



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

TESIS

***“EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL ESTRADIOL Y
ETINILESTRADIOL SOBRE FACTORES DE
COAGULACIÓN EN RATAS WISTAR MACHO”***

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

PRESENTA

JOEL DONACIANO MARTÍNEZ MALDONADO



MÉXICO, D.F.

2011



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:

PRESIDENTE:	Profesor: ALEJANDRO ORTIZ OSORNIO
VOCAL:	Profesor: OSCAR ARMANDO PÉREZ MENDEZ
SECRETARIO:	Profesor: RUTH JAIMEZ MELGOZA
1ER. SUPLENTE:	Profesor: VANESSA REBECA MAYA AMPUDIA
2DO. SUPLENTE:	Profesor: ARACELI MENDIETA RERGIS

**EL PRESENTE TRABAJO SE DESARROLLÓ EN LA
FACULTAD DE MEDICINA, CU. EDIFICIO DE INVESTIGACIÓN, 6TO. PISO.
LABORATORIO DE ESTRÓGENOS Y HEMOSTASIA**

ASESOR DEL TEMA:

DRA. RUTH JAIMEZ MELGOZA

SUSTENTANTE:

JOEL DONACIANO MARTÍNEZ MALDONADO



Dedicatoria

A ti, por haberme dado la oportunidad de vivir
y ser parte de esta maravillosa Tierra,
por permitirme sentir y saber que el mundo girando está...



Agradecimientos

Dios, gracias por darme la oportunidad de crear, experimentar y desarrollarme en esta vida.

A ti Manuel e Imelda, por su apoyo incondicional.

A mis hermanos, por todo el cariño recibido, por estar en todo momento a mi lado y soportar todas mis inquietudes.

A mi asesora Ruth, gracias por hacer de este sueño una realidad.

A todos mis amigos confiaron en mí y con quienes compartí muchos momentos increíbles durante mi Carrera, aquellos que siempre me dieron ánimos de seguir adelante y que me hicieron sonreír en esos tiempos tan difíciles.

A la Universidad Nacional Autónoma de México y a la Facultad de Química, por darme educación y forjarme como buena persona.

A la Facultad de Medicina, a Conacyt (Proyecto 90756) y al NIH (Proyecto D43-TW00127205) por apoyar mis estudios y el desarrollo del presente texto.



Prefacio

XXVII. PARA DETENER LA SANGRE QUE SALE POR LA BOCA O POR OTRA PARTE

Tla xihualhua, iztaccihuatl, nonan.

¿Tle ticma?

Ca ye axcan ticpopoloz

in xoxouhqui coacihuitli,

yayauhqui coacihuitli.

Iztaccihuatl, nonan,

¿tle ticma?

Ye tonmocalaquiz chicomoztoc.

Tictlamachtlaliz tlatlahuqui cihuatl,

tictlamachtzizquiz in tototl, in *spiritu*,

in ye tlateuhyotia, in ye tlapolocayotia.

Niman, axcan.

Amo quin moztla, amo quin huiptla.

Conjuros médicos. Hernando Ruiz de Alarcón



Índice

Resumen	1
Introducción	3
Antecedentes	8
Justificación	11
Hipótesis	12
Objetivos	13
Materiales y métodos	14
Análisis estadístico	19
Resultados	20
a) Curvas de estandarización de los factores de coagulación	
Factor VII	21
Factor X	22
Factor XI	23
Factor XII	24
Fibrinógeno (factor I)	25
b) Curvas dosis-efecto de etinilestradiol y 17 β -estradiol	
Tiempo de protrombina	27
Tiempo de tromboplastina parcial activada	28
Factor VII	30
Factor X	32



Fibrinógeno	33
Factor XI	35
Factor XII	36
Discusión	37
Conclusiones	41
Bibliografía	42
Anexos	48



Resumen

El amplio uso de compuestos estrogénicos y su gran distribución a nivel mundial, tanto en métodos anticonceptivos como en la terapia de reemplazo hormonal, llevados a cabo a través de su administración con diversas formulaciones farmacéuticas, ha sido vinculado con el desarrollo de importantes efectos adversos, entre los que destacan el desarrollo de cáncer de mama y cervicouterino, y el desarrollo de diversos eventos tromboembólicos debidos a una alteración en la coagulación sanguínea. En el presente estudio, se analizaron los efectos del etinilestradiol (EE) y del 17β -estradiol (E_2) sobre el tiempo de protrombina (TP) y el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa), así como algunos factores de la coagulación (FVII, FX, FXI y FXII) y el fibrinógeno (FI) en ratas Wistar macho. En nuestro modelo se realizó la estandarización con reactivos utilizados en la clínica. Las ratas fueron administradas por vía subcutánea durante tres días consecutivos con EE, E_2 (1, 3, 10 y 30 mg/ Kg) o propilenglicol (0.3 mL, vehículo, V).

El EE produjo incrementos significativos ($p < 0.05$) sobre TP (8, 13, 15 y 10%) y TTPa (32, 35 y 28%); mientras que el estradiol no tuvo efecto en estos parámetros. En lo que respecta los factores, el EE disminuyó significativamente la actividad de factor VII (-10, -13 y -10%), X (-10, -9, -15 y -14%) y XI (-15, -14, -19 y -17%), mientras que el E_2 sólo produjo aumento en la actividad del FXI. El EE produjo un aumento de 15% ($p < 0.05$) sobre las concentraciones de fibrinógeno, pero no el E_2 . Nuestros resultados en la estandarización nos permitieron realizar las determinaciones en las muestras de ratas con reactivos para pruebas de coagulación en humano. Por otra parte, los resultados del efecto



de estos dos esteroides sobre la hemostasia de la rata muestran importantes diferencias. En nuestro modelo y con este diseño experimental, el EE presenta efectos anticoagulantes a diferencia de lo que se ha publicado, a su vez el E₂ solo produce un modesto efecto procoagulante. Las diferencias que encontramos en los efectos observados por el E₂ y EE pueden deberse principalmente a diferencias farmacocinéticas, específicamente el tiempo de vida media. La investigación dirigida a la evaluación de los efectos de estos fármacos es necesaria para contribuir en la prevención de sus efectos adversos.



Introducción

Los estrógenos como el estradiol, la estrona y el estriol, son hormonas esteroides de 18 átomos de carbono, biosintetizadas a partir del colesterol y que comparten con otros esteroides al ciclopentanoperhidrofenantreno o gonano como núcleo químico básico. (Ing y O'Malley, 1995). Las hormonas esteroides comparten como intermediario en su biosíntesis al colesterol (figura 1). La fuente de colesterol puede ser por síntesis de novo (desde acetato) o del colesterol unido a lipoproteínas.

Los estrógenos y los progestágenos son hormonas que producen importantes efectos fisiológicos. En mujeres, éstos comprenden acciones vinculadas con el desarrollo de caracteres sexuales secundarios, que son efectos neuroendócrinos como el control de la ovulación, la preparación cíclica de las vías de reproducción para la fecundación e implantación, efectos en cerebro, sistema cardiovascular, hemostasia así como en el metabolismo de minerales, carbohidratos, proteínas y lípidos, entre otros. Los progestágenos están implicados de forma casi exclusiva en la preparación final del útero para la gestación y de las mamas para la lactancia. (Guyton, 2000).

De manera general los efectos de los estrógenos son regulados a través de la interacción del estrógeno con receptores específicos que se encuentran en el citoplasma (α o β) o en la membrana celular, denominados efectos genómicos o no genómicos, respectivamente. (Ing y O'Malley, 1995).



La disminución de niveles de estrógenos durante la menopausia está asociada con la aparición de cambios vasomotores, atrofia urogenital, disminución de la memoria, así como el aumento del riesgo de enfermedades coronarias y crónico-degenerativas como la osteoporosis y la enfermedad de Alzheimer. (Maturana et al, 2007).

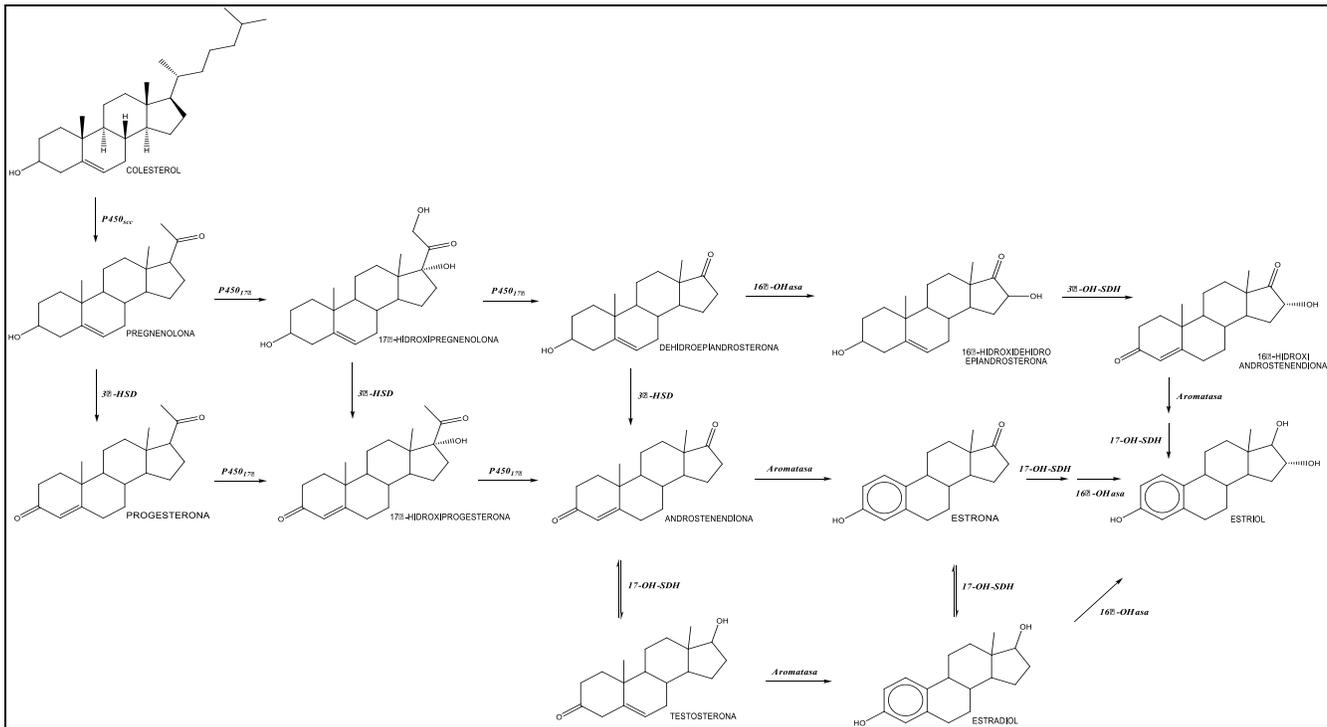


Figura 1. Biosíntesis de las hormonas esteroides. Tomado y modificado de Goodman & Gilman, 2009.

Los efectos fisiológicos de los estrógenos sobre diferentes sistemas tanto en edad fértil como durante la menopausia ha propiciado la investigación dirigida al diseño de fármacos sintéticos y semisintéticos con actividad estrogénica para su uso en el humano, estos fármacos comprenden al etinilestradiol, mestranol, estrógenos conjugados, tamoxifen, raloxifen, entre otros. El uso que se ha dado a estos compuestos es diverso y depende tanto de sus características farmacodinámicas



como farmacocinéticas y comprenden principalmente la terapia sustitutiva estrogénica, terapia anticonceptiva (conjuntamente con una progestina sintética), el tratamiento de endometriosis, la prevención de cáncer de mama, la pérdida ósea, etc. (Breckwoldt et al. 1995).

El derivado etinil del estradiol es un estrógeno potente y a diferencia de los estrógenos naturales es activo cuando se administra por la vía oral (figura 2).

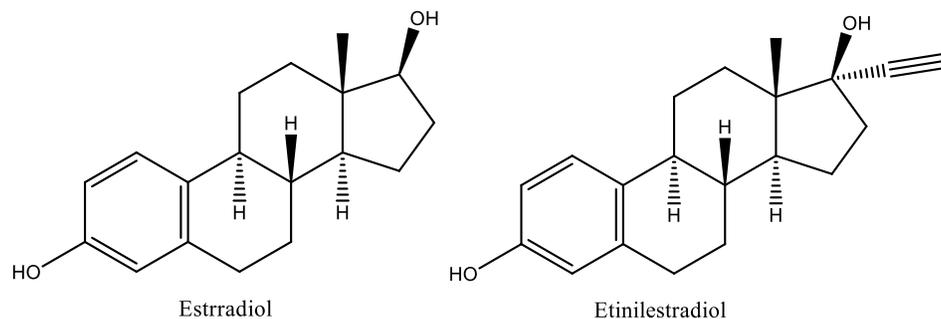


Figura 2. Estructura química del 17 β -estradiol y el 17 α -etinilestradiol

Sistema hemostático

El sistema hemostático se ha dividido clásicamente en hemostasia primaria y secundaria. En la hemostasia primaria participan fundamentalmente las plaquetas a través de los procesos de adhesión, reclutamiento, activación y agregación para formar el tapón hemostático plaquetario inicial. En la hemostasia secundaria, también llamada cascada de MacFarlane o cascada de la coagulación, participan los factores de la coagulación, fosfolípidos, lipoproteínas y calcio iónico. Estos factores han sido denominados por números romanos del I al XIII, de acuerdo al orden de su



descubrimiento (Harmening, 2001; tabla 1, figura 3). Los parámetros utilizados en el laboratorio para explicar alteraciones en esta cascada son principalmente el tiempo de protrombina (TP), el tiempo de tromboplastina parcial activado (TTPa) y el tiempo de trombina (TT). (Furie, 2009; Butenas y Mann, 2002; Pérez-Gómez y Bover, 2007; Quintana, 2002).

Factor	Sinónimo	PM (KDa)	Sitio de síntesis	Función
I	Fibrinógeno	340	Hígado	Estructural
II	Protrombina	72	Hígado	Serina proteasa
III	Factor tisular, tromboplastina tisular	37	Monocitos, Endotelio no vascular	Cofactor/Iniciador
IV	Calcio			
V	Factor lábil, proacelerina	300	Hígado	Cofactor
VII	Proconvertina, factor estable	53	Hígado	Serina proteasa
VIII	Globulina o factor antihemofílico A	300	Hígado	Cofactor
IX	Factor Christmas o antihemofílico B	57	Hígado	Serina proteasa
X	Factor Stuart Prower	67	Hígado	Serina proteasa
XI	Factor antihemofílico C	160	Hígado	Serina proteasa
XII	Factor de Hageman	80	Hígado	Serina proteasa
PK	Precalicroína o Factor de Fletcher	120	Hígado	Serina proteasa
HMWK	Cinínógeno de alto peso molecular	100	Hígado	Cofactor
XIII	Factor estabilizador de la fibrina	300	Hígado, Megacariocitos	Transglutaminasa

Tabla 1. Nomenclatura y función de los factores de la coagulación. Tomado y modificado de Harmening, 2001.

El sistema hemostático representa un mecanismo de defensa que actúa para preservar la integridad de la presión sanguínea en el sistema circulatorio (Furie, 2009). La hemostasia es un sistema fisiológico que detiene la salida de la sangre, al sellar provisionalmente el sitio de daño vascular e iniciar posteriormente los mecanismos de reparación, el coágulo forma un sistema bien estructurado en la herida, el cual es suficientemente lábil para ser removido después de la reparación. (Martínez



y Quintana, 1996; Monroe y Hoffman, 2006).

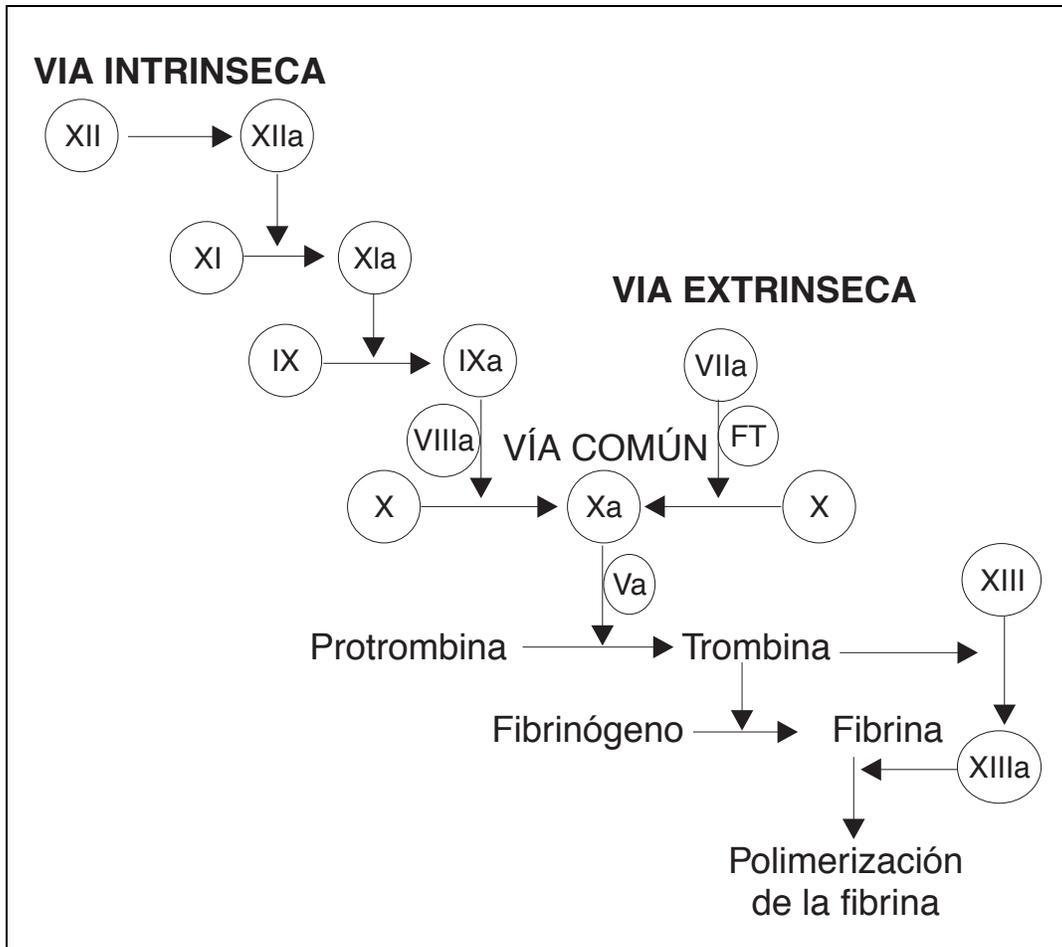


Figura 3. Representación esquemática de la activación de los factores de la cascada de la coagulación. Los factores circulan como proteínas inactivas (zimógenos) hasta que se activan a enzimas por proteólisis parcial. Tomado de Quintana, S., 2002.



Antecedentes del presente estudio

Durante las últimas décadas, se ha incrementado el uso de fármacos con actividad estrogénica y progestacional (principalmente sintéticas), los cuales son de gran utilidad en la terapia anticonceptiva, en mujeres fértiles para el control natal y en la terapia de reemplazo hormonal en mujeres posmenopáusicas para restaurar los efectos benéficos de los estrógenos.

Aunque el uso de estrógenos ha contribuido en forma significativa en el control de la natalidad y en la calidad de vida en mujeres posmenopáusicas, existen numerosos estudios prospectivos y retrospectivos que han demostrado una relación directa entre el uso de estrógenos y un aumento en la incidencia de eventos tromboembólicos así como cáncer de mama y cáncer cérvico-uterino (Breckwoldt et al, 1995).

Además se ha demostrado que el efecto tromboembólico está relacionado directamente con el tipo de estrógeno y de la generación de la progestina que se utilice, así como de la forma farmacéutica administrada y el tiempo de uso de la formulación (Kwang et al, 1999; Rosendaal et al, 2003).

Desde la década de los 60 se conoce que la administración de los estrógenos en la terapia anticonceptiva está relacionada con el incremento en el riesgo de trombosis venosa, embolismo pulmonar, infarto al miocardio y apoplejía (Jordan 1961; Lorentz 1962, Boyce et al, 1963). Este riesgo permanece aunque en menor grado en las formulaciones actuales donde la dosis del



estrógeno ha disminuido considerablemente (15-30 μg). El riesgo de tromboembolismo es mayor en el primer año de uso (mayor de 1 en 1000 por año), cuando se utilizan progestinas de tercera generación y cuando existe predisposición genética o factores de riesgo adquiridos como la obesidad, la diabetes, el tabaquismo, etc. (Rosendaal, 1999, 2001, 2002, 2003). En la terapia de reemplazo hormonal se observa también un incremento en la incidencia de trombosis venosa profunda aunque en menor proporción que en mujeres en edad reproductiva (Lemaitre et al, 2002; Pradhan et al, 2002; Million Women Study Collaborators, 2002).

Los efectos adversos derivados del uso de estrógenos, se relacionan principalmente con un estado de hipercoagulabilidad, cambios en la biosíntesis de factores anticoagulantes, alteración del metabolismo de las lipoproteínas, disminución de la actividad fibrinolítica y cambios sobre la respuesta inflamatoria y el sistema inmune (Kwang et al, 1999; Banfi et al, 1999; Dahm et al, 2003, 2005; Nilsson, 2007).

Los trabajos en investigación básica, señalan que la estimulación estrogénica en células endoteliales de cordón umbilical (HUVEC) y de hepatoma humano (Hep-G2) con estradiol u otros compuestos como los moduladores del receptor de estrógenos (tamoxifen, raloxifen, toremifen), induce la expresión de factores de coagulación (fibrinógeno, FVII, FXII) y disminuye la expresión de inhibidores de la coagulación como el inhibidor del factor tisular (TFPI) (McIntyre et al, 1985; Etingin et al, 1991; Healy y Gelehrter, 1994 ; Roy et al, 1994; Citarella et al, 1996; Wu y Thiagarajan, 1996; Bilsel et al, 2000; Dahm et al, 2003, 2005, 2006).



En experimentos con animales de laboratorio se ha demostrado que la administración aguda o crónica del estradiol o el etinilestradiol, puede modificar las vías de la coagulación. Estos cambios incluyen una disminución del tiempo de coagulación total, alteración de los tiempo de protrombina y tiempo de parcial de tromboplastina, inducción de la expresión genética de factores de la coagulación, inhibición de la expresión de factores anticoagulantes, etc. (García-Manzano et al, 2002; Kurata et al, 2003; Shirk et al, 2005; Unruh et al, 2005, Lemini et al, 2007; Cleuren et al, 2010).



Justificación

Estudios epidemiológicos indican que el uso de anticonceptivos orales incrementa el riesgo absoluto de trombosis venosa de 0.8 por cada 10,000 mujeres no menopáusicas que no utilizan este método a 3.0 por cada 10,000 mujeres usuarias.

Debido al amplio uso que se le da a este tipo de fármacos y su riesgo absoluto y relativo en la trombosis, es necesario conocer los mecanismos a través de los cuales están actuando para producir este efecto adverso y si existen diferencias entre los diferentes fármacos.

Actualmente no existe en la literatura un estudio comparativo del estradiol (E_2) y el etinilestradiol (EE) sobre el sistema hemostático en un modelo animal que nos permita entender y explorar estos efectos sobre la hemostasia debido a que la mayoría de los trabajos publicados sólo se enfocan en un solo fármaco, preferentemente sobre el E_2 , aunque éste se utiliza poco en la clínica.



Hipótesis

Los estrógenos de uso clínico como el etinilestradiol y 17 β -estradiol producen cambios en la hemostasia secundaria en el modelo de rata Wistar macho.



Objetivos

Objetivo general

Realizar un estudio comparativo del efecto de dos fármacos con actividad estrogénica, utilizados en la terapéutica: el 17α -etinilestradiol y el 17β -estradiol, sobre el sistema hemostático de la rata Wistar macho.

Objetivos específicos

- a) Realizar las curvas de estandarización de todos los parámetros a evaluar utilizando reactivos para humano.

- b) Determinar el efecto de 17α -etinilestradiol y 17β -estradiol sobre el tiempo de protrombina (TP) y el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa).

- c) Determinar el efecto del 17α -etinilestradiol y 17β -estradiol sobre la vía extrínseca de la coagulación a través de la determinación del factor de la coagulación VII (FVII).

- d) Determinar el efecto producido por el 17α -etinilestradiol y 17β -estradiol sobre la vía común de la coagulación, mediante la determinación del factor de la coagulación X (FX) y el fibrinógeno (FI).

- e) Determinar el efecto producido por el 17α -etinilestradiol y 17β -estradiol sobre la vía intrínseca de la coagulación a través de la determinación de los factores de la coagulación XI y XII (FXI y FXII).



Materiales y métodos

Reactivos

El 17β -estradiol (E_2), 17α -etinilestradiol (EE), propilenglicol, tribromo etanol (anestésico) e hidrato de amileno fueron adquiridos en Sigma-Aldrich®. Los plasmas deficientes de factores (VII, X, XI y XII), así como la tromboplastina C plus, Actin FS®, plasma estándar humano, cloruro de calcio ($CaCl_2$), buffer Veronal y el buffer de imidazol se compraron en Dade Behring®.

Materiales

El sistema Vacutainer (equipo alado 23G x 3/4", tubo con vacío con 3.2 % de citrato de sodio) fue adquirido en Becton Dickinson®. Las cubetas para el coagulómetro semiautomático Fibrintimer-BFTII®, fueron compradas a Dade Behring®. La centrífuga para el procesamiento de los plasmas fue adquirida a Heraus® (Labofuge 400 R). El refrigerador para el almacenamiento de las muestras congeladas fue adquirido a Mabe®.

Animales

Se utilizaron ratas Wistar macho adultos (250-300 g), 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* y temperatura controlada entre 20-23 °C. Todos los experimentos se realizaron bajo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana de protección de animales (NOM-062-Z00-1999) y la Comisión de Bioética de la Facultad de Medicina.



Manejo de animales y tratamiento farmacológico

Los animales fueron distribuidos por el método de cuadrados latinos en función a su peso corporal en lotes de 3 a 5 animales por grupo. Cada grupo recibió un tratamiento por vía subcutánea de E₂ o EE disueltos en propilenglicol en dosis de 1, 3, 10 y 30 mg/ Kg/ día, durante tres días consecutivos. Los grupos control fueron administrados solo con propilenglicol (vehículo; 0.3 mL/ animal/ día). Cada experimento se realizó por triplicado.

Toma de la muestra

Cada animal fue anestesiado con tribromo etanol (0.22 g/ Kg) por vía intraperitoneal. La toma de la muestra sanguínea se realizó 24 horas después de la última administración (entre las 8:00-10:30 horas del día); la sangre se obtuvo a través de la bifurcación de la arteria ilíaca por medio de un sistema Vacutainer® 23G conteniendo citrato de sodio al 3.2 %. El plasma se obtuvo mediante la centrifugación de las muestras sanguíneas a 3000 rpm a temperatura ambiente, durante 10 minutos. El sobrenadante fue separado del paquete celular y las muestras se congelaron a -20 °C en un refrigerador comercial hasta el momento de las determinaciones. Después de la toma de las muestras, los animales fueron eutanizados con un exceso de anestesia y se enviaron a la unidad de cremación.

Determinación de las pruebas hemostáticas

La determinación de las pruebas hemostáticas se realizó basándonos en la estandarización de los métodos clásicos modificados por García-Manzano (2001).



Determinación del tiempo de protombina (TP)

El tiempo de protombina fue realizado mediante el método de Quick (1954); cada muestra plasmática (100 μ L) se incubó a 37 °C durante un minuto y la reacción se activó con el reactivo de tromboplastina.

Determinación del tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa)

La prueba de TTPa se realizó utilizando 50 μ L de plasma que se mezcló con 50 μ L de Actin FS®, se incubó durante 120 segundos a 37 °C y la reacción se activó con CaCl₂ utilizando el método de Proctor y Rapaport (1961).

Estandarización y curvas de calibración para la determinación de la actividad de los factores de coagulación

Para determinar el efecto de los esteroides evaluados, fue necesario asegurar que los reactivos utilizados en la clínica pudieran usarse en un modelo de rata. Para esto fue necesario realizar las curvas de estandarización con diluciones de plasma estándar humano Dade Behring® y diluciones con el plasma de 10 ratas macho adultos sin tratamiento.

Curva estándar de factores VII y X

La curva estándar para los factores de la vía extrínseca y vía común tales como FVII y FX, se realizó mediante diferentes diluciones del plasma deficiente del factor a evaluar (1:20, 1:40, 1:200, 1:2000).



Curva estándar de factores XI y XII

La curva estándar para los factores de la vía intrínseca como el FXI y FXII, se realizó con diferentes diluciones del plasma deficiente del factor a evaluar (1:5, 1:10, 1:50, 1:500).

Curva estándar de fibrinógeno

La curva estándar del fibrinógeno (FI), se realizó con diluciones de plasma humano estándar Dade Behring® (1:5, 1:10, 1:20) utilizando el método de Clauss (1957).

Determinación de los factores de coagulación (métodos coagulométricos)

Determinación de factor XI y XII

La muestra problema en una dilución de 1:5 se mezcló con el plasma deficiente del factor a evaluar (XI o XII) y se adicionó Actin® (fosfolípidos), posteriormente se incubó durante 120 s a 37°C y la reacción se activó con cloruro de calcio (Proctor y Rapaport, 1961). El tiempo en segundos, que tardó en detenerse la reacción se graficó como la curva estándar y la extrapolación del tiempo resultó en la actividad en porcentaje de cada factor.

Determinación de factores VII y X

La muestra problema en una dilución de 1:20 se mezcló con el plasma deficiente del factor a evaluar (VII o X). La muestra se incubó durante 60 s a 37 °C, la reacción se activó con el reactivo de tromboplastina (método de Quick, 1954). El tiempo en segundos, que tardó en detenerse la reacción



se graficó como la curva estándar y la extrapolación del tiempo resultó en la actividad en porcentaje de cada factor.

Determinación del fibrinógeno

La muestra problema en una dilución 1:5 se incubó 120 s a 37 °C, la reacción se activó con el reactivo de trombina. Los segundos obtenidos se graficaron en la curva estándar y los valores extrapolados representan la concentración de fibrinógeno en mg/ml (método de Clauss, 1957).

Todas las muestras obtenidas en el presente trabajo se procesaron en un coagulómetro Fibrintimer-BFT II®. Los experimentos se realizaron al menos por duplicado y cada muestra se determinó por triplicado. Los grupos tratados fueron comparados con respecto a su propio control (vehículo = 100%) y entre ellos.



Análisis estadístico

El análisis estadístico se realizó mediante el uso del software de gráficos y estadística Sigma Plot 10® y Sigma Stat 3.0®, respectivamente. Los datos se graficaron como el promedio \pm el error estándar de la media (eem). El análisis de los datos se realizó mediante análisis de varianza (ANOVA), prueba de Dunnett y Dunn apropiadas para cada caso. Una $p < 0.05$ se consideró como estadísticamente significativa.



Resultados

a) Estandarización de los factores de coagulación VII, X, XI, XII y FI (fibrinógeno)

Para determinar la actividad de los diferentes factores de la coagulación se realizaron las curvas estándar graficando el tiempo de coagulación contra la actividad que corresponde a cada dilución que se utiliza dependiendo de que factor se esté analizando. Para corroborar que los reactivos utilizados en pruebas en humanos podían utilizarse en nuestro modelo animal fue necesario realizar esta estandarización para rata macho intacta (sin tratamiento).

En las siguientes figuras (4, 5, 6 y 7) podemos observar los resultados de la estandarización de los plasmas de rata con los reactivos para humano y sus respectivos coeficientes de correlación (R).

Las curvas de calibración nos permitieron asegurar que los reactivos de uso humano podían ser utilizados en nuestro modelo animal. Estos resultados nos permitieron continuar con las pruebas hemostáticas propuestas en los objetivos planteados.

Para el caso del fibrinógeno sólo se realizó la curva estándar en humano (1:5, 1:10, :20) debido a que en nuestro equipo no fue posible detectar el coágulo de plasma de rata en diluciones mayores de 1:5 (figura 8). Sin embargo con la dilución 1:5 pudimos realizar las pruebas necesarias para determinar las concentraciones de fibrinógeno en nuestro modelo.

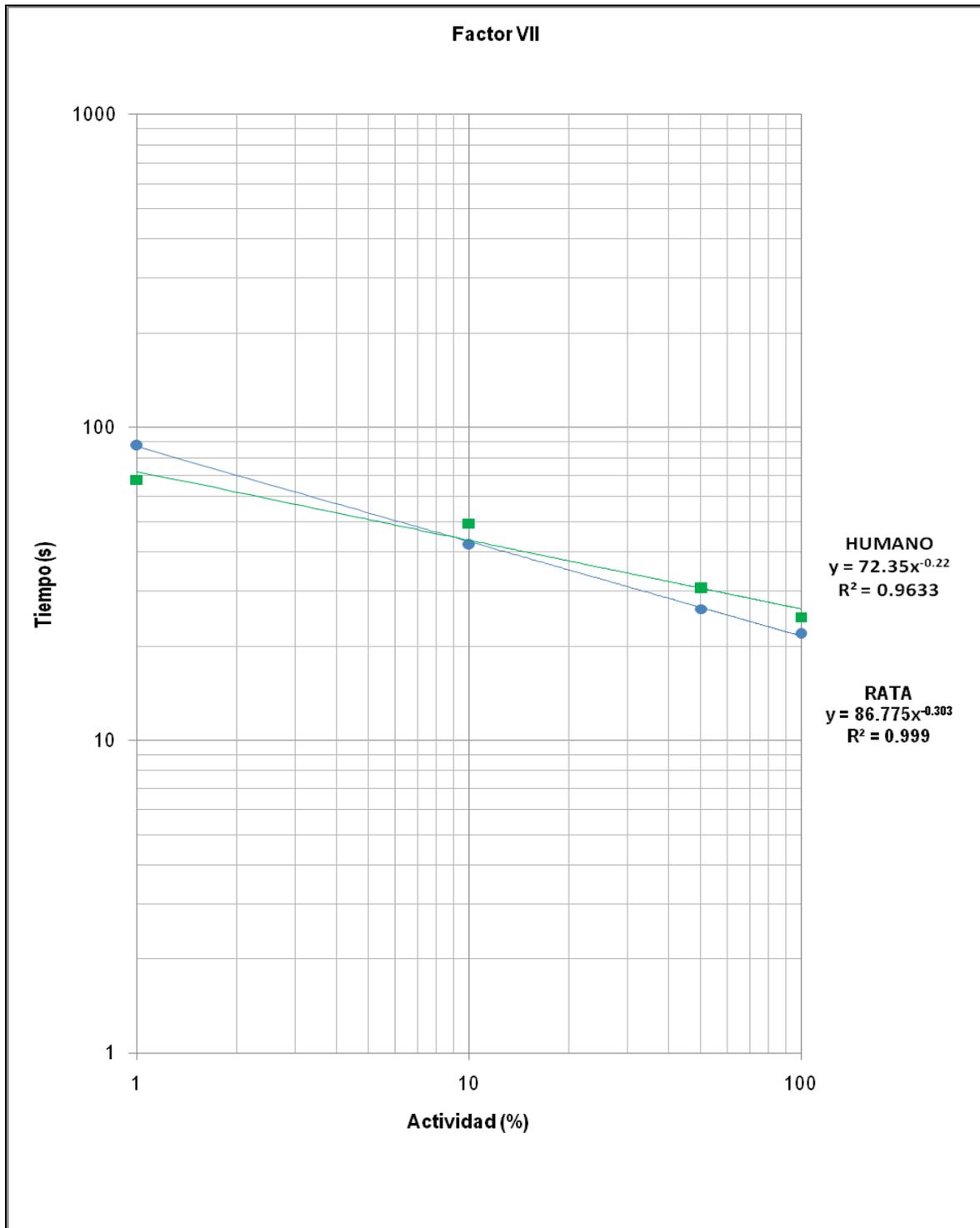


Figura 4. Estandarización del FVII en plasma humano y de rata, con diluciones de 1:20, 1:40, 1:200 y 1:2000. Cada punto representa el promedio de al menos 10 ratas sin tratamiento por triplicado \pm eem.

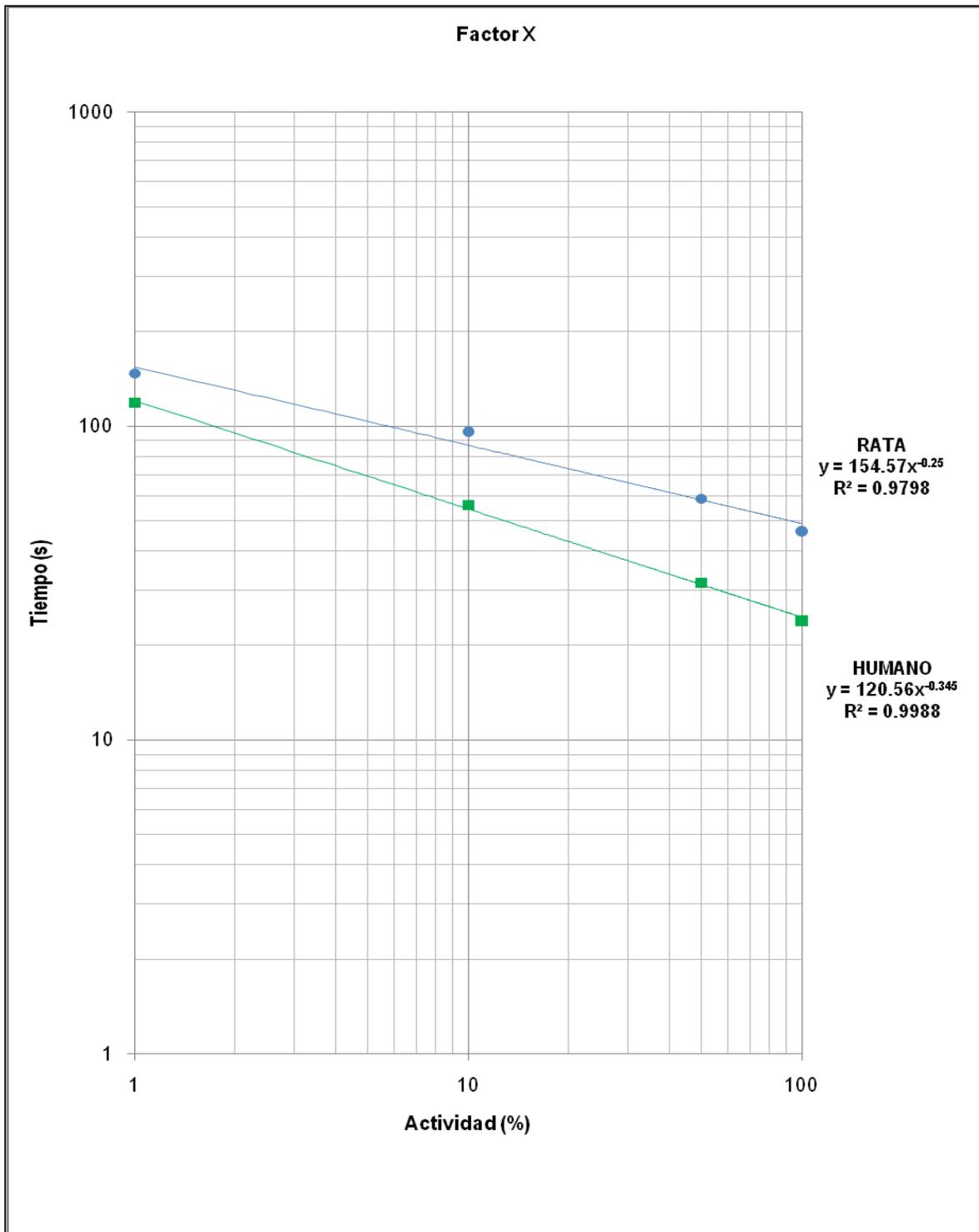


Figura 5. Estandarización del FX en plasma humano y de rata, con diluciones de 1:20, 1:40, 1:200 y 1:2000. Cada punto representa el promedio de al menos 10 ratas sin tratamiento por triplicado \pm eem.

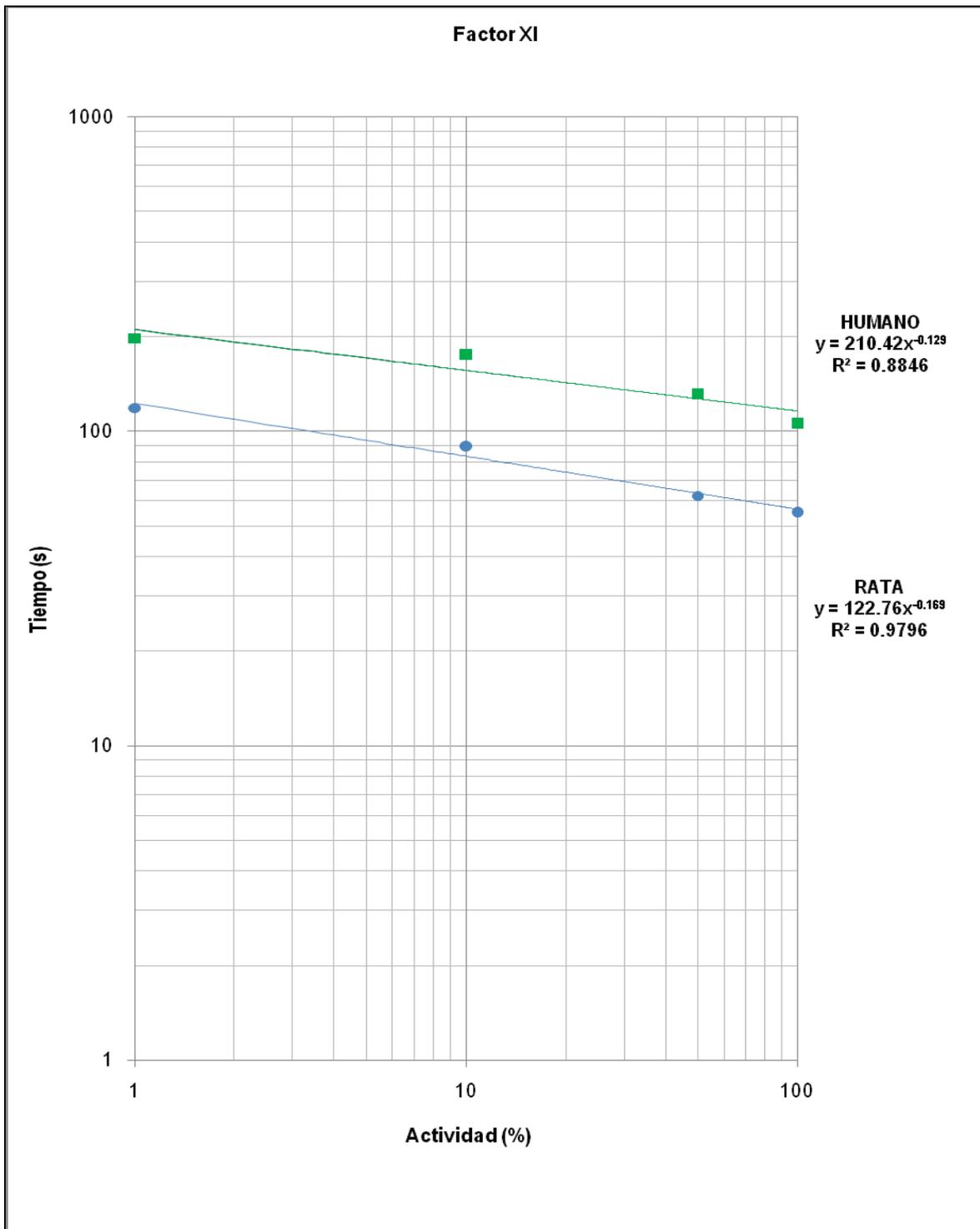


Figura 6. Estandarización del FXI en plasma humano y de rata, con diluciones de 1:5, 1:10, 1:50 y 1:500. Cada punto representa el promedio de al menos 10 ratas sin tratamiento por triplicado \pm eem.

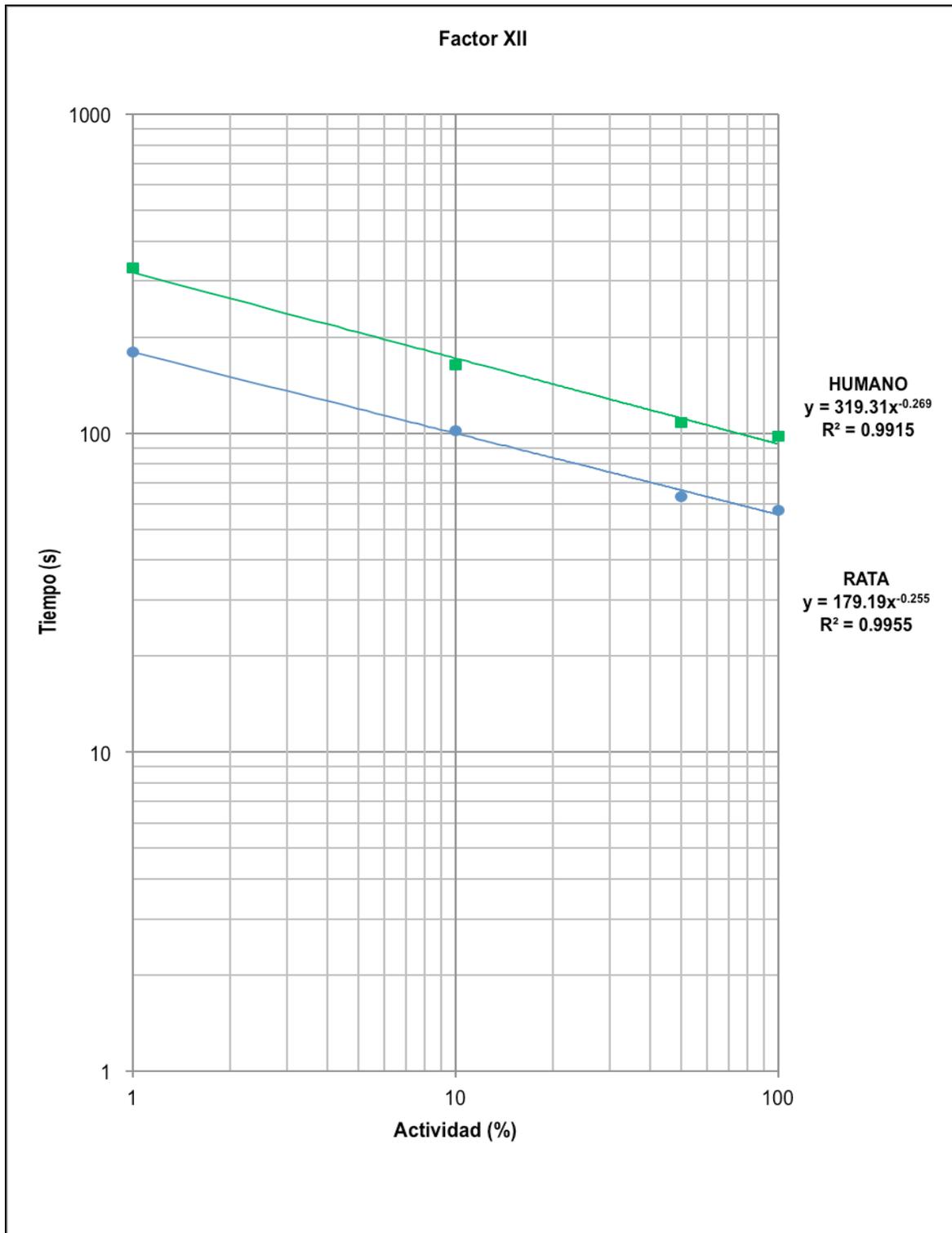


Figura 7. Estandarización del FXII en plasma humano y de rata, con diluciones de 1:5, 1:10, 1:50 y 1:500. Cada punto representa el promedio de al menos 10 ratas sin tratamiento por triplicado \pm eem.

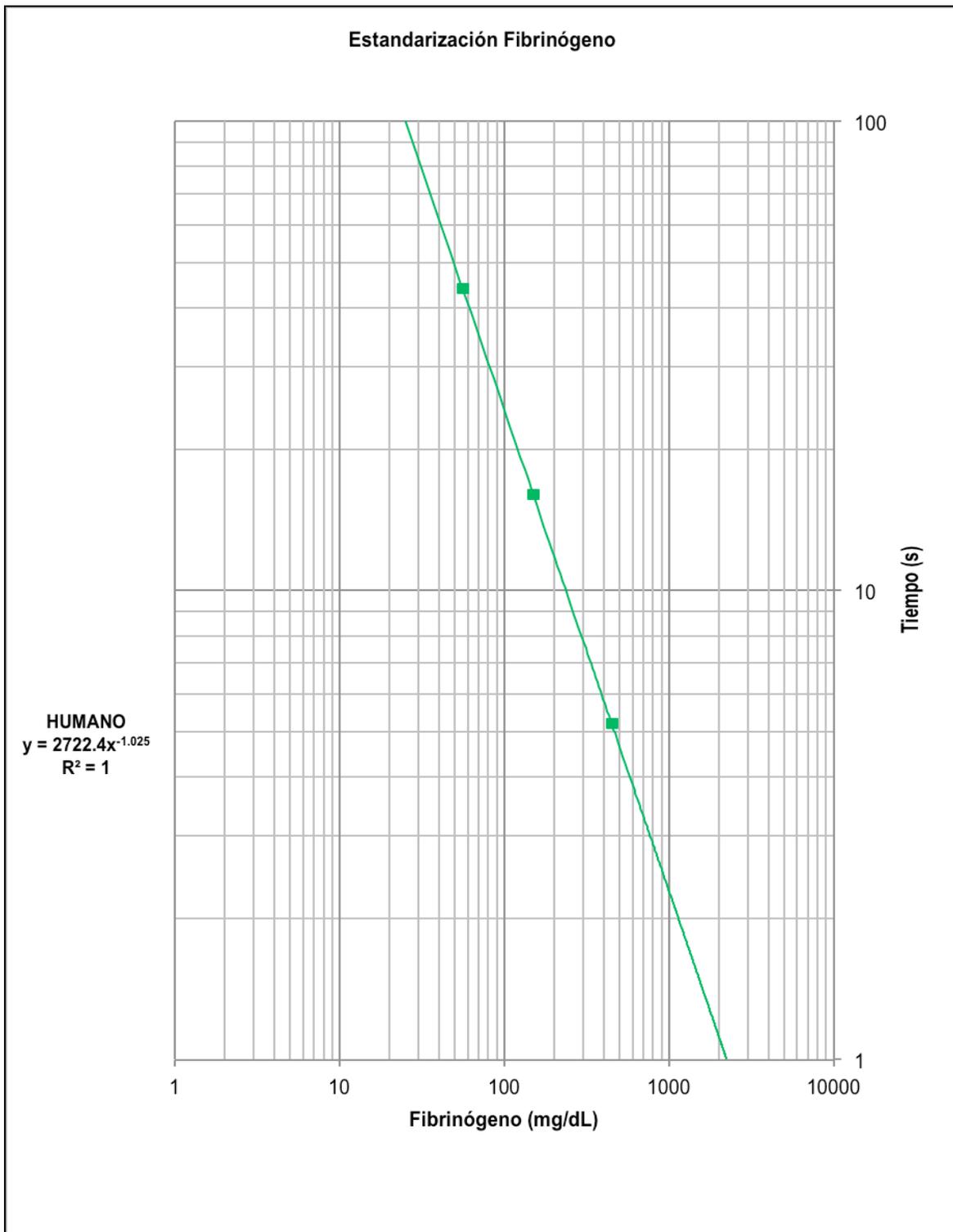


Figura 8. Estandarización de fibrinógeno en plasma estándar humano con diluciones de 1:5, 1:10 y 1:20. Cada punto representa el promedio de un pool de plasma humano estándar por triplicado \pm eem.



b) Efecto de etinilestradiol y 17 β -estradiol sobre TP, TTPa, factores VII, X, XI, XII y fibrinógeno

En la figura 9 y 10 podemos observar el efecto de etinilestradiol y estradiol sobre el TP y TTPa, dos pruebas de coagulación ampliamente utilizadas en el laboratorio para monitorear efecto de fármacos anticoagulantes o estados protrombóticos. Los resultados nos muestran que el etinilestradiol aumenta el TP y el TTPa de manera significativa respecto al control ($p < 0.05$) en todas las dosis administradas (8, 13, 15 y 10 %; figura 9) y (32, 35 y 28 %; figura 10), mientras que el estradiol no muestra efectos en ninguna de estas pruebas.

La comparación entre ambos fármacos ($p < 0.05$) muestra una diferencia significativa para el tiempo de protrombina a dosis de 3, 10 y 30 mg/ Kg, mientras que para el tiempo de tromboplastina no se encuentra diferencia entre ellos a ninguna de las dosis administradas.

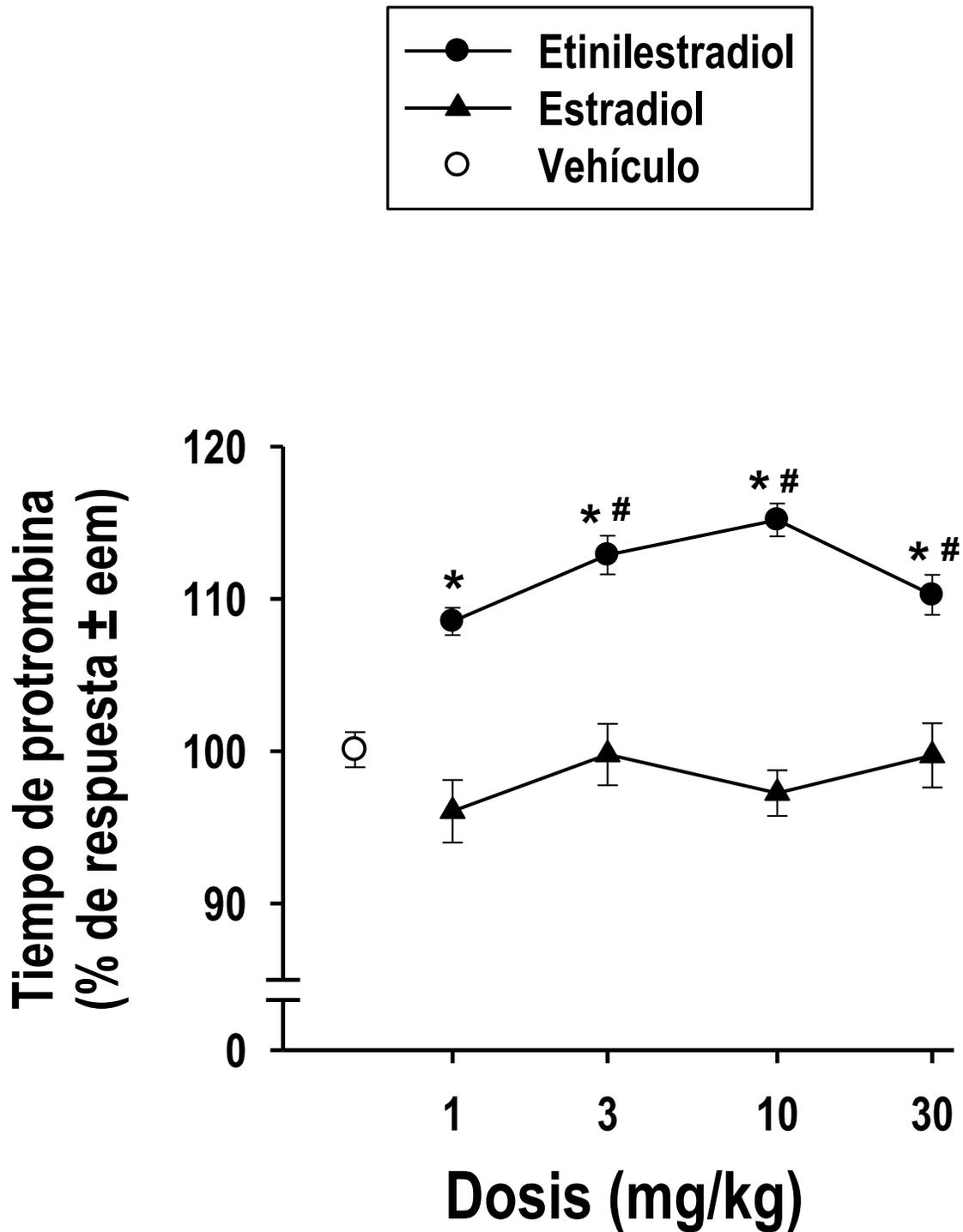


Figura 9. Efecto de etinilestradiol y 17 β -estradiol (1, 3, 10, 30 mg/ kg) sobre el tiempo de protrombina (TP). Cada punto representa el promedio \pm eem de tres experimentos (9 a 15 animales) por triplicado. *P<0.05 EE o E₂ vs vehículo, prueba de Dunnett. #P<0.05 EE vs E₂, prueba de Dunn.

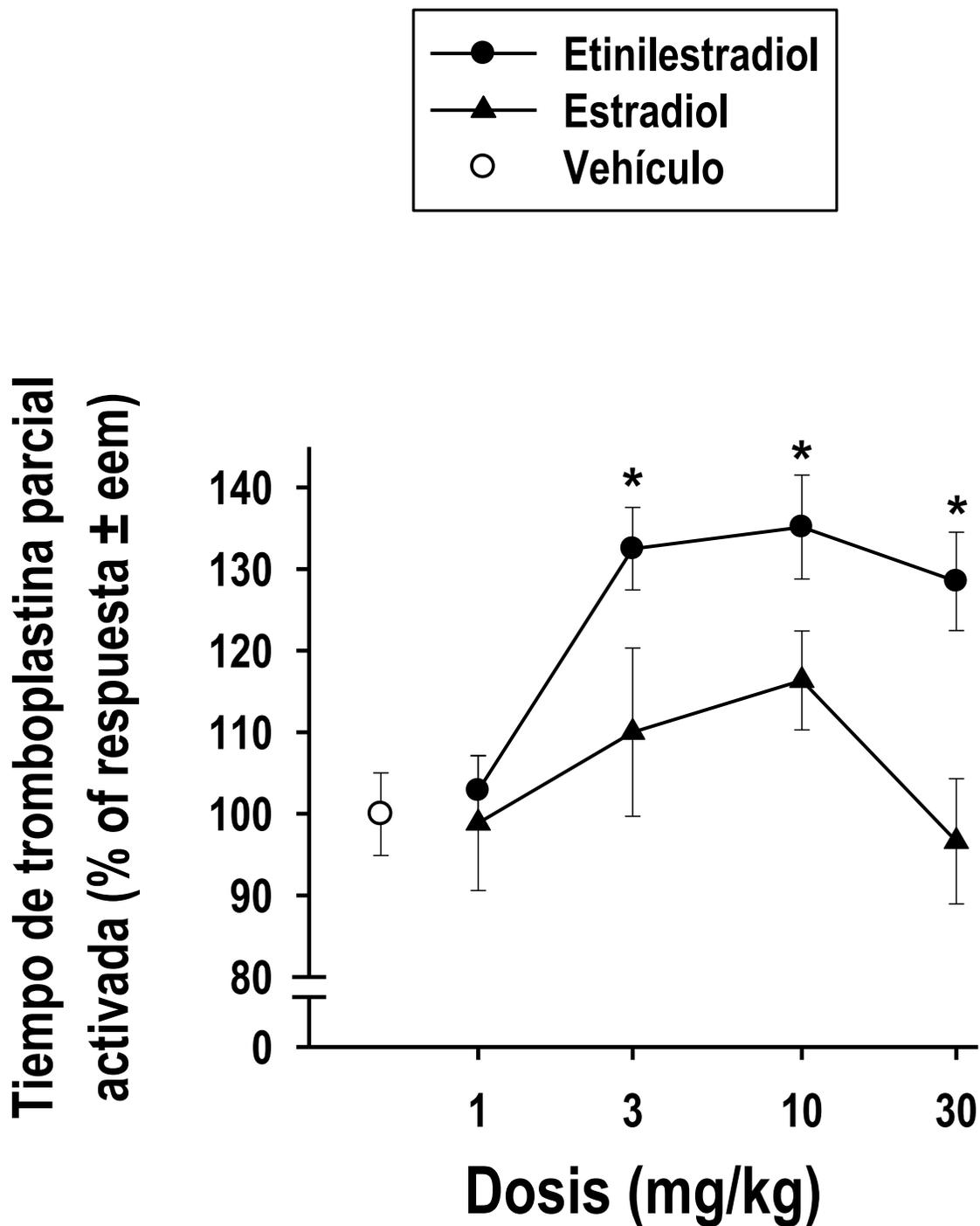


Figura 10. Efecto de etinilestradiol y 17 β -estradiol (1, 3, 10, 30 mg/ kg) sobre el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa). Cada punto representa el promedio \pm eem de tres experimentos (9 a 15 animales) por triplicado. *P<0.05 EE o E₂ vs vehículo, prueba de Dunnett. #P<0.05 EE vs E₂, prueba de Dunn.



La vía extrínseca de la coagulación se exploró al evaluar el efecto del etinilestradiol y estradiol sobre la actividad del factor VII. En la figura 11 se observa que el etinilestradiol disminuye de manera significativa ($p < 0.05$ vs control) la actividad del factor VII (-10, -13 y -10 %) mientras que la administración de estradiol no modifica este marcador hemostático.

La comparación entre ambos fármacos (< 0.05) para este factor, nos muestra que sólo a las dosis de 3 y 10 mg/ Kg existe diferencia significativa entre ellos.

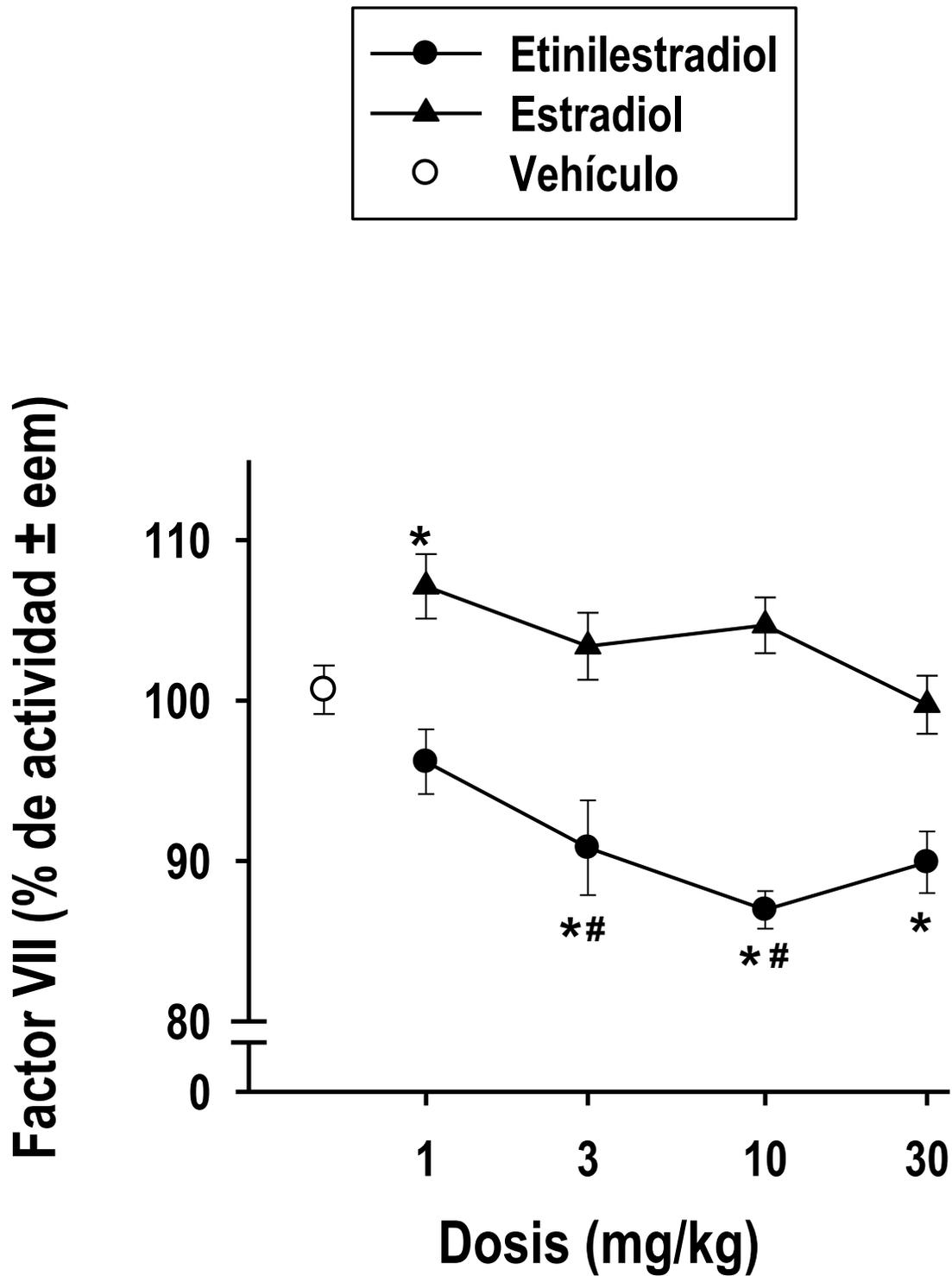


Figura 11. Efecto de etinilestradiol y 17 β -estradiol (1, 3, 10, 30 mg/ kg) sobre la actividad del factor VII. Cada punto representa el promedio \pm eem de tres experimentos (9 a 15 animales) por triplicado. *P<0.05 vs vehículo, prueba de Dunnett. #P<0.05 EE vs E₂, prueba de Dunn.



Para evaluar la vía común se determinó el efecto de etinilestradiol y estradiol sobre la actividad del factor X y las concentraciones del fibrinógeno. En la figura 12 podemos observar la respuesta de la actividad del factor X por la administración de los esteroides, donde el etinilestradiol produjo una importante disminución de la actividad de este factor (10, -9, -15 y -14 %; $p < 0.05$ vs control), mientras que el estradiol no produjo ningún efecto. En el caso del fibrinógeno sólo se observó un aumento significativo del 14 % con la dosis de 30 mg/ Kg de etinilestradiol, pero no con estradiol (figura 13).

Al comparar ambos fármacos entre sí, puede observarse para el caso del factor X una diferencia significativa entre ellos a las dosis de 10 y 30 mg/ Kg. En el gráfico de fibrinógeno, puede observarse que no existe diferencia significativa entre ambos fármacos a ninguna de las dosis administradas.

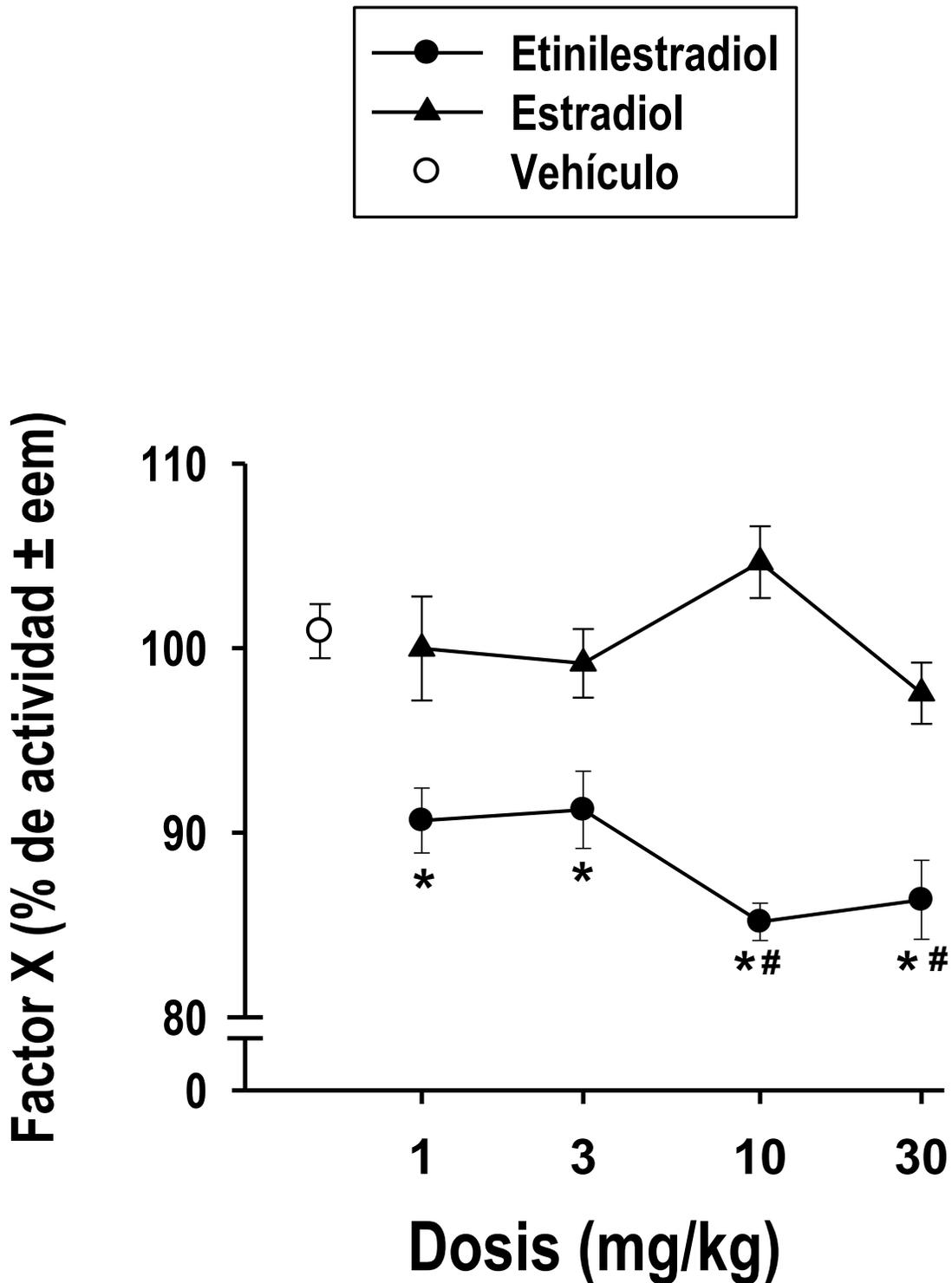


Figura 12. Efecto de etinilestradiol y 17β -estradiol (1, 3, 10, 30 mg/ kg) sobre la actividad del factor VII. Cada punto representa el promedio \pm eem de tres experimentos (9 a 15 animales) por triplicado. * $P < 0.05$ vs vehículo, prueba de Dunnett. # $P < 0.05$ EE vs E_2 , prueba de Dunn.

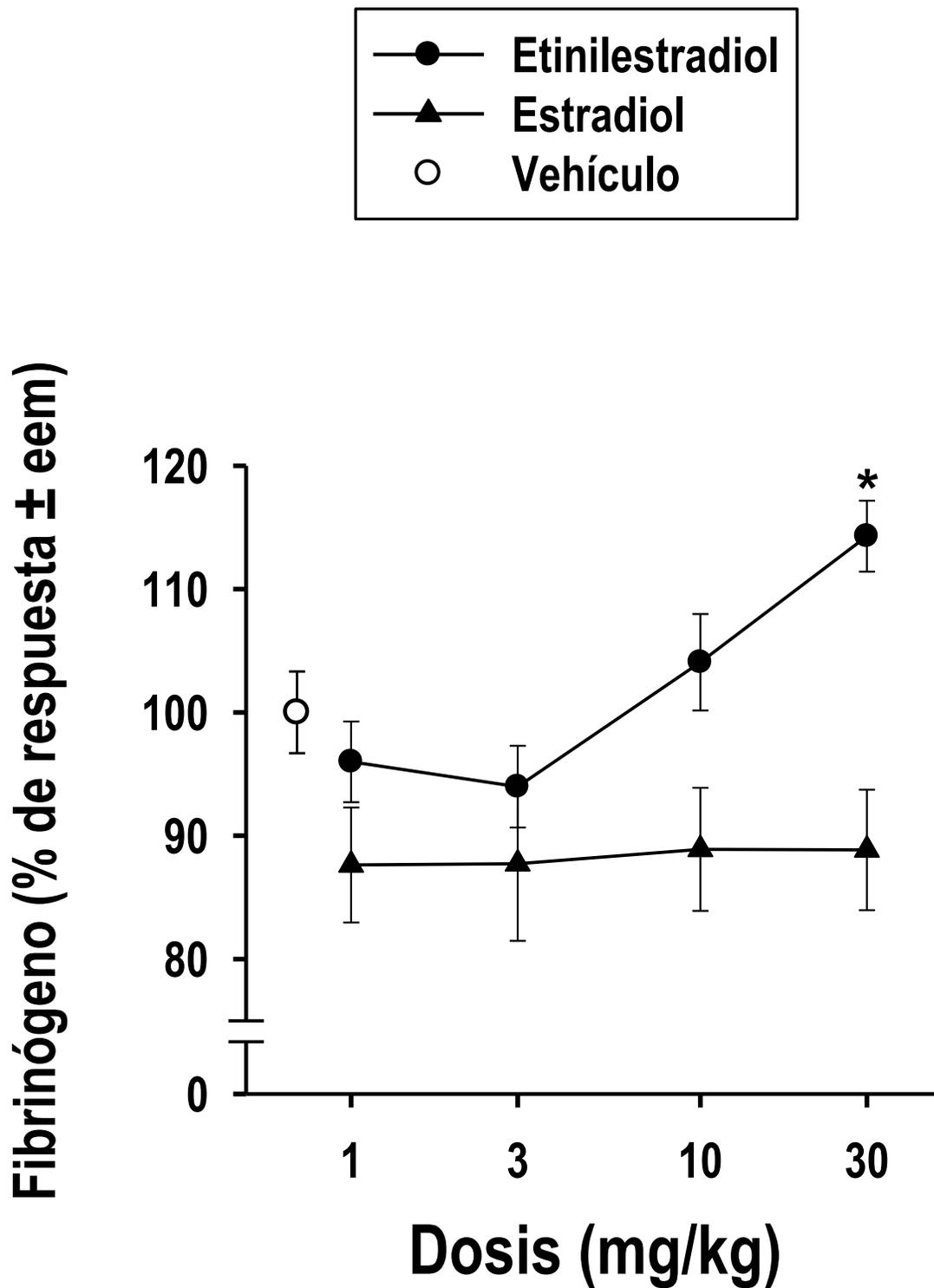


Figura 13. Efecto de etinilestradiol y 17 β -estradiol (1, 3, 10, 30 mg/Kg) sobre el las concentraciones de fibrinógeno. Cada punto representa el promedio \pm eem de tres experimentos (9 a 15 animales) por triplicado. *P<0.05 vs vehículo, prueba de Dunnett. #P<0.05 EE vs E₂, prueba de Dunn.



La vía intrínseca se evaluó por la determinación del efecto del etinilestradiol y estradiol sobre la actividad de los factores XI y XII. El etinilestradiol produjo una disminución significativa del factor XI en todas las dosis administradas (-15, -14, -19 y -17 %; $p < 0.05$ vs control), mientras que el estradiol a diferencia de su efecto en los otros parámetros produjo un importante aumento en la actividad de este factor (10, 14, 24 y 24 %; $p < 0.05$ vs control), como lo observamos en la figura 14. Para el caso del factor XII solo observamos una ligera disminución del 9 % con la dosis de 10 mg/ Kg de estradiol, en este caso el etinilestradiol no produjo ningún efecto, figura 15.

Al comparar ambos fármacos entre sí, podemos ver que existe diferencia significativa entre ellos a todas las dosis para el caso del factor XI, para el caso del factor XII no se produjo ninguna diferencia entre ellos a ninguna de las dosis administradas.

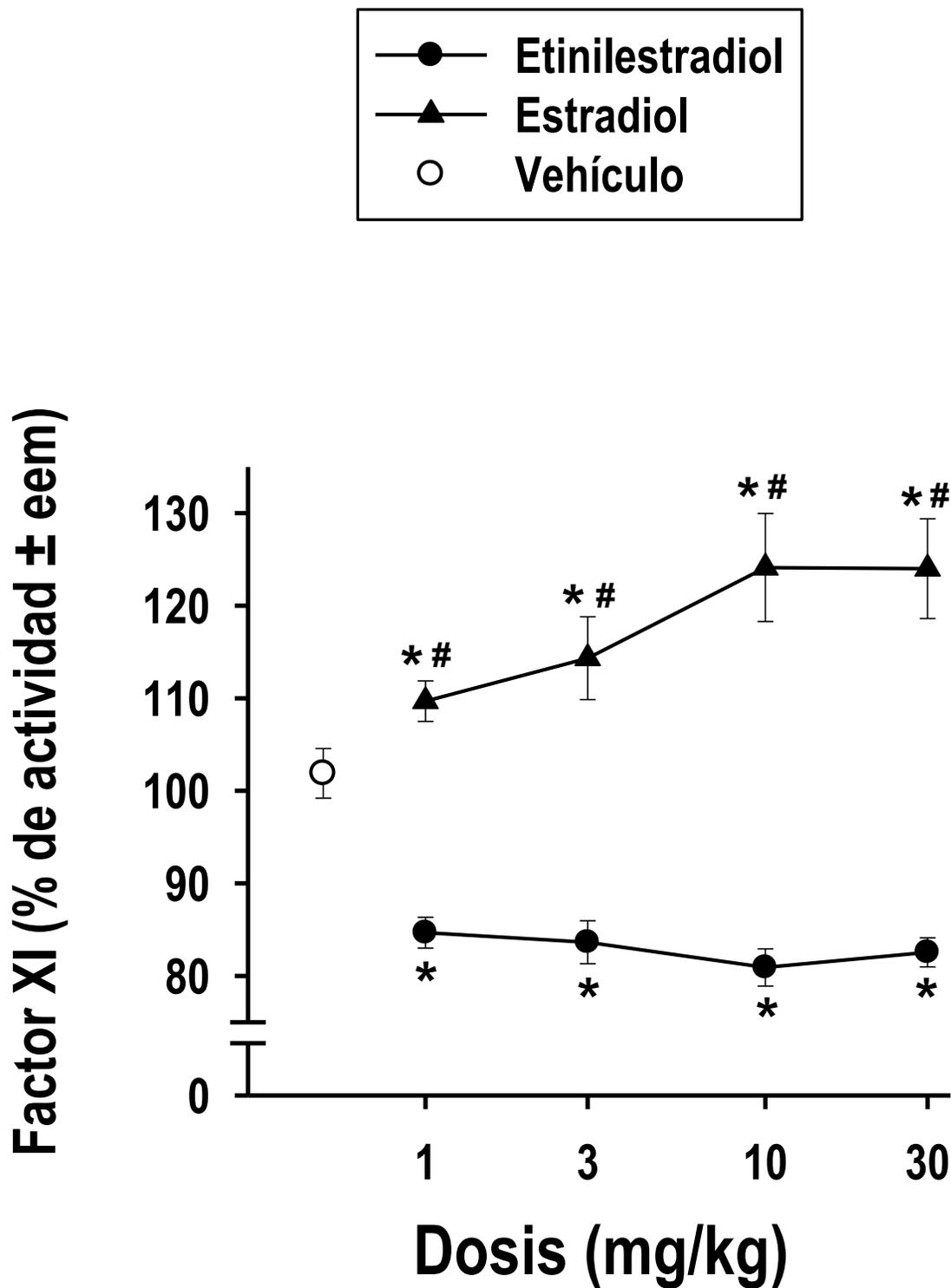


Figura 14. Efecto de etinilestradiol y 17 β -estradiol (1, 3, 10, 30 mg/kg) sobre la actividad del factor XI. Cada punto representa el promedio \pm eem de tres experimentos (9 a 15 animales) por triplicado. *P<0.05 vs vehículo, prueba de Dunnett. #P<0.05 EE vs E₂, prueba de Dunn.

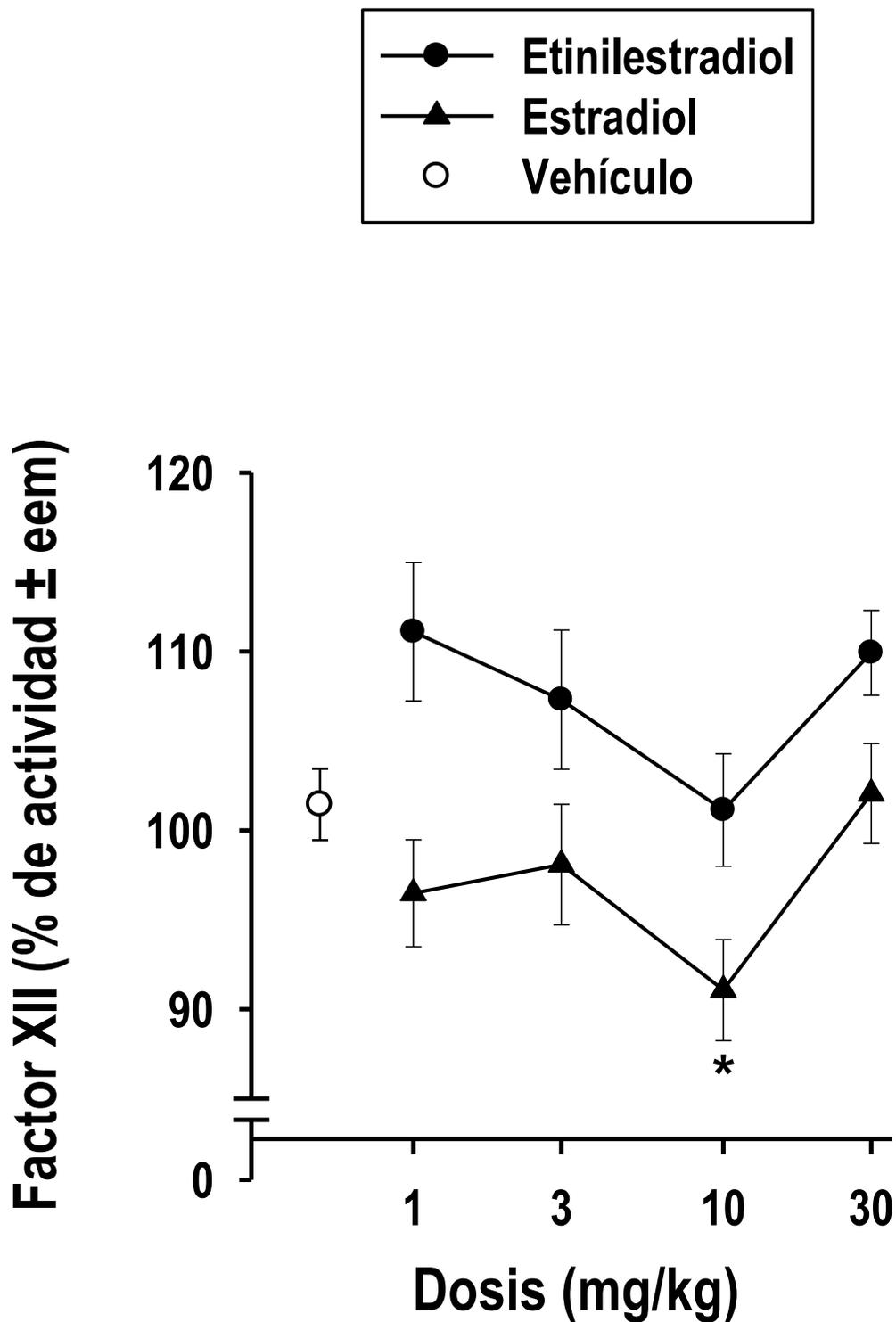


Figura 15. Efecto de etinilestradiol y 17 β -estradiol (1, 3, 10, 30 mg/kg) sobre la actividad del factor XI. Cada punto representa el promedio \pm eem de tres experimentos (9 a 15 animales) por triplicado. *P<0.05 vs vehículo, prueba de Dunnett. #P<0.05 EE vs E₂, prueba de Dunn.



Discusión

En el presente trabajo realizamos una comparación de los efectos de E₂ y EE sobre la hemostasia en el modelo de rata Wistar macho.

Los parámetros hemostáticos que se evaluaron incluyeron marcadores de la hemostasia secundaria tanto de la vía extrínseca, intrínseca y la vía común. Estos marcadores son ampliamente utilizados en la clínica para el monitoreo de pacientes con tratamiento de heparina y warfarina, así como aquellos que cursan con trombosis venosa o algún otro padecimiento de la coagulación. Los fármacos con actividad estrogénica se han utilizado principalmente en mujeres, sin embargo sus efectos adversos sobre la hemostasia también han sido observados en pacientes del género masculino (transexuales que utilizan EE y E₂. Toorians et al; 2003).

En este estudio el EE produjo cambios en las pruebas de orientación (TP y TTPa) a diferencia del E₂ que en este diseño no tuvo ningún efecto. En las pruebas de orientación el EE presenta un efecto anticoagulante que difiere de otros resultados publicados previamente en donde disminuye el tiempo de coagulación total en ratas con una tendencia procoagulante (García-Manzano et al, 2002). El aumento de EE sobre TP coincide con lo observado por Bonnar y Sabra (1986) en un estudio en mujeres que recibieron diferentes preparaciones monofásicas de EE y diferentes progestinas.

El efecto inhibitorio de EE sobre la actividad del factor VII está probablemente relacionado con la



evidencia de que los estrógenos inhiben la actividad transcripcional del promotor del factor VII. Un posible mecanismo para explicar la inhibición del factor VII por la presencia de estrógenos es que el receptor de estrógenos se une a sus elementos de respuesta en el DNA y previene la actividad transcripcional del gen que codifica para el factor VII (Bitondo et al, 2002). Otros grupos de investigación en humanos han demostrado un incremento de los niveles del factor VII en mujeres posmenopáusicas comparadas con mujeres premenopáusicas de edad similar y una relación inversa entre los niveles de factor VII y los niveles de E₂ durante el ciclo menstrual (Scarabin, 1996; Kapiotis et al, 1998). En otro estudio se observó que el incremento de estrógenos durante el embarazo estaba asociado con el aumento en los niveles del factor VII. Las formulaciones de anticonceptivos orales que utilizan estrógenos sintéticos, generalmente resultan en un aumento de los niveles del antígeno del factor VII en plasma (Bonnar y Sabra, 1986; Quehenberger et al, 1996; Middeldorp et al, 2000).

En este estudio demostramos que el EE también produjo un efecto inhibitorio sobre la actividad del factor XI, mientras que el E₂ produjo el efecto opuesto. El aumento de la actividad del factor XI inducido por E₂ puede estar relacionado con una actividad procoagulante, sin embargo es difícil explicar la actividad del EE. Existen muchas contribuciones acerca de la regulación de la actividad del factor XII por la administración de E₂, pero no tenemos evidencias acerca del efecto del EE. En nuestro estudio no encontramos diferencias sobre el factor XII, que contrasta con otros estudios que apoyan la evidencia de que el E₂ aumenta las concentraciones del factor XII a través de una regulación de la transcripción génica. Gordon et al; (1985, 1991) demostró en hígados de ratas que la estimulación con E₂ (2-38 µg/ Kg/durante 7 días) y prolactina aumentaban las concentraciones



plasmáticas del factor XII al aumentar la expresión del gen a nivel transcripcional y síntesis protéica o ambas. Por otro lado, Citarella et al; (1993, 1996) y Farsetti et al; (1995) analizaron la inducción del E₂ (1.5 mg/Kg durante 1 y 5 días) sobre la transcripción del gen que codifica para factor XII, utilizando ratas Sprague-Dawley ovariectomizadas y cotransfecciones en fibroblastos NIH3T3 de ratón y células de hepatoblastoma humano (HepG2).

Nuestros resultados indican que los efectos de EE pueden estar relacionados con una disminución de la actividad de los factores de coagulación y esto implica la prevención en la formación de trombos. Estos resultados convergen con lo reportado por Mueck et al; (2001) donde demuestra que el EE ejerce una influencia positiva sobre varios marcadores que mejoran el tono vascular e impiden el desarrollo de aterosclerosis y trombosis venosa y mejoran el equilibrio de la homeostasis electrolítica. Por otro lado Cleuren et al; (2010) demostró que el EE aumenta los niveles de los transcritos de los factores de coagulación en ratón a través del receptor alfa de estrógenos, así como al fibrinógeno.

Las diferencias que encontramos en los efectos observados por E₂ y EE pueden deberse principalmente a diferencias farmacocinéticas, específicamente el tiempo de vida media, ya que mientras que el E₂ tiene un tiempo de vida media de aproximadamente 70 minutos, el EE tiene un tiempo de vida media de 12 h (8 h mínimo, 24 h máximo).

Esta es la primera evidencia del efecto inhibitorio del EE en un modelo animal con las dosis utilizadas y los días de tratamiento (1-30 mg/Kg/día, durante 3 días).



La importancia del presente trabajo radica en que alrededor del mundo millones de mujeres utilizan la terapia anticonceptiva o de reemplazo hormonal, por lo que es necesaria la investigación dirigida a la evaluación de los efectos adversos de estos fármacos y contribuir a la prevención de los mismos.



Conclusiones

Existen diferencias importantes en la hemostasia secundaria en las respuestas generadas por la administración del estrógeno natural E_2 y un estrógeno sintético EE en el modelo de rata Wistar macho.

El EE presentó en la mayoría de los casos un efecto de tipo inhibitorio al actuar a través de las vías extrínseca, intrínseca y común.

En el presente diseño experimental utilizado, el E_2 sólo mostró un modesto efecto procoagulante sobre el factor XI, que contrasta de manera importante con el efecto observado en el EE.



Bibliografía

1. Banfi C, Mussoni L, Risé P, Cattaneo MG, Vicentini L, Battani F, Galli C, Tremoli E. Very low density lipoprotein-mediated signal transduction and plasminogen activator inhibitor type 1 in culture HepG2 cells. *Circ Res.* 1999; 85:208-217.
2. Bilsel AS, Onaran N, Moini H, Emerk K. Long-term effect of 17 β -estradiol and thrombin on tissue factor pathway inhibitor release from HUVEC. *Thromb Res.* 2000; 99:173-178.
3. Bitondo, D.R., Hall, J.A., Peake, R.I., Iacoviello, L., Winship, P. Oestrogenic repression of human coagulation factor VII expression mediated through an oestrogen response element sequence motif in the promoter region. *Hum Mol Genet.* 2002; 11(7):723-731.
4. Boyce J, Fawcett JW, Noall EWP. Coronary thrombosis and Conovid. *Lancet* 1963; 1:111.
5. Breckwoldt M, Keck C, Karck U. Benefits and risks of hormone replacement therapy (HRT). *J. Steroid Biochem Mol Biol* 1995; 53(1-6):205-208.
6. Bonnar, J., Sabra, A.M. Oral contraceptives and blood coagulation. *J Reprod Med.* 1986; 31(6):551-556.
7. Butenas S, Mann KG. Blood coagulation. *Biochemistry* 2002; 67(1): 3-12.
8. Citarella, F., Misiti, S., Felici, A., Aiuti, A., La Porta, C., Fantoni, A. The 5' sequence of human factor XII gene contains transcription regulatory elements typical of liver specific, estrogen-modulated genes. *Biochim Biophys Acta.* 1993; 1172:197-199.
9. Citarella F, Misiti S, Felici A, Farsetti A, Pontecorvi A, Fantoni A. Estrogen induction and contact phase activation of human factor XII. *Steroids* 1996; 61(4):270-6.
10. Clauss A. Gerinnungsphysiologische schnellmethode zur bestimmung des fibrinogens. *Acta Hematol,* 1957; 17:237-240.
11. Cleuren ACA, Van Der Linden IK, De Visser YP, Wagenaar GTM, Reitsma PH, Van Vlijmen JM. 17 α -



- ethinylestradiol rapidly alters transcript levels of murine coagulation genes via estrogen receptor α . *J Thromb Haemost.* 2010; 8:1838-1846.
12. Dahm AE, Hylckama A, Bendz B, Rosendaal F, Bertina RM, Sandset PM. Low levels of tissue factor pathway inhibitor (TPFI) increase the risk of venous thrombosis. *Blood* 2003; 101:4387-4392.
 13. Dahm AE, Rosendaal FR, Andersen TO, Sandset PM. Tissue factor pathway inhibitor anticoagulant activity: risk for venous thrombosis and effect of hormonal state. *Brit J Haematol* 2005; 132:333-338.
 14. Dahm AE, Iversen N, Birkenes B, Ree AH, Sandset PM. Estrogens, selective estrogen receptor modulators, and selective estrogen receptor down-regulator inhibit endothelial production of tissue factor pathway inhibitor I. *BMC Cardio Dis.* 2006; 6:40.
 15. Etingin OR, Haijar DP, Haijar KA, Harpel PC, Nachman RL. Lipoprotein (a) regulates plasminogen activator inhibitor-1 expression in endothelial cells. *J Bio Chem* 1991; 266(4):2459-2465.
 16. Farsetti, A., Misiti, S., Citarella, F., Felici, A., Andreoli, M., Fantoni, A., Sacchi, A., Pontecorvi, A. Molecular basis of estrogen regulation of Hageman factor XII gene expression. *Endocrinology* 1995; 136(11):5076-5083.
 17. Furie B. Pathogenesis of thrombosis. *ASH* 2009; 1: 255-258.
 18. García-Manzano A, González-Llaven J, Lemini C, Rubio-Pòo C. Standarization of rat blood clotting tests with reagents used for humans. *Proc West Pharmacol Soc.* 2001; 44:153-155.
 19. García-Manzano A, González-Llaven J, Jaimez R, Franco Y, Avila ME, Rubio-Póo C and Lemini C. Changes on hemostatic parameters induced by 17β -estradiol, ethinylestradiol, and the 17β -aminoestrogen pentolame in the male Wistar rat. *Steroids* 2002; 67:1129-1135.
 20. Gordon, M.E., Gouglass, G.J., Ratnoff, D.O., Arafah, M.B. The influence of estrogen and prolactin on Hageman factor (factor XII) titer in ovariectomized and hypophysectomized rats. *Blood* 1985; 66(3):602-605.



21. Gordon, M.E., Johnson, R.T., Ramos, P.L., Schmeidler-Sapiro, T.K. Enhanced expression of factor XII (Hageman factor) in isolated livers of estrogen- and prolactin-treated rats. *J Lab Clin Med.* 1991; 117:353-358.
22. Guyton AC. *Tratado de Fisiología Médica.* 10ª. ed. México: Interamericana McGraw-Hill, 2000.
23. Harmening DM. *Clinical hematology and fundamentals of hemostasis.* 4ª ed. Philadelphia: F. A. Davis Company, 2001.
24. Healy AM, Gelehrter TD. Induction of plasminógeno activator inhibitor-1 in HepG2 human hepatoma cells by mediators of the acute phase response. *J. Biol. Chem.* 1994; 269(29):19095-19100.
25. Ing NH, O'Malley BW. The steroid hormone receptor superfamily: molecular mechanisms of action. En: *Molecular endocrinology: basic concepts and clinical correlations.* Weintraub BD (Ed) Raven Press, Ltd NY, 1995; 195-215.
26. Jordan WM. Pulmonary embolism. *Lancet* 1961; ii:1146-7.
27. Kapiotis, S., Jilma, B., Pernerstorfer, T., Stohlawetz, P., Eichler, H.G., Speiser, W. Plasma levels of activated factor VII decrease during the menstrual cycle. *Thromb Haemost.* 1998; 80:588-591.
28. Middeldorp, S., Meijers, J.C., van den Ende, A.E., van Enk, A., Bruma, B.N., Tans, G. Effects on coagulation of levonorgestrel- and desogestrel-containing low dose oral contraceptives: a cross-over study. *Thromb Haemost.* 2000; 84:4-8.
29. Mueck, O.A., Seeger, H., Petersen, G., Schulte-Wintrop, E., Wallwiener, D. Effect of oral contraceptives with different ethinyl estradiol and levonorgestrel concentrations on the urinary excretion of biochemical vasoactive markers. *Contraception* 2001; 64:357-362.
30. Kurata M, Sasayama Y, Yamasaki N, Kitazawa I, Hamada Y, Horii I. Mechanism for shortening PT and APTT in dogs and rats –effect of fibrinogen on PT and APTT-. *J Toxicol Sci.* 2003; 28(5):439-443.
31. Kwang KK, McDonald K, Horne III, Richard O Cannon III. Effects of hormone replacement therapy on coagulation, fibrinolysis, and thrombosis risk in postmenopausal women. *Thrombosis and Haemostasis.*



- 1999; 82(2):626-633.
32. Lemaitre RN, Heckbert SR, Psaty BM, Smith NL, Kaplan RC, Longstreth WT Jr. Hormone replacement therapy and associated risk of stroke in postmenopausal women. *Arch Intern Med* 2002; 162:1954-60.
33. Lemini, C., Jaimez, R., Franco Y. Gender and inter-species influence on screening coagulation tests of rats and mice. *Thromb Res.* 2007; 120(3):415-419.
34. Lorentz I. Parietal lesions and Enavid. *BMJ* 1962; ii 1191.
35. Martínez C, Quintana S. Manual de hemostasia y trombosis, bases fisiopatológicas y clínicas de las enfermedades hemorrágicas y trombóticas. 1ª ed. México: Editorial Prado, 1996.
36. McIntyre TM, Zimmerman GA, Satoh K, Prescott SM. Cultured endothelial cells synthesize both platelet-activating factor and prostacyclin in response to histamine, bradykinin, and adenosine triphosphate. *J. Clin Inv.* 1985; 76:271-280.
37. Maturana MA, Irigoyen MC, Spritzer PM. Menopause, estrogens, and endothelial dysfunction: current concepts. *Clinics* 2007; 61(1):77-86.
38. Million Women Study Collaborators. Patterns of use of hormone replacement therapy in one million women in Britain 1996-2000. *BJOG* 2002; 109:1319-30.
39. Monroe DM, Hoffman M. What does it take to make a perfect clot?. *Arterioscler Thromb Vac Biol* 2006; 26: 41-18.
40. Nilsson BO. Modulation of the inflammatory response by estrogens with focus on the endothelium and its interactions with leukocytes. *Inflamm Res.* 2007; 56:269-273.
41. Pérez-Gómez F, Bover R. La nueva cascada de la coagulación y su posible influencia en el difícil equilibrio entre trombosis y hemorragia. *Rev Esp Cardiol* 2007; 60(12): 1217-1219.
42. Pradhan AD, Manson JE, Rossouw JE, Siscovick DS, Mouton CP, Rifai N, Wallace RB, Jackson RD, Pettinger MB, Ridker PM. Inflammatory biomarkers, hormone replacement therapy, and incident coronary heart disease: prospective analysis from the Women's Health Initiative observational study. *JAMA* 2002; 288:980-7.



43. Proctor RR, Rapaport SI. The partial thromboplastin time with kaolin. A simple screening test for first stage plasma clotting factor deficiencies. *Am J Clin Pathol.* 1961; 36:212–9.
44. Quenherberger P, Poner U, Kapiotis S, Handler S, Schneider B, Huber J, Speiser W. Increased levels of activated factor VII and decreased plasma protein S activity and circulating thrombomodulin during use of oral contraceptives. *Thromb Haemost.* 1996; 76(5):729-34.
45. Quick AJ. Letter. Normal values for coagulation test. *N. Engl. J. Med.* 1954; 290:751.
46. Quintana S. Actualidades en hemostasia. *Gac Méd Méx* 2002; 138 Suppl 1: S47-S59.
47. Rosendaal FR. Venous thrombosis: a multicausal disease. *Lancet.* 1999; 353:1167-1173.
48. Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Vandenbroucke JP. Oral contraceptives, hormone replacement therapy and thrombosis. *Thromb Haemost.* 2001; 86:112-123.
49. Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Vandenbroucke JP. Female hormones and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2002; 22:201-210.
50. Rosendaal FR, Van Hylckama Vlieg A, Tanis BC, Helmerhorst FM. Estrogens, progestogens and thrombosis. *J Thromb Haemost.* 2003; 1:1371-1380.
51. Roy S, Overton O, Redman C. Overexpression of any fibrinogen chain by HepG2 cells specifically elevates the expression of the other two chains. *J Biol Chem.* 1994; 269(1):691-695.
52. Scarabin, P.Y., Vissac, A.M., Kirzin, J.M., Bourgeat, P., Amiral, J., Agher, R., Guize, L. Population correlates of coagulation factor VII. Importance of age, sex, and menopausal status as determinants of activated factor VII. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 1996; 16:1170-1176.
53. Shirk RA, Zhang Z, Winneker RC. Differential effects of estrogens and progestins on the anticoagulant tissue factor pathway inhibitor in the rat. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2005; 94:361-368.
54. Toorians AWFT, Thomassen MCLGD, Zweegman S, Magdeleyns EJP, Tans G, Gooren LJG, Rosing J. Venous thrombosis and changes of hemostatic variables during cross - sex hormone treatment in transexual people. *J Clin Endo Metabolism.* 2003; 88(12):5723-5729.



55. Unruh M, Grunow A, Gottstein C. Systemic coagulation parameters in mice after treatment with vascular targeting agents. *Thromb J.* 2005; 3:21:1-13.
56. Wu KK, Thiagarajan P. Role of endothelium in thrombosis and hemostasis. *Ann Rev Med.* 1996; 47:315-31.



EFFECTS OF ETHINYLESTRADIOL AND 17 β -ESTRADIOL ON COAGULATION FACTORS IN MALE WISTAR RATS.

Facultad de Medicina



Martínez-Maldonado JD, Franco-Murillo Y, Jaimez R.

Department of Pharmacology, Faculty of Medicine.
Universidad Nacional Autónoma de México.

Abstract

The use of estrogens in contraception or in replacement therapy leads to an increased risk of venous thrombosis. In the present study we explored the effect of ethinylestradiol (EE) and 17 β -estradiol (E2) on coagulation screening tests: prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT), as well as activity of specific coagulation factors (FVII, FX, FXI, and FXII) in a male Wistar rat model. Wistar rats were injected subcutaneously during three consecutive days with EE, E2 (1, 3, 10 and 30 mg/kg) or propylene glycol (0.3ml; vehicle). Plasma was obtained from iliac artery under anesthesia and samples were processed by a fibrinometer and appropriate reagents for each factor. EE produced significant increments on PT (8.5, 13, 15, and 10%; $p < 0.05$) and aPTT (32, 35, and 28%; $p < 0.05$), whereas E2 did not show any effect on these coagulation tests. On coagulation factors EE significantly ($p < 0.05$) diminished the activity of FVII (-10, -13, and -10%), FX (-10, -9, -15, and -14%), and FXI (-15, -17, -19, and -18%). E2 (1 mg/kg) showed significant increments ($p < 0.05$) on FVII (7%), and FXI (10, 14, 24, and 24%) and a diminution on FXII (-9%; 10 mg/kg). In this study we observed that EE has inhibitory effects on the coagulation system. These findings differ from that reported in the literature. Interestingly the results on FXI showed an opposite effect between EE and E2. In our model EE had effects on extrinsic, intrinsic and common via of coagulation.

Introduction

Estrogens have been used in contraception and hormone replacement therapy. In spite of the beneficial effects of estrogens on bone and cardiovascular system, there are several reports about that the use of estrogens produce changes on coagulation system, resulting in an imbalance between pro- and anticoagulant state (Meade et al., 1977; Stampfer et al., 1989; Sherif, 1999; Mueck et al., 2001).

Objective

To explore the effect of ethinylestradiol (EE) and 17 β -estradiol (E2) on screening tests: prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT), as well as activity of coagulation factors (FVII, FX, FXI, and FXII) in male Wistar rat.



Methods



Animals were distributed in groups according to weight in a Latin square design. Each group received subcutaneously; EE (1, 3, 10 or 30 mg/kg), E2 (1, 3, 10, or 30 mg/kg), or propylene glycol (0.3 ml) during three consecutive days. A day after last injection, animals were anesthetized with Avertin (i.p. 250 mg/kg, tert-amyl alcohol/2,2,2-tribromoethanol). Blood was collected from iliac artery using a Vacutainer® system with citrated (0.105 M) tubes (Franklin Lakes NJ). Samples were centrifuged ten minutes for 3000 rpm at room temperature; plasma was separated, and stored at -20° C until assays were performed.

Prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (aPTT). PT was determinate using Dade® thromboplastin C plus according to Quick's method (1954) in a semi-automatic instrument (Fibrinometer BFT II®). Each sample (50 μ l) was incubated 60 s at 37°C and Dade® thromboplastin C plus reagent (100 μ l) was added to start the reaction until clot formation. APTT was evaluated with Dade® actin FS reagent in a semi-automatic Fibrinometer BFT II® (Proctor and Rapaport, 1961). Each sample (50 μ l) was mixed with actin FS® (50 μ l) and incubated 120 s at 37°C. Reaction was activated with CaCl₂ (50 μ l) to induce clot formation.

Coagulation factors Plasma samples obtained from ethinylestradiol, estradiol or vehicle (control group), were dilute. To determine the activity of factors VII and X, each sample was diluted with imidazole buffer 1:20, whereas factors XI and XII were diluted 1:5 in imidazole buffer.

Factors VII and X were quantified according to PT protocol: samples (50 μ l) were mixed with coagulation factor deficient plasma VII or X (50 μ l), incubated 60 s at 37°C and activated with thromboplastin C plus® (100 μ l, Dade Behring®). Factors XI and XII were processed with APTT protocol: each sample (50 μ l) was mixed with coagulation factor deficient plasma (50 μ l) and Dade actin FS® (50 μ l), incubated 120 s at 37°C, and activated with CaCl₂ (100 μ l).

Results

Coefficients of correlation (r^2) obtained from human and rat curves were similar. (Table 1).

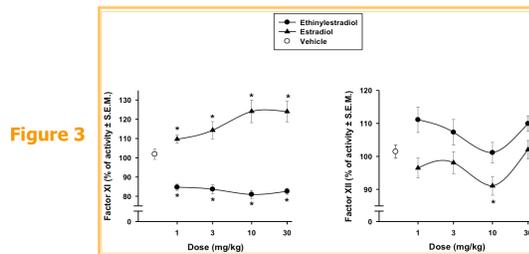
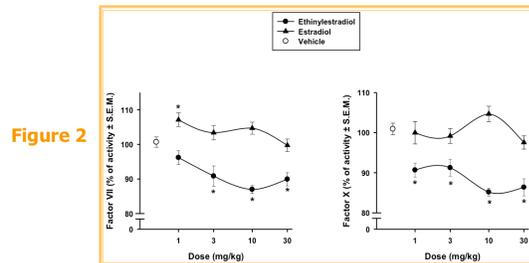
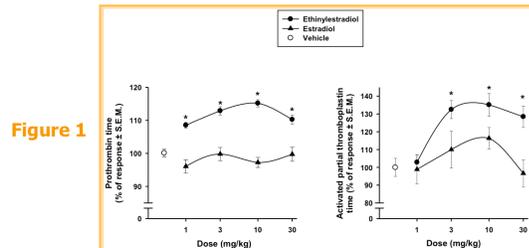
EE produced significant increments ($p < 0.05$) on PT (8, 13, 15, and 10 %) and aPTT (32, 35, and 28%), whereas E2 did not show any effect. (Figure 1).

EE diminished the activity of factors VII (-10, -13, and -10%) and X (-10, -9, -15, and -14); ($p < 0.05$), and E2 (1 mg/kg) produced a modest increment (8%; $p < 0.05$) on FX only. (Figure 2).

On factor XII; E2 (10 mg/kg) showed a diminution of 9 % ($p < 0.05$), and EE did not produce response. EE diminished (-15, -14, -19, and -17%) and E2 augmented (10, 14, 24, and 24%) factor XI activity ($p < 0.05$). (Figure 3).

Table 1. Coefficients of correlation (r^2) from standard curves of human and intact male Wistar rats

Coagulation factor	Human	Rat
FVII	0.9614	0.9636
FX	0.9937	0.9684
FXII	0.9804	0.9416
FXI	0.8689	0.8344



Conclusions

1. EE unlike to E2 produced effects on hemostasis in rat.
2. EE seems to have an anticoagulant pattern.
3. The main difference between EE and E2 was observed in factor XI.
4. In our model we observed that estrogens did not produced procoagulant effects.

References

- Meade, T.W., Haines, A.P., North, W.R.S., Chakrabarti, R., Howarth, D.J., Stirling, Y., 1977. Haemostatic, lipid and blood-pressure profiles of women on oral contraceptives containing 50 μ g or 30 μ g oestrogen. *Lancet*. 5, 948-951.
- Mueck, G.A., Seeger, H., Petersen, G., Schulte-Wintrop, E., Wallwiener, D., 2001. Effect of oral contraceptives with different ethinyl estradiol and levonorgestrel concentrations on the urinary excretion of biochemical vasoactive markers. *Contraception* 64, 357-362.
- Proctor, R.R., Rapaport, S., 1961. The partial thromboplastin time with kaolin. A simple screening test for first stage plasma clotting factor deficiencies. *Am. J. Clin. Pathol.* 36, 212-219.
- Quick, A.J., 1954. Letter: Normal values for coagulation test. *N. Engl. J. Med.* 290, 751.
- Sherif, K., 1999. Benefits and risks of oral contraceptives. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 180(6), S343-S348.
- Stampfer, M.J., Colditz, G.A., Willet, W.C., 1989. Menopause and heart disease: a review. *Ann. NY Acad. Sci.* 592, 193-203.

This study was supported by CONACyT 90756, and NIH D-43-TW001272-05 grants and Faculty of Medicine facilities at Universidad Nacional Autónoma de México.



XXXIV CONGRESO ANUAL
DE LA ASOCIACIÓN
MEXICANA DE
FARMACOLOGÍA A.C.



54th ANNUAL MEETING OF
THE WESTERN
PHARMACOLOGY
SOCIETY



2nd LATIN AMERICAN MEETING
OF THE INTERNATIONAL
SOCIETY OF
PHARMACOEPIDEMIOLOGY

INTERNATIONAL CONGRESS OF PHARMACOLOGY MEXICO 2011

MAY 16th - 20th at the PALACE OF THE SCHOOL OF MEDICINE, MEXICO CITY

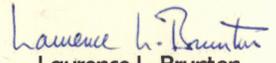
Poster presentation

Martínez Maldonado JD, Franco Murillo Y, Jaimez Melgoza R

for the poster presentation entitled:

Effects of 17 α -ethinylestradiol and 17 β -estradiol on
coagulation factors in male Wistar rats


Ma. Dolores Ramírez González
AMEFAR **President**


Laurence L. Brunton
WPS **President**

