

43



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

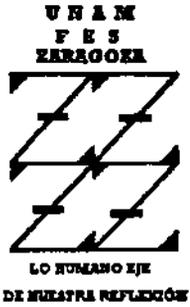
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

EVALUACION DEL EFECTO ESTROGENICO DE 17beta-AMINOESTROGENOS EN RATA WISTAR INMADURA

295235

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A
INES MARTINEZ LOPEZ

DIRECTOR DE TESIS: M. en C. CRISTINA LEMINI GUZMAN



MEXICO, D. F.



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

**JURADO ASIGNADO:**

<b>Presidente</b>	<b>M. C. CAROLINA SAUER RAMIREZ</b>
<b>Vocal</b>	<b>M. en C. CRISTINA LEMINI GUZMAN</b>
<b>Secretario</b>	<b>Q.F.I. ESTELA VALENCIA PLATA</b>
<b>1er.suplente</b>	<b>M. en C. EVANGELINA LOPEZ NIETO</b>
<b>2do.suplente</b>	<b>Q.F.B. MABEL CLARA FRAGOSO SERRANO</b>

**FACULTAD DE MEDICINA.  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA. Edificio A 6º Piso**

**Asesor: M. en C. CRISTINA LEMINI GUZMAN.**

**Sustentante: INES MARTINEZ LOPEZ.**

6287

El presente trabajo se llevó a cabo en el **Departamento de Farmacología de la Facultad de Medicina de la UNAM**, bajo la dirección de la **M. en C. Cristina Lemini Guzmán**, con el apoyo financiero de los proyectos de DGAPA IN205396 y CONACYT 2400PM.

## CONTENIDO

I.	RESUMEN	1
II.	INTRODUCCION	3
	1. Antecedentes	3
	2. Planteamiento del problema	16
	3. Hipótesis	17
	4. Objetivos	17
III.	MATERIAL Y METODOS	18
	1. Métodos químicos	18
	2. Métodos farmacológicos	19
IV.	RESULTADOS Y DISCUSION.	21
	1. Síntesis de 17 $\beta$ -aminoestrógenos.	21
	2. Evaluación de la actividad estrogénica de 17 $\beta$ -aminoestrógenos	37
V.	CONCLUSIONES	54
VI	BIBLIOGRAFIA	55

## I. RESUMEN

La investigación dirigida al descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos para uso terapéutico es un campo de gran interés. Actualmente se cuenta con un gran número de medicamentos para el tratamiento de diversas enfermedades. Sin embargo, además de los efectos terapéuticos, todos producen efectos adversos. De ahí surge la necesidad de obtener nuevos fármacos con mayor eficacia y selectividad.

Los estrógenos están involucrados en la diferenciación, el mantenimiento de las características sexuales y la reproducción, actuando a través de mecanismos genómicos en los que regulan la transcripción y la proliferación celular y efectos no genómicos que implican una acción a nivel membranar que se produce en un periodo corto y que son de latencia muy breve.

Estos fármacos tienen un uso amplio como componentes de anticonceptivos, en la terapia sustitutiva, así como agentes antitumorales en el tratamiento de cáncer prostático. Sin embargo, se ha señalado que su uso puede aumentar el riesgo de trombosis venosa y arterial así como la posibilidad de infarto al miocardio. Estos efectos adversos se han relacionado con la dosis administrada y la potencia estrogénica.

Estudios experimentales, han descrito que la administración de dosis grandes de estrógenos naturales y sintéticos producen efectos bifásicos en la coagulación sanguínea de los roedores. En contraste con estas observaciones se ha descrito que los  $17\beta$ -aminoestrógenos producen efectos anticoagulantes de duración prolongada. Trabajos recientes, señalan que solo los  $17\beta$ -

aminoestrógenos producen actividad anticoagulante en roedores y no otros esteroides con grupos amino en el C-17 mostrando selectividad en su acción.

La obtención y evaluación de la actividad estrogénica de  $17\beta$ -aminoestrógenos son de interés para llevar a cabo estudios de relación estructura-química actividad-biológica que permitan obtener nuevos fármacos más selectivos y eficaces que puedan ser utilizados como estrógenos alternativos sin producir efectos trombogénicos.

Los objetivos de este trabajo fueron: 1) la preparación de los amino-estrógenos análogos de  $17\beta$  estradiol:  $17\beta$ -(3'-hidroxi-1'-propilamino)-1,3,5,(10)-estratrien-3-ol,  $17\beta$ -(4'-hidroxi-1'-butilamino) -1,3,5,(10)-estratrien-3-ol,  $17\beta$ -(5'-hidroxi-1'-pentilamino)-1,3,5 (10)-estratrien-3-ol y 2) evaluación de su efecto estrogénico en la rata Wistar inmadura.

Los resultados obtenidos en este trabajo contribuirán a un mejor entendimiento de la relación estructura-química actividad-biológica que permita el diseño de nuevos estrógenos potencialmente útiles como agentes terapéuticos.

## II. INTRODUCCION

### 1. Antecedentes.

Los compuestos denominados esteroides (esteroles, ácidos biliares, agliconas cardiotónicas, sapogeninas, provitamina D<sub>3</sub> y hormonas esteroidales) están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y animal.[1].

El término " hormona" (del griego *hormao*, excitar), fue dado por Starling en 1905 para nombrar a los agentes químicos producidos por las glándulas de secreción interna que son liberados a la circulación para regular los procesos metabólicos de diversas células. Estos producen su efecto a un punto distante de su fuente de producción [1].

Las hormonas esteroides comprenden: estrógenos, andrógenos, progestágenos, mineralocorticoides y glucocorticoides. Los tres primeros son frecuentemente llamados "hormonas sexuales" cuya función principal es el desarrollo y mantenimiento de las características sexuales y la reproducción. Los glucocorticoides y mineralocorticoides, participan de manera importante en la regulación del metabolismo de carbohidratos y de iones inorgánicos respectivamente [2].

Los estrógenos son esteroides con 18 átomos de carbono que difieren de los andrógenos en que carecen del grupo metilo en el C-10 y en contraste con todos los otros esteroides su anillo A es aromático, lo cual es una característica importante para su actividad estrogénica. Se producen en las células de la granulosa de los folículos ováricos, cuerpo lúteo y placenta y en pequeñas cantidades en los testículos. Están involucrados en la diferenciación, el mantenimiento de las características sexuales y la reproducción, actuando a

través de mecanismos genómicos que regulan la transcripción y la proliferación celular. También pueden actuar a nivel membranal produciendo efectos no genómicos que se observan en un período corto y que son de latencia muy breve [3].

Las hormonas estrogénicas son los principales agentes responsables de los cambios que ocurren en la pubertad en las niñas y el mantenimiento de las características sexuales en la mujer adulta. En la pubertad estimulan el desarrollo de la vagina, útero y trompas de falopio, producen crecimiento de los conductos en las glándulas mamarias, son responsables del crecimiento acelerado y del cierre de las epífisis de los huesos largos. Actúan junto con los progestágenos produciendo los cambios en los órganos genitales que tienen lugar durante el ciclo menstrual y el embarazo.

La respuesta de las hormonas estrogénicas está dada por su interacción con receptores específicos que se encuentran en órganos blanco. Los órganos blanco para las hormonas con actividad estrogénica son: útero, vagina, glándula mamaria, hipófisis e hipotálamo [2].

La acción de estas hormonas está mediada por proteínas que pertenecen a una superfamilia de receptores citoplásmicos o nucleares que funcionan como factores de transcripción. Los estrógenos estimulan el desarrollo de los tejidos que intervienen en la reproducción. En general, las hormonas ováricas aumentan el tamaño y el número de células al incrementar la velocidad de síntesis de proteínas, RNAr, RNAt, RNAm y DNA. Bajo estímulo estrogénico, el epitelio vaginal prolifera y se diferencia; el endometrio uterino prolifera y las glándulas sufren hipertrofia y alargamiento; el miometrio desarrolla una motilidad rítmica, intrínseca, y los conductos mamarios se ramifican. El estradiol que es la hormona natural tiene también efectos anabólicos sobre los huesos y los cartilagos y por tanto es promotor del crecimiento. Al actuar sobre los vasos sanguíneos periféricos, los estrógenos en forma típica causan vasodilatación y disipación del

calor.

El mecanismo de acción de los estrógenos se ilustra en la Figura 1 y consiste en el paso de la hormona a través de la membrana hacia el citoplasma por difusión simple. En el citoplasma se une a su receptor específico formando un complejo hormona-receptor (HR) que se trasloca al núcleo y se une a elementos de respuesta para estrógenos (ERE) en el DNA, esta unión da como resultado la iniciación de la transcripción de RNAm. El RNAm sale del núcleo y se transporta hacia los ribosomas para iniciar la traducción de una secuencia de aminoácidos y junto con el retículo endoplásmico la biosíntesis de una proteína con actividad celular específica [4].

Aunque la respuesta fisiológica tarda horas o días en llevarse a cabo, los esteroides son capaces de activar ciertos genes e iniciar la síntesis de proteínas, provocando efectos fisiológicos a corto y largo plazo. Las respuestas a corto plazo son las que ocurren dentro de las primeras horas después de la administración de estrógenos, por ejemplo un incremento del líquido intraluminal uterino. Las respuestas a largo plazo incluyen el incremento posterior en la síntesis de proteínas, que se manifiesta en el peso del útero, en el caso de animales inmaduros, se puede observar un crecimiento significativo del útero [3].

Los estrógenos que se producen en mayor cantidad en el humano son: estradiol ( $E_2$ ), estrona ( $E_1$ ), y estriol ( $E_3$ ) (Figura 2). El  $E_2$  es el principal producto de secreción del ovario durante la primera parte del ciclo menstrual. Después de la ovulación, estrógenos y progestágenos son sintetizados por las células de la granulosa y el cuerpo amarillo. El estriol es el principal producto metabólico del estradiol y se produce en grandes cantidades en la placenta durante el embarazo [3].

Los estrógenos se utilizan con mayor frecuencia como componentes de anticonceptivos y en terapia sustitutiva durante la menopausia. También son útiles

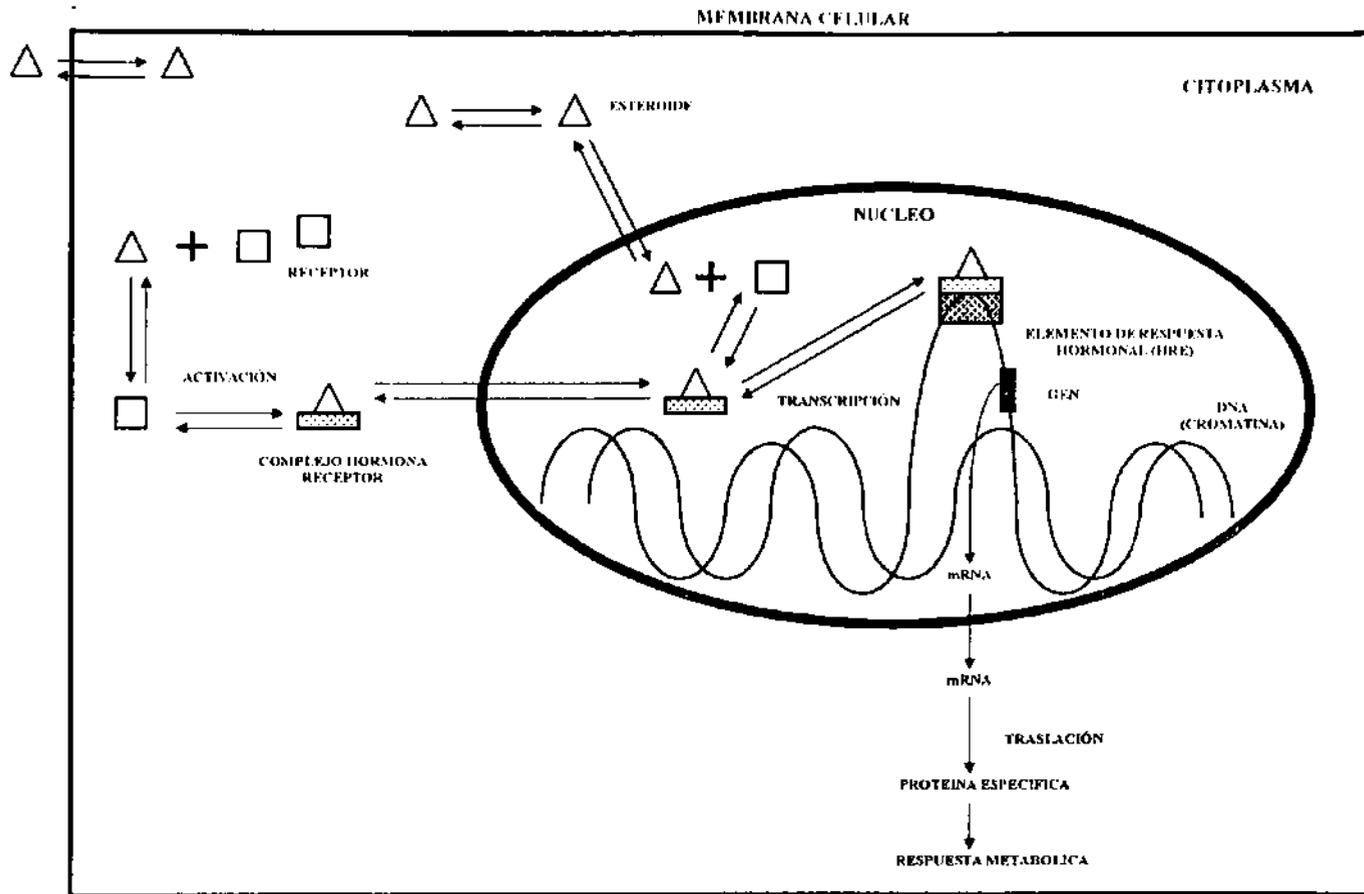
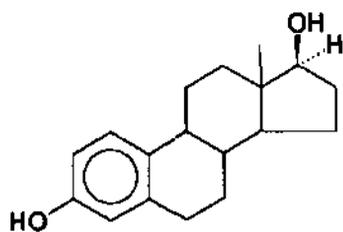
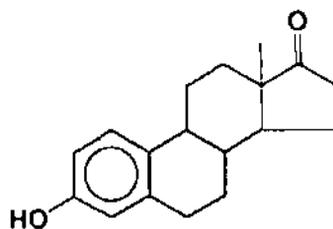


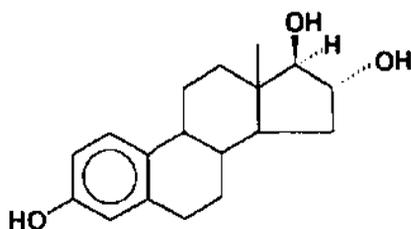
Figura 1. Modelo general de acción estrogénica. La hormona se enlaza con un receptor intracelular en el citoplasma o en el núcleo y causa un cambio conformacional. El complejo hormona receptor se une a una región específica del DNA denominado elemento de respuesta hormonal (HRE). Esta interacción da como resultado la activación o represión de un restringido número de genes.



**Estradiol (E<sub>2</sub>)**



**Estrona (E<sub>1</sub>)**



**Estriol (E<sub>3</sub>)**

**FIGURA 2: Hormonas estrogénicas que se producen en mayor proporción en el humano.**

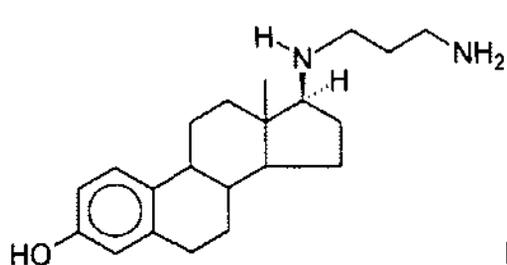
para el tratamiento del acné, hirsutismo, la osteoporosis senil, la supresión de la lactancia después el parto y como agentes antitumorales en el cáncer prostático [1-3]. Sin embargo, se ha señalado que su uso, en forma prolongada, puede aumentar el riesgo de trombosis venosa y arterial, cáncer de mama y cervico-uterino. Estos efectos adversos se han asociado con la dosis administrada y la potencia estrogénica; antecedentes familiares, tabaquismo y obesidad [5 - 18].

Estudios clínicos y experimentales han señalado que los estrógenos favorecen la coagulación de la sangre, ya que producen aumento en las concentraciones circulantes de los factores de coagulación II, VII, IX, y X [13, 17]. También producen aumentos en la concentración de fibrinógeno (factor I) [14, 18] y disminución en la actividad fibrinolítica [14,17]. Todos estos factores están asociados con efectos trombogénicos. Además pueden producir disminución del tono vascular favoreciendo la estasis y retardar el flujo sanguíneo factores que favorecen la trombosis [19].

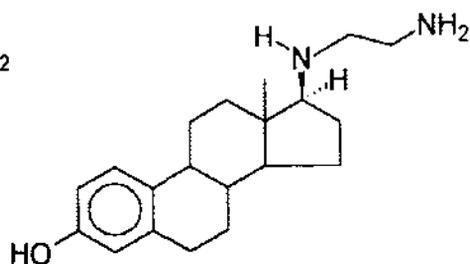
La administración intraperitoneal de estrógenos naturales y sintéticos producen efectos bifásicos sobre la coagulación sanguínea en roedores. En la primera fase se observa un efecto anticoagulante de duración breve (3-7.5 horas) seguida de una fase de hipercoagulabilidad de mayor duración (varios días). Si la administración se lleva a cabo por vía subcutánea solo se observa el efecto hipercoagulante [20].

En contraste con los efectos descritos anteriormente, Rubio y cols. [21] encontraron que, compuestos semejantes al estradiol en los que el hidroxilo en la posición  $17\beta$  se substituye por un grupo amino monosustituido, producen en roedores efectos anticoagulantes dosis-dependientes y de duración prolongada [23].

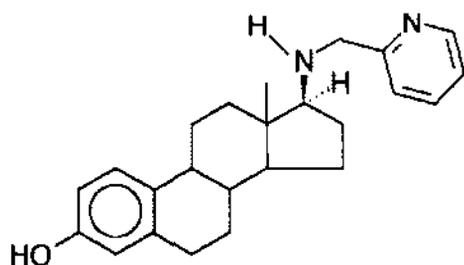
Así el prodiame (1, Fig 3), administrado en dosis de 360 mg/100 g de peso a ratones macho CD1 por vía subcutánea produce un aumento del tiempo de



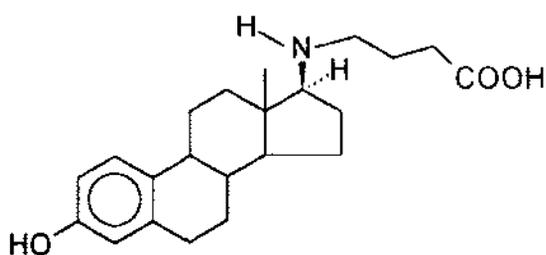
**Prodiame (1)**



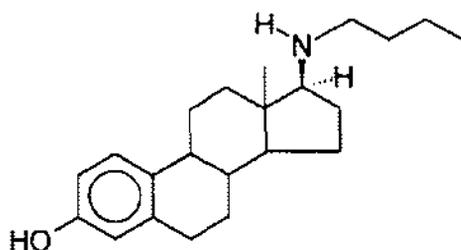
**Endiame (2)**



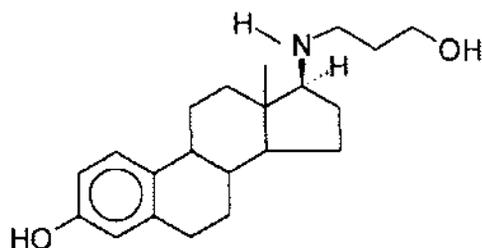
**Picae (3)**



**Proacame (4)**



**Buame (5)**



**Prolame (6)**

**Figura 3: 17β-aminoestrógenos.**

coagulación del 96% con respecto al grupo control y este efecto anticoagulante puede detectarse en un 28% aún después de 72 horas. Sin embargo, este compuesto produce efectos tóxicos sobre el sistema nervioso central que se manifiestan como aumento de la actividad motora de los animales tratados y en algunos casos se producen convulsiones. De manera semejante la administración de los  $17\beta$ -diamino estrógenos, endiame (2) y picae (3) dos diamino estrógenos relacionados con el prodiame (Fig 3) produjeron también los efectos adversos señalados.

Posteriormente se observó la disminución del efecto anticoagulante al sustituir el grupo amino terminal del prodiame (1) por un grupo carboxilo (proacame 4), dió lugar a la pérdida del efecto anticoagulante. Sin embargo, la sustitución por un grupo metilo (buame 5), o bien un hidroxilo (prolame 6), produjo compuestos de mayor potencia anticoagulante que la observada con prodiame (1) y sus análogos 2 y 3, sin dar lugar a los efectos neurotóxicos. El prolame (6) presenta efecto anticoagulante prolongado que puede observarse hasta las 72 h en diversos roedores [22]. El buame, aunque también produce efectos anticoagulantes semejantes al prolame, tiene toxicidad mayor [23].

La estructura química del prolame contiene un grupo amino-alcohol en la posición  $17\beta$  con tres átomos de carbono intermedios entre el grupo amino y el hidroxilo. Observaciones de los mismos autores, mostraron que la cadena central podía ser aumentada hasta seis átomos de carbono sin que el efecto anticoagulante se perdiera. El butolame, el pentolame y el hexolame (7, 8 y 9; Fig 4) producen efectos de incremento del tiempo de coagulación en roedores. En la figura 5 se muestra un estudio comparativo en el ratón macho CD1 de los efectos sobre la coagulación sanguínea por la administración de una dosis equivalente de los  $17\beta$  amino estrógenos prolame (6), butolame (7), pentolame (8) y hexolame (9). En este estudio pudo observarse que el hexolame es el que produce efectos anticoagulantes de menor magnitud y duración [24 - 26].

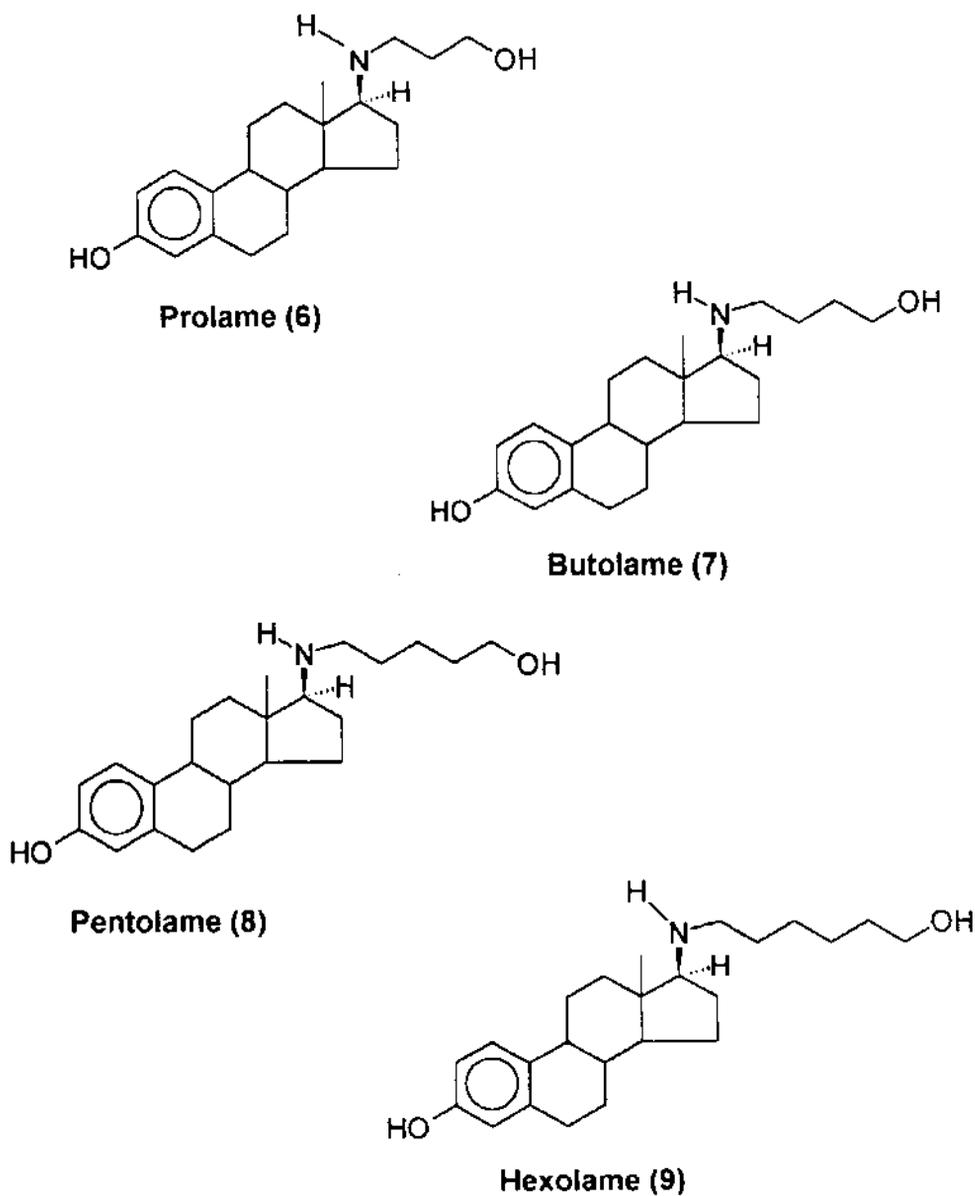


FIGURA 4: Serie homóloga de 17β-aminoestrógenos.

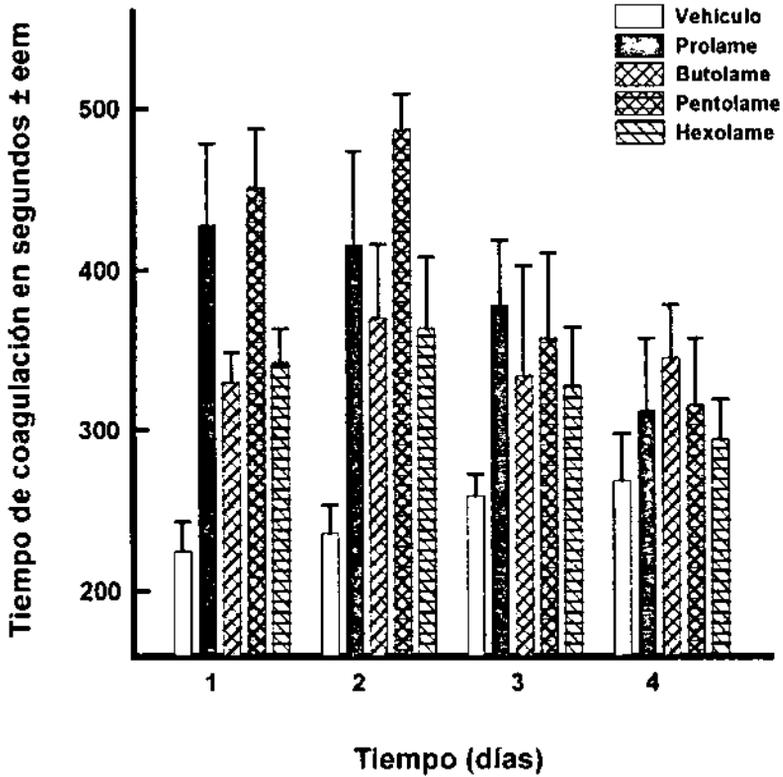


FIGURA 5: Curso temporal de los efectos anticoagulantes en el ratón CD1 por la administración única de 8 mg/100g de prolame (6), butolame (7), pentolame (8) y hexolame (9). N = 5

Por otra parte, los  $17\beta$  amino estrógenos mencionados anteriormente han sido evaluados utilizando el modelo de Allen y Doisy [27]. Este modelo consiste en la administración de estrógenos en ratas o ratones ovariectomizadas (Ovx), en los que se observa la restauración del epitelio vaginal produciendo cornificación vaginal. Estos efectos generalmente se comparan con los producidos por la hormona natural  $E_2$ . En la tabla 1 se presentan los resultados obtenidos por Rubio y cols. [26] donde se puede apreciar que estos compuestos son capaces de producir cornificación vaginal en el ratón hembra Ovx, lo que indicó su capacidad para producir efectos estrogénicos. Sin embargo estos datos son solo cualitativos y ha sido necesario emplear bioensayos que nos permitan valorar el efecto estrogénico de este grupo de fármacos para establecer su potencia relativa al  $E_2$ .

Resultados que han sido publicados recientemente [26] señalan que el pentolame (8) es uno de los compuestos que produce mayor efecto sobre la coagulación sanguínea en roedores; en la rata Wistar Ovx produce efectos estrogénicos muy débiles. Sin embargo fue necesario comparar los efectos de este fármaco con los producidos por sus congéneres prolame (6) y butolame (7), para corroborar si este comportamiento es general y debido a la introducción del grupo amino en el C-17; o bien si la longitud de la cadena del grupo amino es la responsable de la actividad estrogénica.

### **Evaluación de la Respuesta Uterotrófica.**

Los estudios de prolame (6), butolame (7) y pentolame (8) a nivel del eje hipotálamo-hipófisis se están realizando, sin embargo estos son de mayor duración y costo. Un modelo que es un bioensayo rápido y ampliamente utilizado para la evaluación de la actividad estrogénica es el que desarrollaron Evans, Varney y Koch [28]. Este se basa en el efecto que produce el tratamiento con  $E_2$  sobre el peso uterino de roedores hembra ovariectomizadas (Ovx). Generalmente los fármacos que se evalúan por este método son administrados por vía

**TABLA 1: Comparación de la duración del efecto estrogénico (cornificación vaginal) de estradiol, prolame, butolame, pentolame y hexolame en ratón hembra ovariectomizada CD1.**

TRATAMIENTO	DOSIS/día/ 3 DIAS (µg)	N	PESO CORPORAL (g ± eem)	CORNIFICACION VAGINAL DIAS				
				0	4	7	9	11
V	0.1 ml	14	32±0.8	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14
E <sub>2</sub>	1	14	32±0.9	0/14	14/14	12/14	6/14	0/14
E <sub>2</sub>	10	14	32±0.8	0/14	14/14	13/14	8/14	0/14
Prolame	1.2	8	32±0.9	0/8	6/8	0/8	0/8	0/8
Prolame	12	8	32±1.2	0/8	8/8	8/8	3/8	0/8
Butolame	1.3	7	30±0.6	0/7	7/7	0/7	0/7	0/7
Butolame	12.6	7	30±0.8	0/7	7/7	2/7	0/7	0/7
Pentolame	1.3	7	31±0.7	0/7	7/7	2/7	0/7	0/7
Pentolame	13.1	7	30±0.8	0/7	7/7	2/7	0/7	0/7
Hexolame	1.4	7	39±1.7	0/7	2/7	0/7	0/7	0/7
Hexolame	14.6	7	39±0.9	0/7	7/7	2/7	0/7	0/7

subcutánea tres días consecutivos. Al término del tratamiento se sacrifica a los animales, se les extrae el útero y se pesa. El aumento de peso de los úteros de animales tratados con respecto a los del grupo control (que solo se les administra el vehículo) constituye un parámetro muy confiable para evaluar actividad estrogénica. Este método puede ser utilizado tanto en animales adultos como en animales inmaduros.

Una variación que se ha descrito es el modelo desarrollado por Bulbring y Burn en 1935 [29]. Estos investigadores observaron que los estrógenos producen un aumento rápido del peso uterino después de 6 horas de la administración, debido a un incremento de líquido intraluminal en el útero, por lo que sugirieron utilizar esta propiedad para evaluar los efectos sistémicos de los estrógenos en rata o ratón tanto ovariectomizados como en inmaduros. Este método puede ser utilizado 24 horas después de la última administración eliminando el líquido retenido en el útero.

Por otra parte debido a la necesidad que se tiene de unificar criterios de evaluación *in vivo* y con el fin de detectar sustancias estrogénicas, se ha propuesto en los últimos años que la evaluación del efecto uterotrópico sea utilizando los parámetros del peso húmedo y seco del útero [30]. Esta modalidad fue la que se aplicó en este trabajo, utilizando ratas Wistar inmaduras.

## 2. Planteamiento del problema.

La evaluación estrogénica de los  $17\beta$ -aminoestrógenos es de gran interés debido a que estos compuestos pueden dar lugar a fármacos de uso terapéutico.

Los  $17\beta$ -aminoestrógenos producen cornificación vaginal en ratas Wistar y en ratón CD-1 hembras adultas ovariectomizadas (Ovx), disminución de la concentración de la hormona luteinizante (LH) e inducción de los receptores de progesterona.

Debido a estos antecedentes se consideró necesario evaluar la actividad uterotrónica de los  $17\beta$ -aminoestrógenos: prolame (6), butolame (7) y pentolame (8) en rata Wistar inmadura mediante el método de Evans, Varney y Koch, ya que este parámetro se considera un indicador confiable de actividad estrogénica, y es probable que este grupo de sustancias puede tener efectos semejantes a los producidos por  $E_2$ .

El efecto anticoagulante prolongado que presenta este grupo de fármacos es motivo de interés por diferentes grupos de investigación. Se están realizando estudios para el establecimiento de su mecanismo de acción, *in vitro*, que muestran un efecto inhibitorio sobre la agregación plaquetaria y su afinidad por receptores estrogénicos en estudios *in vivo* en relación a su efecto estrogénico.

La obtención de otros compuestos estrogénicos novedosos con actividad anticoagulante de mayor potencia serían de gran utilidad terapéutica tanto en terapias anticonceptivas como en el tratamiento del cáncer prostático; ya que estos pueden disminuir los efectos adversos (trombosis venosa y arterial, riesgo de infarto al miocardio y trombosis cerebral) producidos por los fármacos que se consumen en la actualidad.

### 3. Hipótesis.

Debido a que los  $17\beta$ -aminoestrógenos tienen relación estructural con el estradiol es probable que produzcan efectos estrogénicos semejante a los que produce la hormona natural.

### 4. Objetivos.

Objetivo general:

Evaluar la actividad estrogénica de los  $17\beta$ -aminoestrógenos prolame, butolame y pentolame en rata Wistar inmadura.

Objetivos específicos:

1. Llevar a cabo la síntesis de amino-estrógenos análogos de  $17\beta$  estradiol: el  $17\beta$ -(3-Hidroxi-1-propilamino)-1,3,5,(10)-estratrien-3-ol (6),  $17\beta$ -(4-Hidroxi-1-butilamino)-1,3,5,(10)-estratrien-3-ol (7) y el  $17\beta$ -(5-Hidroxi-1-pentilamino)-1,3,5,(10)-estratrien-3-ol (8).
2. Evaluar el efecto estrogénico de los compuestos prolame (6), butolame (7), y pentolame (8) en la rata Wistar hembra inmadura, comparando sus efectos con los producidos por el  $17\beta$ -estradiol; utilizando el peso del útero como un marcador biológico de actividad estrogénica.

### III. MATERIAL Y METODOS

#### 1. Métodos Químicos.

Todos los solventes y reactivos utilizados fueron grado analítico y fueron empleados sin purificación. La estrona fue obtenida de los laboratorios Syntex S.A.. 3-amino-1-propanol, 4-amino-1-butanol, 5-amino-1-pentanol y boro-hidruro de sodio fueron obtenidos de Aldrich. La pureza de los productos fue establecida por espectroscopía (IR, RMN-<sup>1</sup>H, y EM) y el seguimiento de las reacciones se realizó empleando cromatografía en capa fina con placas de gel de sílice 60 Merck F-254, utilizando como revelador yodo. Los puntos de fusión de los compuestos fueron determinados en un aparato Electrothermal de capilares y no están corregidos. Los espectros de infrarrojo (IR) fueron obtenidos en pastillas de bromuro de potasio usando un espectrofotómetro Nicolet FT-55X. Los espectros de resonancia magnética nuclear (RMN-<sup>1</sup>H) fueron registrados mediante un espectrofotómetro Varian-Gemini de 200 MHz, en CDCl<sub>3</sub>-DMSO-d<sub>6</sub> y están reportados en partes por millón (ppm), usando como referencia interna tetrametilsilano. Los espectros de masas fueron obtenidos en un espectrofotómetro Hewlett-Packard 5985-B por impacto electrónico con introducción directa de la muestra a 70 ev.

**Síntesis de los 17β-aminoestrógenos:** 17β-(3-Hidroxi-1-propilamino)-1,3,5,(10)-estratrien-3-ol (**6**) 17β-(4-Hidroxi-1-butilamino)-1,3,5,(10)-estratrien-3-ol (**7**) y el 17β-(5-Hidroxi-1-pentilamino)-1,3,5,(10)-estratrien-3-ol (**8**)

Una mezcla de 1.5 g (5.5 mmoles) de estrona, 9.6 mmol de las aminas correspondientes y 10 ml de éter isopropílico se calentaron hasta disolución. Se evaporó el disolvente y se calentó a 80-85° C por 4 horas. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, se formó un sólido blanco, que se trituró

con 20 ml de acetona. El producto obtenido se filtró y secó al vacío. Se obtuvieron de 90 al 98% de rendimiento de las iminas correspondientes que fueron utilizadas inmediatamente para la reducción a las aminas mediante la técnica siguiente:

Las iminas (4.5 mmoles) se disolvieron en 20 ml etanol, y se les agregó 1.0 g de borohidruro de sodio en porciones durante 30 minutos. La mezcla de reacción se calentó a reflujo 30 minutos y posteriormente se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 16-20 horas. Se agregaron a la reacción 100 ml de agua y se enfrió con un baño de hielo, el precipitado formado se filtró, lavó con agua y secó al vacío. Los productos fueron recristalizados con éter isopropílico-metanol.

## 2. Métodos Farmacológicos.

**Fármacos.** Las sustancias utilizadas en los experimentos: el estradiol 1,3,5(10)estratrieno-3,17 $\beta$ -diol, E<sub>2</sub>, fue proporcionado por Syntex S.A. Los aminoestrógenos: 17 $\beta$ -(3-Hidroxi-1-propilamino)-1,3,5,(10)-estratrien-3-ol (**6**) 17 $\beta$ -(4-hidroxi-1-butilamino)-1,3,5,(10)-estratrieno-3-ol (**7**) y el 17 $\beta$ -(5-hidroxi-1-pentilamino)-1,3,5,(10)-estratrien-3-ol (**8**) se prepararon como se describe en la primera sección [31-32].

**Animales.** Los experimentos se llevaron a cabo en ratas Wistar hembras inmaduras de 20 días de nacidas, con peso de 30-40g procedentes del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Los animales fueron mantenidos a temperatura constante de 20-22°C en periodos de luz-obscuridad de 12h-12h y se alimentaron con nutricubos de la marca Purina y agua *ad libitum*.

**Diseño Experimental.** Los animales fueron marcados de manera individual para su identificación, mediante pequeñas muescas hechas en el borde de las orejas siguiendo la clave empleada en el laboratorio. La actividad estrogénica de E<sub>2</sub>, **6**, **7** y **8** fue evaluada por el método de peso uterino de Evans, Varney y Koch [28]. En cada bioensayo, se formaron grupos de 5 animales por lote. Se distribuyeron en base a un arreglo de cuadrados latinos, en estratos basados en el peso corporal y

se asignaron los diferentes tratamientos al azar. En todos los experimentos se incluyó un grupo que recibió estradiol ( $E_2$ ) y otro grupo al que solo se le administró el vehículo (V) [33].

A los diferentes grupos se les administraron por vía subcutánea, durante tres días consecutivos en experimentos separados los aminoestrógenos: prolame (6), butolame (7) y pentolame(8) en las dosis mostradas en las tablas correspondientes. El control positivo  $E_2$ , se administró en la dosis de 10  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de peso corporal/día y el vehículo (V), 10 ml/Kg de peso corporal/día. Al cuarto día los animales fueron sacrificados por dislocación cervical y se hizo una incisión longitudinal en el abdomen para la disección de los cuernos uterinos de la rata. El útero se colocó en una caja de Petri con solución salina, donde se eliminó la grasa. Posteriormente el órgano se secó sobre un papel filtro eliminando el líquido intraluminal con la ayuda de una espátula. Se colocó en una caja previamente pesada para obtener el peso uterino húmedo [34]. Posteriormente los úteros fueron colocados en una estufa a 70° C durante 24 horas y pesados nuevamente para obtener el peso uterino seco. Los resultados del peso uterino tanto húmedo como seco fueron calculados por 100g de peso corporal y expresados en porcentaje.

Las dosis efectivas cincuenta 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.).

**Análisis Estadístico.** Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y pruebas de comparaciones múltiples utilizando el método de Dunnet para cada caso en particular. Se consideraron diferencias significativas entre los grupos cuando los valores de p fueron menores de 0.05 [33].

## VII. RESULTADOS Y DISCUSION

### 1. Síntesis de los $17\beta$ -aminoestrógenos.

La obtención de los  $17\beta$ -aminoestrógenos: prolame (6), butolame (7) y pentolame (8) se muestra en la figura 6. Estos compuestos fueron preparados siguiendo los procedimientos descritos por Irmscher [31] y Blickenstaff [32].

El primer paso consistió en la reacción de adición-eliminación que ocurre entre la estrona y la amina correspondiente a una temperatura entre 80 y 85°C, las iminas correspondientes se obtuvieron en rendimientos del 90 al 98%. Estas se caracterizaron comparando su punto de fusión y espectro infrarrojo con una muestra preparada originalmente por Lemini y cols. [25] en donde puede apreciarse la banda característica del grupo imino (C=N), de 1665 a 1675  $\text{cm}^{-1}$  y la desaparición de la banda del grupo carbonilo del producto original (estrona).

Posteriormente se llevó a cabo la reducción de las iminas en solución etanólica empleando borohidruro de sodio como agente reductor. Los  $17\beta$  amino estrógenos prolame (6), butolame(7) y pentolame (8) se obtuvieron en un rendimiento del 82 al 96%. Estos productos fueron purificados por cristalización fraccionada utilizando éter isopropílico-metanol y éter etílico-metanol. La identificación de estos compuestos se llevó a cabo por comparación de sus constantes físicas; (punto de fusión) y sus características espectroscópicas reportadas en la literatura [25, 32].

Los amino estrógenos prolame (6),butolame (7) y pentolame (8) presentan en su espectro de infrarrojo las bandas en 3300 a 3240  $\text{cm}^{-1}$  características de los grupos OH y NH.

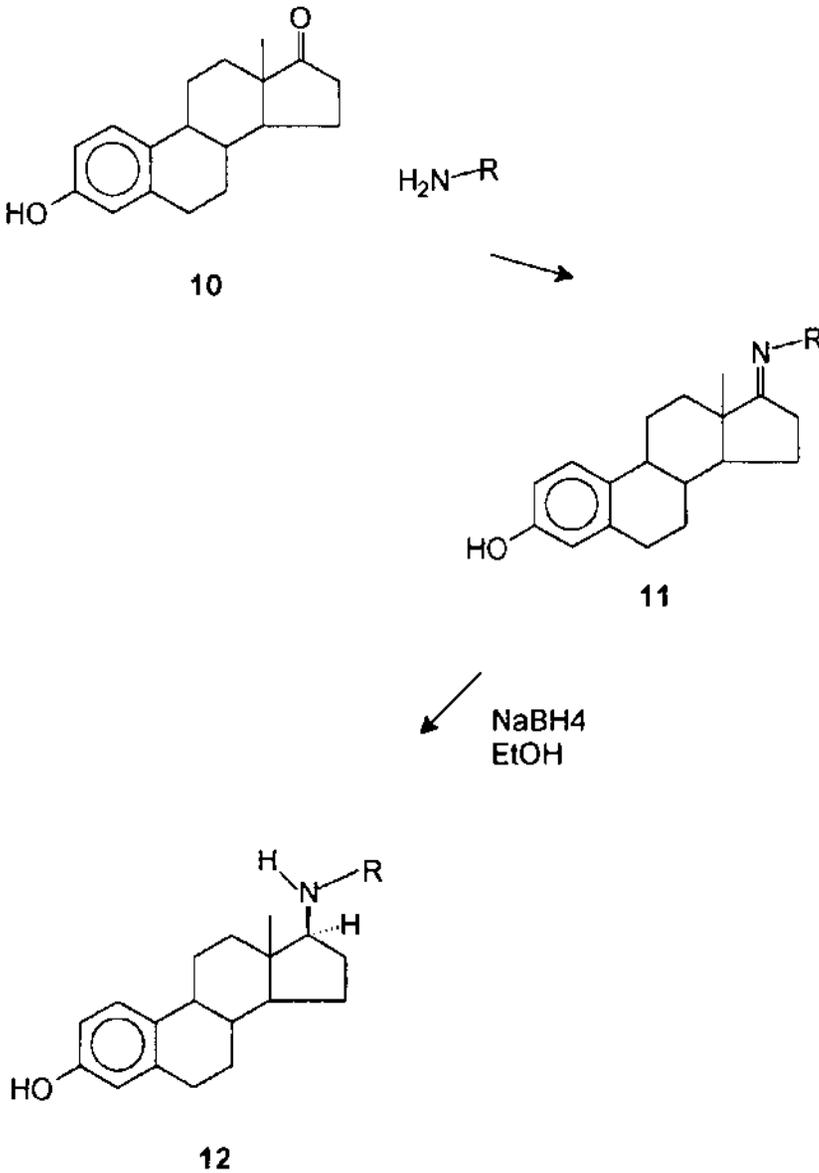


FIGURA 6: Síntesis de 17β-aminoestrógenos.

En su espectro de resonancia magnética nuclear aparece la señal correspondiente al metilo angular de 0.65 a 0.75 ppm correspondientes al prolame, butolame y pentolame (6, 7 y 8) que están de acuerdo con las señales reportadas para estos compuestos [25, 32]. En el caso del prolame (6) puede identificarse un triplete en 3.42 correspondiente a los metilenos vecinos al grupo OH, para los compuestos butolame (7) y pentolame (8) esta señal aparece en 3.57 y 3.63 ppm respectivamente. La señal de los metilenos en todos los casos aparece como un multiplete en la zona de 1.10-2.65 ppm así mismo en esta misma zona puede identificarse el protón del grupo amino que es intercambiable con D<sub>2</sub>O.

Los protones aromáticos se observan como tres señales: para el protón del C-1 se presenta una señal doble con constantes de acoplamiento mayores a 8 Hz, el protón del C-2 aparece como una señal doble de dobles con dos constantes de acoplamiento una mayor de 8 Hz y otra de 2.5 Hz. El protón en C-4 aparece como una señal doble con constantes de acoplamiento correspondientes a 2.5 Hz.

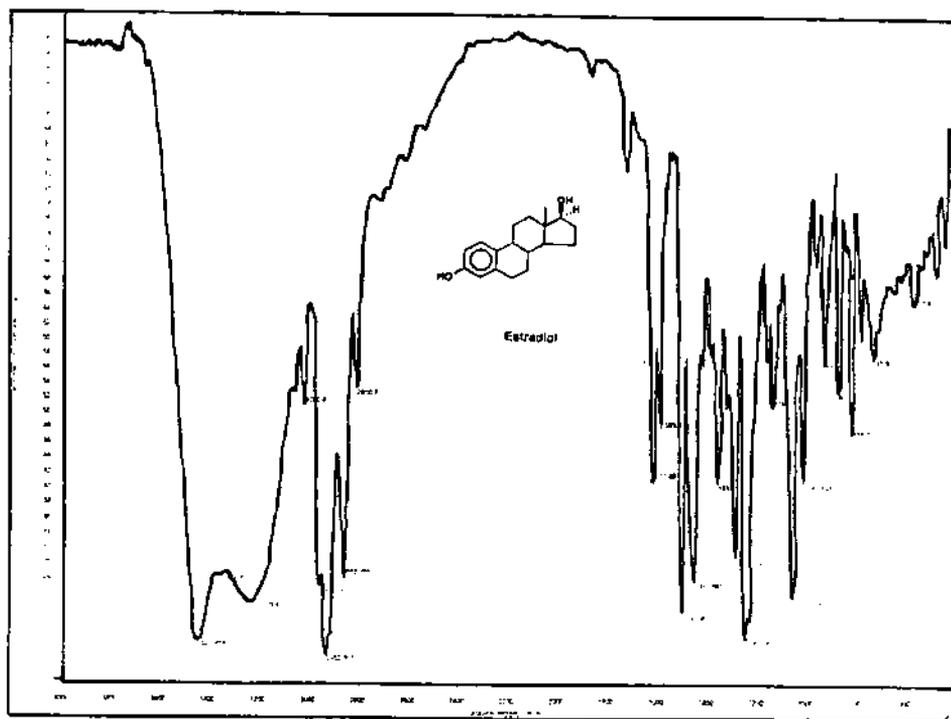
Sus espectros de masas muestran en todos los casos las señales correspondientes al ión molecular que corresponden a los pesos moleculares de los aminoestrógenos prolame (6), butolame (7) y pentolame (8). Estos datos fueron suficientes para establecer la identidad de estos compuestos.

**17 $\beta$ -(3-Hidroxi-1-propilamino)-1,3,5,(10)-estratrien-3-ol (6).** p.f. 194-195°  
C. IR,  $\nu_{\max}$  3420-3240 (OH y NH), 1600 (anillo aromático) cm<sup>-1</sup>; RMN-<sup>1</sup>H,  $\delta$  0.65 (s, 3H, 18-CH<sub>3</sub>), 1.15-2.25 (m), 2.62 (m, 2H, -OH y NH) 2.76 (m, 3H, -N-CH<sub>2</sub> y 17-CH), 3.15 (s, CH<sub>2</sub>OH), 3.42 (t, C21), 6.45 (d, J=2.6 Hz, 1H, H-4), 6.64 (dd, J=8.5 y 2.6=Hz, 1H, H-2), 7.01 (d, J=8.5 Hz, 1H, H-1); EM m/z 329 (M<sup>+</sup> %), 114 (100%).

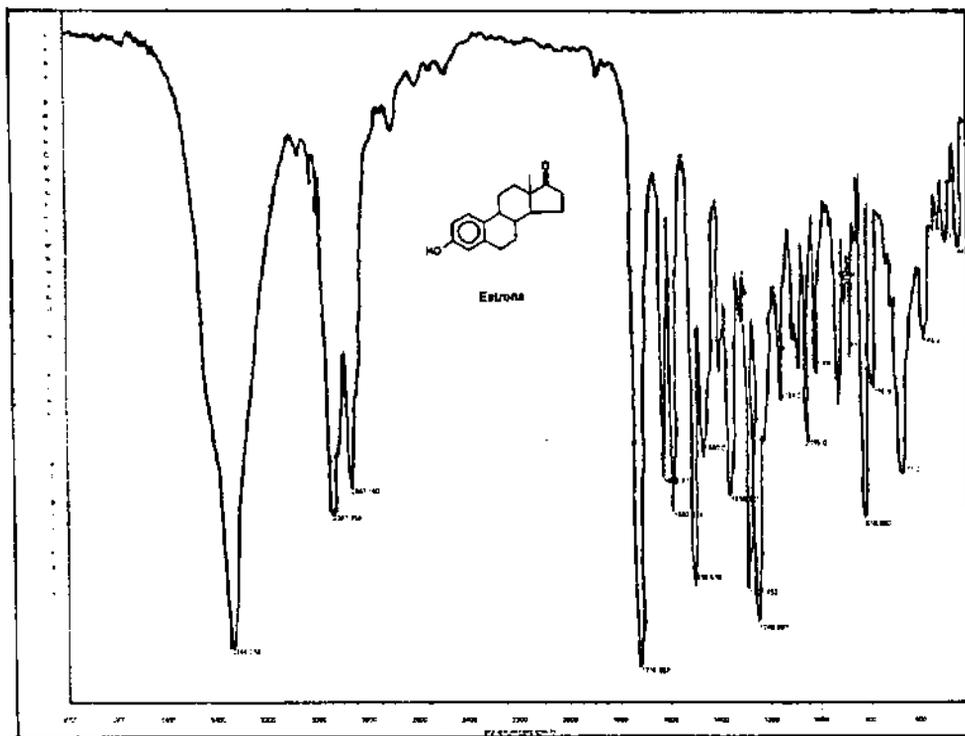
**17 $\beta$ -(4-Hidroxi-1-butilamino)-1,3,5,(10)-estratrien-3-ol (7).** p.f. 147-148°  
C. IR,  $\nu_{\max}$  3300-3020 (OH y NH), 1610 (anillo aromática) cm<sup>-1</sup>; RMN-<sup>1</sup>H,  $\delta$  0.75

(s, 3H, 18-CH<sub>3</sub>), 1.17-2.31 (m), 2.63 (m, 2H, -OH y NH) 2.78 (m, 3H, -N-CH<sub>2</sub> y 17-CH), 3.57 (t, J=6.2 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 6.55 (d, J=2.7 Hz, 1H, H-4), 6.62 (dd, J=8.4 z y 2.7 Hz, 1H, H-2), 7.08 (d, J=8.4 Hz, 1H, H-1); EM m/z 343 (M<sup>+</sup> 9.8%), 284 (12.5%), 128 (100%).

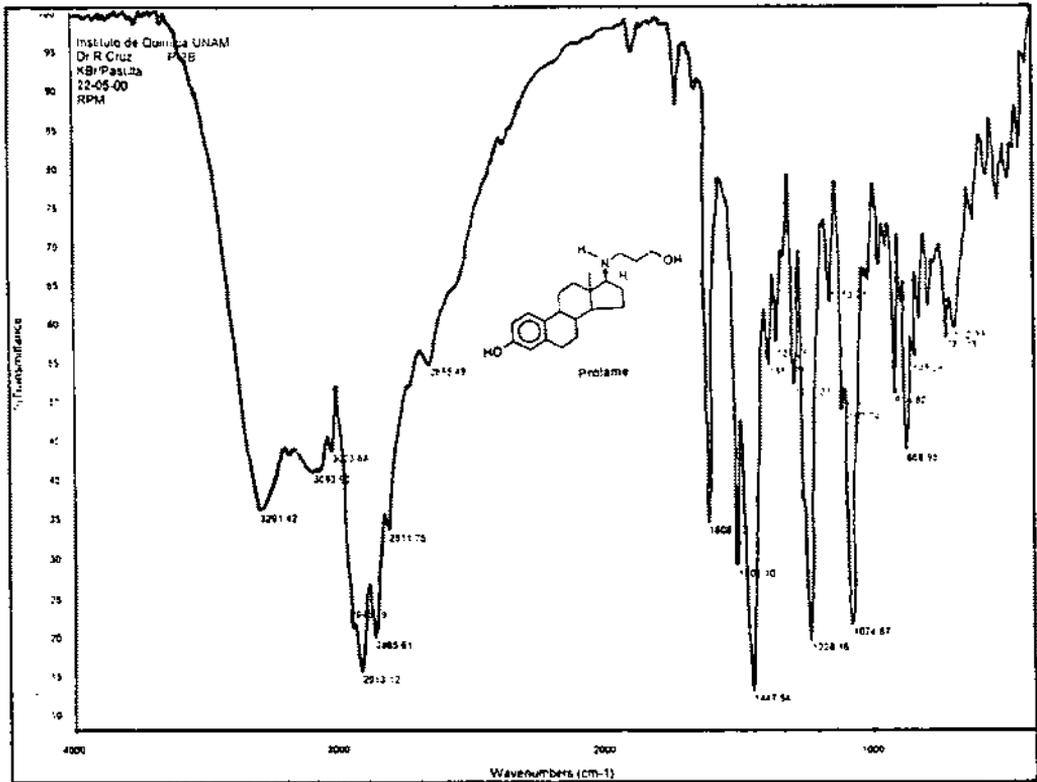
**17β-(5-Hidroxi-1-pentilamino)-1,3,5,(10)-estratrien-3-ol (8).** p.f. 164-165°C; IR.  $\nu_{\max}$  3400-3240 (OH y NH), 1605 (anillo aromático) cm<sup>-1</sup>; RMN-<sup>1</sup>H,  $\delta$  0.72 (s, 3H, 18-CH<sub>3</sub>), 1.18-2.32 (m), 2.64 (m, 2H, -OH y NH) 2.78 (m, 3H, -N-CH<sub>2</sub> y 17-CH), 3.63 (t, J=6.40 Hz, 2H, CH<sub>2</sub>OH), 6.57 (d, J=2.6 Hz, 1H, H-4), 6.64 (dd, J=8.5 z 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%).



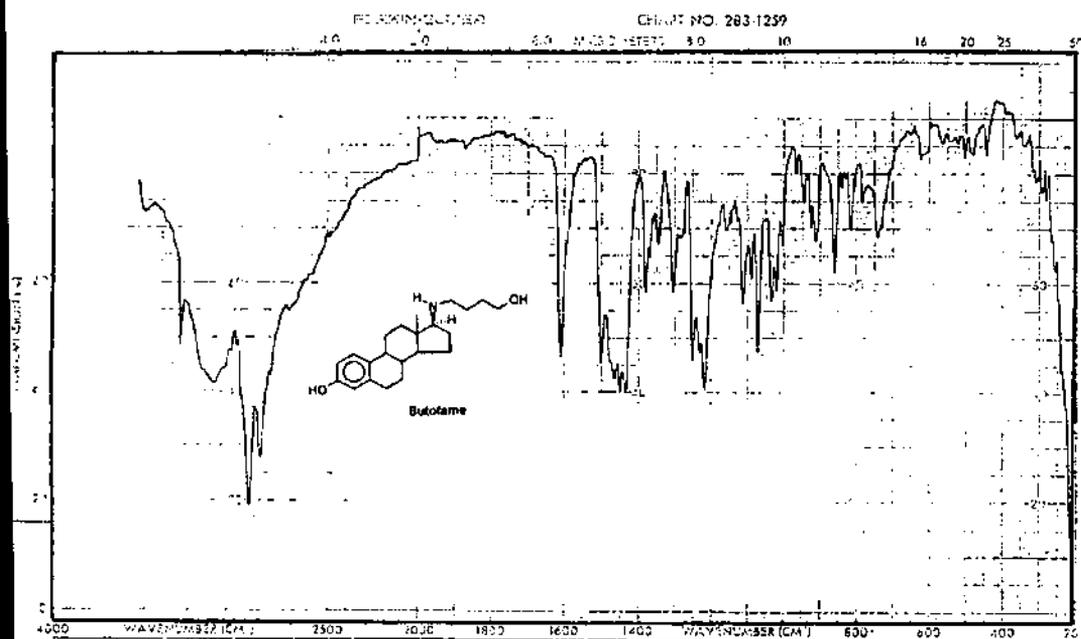
**Espectro de infrarrojo de estradiol.**



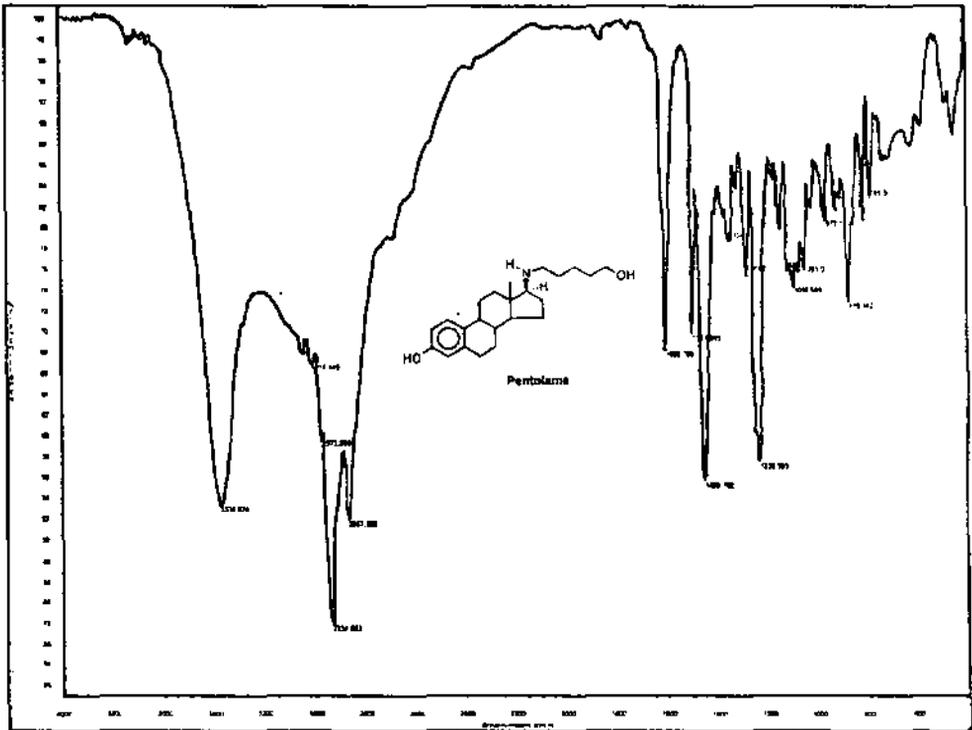
Espectro de infrarrojo de estrona.



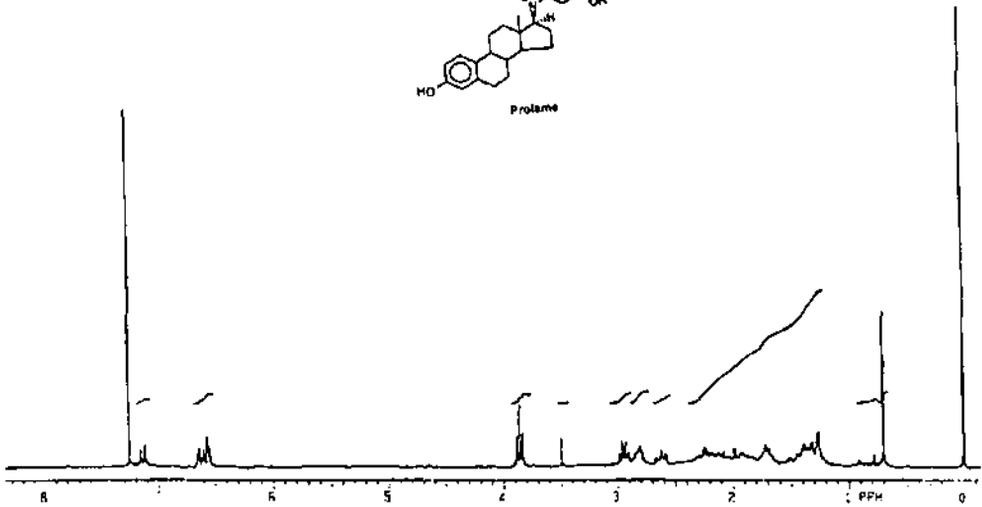
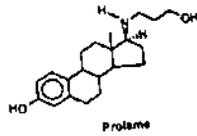
Espectro de infrarrojo de prolame (6).



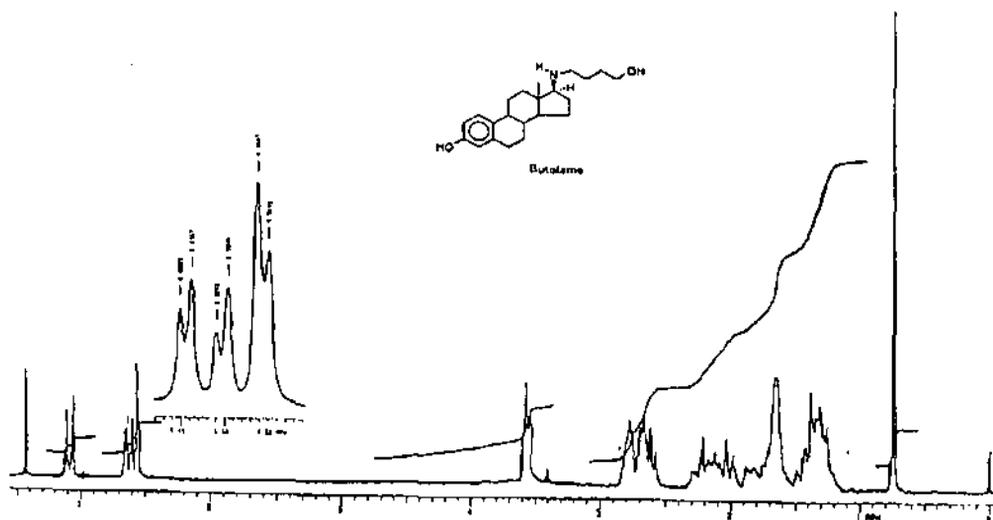
**Espectro de infrarrojo de butolame (7).**



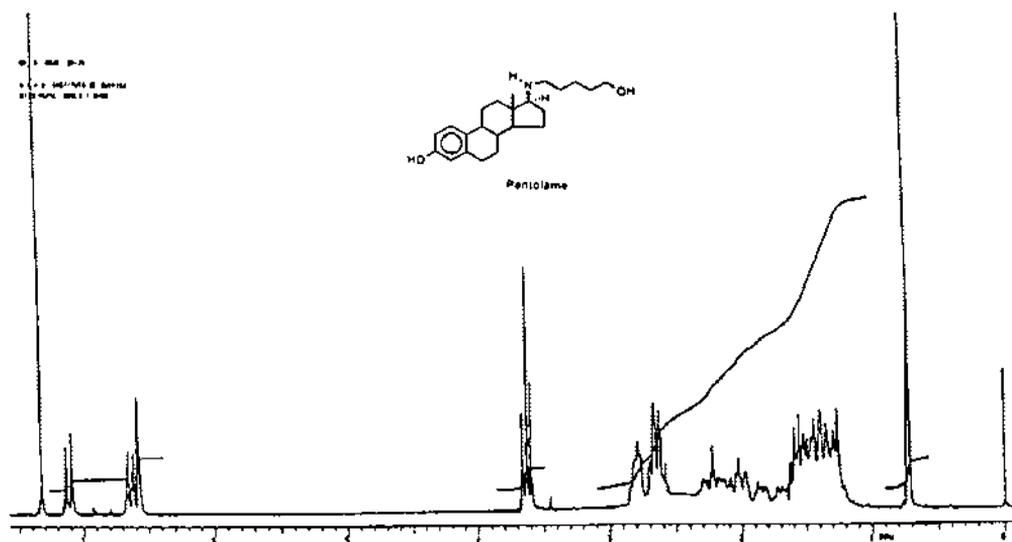
Espectro de infrarrojo de pentolame (8).



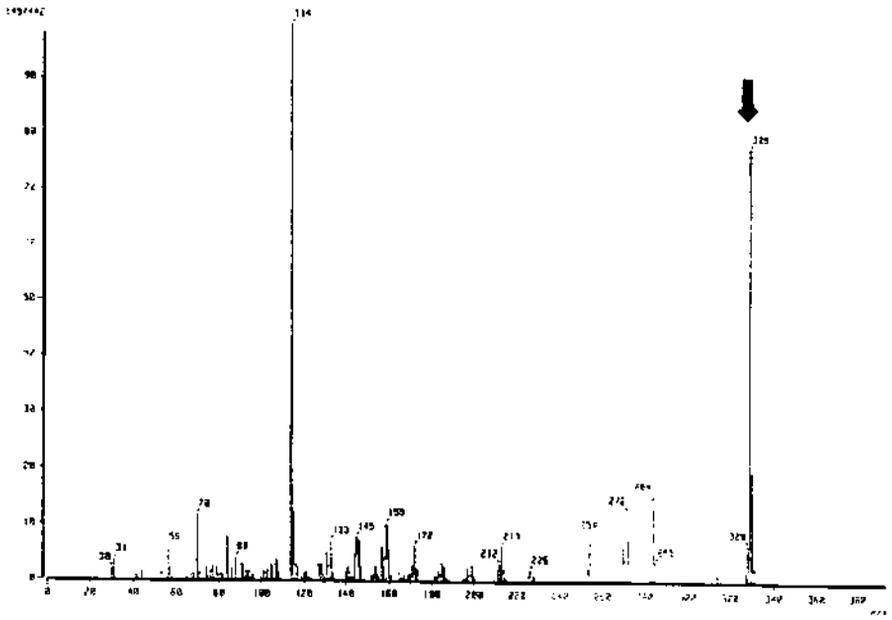
Espectro de resonancia magnetica nuclear de prolame (6).



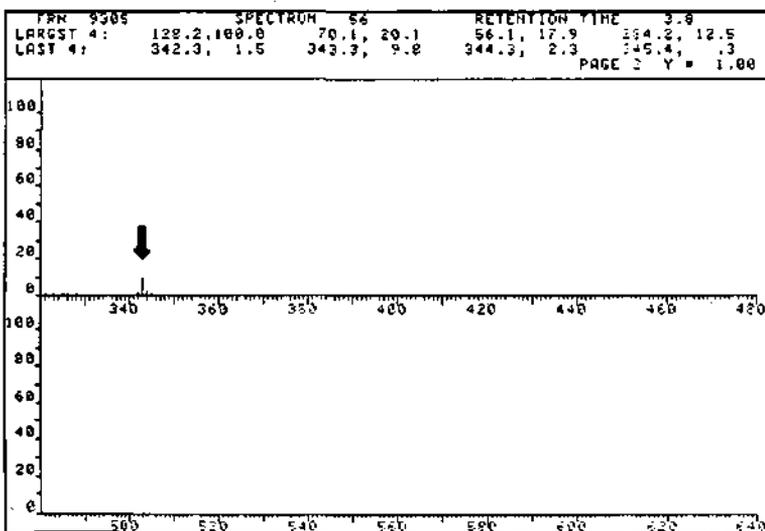
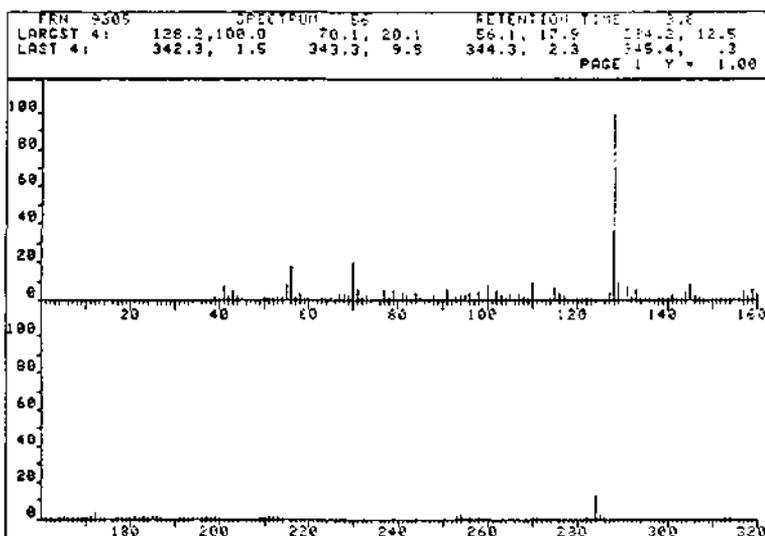
Espectro de resonancia magnetica nuclear de butolame (7).



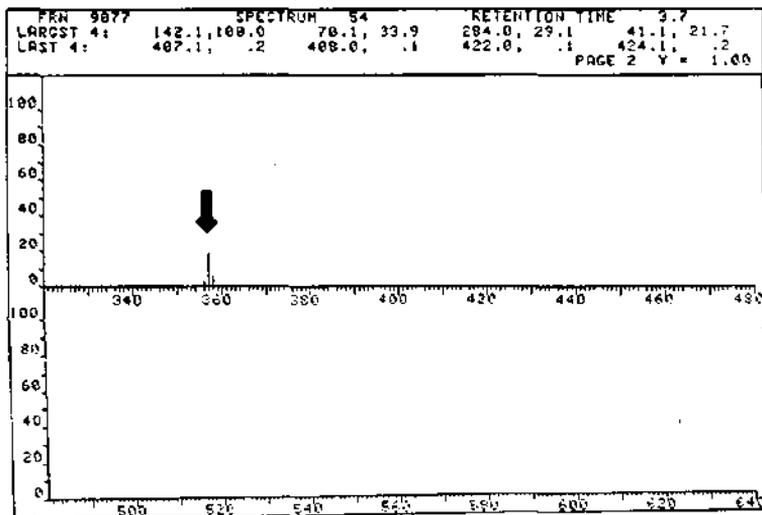
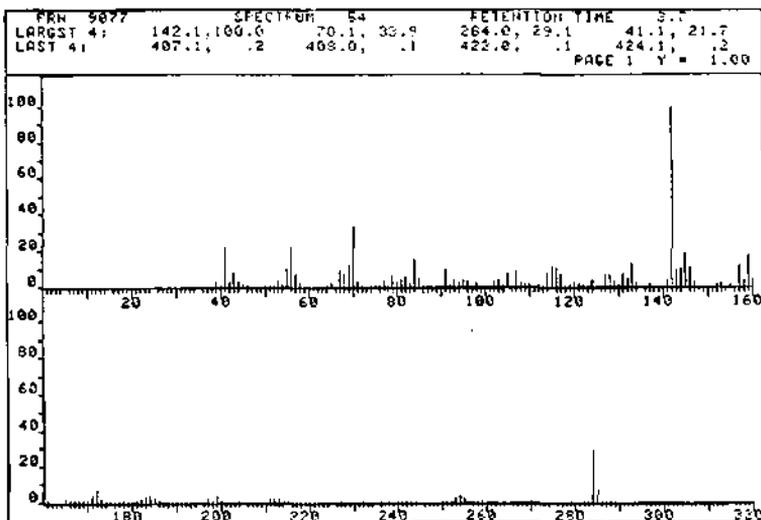
Espectro de resonancia magnetica nuclear de pentolame (B).



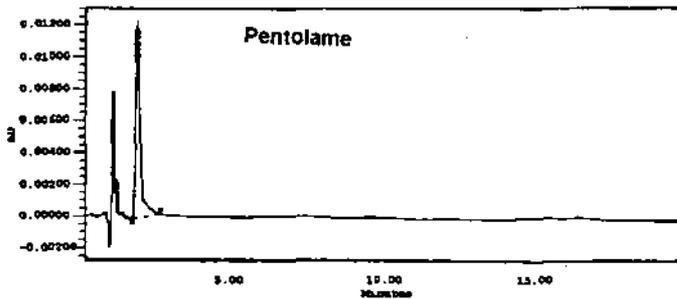
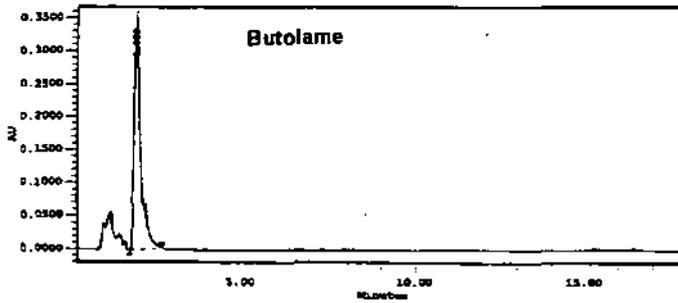
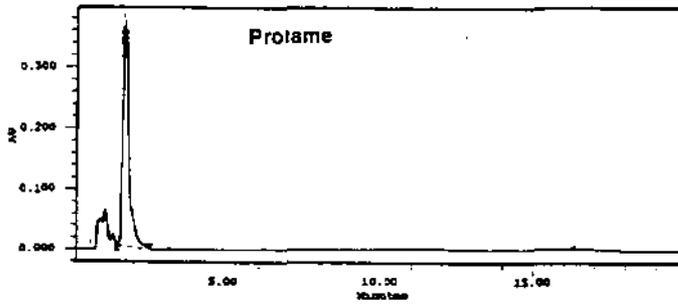
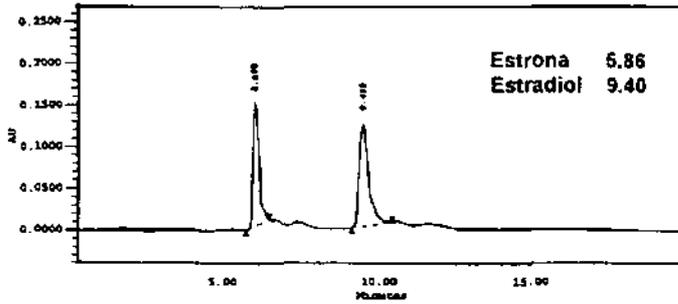
**Espectro de masas de prolame (6).**



Espectro de masas de butolame (7).



Espectro de masas de pentolame (8).



**Espectro de cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC) de prolame (6), butolame, (7) y pentolame (8).**

## 2. Evaluación de la actividad estrogénica de los $17\beta$ -aminoestrógenos prolame (6), butolame (7), y pentolame (8).

Se llevó a cabo un estudio comparativo del efecto estrogénico de los  $17\beta$ -aminoestrógenos prolame (6), butolame (7), y pentolame (8) y el  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ). Este efecto se estimó por el método de Evans, Varney y Koch [28], determinando el peso uterino de la rata Wistar inmadura, como también ha sido descrito por Lawson y Heller [34]

De estos experimentos pudieron obtenerse las curvas dosis-efecto, apreciándose una relación dosis dependiente del efecto de los compuestos señalados sobre el crecimiento uterino de la rata Wistar inmadura. Las figuras 7 a 10, ilustran las curvas obtenidas de peso uterino húmedo (Figura 7 A) y peso uterino seco (Figura 7 B) de  $E_2$ ; (Figura 8 A) y peso uterino seco (Figura 8 B) de prolame; (Figura 9 A) y peso uterino seco (Figura 9 B) de butolame y las Figuras 10 A y peso uterino seco (Figura 10 B) para pentolame.

En todos los casos se observa una relación lineal (tablas 2, 3, 4 y 5) que es dosis dependiente. Para el  $E_2$  la máxima respuesta fue observada con la dosis de 500  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  que correspondió a un aumento de 217% de peso húmedo y 175% de peso seco en relación al grupo control (tabla 6). Los efectos estrogénicos producidos por  $E_2$  fueron estadísticamente significativos desde 10  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  (tabla 2).

Los efectos sobre peso uterino producidos por la administración de prolame (6), butolame (7), pentolame (8) fueron de menor magnitud que las observadas en  $E_2$ , (tablas 3-9). En todos los casos el efecto de estos fármacos fue menor al obtenido con la dosis de 10  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  de  $E_2$ .

El prolame (6, figura 8, tabla 3) administrado a la dosis de 250 y 500  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  produce un crecimiento del útero que es dependiente de la dosis y significativamente estadístico. La dosis de 500  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  aumenta el peso en 20 % con relación al grupo control (tabla 7).

El butolame (7, figura 9, tabla 4) produjo aumentos significativos del peso uterino desde la dosis 50  $\mu\text{g}/\text{Kg}$  (40%, tabla 8) alcanzando la máxima respuesta de 140% con la dosis de 500  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ .

La curva dosis efecto del pentolame se muestra en la figura 10. Este 17 $\beta$ -aminoestrógeno es el que produce el efecto más débil (tablas 5 y 9) ya que la máxima respuesta obtenida fue de 56% comparando con el grupo control con una dosis de 1000  $\mu\text{g}/\text{Kg}$ .

En la figura 11 se muestran los resultados expresados en porcentaje de efecto uterotrófico que se obtuvieron sobre el peso uterino calculado para 100 g de peso de animal. En esta figura se ilustra la comparación de los efectos producidos por la hormona natural  $\text{E}_2$  con los de los compuestos prolame (6), butolame (7) y pentolame (8).

Prolame y pentolame producen efectos estrogénicos muy débiles con respecto al estradiol, esto se observa tanto en el peso uterino húmedo como en el peso uterino seco. El butolame fue el compuesto que produjo la mayor respuesta estrogénica de los tres aminoestrógenos evaluados.

Los resultados de la administración de  $\text{E}_2$  y los 17 $\beta$ -aminoestrógenos prolame(6), butolame (7) y pentolame (8) sobre el porcentaje de peso uterino seco y húmedo fueron graficados y se muestran en la figura 12. En esta figura también se señalan las regresiones lineales y se muestran los límites de confianza de las curvas. En todos los casos estradiol ( $\text{E}_2$ ), prolame (6), butolame (7) y pentolame (8) el peso húmedo del útero muestra límites de confianza más estrechos.

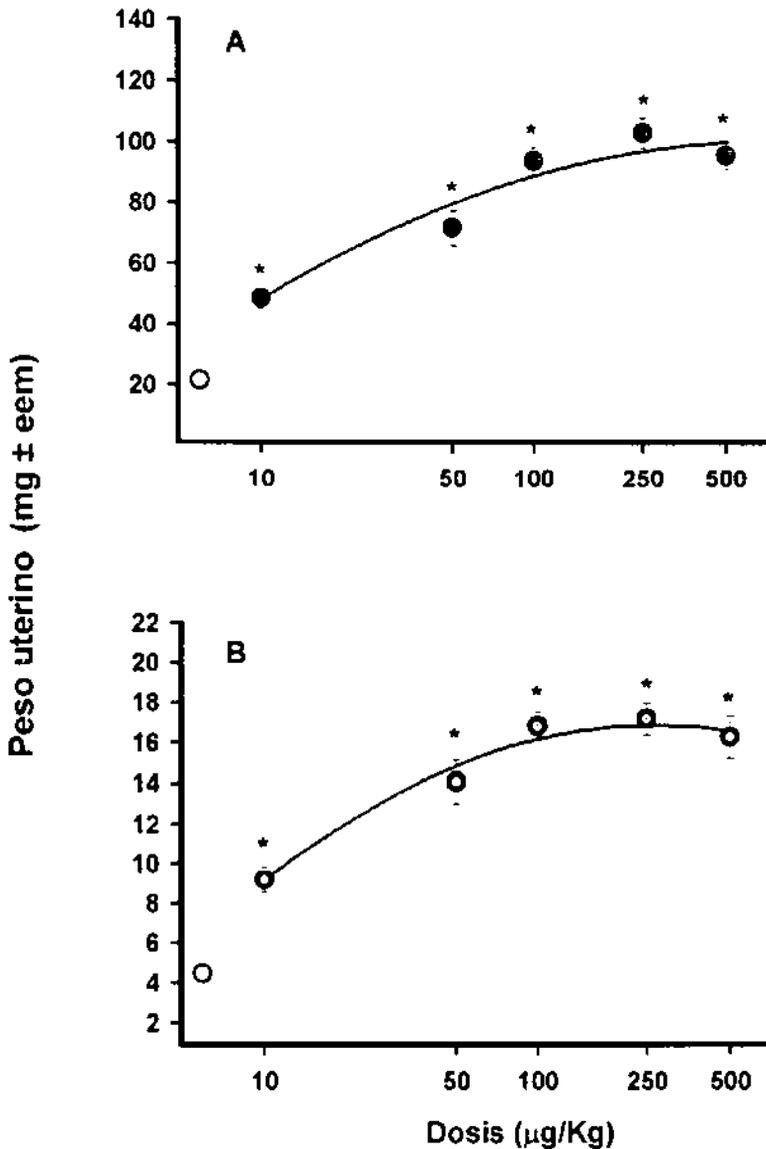
TABLA 2: Curva dosis-efecto de E<sub>2</sub> sobre el peso uterino de la rata Wistar inmadura.

TRATAMIENTO	DOSIS/RATA/ DÍA (µg/Kg)	N	PESO INICIAL DE LA RATA (g±esm)	PESO FINAL DE LA RATA (g±esm)	PESO UTERINO HUMEDO (mg±esm)	PESO UTERINO SECO (mg±esm)
V	10 mL	11	34±0.8	34±0.8	29±2.9	5±0.5
E <sub>2</sub>	10	20	35±0.6	37±1.9	50±3.0*	9±0.6*
E <sub>2</sub>	50	11	34±0.9	35±1.6	64±4.2*	12±0.9*
E <sub>2</sub>	100	11	34±1.0	37±1.2	77±6.1*	14±1.4*
E <sub>2</sub>	250	11	34±1.0	36±1.5	86±6.6*	15±1.1*
E <sub>2</sub>	500	11	34±0.9	35±1.8	87±4.3*	14±1.0*
E <sub>2</sub>	1000	11	34±0.9	33±1.7	79±4.3*	15±0.7*

V = Propilenglicol

E<sub>2</sub> = Estradiol

\* p&lt;0.05. Comparado con el vehiculo por el método de Dunnet.



**FIGURA 7:** Curva dosis-respuesta del efecto de Estradiol sobre el peso uterino de la rata Wistar inmadura. A = peso uterino húmedo. B = peso uterino seco. N =6. \*p<0.05 vs vehículo.

**TABLA 3: Comparación del efecto de prolame y E<sub>2</sub> sobre el peso uterino de la rata Wistar inmadura.**

TRATAMIENTO	DOSIS/RATA/ DIA ( $\mu$ g/Kg)	N	PESO INICIAL DE LA RATA (g $\pm$ esm)	PESO FINAL DE LA RATA (g $\pm$ esm)	PESO UTERINO HUMEDO (mg $\pm$ esm)	PESO UTERINO SECO (mg $\pm$ esm)
V	10 mL	5	36 $\pm$ 1.4	35 $\pm$ 1.6	21 $\pm$ 0.8	5 $\pm$ 0.6
E <sub>2</sub>	10	5	36 $\pm$ 1.3	36 $\pm$ 1.6	49 $\pm$ 2.7*	9 $\pm$ 0.6*
Prolame	50	5	35 $\pm$ 1.2	39 $\pm$ 1.5	20 $\pm$ 1.0	4 $\pm$ 0.1
Prolame	100	5	35 $\pm$ 1.4	37 $\pm$ 1.5	23 $\pm$ 0.7	6 $\pm$ 1.1
Prolame	250	5	34 $\pm$ 2.4	38 $\pm$ 2.8	32 $\pm$ 1.8*	6 $\pm$ 0.3*
Prolame	500	5	36 $\pm$ 1.3	40 $\pm$ 1.5	39 $\pm$ 1.6*	7 $\pm$ 0.8*

V = Propilenglicol

E<sub>2</sub> = Estradiol

\*  $p < 0.05$ . Comparado con el vehiculo por el método de Dunnet.

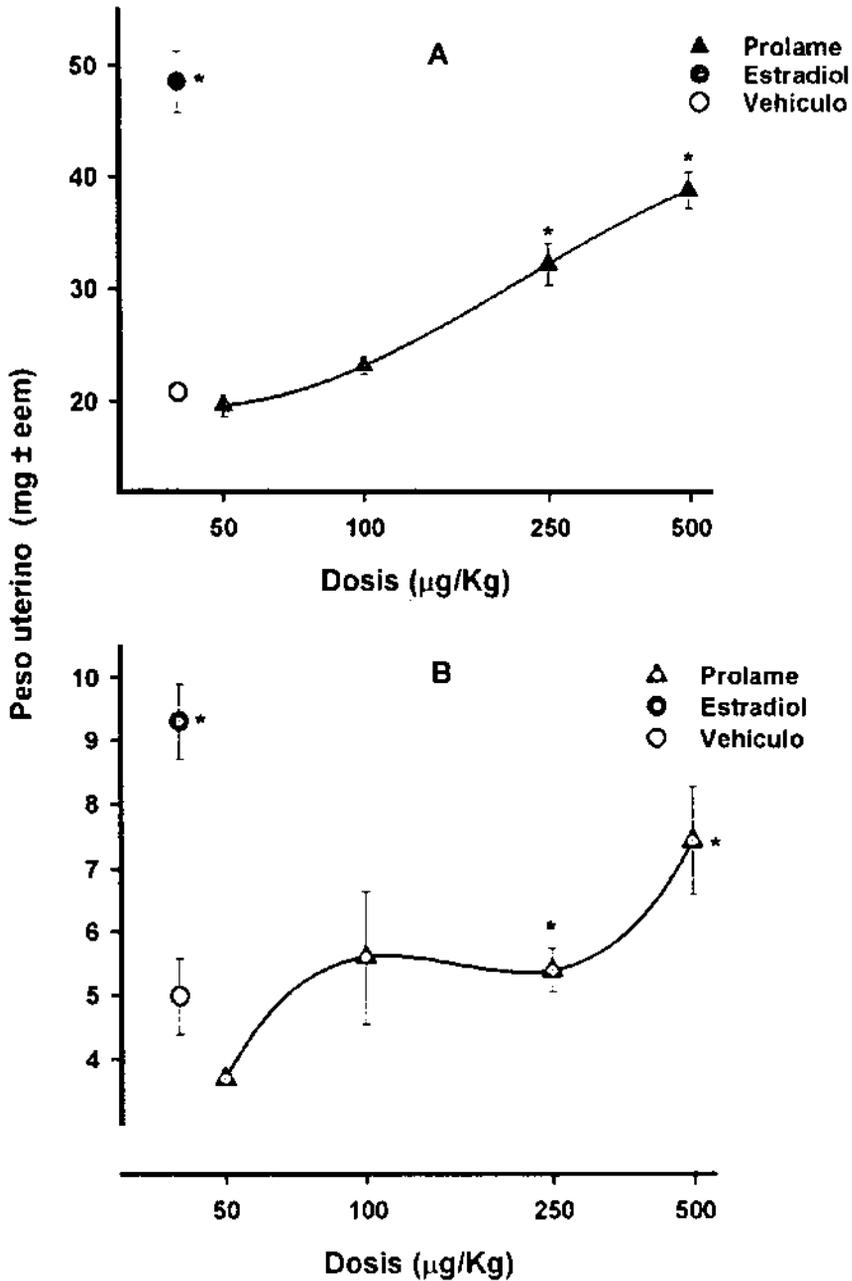


FIGURA 8: Curvas dosis efecto de prolame (6) sobre el peso uterino de la rata hembra Wistar inmadura. A = peso uterino húmedo. B = peso uterino seco. N = 6. \*p<0.05 vs vehículo.

TABLA 4: Comparación del efecto de butolame y E<sub>2</sub> sobre el peso uterino de la rata Wistar inmadura.

TRATAMIENTO	DOSIS/RATA/ DÍA (µg/Kg)	N	PESO INICIAL DE LA RATA (g±esm)	PESO FINAL DE LA RATA (g±esm)	PESO UTERINO HUMEDO (mg±esm)	PESO UTERINO SECO (mg±esm)
V	10 mL	10	33±1.1	32±2.8	20±2.0	3±0.3
E <sub>2</sub>	10	9	33±0.9	32±3.1	44±3.3*	8±0.7*
Butolame	5	5	35±1.8	39±2.9	20±1.4	4±0.7
Butolame	10	5	35±1.7	35±2.3	26±3.6	4±0.5
Butolame	50	5	35±1.6	39±2.8	28±1.7*	5±0.3*
Butolame	100	5	36±1.5	40±1.9	35±3.0*	7±0.5*
Butolame	250	5	31±0.9	23±0.7	23±3.8*	5±0.7*
Butolame	500	5	33±0.9	25±1.6	29±4.1*	6±0.6*
Butolame	1000	5	32±1.2	25±2.0	28±3.1*	6±0.4*

V = Propilenglicol

E<sub>2</sub> = Estradiol

\* p<0.05. Comparado con el vehículo por el método de Dunnet.

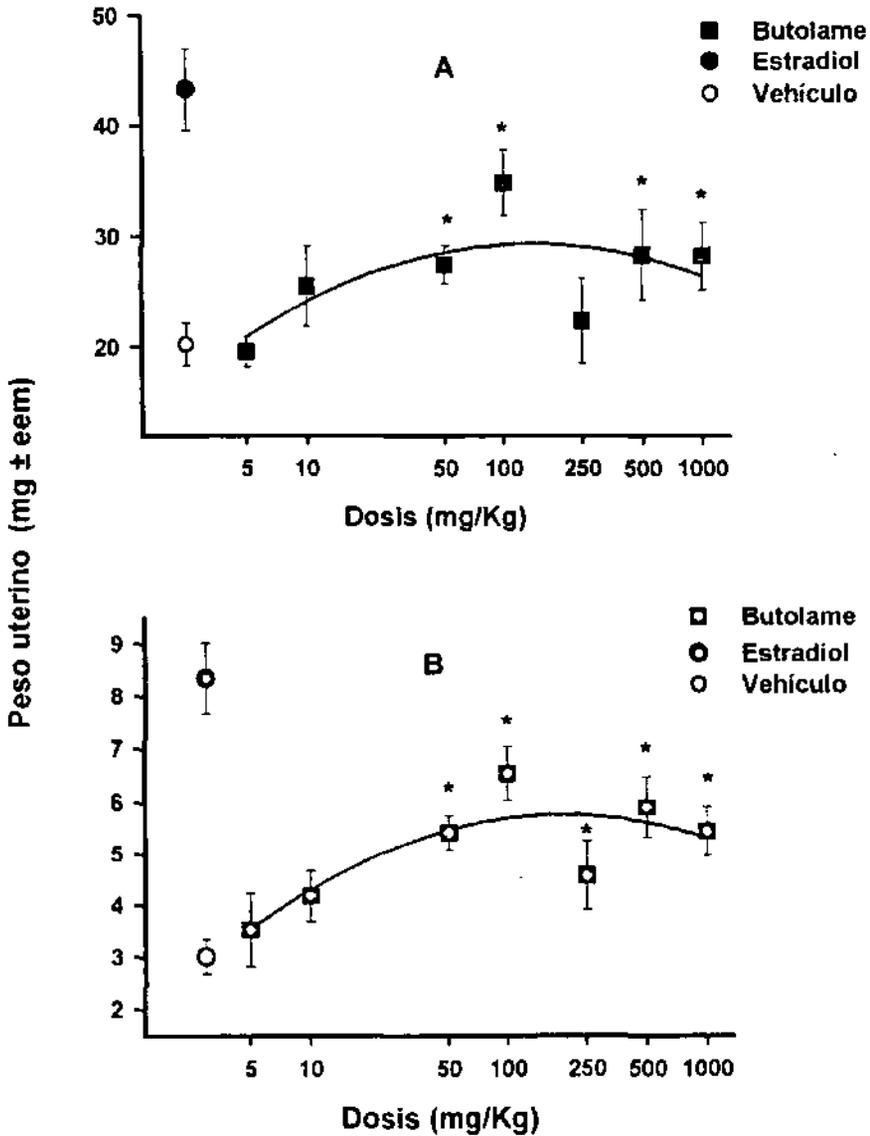


FIGURA 9: Curva dosis-efecto de butolame (7) sobre el peso uterino de la rata hembra inmadura Wistar. A = peso uterino húmedo. B = peso uterino seco. N = 7. \* $p < 0.05$  vs vehículo.

TABLA 5: Comparación del efecto de pentolame y E<sub>2</sub> sobre el peso uterino de la rata Wistar inmadura.

TRATAMIENTO	DOSIS/RATA/ DÍA (µg/Kg)	N	PESO INICIAL DE LA RATA (g ± esm)	PESO FINAL DE LA RATA (g ± esm)	PESO UTERINO HUMEDO (mg ± esm)	PESO UTERINO SECO (mg ± esm)
V	10 mL	5	37 ± 1.9	46 ± 6.2	22 ± 0.9	4 ± 1.3
E <sub>2</sub>	10	5	38 ± 1.4	48 ± 4.2	64 ± 6.0*	12 ± 1.2*
Pentolame	100	5	37 ± 1.6	48 ± 4.8	23 ± 2.1	5 ± 0.5
Pentolame	250	5	37 ± 1.6	49 ± 5.6	24 ± 3.0	5 ± 0.7
Pentolame	500	5	37 ± 1.6	46 ± 5.0	24 ± 3.7	5 ± 0.9
Pentolame	1000	5	37 ± 1.5	48 ± 4.8	31 ± 3.7*	7 ± 0.9*

V = Propilenglicol

E<sub>2</sub> = Estradiol

\* p < 0.05. Comparado con el vehiculo por el método de Dunnet.

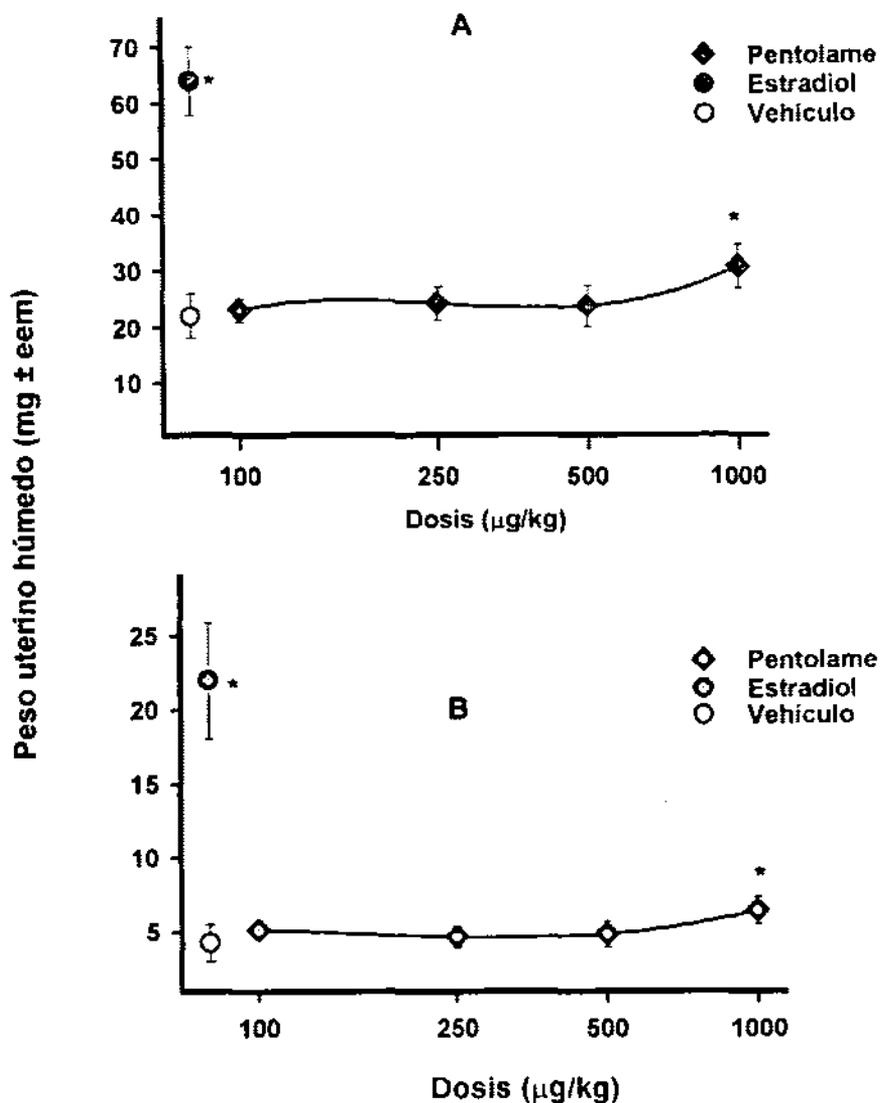


FIGURA 10: Curvas dosis efecto de pentolame (8) sobre peso uterino de la rata hembra Wistar. A = peso uterino húmedo. B = peso uterino seco. N = 6. \* $p < 0.05$  vs vehículo.

**TABLA 6: Curva dosis-porcentaje de efecto uterotrófico de E<sub>2</sub> en la rata Wistar inmadura**

TRATAMIENTO	DOSIS/RATA/ DÍA (µg/Kg)	N	PESO UTERINO HUMEDO (PUH) (mg/100g±esm)	PORCENTAJE DE EFECTO vs CONTROL (PUH)	PESO UTERINO SECO (PUS) (mg/100g±esm)	PORCENTAJE DE EFECTO vs CONTROL (PUS)
V	10 mL	11	86±8.0	100	16±1.3	100
E <sub>2</sub>	10	11	136±5.8	158	25±1.1	156
E <sub>2</sub>	50	11	192±14	223	36±3.1	225
E <sub>2</sub>	100	10	227±19.4	264	41±4.2	256
E <sub>2</sub>	250	11	252±21.2	293	42±3.3	263
E <sub>2</sub>	500	11	273±15.3	317	44±3.3	275

V = Propilenglicol

E<sub>2</sub> = Estradiol

**TABLA 7: Curva dosis-porcentaje de efecto uterotr3fico de prolame en la rata Wistar inmadura**

TRATAMIENTO	DOSIS/RATA/ DIA ( $\mu\text{g}/\text{Kg}$ )	N	PESO UTERINO HUMEDO (PUH) ( $\text{mg}/100\text{g}^{\text{resm}}$ )	PORCENTAJE DE EFECTO vs CONTROL (PUH)	PESO UTERINO SECO (PUS) ( $\text{mg}/100\text{g}^{\text{resm}}$ )	PORCENTAJE DE EFECTO vs CONTROL (PUS)
V	10 mL	5	61.3.5	100	15.2.2	100
E <sub>2</sub>	10	5	131.11.1	215	23.2.5	153
Prolame	50	5	51.1.1	84	10.0.3	67
Prolame	100	5	62.4	102	15.2.9	100
Prolame	250	5	85.4.5	139	14.0.9	93
Prolame	500	5	97.1.8	159	18.1.5	120

V = Propilenglicol

E<sub>2</sub> = Estradiol

**TABLA 8: Curva dosis-porcentaje de efecto uterotrónico de butolame en la rata Wistar inmadura**

TRATAMIENTO	DOSIS/RATA/ DÍA (µg/Kg)	N	PESO UTERINO HUMEDO (PUH) (mg/100g·esm)	PORCENTAJE DE EFECTO vs CONTROL (PUH)	PESO UTERINO SECO (PUS) (mg/100g·esm)	PORCENTAJE DE EFECTO vs CONTROL (PUS)
V	10 mL	10	49±2.4	100	10±1.0	100
E <sub>2</sub>	10	10	139±10	284	26±1.6	260
Butolame	5	5	51±2.9	104	9.0±1.8	90
Butolame	10	5	65±9.7	133	10±1.7	100
Butolame	50	5	73±7.4	149	14±1.6	140
Butolame	100	5	88±7.6	180	16±1.3	160
Butolame	250	5	98±14.5	200	20±2.6	200
Butolame	500	5	113±10.9	231	24±1.0	240
Butolame	1000	5	114±5.3	233	22±1.1	220

V = Propilenglicol

E<sub>2</sub> = Estradiol

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

**TABLA 9: Curva dosis-porcentaje de efecto uterotr3fico de pentolame en la rata Wistar inmadura**

TRATAMIENTO	DOSIS/RATA/ DIA (µg/Kg)	N	PESO UTERINO HUMEDO (PUH) (mg/100g <sup>±</sup> esm)	PORCENTAJE DE EFECTO vs CONTROL (PUH)	PESO UTERINO SECO (PUS) (mg/100g <sup>±</sup> esm)	PORCENTAJE DE EFECTO vs CONTROL (PUS)
V	10 mL	5	49 ± 5.9	100	9 ± 2.0	100
E <sub>2</sub>	10	5	134 ± 7.9	273	25 ± 1.7	278
Pentolame	100	5	49 ± 4.2	100	10 ± 0.8	111
Pentolame	250	5	50 ± 2.3	102	10 ± 0.5	111
Pentolame	500	5	53 ± 6.8	108	11 ± 1.6	122
Pentolame	1000	5	66 ± 6.8	135	14 ± 1.7	156

V = Propilenglicol

E<sub>2</sub> = Estradiol

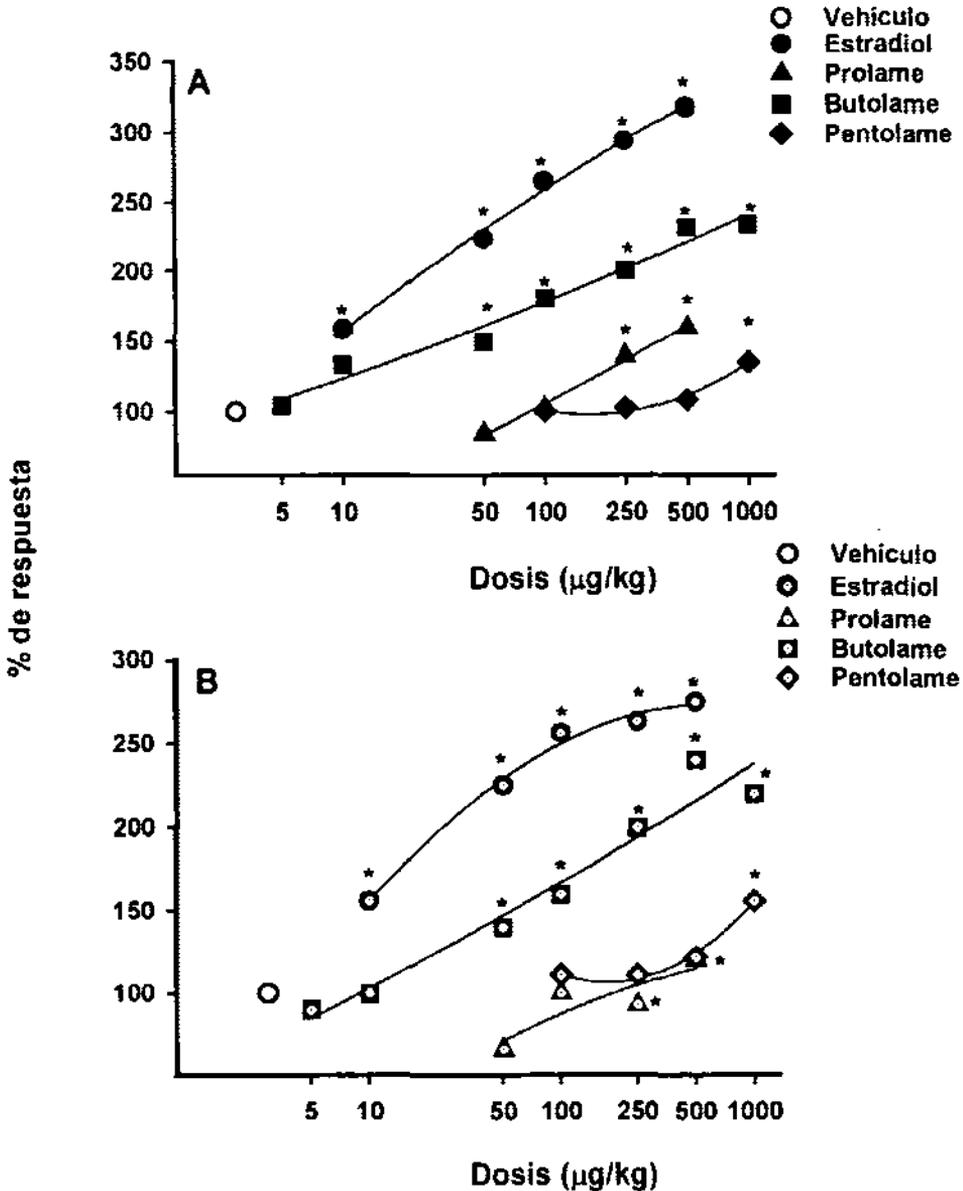


Figura 11: Curvas dosis-efecto sobre peso uterino de rata hembra Wistar inmadura, producida por los 17 $\beta$ -amino estrógenos: prolame (6), butolame (7), pentolame (8), estradiol y vehículo. A = peso uterino húmedo. B = peso uterino seco. Resultados calculados por 100 g de peso. N = 6. \*p<0.05 vs vehículo.

**TABLA 10: Dosis efectiva 50 ( $DE_{50}$ ) y Potencia relativa al  $E_2$  (PR) del efecto uterotrófico de los 17 $\beta$ -aminoestrógenos prolame, butolame y pentolame.**

TRATAMIENTO	DOSIS EFECTIVA 50 (PUH)	POTENCIA RELATIVA (PUH)	DOSIS EFECTIVA 50 (PUS)	POTENCIA RELATIVA (PUS)
Estradiol	55	100	36	100
Prolame	165	33	132	27
Butolame	119	6	96	38
Pentolame	2298	2	934	4

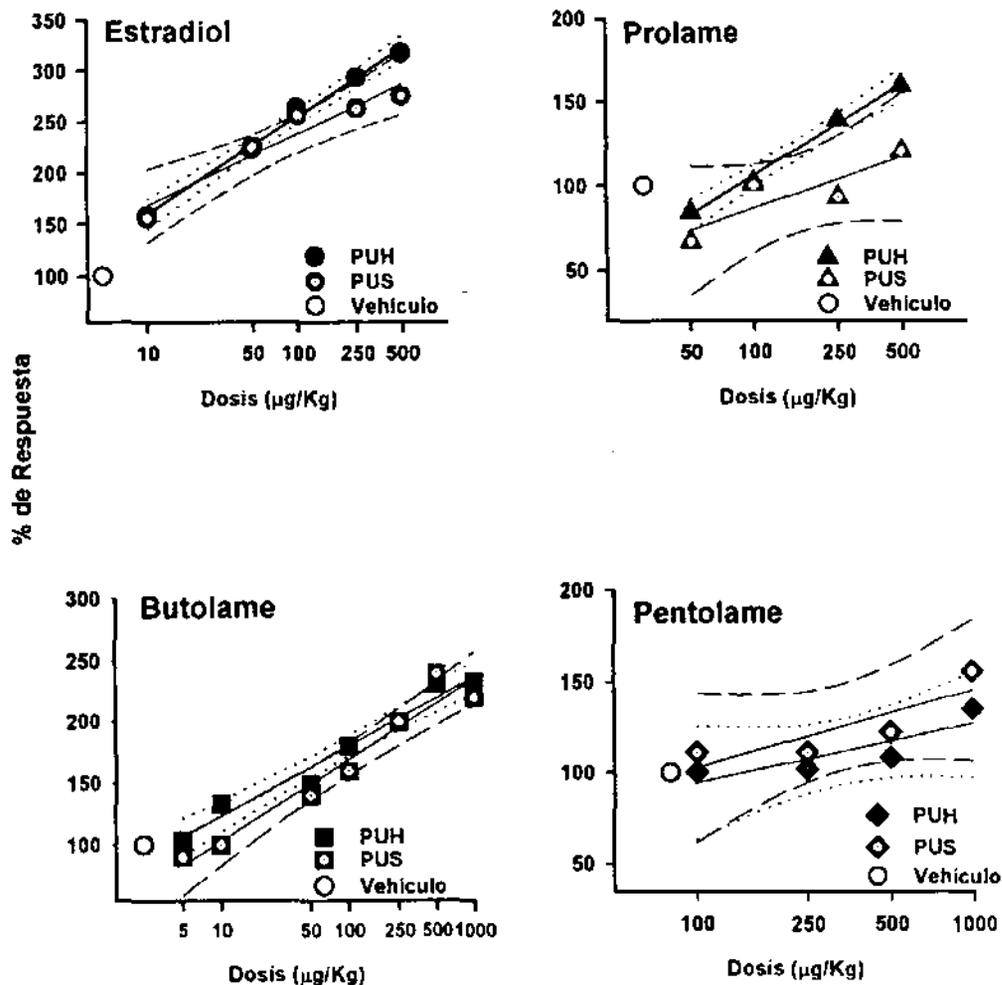


FIGURA 12: Curvas dosis-efecto de estradiol, prolame (6), butolame (7) y pentolame (8) sobre el peso uterino húmedo (PUH, línea punteada) y peso uterino seco (PUS, línea discontinua) de la rata Wistar inmadura. En todos los casos se muestran los límites de confianza.

## VIII CONCLUSIONES

1. Los compuestos prolame (6), butolame (7) y pentolame (8) se sintetizaron y caracterizaron por métodos espectroscópicos de infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear (RMN) y espectroscopia de masas (EM).
2. La evaluación de los efectos estrogénicos de prolame (6), butolame (7) y pentolame (8) en la rata Wistar inmadura nos condujo a las siguientes conclusiones:
  - a) Los compuestos prolame (6), butolame (7) y pentolame (8) administrados por vía subcutánea en la rata Wistar inmadura producen efectos estrogénicos dosis dependientes de menor potencia que el  $E_2$ .
  - b) De los experimentos realizados pudieron establecerse los parámetros de  $DE_{50}$  y efecto máximo para prolame (6), butolame (7) y pentolame (8), también se calculó la potencia en relación al  $E_2$  que se observó en el siguiente orden decreciente: prolame (6) > butolame (7) > pentolame (8).
  - c) Estos resultados fueron similares a los reportados recientemente en la literatura y se correlacionan con los resultados obtenidos en la rata Wistar adulta ovariectomizada.
3. El método de Evans, Varney y Koch constituye un marcador biológico de actividad estrogénica confiable, rápido y accesible.
4. Los compuestos prolame (6), butolame (7) y pentolame (8) serán motivo de estudio futuro en unión a receptores estrogénicos.

## VII. BIBLIOGRAFIA

1. Burger, A., **Medicinal Chemistry, Steroids Hormones**, 2a. ed., Ed. Interscience Publisher, INC., New York, 1960, p 691-703.
2. Katzung, B.G., **Farmacología Básica y Clínica en: Hormonas Gonadales e Inhibidores**, 4a edición, El Manual Moderno, México D.F. 1991, p 501-505.
3. Goodman, A. and Gilman, Rall, T.W., Nies, A. S., Taylor, P., **Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica en: Estrogénos y Progestágenos** 8a. edición, Editorial Médica Panamericana 1986, p 1341-1350.
4. Williams, R.A., **Text book of endocrinology in: Mechanism of action of hormones that act as transcription-regulatory factors**, 9ª ed., ed. Saunders, New York 1998, p 55-87.
5. Kalin, M.F. and Zumoff, B.: Sex hormones and coronary disease: a review of the clinical studies. **Steroids**, 55:330-352, 1990.
6. The Coronary Drug Project Research Group.: Findings leading to discontinuation of the 2.5/mg/day estrogen group. **J. Am. Med. Assoc.** 226:652-657, 1973.
7. Rosenberg, L., Palmer, J.R., Lesko, S.M., Shapiro, S.: Oral contraceptive use and the risk of myocardial infraction. **Am. J. Epidemiol.** 131:1009, 1990.
8. Huch, K.M., Elam, M.B., and Chesney, C.M.: Oral contraceptive steroid induced platelet coagulant hiperactivity: dissociation of *in vivo* and *in vitro* effect. **Thromb. Res.** 1:41-50, 1987.
9. Ygge, J., Brody, S., Korsan-Bengtson, K., Nilson, L.: Changes in blood coagulation and fibrinolysis in women receiving oral contraceptives. **Am. J. Obstet. Gynecol.** 107:87, 1969.
10. Hellstern, P., Miyashita, C., Kholer, M.: Thrombin induced platelet malondialdehyde (MDA) formation in normal subjects and in women taking oral contraceptives. **Thromb. Haemost.** 48:395, 1982.
11. Gordon, E.M., Ratnoff, O.D., Saito, H.: Rapid fibrinolysis, augmented Hageman factor (factor XII) titres and decreased C1 esterase inhibitor titres in women taking oral contraceptives. **J Lab. Clin. Med.** 96:762, 1980.
12. Alkjaersig, N., Fletcher, A.P., Burstein, R.: Association between oral contraceptive use and thromboembolismo: a new approach to investigation based on plasma fibrinogen chromatography. **Am. J. Obstet. Gynecol.** 122:199, 1975.

13. Ambrus, J.L., Nieswander, K.R., Courey, N.G.: Progestational agents and blood coagulation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **103**:994, 1969.
14. Nilsson, I.M., Kullander, S.: Coagulation and fibrinolytic studies during use of gestagens. *Acta Obstet. Gynaecol. Scand.* **46**:286 1967.
15. Donayre, J., Pincus, G.: Effects of Enovid on blood clotting factors. *Metabolism* **14**:418, 1965.
16. Tsakok F.,H.,Koh, S.: Effects of oral contraceptives containing 50µg estrogen on blood coagulation in non-Caucasian women. *Contraception*, **21**:505, 1980.
17. Hedlin, A.M.:The efectct of oral contraceptive estrogen on blood coagulation and fibrinolysis. *Throm. Diath. Haemost.* **33**:370, 1975.
18. Meade, T.W., Brozovic, M., Chakrabarti, R.: An epidemiological study of the haemostatic and other effects of oral contraceptives. *Br. J. Haematol.* **34**:353, 1976.
19. Barrett-Connor, E., Bush, T.: Estrogen and coronary heart disease in women. *J. Am. Med. Assoc.* **265**:1861,1991.
20. Mandoki, J.J., Zavala, E., Silva, G., Mendoza-Patiño, N., Rubio-Póo, C., Medina-Martínez, S. & Domínguez-Escoto, P.: The dual effects of estrogens on blood clotting time *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **26**:45-48, 1983.
21. Rubio-Póo, C., Mandoki, J.J., Jayme, V., Mendoza-Patiño, N., Alvarado, C., Silva, G., Zavala, E., Fernández-G., J.M.& Rubio-Arroyo, M.: Prodiame: A new estrogen with sustained anticoagulan effect. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **25**:111-113, 1983.
22. Rubio-Póo, C., Mandoki, J.J., Mendoza-Patino, N., Lemini C., de la Peña, A. Cruz, Zavala, E., Silva, G., García-Mondragón, J., Fernández-G., J.M., Soriano-García, M. & Toscano, A.R.: The anticoagulant effect of prolame, a novel amino-estrogen. *Steroids* **45**:159-170, 1985.
23. Mandoki, J.J., Rubio-Póo, C., Lemini, C., De la Peña, A., Fernández-G, J.M., García-Mondragón, J., Zavala, E., Silva, G., y Mendoza-Patiño, N.: The effects of five new 17β-aminoestrogens, buame, endiame, etolame, picae, and proacame on blood clotting time. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **34**:99-106, 1991.
24. Rubio-Póo, C., Lemini, C., García-Mondragón, J., de la Peña, A., Jayme V., Mendoza-Patiño, N., Zavala, E. Silva, G., Blickenstaff, R.T., Fernández-G., J.M., & Mandoki, J.J.: The anticoagulant effect of hexolame another amino-estrogen with prolonged anticoagulant effect. *Steroids* **55**:83-86, 1990.
25. Lemini, C., Rubio-Poo, C., Garcia-Mondragón, J., Zavala, E., Mendoza-Patiño, N., Castro, D., Cruz-Almanza, R., Y Mandoki J.J. Anticoagulant and estrogenic effects of two new 17β-aminoestrogens, butolame [17β- (4-hydroxy-1-butilamino)-1,3,5(10)estratrien-3-ol] and pentolame [17β-(5-hydroxy- 1-pentilamino)- 1,3,5(10) -estratrien -3-ol]. *Steroids* **58**:457-461 1993.

26. Rubio-Póo, C. Lemini, C., Silva, G., García Mondragón, J., Zavala, E., Castro, D., Patiño, N., Mandoki, J.J. Comparison of the time course of anticoagulant and estrogenic effects of prolame, butolame, pentolame and hexolame, a homologous series of 17 $\beta$ -aminoestrogens. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **36**:143-147, 1993.
27. Allen, E. and Doisy, E.A. An ovarian hormone. *J. Am. Med. Assoc.* **81**:819-821, 1923.
28. Evans, J.S., Varney, R.F., and Koch, F.C. The mouse uterine weight method for assay of estrogens. *Endocrinology* **28**:747-752, 1941.
29. Bulbring, E., and Burn, J. H. The estimation of oestrin and of male hormone in oily solution. *J Physiol.* **85**:320-333, 1935.
30. Odum, J. Lefevre, P.A., Tittensor, S., Paton, D., Routledge, E.J., Beresford, N.A., Sumpter, J.P., Ashby J. The rodent uterotrophic assay: critical protocol features, studies with nonyl phenols, and comparison with a yeast estrogenicity assay. *Reg. Tox. Pharm.* **25**:176-188, 1997.
31. Irmscher, K.: Die umsetzung ubon steroidketonen mit aminoalkoholen. *Chem. Ber.* **95**:907-917, 1962.
32. Blickenstaff, R.T., Foster, E., Gerzon, K. y Young, P.: Synthesis of some analogues of estradiol. *Steroids* **46**:889-902, 1985.
33. Snedecor, G.W., and Cochran, W.G.: **Statistical Methods**, 8a. ed., Iowa State University Press, Ames, 1989, p 96-98.
34. Lawson, H.D., Heller, O.G. The immature rat uterus in the assay of estrogenic activity. *Endocrinology*, **24**:35-44, 1939.
35. Zarrow, M.X., Yochim, J. M., McCarthy, J.L. Sanborn, R.C., en: Experimental endocrinology a source book of basic techniques. En: **The estrogens**, p 28-30. Academic Press New York and London 1964.