

11281



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS

15

EFFECTOS ANTICOAGULANTE Y ESTROGENICO DE LOS
17 β -AMINOESTROGENOS PROLAME. BUTOLAME Y
PENTOLAME EN LA RATA OVARIECTOMIZADA

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
DOCTORA EN CIENCIAS
P R E S E N T A:

Q.F.B. RUTH JAIMEZ MELGOZA

Facultad de Medicina

DIRECTOR DE TESIS:

M. EN C. CRISTINA LEMINI GUZMAN



MEXICO, D. F.

2001



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

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

COMITE TUTORAL:

Dra. Ana Elena Lemus Bravo
Dr. Fernando Larrea Gallo

JURADO ASIGNADO:

Presidente: Dr. Gonzalo Martínez de la Escalera
Secretario: Dra. Cristina Lemini Guzmán
Vocal: *Dr. Fernando Larrea Gallo*
Vocal: Dra. Irma Villalpando Fierro
Vocal: Dra. Gabriela Morali de la Brena
Suplente Dr. Vicente Díaz Sánchez
Suplente Dr. Enrique Pedernera Astegiano

PREFACIO

El zorro le dijo al Principito:

-Ve a ver las rosas una vez más. Y así comprenderás que la tuya es única en el mundo. Regresarás para decirme adiós y como regalo te diré un secreto.

El Principito se fue a ver nuevamente las rosas:

-En efecto, no son nada parecidas a mi rosa, todavía no son nada -les dijo-. Nadie las ha domesticado y ustedes no han domesticado a nadie. Están ustedes como estaba mi zorro. Sólo era un zorro común y corriente como cien mil otros. Pero ahora Él es mi Amigo y ahora es Único en el mundo.

Y las rosas se molestaron.

-Son realmente bellas, pero están vacías -les dijo todavía-. No se puede morir por ustedes. Sin duda un transeúnte común creerá que mi rosa se parece a ustedes. Pero Ella sola es para mí más importante que todas ustedes juntas, ya que Ella es la rosa a quien yo he regado. Y la he puesto bajo mi globo y le di abrigo con un biombo. Y también la libré de las orugas y sólo dejé aquellas que se convirtieron en Mariposas. Es Ella la rosa a quien oí quejarse, vanagloriarse, callarse. Porque, al fin de todo, Ella es mi rosa.

Y volvió con el zorro

-Adiós- dijo.

-Adiós- dijo el zorro-. He aquí mi Secreto. Es muy simple: *no se puede ver bien, solo con el Corazón. Lo esencial es invisible a los ojos*. Los hombres han olvidado esa gran verdad. Pero Tú no la olvides. Eres responsable para siempre de lo que has domesticado...

Antoine de Saint-Exupéry

Fragmento de El Principito, capítulo XXI

AGRADECIMIENTOS

A mis Papis : Esperanza Melgoza y Vicente Jaimez. Por que son el regalo más Maravilloso que me ha dado la VIDA.

A mis Maestros:

Q.F.B. Ana Elena Lemus Bravo, Q.F.B. Griselda Silva Leal, Dr. Fernando Larrea Gallo y M. en C. Cristina Lemuni Guzmán. Por su paciencia y dedicación.

A mis Amigos de Farma:

Yani Franco, Inés Martínez, Mon Buendía, Diana González, At Hernández y Julio Rivera. Por su compañía en esas duras jornadas de trabajo.

A mis Amigos de Nutrición:

Pablo Damián, Renecito Santillán, Vero Zaga, Martín, Sarita Córdova, las Larreitas (Lore, Isa, Rocío, Irene). Por haberme aceptado en el club de los buenos amigos.

A mis amigos de Siempre:

Bere, Diana Luque, Charytin, Melita, El Barón Rojo, Jerónimo, DJ MOV y en especial a Ti C, por todos esos grandiosos e inigualables momentos

A la familia:

Mis hermanitos Francisco y Vicente, mis tíos Cecilia y Rodolfo, mis primos Rodolfo, Cecy (mi hermanita), Nahúm (el pequeño), mi tío Ricardo y mis abues Luisa, Pompeya y Francisco. Porque sin su Amor y apoyo las cosas serían muy distintas ahora.

A mi Amor, porque contigo he aprendido el verdadero sentido de esta palabra.

Al apoyo técnico de Farmacología:

Rodolfo Arias, Miguel Hernández, Yolanda Alvarez, Rafa y Yola del bioterio.

Al apoyo técnico de Nutrición:

Sarah Córdova y Angel Morales

A las dos Instituciones donde fue posible realizar este Proyecto de Investigación

Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Medicina Departamento de Farmacología. Laboratorio de Farmacología Endócrina
Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán Departamento de Biología de la Reproducción. Laboratorio de Bioquímica Hormonal.

DEDICATORIA

Todos ustedes merecen una dedicatoria especial, pero comprenden y saben que durante la realización de este proyecto siempre estuvo a mi lado un Angel que fungió como Tutora, Maestra, Amiga y Madre, es por eso que quiero Dedicar esta Tesis a:

M. en C. Cristina Lemini Guzmán

con todo mi Cariño y Respeto

INDICE

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCION	3
4. ANTECEDENTES	4
Justificación	7
Hipótesis	
5. OBJETIVOS	8
5.1 Objetivo General	
5.2 Objetivos Específicos	
6. MATERIALES Y METODOS	9
6.1 MATERIALES	
6.1.1 Compuestos radiactivos	
6.1.2 Compuestos radionerteros	
6.1.3 Disolventes	
6.1.4 Material biológico	11
6.2 METODOS	11
6.2.1 Purificación de los compuestos radiactivos	
6.2.2 Síntesis, purificación y caracterización de los 17 β -aminoestrogenos prolame, butolame y pentolame	
6.2.3 Ovariectomía	14
6.2.4 Evaluación del efecto del prolame, butolame, pentolame y estradiol sobre el tiempo de la coagulación sanguínea	

6.2.5	Evaluación del efecto estrogénico del prolame, butolame y pentolame sobre	15
6.2.5.1	El peso uterino	
6.2.5.2	El eje hipotálamo-hipófisis	
6.2.5.3	La adenohipófisis	16
	Determinación de la constante aparente de disociación (K_d) y del número de sitios de unión (NSU) del receptor de progesterona	17
6.2.6	Determinación de los cursos temporales del decaimiento del efecto de pentolame sobre el peso del útero y las concentraciones circulantes de la hormona luteinizante	18
6.2.7	Interacción de prolame, butolame y pentolame con el receptor intracelular de estrógenos	19
6.2.8	Análisis estadístico.....	20
6.2.9	Determinación de las dosis efectivas e inhibitorias al cincuenta por ciento	
6.2.10	Correlación entre la potencia estrogénica y la longitud de la cadena amino-alcohol de los 17 β -aminoestrógenos	21
7.	RESULTADOS	22
7.1	Síntesis de los 17 β -aminoestrógenos: prolame, butolame y pentolame	
7.2	Constantes fisicoquímicas de prolame, butolame y pentolame obtenidas mediante espectroscopia de infrarrojo, espectroscopia de resonancia magnética nuclear y espectrometría de masas	
7.3	Efecto de prolame, butolame, pentolame y estradiol sobre el tiempo de la coagulación sanguínea	23
7.4	Efecto uterotrófico de prolame, butolame y pentolame <i>Dosis efectiva media y potencia relativa</i>	25

7.5	Curso temporal del decaimiento del efecto de pentolame sobre el peso del útero	27
7.6	Efecto antigonadotrófico de prolame, butolame y pentolame Dosis inhibitoria media y potencia relativa	29
7.7	Curso temporal del decaimiento del efecto de pentolame sobre las concentraciones circulantes de la hormona luteinizante	31
7.8	Inducción del receptor intracelular de progesterona estrógeno-dependiente en la hipófisis anterior	33
7.9	Constante de disociación (K_d) y número de sitios de unión (NSU) del receptor de progesterona	35
7.10	Interacción de prolame, butolame y pentolame con el receptor intracelular específico de estrógenos. Afinidad relativa de unión (ARU) y constante de inhibición (K_i)	36
7.11	Relación estructura química/actividad biológica	38
8.	DISCUSION	43
9.	CONCLUSIONES	50
10.	BIBLIOGRAFIA	51
11.	APENDICE	
12.	PUBLICACIONES ORIGINALES GENERADAS	

1. RESUMEN

La administración de estrógenos naturales y sintéticos se ha relacionado con el aumento de padecimientos tromboembólicos. Por otra parte los 17β -aminoestrógenos son compuestos sintéticos que ejercen efectos opuestos al estradiol sobre el tiempo de la coagulación. La única diferencia estructural entre el estradiol y estos compuestos consiste en la sustitución del hidroxilo del carbono 17 por un grupo amino-alcohol. Se investigaron los efectos de tipo estrogénico y sobre el tiempo de coagulación de tres 17β -aminoestrógenos, prolame, butolame y pentolame, utilizando distintos marcadores biológicos. Así mismo se estudió la capacidad de estos compuestos para unirse al receptor intracelular de estrógenos. Los animales se ovariectomizaron tres semanas antes de iniciar los tratamientos y recibieron diariamente por vía subcutánea diferentes dosis de cada uno de los 17β -aminoestrógenos (1-1000 μg), el estradiol (0.1-1000 μg) o el vehículo (propilenglicol 0.3 ml) durante cinco días consecutivos. La administración de los 17β -aminoestrógenos incrementó el tiempo de coagulación en forma significativa (25-28%, $p < 0.01$) en comparación con el grupo control tratado con el vehículo. El estradiol mostró un efecto opuesto al de los 17β -aminoestrógenos, al disminuir el tiempo de coagulación hasta en un 30% ($p < 0.01$). El prolame, butolame y pentolame restauraron el peso del útero e inhibieron las concentraciones circulantes de LH, efectos que permanecieron hasta el quinto día después de la última administración. El tratamiento con pentolame indujo la presencia del receptor de progesterona estrógeno-dependiente en la hipófisis anterior y las constantes fisicoquímicas del receptor inducido fueron similares a las del receptor inducido con el estradiol a dosis equipotentes (860 μg vs 1 μg respectivamente). El análisis de competencia por el receptor intracelular de estrógenos mostró que los 17β -aminoestrógenos presentan una afinidad de unión menor a la del estradiol. El prolame presentó la potencia estrogénica mayor, seguido por butolame y pentolame. Nuestros resultados sugieren que la longitud de la cadena amino-alcohol en el carbono 17 influye de manera importante en la expresión de la potencia estrogénica a nivel de distintos órganos blanco.

2. ABSTRACT

The use of estrogens in humans has been related with thromboembolic disease. The 17 β -aminoestrogens are synthetic compounds that have different effects than estradiol on blood clotting time. The amino-alcohol group at the C-17 is the structural difference between estradiol and this group of compounds. In this study, we investigated the effects of three 17 β -aminoestrogens such as prolame, butolame and pentolame; upon the blood clotting time, uterine weight, serum LH, and the induction of intracellular estrogen-dependent progesterone receptors in the anterior pituitary, in the adult castrated female rat. We also investigated ability of these compounds, to bind to intracellular estrogen receptors. Groups of animals were subcutaneously administered with either estradiol (0.1 to 1000 μ g), or the aminoestrogens (1 to 1000 μ g), and the control group received the vehicle daily for 5 consecutive days after 3 weeks following ovariectomy. Administration of the three aminoestrogens to castrated animals significantly increased ($p < 0.01$) the blood clotting time when compared with that obtained in the control group. In contrast, estradiol significantly shortened blood clotting times ($p < 0.01$). Prolame, butolame and pentolame reverted the castration-induced reduction in uterine weight and caused a significant inhibition on serum LH levels of ovariectomized rats. The effect of pentolame upon serum LH levels and uterine weight, still remained until day 5 after the last injection. In addition, treatment with pentolame was able to induce in the castrated female rat the presence of specific estrogen-dependent progestin binding sites in the anterior pituitary. The affinity constants and the number of binding sites of pentolame-induced progestin receptors were similar to those obtained with estradiol at equipotent doses (860 μ g pentolame vs 1 μ g estradiol, respectively) Prolame had the highest estrogenic activity followed by butolame and pentolame. The overall data suggest that modifications the length of the amino-alcohol side chain at C-17 might have an impact on the affinity and estrogenic intrinsic properties of aminoestrogens at the level of diverse target tissues

3. INTRODUCCION

En los mamíferos, las hormonas sexuales son productos de la biosíntesis y secreción de las células esteroideogénicas gonadales y tienen, entre otras funciones, la de mantener las características anatómo-funcionales de los diferentes órganos y tejidos que constituyen el aparato reproductor masculino y femenino. Durante la pubertad se producen cambios a nivel del eje hipotálamo-hipófisis-gónada, caracterizados por la instalación de mecanismos de retroalimentación positivos y negativos, responsables de la liberación de gonadotrofinas hipofisarias así como de la biosíntesis y secreción gonadal de las hormonas esteroides sexuales. (Gower, 1988; Erickson y Schreiber, 1995).

En la etapa reproductiva del individuo adulto, las funciones endócrina (esteroideogénesis) y reproductiva (gametogénesis) de las gónadas, son esenciales para la perpetuación y conservación de las especies y están reguladas por hormonas de origen hipofisario (gonadotrofinas) (Mc Donnell *et al.* 1993).

En la gónada femenina, las células de la teca, bajo estímulo de la hormona luteinizante (LH), sintetizan primordialmente andrógenos, los cuales atraviesan la membrana basal hasta alcanzar las células de la granulosa, que representa el substrato anatómico en el cual se lleva a cabo el proceso de aromatización. Este proceso está regulado por la hormona folículo estimulante (FSH) cuya acción es de fundamental importancia durante los procesos de maduración folicular que preceden al fenómeno de la ovulación (Erickson y Schreiber, 1995)

Los estrógenos constituyen un grupo de hormonas esteroides responsables de la construcción del fenotipo femenino en la etapa pospubertal, al estimular el desarrollo de las características sexuales secundarias y en acción conjunta con la progesterona, aseguran la función gametogénica del ovario (Rebar *et al.* 1995)

En los mamíferos, los efectos biológicos de las hormonas esteroideas con actividad estrogénica se ejercen principalmente sobre el eje hipotálamo-hipófisis y los órganos sexuales accesorios, así como en el endometrio y la glándula mamaria, proporcionando los cambios estructurales y funcionales, necesarios para los procesos reproductivos propios de la especie (Gorski y Gannon, 1976, Katzenellenbogen, 1980; Ing y O'Malley, 1995). Estos efectos son mediados por receptores localizados en el citoplasma o núcleo de la célula. La interacción de la hormona esteroide con su receptor modifica la transcripción de genes estructurales cuyos productos son los responsables del efecto biológico a nivel de la célula blanco o esteroide-dependiente (Evans, 1988; Carson-Jurica *et al.* 1990).

La deficiencia en la producción de hormonas con actividad estrogénica provoca elevaciones de las hormonas tróficas y atrofia en aquellos sistemas dependientes de las mismas. Esta condición se encuentra representada por situaciones clínicas caracterizadas por la ausencia tanto anatómica como funcional de la gónada femenina que conlleva a la pérdida de la capacidad reproductiva, así como al aumento del riesgo relativo de un número importante de padecimientos tanto en la esfera cardiovascular como del metabolismo óseo (Mammen, 1982, Henderson *et al.* 1985, 1998; Barret-Connor y Bush 1991). Esta situación, es muy común en mujeres postmenopáusicas y representa un problema importante de salud que requiere tanto de su prevención como de su tratamiento adecuados (Rosenberg *et al.* 1990; Breckwoldt *et al.* 1995)

4. ANTECEDENTES

La administración de compuestos hormonales con actividad estrogénica a mujeres postmenopáusicas o como terapia anticonceptiva y en el hombre en el *tratamiento del cáncer de prostata, ha sido motivo de controversia.* Esta controversia se ha generado debido a las diferencias en los resultados de los diferentes grupos que han estudiado los riesgos y beneficios de la administración

En los mamíferos, los efectos biológicos de las hormonas esteroides con actividad estrogénica se ejercen principalmente sobre el eje hipotálamo-hipófisis y los órganos sexuales accesorios, así como en el endometrio y la glándula mamaria, proporcionando los cambios estructurales y funcionales, necesarios para los procesos reproductivos propios de la especie (Gorski y Gannon, 1976, Katzenellenbogen, 1980; Ing y O'Malley, 1995) Estos efectos son mediados por receptores localizados en el citoplasma o núcleo de la célula. La interacción de la hormona esteroide con su receptor modifica la transcripción de genes estructurales cuyos productos son los responsables del efecto biológico a nivel de la célula blanco o esteroide-dependiente (Evans, 1988; Carson-Jurica *et al.* 1990).

La deficiencia en la producción de hormonas con actividad estrogénica provoca elevaciones de las hormonas tróficas y atrofia en aquellos sistemas dependientes de las mismas. Esta condición se encuentra representada por situaciones clínicas caracterizadas por la ausencia tanto anatómica como funcional de la gónada femenina que conlleva a la pérdida de la capacidad reproductiva, así como al aumento del riesgo relativo de un número importante de padecimientos tanto en la esfera cardiovascular como del metabolismo óseo (Mammen, 1982; Henderson *et al.* 1985, 1998; Barret-Connor y Bush 1991). Esta situación, es muy común en mujeres postmenopáusicas y representa un problema importante de salud que requiere tanto de su prevención como de su tratamiento adecuados (Rosenberg *et al.* 1990, Breckwoldt *et al.* 1995)

4. ANTECEDENTES

La administración de compuestos hormonales con actividad estrogénica a mujeres postmenopáusicas o como terapia anticonceptiva y en el hombre en el tratamiento del cáncer de prostata, ha sido motivo de controversia. Esta controversia se ha generado debido a las diferencias en los resultados de los diferentes grupos que han estudiado los riesgos y beneficios de la administración

de estrógenos. Sin embargo el análisis general de estos estudios nos señalaba que estas diferencias se deben a factores que no fueron tomados en consideración, como el diseño estadístico, los antecedentes familiares de enfermedad tromboembólica, infartos previos al estudio, obesidad, hipertensión, diabetes, hipercolesterolemia, tabaquismo etc; (Henderson *et al.* 1985, Kalin y Zumoff, 1990; Breckwoldt *et al.* 1995).

Existen numerosos estudios que apoyan las evidencias de que los estrógenos en la mujer ejercen un efecto protector a nivel cardiovascular y sobre el sistema óseo. Estos estudios indican que la incidencia de infarto al miocardio es cuatro veces mayor en el hombre que en la mujer antes de la menopausia. (Barret-Connor *et al.* 1991; Wren, 1992; Farhat *et al.* 1996; Perrot-Applanat, 1996). Además la administración de estrógenos en hombres adultos después de sufrir un infarto agudo al miocardio redujo la tasa de mortalidad en un 50% (Stamler *et al.* 1963; Henderson *et al.* 1985, 1998). Sin embargo otros estudios señalan que el uso de estrógenos incrementa el riesgo de ciertas enfermedades tales como el tromboembolismo venoso profundo, cáncer endometrial, cáncer de mama, etc; (Böttiger *et al.* 1980; Gruchow *et al.* 1988; Breckwoldt *et al.* 1995). Por otro lado, se ha demostrado que los estrógenos tienen la capacidad de modificar las concentraciones circulantes de algunos factores de la coagulación (factor I, II, VII, XII etc;) y alterar la actividad fibrinolítica, efecto que conduce a un estado de hipercoagulabilidad sanguínea (Gerstman *et al.* 1990; Meade *et al.* 1990; Caine *et al.* 1992; Devor *et al.* 1992; Lee *et al.* 1993; Farsetti *et al.* 1995; Citarella *et al.* 1996, Meilahn *et al.* 1996).

Los experimentos con animales de laboratorio confirman que los estrógenos ejercen efectos significativos sobre el metabolismo de las proteínas que participan en el proceso de la coagulación sanguínea, las lipoproteínas, así como en el músculo liso vascular (Emms y Lewis 1985, Owens *et al.* 1986, Farhat *et al.* 1996)

Mandoki *et al.* (1983) demostraron que la administración de dosis elevadas de estrógenos naturales y sintéticos producían efectos bifásicos sobre la coagulación sanguínea en el ratón. Un efecto anticoagulante inicial de duración breve (3-7.5 horas), seguido de un efecto hipercoagulante de mayor duración (varios días).

Todas estas observaciones han contraindicado el uso de los estrógenos en sujetos con antecedentes de fenómenos tromboembólicos, cáncer de mama, enfermedad cardiovascular isquémica entre otros.

En la búsqueda de compuestos con actividad estrogénica pero con menores efectos adversos sobre la coagulación sanguínea, un grupo de investigadores de la Universidad Nacional Autónoma de México, desarrolló una serie de derivados del estradiol que en contraste con los efectos descritos anteriormente para los estrógenos, exhibieron efectos anticoagulantes. La única diferencia estructural entre el estradiol y este grupo de compuestos es la sustitución del hidroxilo del carbono 17 por un grupo amino-alcohol en orientación beta, por lo que se denominaron en forma genérica como 17 β -aminoestrógenos.

Los estudios *in vitro* demostraron que los aminoestrógenos prolame, butolame y pentolame producían inhibición de la agregación plaquetaria (De la Peña *et al.* 1993, 1994). La administración de prolame, butolame, pentolame o hexolame a ratonas CD-1 ovariectomizadas produjo un aumento significativo del tiempo de la coagulación y cambios en el epitelio vaginal (células cornificadas) característicos de actividad estrogénica. El efecto sobre el epitelio vaginal se mantuvo durante varios días después de la última administración. La magnitud de los efectos descritos anteriormente y la toxicidad de los compuestos, dependían del tipo de sustituyente del amino terminal (Rubio-Póo *et al.* 1985, 1990; Lemini *et al.* 1993)

Estos resultados sugerían que los derivados 17 β -aminoestrógenos podrían ofrecer ventajas si se utilizaran en tratamientos clínicos en situaciones en donde la administración del estrógeno estuviera contraindicada, hecho que despertó el interés por la evaluación farmacológica de estos compuestos.

JUSTIFICACION

Las diferencias del efecto sobre el tiempo de la coagulación entre los 17 β -aminoestrógenos y los estrógenos de uso actual en el humano, nos motivaron a realizar el estudio acerca de la potencia estrogénica de los 17 β -aminoestrógenos: prolame, butolame y pentolame. Nuestro interés fue el de evaluar esta serie de fármacos sobre diferentes funciones del sistema reproductor, en especial sobre la dinámica de la función gonadotrófica de la hipófisis anterior y el tejido uterino, así como sus mecanismos de acción. Con la finalidad de desarrollar nuevos fármacos que pudieran utilizarse con fines terapéuticos sin la posibilidad de producir efectos trombogénicos.

HIPOTESIS

Los 17 β -aminoestrógenos prolame, butolame y pentolame, en forma contraria al 17 β -estradiol, incrementan el tiempo de la coagulación sanguínea. Sus efectos estrogénicos sobre el sistema reproductor son mediados a través de su interacción con los receptores intracelulares para estrógenos.

5. OBJETIVOS

5.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de los 17β -aminoestrógenos prolame, butolame y pentolame sobre el sistema reproductor así como su actividad anticoagulante empleando como modelo la rata ovariectomizada.

5.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- a) Síntesis, purificación y caracterización de prolame, butolame y pentolame.
- b) Determinación del efecto de prolame, butolame y pentolame sobre el tiempo de la coagulación sanguínea en la rata ovariectomizada
- c) Evaluación de los efectos estrogénicos de prolame, butolame y pentolame en la rata ovariectomizada sobre el peso del útero, las concentraciones séricas de la hormona luteinizante (LH) y la inducción del receptor intracelular de progesterona (estrógeno-dependiente) en la hipófisis anterior.
- d) Determinación del curso temporal del efecto de pentolame sobre el peso del útero y las concentraciones en suero de la LH.
- e) Evaluación de la interacción de prolame, butolame y pentolame con el receptor intracelular específico de estrógenos

6. MATERIALES Y METODOS

6.1 MATERIALES

6.1.1 Compuestos radiactivos

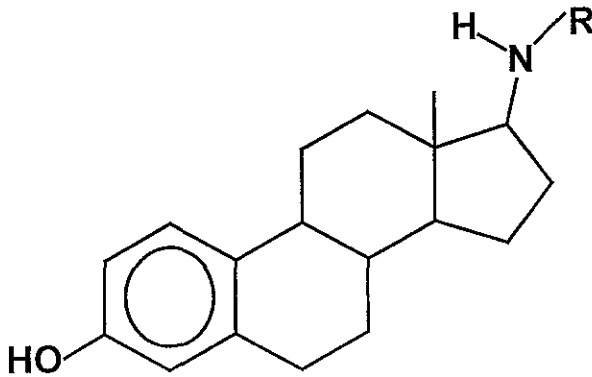
El estradiol E₂-[³H]-2,4,6,7 (1,3,5(10)-estratrieno-3,17β-diol) con una actividad específica (a.e.) de 97 Ci/mmola y la promegestona ORG2058-[³H]-6,7 (16α-etil-21-hidroxi-19-nor-4-pregнено-3,20-diona) a.e. de 45 Ci/mmola, se obtuvieron de Amersham International plc (Buckinghamshire, Inglaterra).

6.1.2 Compuestos radioinertes

El estradiol se obtuvo de Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EE UU) y su pureza fue establecida por cromatografía en capa fina. El ORG-2058 se obtuvo de Amersham International (Buckinghamshire, Inglaterra). Los aminoestrógenos Prolame 17β-(3-hidroxi-1-propilamino)-1,3,5(10)-estratrieno-3-ol, Butolame 17β-(4-hidroxi-1-butilamino)-1,3,5(10)-estratrieno-3-ol y Pentolame 17β-(5-hidroxi-1-pentilamino)-1,3,5(10)-estratrieno-3-ol (fig. 1) se sintetizaron en el laboratorio a partir de estrona; 3-hidroxi-1,3,5(10)-estratrieno-17-ona que fue donada por Syntex de México. Las alcohol aminas 3-amino-1-propanol, 4-amino-1-butanol y 5-amino-1-pentanol así como el borohidruro de sodio y el borohidruro de litio se adquirieron de Aldrich (Milwaukee, WI, EE UU)

6.1.3 Disolventes

Los disolventes y reactivos utilizados en los experimentos de síntesis de los aminoestrógenos fueron de grado analítico. Los disolventes empleados en el análisis de pureza de prolame, butolame y pentolame fueron grado HPLC.



- $R_1 = (\text{CH}_2)_3\text{OH}$ Prolame
 $R_2 = (\text{CH}_2)_4\text{OH}$ Butolame
 $R_3 = (\text{CH}_2)_5\text{OH}$ Pentolame

Figura 1. Estructura química de los 17β-aminoestrógenos

6.1.4 Material biológico

Para la realización de los experimentos se utilizaron ratas hembras adultas (200-250 g) o ratas hembras prepúberes (80-100 g) de la cepa Wistar, procedentes del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM que se mantuvieron en ciclos de luz-oscuridad de 12 h x 12 h con agua y alimento *ad libitum*.

6.2 METODOS

6.2.1 Purificación de los compuestos radiactivos

La pureza radioquímica de los esteroides isotópicamente marcados con tritio se verificó por la técnica de dilución isotópica inversa que incluyó cromatografía en papel en el sistema NB₂ (tolúeno:iso-octano/metanol:agua, 67:33/60:40) y en el B₃ de Bush (hexano:benceno/metanol:agua, 67:33/80:20), seguida de recristalizaciones sucesivas de una alícuota a la que se le adicionó una cantidad conocida, en términos de miligramos, del mismo esteroide radioinerte hasta la obtención de actividad específica constante.

6.2.2 Síntesis purificación y caracterización de los 17 β -aminoestrógenos prolame, butolame y pentolame

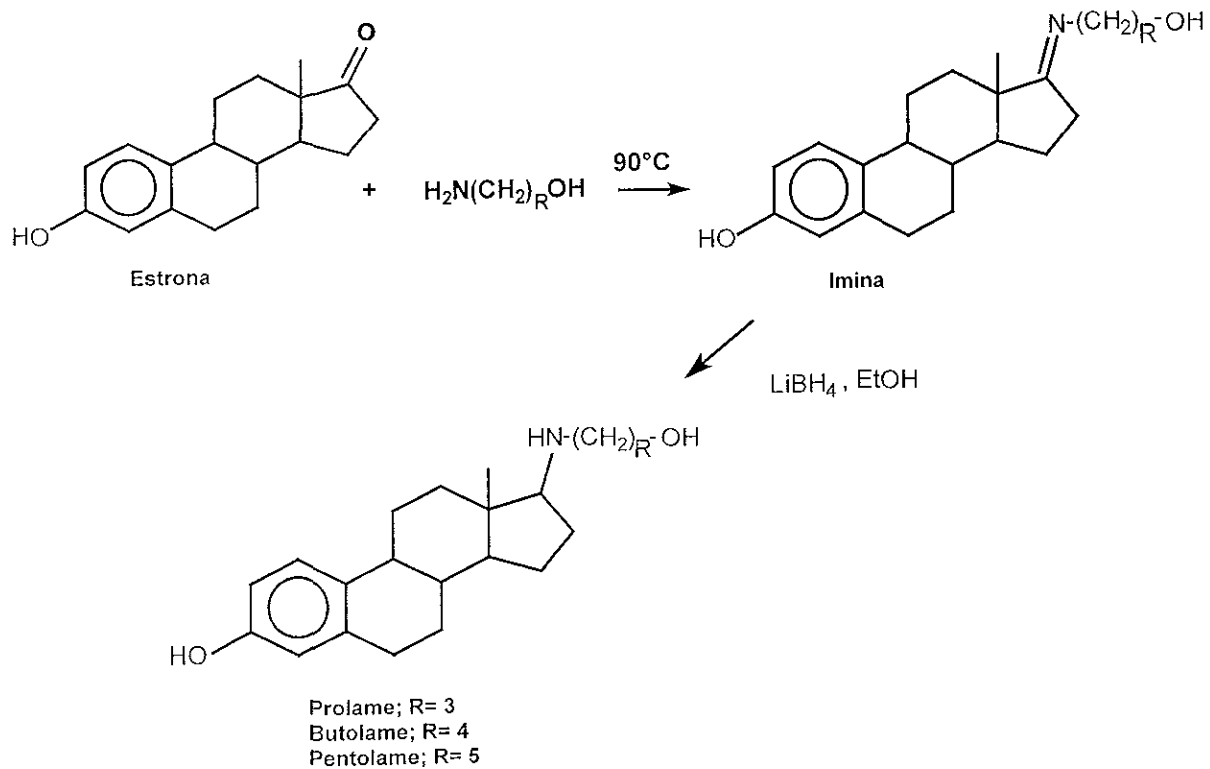
Los 17 β -aminoestrógenos *prolame*, *butolame* y *pentolame* se sintetizaron de acuerdo a los métodos descritos en la literatura (Fernández *et al.* 1985, Lemini *et al.* 1993) La ruta sintética consistió en la reacción de 1 g (9.69 mmolas) de estrona con 1.5 g (5.5 mmolas) de la amina primaria correspondiente (3-amino-1-propanol, 4-amino-1-butanol ó 5-amino-1-pentanol) a una temperatura de 80-90°C durante 4 h en 10 ml de éter isopropílico. El resultado de esta reacción fue la obtención de la correspondiente imina como un sólido blanco que se trituró con 20 ml de acetona, se filtró y se seco al vacío. La imina obtenida (1 g = 4.5 mmolas) se

disolvió en 20 ml de etanol, y se agregó 1 g de borohidruro de sodio o de litio en forma fraccionada durante 30 minutos. La mezcla de reacción se calentó a reflujo por una hora y 30 minutos, después de la cual se dejó enfriar en un baño de hielo para adicionarle 100 ml de agua. El precipitado formado se filtró, se lavó con agua y se secó al vacío. La reducción de la imina permitió la obtención del 17 β -aminoestrógeno requerido (fig. 2).

Los productos de la reacción se aislaron y purificaron por cristalizaciones sucesivas con metanol/éter isopropílico. El seguimiento de las reacciones se realizó mediante cromatografía en capa fina utilizando placas de gel de sílice 60 Merck F-254 (3 x 5 cm), con el eluyente hexano/acetato de etilo (70/30). Los productos se observaron mediante luz ultravioleta y se revelaron con vapores de yodo. La pureza y caracterización de los productos se llevó a cabo por el establecimiento de sus constantes fisicoquímicas y espectroscópicas utilizando métodos de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), análisis elemental, espectroscopía de infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear de hidrógeno ($^1\text{H-RMN}$) y espectrometría de masas (EM).

La pureza de los compuestos se certificó por medio de HPLC en fase reversa, utilizando un sistema de acetonitrilo/agua en una proporción de 70/30. El cromatógrafo de líquidos de alta resolución empleado fue un Millennium 2000 marca Waters con un detector de arreglo de diodos modelo 996. El punto de fusión de los productos se determinó en un aparato Electrothermal modelo 9100.

El análisis elemental de los productos se obtuvo de Galbraith Laboratories Inc (Knoxville, TN, EE UU). Para la obtención de los espectros de infrarrojo (IR) en pastillas de bromuro de potasio se utilizó un espectrofotómetro Nicolet FT-55X. Los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno ($^1\text{H-RMN}$) se registraron mediante un espectrofotómetro Varian-Gemini de 200 MHz, en CDCl_3 - DMSO-d_6 y se expresaron en partes por millón (ppm), usando como referencia interna tetrametilsilano. Los espectros de masas se obtuvieron por impacto electrónico con introducción directa de la muestra a 70 electrón voltios (e v) en un espectrómetro Hewlett-Packard 5985-B.

Figura 2. Síntesis de los 17 β -aminoestrógenos: prolame, butolame y pentolame

6.2.3 Ovariectomía

Las ovariectomías se realizaron en ratas Wistar adultas tres semanas antes de iniciar los tratamientos. Los animales se anestesiaron con hidrato de cloral (280 mg/Kg de peso corporal) por vía intraperitoneal. Se realizó una incisión transversal de aproximadamente 1 cm en la región dorsal, procediendo a una segunda *incisión bilateral longitudinal en el músculo*, a una distancia aproximada de 0.5 cm de los músculos espinales dentro de la cavidad peritoneal hasta la localización del útero y los ovarios. Los cuernos uterinos se ligaron y los ovarios se removieron. Finalmente se suturó en los diferentes planos y la región dorsal se desinfectó con una solución de benzal al 1 % (Bennet *et al.* 1970).

6.2.4 Evaluación del efecto de prolame, butolame, pentolame y estradiol sobre el tiempo de la coagulación sanguínea

La evaluación del efecto de los diferentes aminoestrógenos sobre el tiempo de coagulación se llevó a cabo por el método de microhematocrito (Mandoki *et al.* 1983, 1991; Rubio-Póo *et al.* 1983, 1985, 1990; Lemini *et al.* 1993). Se utilizaron ratas Wistar ovariectomizadas distribuidas de acuerdo a su peso corporal, en varios lotes conteniendo de 4-6 animales cada uno (Zar, 1984)

Las ratas recibieron por vía subcutánea (sc) durante 5 días consecutivos diferentes dosis de prolame, butolame, pentolame (1-1000 μ g) o de E₂ (0.1-1000 μ g) disueltos en 0.3 ml de propilenglicol empleado como vehículo. Transcurridas 24 h después de la última administración se determinó el tiempo de coagulación. La cola de cada animal se sumergió en agua a 37°C durante 30 seg y posteriormente se hizo una incisión en la punta de donde se tomó la muestra de sangre (25 μ l) con un capilar no heparinizado. En ese momento se accionó un cronómetro y el capilar se depositó sobre una base de madera en forma de

triángulo invertido que se inclinó en un ángulo de $\pm 60^\circ$ para permitir que la muestra de sangre se desplazara entre dos marcas del capilar separadas por una distancia de 5 cm. El cronómetro se detuvo cuando la muestra de sangre en el capilar se coaguló registrando el tiempo transcurrido.

Los experimentos se realizaron por lo menos 3 veces en un mismo horario entre las 8:30-11:00 h, manteniendo una temperatura ambiente constante entre 22 y 24°C. Como grupo control se utilizó un lote de animales que recibieron solo el vehículo.

6.2.5 Evaluación del efecto estrogénico de prolame, butolame y pentolame sobre:

6.2.5.1 El peso uterino

El efecto de los aminoestrógenos sobre el peso del útero se llevó a cabo mediante métodos descritos por Astwood (1938); Evans *et al.* (1941) y Reel *et al.* (1996). Los mismos animales que se utilizaron para la determinación del tiempo de la coagulación se decapitaron. El útero se removió y se pesó, mientras que la sangre colectada se utilizó para determinar concentraciones de LH en suero. Como controles del experimento se emplearon tres grupos, los animales tratados con E_2 , aquellos que solo recibieron el vehículo y ratas intactas sin tratamiento.

6.2.5.2 El eje hipotálamo-hipófisis

Las muestras de sangre que se obtuvieron en el experimento anterior se dejaron a temperatura ambiente hasta la retracción del coágulo. El suero se obtuvo por centrifugación a 3000 rpm durante 10 min. Las concentraciones en suero de LH se cuantificaron por medio de radioinmunoanálisis en fase líquida de doble anticuerpo (Migdie, 1966, Torell y Larson 1978), con reactivos y protocolo

proporcionados por el National Hormone and Pituitary Program (Rockville, Maryland, EE UU). Los coeficientes de variación intra e inter-análisis fueron de 4.6 % y 8.2 % respectivamente y los resultados se expresaron en ng/ml. Como controles del experimento se utilizaron los sueros de los animales que recibieron E₂, el vehículo y ratas intactas sin tratamiento.

6.2.5.3 La adenohipófisis

La expresión del receptor de progesterona (RP) estrógeno-dependiente se indujo en la hipófisis anterior de ratas Wistar adultas ovariectomizadas. Los animales se distribuyeron en tres grupos de 9 ratas cada uno. El primer grupo recibió 850 µg de pentolame, el segundo 1 µg de E₂ y un tercero 0.3 ml de propilenglicol por vía subcutánea durante 5 días consecutivos. El día posterior a la última administración, los animales se decapitaron y se obtuvo la adenohipófisis. El tejido adenohipofisario se lavó con buffer TEDMGL (Tris HCl 20 mM, pH 7.4 a 4°C, EDTA 1.5 mM, ditioneitol 0.25 mM y molibdato de sodio 10 mM, 10 % de glicerol v/v y 1 µg/ml de leupeptina) se secó y se pesó. Posteriormente se homogeneizó con buffer TEDMGL (en una relación peso/volumen de 1/6) en un politrón con pistilo de teflón. El citosol se obtuvo al centrifugar el homogeneizado a 105,000 x g durante 1 h a 4°C en una ultracentrífuga Beckman XL90 con un rotor SW 50 1

El contenido de proteínas totales se determinó en alícuotas del citosol por el método de Bradford (1976). El citosol (3-5 mg proteína/ml) se incubó durante 4 h a 4°C en presencia de ORG2058-[³H] (radioligando específico del receptor de progesterona) a una concentración de 3 nM. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, el citosol tritado se depositó sobre la superficie de un gradiente lineal de sacarosa (20-35%) suplementado con 10 % de glicerol. Los gradientes se centrifugaron en una ultracentrífuga Beckman XL90 (rotor vertical VTi 65) a 400,000 x g durante 2 h y treinta minutos a 2°C. El fondo del tubo de cada gradiente se perforó y se colectaron fracciones de aproximadamente 85 µl. La

radiactividad de cada fracción se cuantificó en un espectrómetro de centelleo líquido Packard Tri Carb modelo 1900TR con una eficiencia del 69 % y se utilizó Instagel® como solución de centelleo.

El quenching se corrigió en todas las muestras por estandarización externa. El coeficiente de sedimentación del complejo hormona-receptor se calculó tomando como referencia el coeficiente de sedimentación (4.6) de la albúmina sérica de bovino (ASB), la cual se corrió en forma paralela en otro gradiente (Kouvonen *et al.* 1978). La unión no específica se valoró en incubaciones en paralelo que contenían un exceso de 200x de ORG2058 radioinerte (Vilchis *et al.* 1986; Pérez-Palacios *et al.* 1991)

Determinación de la constante aparente de disociación (K_d) y del número de sitios de unión (NSU) del receptor de progesterona

Las constantes fisicoquímicas K_d y NSU del receptor de progesterona inducido con la administración de pentolame, se obtuvieron mediante curvas de saturación las cuales se graficaron de acuerdo a lo descrito por Scatchard (1949)

En la realización de estos experimentos se utilizaron ratas Wistar ovariectomizadas tratadas diariamente con 850 μg de pentolame durante 2 ó 4 días consecutivos. Como controles del experimento se utilizaron grupos de animales que recibieron 1 μg de E_2 o únicamente el vehículo (0.3 ml) Veinticuatro horas después de la última administración, los animales se decapitaron y se disecaron las adenohipófisis. Los tejidos se homogeneizaron en buffer TEDMGL en una relación peso/volumen de 1/6 con un politrón con pistilo de teflón. El citosol se obtuvo al centrifugar el homogeneizado a 105,000 x g durante 1 h a 4°C en una ultracentrífuga Beckman XL90 y un rotor SW 50 1

El contenido de proteínas totales se determinó en alícuotas del citosol por el método de Bradford (1976). El citosol (3-5 mg proteína/ml) se incubó durante 18 h a 4°C con ORG2058-³H a las concentraciones de 2, 4 y 8 nM. El esteroide no unido se separó agregando una suspensión de carbón-dextrán (250 mg carbón activado y 25 mg de Dextrán T-70 disueltos en 100 ml de buffer TEDM) agitando durante 4 minutos. Posteriormente la suspensión se centrifugó a 3000 rpm durante 10 min a 4°C y del sobrenadante se tomaron alícuotas de 200 µl para determinar el contenido de radiactividad en un espectrómetro de centelleo líquido Packard Tri Carb modelo 1900TR con una eficiencia del 69 %. Se usó Instagel® como solución de centelleo.

6.2.6 Determinación de los cursos temporales del decaimiento del efecto de pentolame sobre el peso del útero y las concentraciones circulantes de la hormona luteinizante

Las determinaciones de los cursos temporales del decaimiento de los efectos de pentolame sobre el peso del útero y las concentraciones circulantes de LH se llevaron al cabo en ratas ovariectomizadas distribuidas en grupos de 5 animales por grupo. Las ratas recibieron por vía subcutánea 500 ó 1000 µg de pentolame disuelto en 0.3 ml de propilenglicol, durante 5 días consecutivos. Los cursos temporales del decaimiento del efecto se establecieron en función a la permanencia del efecto de pentolame en periodos de 1 a 7 días posteriores a la última administración. Las muestras de sangre y los úteros se obtuvieron en la misma forma descrita con anterioridad. Para evaluar el efecto uterotrófico se utilizaron los métodos descritos por Astwood (1938), Evans (1941) y Reel (1996) y los métodos de Migdley (1966) y Torell y Larson (1978) para la evaluación del efecto sobre las concentraciones de LH. Como controles del experimento se emplearon grupos de ratas ovariectomizadas tratadas con E₂ (5 µg), ratas ovariectomizadas que recibieron solo el vehículo (0.3 ml) y ratas hembras intactas sin tratamiento.

6.2.7 Interacción de prolame, butolame y pentolame con el receptor intracelular de estrógenos

La interacción de los aminoestrógenos con el receptor intracelular de estrógenos (RE) se estableció por medio de análisis de competencia (Chávez *et al.* 1985), para lo cual se utilizó el citosol obtenido del útero de ratas Wistar hembras prepúberes como la fuente del receptor de estrógenos. Los animales se decapitaron y se obtuvieron los úteros que fueron homogeneizados en buffer TEDML en un politrón. El citosol se obtuvo centrifugando el homogeneizado a 105,000 x g durante 1 h a 4°C. El contenido de proteínas totales se determinó en alícuotas del citosol por el método de Bradford (1976).

Del citosol se tomaron alícuotas de 200 µl (3-5 mg de proteína/ml) y se incubaron en presencia de concentraciones a saturación de estradiol tritiado (1 nM) y concentraciones crecientes de prolame, butolame y pentolame (1 nM-1 mM) durante 18 h a 4°C.

Como controles del experimento se incubaron concentraciones crecientes de E₂ (1-500 nM) u ORG-2058 (1 nM-1 mM) radioinertes. La separación de la fracción unida de la libre se llevó al cabo por la adición de una suspensión de carbón-dextrán (250 mg carbón activado y 25 mg de Dextrán T-70 disueltos en 100 ml de buffer TEDM), agitando durante 5 min y posteriormente centrifugando 10 min a 3000 rpm. Después de la centrifugación, se tomaron alícuotas del sobrenadante para determinar el contenido de radiactividad en un espectrómetro de centelleo líquido Packard Tri Carb modelo 1900TR con una eficiencia del 69 % y se usó Instagel® como solución de centelleo. Los resultados se expresaron como el porcentaje de unión al RE tomando la unión del E₂ tritiado como 100 por ciento.

La afinidad relativa de unión (ARU) de prolame, butolame y pentolame se calculó a partir de la constante de inhibición al cincuenta por ciento (K_i) de cada compuesto, considerando un valor de 100 para el estradiol (Cheng y Prusoff, 1973).

6.2.8 Análisis estadístico

La significancia estadística de las diferencias entre los grupos se estimó por análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias entre el grupo control y los grupos tratados se estimaron por los métodos de Dunnett, Tukey o t de Student apropiadas para cada caso en particular (Zar, 1984) Los resultados se consideraron significativos cuando el valor de p fue menor a 0.05. Todos los experimentos se realizaron por lo menos 3 veces. Los resultados se expresaron como el promedio \pm el error estándar de la media (EE).

6.2.9 Determinación de las dosis efectivas e inhibitorias al cincuenta por ciento

Las dosis efectivas cincuenta (DE_{50}) y las dosis inhibitorias cincuenta (DI_{50}) se calcularon a partir de los datos de las curvas dosis-respuesta utilizando el programa Microcal® Origin® versión 4.1 (Copyright© 1991-1996 Microcal Software Inc.)

6.2.10 Correlación entre la potencia estrogénica y la longitud de la cadena amino-alcohol de los 17 β -aminoestrógenos

El análisis de correlación se realizó al graficar la potencia relativa de los 17 β -aminoestrógenos y el E₂ contra la longitud de la cadena amino-alcohol del carbono 17. Los coeficientes de correlación se obtuvieron mediante regresiones lineales utilizando el programa Microcal® Origin® versión 4.1 (Copyright© 1991-1996 Microcal Software Inc.)

7 RESULTADOS

7.1 Síntesis de los 17 β -aminoestrógenos: prolame, butolame y pentolame

Los aminoestrógenos prolame, butolame y pentolame sintetizados se purificaron por cristalización fraccionada y se caracterizaron por técnicas de cromatografía y espectroscopía. Mediante HPLC se estableció la pureza de estos aminoestrógenos obteniendo sus tiempos de retención (5 min) que fueron distintos de los de estrona (10 min) y estradiol (15 min) (Apéndice 9 1). El establecimiento de la linealidad de cada compuesto nos permitió establecer que su pureza fue mayor al 99 %. Con estos datos fue posible asegurar que los compuestos sintetizados se encontraban libres de impurezas que por su naturaleza química, pudieran interferir con nuestros resultados.

7.2 Constantes fisicoquímicas de prolame, butolame y pentolame obtenidas mediante espectroscopía de infrarrojo (IR), espectroscopía de resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas (EM)

Las constantes fisicoquímicas de prolame, butolame y pentolame así como sus características espectroscópicas de IR, RMN y EM, semejantes a las reportadas previamente, fueron las siguientes.

Prolame: 17 β -(3-hidroxi-1-propilamino)-1,3,5(10)-estrantrieno-3-ol

Rendimiento 96 % p f 198-200° C IR, ν_{\max} 3422 (OH), 3272 (NH), 1605 (anillo aromático) cm^{-1} RMN-H, δ 0 65 (s, C-18), 1 15-2 25 (m), 2 62 (t, C-19), 3 15 (s, OH), 3 42 (t, C-21), 6 45 (d, C-4 y C-2), 7 0 (d, C-1) EM m/z 329 (Apéndice 9 2-9.4)

Butolame: 17 β -(4-Hidroxi-1-butilamino)-1,3,5,(10)-estratrien-3-ol

Rendimiento: 95 % p.f. 147-148 °C. IR, ν_{\max} 3400-3240 (OH), 3180-3020 (NH), 1610 (anillo aromático) cm^{-1} . RMN-H, δ 0.75 (s, 3H, 18-CH₃), 1.17-2.31 (m), 2.63 (m, 2H,-OH y NH) 2.77 (m, 3H,-N-CH₂ y 17-CH), 3.57 (t, J=6.20 Hz, 2H, CH₂OH), 6.55 (d, J=2.7 Hz, 1H, H-4), 6.62 (dd, J=8.4 Hz y 2.7 Hz, 1H, H-2), 7.08 (d, J=8.4 Hz, 1H, H-1). EM m/z 343 (M⁺ 9.8%), 284 (12.5), 128 (100%). (Apéndice 9.5-9.7)

Pentolame: 17 β -(5-Hidroxi-1-pentilamino)-1,3,5,(10)-estratrien-3-ol

Rendimiento: 96 %. p.f. 164-165° C. IR, ν_{\max} 3400-3240 (OH y NH), 1605 (anillo aromático) cm^{-1} . RMN-H, δ 0.72 (s, 3H, 18-CH₃), 1.18-2.32 (m), 2.64 (m, 2H,-OH y NH) 2.78 (m, 3H,-N-CH₂ y 17-CH), 3.63 (t, J=6.40 Hz, 2H, CH₂OH), 6.57 (d, J=2.6 Hz, 1H, H-4), 6.64 (dd, J=8.5 Hz y 2.6 Hz, 1H, H-2), 7.11 (d, J=8.5 Hz, 1H, H-1). EM m/z 357 (M 18 %), 284 (29 %), 142 (100 %) (Apéndice 9.8-9.10)

7.3 Efecto de prolame, butolame, pentolame y estradiol sobre el tiempo de la coagulación sanguínea

El efecto de los aminoestrógenos y el E₂ sobre el tiempo de la coagulación sanguínea de la rata Wistar ovariectomizada se puede observar en la figura 3. Los resultados muestran que el prolame, butolame y pentolame tienen capacidad para incrementar el tiempo de la coagulación sanguínea en un 20 a 25 % con respecto al grupo control y este aumento es significativo ($p < 0.05$ vs vehículo, 100%). Sin embargo este efecto inicia a dosis diferentes para cada compuesto. Por otro lado el efecto que produjo el E₂ fue opuesto al presentado por los aminoestrógenos ya que disminuye el tiempo de la coagulación. Los efectos del E₂ con respecto al grupo control se presentaron de forma significativa ($p < 0.05$) a partir de la administración de las dosis de 10 μg y a dosis mayores puede observarse una disminución del tiempo de la coagulación hasta en un 30%

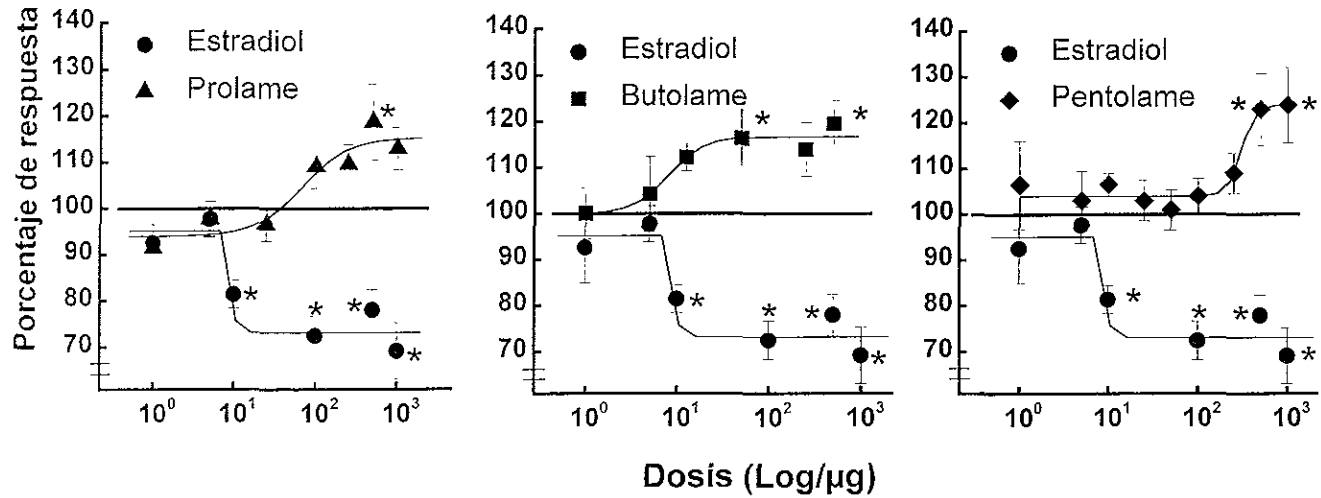


Figura 3. Curvas dosis-respuesta del efecto de los 17β-aminoestrógenos, proiame, butolame y pentolame y el estradiol sobre el tiempo de la coagulación sanguínea en ratas Wistar ovariectomizadas. Cada punto representa el promedio ± EE de 8-12 animales *p < 0.05 vs vehículo 100% (----)

7.4 Efecto uterotrófico de prolame, butolame y pentolame. Dosis efectiva media (DE₅₀) y potencia relativa

Los aminoestrógenos prolame, butolame y pentolame produjeron aumentos del peso del útero de ratas ovariectomizadas que fueron significativos ($p < 0.05$ vs vehículo) y dependientes de la dosis (fig 4).

Los 17 β -aminoestrógenos prolame y pentolame indujeron el crecimiento y la recuperación total del peso del útero. El efecto máximo de prolame se observa a la dosis de 25 μ g, mientras que en pentolame es de 500 μ g. Esto demuestra que estos compuestos son menos potentes que el estradiol, el cual alcanza su efecto máximo a la dosis de 5 μ g. El butolame es el aminoestrógeno que muestra una eficacia menor debido a que no logra la recuperación del peso del útero en su totalidad.

A partir de la dosis efectiva media (DE₅₀) se determinó la potencia relativa de cada aminoestrógeno evaluado con respecto al estradiol (Tabla 1). Los resultados indican que los aminoestrógenos exhiben una potencia estrogénica menor a la del estradiol, siendo el prolame el compuesto más potente de los tres aminoestrógenos evaluados, pero es aproximadamente 6 veces menos potente que el E₂. El gradiente de potencia estrogénica de los aminoestrógenos en sentido decreciente es prolame > butolame > pentolame

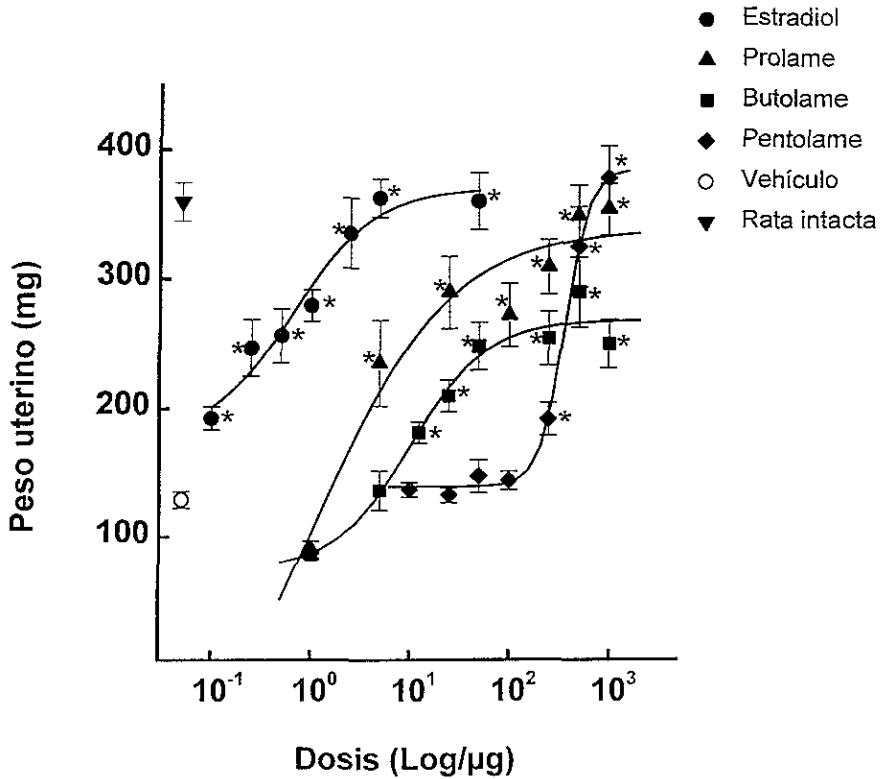


Figura 4. Curvas dosis-respuesta del efecto de los 17β-aminoestrógenos prolame, butolame y pentolame sobre el peso del útero de ratas Wistar ovariectomizadas. Cada punto representa el promedio ± EE de 8-12 animales. Como controles del experimento se utilizaron el estradiol, el vehículo y ratas intactas. *p<0.05 vs vehículo

Tabla 1. Dosis efectivas medias (DE_{50}) y potencia relativa de los 17β -aminoestrógenos en el útero de ratas Wistar ovariectomizadas

Esteroides	DE_{50} (μg)	Límites de confianza (95%)	Potencia relativa
Estradiol	0.66	0.4-0.9	100
Prolame	4.10	3.2-5.1	16
Butolame	17.1	15.8-19.6	4
Pentolame	420	410-430	0.15

7.5 Curso temporal del decaimiento del efecto de pentolame sobre el peso del útero

La figura 5 nos muestra el curso temporal del decaimiento del efecto de pentolame sobre el peso del útero de la rata ovariectomizada. Observamos que el efecto de las dos dosis de pentolame así como el del E_2 fue significativo (^a $p < 0.01$ vs vehículo) y se mantuvo durante 6 días después de la última administración. El comportamiento en la disminución del efecto uterotrófico de pentolame fue muy similar al que presentó el E_2 . Si comparamos el efecto de pentolame y el E_2 con respecto al peso del útero de las ratas intactas, observamos que al quinto día después de terminar el tratamiento existieron diferencias significativas (^b $p < 0.01$) en la disminución del efecto

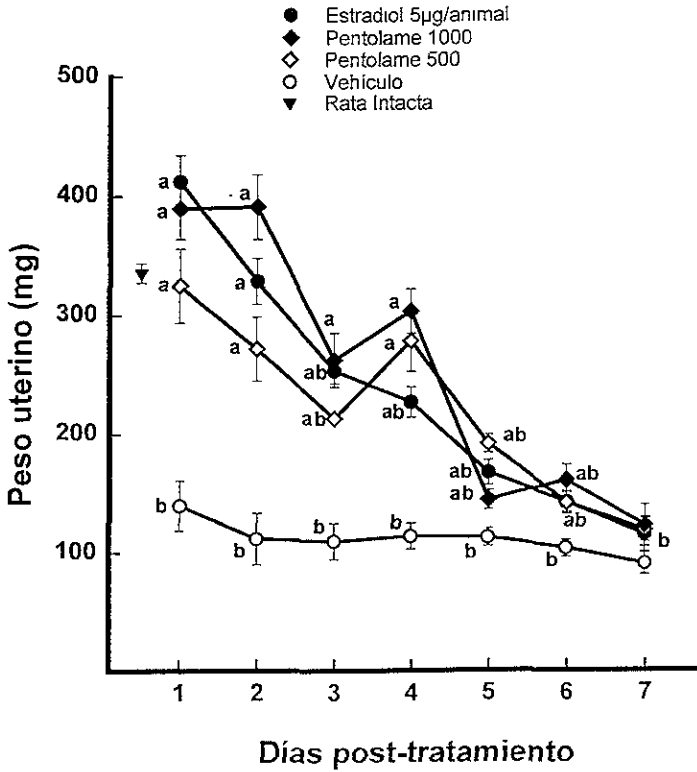


Figura 5 Curso temporal del decaimiento del efecto de pentolame en el útero de ratas Wistar ovariectomizadas. Cada punto representa el promedio de 8 animales \pm EE ^a $p < 0.01$ vs vehículo ^b $p < 0.01$ vs rata intacta

7.6 Efecto antigonadotrófico de prolame, butolame y pentolame. Dosis inhibitoria media (DI_{50}) y potencia relativa

El efecto de prolame, butolame y pentolame sobre las concentraciones séricas de la LH de la rata Wistar ovariectomizada se observa en la figura 6. Los tres aminoestrógenos señalados tuvieron la capacidad de disminuir las concentraciones de la LH en suero. Este efecto de los aminoestrógenos fue dependiente de la dosis administrada y significativo con respecto al grupo control ($p < 0.05$) a partir de la dosis de 25 μg del prolame, 50 μg para butolame y 500 μg en el caso de pentolame. Las dosis a las cuales los aminoestrógenos exhibieron un efecto antigonadotrófico fueron mayores que las de E_2 .

La capacidad de cada aminoestrógeno para inhibir las concentraciones de la LH en suero se determinó en base al efecto máximo producido por el estradiol y las concentraciones en suero de ratas intactas. Los tres compuestos evaluados redujeron las concentraciones circulantes de LH en la misma magnitud que el estradiol aunque como se observa se requirieron dosis mayores de los aminoestrógenos para obtener este efecto máximo.

Las DI_{50} y la potencia relativa de prolame, butolame y pentolame indican que los aminoestrógenos tuvieron una potencia estrogénica menor a la del E_2 y que existen diferencias importantes en la potencia relativa de cada uno de ellos (Tabla 2). El aminoestrógeno que exhibió la mayor potencia inhibitoria fue el prolame seguido de butolame y pentolame.

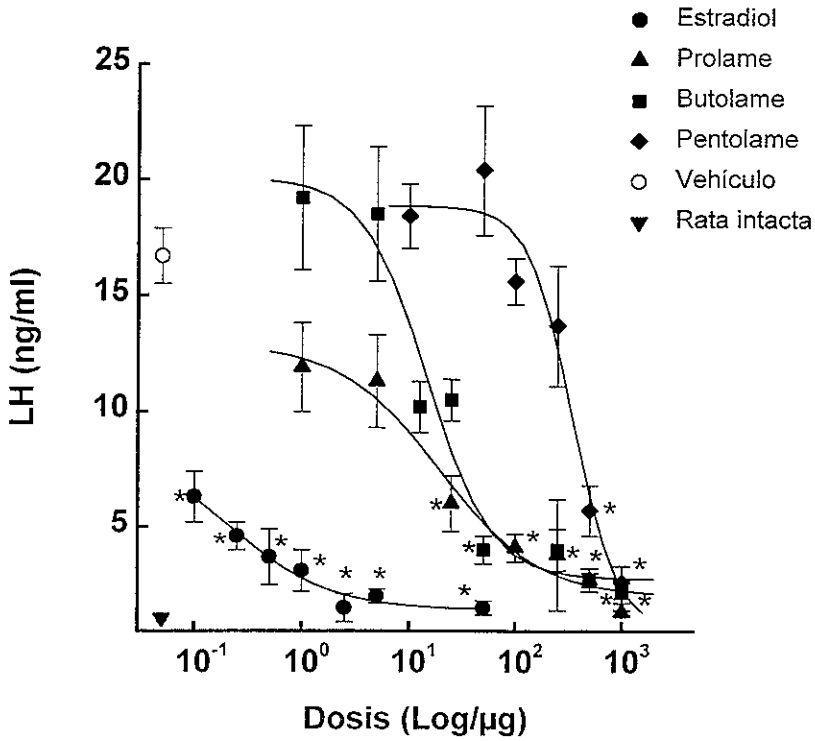


Figura 6. Curvas dosis-respuesta del efecto de los 17β-aminoestrógenos, prolame, butolame y pentolame sobre las concentraciones de LH en el suero de ratas Wistar ovariectomizadas. Cada punto representa el promedio ± EE de 8-12 animales. Como controles del experimento se utilizaron el estradiol, el vehículo y ratas intactas *p< 0.05 vs vehículo

Tabla 2. Dosis inhibitorias medias (DI_{50}) y potencia relativa de los 17 β -aminoestrógenos sobre las concentraciones circulantes de LH en ratas Wistar ovariectomizadas

Esteroide	DI_{50} (μg)	Límites de confianza (95%)	Potencia relativa
Estradiol	0.2	0.1-0.3	100
Prolame	8.1	7-9	2.6
Butolame	17	15-20	1.2
Pentolame	860	853-867	0.02

7.7 Curso temporal del decaimiento del efecto de pentolame sobre las concentraciones circulantes de LH

La figura 7 nos muestra el curso temporal del decaimiento del efecto de pentolame sobre las concentraciones de LH. El pentolame (500 y 1000 μ g) y el E_2 (5 μ g) mostraron un patrón en el curso temporal del efecto muy similar y en ambos casos significativamente diferentes del vehículo (^a $p < 0.01$). Este efecto se observó durante 4 días después de la última administración. En el quinto y sexto días post-tratamiento los niveles de LH se elevaron por encima de los valores obtenidos tanto en el grupo que recibió el vehículo como en el grupo de ratas intactas (^b $p < 0.01$). Al séptimo día después del tratamiento observamos que los niveles de LH son muy semejantes a los del grupo que recibió el vehículo.

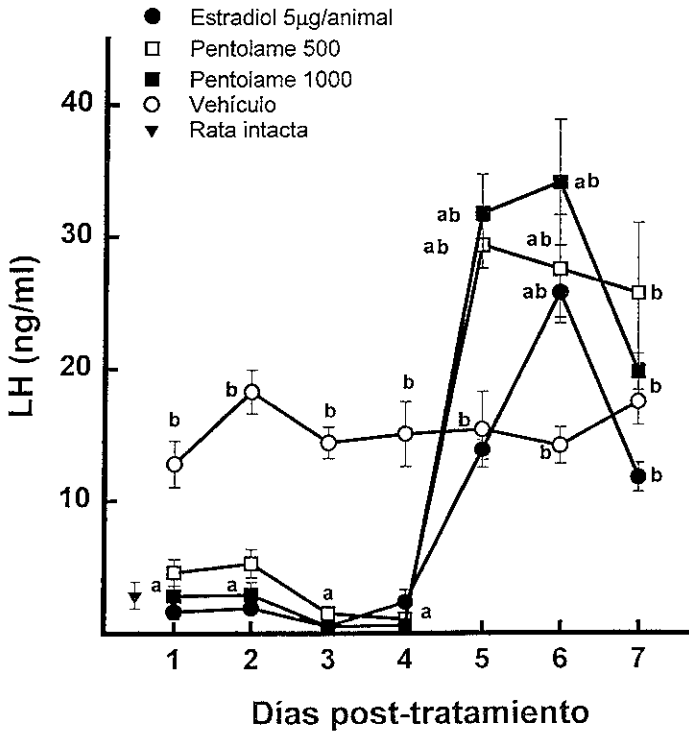


Figura 7 Curso temporal del decaimiento del efecto de pentolame sobre las concentraciones de LH en el suero de ratas Wistar ovariectomizadas. Cada punto representa el promedio \pm EE de 8 animales. ^ap<0.01 vs vehículo, ^bp<0.01 vs rata intacta.

7.8 Inducción del receptor intracelular de progesterona estrógeno-dependiente en la hipófisis anterior

El pentolame tuvo la capacidad de inducir la presencia de receptores de progesterona (RP) estrógeno-dependientes en la hipófisis anterior de ratas ovariectomizadas (fig 8A).

En la figura 8A y 8B, se aprecia un pico de radiactividad que denota la presencia del RP unido al ^3H -ORG2058 (ligando específico del receptor de progesterona). Este complejo receptor-radioligando presenta un coeficiente de sedimentación de 8 unidades Svedberg (S) igual al obtenido en el gradiente que corresponde al tratamiento con E_2 (fig 8B)

La figura 8C representa el gradiente del citosol de los animales que recibieron solo el vehículo y como puede apreciarse no aparece ninguna zona radiactiva. Los círculos blancos indican la unión específica del ORG-2058 por el RP que se observa como la abolición del pico de radiactividad

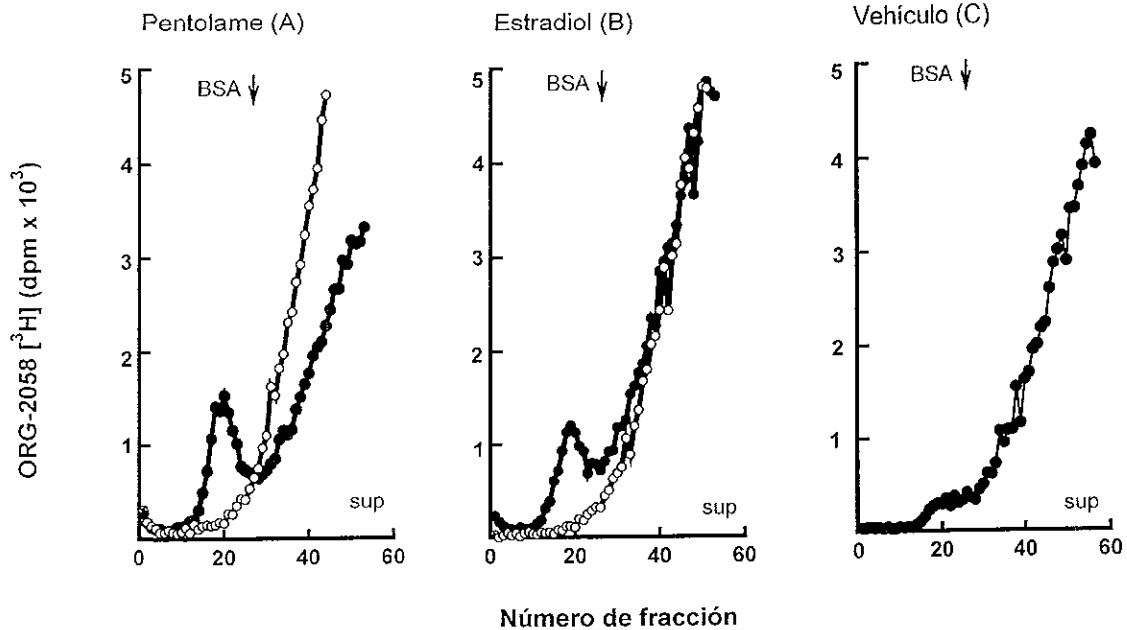


Figura 8. Inducción del RP estrógeno-dependiente en adenohipófisis de rata Wistar ovariectomizada después de la administración de 850 µg de pentolame ó 1 µg de estradiol (círculos cerrados). La unión específica se obtuvo al adicionar un exceso de 200x de ORG-2058 (círculos abiertos) en un gradiente en paralelo. El valor del coeficiente de sedimentación del complejo RP-ORG2058 se determinó a partir del valor del complejo ASB-ORG2058 que se indica con las flechas. n = 12. Sup = parte superior del gradiente.

7.9 Constantes de disociación (K_d) y número de sitios de unión (NSU) del receptor de progesterona

Las constantes fisicoquímicas del RP, K_d y NSU se obtuvieron por medio de un análisis de saturación y se calcularon a partir de gráficas al estilo de Scatchard (1949). Los valores de las constantes del RP inducidas por el pentolame fueron similares a las obtenidas con el E_2 (tabla 3). La administración durante dos días de la dosis efectiva media de pentolame (850 μg) y estradiol (1 μg) obtenidas en los experimentos sobre el peso uterino, fueron suficientes para inducir la presencia del RP. El NSU no varió al comparar 2 y 4 días de tratamiento (tabla 3).

Tabla 3. Constantes aparentes de disociación (K_d) y número de sitios de unión (NSU) del receptor de progesterona en la hipófisis anterior

Esteroides	Dosis administrada (μg)	Días de tratamiento	K_d (10^{-9} M)	NSU/mg proteína
Estradiol	1	2	5.2	0.16
Estradiol	1	4	3.5	0.12
Pentolame	850	2	5.1	0.17
Pentolame	850	4	4.9	0.14

7.10 Interacción de prolame, butolame y pentolame con el receptor intracelular específico de estrógenos. Afinidad relativa de unión (ARU) y constante de inhibición (K_i).

El análisis de competencia de los aminoestrógenos por el receptor específico de estrógenos, nos permitió establecer que estos compuestos tienen la capacidad para interactuar con el receptor intracelular específico de estrógenos (fig 9). Podemos apreciar que se requirieron concentraciones mayores de los aminoestrógenos que del E_2 para observar la interacción. Por otro lado cada aminoestrógeno requirió de una concentración diferente para competir con el estradiol tritinado por el receptor de estrógenos. El ORG-2058 es un control del experimento debido a que es una progestina sintética que no interactúa con el receptor específico de estrógenos.

Los valores de la afinidad relativa de unión (ARU) y la constante de inhibición (K_i) (tabla 4) muestran que prolame, butolame y pentolame tienen una afinidad menor por el receptor que la que presenta el E_2 .

La afinidad de los aminoestrógenos prolame y butolame fue muy semejante, mientras que el pentolame fue el aminoestrógeno que mostró la menor afinidad de los tres compuestos evaluados.

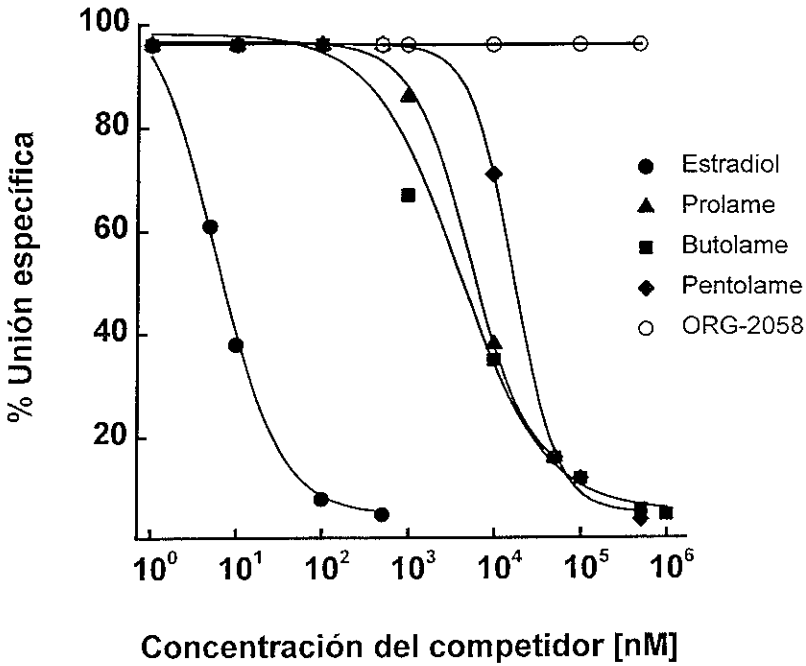


Figura 9 Interacción de los 17 β -aminoestrógenos prolame, butolame y pentolame con el receptor de estrógenos en el citosol del útero de ratas Wistar inmaduras

Tabla 4. Afinidad relativa de unión (ARU) y constantes de inhibición (Ki) de los 17 β -aminoestrógenos por el receptor de estradiol

Esteroides	ARU	Ki
Estradiol	100	5.2 (10⁻⁹ M)
Prolame	0.11	4.5 (10⁻⁶ M)
Butolame	0.14	3.5 (10⁻⁶ M)
Pentolame	0.03	16.0 (10⁻⁶ M)

7.11 Relación estructura química/actividad biológica

Los valores de las potencias relativas obtenidas de experimentos anteriores se emplearon para establecer una correlación entre la potencia estrogénica de los aminoestrógenos evaluados y la longitud de la cadena alquílica del grupo amino-alcohol.

Para obtener los coeficientes de correlación (R) se consideró que el estradiol no contiene cadena alquílica y se le asignó un valor de cero, mientras que para los aminoestrógenos el valor fue de 3 para prolame, 4 para butolame y 5 en el caso de pentolame. Estos valores se graficaron contra la potencia estrogénica de cada compuesto

En la figura 10 se utilizaron los valores de la potencia estrogénica de los aminoestrógenos y el E₂ para incrementar el peso del útero donde obtuvimos un coeficiente de correlación de 0.91

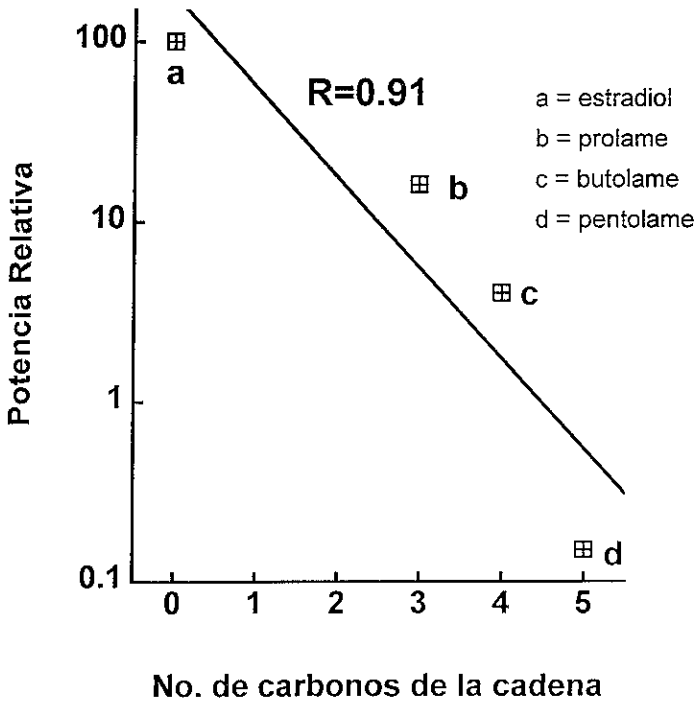


Figura 10 Relación estructura química-actividad estrogénica del prolame, butolame, pentolame y estradiol en el peso del útero de ratas Wistar ovariectomizadas

En la figura 11 se graficó el resultado de la potencia de estos compuestos para inhibir las concentraciones en suero de LH y el valor del coeficiente de correlación fue de 0.94.

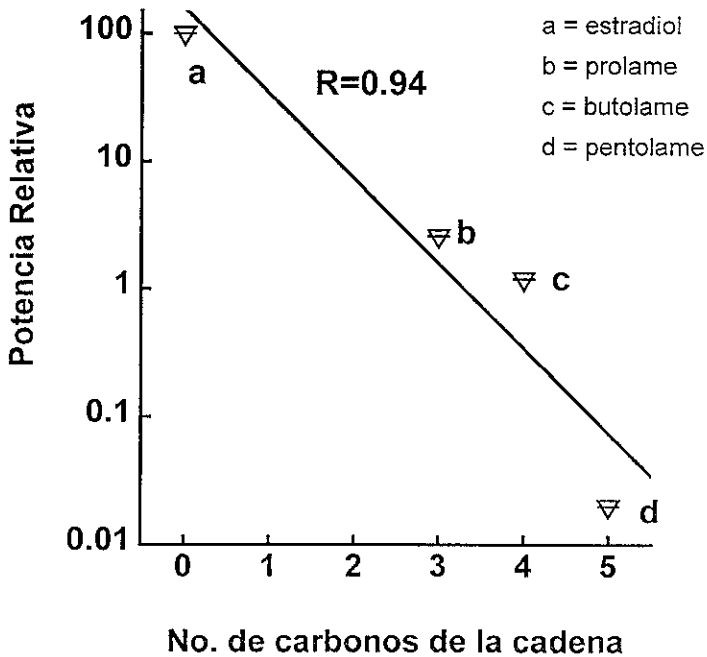


Figura 11. Relación estructura química-actividad estrogénica del prolame, butolame, pentolame y estradiol sobre las concentraciones de LH en suero de ratas Wistar ovariectomizadas

Recientemente nuestro grupo de investigación estableció un convenio de colaboración con la Universidad de Baylor en Houston Texas con el objetivo de evaluar la actividad estrogénica de los aminoestrógenos prolame, butolame y pentolame. Esta evaluación se hizo utilizando un sistema *in vitro* de células HeLa co-transfectadas con un vector de expresión para el receptor de estrógenos humano α ó β y un vector reportero (Cloramfenicol acetil transferasa, CAT) (Bagchi *et al.* 1992). Las potencias relativas obtenidas se graficaron y los coeficientes de correlación ($\alpha = 0.99$ y $\beta = 0.98$) indican que también en este sistema existe una relación directa entre la actividad biológica de cada aminoestrógeno y el número de carbonos que constituyen a la cadena del grupo amino-alcohol (fig 12 y 13).

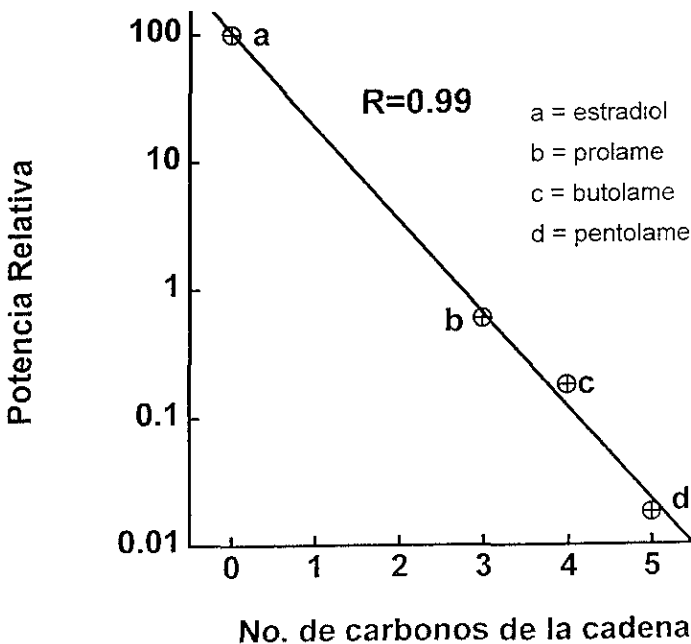


Figura 12 Relación estructura química-actividad estrogénica del prolame, butolame, pentolame y estradiol en células HeLa transfectadas con el receptor alfa de estrógenos

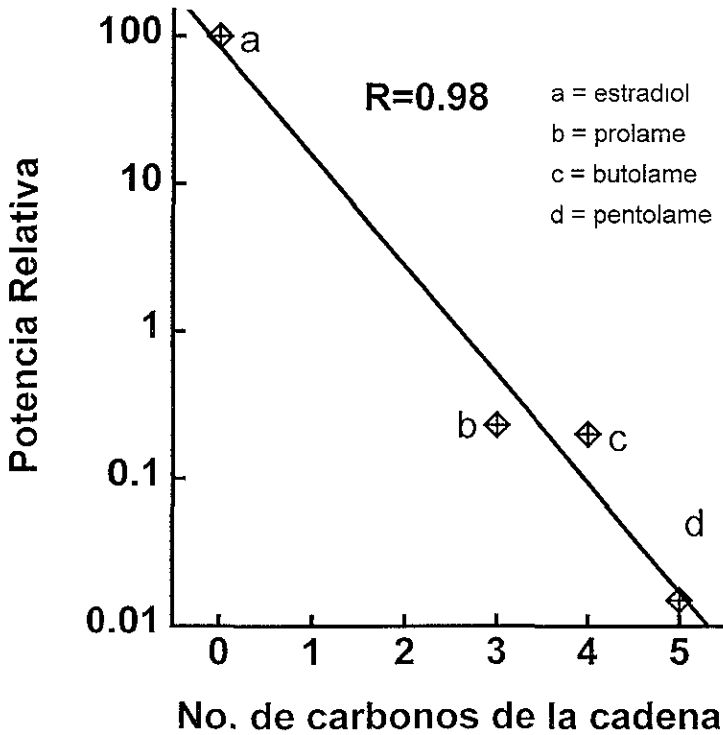


Figura 13. Relación estructura química-actividad estrogénica del prolame, butolame, pentolame y estradiol en células HeLa transfectadas con el receptor beta de estrógenos

7. DISCUSION

En el presente trabajo se realizó la evaluación de los efectos de los 17β -aminoestrógenos prolame, butolame y pentolame sobre el tiempo de la coagulación sanguínea y el sistema reproductor así como su interacción por el receptor intracelular específico de estrógenos en la rata Wistar ovariectomizada.

Los 17β -aminoestrógenos evaluados tienen la capacidad de incrementar en forma significativa el tiempo de la coagulación sanguínea en la rata. Estos resultados son similares a trabajos anteriores en donde la administración de 17β -aminoestrógenos a ratones y ratas macho resultó en un aumento importante del tiempo de la coagulación sanguínea (Rubio-Póo *et al.* 1985, 1990; Mandoki *et al.* 1991; Lemini *et al.* 1993). Por otra parte la administración del estradiol produjo un efecto procoagulante, hecho que confirma estudios anteriores acerca de que los estrógenos naturales o sintéticos pueden modificar el proceso hemostático a diferentes niveles en el roedor y en los mamíferos incluyendo al ser humano (Mammen, 1982). Los estrógenos interfieren en la síntesis de las proteínas que participan en el proceso de la coagulación y la fibrinólisis. Aumentan los niveles de factores dependientes de la vitamina K como el factor VII y VIII (Owens *et al.* 1986), elevan los niveles del fibrinógeno y el factor XII y disminuyen las concentraciones de antitrombina III (Gordon *et al.* 1980, Owens *et al.* 1986; Meade *et al.* 1990; Caine *et al.* 1992, Lee *et al.* 1993; Citarella *et al.* 1996, Mellahn *et al.* 1996).

El tiempo de la coagulación es un parámetro que nos indica la actividad de los factores que participan en la cascada de eventos hacia la formación del coagulo. Mediante los resultados obtenidos podemos sugerir que la participación

los 17 β -aminoestrógenos evaluados y el E₂ en estos eventos se llevan a cabo de manera distinta.

La adición del grupo amino-alcohol sobre el carbono 17 del hidrocarburo estrano juega un papel de importancia para poder observar el efecto en el tiempo de la coagulación y es probable que la longitud de la cadena de metilenos pueda tener influencia en la potencia anticoagulante de cada aminoestrógeno.

Las observaciones acerca del efecto de los 17 β -aminoestrógenos y el estradiol sobre el tiempo de coagulación y los antecedentes del efecto adverso de la administración de estrógenos (Auger y Mackie, 1988, Caine *et al.* 1992; Meade *et al.* 1990; Meilahn *et al.* 1996; Notelovitz *et al.* 1981; Psaty *et al.* 1993; Samsioe, 1994); nos motivaron a realizar la evaluación de la potencia estrogénica de los 17 β -aminoestrógenos dirigida al desarrollo de nuevos fármacos que pudieran utilizarse con fines terapéuticos, sin la posibilidad de producir efectos trombogénicos

La evaluación de la potencia estrogénica del prolame, butolame y pentolame se realizó *in vivo* e *in vitro* en ratas Wistar ovariectomizadas. Estos marcadores biológicos incluyeron el efecto sobre el sistema reproductor a nivel periférico (incremento del peso del útero), la inhibición de la LH y la inducción del receptor de progesterona en la hipófisis anterior, así como la determinación de la afinidad de unión de este grupo de compuestos por el receptor intracelular de estrógenos.

El útero es un órgano blanco para las hormonas estrogénicas debido a que contiene los receptores específicos que permiten la transcripción de genes que regulan el crecimiento y diferenciación de las diferentes células que componen el tejido del útero (miometrio, endometrio, epitelio luminal, etc).

(Astwood, 1938; Eriksson *et al.* 1978; Grunert *et al.* 1984; Branham *et al.* 1993). En ausencia de hormonas estrogénicas el útero inicia un proceso de adelgazamiento y atrofia que puede revertirse por la administración exógena de compuestos que poseen actividad estrogénica (Evans, 1941; Branham *et al.* 1993).

En nuestros resultados observamos que los 17 β -aminoestrógenos prolame, butolame y pentolame, poseen actividad estrogénica al restaurar el peso del útero de las ratas ovariectomizadas. La potencia de este efecto es menor a la del estradiol, hecho que concuerda con resultados previos donde utilizaron el indicador de cornificación vaginal como marcador biológico de actividad estrogénica (Rubio-Póo *et al.* 1985,1990; Lemini *et al.* 1993). Al parecer la sustitución del grupo alcohol del carbono 17 por el grupo aminoalcohol disminuye la potencia estrogénica. También observamos que existen diferencias en la potencia de cada aminoestrógeno que guarda una relación inversa en función a la longitud de la cadena de metilenos del grupo aminoalcohol.

Los estrógenos actúan a nivel de sistema nervioso central mediante mecanismos de retroalimentación positivos o negativos que permiten entre otras cosas el control de su biosíntesis, la biosíntesis de cierto tipo de receptores y la estimulación de la síntesis y la liberación o la inhibición de ciertas hormonas protéicas como la hormona luteinizante (LH) y la hormona folículo estimulante (FSH) (Gower, 1988; Mc Donnell *et al.* 1993)

Las hormonas tróficas como la LH se biosintetizan en los gonadotrofos de la hipófisis anterior y es el estradiol junto con otras moléculas la hormona que estimula o inhibe la liberación de la LH dependiendo de las concentraciones de estradiol que se encuentran en el torrente circulatorio. Si los niveles de estrógenos son muy bajos se estimula la liberación de la LH, por el contrario

cuando los niveles de estrógenos se encuentran elevados se activan los mecanismos de inhibición de la liberación de LH (Rebar *et al.* 1995).

Las concentraciones en suero de la LH pueden detectarse mediante radioinmunoanálisis (Midgley, 1966; Thorell y Larson, 1978) y cuantificarse en forma indirecta el efecto de un fármaco con propiedades estrogénicas que esté actuando a nivel del eje hipotálamo-hipófisis-gónada.

Los aminoestrógenos prolame, butolame y pentolame inhiben las concentraciones en suero de la LH en la rata ovariectomizada. Esto sugiere que estos compuestos actúan en el hipotálamo y en la hipófisis de manera similar al estradiol. Por otra parte encontramos que la potencia estrogénica de esta clase de compuestos es menor a la del estradiol, lo cual indica que estos compuestos actúan como agonistas parciales a nivel periférico (tejido uterino), sobre la adenohipófisis o en el eje hipotálamo-hipófisis. De igual manera existe la misma relación inversa entre la potencia estrogénica y la longitud de la cadena del grupo amino-alcohol, donde el prolame es el compuesto con mayor actividad estrogénica, seguido por el butolame y el pentolame.

El curso temporal del efecto nos permite evaluar diferencias en el efecto de un fármaco a través del tiempo y predecir parámetros farmacocinéticos tales como el efecto máximo, el tiempo de vida media y la depuración metabólica. En este trabajo se muestran los cursos temporales del decaimiento de los efectos de pentolame y estradiol en el peso del útero y sobre las concentraciones en suero de la LH. El patrón de la desaparición del efecto es muy similar entre el pentolame y el estradiol en ambos experimentos (peso del útero y concentraciones de LH).

En los cursos temporales del decaimiento del efecto del pentolame y el estradiol sobre el peso del útero, se observó una disminución progresiva continúa hasta el sexto día posterior a la última administración.

Los patrones de los cursos temporales del decaimiento del efecto de pentolame y estradiol sobre las concentraciones en suero de la LH son diferentes a los observados en el peso del útero. Sin embargo ambos compuestos muestran similitudes de comportamiento. El efecto máximo se observa cuatro días después de la última administración, mientras que en el quinto día observamos un incremento significativo de las concentraciones de LH. Este incremento puede estar mediado a través del mecanismo de retroalimentación que ejercen los estrógenos a nivel de la hipófisis en donde podría existir una acumulación de LH que se libera después del cuarto día, cuando las concentraciones de pentolame o estradiol disminuyen.

Por otro lado la disminución del efecto estrogénico de pentolame y estradiol son muy similares pudiéndose interpretar que sus valores en los tiempos de vida media y en la depuración metabólica son muy semejantes.

Los estrógenos intervienen de manera selectiva en la biosíntesis de ciertas proteínas como es el caso del receptor de progesterona estrógeno-dependiente en la hipófisis anterior (MacLusky y McEwen, 1978, 1980). Así la administración de pentolame en la rata ovariectomizada indujo la presencia de una proteína en la hipófisis y de acuerdo a sus propiedades de unión con el ORG-2058 y sus constantes fisicoquímicas (K_d y NSU) se estableció la autenticidad del receptor específico de progesterona. Si consideramos que el pentolame es el aminoestrógeno con menor potencia estrogénica que prolame y

butolame podemos suponer que la administración de prolame o butolame podría inducir esta misma respuesta.

Los resultados del efecto estrogénico de los aminoestrógenos prolame, butolame y pentolame sobre el sistema reproductor de ratas ovariectomizadas nos permitieron concluir que estos compuestos se comportan como agonistas parciales, sin embargo, estos efectos pudieran deberse a la biotransformación de los mismos (McGregor y Jordan, 1998). Por esta razón fue necesario utilizar un sistema que nos permitiera determinar si los aminoestrógenos podrían interactuar con receptores específicos de estrógenos (Stancel *et al.* 1973). Mediante el análisis por competencia por el receptor intracelular de estrógenos pudimos demostrar que los aminoestrógenos prolame, butolame y pentolame tienen afinidad por el receptor intracelular de estrógenos aunque esta afinidad es mucho menor que la del estradiol, resultado que concuerda con la potencia estrogénica que se obtuvo en los experimentos anteriores con respecto al estradiol. La afinidad relativa de unión de prolame y butolame es muy semejante, mientras que el pentolame es el aminoestrógeno que muestra la menor afinidad, lo cual se correlaciona con los efectos biológicos descritos anteriormente sobre el sistema reproductor.

Existe una relación inversa entre la longitud de la cadena intermedia de metilenos del grupo amino-alcohol y la potencia estrogénica de los aminoestrógenos. Esta relación es consistente en los distintos experimentos tanto *in vivo* como *in vitro* realizados para determinar actividad estrogénica. El valor de los coeficientes de correlación indica que un aumento en el número de metilenos de la cadena del grupo amino-alcohol disminuye en forma importante la potencia estrogénica.

En este trabajo pudimos observar que la sustitución del hidroxilo en el carbono 17 por un grupo amino sustituido, modifica la actividad estrogénica y confiere así mismo otra actividad biológica. Los resultados presentes no nos permiten ofrecer una posible explicación del mecanismo de acción por el cual los 17 β -aminoestrógenos actúan como agonistas parciales en los órganos reproductivos y de manera opuesta a los estrógenos a nivel del sistema de la coagulación. Sin embargo existen trabajos recientes que sugieren una acción tejido-selectiva de algunos compuestos como el tamoxifen (trifeniletileno) o el raloxifen (benzotiofeno). Estos compuestos ejercen efectos de tipo agonista en algunos tejidos (útero o sistema óseo) y efectos antagonísticos en otros (glándula mamaria) (Jordan *et al.* 1985; Bryant y Dere, 1998, Walsh *et al.* 1998).

Posiblemente nuestros resultados podrían relacionarse con la existencia de más de una forma de acción hormonal, que pudieran estar determinadas por cambios conformacionales, biotransformación del ligando (McDonnell *et al.* 1995; MacGregor y Jordan, 1998), la presencia de factores de transcripción tejido-específicos, coactivadores o correpresores (Shughrue *et al.* 1996, 1998; Katzenellenbogen *et al.* 1996; Grohé *et al.* 1998) y diferentes tipos o subtipos de receptores (Kuiper *et al.* 1996; Mosselman *et al.* 1996, Chu y Fuller, 1997, Paech *et al.* 1997; Saunders *et al.* 1997; Maruyama *et al.* 1998); entre otras

Los resultados expuestos anteriormente nos plantean la posibilidad de diseñar fármacos con propiedades tejido-selectivas, con potencial terapéutico en el humano

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
INSTITUTO DE QUÍMICA

8. CONCLUSIONES

- ❖ Los 17 β -aminoestrógenos prolame, butolame y pentolame producen efectos opuestos al estradiol sobre el tiempo de la coagulación sanguínea de la rata ovariectomizada
- ❖ Los 17 β -aminoestrógenos prolame, butolame y pentolame ejercen efectos de tipo estrogénico en la rata ovariectomizada a nivel periférico debido a que incrementan el peso del útero
- ❖ Los 17 β -aminoestrógenos prolame, butolame y pentolame actúan sobre el eje hipotálamo-hipófisis ya que inhiben las concentraciones séricas de la LH en la rata ovariectomizada.
- ❖ Las observaciones obtenidas señalan que estos compuestos son capaces de inducir la presencia del receptor de progesterona estrógeno-dependiente en la hipófisis anterior.
- ❖ Los 17 β -aminoestrógenos prolame, butolame y pentolame tienen la capacidad de interactuar *in vitro* con receptores específicos de estrógenos.
- ❖ Existe una relación inversa entre la potencia estrogénica de los 17 β -aminoestrógenos prolame, butolame y pentolame y el número de carbonos de la cadena intermedia del grupo amino-alcohol en el carbono 17.
- ❖ Los 17 β -aminoestrógenos prolame, butolame y pentolame exhiben efectos de tipo estrogénico. Sin embargo su potencia estrogénica es menor a la del E₂

10. BIBLIOGRAFIA

- ❖ Astwood EB. (1938). A six hour assay for the quantitative determination of estrogen. *Endocrinology* **23** 25-31.
- ❖ Auger JM, Mackie JM. (1988) Effects of tamoxifen on blood coagulation. *Cancer*. **61**:1316-1319.
- ❖ Bagchi MK, Tsai MJ, O'Malley BW, Tsai SY. (1992) Analysis of the mechanism of steroid receptor-dependent gene activation in cell free systems *Endo Rev.* **13** 525-535.
- ❖ Barret-Connor E, Bush TL. (1991). Estrogen and coronary heart disease in women *JAMA*. **265**:1861-1867.
- ❖ Bennet JP, Vickery BH. (1970) Rats and mice En: Reproduction and breeding techniques for laboratory animals (E.S E. Hafez, De.), Chap 17 pp299-316. Lea and Febiger, Philadelphia
- ❖ Böttiger LE, Boman G, Eklund G, Westerholm B. (1980) Oral contraceptives and thromboembolic disease: effects of lowering oestrogen content. *Lancet* **24** 1097-1101
- ❖ Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding *Analyt Biochem*. **72**:248-254
- ❖ Branham WS, Zehr DR, Sheehan DM. (1993) Differential sensitivity of rat uterine growth and epithelium hypertrophy to estrogens and antiestrogens *PSEBM* **203**:297-303.
- ❖ Breckwoldt M, Keck C, Karck U. (1995). Benefits and risks of hormone replacement therapy (HRT). *J Steroid Biochem Molec Biol* **53**(1-6):205-208.
- ❖ Bryant HU, Dere WH. (1998). Selective estrogen receptor modulators: an alternative to hormone replacement therapy. *PSEBM* **217** 45-52.
- ❖ Caine YG, Bauer KA, Barzegar S, Cate HT, Sacks FM, Walsh BW, Schiff I, Rosenberg RD. (1992). Coagulation activation following estrogen administration to postmenopausal women *Thromb Haemostas.* **68**(4).392-395.
- ❖ Carson-Jurica MA, Shrader WT, O'Malley BW (1990) Steroid receptor family structure and functions *Endo Rev* **11**(2):201-220
- ❖ Citarella F, Misiti S, Felici A, Farsetti A, Pontecorvi A, Fantoni A (1996) Estrogen induction and contact phase activation of human factor XII *Steroids* **61** 270-276

- ❖ Chae CU, Ridker PM, Manson JE. (1997) Postmenopausal hormone replacement therapy and cardiovascular disease. *Thromb Haemostas.* **78**(1):770-780.
- ❖ Chávez BA, Vilchis F, Pérez AE, García GA, Grillasca I, Pérez-Palacios G. (1985) Stereospecificity of the intracellular binding of norethisterone and its A-ring reduced metabolites *J Steroid Biochem.* **22**(1):121-126.
- ❖ Cheng YC, Prusoff WH. (1973). Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmac.* **22**:3099-3108.
- ❖ Chu S, Fuller PJ. (1997). Identification of a splice variant of the rat estrogen receptor β gene. *Mol Cel Endo.* **132**:195-199.
- ❖ De la Peña A, Baños G, Izaguirre R, Mandoki JJ, Fernández-G JM. (1993). Comparative effect of synthetic aminoestrogens with estradiol on platelet aggregation. *Steroids* **58**:407-409.
- ❖ De la Peña A, Baños G, Izaguirre R, Tobón-Cervantes A, Fernández-G JM. (1994). Comparative effect of three synthetic alkanol-amino-estrogens, etolame, butolame and pentolame on platelet aggregation. *Med Sci Res.* **22**:119.120.
- ❖ Devor M, Barret-Connor E, Renvall M, Feigal D, Ramsdell J. (1992). Estrogen replacement therapy and the risk of venous thrombosis. *Am J Med* **92**:275-282.
- ❖ Emms H, Lewis GP. (1985) Sex and hormonal influences on platelet sensitivity and coagulation in the rat *Br J Pharmac.* **86**:557-563.
- ❖ Erickson GF, Schreiber JR. (1995). Morphology and physiology of the ovary En. Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism (2nd Ed) Rebar WR (Ed) J B Lippincott Company, Philadelphia Pp 852-867.
- ❖ Eriksson H, Upchurch S, Hardin JW, Peck Jr EJ, Clark JH. (1978). Heterogeneity of estrogen receptors in the cytosol and nuclear fractions of the rat uterus *Biochem Biophys Res Commun* **81**(1).1-7
- ❖ Evans JS, Varney RF, Koch FC (1941). The mouse uterine weight method for the assay of estrogens *Endocrinology* **28** 747-757
- ❖ Evans RM (1988) The steroid and thyroid hormone receptor superfamily *Science* **240**:889-895
- ❖ Farhat MY, Lavigne MC, Ramwell PW (1996). The vascular protective effects of estrogen. *FASEB J* **10**.615-624

- ❖ Farsetti A, Misiti S, Citarella F, Felici A, Andreoli M, Fantoni A, Sacchi, Pontecorvi A (1995). Molecular basis of estrogen regulation of Hageman factor XII gene expression *Endocrinology* **136** (11):5076-5083.
- ❖ Fernández-G JM, Rubio-Arroyo MF, Soriano-García M, Toscano RA, Pérez-César MC, Rubio-Póo C, Mandoki JJ, de la Peña A, Lemini C, Mendoza-Patiño N, Cruz F. (1985). Synthesis and molecular structure of prolame, N-(3-hydroxy-1,3,5 (10)-estratrien-17 β -yl)-3-hydroxypropylamine, an amino-estrogen with prolonged anticoagulant and brief estrogenic effects. *Steroids* **45**(2):151-157.
- ❖ Gerstman BB, Piper JM, Freiman JP, Tomita DK, Kennedy DL, Ferguson WJ, Bennett RC. (1990). Oral contraceptive oestrogen and progestin potencies and the incidence of deep venous thromboembolism. *Int J Epidemiol.* **19**(4):931-936.
- ❖ Gordon EM, Ratnoff OD, Saito H, Donaldson VH, Pensky J, Jones PK. (1980). Rapid fibrinolysis, augmented Hageman factor (factor XII) titers, and decreased C1 esterase inhibitor titers in women taking oral contraceptives. *J Lab Clin Med.* **96** (5):762-769.
- ❖ Gorski J, Gannon F. (1976). Current models of steroid hormone action: a critique *Annu Rev Biochem.* **28**:425
- ❖ Gower DB. (1988) The biosynthesis of steroid hormones: an up-date. En: Hormones and their Actions. Part 1. BA Cooke, RJB King and HJ van der Molen (Eds). Elsevier Science Publishers BV (Biomedical Division) pp 3-28
- ❖ Grohé C, Kahlert S, Lobbert K, Vetter H. (1998). Expression of oestrogen receptor α and β in rat heart: role of local oestrogen synthesis. *J Endo* **156**:R1-R7
- ❖ Gruchow HW, Anderson AJ, Barboriak JJ, Sobocinsky KA. (1988). Postmenopausal use of estrogen and occlusion of coronary arteries. *Am Heart J* **115**:954-963
- ❖ Henderson BE, Ross RK, Paganini-Hill A. (1985). Estrogen use and cardiovascular disease *J Rep Med.* **30** (10):814-820
- ❖ Henderson BE, Ross RK, Paganini-Hill A. (1998) Estrogen replacement therapy and protection from acute myocardial infarction *Am J Obstet Gynecol.* **159** 312-317.
- ❖ Henriksson P (1991) Estrogen in patients with prostatic cancer *Drug Safety.* **6**(1):47-53.
- ❖ Ing NH, O'Malley BW (1995) The steroid hormone receptor superfamily molecular mechanisms of action En Molecular endocrinology: basic concepts and clinical correlations Weintraub BD (Ed) Raven Press, Ltd NY pp 195-215
- ❖ Jordan VC, Mittal S, Gosden B, Koch R, Lieberman ME (1985) Structure-activity relationships of estrogens *Env Health Persp* **61** 97-110

- ❖ Kalin MF, Zumoff B (1990) Sex hormones and coronary disease: a review of the clinical studies. *Steroids* **55**, 330-352.
- ❖ Katzenellenbogen BS (1980). Dynamics of steroid hormone receptor action. *Annu Rev Physiol.* **42**:17-35.
- ❖ Katzenellenbogen JA, O'Malley BW, Katzenellenbogen BS. (1996). Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: Interaction with multiple effector sites as a basis for the cell- and promoter-specific action of these hormones. *Mol Endo.* **10** (2):119-131.
- ❖ Kontturi M. (1991). Metabolic side-effects of estrogen therapy for prostatic cancer. *Scand J Urol Nephrol Suppl.* **138**:127-130.
- ❖ Kouvonen I, Petterson K, Lovgren T. (1978) Amido black 10 b-stained bovine serum albumin (BSA) in density gradient centrifugation. *Analyt Biochem.* **89**:306-308
- ❖ Kuiper JM, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson J-A. (1996) Cloning of a novel estrogen receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Sci USA* **93**:5925-5930.
- ❖ Lee AJ, Lowe GDO, Smith WCS, Tunstall-Pedoe H. (1993). Plasma fibrinogen in women: relationships with oral contraception, the menopause and hormone replacement therapy. *Brit J Haematol.* **83**:616-621
- ❖ Lemini C, Rubio-Poó C, Silva G, García-Mondragón J, Zavala E, Mendoza-Patiño N, Castro D, Cruz-Almanza R, Mandoki JJ. (1993) Anticoagulant and estrogenic effects of two new 17 β -aminoestrogens, butolame [17 β -(4-hydroxy-1-butylamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol] and pentolame [17 β -(5-hydroxy-1-pentylamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol]. *Steroids* **58**:457-461.
- ❖ Lobo RA. (1991). Effects of hormonal replacement on lipids and lipoproteins in postmenopausal women. *J Clin Endo Metabol.* **73**(5):925-930
- ❖ MacGregor JI, Jordan VC. (1998) Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacol Rev* **50**(2):151-196
- ❖ MacLusky NJ, McEwen BS (1978) Oestrogen modulates progesterin receptor concentrations in some rat brain regions but not in others. *Nature* **274**:276-278
- ❖ MacLusky NJ, McEwen BS (1980) Progesterin receptors in rat brain: distribution and properties of cytoplasmic progesterin-binding sites. *Endocrinology* **106**(1):192-202
- ❖ Mammen EF (1982) Oral contraceptives and blood coagulation: a critical review. *Am J Obstet Gynecol* **142**:781-790

- ❖ Mandoki JJ, Zavala E, Silva G, Mendoza-Patiño N, Rubio-Poó C, Medina-Martínez S, Domínguez-Escoto P. (1983). The dual effects of estrogens on blood clotting time *Proc West Pharmacol Soc.* **26**:45-48
- ❖ Mandoki JJ, Rubio-Poó C, Lemini C, De la Peña A, Fernández-G JM, García-Mondragón J, Zavala E, Silva G, Mendoza-Patiño N (1991). The effects of five new 17 β -amino-estrogens, buame, endiame, etolame, picae, and procame on blood clotting time. *Proc West Pharmacol Soc.* **34**:99-106.
- ❖ Maruyama K, Endoh H, Sasaki-Iwaoka H, Kanou H, Shimaya E, Hashimoto S, Kato S, Kawashima H. (1998). A novel isoform of rat estrogen receptor beta with 18 amino acid insertion in the ligand binding domain as a putative dominant negative regulator of estrogen action. *Biochem Biophys Res Comm.* **246**:142-147
- ❖ Mc Donnell DP, Clevenger B, Dana S, Santiso-Mere D, Tzukerman MT, Gleeson MA. (1993). The mechanisms of action of steroid hormones: a new twist to an old tale. *J Clin Pharmacol.* **33**:1165-1172.
- ❖ Meade TW, Dyer S, Howarth DJ, Imeson JD, Strirling Y. (1990). Antithrombin III and procoagulant activity sex differences and effects of the menopause. *Br J Haematol.* **74**:77-81
- ❖ Meilahn EN, Cauley JA, Tracy RP, Macy EO, Gutai JP, Kuller LH. (1996). Association of sex hormones and adiposity with plasma levels of fibrinogen and PAI-1 in postmenopausal women. *Am J Epidemiol.* **143** (2): 159-166
- ❖ Midgley AR. (1966). Radioimmunoassay: A method for human chorionic gonadotropin and human luteinizing hormone *Endocrinology* **79**:10-18
- ❖ Mosselman S, Polman J, Dijkema R. (1996). ER β : Identification and characterization of a novel human estrogen receptor *FEBS Letters* **392** 49-53
- ❖ Notelovitz M, Kitchens CS, Coone L, McKenzie L, Cater R. (1981). Low-dose oral contraceptive usage and coagulation *Am J Obstet Gynecol.* **141** 71-75.
- ❖ Owens MR, Cimino CD, Donnelly J. (1986) Measurements of rat plasma coagulation proteins during prolonged exposure to diethylstilbesterol *Throm Res.* **42** 343-354
- ❖ Paech K, Webb P, Kuiper G, Nilsson S, Gustafsson JA, Kushner PJ, Scanlan TS (1997) Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP1 sites *Science.* **277** 1508-1510
- ❖ Pérez-Palacios G, Vilchis F, Chavéz B, Larrea F, García GA, Arreola GA, Perez AE (1991) Una re-visita al mecanismo de acción de la noretisterona En Tópicos Selectos en Biología de la Reproducción (1a Edición) Miguel Angel Porrua (Ed) México D,F pp 350-390

- ❖ Perrot-Appianat M. (1996). Estrogen receptors in the cardiovascular system. *Steroids*. **61**:212-215.
- ❖ Psaty BM, Heckbert SR, Atkins D, Siscovick DS, Koepsell TD, Wahl PW, Longstreth WT Jr, Weiss NS, Wagner EH, Prentice R, Furberg CD. (1993). A review of the association of estrogens and progestins with cardiovascular disease in postmenopausal women. *Arch Intern Med* **153**:1421-1427.
- ❖ Rebar RW, Kenigsberg D, Hodgen GD (1995). The normal menstrual cycle and the control of ovulation. En: *Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism* (2nd Ed) Rebar WR (Ed) J.B Lippincott Company, Philadelphia. Pp 868-879.
- ❖ Reel JR, Lamb JC IV, Neal BH. (1996). Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. *Fundam Appl Toxicol*. **34**:288-305
- ❖ Rosenberg L, Palmer JR, Lesko SM, Shapiro S. (1990). Oral contraceptive use and the risk of myocardial infarction. *Am J Epidemiol*. **131**(6):1009-16.
- ❖ Rubio-Póo C, Mandoki JJ, Jayme V, Mendoza-Patiño N, Alvarado C, Silva G, Zavala E, Fernández-González JM, Rubio-Arroyo M (1983). Prodiame: a new estrogen with sustained anticoagulant effect *Proc West Pharmacol Soc*. **26**:111-113
- ❖ Rubio-Póo C, Mandoki JJ, Mendoza-Patiño N, Lemini C, De la Peña A, Cruz F, Zavala E, Silva G, García-Mondragón J, Fernández-G JM, Soriano-García M, Toscano AR. (1985). The anticoagulant effect of prolame, N-(3-hydroxy-1,3,5(10)estratrien-17 β -yl)-3-hydroxypropyl amine, a novel amino-estrogen. *Steroids* **45**(2):159-170.
- ❖ Rubio-Póo C, Lemini C, García-Mondragón J, de la Peña A, Jayme V, Mendoza-Patiño N, Zavala E, Silva G, Blickenstaff RT, Fernandez-G JM, Mandoki JJ. (1990) The anticoagulant effect of hexolame, N-(3-hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17 β -yl)-6-hydroxyhexylamine, another amino-estrogen with prolonged anticoagulant effect *Steroids* **55**:83-86.
- ❖ Samsioe G. (1994) Coagulation and anticoagulation effects of contraceptives steroids *Am J Obstet Gynecol*. **170** 1523-7
- ❖ Saunders PTK, Maguire SM, Gaughan J, Millar MR (1997) Expression of oestrogen receptor beta (ER β) in multiple rat tissues visualised by immunohistochemistry *J Endo* **154**:R13-R16
- ❖ Scatchard G (1949) The attractions of proteins for small molecules and ions *Ann NY Acad Sci*. **51** 660-672
- ❖ Shughrue PJ, Komm B, Merchenthaler I (1996) The distribution of estrogen receptor- β mRNA in the rat hypothalamus *Steroids* **61** 678-681

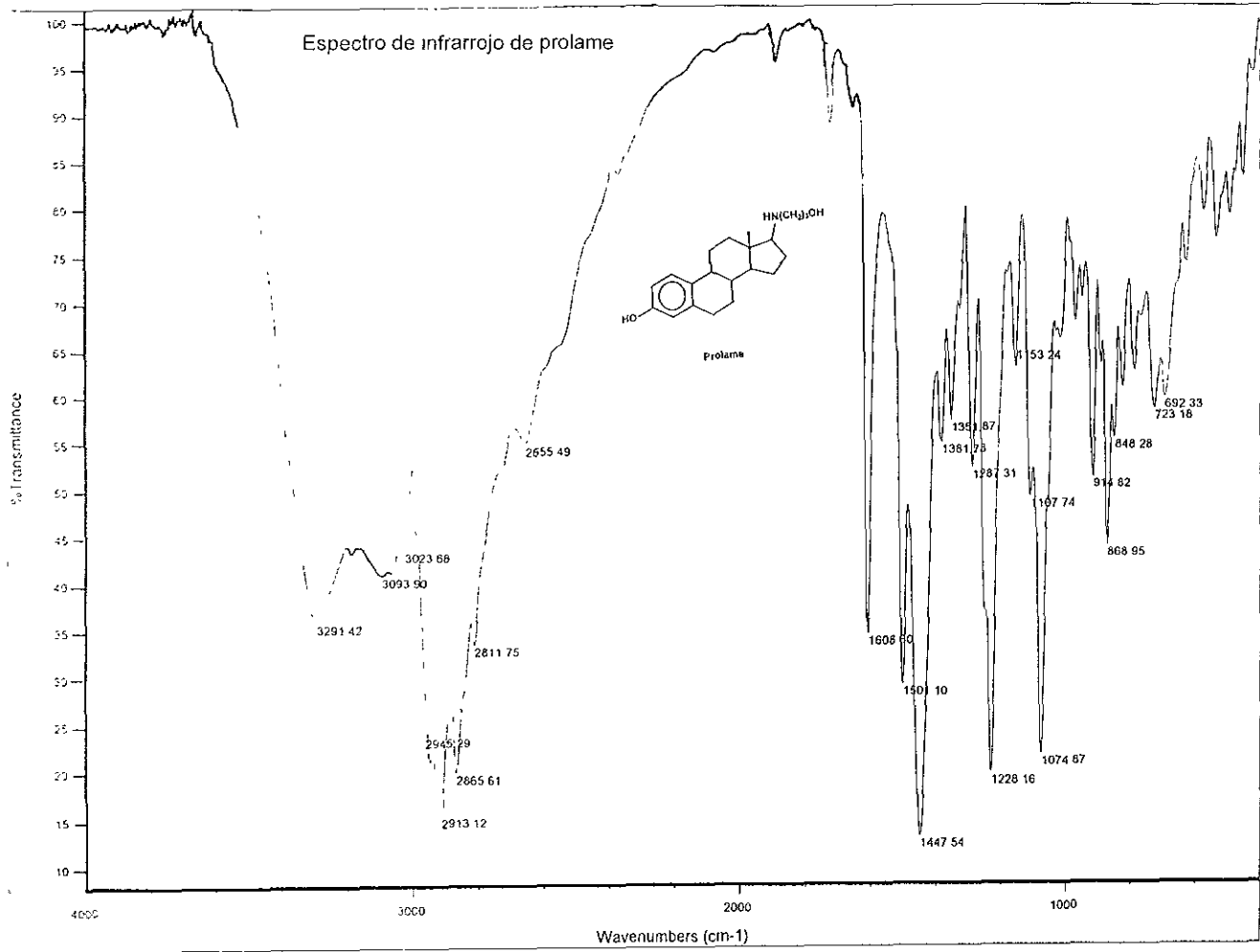
- ❖ Shughrue PJ, Lane MV, Scrimo PJ, Merchenthaler I (1998). Comparative distribution of estrogen receptor- α (ER- α) and β (ER- β) mRNA in the rat pituitary, gonad, and reproductive tract *Steroids* **63** 498-504.
- ❖ Skouby SO, Jespersen J (1990). Metabolic aspects of oral contraceptives of relevance for cardiovascular disease. *Advances in contraception* **6** Suppl:7-13
- ❖ Stamler J, Pick R, Katz LN, Pick A, Kaplan BM, Berkson DM, Century D (1963). Effectiveness of estrogens for therapy of myocardial infarction in middle-age men. *JAMA*. **183** (8).106-112.
- ❖ Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Manson JE, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. (1991). Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. *N Engl J Med*. **325**(11):756-62.
- ❖ Stancel GM, Tak Leung KM, Gorski J. (1973). Estrogen receptors in rat uterus Relationship between cytoplasmic and nuclear forms of the estrogen binding protein. *Biochem*. **12**(11): 2137-2141
- ❖ Tchernitchin A. (1979) The role of eosinophil receptors in the non-genomic response to oestrogens in the uterus. *J. Steroid Biochem*. **11**:417-424
- ❖ Thorell JI, Larson SM. (1978). Pituitary-gonadal axis. En *Radioimmunoassay and related techniques methodology and clinical applications*. The C V Mosby Company, St Louis. pp 137-163
- ❖ Vilchis F, Chávez B, Pérez AE, García GA, Angeles A, Pérez-Palacios G. (1986). Evidence that a non-aromatizable metabolite of norethisterone induces estrogen-dependent pituitary progesterin receptors. *J Steroid Biochem* **24**(2).525-531.
- ❖ Walsh BW, Kuller LH, Wild RA, Paul S, Farmer M, Lawrence JB, Shah AS, Anderson PW (1998) Effects of raloxifene on serum lipids and coagulation factors in healthy postmenopausal women *JAMA*. **279** 1445-1451.
- ❖ Wren BG. (1992) The effect of oestrogen on the female cardiovascular system. *Med J Aust*. **157**:204-208
- ❖ Zar JH. (1984). Multiple Comparisons. En *Biostatistical Analysis* (2a Ed.). B Kurts, (Ed). Prentice-Hall, International, Englewood Cliffs, N J pp 176-205.

11. APENDICE

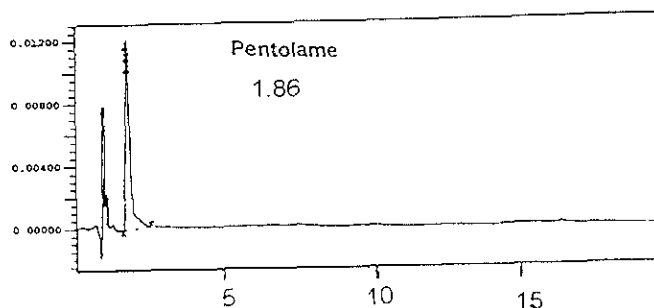
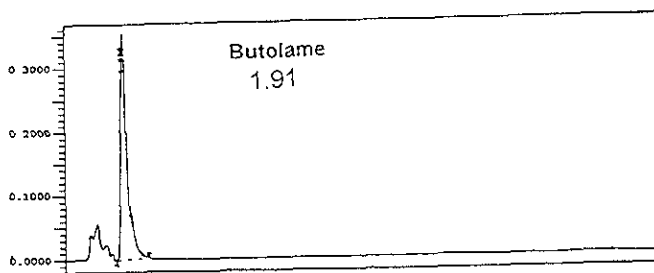
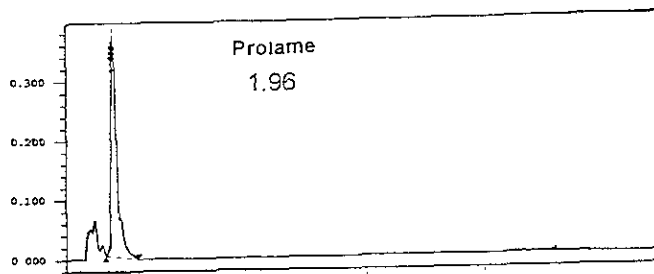
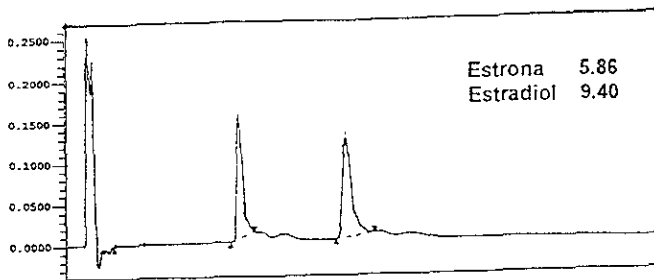
Cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC), espectros de absorción de infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear (RMN) y espectrometría de masas (EM) de los 17β -aminoestrógenos prolame, butolame y pentolame

- Cromatogramas de HPLC
- IR de prolame
- RMN de prolame
- EM de prolame
- IR de butolame
- RMN de butolame
- EM de butolame
- IR de pentolame
- RMN de pentolame
- EM de pentolame

Espectro de infrarrojo de prolame



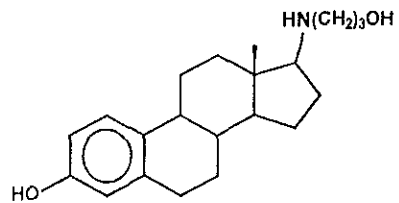
Absorbancia



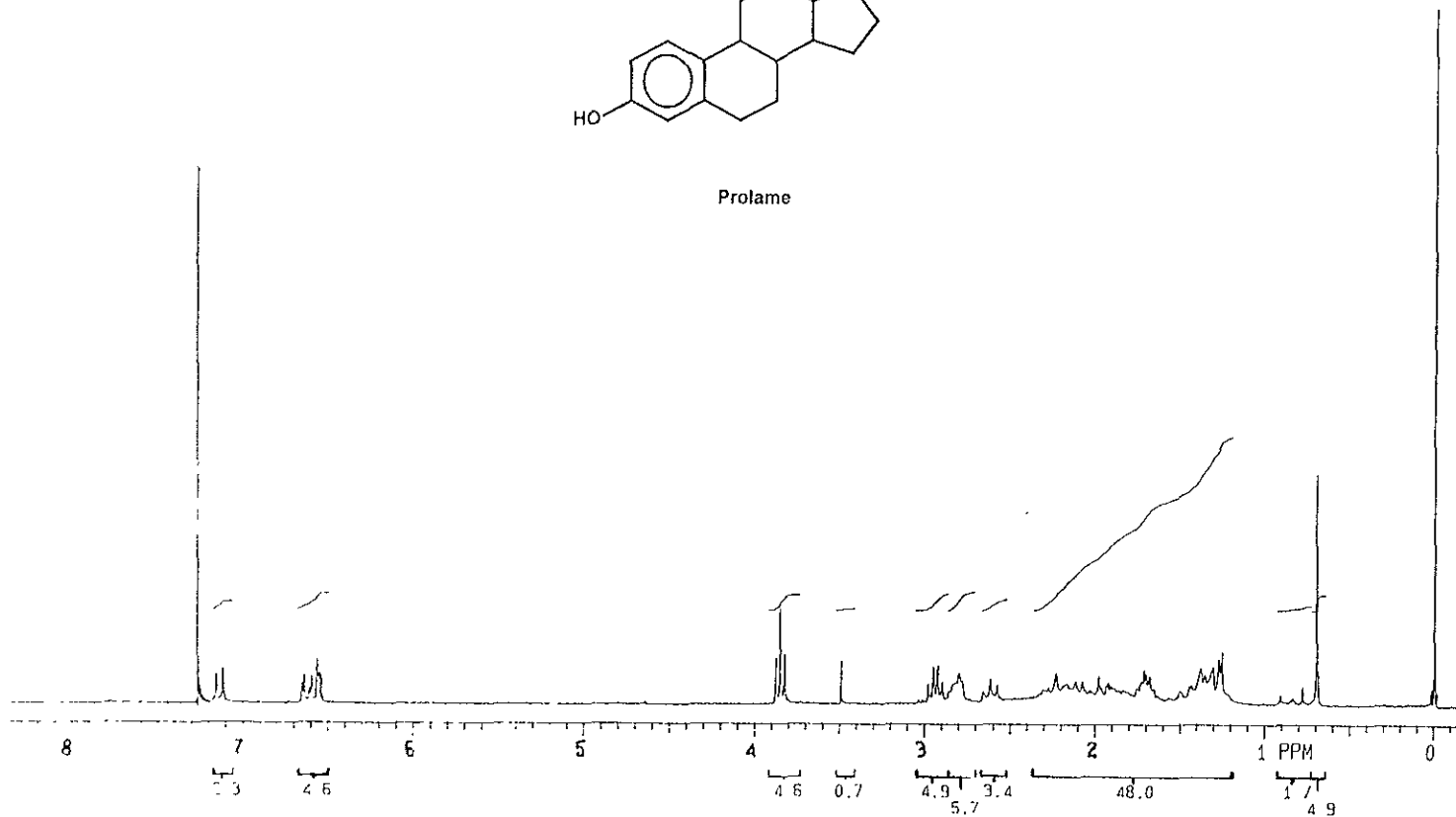
Minutos

Cromatogramas de HPLC

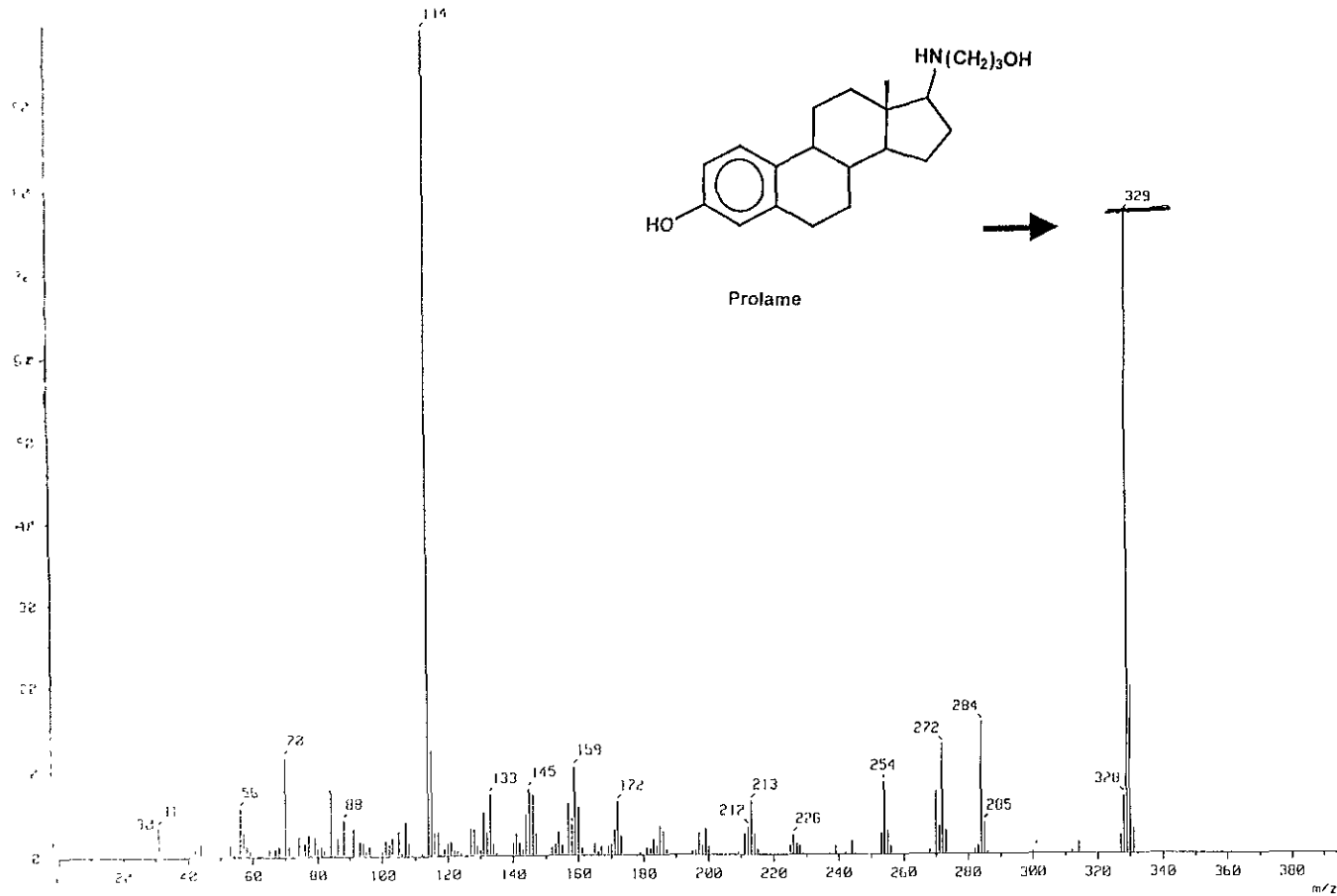
Espectro de resonancia magnética nuclear de prolame

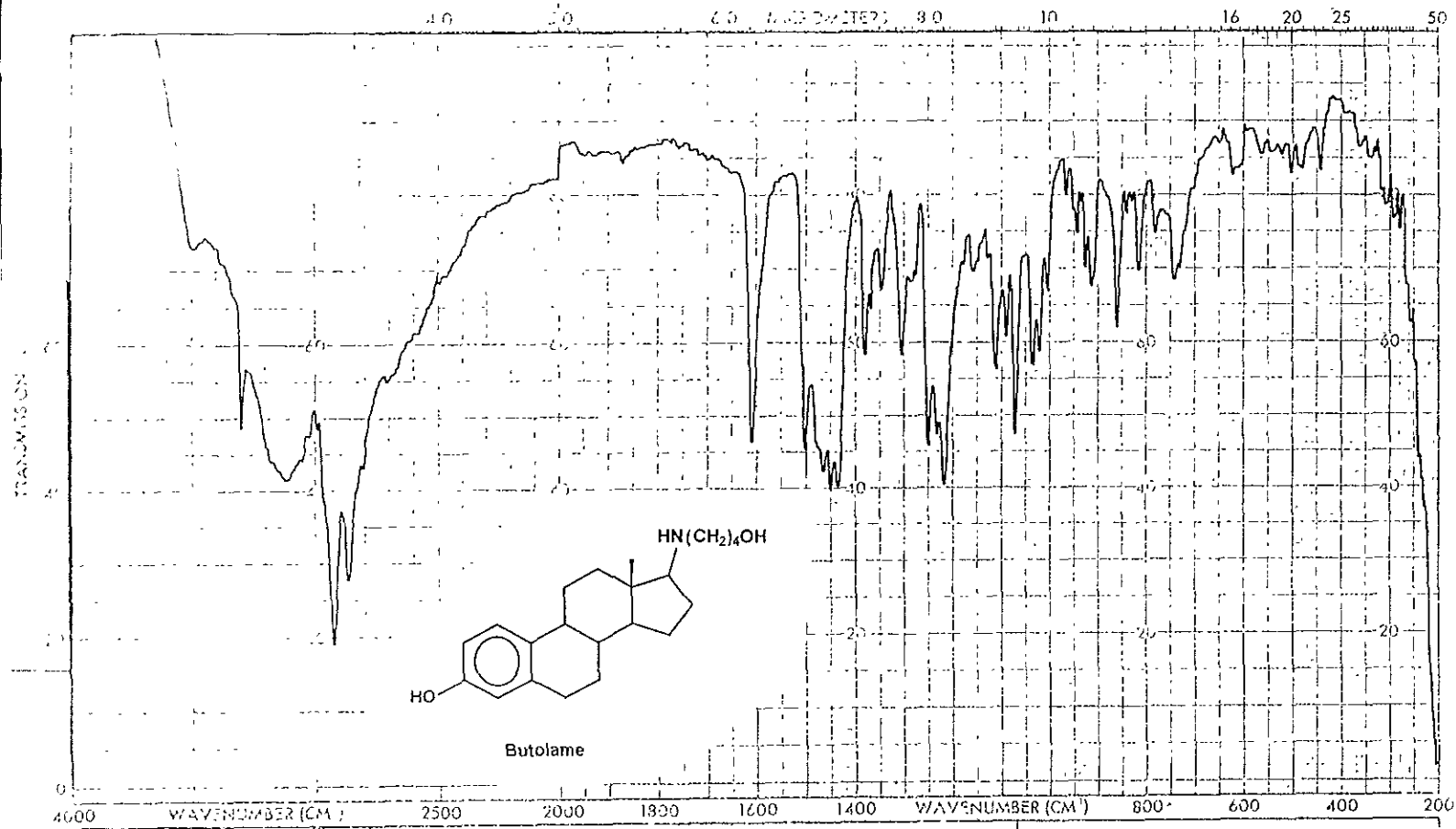


Prolame

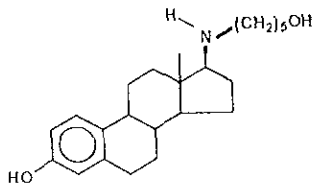


Espectro de masas de prolame

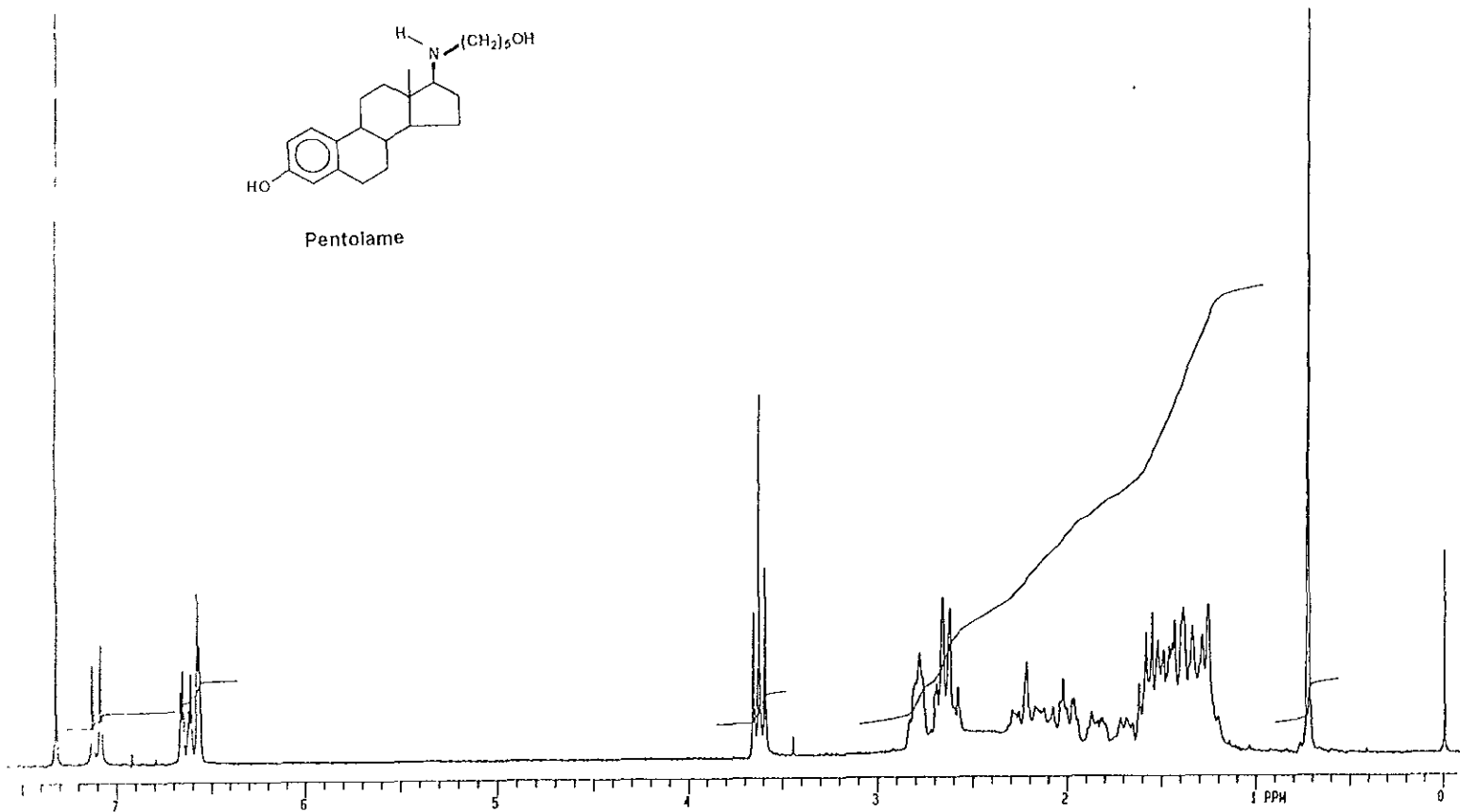




Espectro de infrarrojo de butolame



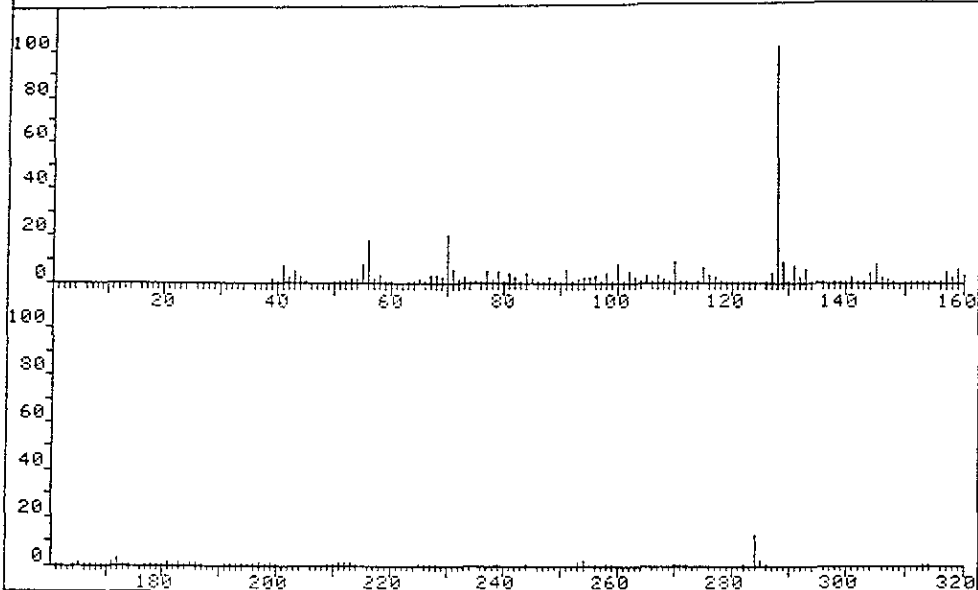
Pentolame



Espectro de resonancia magnética nuclear de pentolame

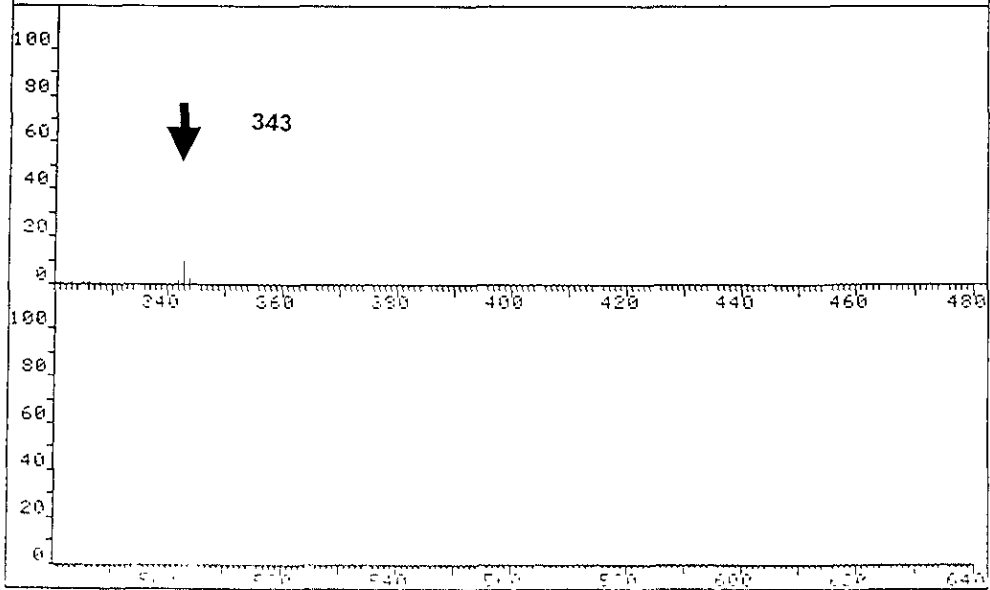
FRN 9305	SPECTRUM 56	RETENTION TIME 3.8
LARGST 4: 128.2, 100.0	70.1, 20.1	56.1, 17.9 284.2, 12.5
LAST 4: 342.3, 1.5	343.3, 9.8	344.3, 2.3 345.4, .3

PAGE 1 Y = 1.00

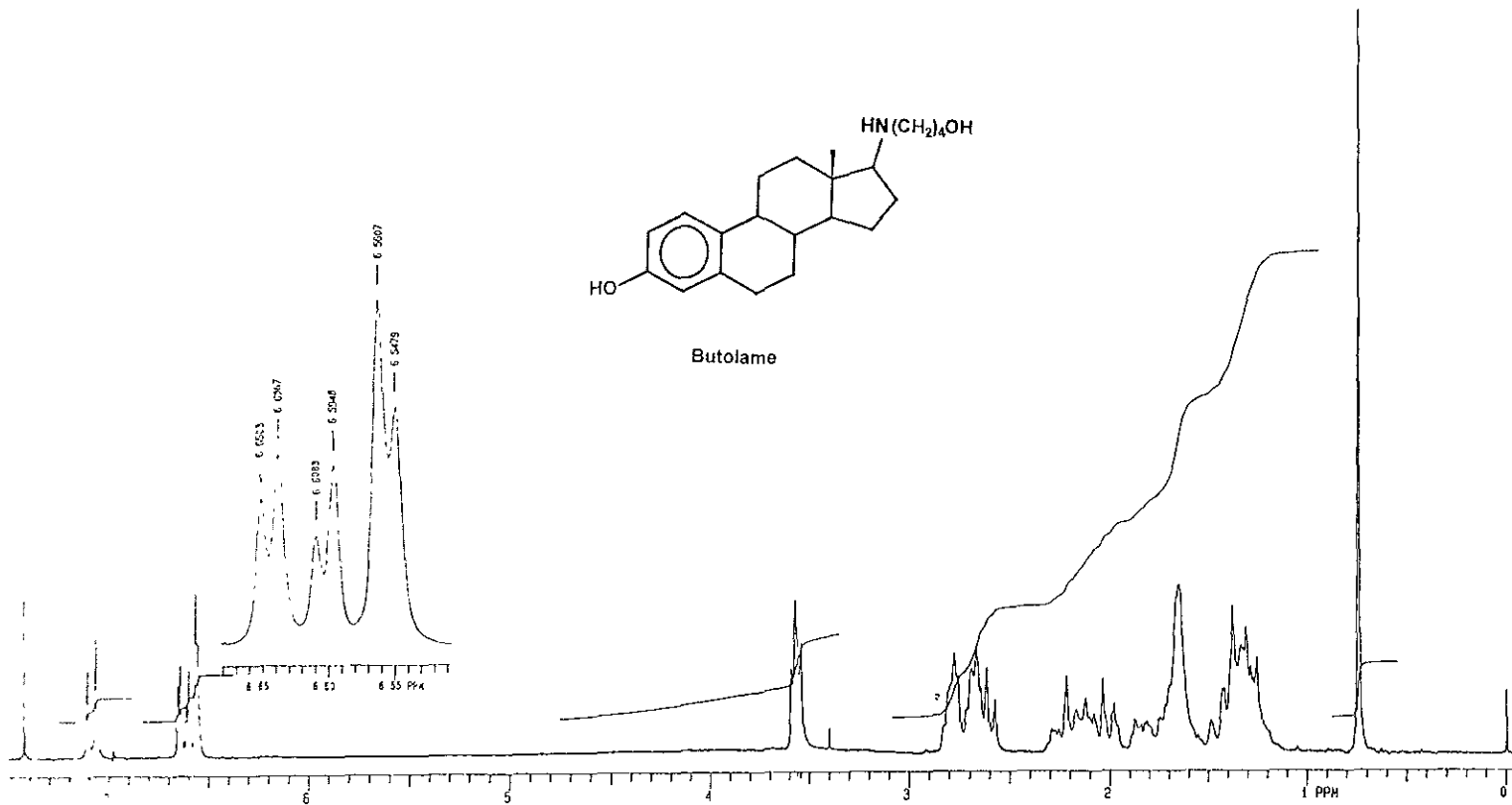


FRN 9306	SPECTRUM 56	RETENTION TIME 3.8
LARGST 4: 128.2, 100.0	70.1, 20.1	56.1, 17.9 284.2, 12.5
LAST 4: 342.3, 1.5	343.3, 9.8	344.3, 2.3 345.4, .3

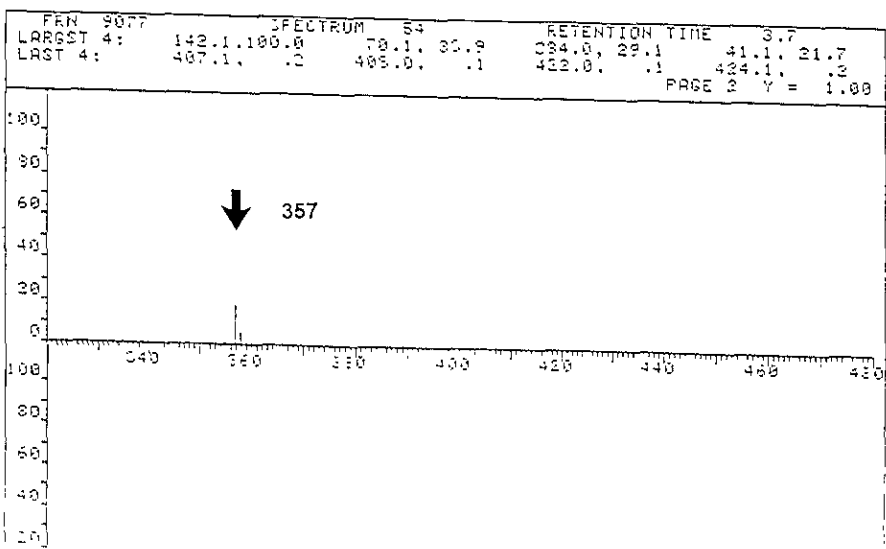
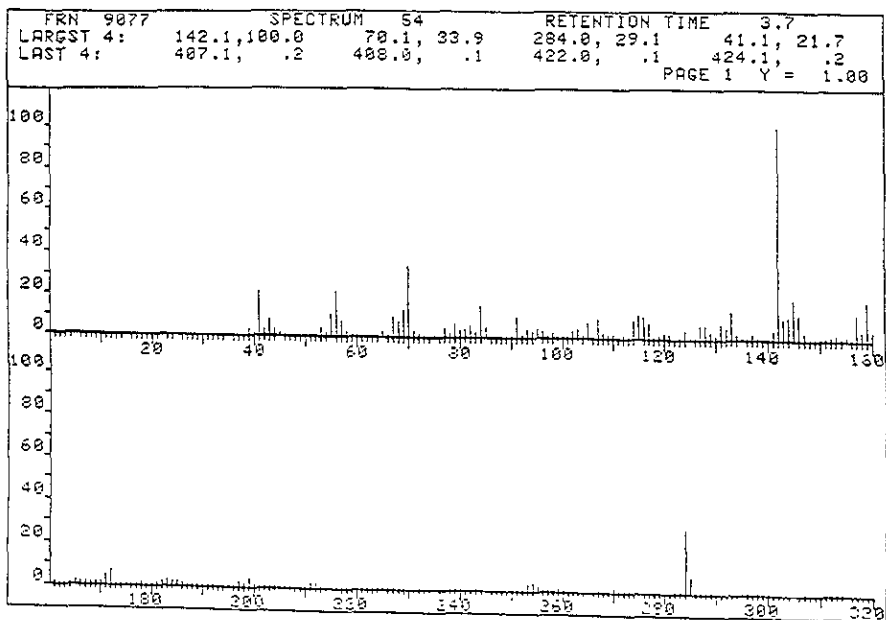
PAGE 2 Y = 1.00



Espectro de masas de butolame



Espectro de resonancia magnética nuclear de butolame



Espectro de masas de pentolame

12. PUBLICACIONES ORIGINALES GENERADAS



In vivo estrogen bioactivities and in vitro estrogen receptor binding and transcriptional activities of anticoagulant synthetic 17β-aminoestrogens

Ruth Jaimez^a, Austin Cooney^b, Kathy Jackson^b, Ana E. Lemus^c, Cristina Lemini^d, Mario Cárdenas^d, Rocio García^d, Griselda Silva^d, Fernando Larrea^{d,*}

^aDepartment of Pharmacology, School of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, México

^bDepartment of Cell Biology, Baylor College of Medicine, Houston, TX, U.S.A.

^cDepartment of Reproductive Biology, UNAM-Ensenada, México

^dDepartment of Reproductive Biology, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, México 14000, México

Received 15 October 1999; accepted 17 January 2000

Abstract

Estrogenic activities of the two 17β-aminoestrogen (AE) derivatives, prolame and butolame, were studied upon coagulation, serum luteinizing hormone (LH) and uterine weight, including endometrial morphology in castrated female rats. We have also investigated the ability of these two compounds, as well as another AE, pentolame, to activate transcription through the estrogen receptor α (ERα) and the estrogen receptor β (ERβ). Administration of prolame and butolame to castrated animals increased significantly ($P < 0.01$) the mean clotting time when compared with that obtained in the group of control animals. Butolame was a more potent anticoagulant than prolame ($P < 0.01$), as judged by their corresponding IC_{50} (5.4 ± 0.65 and $66.6 \pm 2.57 \mu\text{g}$ /animal, respectively). In contrast, estradiol significantly shortened blood clotting times ($P < 0.005$). Both prolame and butolame caused a significant inhibition of serum LH levels (LC_{50} 8.10 ± 0.79 and $17 \pm 64 \mu\text{g}$ /animal, respectively) and restored castration-induced reduction in uterine weight of ovariectomized rats (EC_{50} 4.14 ± 1.57 and $17.0 \pm 1.78 \mu\text{g}$ /animal, respectively). In terms of the effects of prolame, butolame, and pentolame in transient transfection assays, all the three AE activated ER-dependent reporter gene expression; however, only at high concentrations. Prolame had the highest activity followed by butolame and pentolame. Induction of transcription by these compounds was preferentially mediated through the ERα, especially in the case of pentolame where little if any activation occurred through the ERβ. None of the compounds showed antagonistic activities through either ER subtype. The overall data suggest that modifications in the structure and length of the amino-alcohol side-chain at C-17 might have an impact on the affinity and estrogenic intrinsic properties of AE, at the level of diverse target tissues. © 2000 Elsevier Science Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Synthetic 17β-aminoestrogens (AE) differ from natural estrogens in their ability to affect blood-clotting times. In contrast to 17β-estradiol (E₂), AE, induce long-lasting anticoagulant effects also inhibiting in

vitro, the process of platelet aggregation [1–6]. To our knowledge, only one of these steroids (pentolame) has been proved in terms of its estrogenic potencies upon the neuroendocrine and reproductive organs of female rats. In a previously published study by our group [6], pentolame, an AE derivative containing an amino-alcohol side chain (NH-CH₂m-OH at C-17) with five methylenes, demonstrated a low degree of estrogenicity on the pituitary and endometrium. At the same time, pentolame showed significant opposite effects as compared to E₂ upon blood coagulation. These obser-

* Corresponding author. Tel.: +52 55 5762100; fax: +52 55 558 9580.

E-mail address: fllarrea@iunz.unam.mx (F. Larrea).

2.5 Hormonal assays

Serum concentrations of pituitary luteinizing hormone (LH) were measured in duplicate by specific radioimmunoassay (RIA) using reagents and protocols provided by the National Hormone and Pituitary Program (Rockville, MD, USA) as previously described [10]. The results were expressed as the mean \pm SE in ng/ml according to NIAMDD rat LH R_p-3, used as reference preparation. The intra- and inter-assay coefficients of variation were 4.6 and 8.2%, respectively.

2.6 Receptor binding studies

Immature female intact rats (80–100 g) without estrogen priming were used for these studies. Uterine cytosols were prepared after tissue homogenization in TEDM buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4 at 4°C, 1.5 mM EDTA, 0.25 mM dithiothreitol, 10 μ g/ml leupeptine and 10% glycerol) using 10 s bursts of a polytron homogenizer (Brinkmann Instruments, Westbury, NY) in a tissue buffer ratio of 1.6 (w/v). The homogenates were centrifuged at 105,000 \times g for 1 h at 2°C in a SW 50.1 rotor (Beckman Instruments). The RBA of prolame and butolame to cytosol ER were evaluated by incubations containing 1 nM [³H]-E₂ in the presence of increasing concentrations (10⁻⁹–10⁻⁷ M) of the non-radioactive corresponding steroids for 18 h at 4°C. Bound and free steroids were separated by the addition of Dextran-coated charcoal suspension (250 mg Norit-A and 25 mg Dextran T-70 in 100 ml of TEDM buffer). After centrifugation at 800 \times G for 15 min at 4°C, the supernatants were assayed for radioactivity determination. The RBA of each competitor was calculated from their abilities to displace [³H]-E₂ bound from its receptor as previously described [11].

2.7 Transfections and C17 assays

HeLa cells were plated the day before transfections at a density of 3.0×10^5 cells/well six-well plate in Dulbecco's modified Eagle's medium without phenol red, which was supplemented with 5% stripped FBS (HyClone Laboratories, Logan UT) and 10,000 U of Penicillin and Streptomycin (DMEM-HG) and maintained in 5% CO₂ at 37°C. The next day, the HeLa cells were visualized on a microscope to verify that the cell density was between 30 and 50% confluent. Transfections were performed in triplicate using Superfect[®] (Qiagen, Valencia, CA), using reagents and protocols provided by the manufacturer. Briefly, serum-free media (0.1 ml) was aliquoted and DNA samples added, after vortexing, 10 μ l of Superfect[®] reagent was added and vortexed for 10 s. After incubation at room temperature for 5–10 min, 0.6 ml of supplemented DMEM-HG was added to each sample.

The medium containing the transfection complexes (1 μ g of the reporter gene plasmid, 25 ng of ER expression vector) was added to the cell monolayer, which had previously been rinsed with PBS. The plates were incubated for 3 h at 37°C in 5% CO₂. After incubation, the plates containing the transfection complexes were rinsed with PBS and 3 ml of complete growth medium was added to each well. Twenty-four hours later, the medium was replaced with complete medium containing the compounds of interest. Dimethyl sulfoxide (DMSO) or ethanol (EtOH) were used as steroid vehicles. CAT activity using 5 μ g of protein, 25 μ g of butyryl coenzyme-A (Sigma Chemical, St. Louis, MO), 2×10^5 cpm of xylene-extracted [³H]-chloramphenicol (Dumont-NEN Research Products, Boston, MA) in 0.25 M Tris-HCl, pH 8.0, was assayed as described [12–14].

2.8 Blood clotting time

Blood-clotting time was measured in vehicle and steroid-treated castrated female rats 24 h after the last steroid administration. After warming the tail of the animal in water at 40°C, a small cut was made at the tip using a sharp razor blade as reported earlier [6]. A blood sample (25 μ l) was collected from the tip of the tail into a microhematocrit glass capillary tube, and was made to flow with gravity by tilting the capillary.

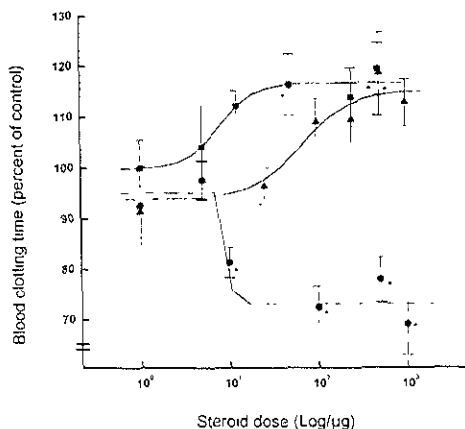


Fig. 2. Effects of prolame (▲), butolame (■) and estradiol (●) upon blood clotting times in castrated female rats. Twenty days after ovariectomy, rats were s.c. injected with 0.3 ml of propylene glycol containing various concentrations of the corresponding steroid (once 10000 μ g/animal for five consecutive days). Blood clotting times were recorded 24 h after the first injection. Each point represents the mean \pm SD of seven rats. Control rat (100%) received only the vehicle (0.3 ml of propylene glycol).

tube to angles of $+60^\circ$ and -60° with respect to the horizontal plane until the blood ceased to flow (reaction end-point)

2.9. Statistical analysis

Statistical significance among groups were analyzed employing one-way analysis of variance (ANOVA) and differences between the control and the treated groups were estimated by Dunnett's or Student–Newman–Keul's methods as appropriate. Differences were considered significant at a level of P less than or equal to 0.05. Data are representative of at least three independent experiments.

3. Results

3.1. Effects of prolame and butolame on blood clotting times

Fig. 2 shows the dose response effects of prolame, butolame and E_2 on blood clotting times in long-term ovariectomized rats. Different doses of steroids were administered daily for five consecutive days and evaluations on blood coagulation were done 24 h after the last injection. As shown, both prolame and butolame

increased significantly the mean time of bleeding when compared to that observed in the vehicle-treated control group (100%). Doses above 10 $\mu\text{g}/\text{animal}$ of both AE resulted in values significantly different to those observed in the control group. In addition, butolame was a more potent anticoagulant than prolame ($P < 0.01$) as judged by their corresponding IC_{50} upon blood coagulation (5.4 ± 0.65 and 66.6 ± 2.57 $\mu\text{g}/\text{animal}$, respectively). In contrast, mean clotting times were significantly shortened ($P < 0.01$ vs vehicle) in the group of E_2 treated rats, whose values were always significantly lower ($P < 0.005$) when compared to those obtained with similar doses of both AE.

3.2. In vivo estrogenicity

In order to determine the effects of AE on the hypothalamic–pituitary unit, we measured the serum concentrations of radioimmunoassayable LH in long-term castrated female rats treated for five consecutive days with different doses of prolame and butolame. As illustrated in Fig. 3, administration of both AE on ovariectomized rats at doses 25–1000 $\mu\text{g}/\text{animal}$ caused a significant decrease ($P < 0.05$) in serum LH levels compared to those in the ovariectomized control group. In terms of LH suppressing activities of these two AE, prolame showed a significantly higher potency ($P < 0.05$) than butolame with IC_{50} of 8.10 ± 0.79 and 17 ± 2.64 $\mu\text{g}/\text{animal}$, respectively. In addition,

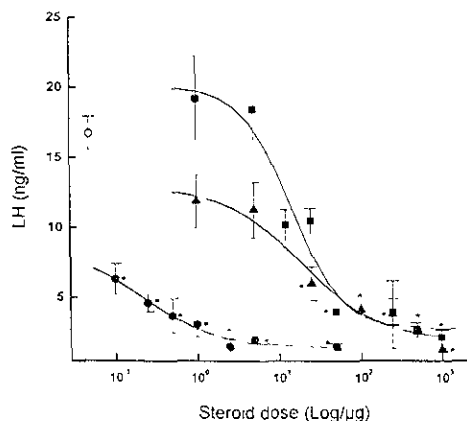


Fig. 3. Effects of different doses of prolame (▲), butolame (■) and estradiol (●) upon circulating LH levels of castrated female rats. Twenty days after ovariectomy, rats were s.c. injected with 0.3 ml of propylene glycol containing different concentrations of steroids (dose: 0.1–1000 $\mu\text{g}/\text{animal}$) for five consecutive days. One day after the last injection, rats were killed by decapitation and trunk blood collected and processed in duplicate for LH measurements. Control rats received the vehicle (none of) LH point represent the mean \pm SD of seven to eight rats. * $P < 0.05$ vs. control.

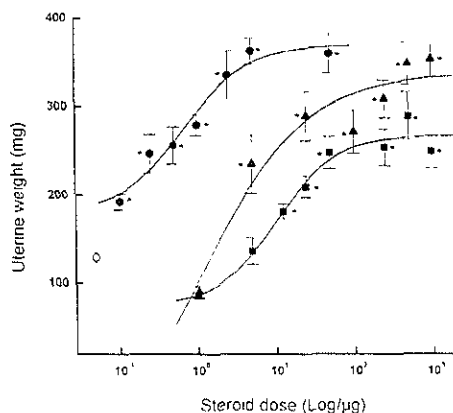


Fig. 4. Dose-dependent effects of prolame (▲), butolame (■) and estradiol (●) on uterine weight in castrated female rats. Twenty days after castration, 5-day treatment was started at the indicated doses. Control ovariectomized rats received the vehicle alone (○). Each point represents the mean \pm SD of seven to eight rats. * $P < 0.05$ vs. control rats.

administration of E_2 effectively suppressed the high postovariectomy concentrations of LH (IC_{50} 0.21 ± 0.1 $\mu\text{g}/\text{animal}$). As shown in Fig. 3, E_2 , at the dose of 2.5 $\mu\text{g}/\text{animal}$, brought LH up to or below the limits of detection of the assay.

The estrogenic effects of prolame and butolame on the reproductive female tract were studied by their ability to restore the castration-induced reduction in uterine weight. Fig. 4 shows the pattern of uterine weights of ovariectomized rats treated with different doses of both AE derivatives and E_2 . As shown in this figure, E_2 treatment caused a major increase in uterine weight (EC_{50} 0.6 ± 0.3 $\mu\text{g}/\text{animal}$), whereas prolame and butolame were less effective in terms of their uterotrophic activity (EC_{50} 4.14 ± 1.57 and 17.0 ± 1.78 $\mu\text{g}/\text{animal}$, respectively). However, both AE significantly increased the uterine weight compared to that seen in ovariectomized rats ($P < 0.05$ at the EC_{50} of both AE, respectively). Again, prolame showed a significantly higher estrogenic potency than that obtained with butolame ($P < 0.05$ at their corresponding EC_{50}). The endometrial histological changes induced by both prolame and butolame were characterized by an increase in both stromal and epithelial cells. Morphologically, the major findings consisted of enlargement of endometrial gland, the epithelial cells showed a columnar pattern and there was an increase in the number and volume of stromal cells. These morphological findings were similar to those obtained in rats treated with E_2 (data not shown) and to those previously described for pentolame [6].

3.3 Receptor binding characteristics

In order to assess whether prolame and butolame interact with specific intracellular ER, we used cytosol fractions prepared from uteri obtained from immature intact non-steroid treated rats. Fig. 5 shows competition curves of non-labeled synthetic AE and E_2 for specific estrogen binding sites in the rat uterus. The results demonstrated that all synthetic AE tested competed with [^3H]- E_2 for the ER. The ability of prolame and butolame to displace [^3H]- E_2 bound from its cytosolic receptor, expressed as their RBA, was substantially lower than that of unlabeled E_2 (0.11 and 0.14, respectively). Pentolame showed the lowest ability to displace [^3H]- E_2 from its receptor. As expected, addition of increasing concentrations of unlabeled ORG-2058, a synthetic specific ligand for progesterone receptors, did not displace [^3H]- E_2 bound from uterine cytosolic estrogen-binding sites.

3.4. Estrogen receptor-mediated transcription activation by 17 β -aestrogens

To determine whether AE would regulate transcription through the ER α or ER β , a reporter plasmid containing a canonical estrogen response element driving expression of the chloramphenicol acyltransferase reporter was transiently transfected into HeLa cells. In the absence of cotransfected expression vectors for both subtypes of human ER, induction of CAT reporter transcription by the different compounds was not observed. However, cotransfection with an expression vector for the human ER α with the reporter construct resulted in a significant dose-dependent CAT transcriptional activation after incubation with E_2 , prolame and butolame (EC_{50} 4.0×10^{-11} M, 4.7×10^{-9} M and 1.2×10^{-8} M, respectively). In this study, we have also tested, for transcriptional activation, another similar AE derivative (pentolame) whose *in vivo* estrogenic activity has been previously described by this laboratory [6]. As shown in Fig. 6A addition of pentolame to cotransfected HeLa cells was followed by a lower CAT transcriptional potency (EC_{50} 1.1×10^{-7} M) than that observed with similar doses of prolame and butolame, respectively. However, similar responses were obtained when higher concentrations (1 μM) of all AE were added. 17 β -estradiol induced the highest six-fold increment in CAT transcriptional activation. In terms of the ER β (Fig. 6B), E_2 , prolame and butolame increased CAT activity in a dose-dependent manner, however, higher concentrations of these ligands were required (EC_{50} 2.1×10^{-10} , 9.0×10^{-8} and 1.16×10^{-7} M, respectively). Pentolame even at high concentrations showed the lowest ability to increase CAT activity through activation of the ER β (EC_{50} 9.1×10^{-7} M). In order to investigate whether these compounds, especially

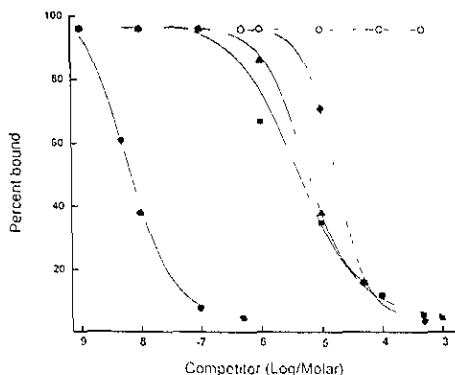


Fig. 5. Estrogen receptor binding activity of prolame (\blacktriangle), butolame (\blacksquare), pentolame (\blacklozenge), estradiol (\bullet) and ORG-2058 (\circ). Uterine cytosols from immature female rats were labeled with [^3H]- E_2 at 4°C in the absence or presence of increasing concentrations of the corresponding unlabeled steroid. Bound and free fractions were separated by the addition of ethanol to coated charcoal suspension. Competition curves were plotted as percent bound versus log molar concentration.

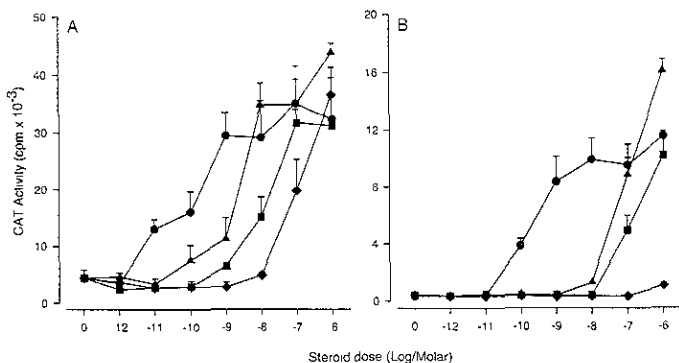


Fig. 6 Effect of 17 β -estradiol (●), prolame (▲), butolame (■) and pentolame (◆) on ER α (Panel A) and ER β (Panel B) mediated reporter activity. HeLa cells were transfected with the expression vector for ER α or ER β and an (ERE) CAT reporter gene (ERE β lucCAT). After 24 h, cells were harvested and assayed for CAT activity. Values are the mean \pm SD of a representative experiment per triplicate.

pentolame, act through the ER β as antagonists. HeLa cells transfected with an expression vector for ER β , together with the estrogen-responsive reporter gene, were treated with E $_2$ (1×10^{-9} M) in the presence or absence of increasing concentrations of prolame, butolame or pentolame, respectively (10^{-8} – 10^{-6} M), or the antiestrogen 4-hydroxytamoxifen (10^{-7} M). As shown in Fig. 7, with the exception of hydroxytamoxifen (Panel A), none of the AE tested significantly inhibited estradiol-induced reporter gene activation (Panel B). Similar results were obtained with the ER α (data not shown).

4. Discussion

In the process of investigating tissue-selective activity of contraceptive synthetic steroids, our group has discovered the anticoagulant properties of certain estrogen derivatives that could be of potential therapeutic use [1–6]. In this regard, several observations indicate that administration of natural and synthetic steroids (estrogens and progestins) are associated with a decreased incidence of endometrial and ovarian cancer due to the progestin component in the formulation and the suppression of gonadotropin secretion

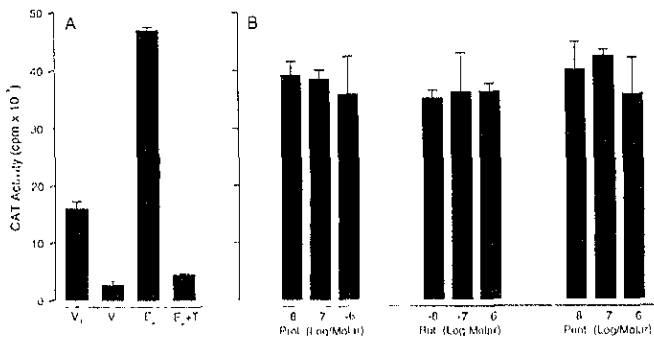


Fig. 7 ER β -mediated CAT inhibition. HeLa cells transfected with the expression vector for ER β and an (ERE) CAT reporter gene (ERE β lucCAT) were incubated with 10 nM E $_2$ in the presence or absence of 4-hydroxytamoxifen (1) (Panel A) and various concentrations (10^{-8} – 10^{-6} M) of prolame (Prol), butolame (But) or pentolame (Pent) (Panel B). Control incubation, were performed in the presence of only the vehicle (V) (DMSO) and ethanol or the vehicle (ethanol) plus E $_2$ (V+E $_2$) (Panel A). Values are the mean \pm SD of a representative experiment per triplicate.

Although most of the metabolic studies demonstrate favorable effects of estrogen therapy, its prescription in subjects with pre-existing metabolic abnormalities may be contraindicated. Therefore, the design and development of hormones with tissue-specific actions might be of importance for individuals with high risks of sex-steroid related diseases. In this study, two additional AE derivatives were investigated in terms of their estrogenicity at the neuroendocrine level and reproductive organs of the female rat. The overall objective of this work was to discriminate, among the available non-toxic synthetic AE, compounds with unique agonist and/or antagonist properties at the level of steroid responsive tissues in an effort to develop new drugs for targeted sub-populations. The results of this study allowed us to support and extend previous observations [3] indicating that actions of AE upon blood coagulation might be due to changes in the structure and length of the amino-alcohol side-chain at C-17. Indeed, a recent report from this laboratory [6] indicated that pentolame, an AE with five methylenes at the 17 β amino-alcohol side-chain, elicited a significant increase in blood clotting times when injected into adult castrated female rats. However, when compared with E₂, its effects on the pituitary and endometrium showed a low degree of estrogenicity. These observations, together with the results presented in this communication, suggest that a short side-chain is associated with lower anticoagulant but higher estrogenic potencies of these compounds. From the results in previous studies, including those presented herein, it is not possible to convincingly explain the mechanisms by which AE function as agonists in reproductive organs but not in the coagulation system. Interestingly, a number of observations suggest that natural and synthetic steroids act in a tissue-specific manner, as in the case of androgens [15,16] and synthetic compounds, such as tamoxifen [17] or members of the 19-nor testosterone family [18,19]. These observations may correspond to a general phenomenon of more than one hormone action that are determined by the presence of tissue-specific transcription factors, coactivators or corepressors, receptors sub-types or implying also the bio-conversion to metabolites with different receptor-ligand interactions [18,20].

It was clear from the data reported herein that prolame and butolame have the abilities to interact with specific E₂ receptors with RBA significantly lower than those for the natural hormone. It has been firmly established that LR complexes are not always recognized and transcribed similarly in all cells [21] leading to the concept that a number of ligands acting through the same receptor can express distinct effects in different cells [21,22]. These observations may, in part explain the relative antagonistic and agonistic effects

of AE upon coagulation and the reproductive system, respectively.

In this study, we have determined whether prolame, butolame and pentolame, that differ from each other in their biological potencies to alter coagulation and pituitary LH release, were able to regulate transcription through the ER. The overall results demonstrated that all AE through interaction with the ER α up-regulated gene CAT expression in a reporter plasmid containing a consensus ERE. Interestingly, pentolame had a lower potency to activate transcription indicating most likely a direct effect of the amino-alcohol side-chain composition on ligand-receptor interactions and activation. The question remains, however, whether difference in responses of these two AE observed either in vivo or in vitro are mediated directly at the transcriptional level or through changes in steroid-receptor interaction.

From a more general perspective, the data presented herein demonstrate that AE modulate transcription via E₂ receptors, whose transcriptional activities are most probably affected by the amino-alcohol side-chain composition at C-17. In addition, it seems plausible that further identification of E₂ receptor modulators, such as AE at the molecular level, could allow the development of therapeutic tissue-selective new drugs for targeted sub-populations.

Acknowledgements

This study was supported in part by grants from the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT to FL) DGAPA-UNAM IN205396 (to CL), the Andrew W. Mellon Foundation (to AJC) and CONRAD (to AJC and FL). The authors are indebted to the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, The National Institute of Child Health and Human Development, and the US Department of Agriculture for rat LH RIA reagents.

References

- [1] C. Lemmi, C. Rubio-Poo, G. Silva, J. Garcia-Mondragon, I. Zavala, N. Mendoza-Patino, D. Castro, R. Cruz-Almanza, I.J. Mandoki, Anticoagulant and estrogenic effects of two new 17 β imino-steroids: butolame [17 β -(4-hydroxy-1-butylamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol] and pentolame [17 β -(5-hydroxy-1-pentylamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol]. *Steroids* 58 (1993) 457–461.
- [2] C. Rubio-Poo, C. Lemmi, J. Garcia-Mondragon, A. de la Peña, V. Luján, N. Mendoza-Patino, I. Zavala, G. Silva, R. I. Blackenstaff, I.M. Fernandez-G. I.J. Mandoki, The anticoagulant effect of hexolame, N-(3-hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17 β -(1)-6-hydroxyhexylamino), another amino-estrogen with prolonged anticoagulant effect. *Steroids* 55 (1990) 83–86.
- [3] I.J. Mandoki, C. Rubio-Poo, C. Lemmi, A. de la Peña, I.M. Fernandez-G., J. Garcia-Mondragon, E. Zavala, G. Silva, N.

- Mendoza-Patiño, The effects of five new 17 β -amino-estrogens, bisoame, endame, etolame, picame and proclame on blood clotting time, *Proc West Pharmacol Soc* 34 (1991) 99-106
- [4] A de la Peña, G Baños R Izaguirre, J J Mandoki, J M Fernandez-G, Comparative effect of synthetic aminoestrogens with estradiol on platelet aggregation, *Steroids* 58 (1993) 407-409
- [5] A De la Peña, G Baños R Izaguirre, A Tobon-Cervantes, J M Fernandez-G, Comparative effect of three synthetic alkylamino-estrogens etolame, bisoame and pentolame on platelet aggregation, *Med Sci Res* 22 (1994) 119-124
- [6] A E Lemus R Jimez, C Lemmi, M Menpvan, G Silva, C Rubio-Poo, F Valenzuela, I Larrea, Estrogenic effects of the synthetic aminoestrogen 17 β -(5-hydroxy-1-pentylamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol (pentolame), *Steroids* 63 (1998) 433-438
- [7] J M Fernandez-G, M F Rubio-Arroyo, M Soriano-García, R A Toscano, M C Perez-Cesar, C Rubio-Poo, J J Mandoki, A de la Peña, C Lemmi, N Mendoza-Patiño, F Cruz, Synthesis and molecular structure of proclame, N-(3-hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17 β -yl)-3-hydroxypropylamine, an amino-estrogen with prolonged anticoagulant and brief estrogenic effects, *Steroids* 45 (1985) 151-157
- [8] P Le Goff, M M Montano, D J Schodin, B Katzenellenbogen, Phosphorylation of the human estrogen receptor, *J Biol Chem* 269 (1994) 4458-4466
- [9] C L Smith, O M Connely, B M O'Malley, Modulation of the ligand-independent activation of the human estrogen receptor by hormone and antihormone, *Proc Natl Acad Sci USA* 90 (1993) 6120-6124
- [10] F Larrea, O Morteuma, G Perez-Palacios, Estrogen-like effects of norethisterone on the hypothalamic-pituitary unit of ovariectomized rats, *J Steroid Biochem* 20 (1984) 841-847
- [11] B A Chavez, I Vilchis, A L Perez, G A Garcia, I Guillasa, G Perez-Palacios, Stereospecificity of the intracellular binding of norethisterone and its A-ring reduced metabolites, *J Steroid Biochem* 22 (1985) 121-126
- [12] A J Cooney, S Y Tsai, B W O'Malley, M J Tsai, COUP-TF dimers bind to different GGTC A response elements allowing it to repress hormonal induction of VDR, TR, and RAR, *Mol Cell Biol* 12 (1992) 4153-4163
- [13] A J Cooney, X. Lung, S Y Tsai, B W O'Malley, M J Tsai, Multiple mechanisms of COUP-TF dependent repression of VDR, TR and RAR transactivation, *J Biol Chem* 268 (1993) 4152-4160
- [14] B Seed, J Y Sheen, A simple phase-extraction assay for chloramphenicol acetyltransferase activity, *Gene* 67 (1988) 271-277
- [15] W G Fricdenck, Androgen metabolism in the prostate of the finasteride-treated, adult rat: a possible explanation for the differential action of testosterone and 5 α -dihydrotestosterone during development of the male urogenital tract, *Endocrinology* 138 (1997) 871-877
- [16] A E Lemus, I Enriquez, G A Garcia, I Guillasa, G Perez-Palacios, 5 α -reduction of norethisterone enhances its binding affinity for androgen receptors but diminishes its androgen potency, *J Steroid Biochem Mol Biol* 60 (1997) 121-129
- [17] V C Jordan, C S Murphy, Endocrine pharmacology of antiestrogens as antitumor agents, *Endocr Rev* 11 (1990) 578-610
- [18] F Larrea, I Vilchis, B Chavez, A E Perez, J Guiza-Flores, G Perez-Palacios, The metabolism of 19-nor contraceptive progestins modulates their biological activity at the neuroendocrine level, *J Steroid Biochem* 27 (1987) 657-663
- [19] G Perez-Palacios, M A Carbon, A M Pasapera, I Castro, J Enriquez, F Vilchis, G A Garcia, G Morali, A E Lemus, Mechanisms of hormonal and antihormonal action of contraceptive progestins at the molecular level, *J Steroid Biochem Molec Biol* 41 (1992) 479-485
- [20] S Hulehmi, E Marden, G Martin, H MacKay, C Abbondanza, M Brown, Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription, *Science* 264 (1994) 1455-1458
- [21] J A Katzenellenbogen, B W O'Malley, B S Katzenellenbogen, Tripartite steroid hormone receptor pharmacology: interaction with multiple effector sites as a base of the cell- and promoter-specific action of these hormones, *Mol Endocrinol* 10 (1996) 119-131
- [22] D P McDonnell, D L Clemm, T Herman, M L Goldman, J W Pike, Analysis of estrogen receptor function in vitro reveals three distinct classes of antiestrogens, *Mol Endocrinol* 9 (1995) 659-669



Estrogenic effects of the synthetic aminoestrogen 17 β -(5-hydroxy-1-pentylamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol (pentolame)

Ana E. Lemus,* Ruth Jaimez,‡ Cristina Lemini,‡ Martha Menjivar,† Griselda Silva,‡ Consuelo Rubio-Poo,‡ Fermín Valenzuela,‡ and Fernando Larrea†

*Departments of Reproductive Biology, UAM-Iztapalapa and †Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, and ‡Department of Pharmacology, School of Medicine, Universidad Nacional Autónoma de México, Mexico City, Mexico

In this study, we investigated the effects of pentolame, a 17 β -aminoestrogen derivative, upon coagulation, serum LH pituitary progesterin receptors, uterine weight and endometrium morphological changes in the castrated female rat. Groups of animals were subcutaneously (s.c.) injected with either estradiol (E₂) (0.1 up to 1000 μ g/animal), pentolame (1 up to 1000 μ g/animal), or the vehicle alone daily for 5 consecutive days starting 2 weeks following ovariectomy. Administration of pentolame (10 to 1000 μ g/animal) increased significantly ($p < 0.05$) the blood clotting time when compared with that obtained in the group of control animals (EC₅₀ 582 μ g). Pentolame (500 and 1000 μ g/day for 5 days) caused a significant inhibition ($p < 0.01$) of serum LH levels (IC₅₀ 860 μ g), which remained suppressed until Day 5 post last injection. In addition, treatment with pentolame was able to restore in the castrated female rat the presence of specific estrogen-dependent progesterin binding sites at the anterior pituitary level. The affinity constants and the number of binding sites of pentolame-induced progesterin receptors were similar to those obtained with estradiol at equipotent doses (860 μ g vs. 1 μ g/animal, respectively). Administration of the 17 β -aminoestrogen derivative resulted in a significant increase in uterine weight (EC₅₀ 120 μ g) and endometrial characteristics were indistinguishable from those observed in the group of rats treated with E₂. (Steroids 63:433-438, 1998) © 1998 by Elsevier Science Inc.

Keywords: blood coagulation; estrogens; aminoestrogens; steroids; neuroendocrine effects

Introduction

It has been previously shown that in contrast to estradiol administration of 17 β -aminoestrogens produced sustained anticoagulant effects and inhibit platelet aggregation.^{1,2} This observation suggests that these steroid derivatives could be of potential use in humans as candidates for new therapeutic agents. In our laboratory the search for a potential estrogenic compound with differential actions upon coagulability has resulted in the development of several 17 β -hydroxy-amino-derivatives of estradiol that increase blood clotting times in laboratory animals without the appearance of other major deleterious side effects. Since very little is known about the *in vivo* estrogenic activities of 17 β -aminoestrogens, we have in this study compared the effects of pentolame,³ one of the newest derivatives devel-

oped, with estradiol upon the neuroendocrine and reproductive organs of chronically castrated female rats.

Experimental

Reagents

Non-radioactive estradiol, 1,3,5(10)-estratrien-3,17 β -diol was purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, Missouri) and its chemical purity established by paper chromatography. Pentolame (Figure 1), 17 β -(5-hydroxy-1-pentylamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol was synthesized from estrone, 3-hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17-one (Synex, Mexico). Chemical purity of pentolame was established by spectral (IR, NMR, MS) and chromatographic (HPLC and HLC) techniques as previously reported.³ Radiomeri ORG 2058, (16 α -ethyl-21-hydroxy-19 nor-4 pregnen-3,20-dione), and [6-³H] ORG 2058, specific activity (s.a.) 38 Ci/mmol, were purchased from Amersham International (Buckinghamshire, England). The radiochemical purity of the [³H] steroid was assessed by its chromatographic behavior in paper and HPLC and by repeated crystallizations to constant s.a. Radioactivity was determined in a Packard Tri-Carb liquid scintillation spectrometer (Model 1900 TR) with a counting efficiency for [³H] of 60% using Ready Solv

Address reprint requests to Cristina Lemini, M.D., Department of Reproductive Biology, Instituto Nacional de la Nutrición Salvador Zubirán, Vasco de Quiroga No. 18, México 14000, México D.F.
Received July 10, 1997; accepted April 2, 1998.

Steroids 63:433-438, 1998.

© 1998 by Elsevier Science B.V. All rights reserved.
0037-0712/98/050433-06\$14.00/0

0037-0712/98/050433-06
PII: S0037-0712(98)00580-0

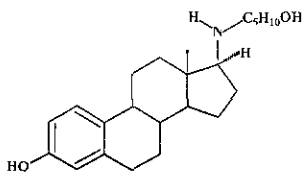


Figure 1 Structural formula of pentolame

HP (Beckman Instruments, Palo Alto, California). All other solvents and reagents were of analytical grade.

Animals and tissues

Female Wistar rats weighing 200–220 g were used. Animals were housed under a lighting schedule of 12-h light/12-h darkness with free access to food and water. Rats were ovariectomized under anesthesia with 4% chloral hydrate, 15 days prior hormonal treatment. Animals were injected daily for 5 consecutive days with 0.3 mL of propylene glycol containing either pentolame or E_2 at different concentrations. Control animals received the vehicle alone. Animals were killed by decapitation. Blood collected from the cervical wound (trunk blood) was centrifuged and serum stored individually at -20°C until assayed. Tissues (pituitary and uterus) were removed, blotted, weighed, and immediately processed as described below. Uteri were fixed in 10% formaldehyde and submitted to histological examination.

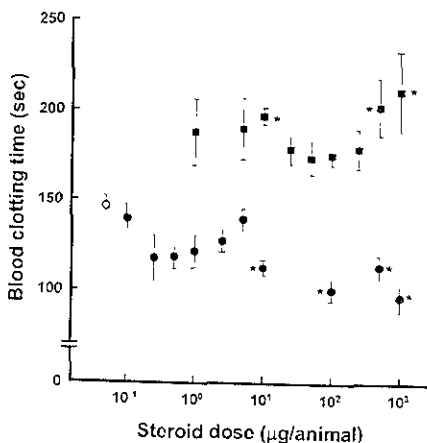


Figure 2 Effects of pentolame (■) and E_2 (●) upon blood clotting times in castrated female rats. Two weeks following ovariectomy, rats were s.c. injected with 0.3 mL of propylene glycol containing various concentrations of pentolame or E_2 (range 0.1 to 1000 µg/animal) daily for 5 consecutive days. Blood clotting times were recorded, as described under Experimental. 24 h after the last injection. Each point represents the mean plus or minus SE of at least 6 rats. Control rats received only the vehicle alone. * $p < 0.05$ vs. control.

Hormonal assays

Serum concentrations of luteinizing hormone (LH) were measured in duplicate by specific radioimmunoassay (RIA) using reagents and protocols provided by the National Hormone and Pituitary Program (Rockville, Maryland, USA) as previously described.⁸ The results were expressed as the mean plus or minus SE in ng/mL according to NIAMDD rat LH R_p-3 used as reference preparation. The intra- and inter-assay coefficients of variation were 4.6% and 8.2%, respectively.

Induction of anterior pituitary estrogen-dependent progesterin receptors

The induction of estrogen-dependent progesterone receptors (PR) in the anterior pituitary (AP) of castrated adult female rats following the administration of pentolame was studied as previously described.⁹ Castrated animals were treated with pentolame (850 µg/animal) or E_2 (1 µg/animal). The control group received only the vehicle alone. The day after treatment, animals were killed and APs were obtained homogenized and centrifuged at 105,000 × g as previously described.¹⁰ The resultant supernatants (cytosol) were incubated (1.5 mg protein) with 3.0 nM [³H] ORG 2058 at 4°C during 3 h or with three different concentrations (2.4, and 8 nM) of the labeled steroid for sucrose gradient centrifugation and saturation analysis, respectively. After incubation, labeled cytosols were layered on the top of linear sucrose gradients (20–35%) in 20 mM Tris-HCl, pH 7.4, at 4°C, 1.5 mM EDTA, 0.25 mM dithiothreitol and 10 mM sodium molybdate supplemented with 10% glycerol (v/v) and leupeptin (1 µg/mL). Bovine serum albumin (BSA), centrifuged on a parallel gradient, was used as reference (4.6 S). Gradients were centrifuged at 370,000 × g for 2.5 h at 2°C.

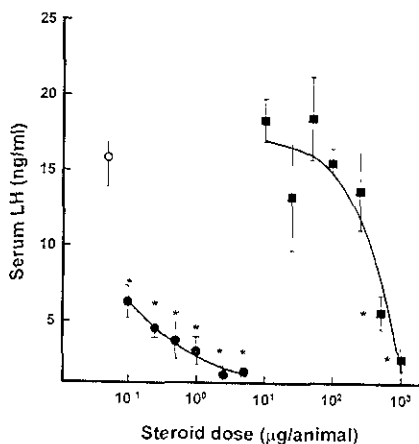


Figure 3 Effects of different doses of pentolame and E_2 upon circulating LH levels of castrated female rats. Groups of rats were s.c. treated with either pentolame (■), E_2 (●) or the vehicle alone (○) every day for five consecutive days. One day after the last injection, rats were killed by decapitation and trunk blood collected and processed in duplicate for LH measurements. Each point represents the mean plus or minus SE of 6 to 8 rats. * $p < 0.01$ vs. control.

Neuroendocrine effects of pentolame¹ Lemus et al

microhematocrit glass capillary tube, and was made to flow by gravity by tilting the capillary tube to angles of plus 60° and minus 60° with respect to the horizontal plane until the blood ceased to flow (reaction end-point)

Statistical analysis

Statistical significance among groups were analyzed employing one-way analysis of variance (ANOVA) and differences between the control and the treated groups were estimated by Dunnett's or Student-Newman-Keul's methods, as appropriate¹³. Differences were considered significant at a level of $p < 0.05$. All experiments were done at least twice.

Results

Effects of pentolame on blood clotting times

Figure 2 shows the dose-response effects of pentolame and E_2 administered daily per 5 consecutive days upon blood coagulation to castrated female rats. Evaluations on blood clotting times were performed 24 h after the last injection. As depicted, pentolame at the doses of 10 to 1000 $\mu\text{g}/\text{animal}$ increased significantly ($p < 0.05$) the blood clotting time when compared to that obtained in control animals. A significant shortening of bleeding time parameters was observed when rats received similar doses of E_2 ($p < 0.05$ vs control).

Effect on hormone levels

At the time of the study, the serum LH levels in the group of castrated rats (control group) were significantly higher ($p < 0.05$) than those seen in intact animals. As shown in Figure 3, these high post-ovariectomy serum concentrations of LH were effectively suppressed by the administration of E_2 (IC_{50} 1.18 $\mu\text{g}/\text{animal}$). In the case of pentolame, inhibition of serum LH (IC_{50} 860 $\mu\text{g}/\text{animal}$) occurred only in animals injected with 500 and 1000 μg .

The inhibitory actions on pituitary LH were also evaluated after withdrawal of pentolame administration. As shown in Figure 4, in rats injected with both pentolame and estradiol, LH levels remained suppressed during the following 4 days post treatment. At Day 5, serum LH increased to levels even higher than those observed in serum from control ovariectomized rats. As in the case of the group of E_2 -treated rats, and independently of the dose of pentolame (500 and 1000 $\mu\text{g}/\text{animal}$) administered, no significant differences in serum LH concentrations and duration of the inhibitory effect (Days 1 to 4) were observed during the recovery period.

Induction of anterior pituitary estrogen-dependent progesterin receptors

Control studies in castrated female rats demonstrated the absence of [³H] ORG 2058 specific binding in cytosols of anterior pituitary glands as disclosed by saturation and sucrose gradient centrifugation analyses. As shown in Table 1, administration of pentolame (860 $\mu\text{g}/\text{animal}/2$ days) to castrated rats restored the progesterin receptor in the anterior pituitary with the same affinity and number of binding sites

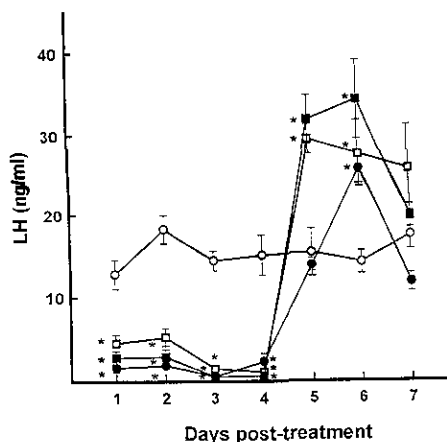


Figure 4 Extent of the inhibitory effects of 500 μg (□) and 1000 μg (●) of pentolame and 5 μg of E_2 (●) upon circulating LH levels in castrated female rats. Rats were treated as described under Figure 3, and the LH levels measured in blood samples obtained at different intervals following pentolame withdrawal. Each point represents the mean plus or minus SE of 4 to 6 rats. Control rats received only the vehicle alone (○). * $p < 0.01$ vs control.

using a VTI Beckman rotor. Non-specific labeling was assessed in cytosols incubated with an excess (200 folds) of non-labeled ORG 2058. Fractions of 0.15 mL were collected and assayed for radioactivity. Progesterin receptor-binding characteristics and number of binding sites were determined from charcoal-dextran treated incubations after centrifugation and radioactivity determination in the supernatants as previously described¹⁴.

Protein determination was done by the method of Bradford¹⁵ using BSA as standard.

Blood clotting time

Blood clotting time was measured in steroid-treated castrated female rats 24 h after the last steroid administration. After warming the tail of the animal in water at 40°C a small cut was made at the tip using a sharp razor blade as reported earlier¹⁶. A blood sample (25 μl) was collected from the tip of the tail into a

Table 1 Affinity Constants and Number of Binding Sites of Progesterin Receptors at the Pituitary Level

		K_d (nM)	NBS ¹
Pentolame	2 ^b	4.7	0.173
	5	4.5	0.124
Estradiol	2	5.4	0.155
	5	4.1	0.121

¹Number of binding sites (fmol/mg prot).

²Day of treatment.

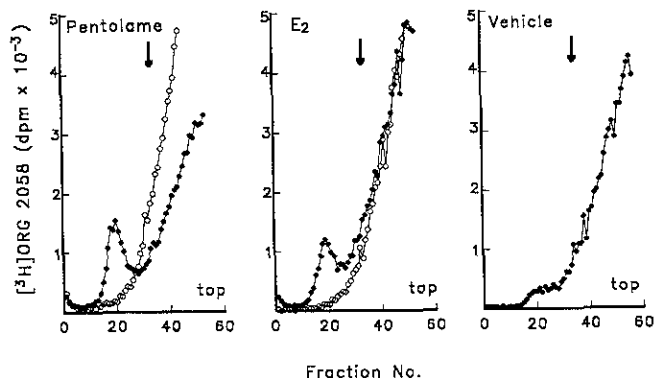


Figure 5 Induction of cytosol progesterin receptors (PR) in the anterior pituitary of ovariectomized rats by pentolame. Rats were injected with pentolame (860 $\mu\text{g}/\text{animal}$, $n = 9$), E_2 (1 $\mu\text{g}/\text{animal}$, $n = 9$) or the vehicle alone ($n = 9$) for two consecutive days. PR were analyzed by sucrose density gradients of cytosols previously incubated with [^3H] ORG 2058 as the radioligand. Results were plotted as the sedimentation profile of the progesterin binding sites (8 S). Addition of 200 fold excess of radioligand ORG 2058 completely abolished the formation of [^3H] ORG 2058-PR complexes (open circles). Sedimentation of BSA used as marker is shown with the arrow.

as those observed with equipotent doses of E_2 (1 $\mu\text{g}/\text{animal}/2$ days). No differences in affinity constants and number of binding sites were found in rats receiving pentolame or estradiol during 2 or 5 days. As shown in Figure 5, [^3H]

ORG 2058-protein complexes sedimented at 8-9 S, similar to those induced with the natural estrogen. Control incubations in the presence of an excess of unlabeled ORG 2058 did not show any radioactivity that sedimented at 8-9 S.

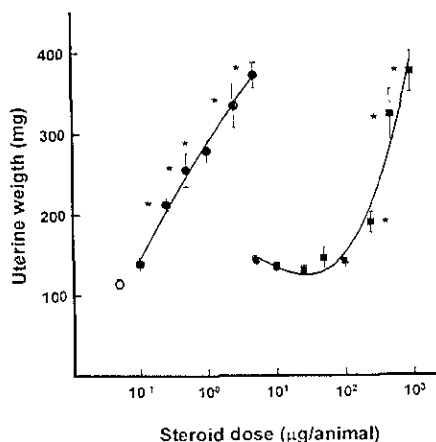


Figure 6 Dose response curves of pentolame administration on wet uterine weight of female castrated rats. Rats were treated with pentolame (■) as described in Figure 3. One day after the last injection, animals were killed and the uterus excised, blotted, and weighed. Control rats received either E_2 (○) or the vehicle alone (●). Each point represents the mean plus or minus SE of 6 to 12 rats. * $p < 0.01$ v. vehicle.

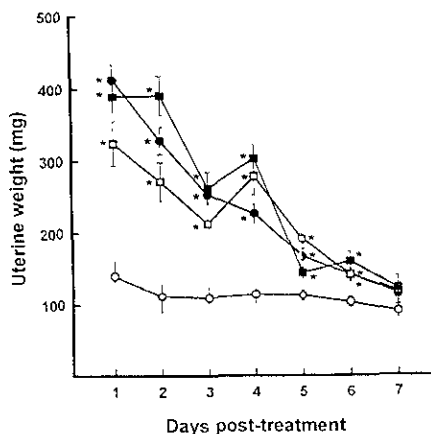


Figure 7 Extent of pentolame (500 μg (□) and 1000 μg (■)), effects on uterine weight of castrated female rats. Rats were treated as described in Figure 3, and uterine weight recorded at different intervals, after steroid withdrawal. Control rats received either E_2 (○) or the vehicle alone (●). Each point represents the mean plus or minus SE of 12 rats. * $p < 0.05$ v. vehicle.

Effects of pentolame on uterine growth and endometrium morphological changes

As an additional marker of estrogenic activity of pentolame, we studied the effects of this 17β -aminoestrogen derivative on the reproductive female tract of the rat. As shown in Figure 6 administration of pentolame resulted in a dose-response effect upon uterine weight. The uterine weight increase was significant ($p < 0.01$) from 250 μg of pentolame and occurred at the expense of both myometrium and endometrium (EC_{50} 424 $\mu\text{g}/\text{animal}$). Withdrawal of pentolame and E_2 administration was immediately followed by the loss of uterine weight, however, a complete involution of the uterus did not occur until seven days post hormonal treatment (Figure 7). Major histological changes in endometrium included the proliferation of endometrial glands which were lined by columnar pseudo-stratified epithelium and stroma cells. This proliferative pattern in the endometrium was indistinguishable from that observed with the administration of E_2 .

Administration of pentolame to rats did not show any effects other than those observed and described in this paper.

Discussion

In the present study, we have examined for the first time the influence of the 17β -aminoestrogen administration, pentolame, upon the hypothalamic-pituitary unit of castrated female rats. In agreement with previous studies,^{3,4} pentolame administration resulted in opposite effects on blood coagulation parameters when compared to those obtained with estradiol. Indeed, pentolame significantly increased the blood clotting time, phenomenon that last several days, without the sustained procoagulant phase that usually follows the administration of the natural estrogen.² Although the molecular basis for pentolame-induced anticoagulant effects remains to be elucidated, differences in blood clotting times are obtained by small changes within the chemical structure of the 17β -amino side-chain.⁵

The finding that pentolame administration to ovariectomized rats was able to restore, in the anterior pituitary, the presence of estrogen-dependent progesterin receptors, which appeared to be indistinguishable from those induced by the administration of estradiol, suggests that *in vivo* pentolame has an estrogen agonistic mechanism of action at the pituitary level. Recently, Jayme et al.¹¹ reported that in intact adult male rats chronic administration of 17β -aminoestrogens in subdermal capsules, including pentolame among them, did not affect male sex organs as in the case of estradiol, suggesting no effects of these compounds on pituitary LH and FSH release. The reasons for this discrepancy are most probably due to differences in the route of administration and the levels of aminoestrogens in the circulation. In this study, administration of pentolame (IC_{50} 860 $\mu\text{g}/\text{animal}$) was able to inhibit the serum concentrations of LH in the castrated animal. This finding, together with the increase in uterine weight including the estrogen-like changes seen in the endometrium, indicates an agonistic estrogen mediated mechanism of action of pentolame at the level of reproductive organs. Inasmuch as dose response

effects of both pentolame and E_2 on serum LH were indicative of the low estrogenicity of the 17β -aminoestrogen at the neuroendocrine level, there was clearly an opposite effect of these two steroids upon blood coagulation. These actions (on serum LH and blood clotting time) might depend on tissue-specific distribution of transcription factors and receptor subtypes¹⁵⁻¹⁷ which result either in agonistic or antagonistic biological effects. The question remains, however, whether pentolame peripheral biotransformation is in part responsible for its *in vivo* actions.

In summary, the low biological potency of pentolame compared to estradiol upon the neuroendocrine and reproductive systems, notwithstanding the effects of pentolame on blood clotting times, still makes highly unlikely the potential uses of 17β -aminoestrogens derivatives in humans. However, the search for understanding the mechanisms of action of both natural and synthetic steroid hormones is of the utmost importance in the process of developing new generation of compounds with intrinsic disease-prevention benefits.

Acknowledgments

This study was supported in part by grants from the Special Programme for Research, Development and Research Training in Human Reproduction of the World Health Organization (Geneva, Switzerland), The National Council of Science and Technology (CONACYT, México), and DGAPA-UNAM (IN205396 and IN205596). The authors are indebted to the National Hormone and Pituitary Program, the National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases, the National Institute of Child Health and Human Development, and the US Department of Agriculture for rat LH RIA reagents.

References

1. Fernández-G JM, Rubio-Arroyo MF, Soriano-García M, Toscano RA, Pérez-Cesar MC, Rubio-Poo C, Mandoki JJ, de la Peña A, Lemus C, Mendoza-Patino N, Cruz I (1985) Synthesis and molecular structure of prolame, N -(3-hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17 β -yl)-3-hydroxypropylamine; an amino-estrogen with prolonged anticoagulant and brief estrogenic effects. *Steroids* 45:151-157.
2. Lemus C, Rubio-Poo C, Silva G, García-Mondragón J, Zavala L, Mendoza-Patino N, Castro D, Cruz-Almanza R, Mandoki JJ (1993) Anticoagulant and estrogenic effects of two new 17β -aminoestrogens: butilame [17 β -(4-hydroxy-1-butylamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-yl] and pentolame [17 β -(5-hydroxy-1-pentylamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-yl]. *Steroids* 58:457-461.
3. Rubio-Poo C, Mandoki JJ, Mendoza-Patino N, Lemus C, de la Peña A, Cruz I, Zavala L, Silva G, Mondragón-García I, Lemus C-G, de la Cruz I, Soriano-García M, Toscano AR (1985) The anticoagulant effect of prolame, N -(3-hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17 β -yl)-3-hydroxypropylamine; a novel amino-estrogen. *Steroids* 45:159-170.
4. Rubio-Poo C, Lemus C, García-Mondragón J, de la Peña A, Jayme V, Mendoza-Patino N, Zavala L, Silva G, Bhattacharya R, Lemus C-G, JM, Mandoki JJ (1990) The anticoagulant effect of hexolame, N -(3-hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17 β -yl)-6-hydroxyhexylamine; another amino-estrogen with prolonged anticoagulant effect. *Steroids* 55:83-86.
5. Mandoki JJ, Rubio-Poo C, Lemus C, De la Peña A, Lemus C-G, JM, García-Mondragón J, Zavala L, Silva G, Mendoza-Patino N (1991) The effects of five new 17β -amino-estrogens, butilame, cindame, etolame, pival and prolame, on blood clotting time. *Proc. West Pharmacol. Soc.* 11:99-101.
6. De la Peña A, Bayas G, Lemus C, R. M. A. Bayas G, Lemus C-G, JM

Papers

- (1993) Comparative effects of synthetic androstrogens with estradiol on platelet aggregation. *Steroids* **58** 407-409
- 7 De la Peña A, Baños G, Izaguirre R, Tobon-Cervantes A, Fernández-G JM (1994) Comparative effect of three synthetic alkanoi-amino-estrogens, tolamme, butolame and pentolame on platelet aggregation. *Med Sci Res* **22** 119-120
 - 8 Larrea F, Moctezuma O, Perez-Palacios G (1984) Estrogen-like effects of norethisterone on the hypothalamic-pituitary unit of ovariectomized rats. *J Steroid Biochem* **20** 841-847
 - 9 Vilchis F, Chávez B, Pérez AE, Garcia GA, Angeles A, Pérez-Palacios G (1986) Evidence that a non-aromatizable metabolite of norethisterone induces estrogen-dependent pituitary progesterin receptors. *J Steroid Biochem* **24** 525-531
 - 10 Chávez B, Vilchis F, Pérez AE, Garcia GA, Grillasca I, Pérez-Palacios G (1985) Stereospecificity of the intracellular binding of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *J Steroid Biochem* **22** 121-126
 - 11 Larrea F, Oltari RM, Granados J, Mutchmek O, Díaz-Sánchez V, Musio NA (1990) Genetic polymorphism of the human sex hormone-binding globulin: evidence of an isoelectric focusing variant with normal androgen-binding affinities. *J Steroid Biochem* **36** 541-548
 - 12 Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyst Biochem* **72** 248-254
 - 13 Zar JH (1984) Multiple comparisons. In Kurtz B (ed), *Biostatistical Analysis*. Prentice-Hall, New Jersey, pp 176-205
 - 14 Jayme V, Rubio-Pérez C, Mandoki JJ, Lemini C (1994) Effects of chronic administration of two 17 β -androstrogens, butolame and pentolame, on the reproductive male tract of the rat. *Med Sci Res* **22**:421-422
 - 15 Halchmi S, Marden E, Martin G, MacKay H, Abbondanza C, Brown M (1994) Estrogen receptor-associated proteins: possible mediators of hormone-induced transcription. *Science* (Washington, DC) **264** 1455-1458
 - 16 McDonnell DP, Dana S, Hoener P, Lieberman B, Imhof M, Stein R (1995) Cellular mechanisms which distinguish between hormone- and antihormone-activated estrogen receptor. *Ann NY Acad Sci* **761** 121-137
 - 17 McDonnell DP, Clevenger B, Dana S, Santino-Mercé D, Trukerman MT, Gleason MA (1993) The mechanisms of action of steroid hormones: a new twist to an old tale. *J Clin Pharmacol* **33** 1165-1172