granulaciones en su interior (Flores y col., 1999).

Siddique y Afzal (2005) realizaron estudios *in vitro* donde se efectuaron tratamientos para estudiar el mecanismo posible de la genotoxicidad del acetato de ciproterona en linfocitos humanos usando como parámetros las aberraciones cromosómicas, el índice mitótico y los intercambios de las cromátides hermanas; siguiendo como referencia que el acetato de ciproterona es genotóxico a 20, 30 µM. Se estudió el mecanismo posible de la genotoxicidad del acetato de ciproterona, la dismutasa de superóxido y la catalasa fueron utilizados por separado y en combinación con el acetato de ciproterona a 30 µM y en diversas dosis. Los resultados que se obtuvieron fue que el tratamiento con superóxido dismutasa aumenta las aberraciones cromosómicas y los intercambios de las cromátides hermanas y disminuyó el índice mitótico con respecto al tratamiento con 30 µM de

acetato de ciproterona solamente, por separado y conjuntamente con el tratamiento con superóxido dismutasa sugirieron un posible papel de la especie reactiva del oxígeno para el daño genotóxico. Otro experimento realizado por estos mismos autores, donde se estudió y aprobó la genotoxicidad del etinilestradiol en linfocitos humanos usando como parámetros las aberraciones cromosómicas, el índice mitótico y los intercambios de las cromátides hermanas. El etinilestradiol fue estudiado en tres diversas concentraciones, en 1, 5 y 10  $\mu\text{M}$ , en conjunto con la presencia como en ausencia de la fracción microsomal del hígado de la rata, así como con el NADP y en su ausencia; para probar el mecanismo posible de la genotoxicidad del etinilestradiol, la dismutasa superóxido y la catalasa fueron utilizados por separado y en la combinación junto con 10  $\mu\text{M}$  del etinilestradiol, solamente de la presencia de la activación metabólica con el NADP en ambas dosis aprobadas. Los resultados que obtuvieron fueron que el etinilestradiol fue encontrado genotóxico en 5 y en 10  $\mu\text{M}$  en la presencia de la mezcla de activación metabólica sin el NADP, el tratamiento de catalasa disminuyó las frecuencias de las aberraciones cromosómicas y de intercambios de las cromátides hermanas (Siddique y Afzal, 2005).

Bukvic y col. (2000) estudiaron las progestinas 17-alfa-etinilestradiol y el norgestrel en combinación las cuales inducen aumentos y aneuploidia de micronúcleos del linfocito y el fibroblasto en cultivos humanos, realizaron la prueba de una sustancia genotóxica que representa un acercamiento confiable para evaluar el peligro genético y para obtener información acerca de sus características carcinogénicas posibles, para evaluar los efectos citogenéticos *in vitro* de los anticonceptivos orales. Se llevaron acabo tratamientos en los que se usaron tres diversas concentraciones de mezcla de etinilestradiol y norgestrel en proporción 1:5 con dos diversas duraciones del tratamiento a las 48 y 72 h en dos tipos de células humanas: los linfocitos y los fibroblastos y una serie de métodos de prueba a corto plazo donde se observó intercambio de cromátides hermanas, presencia de micronúcleos (manganeso), y aberraciones cromosómicas. Se encontró que las hormonas no inducen aberraciones cromosómicas estructurales en linfocitos y no

indican que el etinilestradiol y el norgestrel tengan un efecto aneugénico en cultivos de linfocitos y fibroblastos (Bukvic y col., 2000).

Ahmad y col. (2001) evaluaron el potencial genotóxico de dos progestinas sintéticas anticonceptivas el norgestrel y noretindrona sobre los cromosomas de linfocitos humanos, donde se usaron como parámetros a evaluar las aberraciones cromosómicas, intercambios de las cromátides hermanas y la cinética del crecimiento de la célula. El estudio fue realizado por la presencia de ambas drogas, también en ausencia de la activación de la mezcla metabólica. Los linfocitos fueron expuestos a tres diversas concentraciones de las drogas (20,40 75 mg/ml para la noretindrona y de 10, 25, y 50 mg/ml para el norgestrel para tres diferentes tiempos 24, 48, y 72 h; de estos tratamientos se obtuvo que la droga noretindrona no fue genotóxica en cualquier concentración y en cualquier tiempo de exposición en presencia o ausencia de la mezcla; a diferencia de la otra droga norgestrel fue encontrado genotóxica al inducir aberraciones cromosómicas, intercambios de cromátides hermanas y el índice mitótico fue más significativo. Se concluyó que el norgestrel y sus metabolitos son posibles mutágenos potentes más allá de una dosis particular en linfocitos humanos.

En una evaluación toxicológica cuidadosa en varias especies animales, con el anticonceptivo Depo-Provera (depot-acetato de medroxiprogesterona o DMPA), que fue administrado por vía subcutánea o intramuscular; se probó en estudios de toxicidad a cortos y a largo plazo, conocimiento de efectos sobre la reproducción y el poder carcinogénico en conejos, monos, ratones, ratas, perros del beagle, y monos macaco de la India. Las pruebas de la genotoxicidad se realizaron *in vitro* e *in vivo*. Los resultados demostraron que el anticonceptivo Depo-Provera (depot-acetato de medroxiprogesterona o DMPA) no es significativamente diferente a otros anticonceptivos progestágenos en toxicidad y potencial para inducir tumores (Jordan, 1994).

La actividad progestacional fue probada en conejos jóvenes. Usando diferentes progestágenos, la nesterona es la progesterona con mayor potencia progestacional, siendo 10 veces mas potente que el levonorgestrel y 100 veces mas cuando es suministrado por vía subcutánea.

La noretisterona, el acetato de medroxiprogesterona y la drospirinona, utilizadas por vía oral son muy potentes pero menos que el levonorgestrel, mientras que el acetato de nomegestrol es cuatro veces más activo que el acetato de medroxiprogesterona (Stanten y col., 2001).

La afinidad de unión de algunas progesteronas con los receptores de estrógenos o andrógenos indica considerables diferencias entre las moléculas. La afinidad por el receptor de andrógenos del levonorgestrel y el desogestrel es de 70 y 40% respectivamente en comparación a la testosterona, en contraste la nesterona muestra poca o ninguna afinidad por dicho receptor (Stanten y col., 2001).

Las progesteronas con propiedades androgénicas muestran una leve oposición al incremento del HDL colesterol generado por los estrógenos mientras que la progesterona natural y algunos derivados de la 19 Nortestosterona como el Acetato de Nomegestrol no parecen afectar estos parámetros. En un estudio de forma aleatoria y a doble ciego, se comparó los efectos del Acetato de Nomegestrol con el acetato de Noretisterona en dosis de 5 mg/día, observándose que el incremento del HDL colesterol generada por el valerianato de estradiol era parcialmente revertido por la Noretisterona pero no por el Acetato de Nomegestrol. La importancia de los cambios lipídicos esta siendo cuestionada actualmente siendo el rol protector del HDL colesterol de aproximadamente un 30 a un 50%.

En ese mismo año se realizó otro estudio en mujeres postmenopáusicas normotensas, utilizando un compuesto combinado continuo de Estradiol transdérmico y Acetato de medroxiprogesterona, se observó una reducción de la media tanto sistólica como diastólica (Williams y col., 1998).

En la publicación de las dos últimas décadas se analizan la relación de la estrogenoterapia y el incremento de riesgo de cáncer de mama. Los resultados sugieren un mayor riesgo en las terapias combinadas. Todos los estudios coinciden en que el uso del agregado de progesterona en el tratamiento de reemplazo hormonal (THR) por más de 5 años muestran un leve incremento del riesgo de cáncer de mama, y encontraron menor riesgo en las mujeres con esquema combinado continuo (Ross y Paganni, 2000).

Los derivados de la testosterona como la noretisterona o el acetato de noretisterona son también combinaciones prescritas en hormonoterapia, fundamentalmente en los países escandinavos. Por lo tanto son diversos los compuestos utilizados y la población usuaria de hormonoterapia no es homogénea; además en Europa se utiliza el 17- $\beta$ -estradiol y el valerato de estradiol mientras que en los Estados Unidos se utiliza de preferencia los estrógenos conjugados equinos. Las dosis prescritas también varían entre ambos continentes. Además la co-prescripción de estrógenos y progesteronas es bastante reciente, el porcentaje de pacientes que recibieron hormonoterapia combinada en los reportes de la década de los '80 y hasta la mitad de los '90 es muy baja. Algunos experimentos recientes han indicado un mayor grado de proliferación en el tejido mamario con la exposición a la progesterona. Si la hormonoterapia combinada produce proliferación o diferenciación del tejido mamario sigue siendo controvertido (Bjorn y col., 2000).

### **III. HIPÓTESIS**

La progestina 17-acetato de medroxiprogesterona, induce cambios citogenéticos en los cromosomas humanos obtenidos a partir de linfocitos de sangre periférica.

## **IV. OBJETIVOS**

### **IV.1 General**

Estudiar el efecto de la progestina, 17-acetato de medroxiprogesterona, en cromosomas humanos de linfocitos de sangre periférica.

### **IV.2 Específicos**

- Realizar una curva concentración respuesta para la obtención de linfocitos en metafase para su estudio posterior.
- Evaluar el efecto de 17-acetato de medroxiprogesterona a diferentes concentraciones en cromosomas de linfocitos humanos.
- Analizar el tipo de aberraciones cromosómicas causadas por el 17-acetato de medroxiprogesterona.
- Realizar el análisis estadístico de los datos.

## V. METODOLOGÍA

### V.1 Materiales

- Gasas de algodón esterilizadas, marca Curapak.
- Lámpara de alcohol, marca Pirex.
- Guantes de látex, marca Ambiderm confort.
- Cubre bocas, marca VWR.
- Tubo de centrifuga de 15 ml con tapón de rosca, marca Falcón.
- Pipetas serologicas de 5 mL y 10 mL desechables estériles, marca Falcón.
- Vasos de precipitado de 50 ml, 100 ml, 250 ml, 1000 ml, marca Pirex y Kimax.
- Jeringas de insulina de 1mL estériles de marca B-D.
- Jeringas de 60 mL estériles de marca Terumo.
- Membrana millipore 0.20  $\mu\text{m}$  Minisart marca Santorius No. Lote 16534 050594.
- Pipetas Pasteur de vidrio longitud 9" marca Corning.
- Portaobjetos de 24 X75mm, marca Lauka.
- Eppendorf 0.5 mL y 1mL, marca Physio Care.
- Pinzas, marca Fontax.

#### V.1.1 Equipo

- Campana de flujo laminar Labconco, marca Delta Series.
- Incubadora de hibridación, marca Cole Parmer.
- Centrifuga Allegra 64-R, marca Beckman Coulter.
- Microscopio óptico con sistemas de fase, marca Zeiss.

### V.1.2 Reactivos

- Alcohol etílico absoluto anhidro 4 L, marca J.T. Baker, No. Lote A37C11.
- Suero fetal de Ternera 100 mL, marca Gibco, No. Lote 1243987.
- Antibiótico Penicilina-Streptomina 20 mL, marca Gibco, No. Lote 1316617.
- Fitohemaglutinina 10 mL, marca Gibco, No. Lote 1287023.
- Medio Ham F10 (Mezcla de nutrientes)+ L Glutamina 500 mL, marca Gibco, No. Lote 1319594.
- Karyo Max Colcemid Solución 10 µg/mL, 10 mL, marca Gibco, No. Lote 1305832.
- Ácido acético glacial 100% 1 L, marca J.T. Backer, No. Lote UN2789.
- Acetato de sodio anhidro grado reactivo (AS), marca USB, No. Lote 111114.
- Metanol 1 L, marca Fermont, No. Lote 06121.
- 17- Acetato de medroxiprogesterona (17-MPA) mínimo 97% grado HPLC 1 g, marca Sigma, No Lote M1629-1G.
- Mitomicina C (MMC) 2mg y 48 mg NaCl, marca Sigma, No. Lote 28H2535.
- Citrato de sodio cristales 500 g, marca J. T. Baker, No. Lote M-31323.
- Cloruro de Potasio cristales 500 g, marca J.T. Baker. No. Lote L42342.
- Karyo Max Giemsa R66 Solución 100 mL, marca Gibco, No. Lote 1226061.
- Cloruro de sodio 50 g, marca Fermont, No. Lote 24902.
- Aceite de inmersión 7.4 cc, marca Cargille.
- $\text{KH}_2\text{PO}_4$  al 0.3 M, solución preparada con Fosfato de potasio monobásico cristal ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ) 500 g, marca J. T. Baker, No. Lote 3246-01.
- $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  al 0.3 M, solución preparada con Fosfato de sodio dibásico anhidro ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ ) 500 g, marca J. T. Baker, No. Lote 3828-01.

## V.2 Método

### V.2.1 Toma de muestra

Las muestras de sangre periférica de personas voluntarias de sexo femenino que se tomaron en condiciones asépticas, se colocaron en un tubo con anticoagulante heparina.

### V.2.2 Siembra

Se encendió la campana de flujo laminar y practicó la asepsia con gasas impregnadas de alcohol de 96°, se dejó encendida la campana por 30 minutos. Los reactivos que se utilizaron se pusieron a temperatura ambiente dentro de la campana.

En tubos Falcon se colocaron 9 ml de medio de cultivo HAM-F10 y se les adicionó 0.1 ml de antibiótico (preparado con 10,000 unidades /mL de penicilina G sódica y 10,000 µg/mL de sulfato de estreptomicina en 0.85% de salina). A la mezcla obtenida se le adicionó una alícuota de 1 ml de Suero Fetal de Ternera quedando a una concentración de 10%, 13 gotas de sangre periférica (equivalente a 500-600 µL) con una pipeta de 10 ml desechable estéril y una alícuota de 0.1 ml de Fitohemaglutinina. Los tubos se homogenizaron cada vez que se adicionó un reactivo. El blanco se preparó colocando todos los reactivos antes mencionados sin la muestra de sangre. En el tubo del control negativo se colocaron todos los reactivos sin el tratamiento. En el tubo del control positivo se colocaron todos los reactivos y el volumen necesario de MMC (se disolvieron 2 mg en 20 ml de agua estéril) para hacer la curva de concentración respuesta. Los tubos problema contenían además de los reactivos las distintas concentraciones obtenidas en la

curva dosis respuesta. Los tubos antes mencionados se incubaron a 37 °C durante 72 horas.

### V.2.3 Cosecha

Una vez incubados los tubos, se prepararon las soluciones hipotónicas en tubos Falcón la cual consiste en una mezcla de solución de citrato de sodio al 0.4% y una solución de cloruro de potasio al 0.4% en una proporción 1:1 (por lo tanto se requieren de un volumen total de 6 mL de solución hipotónica para cada cultivo por lo que se colocan 3 ml de cada solución posteriormente se pusieron a baño maría (37 °C) para que las soluciones hipotónicas tomaran la temperatura de 37 °C.

En la campana de flujo laminar previamente encendida y limpia como se había mencionado para la siembra se agregaron 20 µL de colchicina (a una concentración de 10 µg/ml), se mezcló la muestra dentro de la campana de flujo laminar y se cerraron los tubos.

Los tubos se incubaron durante 20 minutos a 37 °C, inmediatamente después de haber agregado la colchicina. Al término de los 20 minutos de incubación, los tubos se centrifugaron durante 10 minutos a 1200 RPM a temperatura ambiente y se eliminó casi todo el sobrenadante con una pipeta Pasteur, dejando de 1.5 mL a 2 mL del mismo para resuspender el botón.

El botón celular se separó lentamente con la pipeta Pasteur y se adicionaron las alícuotas de las soluciones hipotónicas en baño maría, se resuspendió el botón celular suavemente, dejándose actuar por un tiempo de 8 minutos, al término de éste tiempo inmediatamente se adicionó el fijador (metanol- ácido acético en proporción 3:1), hasta que la solución se tornó oscura, se homogenizó completamente con la pipeta Pasteur.

Los tubos se sacaron del baño maría y se centrifugaron por 10 minutos a 1200 RPM a temperatura ambiente. Al término de los 10 minutos, se eliminó el sobrenadante de cada tubo con una pipeta Pasteur dejando solo el botón celular. Se adicionó el fijador hasta la marca de 6 ml, el botón se dispersó en el fijador lentamente con la pipeta. Este paso se realizó las veces necesarias hasta obtener un botón y un sobrenadante transparente. Después de obtener el botón limpio se eliminó el sobrenadante, dejando una mínima cantidad del mismo para homogenizar el botón celular.

Para la elaboración de laminillas en portaobjetos previamente lavados y desengrasados en los que se dejaron caer una o dos gotas del botón a una distancia de 2 m de altura. Las laminillas se dejaron secar a temperatura ambiente o con el calor de un mechero.

Posteriormente se realizó una tinción homogénea, el colorante utilizado se preparó con 3 ml del colorante Giemsa, 1.5 ml de cada buffer A y B y 25 ml de agua destilada. El colorante Giemsa se compró ya preparado a los distribuidores autorizados. El buffer A se preparó para medio litro de agua estéril con 22.65 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  al 0.3 M y el buffer B para medio litro de agua estéril con 29.66 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  al 0.3 M.

El primer paso de la tinción fue sumergir las laminillas en una solución de cloruro de sodio al 0.9% durante 1 minuto (hidratar), después se sumergieron en el colorante recién preparado durante 3 minutos (tinción), se enjuagaron ligeramente con agua de la llave por un instante (quitar el colorante excedente) y se pusieron a secar al medio ambiente.

Una vez secas se observó al microscopio el efecto clastogénico para comparar las deleciones, duplicaciones y demás aberraciones cromosómicas obtenidas por efecto de la hormona. Los resultados se compararon con el efecto inducido por la MMC que fue utilizado como control positivo.

### V. 3 Diseño experimental

Se realizó una curva concentración- respuesta con base en 2 veces la dosis de 17-acetato de medroxiprogesterona parenteral aplicada al ser humano. Se trabajó con 6 grupos iniciales, cada grupo consistió en dos tubos para su cultivo con linfocitos, dando un total de 12 tubos.

Cuadro 1. Diseño experimental. En éste cuadro se muestran los mg aplicados al control negativo, positivo y a los diferentes grupos tratados así como las concentraciones a las que quedaron los mismos.

Grupo	mg de MMC	mg de AS	mg de 17-MPA	Concentración de 17-MPA en el tubo de cultivo (mg/ml)
Control negativo	--	--	--	--
Control AS	--	2.3 mg	--	--
Control positivo	0.002 mg	--	--	--
Tratado 1	--	--	0.25 mg	0.022 mg/ml
Tratado 2	--	--	11 mg	1.1 mg/ml
Tratado 3	--	--	22 mg	2.2 mg/ml

Para el control positivo se realizó una curva de concentración-respuesta de una solución preparada de mitomicina C (2 mg de mitomicina C en 20 ml de agua estéril) quedando a una concentración de 100 µg/ml (Cuadro 2).

Cuadro 2. Curva de concentración respuesta de mitomicina C. En el cuadro se muestran los  $\mu\text{g}$  de mitomicina C, y las concentraciones en cada tubo.

$\mu\text{g}$ de MMC	Concentración de MMC ( $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) en tubo de cultivo.
100 $\mu\text{g}$	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$
50 $\mu\text{g}$	5 $\mu\text{g}/\text{ml}$
10 $\mu\text{g}$	1 $\mu\text{g}/\text{ml}$
5 $\mu\text{g}$	0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Se encontró que la concentración adecuada de mitomicina C, que causa daños clastogénicos fue de 1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$  debido a que en las concentraciones mayores 5 y 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  no se observaron metafases y en la concentración de 0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  se encontró un número mínimo de anormalidades.

Se preparó una solución de acetato de sodio que se utilizó como control blanco de la siguiente manera: Se pesaron 23 mg de acetato de sodio se pusieron en 10 ml de medio, quedando a una concentración de 2.3 mg/ml, de ésta solución se tomó 1 ml que se adicionó a 10 ml de medio final, obteniendo así una concentración de 0.23 mg/ml.

Se preparó una solución de 17-acetato de medroxiprogesterona a la concentración de 2.5 mg/mL, de la siguiente manera: Se pesaron 25 mg en 10 mL de medio, al tomar 0.1 mL de ésta solución se añadieron al medio final (11ml) se obtuvo en los cultivos una concentración de 0.022 mg/ml.

La prueba estadística apropiada puede ser encontrada estimando la variación debida a los tratamientos aplicados de manera independiente; esto es la varianza entre los tratamientos y compararla contra la varianza obtenida dentro de cada tratamiento, suponiendo que estos tienen igual varianza, mediante una prueba F de Fisher con un nivel de significancia  $\alpha$  preestablecido y los grados de libertad asociados al numerador y al denominador, respectivamente.

$$H_0 : \mu_1 = \mu_2 = \mu_3 = \dots \mu_k$$

*Ha : UNA O MÁS PARES DE MEDIAS SON DIFERENTES*

$$SCTratos = n \sum_{i=1}^k (\bar{y}_{i\cdot} - \bar{y}_{\cdot\cdot})^2$$

$$\hat{\sigma}_{Tratamiento}^2 = \frac{SCTratamiento}{(k-1)}$$

$$SCErro = \sum_{i=1}^k \sum_{j=1}^n (y_{ij} - \bar{y}_{i\cdot})^2$$

$$\hat{\sigma}_{Error}^2 = \frac{SCErro}{(n-k)}$$

$$F = \frac{\hat{\sigma}_{Tratamiento}^2}{\hat{\sigma}_{Error}^2}$$

Partiendo de la prueba estadística de comparación de medias (ANOVA) de una vía, se realizó la prueba estadística de Dunnett que es necesaria con frecuencia en el experimento para comparar simultáneamente cada tratamiento con un control, determinar las diferencias significativas entre cada media del tratamiento y el control, con un solo nivel de significancia  $\alpha$  (Walpole y Myers, 1992).

Para realizar la prueba de Dunnett es necesario que existan dos o más tratamientos, y se utiliza un tratamiento como control. En general lo que se desea probar en ésta prueba es:

$$\left. \begin{array}{l} H_0: \mu_0 = \mu_i \\ H_1: \mu_0 \neq \mu_i \end{array} \right\} i = 1, 2, \dots, k,$$

Donde  $\mu_0$  representa el rendimiento promedio para la población de mediciones en la cual se utiliza el control. Por lo que las suposiciones usuales del análisis de varianza tienen que ser válidas para probar la hipótesis nula especificada por  $H_0$  contra la alternativa bilateral para una situación donde existen  $k$  tratamientos, sin incluir el control y  $n$  observaciones por tratamiento, primero se calculan los valores:

$$d_i = \frac{\bar{y}_i - \bar{y}_0}{\sqrt{\frac{2s^2}{n}}}$$

La varianza muestral  $s^2$  se obtiene del cuadrado medio del error en el análisis de varianza. El régimen crítico para rechazar  $H_0$ , a nivel de significancia  $\alpha$ , se establece por la desigualdad:

$$|d_i| > d_{\alpha/2}(k, v),$$

Donde  $v$  es el número de grados de libertad para el cuadrado medio del error. Los valores de la cantidad  $d_{\alpha/2}(k, v)$ , para una prueba de dos colas se dan en tablas para  $\alpha = 0.05$  como nivel conjunto de significancia (Walpole y Myers, 1992).

Las pruebas de comparación de medias (ANOVA) y prueba de Dunnett para éste estudio fueron realizadas en el programa The Statistical Discovery Software (JMP).

## VI. RESULTADOS

VI.1 Grupo control negativo. Se analizaron 30 metafases sin tratamiento para conocer los daños espontáneos, se encontraron alteraciones espontáneas como gaps (0.33 ± 0.33 ee) en el cromosoma del grupo D (Tabla 3) (Figura 8).

Cuadro 3. Control negativo. Los daños espontáneos observados se indican en las muestras analizadas sin tratamiento.

Metafases	1° Experimento	2° Experimento	3° Experimento	Total	$X_{media} \pm ee$
Normales	10	6	10	26	$8.66 \pm 1.33$
Anormales (Gaps)	1	0	0	1	$0.33 \pm 0.33$
Gaps	1	0	0	1	$0.33 \pm 0.33$

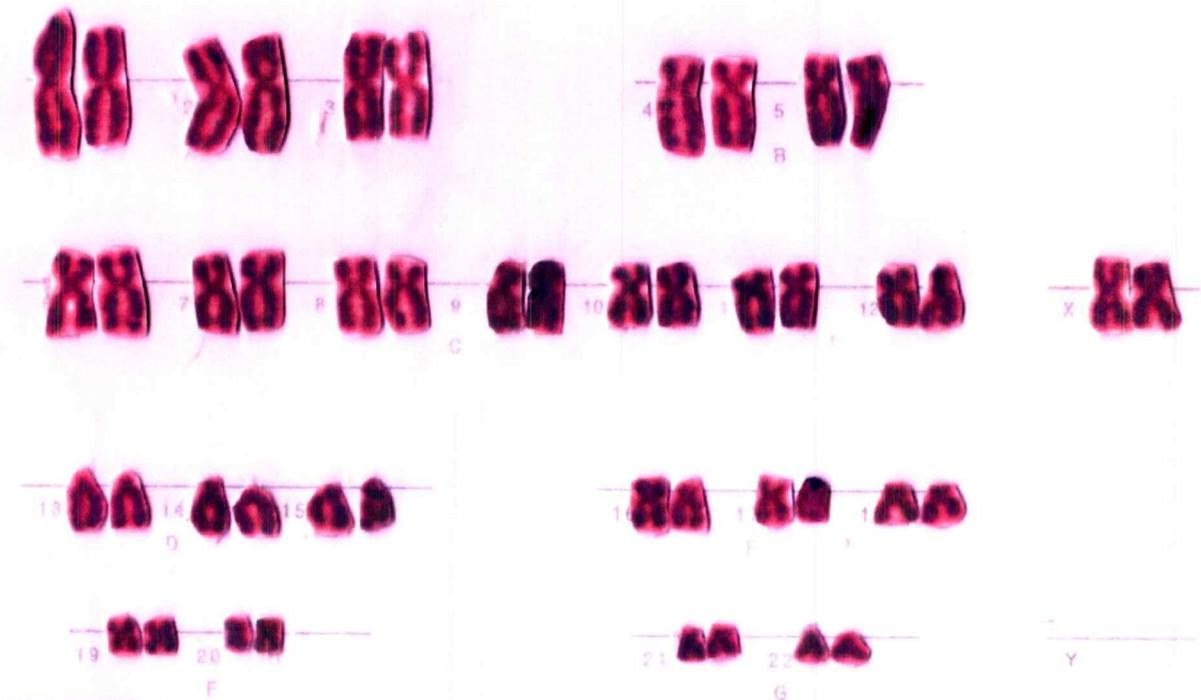


Figura 8. Cariotipo del control negativo. Los cromosomas se observan normales agrupados por número y grupo.

VI.2 Control positivo. Se analizaron 30 metafases tratadas con el clastógeno mitomicina C a una concentración de 1 µg/ml y se observaron daños como: gaps ( $4.66 \pm 1.20$  ee) (monocromatídicas e isocromatídicas) en los cromosomas pertenecientes al grupo A y C por mencionar algunos, las aneuploidías ( $3 \pm 0.57$  ee) se observaron en los cromosomas pertenecientes a los grupos A, C, D, (Tabla 4) (Figura 9). Los resultados del total de anomalías observadas en este grupo y comparados con el control negativo y los tratados con 17-acetato de medroxiprogesterona presentaron diferencia estadística con las pruebas de ANOVA de una vía (Anexo 1).

Cuadro 4. Control positivo. La mitomicina C induce alteraciones citogenéticas a una concentración de 1 µg/mL.

Metafases	1° EXP	2° EXP	3° EXP	Total	$X_{media} \pm ee$
Normales	2	3	4	9	$3 \pm 0.57$
Anormales (Gaps, aneuploidía)	8	7	6	21	$7 \pm 0.57$
Gaps	7	4	3	14	$4.66 \pm 1.20$
Aneuploidía	2	4	3	9	$3 \pm 0.57$

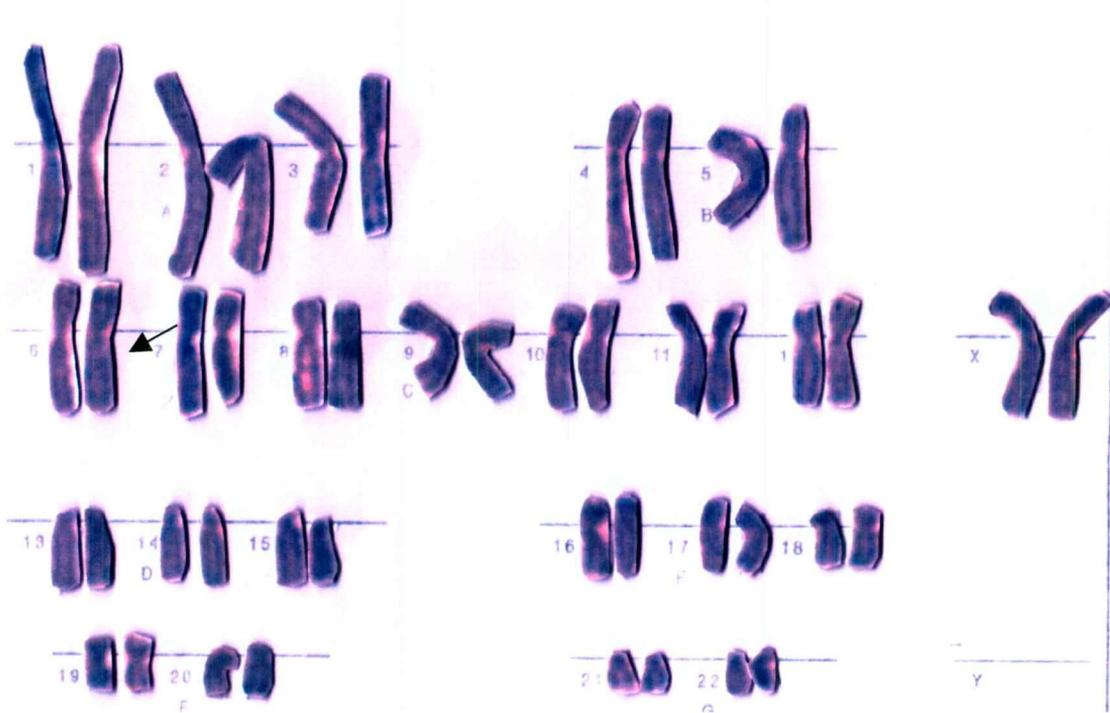


Figura 9. Cariotipo que muestra el efecto del grupo tratado con mitomicina C a una concentración de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Se utilizó éste clastógeno por su alta efectividad de daño, en éste cariotipo se observan gaps en los cromosomas pertenecientes al grupo C. Cariotipo con 46 cromosomas.

VI.3 Control acetato de sodio. Se metió la dosis de acetato de sodio equivalente a adicionado en los tratamientos con 17-acetato de medroxiprogesterona. Los cambios observados en 20 metafases fue solo un gap en el cromosoma perteneciente al grupo A, los resultados no presentaron diferencia estadística significativa con el control negativo (Figura 10).

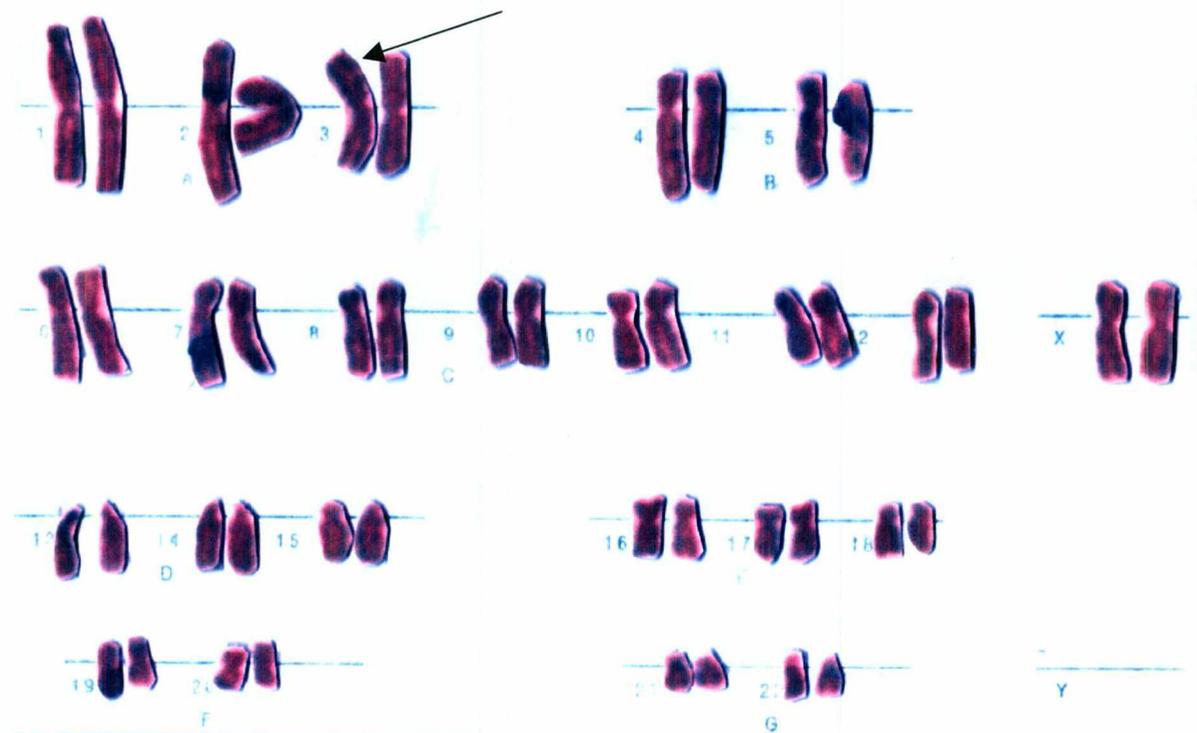


Figura 10. Cariotipo tratado con acetato de sodio a 2.3 mg/ml. Esta dosis de acetato de sodio es el equivalente a la concentración más alta de 17-acetato de medroxiprogesterona 2.2 mg/ml. Se muestra un gap en el cromosoma perteneciente al grupo A. Cariotipo con 46 cromosomas.

#### VI.4 Tratamientos

Para llegar a la concentración aplicada en los diferentes tratamientos se realizó una curva concentración respuesta, con los siguientes tratamientos donde se tomó como base 0.022 mg (X): 2X, 200X, 1000X.

VI.4.1 Dosis 0.022 mg/ml de 17-acetato de medroxiprogesterona (17-MPA). Esta dosis de 17-acetato de medroxiprogesterona es equivalente a 2 veces la aplicada al ser humano. Se analizaron un total de 30 metafases en tres experimentos diferentes y se encontraron los siguientes daños citogenéticos: Gaps ( $0.66 \pm 0.33$  ee) en los cromosomas pertenecientes al grupo A, (Tabla 5) (Figura 11). Los resultados

de este grupo comparados con el control negativo no presentaron diferencia estadística significativa.

Cuadro 5. Tratamiento 1. 17-MPA induce cambios citogenéticas a una concentración de 0.022mg/mL (2 veces la dosis del fármaco).

Metafases	1° EXP	2° EXP	3° EXP	total	X media±ee
Normales	10	8	9	27	9.33±0.33
Anormales (Gaps)	0	2	1	3	0.66±0.33
Gaps	0	1	1	2	0.66±0.33

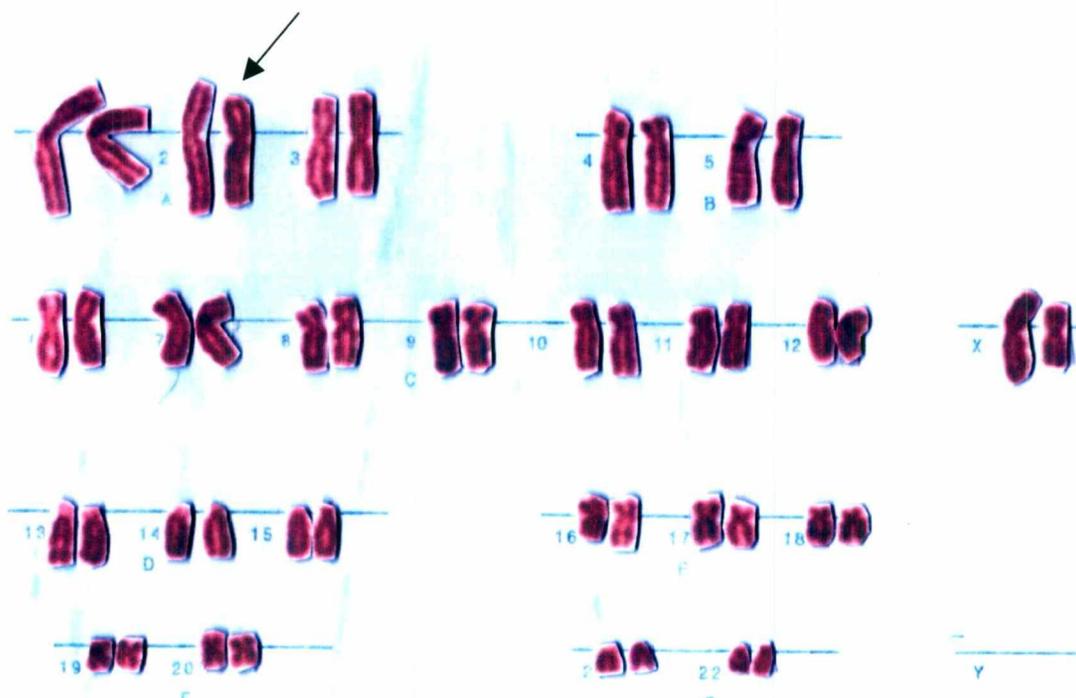


Figura 11. Cariotipo que caracteriza a linfocito tratado con 17-MPA a una concentración de 0.022mg/mL (con 2 veces la dosis del fármaco). En éste cariotipo se observa un cromosoma con pérdida de material genético perteneciente al grupo A. Cariotipo con 46 cromosomas.

VI.4.2 Dosis 1.1 mg/ml de 17-acetato de medroxiprogesterona (17-MPA). Esta dosis se realizó por ser 100 veces la aplicada al ser humano. Se analizaron 30 metafases en tres experimentos diferentes se encontraron los siguientes daños: Gaps ( $0.66 \pm 0.33$  ee) en los cromosomas pertenecientes al grupo C, aneuploidía ( $0.33 \pm 0.33$  ee) en el cromosoma perteneciente al grupo B (Tabla 6) (Figura 12). Los resultados de este grupo comparados con el anterior y el control negativo no presentaron diferencia estadística entre ellos.

Cuadro 6. Tratamiento 2. 17-MPA produce alteraciones cromosómicas al aplicar una concentración de 1.1 mg/mL equivalente a 100 veces la dosis del fármaco.

Metafases	1° EXP	2° EXP	3° EXP	total	X media $\pm$ ee
Normales	9	9	9	27	9 $\pm$ 0
Anormales (Gaps, aneuploidía)	1	1	1	3	1 $\pm$ 0
Gaps	0	1	1	2	0.66 $\pm$ 0.33
Aneuploidía	1	0	0	0	0.33 $\pm$ 0.33

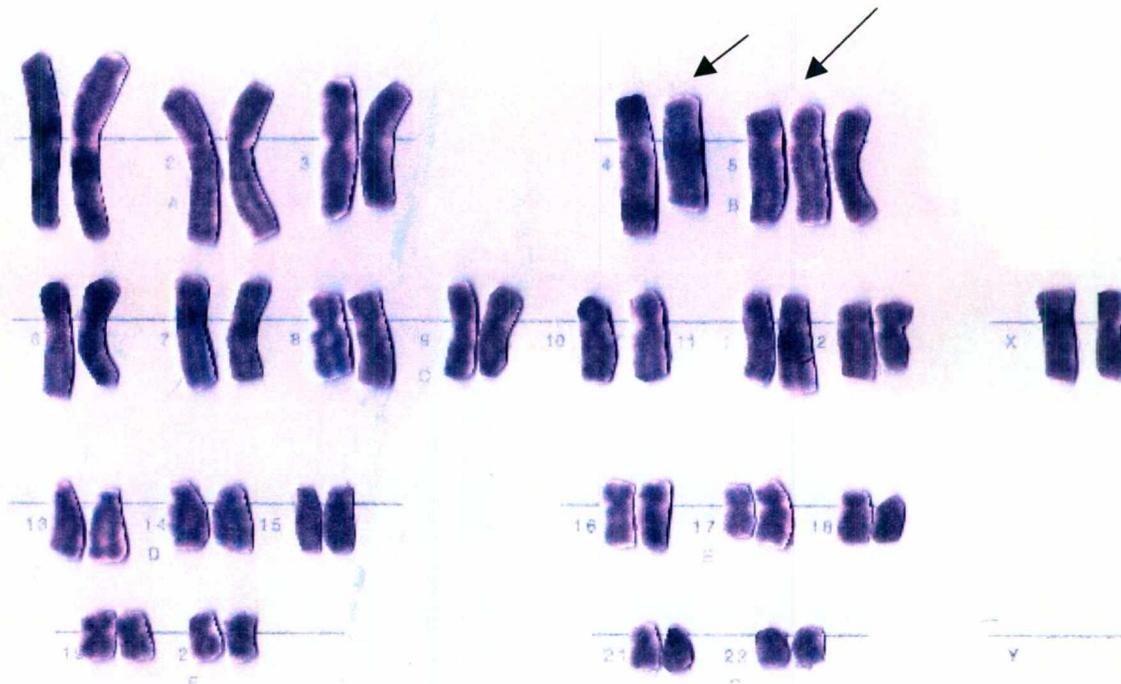


Figura 12. Cariotipo que representa al grupo tratado con 1.1 mg/mL de 17-MPA equivalente a 100 veces la dosis del fármaco. En éste cariotipo se observa un cromosoma de más perteneciente al grupo B lo que podría ser trisomía y pérdida de material genético en cromosoma de grupo B. Cariotipo con 47 cromosomas.

VI.4.3 Dosis 2.2 mg/ml de 17-acetato de medroxiprogesterona (17-MPA). Esta dosis se realizó por ser 200 veces la dosis aplicada al ser humano. Se analizaron 30 metafases en tres experimentos se encontraron los siguientes daños: Gaps ( $1.33 \pm 0.66$  ee) en los cromosomas pertenecientes al grupo A y C. (Tabla 7) (Figura 13). Al comparar estadísticamente estos resultados con el control negativo no presentó diferencia estadística.

Cuadro 7. Tratamiento 3. 17-MPA produce anomalías que se encontraron al aplicar una concentración de 2.2 mg/mL (200 veces la dosis del fármaco).

Metafases	1° EXP	2° EXP	3° EXP	total	X media3
Normales	10	9	8	27	9±0.57
Anormales (Gaps)	0	1	2	3	1±0.57
Gaps	0	2	2	4	1.33±0.66

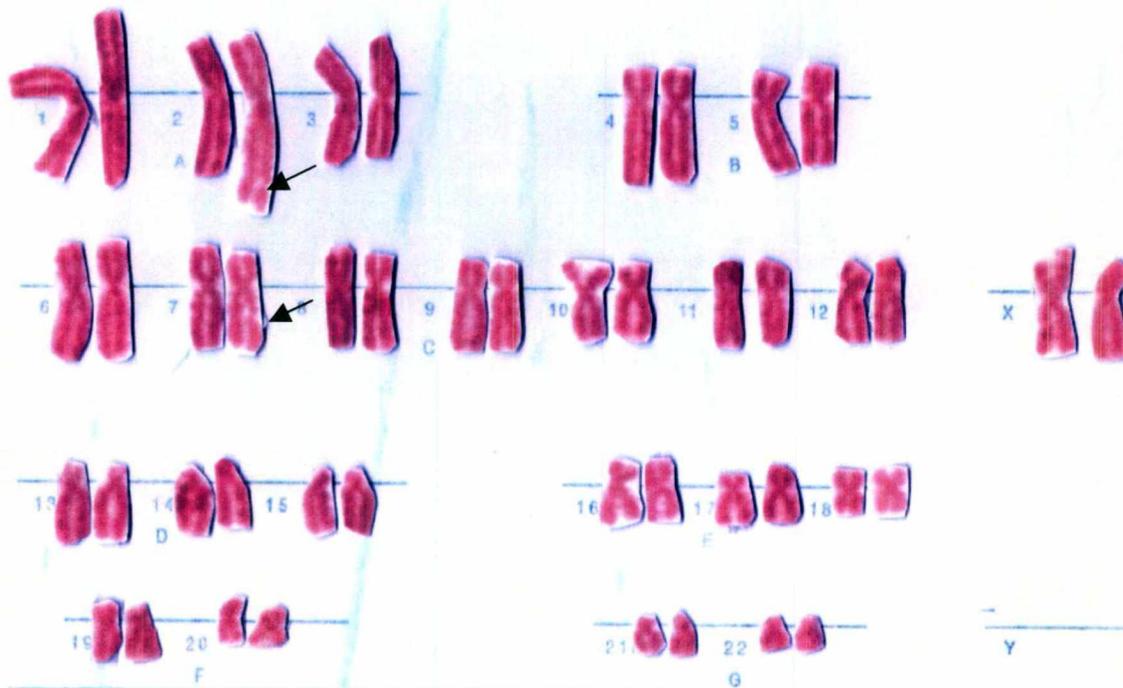


Figura 13. Cariotipo que pertenece a linfocito tratado con 2.2 mg/mL de 17-MPA (200 veces la dosis del fármaco). En este cariotipo se observan gaps en cromosomas pertenecientes a los grupos A y C. Cariotipo con 46 cromosomas.

El número de metafases de los grupos controles fue comparado con el de los grupos tratados y se observó diferencia estadísticamente significativa entre el control negativo y el control positivo así como entre los grupos tratados y el control positivo, sin embargo no hubo diferencia entre los grupos tratados y el control negativo (Figura 14).

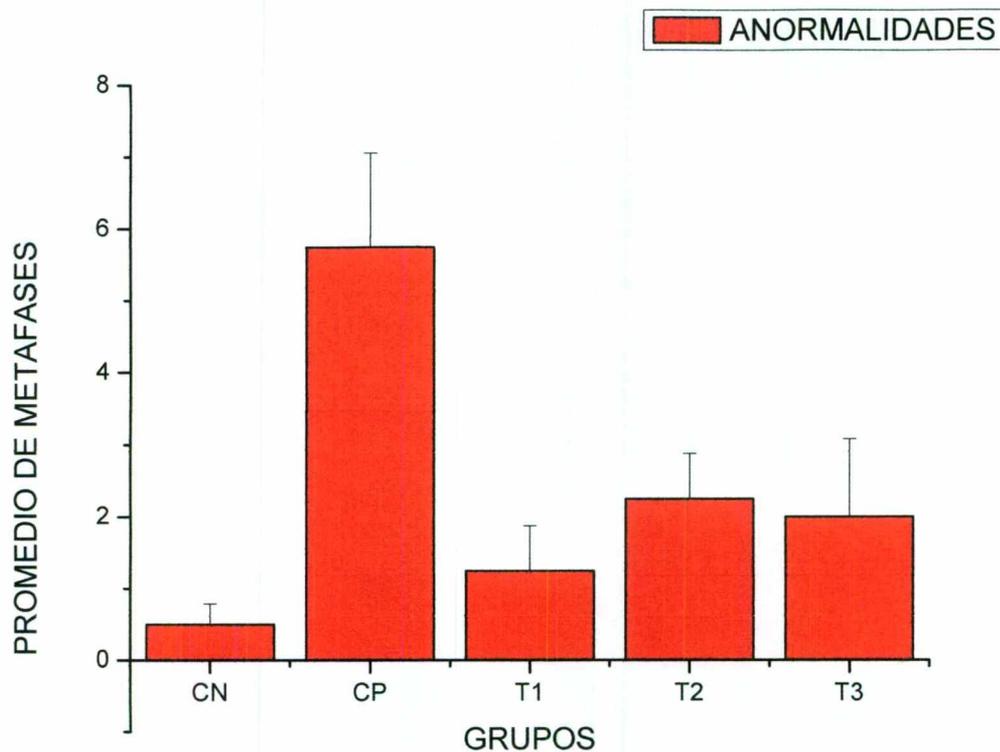


Figura 14. Metafases anormales. En la gráfica se indican las diferencias de los daños citogenéticos en los grupos realizados en los tres experimentos de forma general.

## VII. DISCUSIÓN

En el estudio *in vitro* de 17-acetato de medroxiprogesterona se observaron daños citogenéticos en linfocitos humanos los cuales podrían presentarse *in vivo* en mujeres que lo utilizan como método anticonceptivo parenteral. Existen pocos estudios acerca de la progestina 17-acetato de medroxiprogesterona debido a que solo se han estudiado los anticonceptivos orales combinados de estrógenos y progestina.

Control negativo: Se observaron metafases normales en las células en división, sin embargo también se encontraron cambios citogenéticos espontáneos, los cuales se producen sin que hayan sido tratadas con agentes químicos inductores. Estos cambios se pueden asociar a modificaciones aleatorias de la secuencia nucleotídica de los genes. También pueden estar relacionadas a procesos químicos normales que alteran las estructuras de las bases nitrogenadas que forman parte de los genes ya existentes como los cambios de la forma ceto a enol en las bases nitrogenadas que posteriormente pueden inducir alteraciones citogenéticas, se cree que la mayoría de los cambios espontáneos se producen durante el proceso enzimático de replicación del DNA, debido a que las lesiones que sufre el DNA no se revierten por los sistemas de reparación con los que cuenta la célula humana entre los que se encuentran: a) directa, b) por escisión de bases, c) por escisión de nucleótidos, d) acoplada a transcripción, posreplicativa, de bases mal apareadas (Klug y Cummings, 1999; Guízar, 2001).

Existen fuentes que pueden provocar mutaciones espontáneas tales como agentes físicos del tipo radiaciones cósmicas y/o ultravioleta, las provenientes de minerales, agentes químicos que se pueden encontrar como contaminantes del tipo: 1) tratamientos con quimioterapias, 2) armas químicas en las que se usen agentes alquilantes; 3) colorantes de acridina, y 4) agentes biológicos como virus, así como los transposones (Klug y Cummings, 1999).

Control positivo: Se utilizó el antibiótico mitomicina C que es obtenido de *Streptomyces caespitosus* el cual es eficaz contra los tumores (García, 1993). La concentración de 1 µg/ml (utilizada en éste estudio) indujo gaps, aneuploidías, éstos resultados son consistentes con los obtenidos por Siddique y Afzal, 2005 que utilizaron una concentración de mitomicina C de 0.3 µg/ml donde se obtuvieron aberraciones como fragmentos, gaps, rompimientos cromatídicos y cromosómicos. La mitomicina ha demostrado ser un clastógeno modelo para la inducción de daño citogenético, Roncada y col. 2004 emplearon MMC en linfocitos humanos a una concentración de 0.30 µg/ml como control positivo para estudiar la inhibición de aberraciones cromosómicas por Ara-C (planta medicinal). Asimismo Konishi y col., 2004 utilizaron MMC a una concentración de 2.5 µg/ml como control positivo donde evaluaron la frecuencia de aberraciones cromosómicas en células K1 de ovario de hamster chino. En este estudio se llevó a cabo una curva concentración respuesta y se obtuvieron los mejores resultados a 1µg/ml, dicho resultado puede ser asociado a que los pacientes con menor dosis como los reportados antes pudieron haber estado en contacto con otros agentes o sustancias que aumentaron el efecto de la MMC: las radiaciones de microondas de baja densidad 2450-MHz aumentan el efecto dañino de la mitomicina C a las concentraciones 0.0125 µg/ml, 0.025 µg/ml y 0.1 µg/ml durante 24 horas en el ensayo cometa (Zhang y col. 2002), el antibiótico bleomicina sinergiza los daños producidos por mitomicina C en linfocitos humanos por análisis alcalino de ensayo cometa (Milic y Kopjar, 2004) o bien sujetos a estrés que incrementan la susceptibilidad a los efectos tóxicos de la mitomicina. También en 2005, Fimognari y col. encontraron que sulforafano de isotiocianato tiene la capacidad antígenotóxica para contrarrestar los efectos de los mutagénos etilmetano sulfonato, vincristrina, y MMC en linfocitos humanos cultivados *in vitro*.

El efecto clastogénico producido por la mitomicina C es debido a que contiene un grupo aziridina y otro quinona en su estructura, así como un anillo mitosano (Figura 15), los cuales participan en reacciones de alquilación de DNA, que se producen después de la reducción química espontánea o enzimática de la célula y de la pérdida del grupo metoxi, la mitomicina se vuelve un agente de alquilación bifuncional o trifuncional que inhibe la síntesis de DNA y los enlaces cruzados de dicho ácido en posición N<sup>6</sup> de la adenina o las posiciones O<sup>6</sup> o N<sup>7</sup> de la guanina. Los cambios observados se pueden deber a que no son capaces de revertir el daño los sistemas de reparación porque hayan sido dañados o rebasados en sus funciones. Entre los mecanismos de reparación del daño se incluyen la escisión de nucleótidos que revierte el tipo más grave de daño al DNA; los enlaces cruzados y bases que se han modificado por la unión de grupos químicos grandes en éste caso producidos por mitomicina C (Hardman y col. 1996).

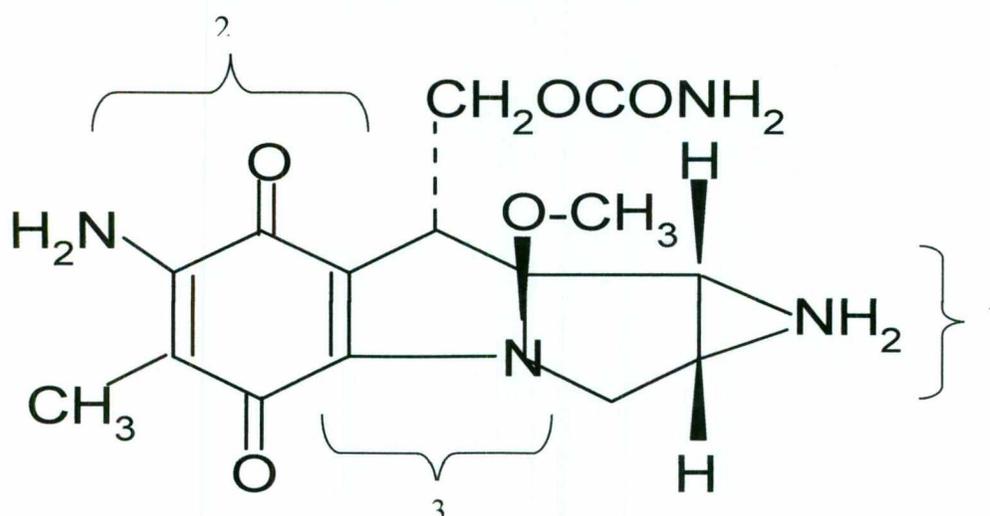


Figura 15. Estructura mitomicina C. Se pueden observar los grupos funcionales que conforman la mitomicina C que hacen que sea un clastógeno potente: 1) grupo aziridina, 2) quinona, 3) anillo mitosano (Hardman y col. 1996).

Los daños producidos por mitomicina C son estadísticamente significativos respecto a los tratamientos con 17-acetato de medroxiprogesterona con una P < 0.0001.

Control blanco: Se realizó un blanco con acetato de sodio donde se encontró solo una deleción la cual puede deberse a una mutación de tipo aleatoria que tienen lugar durante el copiado (Mathews, 2001). Los resultados tan bajos en clastogénesis en este control indican que los cambios encontrados en los grupos problema se deben esencialmente a la progesterona y no al acetato que es parte componente de la presentación química.

Los tratamientos con 17-acetato de medroxiprogesterona:

Los daños encontrados en las metafases tratadas con 17-acetato de medroxiprogesterona pudo ser debida a el mecanismo de acción de las progestinas en las que en condiciones normales se unen al receptor (comprendida por receptor progesterona A y receptor progesterona B), se unen a secuencias específicas de DNA con la región promotora de genes sensibles a progesterona refieren una respuesta a elementos de progesterona para transactivarlo y llevar a cabo su función de activación de genes al unirse al promotor en el núcleo. En caso que dicha transactivación sea bloqueada, también pueden bloquearse la síntesis de proteínas del tipo polimerasas de reparación y con ello la inducción de mutaciones se hace mas frecuente y también los cambios citogenéticos. La unión agonista de receptor de progesterona se cree que activa la transcripción con coactivadores, que también actúan como factores de puentes entre el receptor y la transcripción general del DNA. Esto es seguido por el incremento de la velocidad de la transcripción produciendo efectos agonistas a niveles de tejido celular. Los cambios en la unión de la hormona receptor pueden producir efectos antagónicos (Liu y col., 2002 y Sitruk y Ware, 2006).

El gap es la ausencia o discontinuidad de una o más bases en una de las hebras del DNA duplicado y corresponde a una región cromosómica que posee escasa coloración que ocasionalmente puede ser confundida con una fractura cromosómica, se clasifica como gap a toda lesión menor cuyo ancho sea menor que el de la cromátide, en algunos casos se observó un delgado filamento de

cromatina que conecta los segmentos proximal y distal al gap que confirma la existencia de una lesión a cromática (Martínez y Folle, 2006).

El gap es una aberración del tipo cromátida y se producen en los cromosomas ya replicados es decir que se encuentran en la fase G2 del ciclo celular que es el tiempo que transcurre entre la duplicación del DNA y el inicio de la mitosis (Martínez y Folle, 2006).

Los gaps encontrados en este estudio pueden ser debido a dos tipos de reparación que no revirtieron el daño: reparación de escisión de bases donde la presencia del daño se debió a que no se llevó a cabo la reparación de la pérdida de bases de un tramo del brazo cromosómico, que revierte muchos tipos de nucleótidos que han sufrido daños más o menos menores en las bases donde una DNA glucosilasa inicia el proceso y corta el enlace  $\beta$ -N-glucosídico entre la base dañada y el azúcar del nucleótido, probablemente porque el paso siguiente no se efectuó de manera adecuada, la síntesis de DNA para rellenar el hueco faltante. (Griffiths y Gelbart, 2000; Mathews 2001).

Las aneuploidías encontradas en este trabajo son debidas al fenómeno conocido como no disyunción que ocurre durante la mitosis, que es un fallo en el proceso de la segregación normal de los cromosomas homólogos, a los dos polos celulares durante la división mitótica, de manera que dos cromosomas homólogos se desplazan al mismo polo celular, y ninguno al otro polo. No se conoce el mecanismo molecular preciso por el que falla. La trisomía puede ocurrir al suponer que dos cromosomas se comportan normalmente y cada uno de ellos se desplaza a un polo opuesto de la célula y el tercero se desplaza al azar a uno u otro polo, entonces se predice las tres segregaciones, igualmente frecuentes (Griffiths y Gelbart, 2000).

Otra explicación al daño ocasionado en éste estudio por 17-acetato de medroxiprogesterona puede deberse a que el compuesto estudiado puede actuar como un agente químico alquilante y por lo tanto formar enlaces covalentes con las bases del DNA (aductos), se propone que el 17-acetato de medroxiprogesterona forme éstos enlaces por la actividad de algún metabolito activado para unirse a la guanina en la posición N<sup>7</sup>. (Guízar 2001).

La progestina, acetato de ciproterona, pertenece al grupo del acetato de medroxiprogesterona y en éste estudio los resultados son consistentes a los realizados por Siddique y Afzal, 2003 y 2004 solo en el que afirman que el acetato de ciproterona ha revelado el incremento de las aberraciones cromosómicas que aumentaron con frecuencia significativa, no se puede decir lo mismo del 17-acetato de medroxiprogesterona, debido a que los daños citogenéticos producidos no son estadísticamente significativos comparados con el control negativo.

Las progestinas sintéticas como acetato de megestrol y acetato de clormadinona, son derivados éster de la progesterona y pertenecientes al grupo del acetato de medroxiprogesterona, los cuales pueden formar aductos en el DNA como se ha reportado para cultivos primarios de hepatocitos (Hardman y col. 1996). El acetato de ciproterona induce niveles significativos de aductos en el DNA, los cuales se formaron en hepatocitos humanos expuestos a partir de la concentración 0.03  $\mu\text{M}$ , siendo la concentración de 10  $\mu\text{M}$  la que presentó niveles mayores de aductos. El riesgo genotóxico observado con el acetato de ciproterona, acetato de clormadidona y acetato de megestrol está asociado con la presencia del doble enlace en la posición 6 y 7 del esteroide, este se encuentra ausente en el acetato de medroxiprogesterona y progesterona (Werner y col. 1997). De acuerdo a lo anterior se propone que la 17-acetato de medroxiprogesterona probablemente puede inducir aductos en el DNA por un mecanismo diferente; esta puede ser una razón por la cual el 17-acetato de medroxiprogesterona induce estos daños a los cromosomas y no sean estadísticamente significativos como las progestinas acetato de megestrol, acetato de clormadidona y acetato de ciproterona.

Los resultados de Ahmad y col. 2001 son consistentes de los obtenidos en éste trabajo, debido a que ellos afirman que la progestina noretindrona expuesta en las concentraciones de 20, 40 y 75 µg/ml en linfocitos no tiene la suficiente potencia para causar daño genotóxico en linfocitos humanos *in vitro*, y difiere en que la noretindrona no induce ninguna aberración cromosómica, no afecta la cinética de crecimiento a nivel significativo en la presencia o ausencia de la activación metabólica, esto puede deberse a que es menos selectivo que los ésteres de progesterona (entre ellos el acetato de medroxiprogesterona), y tiene por lo tanto actividad estrogénica y antiestrogénica diferente (Hardman y col. 1996). También difieren de los reportados por Martelli y col. 2003, donde mencionan que los daños inducidos en hepatocitos se reparan, posiblemente por la abundancia de enzimas de dichas células.

Los daños citogenéticos producidos por el 17-acetato de medroxiprogesterona pueden estar asociados con la presencia de los mecanismos antes mencionados, éstos no son estadísticamente significativos con una  $P < 0.0001$  respecto al control positivo.

Es necesario continuar con estos estudios para realizar las técnicas correspondientes de tinción de cromátides hermanas, así como la tinción de bandeado para observar la presencia de ICH, deleciones y duplicaciones para conocer el efecto clastogénico de ésta sustancia química.

## VII. CONCLUSIONES

- Los cambios espontáneos encontrados en el control negativo fueron mínimos en relación con el control positivo y/o los tratados con 17-MPA.
- Las aberraciones cromosómicas inducidas por mitomicina C fué significativamente diferente en relación al control negativo y a los grupos tratados con 17-MPA.
- Entre los daños observados por el 17- acetato de medroxiprogesterona se encuentran gaps y aneuploidía (trisomía).
- La progestina 17-acetato de medroxiprogesterona (17-MPA), no induce cambios citogenéticas estadísticamente significativos en los cromosomas humanos obtenidos a partir de linfocitos de sangre periférica.

## IX. BIBLIOGRAFÍA

- Ahmad, M. E., Shadad, G. G., Afzer M. A., Afzal, M. 2001.** Evaluation of genotoxic potential of synthetic progestins-norethindrone and norgestrel in human lymphocytes in vitro. *Mutation Reserch*. Vol. 494 (1-2):13-20.
- Bjorn, I., Bixo, M., Nojd, K. S., Nyberg, S., Backstrom, T. 2000.** Negative mood changes during hormone replacemnte therapy: a comparison between two progestogens. *American Journal of Obstetric and Gynecology*. Vol. 183 :1419-26.
- Bukvic, N., Susca, F., Bukvic D., Fanelli M., Guanti G. 2000.** 17-alpha-ethinylestradiol and norgestrel in combination induce micronucleos increases and aneuploidy in human lymphocyte and fibroblast cultures. *Teratogénesis, Carcinogénesis and Mutagénesis*. Vol. 20 (3):147-59.
- Figmognari, C., Betri, F., Cantelli-Forti, G., Hrelia, P. 2005.** Effect of sulforaphane on micronucleus induction in cultured human lymphocytes by four different mutagens. *Environmental and molecular mutagenesis*. Vol. 46(4): 260-267.
- Flores, H., Martínez, S. G., González, A. S. E., García, D. G., Castro, R. I. 1999.** Inhibición del desarrollo embrionario por la 5a-Noretisterona. *Perinatology Reproduction Human*. Vol. 13 (2): 150-157.
- Flórez, J. 2000.** *Farmacología humana*. 3a. ed., Masson, Barcelona España: 868-879.
- García, R. L. 1993.** *Diccionario de Química y de productos químicos*. 2a. ed., Ediciones Omega S.A., Barcelona España: 642, 688.
- Griffiths, J. F. A., Gelbart, M. W. 2000.** *Genética Moderna*, Madrid: 39-43, 236, 243, 244, 257.
- Guízar V. J. J. 2001.** *Genética Clínica Diagnóstico y manejo de las enfermedades hereditarias*, México D. F.: 33-37, 162.
- Guyton, C. A. y Hall, E. J. 1996.** *Tratado de fisiología médica*. 9ª ed., McGraw-Hill interamericana, México: 1121.

**Hardman, G. J., Limbird, E. L., Molinoff, B. P., Ruddon, W. R., Goodman G. A. 1996.** Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9a ed., Mc Graw-Hill interamericana, México: 1347, 1514, 1515, 1517.

**Helguero, L. A., Viegas, M., Asathamby, A., Shyamala, G., Lanari, C., Malinolo, A. A. 2003.** Progesterone receptor expression in medroxyprogesterone acetate-induced murine mammary carcinomas and response to endocrine treatment. Breast Cancer Research and treatment. Vol. 79 (3): 379-90.

**Instituto de Esterilidad y Salud Reproductiva, 1996-2004,**  
[www.reproduccion.com.mx/proceso.html](http://www.reproduccion.com.mx/proceso.html)

**Jordan, A. 1994.** Toxicology of depot medroxyprogesterone acetate. Contraception. Vol. 49 (3):189-201.

**Klug, S. W., Cummings, R. M. 1999.** Conceptos de Genética. 5ª ed., Prentice Hall, Madrid: 19-24, 256, 257, 415, 426, 429.

**Konishi, Naitouk, Kadowak, S., Takahara Y., Yamamoto K. 2004.** Anti-clastic ingredient in *Cassia nomane* extract. Biofactors. Vol. 22 (1-4): 99-102.

**Krikun, G., Gil, M., Ayesha, A., Seth, G., Frederick, S., Sapi, E., Mizanur, R., Caze, R., Mazin, Q., Loockwook, J. C. 2004.** A Novel Immortalized Human Endometrial Stromal Cell Line with Normal Progestational Response. Endocrinology. Vol. 145 (5): 2291-2296.

**Liu Z., Auboeuf D., Wong J., Cheng J. D., Tsai S. Y., Tsai M. J., O" Malley B. W. 2002.** Coactivator/corepressor ratios modulate PR-mediated transcription by the selective receptor modulator RU486. Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of American. Vol. 99: 7940-7944.

**Maier, W. E. y Herman, J. R. 2001.** Pharmacology y Toxicology of ethinyl estradiol and norethindrone acetate in experimental animals. Toxicology and Pharmacology. Vol. 34:53-58.

**Manning, S. R. 1989.** Estadística. 4a Edición. Prentice Hall Hispanoamericana, S. A., México: 389, 380.

**Martelli, A. F., Mattioli, M., Angiola, R. R., Bambrilla G. 2003.** Species, sex and Inter.-individual difference in DNA repair induced by nine sex steroids in primary cultures of rats and human hepatocytes. Mutation Research. (563): 69-78. **Mathews,**

K. C., Van Holde, E. K. **2001**. Bioquímica. 2a Edición. McGraw-Hill Interamericana, Madrid: 914, 923.

**Martínez,** W., Folle, G. **2006**.  
<http://genetica.fcien.edu.uy/materiales/PRACTICOS/alteraciones%20cromosomicas/alteraciones%20cromosomicas.pdf>

**Milic,** M., Kopjar, N. **2004**. Evaluation of *in vitro* genotoxic activity of bleomycin and Mitomycin C in human lymphocytes using the alkaline comet assay. Arhivza higijenu rada i toksikologiju. Vol. 55(4): 249-259.

**Rodríguez,** A. F., Torres, J. M., Cuadros, J. L., Ruiz, E., Ortega, E. **2000**. Effect of estrogen-progestin replacement therapy on plasma lipids and lipoproteins in postmenopausal women. Endocrine Research. Vol. 26 (2):263-73.

**Rodríguez,** F. R. y Gómez, G. L., **2003**. Caracterización de las progestinas inyectables y sus beneficios en la Planificación Familiar. Revista Cubana de Medicina General Integral. Vol. 12 (2):1-10.

**Roncada,** T., Vicentini V. E., Mantovani M. S., **2004**. Possible mg actions of plant extracts on the chromosoma breaking activity of MMC and Ara-C in human lymphocytes *in vitro*. Toxicology In vitro. Vol. 18(5): 617-622.

**Ross,** R. K., y Paganni-Hill A., **2000**. Effect of hormone replacement therapy on breast risk: estrogen versus estrogen plus progestin. Journal of the National Cancer. Vol. 92:328-32.

**Sánchez,** G. J. L. **2006**. [web.educastur.princast.es/.../INDICE.htm](http://web.educastur.princast.es/.../INDICE.htm)

**Sarabia,** A. G. y García-Alcocer, M. G. **2002**. Modificación de la expresión genética durante la neurulación en embriones de rata por efecto de la progesterona. Querétaro. Universidad Autónoma de Querétaro. Tesis para obtener el título de Químico Farmacéutico Biólogo.4.

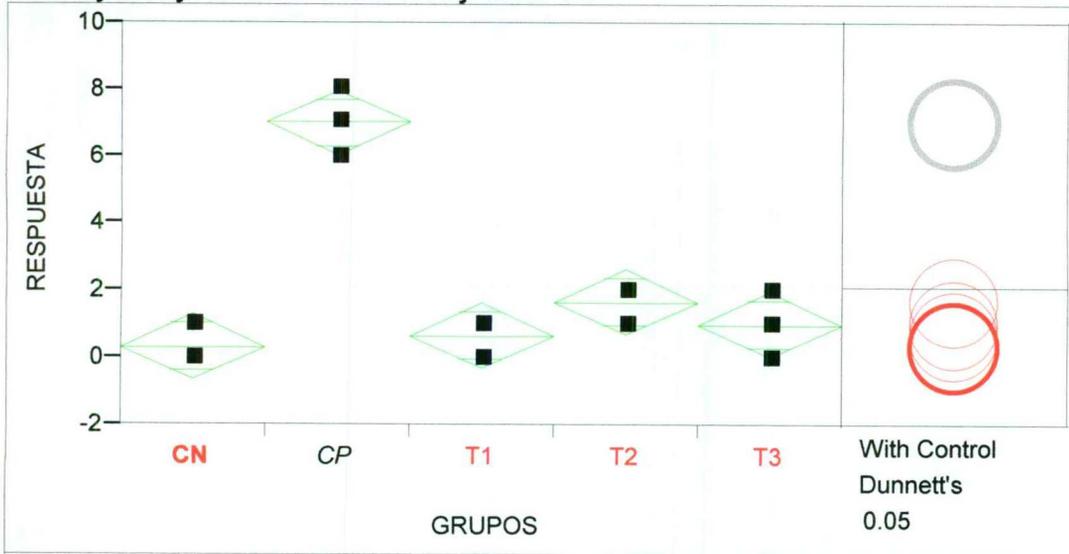
**Seuc,** J. A., Santana, P. F., González, S. R. M., Arranz, C. M. C. y Fernández, L. G. M. **2000**. Efecto del contraceptivo inyectable Depo-provera sobre el metabolismo de la glucosa. Revista Cubana de Medicina General Integral. Vol. 11 (2):98-104.

**Siddique,** Y. H. y Afzal, M. **2003**. Induction of sister chromatid exchanges by androstenedione in human lymphocytes *in vitro*. Bulletin on Environmental. Vol. 1: 9-12.

- Siddique, Y. H. y Afzal, M. 2004.** Evaluation of genotoxic potencial of synthetic progestin ethynodiol diacetate in human lymphocytes *in vitro*. *Current Sciencie*. Vol. 86: 1161-1165.
- Siddique, Y. H. y Afzal, M. 2004.** Induction of chromosomal aberrations and sister chromatid exchanges by chlormadidone acetate in human lymphocytes: a possible role of reactive oxygen species. *Indian Journal of Experimental Biology*. Vol. 42 (11): 1078-83.
- Siddique, Y. H. y Afzal, M. 2005.** Genotoxic potential of cyproterone acetate: a possible role of reactive oxygen species. *Toxicology In vitro*. Vol. 19 (1): 63-8.
- Stanten, R., Pinkeron J., et al. 2001.** Risk of breast cancer with progestins in combination with estrogen as hormone replacement therapy. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. Vol. 86:16-23.
- Sitruk, R. y Ware, M. D. 2002.** Progestágenos en Terapia de Reemplazo Hormonal: Nuevas moléculas, Riesgos y Beneficios. *Menopause*. Vol. 9 (1).
- Struk, R. y Ware, M. D. 2006.** New progestagens for contraceptive use. *Human Reproduction Update*. Vol. 12 (2): 169-178.
- Walpole, E. R., Myers H. R. 1992.** Probabilidad y Estadística. 4a. Edición. Mc-Graw-Hill, México: 511,512.
- Werner, S., Kunz, T., Beckurts, C. D., Heidecke, T. W., Schwarz, L. R. 1997.** Formation of DNA adducts by cyproterone acetate and some structural analogues in primary cultures of human hepatocytes. *Mutation Research*. (395): 179-187.
- Williams, J. K., Cline, J. M., Honore, E. K., Delansorne, R., Paris, J. 1998.** Coadministration of nomegestrol acetate does not diminish the beneficial effects of estradiol on coronary artery dilator responses in non human primates. *American Journal of Obstetric and Gynecology*. Vol. 179: 1288-94.
- Zhang, M. B., He, J. L., Jin, L. F., Lu, D. Q. 2002.** Study of low-intesity 2450-MHz microwave exposure enhancing the genotoxic effects of Mitomicyn C using micronucleus test and comet assay *in vitro*. *Biomedical and Enviromental Sciencies*. Vol. 15(4): 283-290.

# **ANEXO 1**

**Oneway Analysis of RESPUESTA By GRUPOS**



**Oneway Anova Summary of Fit**

Rsquare 0.938608  
 Adj Rsquare 0.914052  
 Root Mean Square Error 0.774597  
 Mean of Response 2.133333  
 Observations (or Sum Wgts) 15

**Analysis of Variance**

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
GRUPOS	4	91.733333	22.9333	38.2222	<.0001
Error	10	6.000000	0.6000		
C. Total	14	97.733333			

**Means for Oneway Anova**

Level	Number	Mean	Std Error	Lower 95%	Upper 95%
CN	3	0.33333	0.44721	-0.663	1.3298
CP	3	7.00000	0.44721	6.004	7.9965
T1	3	0.66667	0.44721	-0.330	1.6631
T2	3	1.66667	0.44721	0.670	2.6631
T3	3	1.00000	0.44721	0.004	1.9965

Std Error uses a pooled estimate of error variance

**Means Comparisons**

Dif=Mean[i]-Mean[j]	CP	T2	T3	T1	CN
CP	0.0000	5.3333	6.0000	6.3333	6.6667
T2	-5.3333	0.0000	0.6667	1.0000	1.3333
T3	-6.0000	-0.6667	0.0000	0.3333	0.6667
T1	-6.3333	-1.0000	-0.3333	0.0000	0.3333
CN	-6.6667	-1.3333	-0.6667	-0.3333	0.0000

Alpha= 0.05

**Comparisons with a control using Dunnett's Method**

Control Group = CN

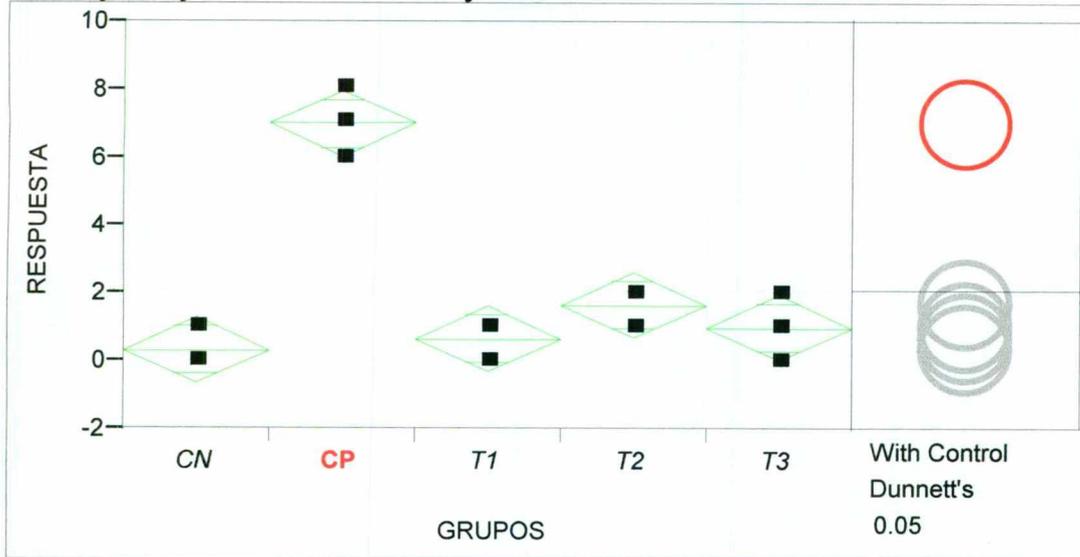
|d| 2.89051 Alpha 0.05

Abs(Dif)-LSD CN 4.8385

Abs(Dif)-LSD	CN
T2	-0.4948
T3	-1.1615
T1	-1.4948
CN	-1.8281

Positive values show pairs of means that are significantly different.

### Oneway Analysis of RESPUESTA By GRUPOS



### Oneway Anova Summary of Fit

Rsquare	0.938608
Adj Rsquare	0.914052
Root Mean Square Error	0.774597
Mean of Response	2.133333
Observations (or Sum Wgts)	15

### Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
GRUPOS	4	91.733333	22.9333	38.2222	<.0001
Error	10	6.000000	0.6000		
C. Total	14	97.733333			

### Means for Oneway Anova

Level	Number	Mean	Std Error	Lower 95%	Upper 95%
CN	3	0.33333	0.44721	-0.663	1.3298
CP	3	7.00000	0.44721	6.004	7.9965
T1	3	0.66667	0.44721	-0.330	1.6631
T2	3	1.66667	0.44721	0.670	2.6631
T3	3	1.00000	0.44721	0.004	1.9965

Std Error uses a pooled estimate of error variance

### Means Comparisons

Dif=Mean[i]-Mean[j]	CP	T2	T3	T1	CN
CP	0.0000	5.3333	6.0000	6.3333	6.6667
T2	-5.3333	0.0000	0.6667	1.0000	1.3333
T3	-6.0000	-0.6667	0.0000	0.3333	0.6667
T1	-6.3333	-1.0000	-0.3333	0.0000	0.3333
CN	-6.6667	-1.3333	-0.6667	-0.3333	0.0000

Alpha=  
0.05

Comparisons with a control using Dunnett's Method

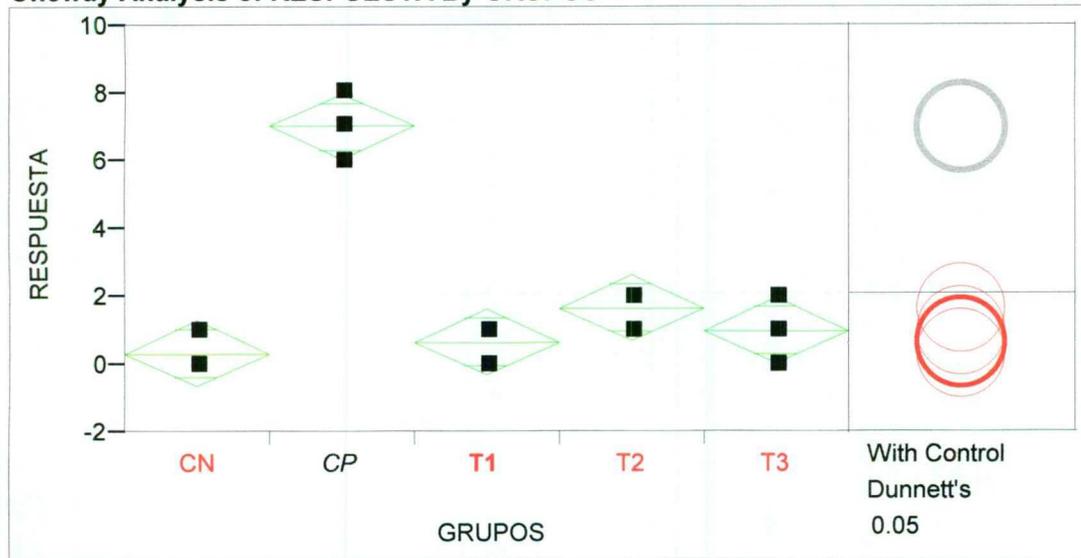
Control Group =  
CP

|d|            Alpha  
2.89051       0.05

Abs(Dif)-LSD	CP
CP	-1.8281
T2	3.5052
T3	4.1719
T1	4.5052
CN	4.8385

Positive values show pairs of means that are significantly different.

Oneway Analysis of RESPUESTA By GRUPOS



Oneway Anova  
Summary of Fit

Rsquare	0.938608
Adj Rsquare	0.914052
Root Mean Square Error	0.774597
Mean of Response	2.133333
Observations (or Sum Wgts)	15

Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
GRUPOS	4	91.733333	22.9333	38.2222	<.0001
Error	10	6.000000	0.6000		
C. Total	14	97.733333			

Means for Oneway Anova

Level	Number	Mean	Std Error	Lower 95%	Upper 95%
CN	3	0.33333	0.44721	-0.663	1.3298
CP	3	7.00000	0.44721	6.004	7.9965
T1	3	0.66667	0.44721	-0.330	1.6631
T2	3	1.66667	0.44721	0.670	2.6631
T3	3	1.00000	0.44721	0.004	1.9965

Std Error uses a pooled estimate of error variance

Means Comparisons

Dif=Mean[i]-Mean[j]	CP	T2	T3	T1	CN
CP	0.0000	5.3333	6.0000	6.3333	6.6667

Dif=Mean[i]-Mean[j]	CP	T2	T3	T1	CN
T2	-5.3333	0.0000	0.6667	1.0000	1.3333
T3	-6.0000	-0.6667	0.0000	0.3333	0.6667
T1	-6.3333	-1.0000	-0.3333	0.0000	0.3333
CN	-6.6667	-1.3333	-0.6667	-0.3333	0.0000

Alpha=  
0.05

Comparisons with a control using Dunnett's Method

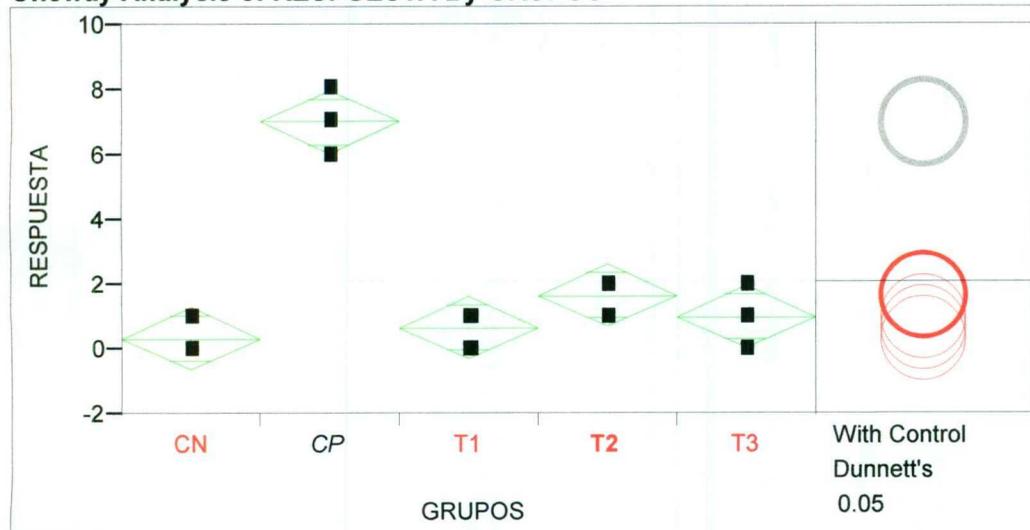
Control Group =  
T1

|d|      Alpha  
2.89051      0.05

Abs(Dif)-LSD	T1
CP	4.5052
T2	-0.8281
T3	-1.4948
T1	-1.8281
CN	-1.4948

Positive values show pairs of means that are significantly different.

### Oneway Analysis of RESPUESTA By GRUPOS



### Oneway Anova Summary of Fit

Rsquare	0.938608
Adj Rsquare	0.914052
Root Mean Square Error	0.774597
Mean of Response	2.133333
Observations (or Sum Wgts)	15

### Analysis of Variance

Source	DF	Sum of Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
GRUPOS	4	91.733333	22.9333	38.2222	<.0001
Error	10	6.000000	0.6000		
C. Total	14	97.733333			

### Means for Oneway Anova

Level	Number	Mean	Std Error	Lower 95%	Upper 95%
CN	3	0.33333	0.44721	-0.663	1.3298

## Trastornos de la coagulación

Los trastornos de la coagulación pueden ser hereditarios o adquiridos. Los trastornos hereditarios se manifiestan generalmente como fallo de un único factor, mientras que en los trastornos de coagulación adquiridos el defecto hemostático generalmente es complejo; comprende faltas de varios factores y, con cierta frecuencia, también trastornos vasculares y plaquetarios.

Los trastornos de la coagulación adquiridos más frecuentes están relacionados con los factores que dependen de la vitamina K; es decir los factores II (protrombina), VII, IX y X. Se observan deficiencias de estos cuatro factores en la enfermedad hemorrágica del recién nacido, en pacientes afectados de obstrucción biliar, del síndrome de mala absorción, de enfermedades hepáticas y en los pacientes después de ingestión de drogas cumarínicas. La destrucción anormal de los factores coagulantes se encuentra en pacientes que presentan un síndrome de desfibrinización. El trastorno más peligroso se caracteriza por un fallo hemostático complejo que puede presentar fibrinólisis anormal, presencia de varios inhibidores, trombocitopenia, hipofibrinogemia y bajos niveles de los factores V y VII, todo ello en múltiples combinaciones. En ciertos casos los trastornos de la coagulación se originan más por exceso de inhibidores que por deficiencia de los diversos factores. Se observan trastornos de la coagulación en otras muchas enfermedades; entre las más frecuentes citaremos: uremia, disproteinemias de diversos tipos, leucemia aguda y carcinomatosis.

# PRUEBA DEL TORNIQUETE

## Técnica

1. Colocar en el brazo, en la forma acostumbrada, el manómetro para la determinación de la presión arterial.
2. Inflar el manómetro hasta una presión de 80 mm de mercurio y mantenerla durante 5 minutos.
3. Retirar el manómetro y el cabo de un minuto observar la formación de petequias en el antebrazo en un área de 5 cm.
4. Los resultados de la prueba se gradúan de manera aproximada desde normal a 4+, tal como se indica a continuación:

< 10 petequias	Normal
10-20 petequias	Repetir
> 20 petequias	Positivo

## Interpretación

1. Esta prueba es una medida imperfecta de la fragilidad capilar. El número y tamaño de las petequias es más o menos proporcional a la propensión a sangrar. Existe un grado de correlación más regular entre el número y tamaño de las petequias y el grado de trombocitopenia. Sin embargo, la prueba depende también de la fragilidad capilar y puede ser muy positiva con un recuento de plaquetas normal. También influyen en el resultado de la prueba el tamaño de los vasos lesionados y el espesor, textura y temperatura de la piel.
2. La prueba no debe repetirse en el mismo brazo hasta pasada una semana.
3. Para hacer más cuantitativa la prueba del torniquete, puede trazarse con tinta un círculo de 5 cm. de diámetro en el antebrazo, de manera que el borde superior quede a 4 cm. de la parte interior del codo. Se anotan las petequias que hay en el círculo y se realiza la prueba como se ha indicado anteriormente. Se anota el número de petequias nuevas que aparecen en el área. Normalmente no debe haber más de 10, o como máximo 20. Esta prueba tiene, no obstante, un inconveniente: pueden aparecer muy pocas petequias en el interior del círculo aunque la prueba sea muy positiva.
4. En casos normales, las petequias aparecen con frecuencia justo debajo del borde inferior del manómetro. Las que aparecen donde estaba éste no se tienen en cuenta.

# TIEMPO DE SANGRADO.

## Finalidad de la prueba

El tiempo de sangrado se utiliza como comprobante de las alteraciones de la función plaquetaria, tanto congénitas como adquiridas y para la enfermedad de Von Willebrand.

## Fundamento de la prueba

El tiempo de sangrado es el necesario para que deje de sangrar una herida estandarizada en la piel. Es una medida de la función plaquetaria e independiente del mecanismo de la coagulación, aunque en caso de alteración grave de la coagulación el tiempo de sangría puede estar alterado.

## Técnica.

1. Verificar que se encuentre limpia el área seleccionada para la prueba.
2. Se hace una punción en el lóbulo de la oreja de una profundidad de unos 4 mm x 2 mm con una lanceta adecuada.
3. El lóbulo de la oreja debe estar caliente pero no se debe limpiar con alcohol ni amasado vigorosamente.
4. Tan pronto como se realiza la punción se pone en marcha un cronómetro.
5. La sangre debe salir libremente y el lóbulo no se debe comprimir.
6. Cada 15 segundos las gotas de sangre que hayan surgido de la oreja se absorben con un trozo de papel de filtro con cuidado de no tocar la superficie de la oreja.

## Interpretación

1. Desde hace tiempo se sabe que la aspirina puede causar un tiempo de sangría alargado, lo que podría ser la explicación de los altos límites normales citados en la literatura. Por ello se debe interrogar al paciente sobre si ha tomado aspirina o cualquier preparado que la contenga en la semana precedente. Si llega a ocurrir así se debe posponer el test para la semana siguiente.

2. Los valores normales con el método Duke oscilan entre 1 y 3 ½ minutos siendo anormales los tiempos de 4 o más minutos.

3. El límite superior de la normalidad con el método de Ivy es de 5 minutos, pero algunos investigadores aceptan como normal un tiempo hasta de 7 minutos.