



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**TRATAMIENTO CRÓNICO DE TAMOXIFENO Y SU EFECTO EN EL SISTEMA
HEMOSTÁTICO Y LA RESPUESTA INFLAMATORIA *IN VIVO***

TESIS

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA

FUENTES FONSECA ROSA NALLELY



MÉXICO, D.F. FEBRERO, 2015



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: ATONATIU EDMUNDO GÓMEZ MARTÍNEZ**

VOCAL: **Profesor: JOSÉ FAUSTO RIVERO CRUZ**

SECRETARIO: **Profesor: RUTH JAIMEZ MELGOZA**

1er. SUPLENTE: **Profesor: OSCAR ARMANDO PÉREZ MÉNDEZ**

2º SUPLENTE: **Profesor: MARÍA EVA GONZÁLEZ TRUJANO**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Estrógenos y Hemostasia. Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina.

ASESORA DEL TEMA:

Dra. RUTH JAIMEZ MELGOZA

SUSTENTANTE:

FUENTES FONSECA ROSA NALLELY

ÍNDICE

1.	RESUMEN	1
2.	INTRODUCCIÓN	3
2.1	RECEPTOR DE ESTRÓGENOS	4
2.2	MODULADORES SELECTIVOS DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS.....	5
2.3	ANTIESTRÓGENOS.....	6
2.4	FITOESTRÓGENOS.....	6
2.5	MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS SERMs.....	8
2.6	FARMACOCINÉTICA DE LOS SERMs.....	10
3.	ANTECEDENTES	11
4.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	13
5.	JUSTIFICACIÓN	13
6.	HIPÓTESIS.....	14
7.	OBJETIVOS.....	14
7.1	OBJETIVO GENERAL	14
7.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	14
8.	MATERIALES Y MÉTODOS	15
8.1	MATERIALES	15
8.1.1	Reactivos	15
8.1.2	Material y equipo.....	15
8.1.3	Material biológico	16
8.2	MÉTODOS.....	16
8.2.1	Ovariectomía.....	16
8.2.2	Manejo de animales y tratamiento farmacológico.....	16
8.2.3	Toma de muestras	17
8.2.4	Determinación de las pruebas hemostáticas	17
8.2.5	Determinación de marcadores biológicos.....	18
8.2.6	Análisis estadístico.....	19
9.	RESULTADOS.....	20
9.1	Efecto sobre el peso corporal.....	20
9.2	Efecto sobre el peso del útero.....	20
9.3	Efecto hemostático del tamoxifeno.....	23

9.3.1	Efecto del tamoxifeno sobre TP	23
9.3.2	Efecto del tamoxifeno sobre TTPa	23
9.3.3	Efecto del tamoxifeno sobre fibrinógeno.....	26
9.3.4	Factor tisular (FT).....	27
9.3.5	Fibrinógeno	28
9.3.6	Plasminógeno	29
9.3.7	Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1).....	30
9.3.8	Interleucina 1- β (IL 1- β).....	31
9.3.9	Factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α).....	32
10.	DISCUSIÓN.....	33
11.	CONCLUSIONES	36
12.	PERSPECTIVAS	36
13.	BIBLIOGRAFÍA.....	37
14.	ANEXO I.....	41
14.1	CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE FIBRINÓGENO.....	41

ABREVIATURAS

Adjuvant Tamoxifen Longer Against Shorter (ATLAS)

Adjuvant Tamoxifen Treatment Offer More? (ATTOM)

Corresponsables (CoR)

Dominio de unión a ligando (LBD)

Dominio de unión al DNA (DBD)

Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG)

Elementos de respuesta estrogénica (ERE)

Factor de crecimiento epidermal tipo 2 (EGF-2)

Factor de necrosis tumoral- α (TNF- α)

Factor tisular (FT)

Food and Drug Administration (FDA)

Función de activación 2 (AF2)

Inhibidor de la activación del plasminógeno tipo 1 (PAI-1)

Interleucina 1- β (IL1- β)

Moduladores selectivos del receptor de estrógenos (SERMs)

Novalex Adjuvant Trial Organisation (NATO)

Receptor de estrógenos (ER)

Terapia de reemplazo hormonal (THR)

Tiempo de protrombina (TP)

Tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa)

1. RESUMEN

El cáncer de mama es la neoplasia diagnosticada con mayor frecuencia en la población femenina del mundo. El tamoxifeno es un fármaco introducido en 1969 para la prevención y tratamiento en el cáncer de mama dependiente de estrógenos debido a sus efectos antagonistas en este tejido, pero se han reportado efectos adversos tales como, cáncer de útero, tromboembolismo venoso y accidente cerebrovascular. Sin embargo, algunos trabajos han publicado que disminuye los eventos trombóticos y atribuyen un efecto cardioprotector.

Debido a los efectos adversos sobre la hemostasia del tamoxifeno aún son controversiales. En el presente trabajo se evaluaron los efectos del tamoxifeno sobre los marcadores involucrados en la patogénesis de la trombosis tales como la coagulación, la fibrinólisis y la respuesta inflamatoria, en ratas Wistar ovariectomizadas, distribuidas en lotes, a cada grupo se administró diferentes dosis de tamoxifeno (100, 300 y 1000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) o el vehículo (propilenglicol 0.2 mL) durante 15 días por vía subcutánea. A las 24 horas después del tratamiento, los animales se pesaron, se sacrificaron y sus úteros se pesaron, el plasma se obtuvo para realizar las pruebas de coagulometría; se determinó el tiempo de protrombina, el tiempo de tromboplastina parcial activada y concentración de fibrinógeno. El suero se utilizó para determinar fibrinógeno, plasminógeno, factor de necrosis tumoral- α , Interleucina 1- β , Inhibidor de la activación del plasminógeno tipo 1 y factor tisular mediante el método de ELISA indirecto.

El tratamiento crónico con tamoxifeno disminuyó el peso corporal de los animales tratados y aumentó el peso del útero. En las pruebas de la vía extrínseca, no observamos efectos significativos. El tiempo de tromboplastina parcial aumentó en 20 y 27%; $p < 0.05$. El tamoxifeno produjo un aumento sobre las concentraciones plasmáticas del fibrinógeno (27-41%, $p < 0.05$), sin embargo disminuyó (-39%, $p < 0.05$) en suero. El tamoxifeno ejerce cambios leves en el sistema fibrinolítico el disminuir al activador del plasminógeno en 20%; $p < 0.05$, mientras que no observamos efectos significativos sobre el plasminógeno. En los marcadores de la inflamación el factor de necrosis tumoral alfa disminuyó significativamente en 34% y 56%; $p < 0.05$, mientras que la interleucina 1 β no cambió

significativamente. En el modelo experimental de rata Wistar hembra ovariectomizada, el tamoxifeno actuó como un compuesto antitrombótico y antiinflamatorio.

2. INTRODUCCIÓN

El cáncer de mama es la neoplasia diagnosticada con mayor frecuencia en la población femenina del mundo. En México, a partir del 2006 es la primera causa de muerte por tumores en mujeres entre 40 y 54 años. (Rodríguez & Capurso, 2006). Los factores hereditarios, la exposición a radiaciones ionizantes, ingesta de alcohol, son algunos de los factores de riesgo asociados al desarrollo de este tipo de cáncer. Particularmente, esta neoplasia se encuentra asociada a la regulación hormonal, específicamente de estrógenos. Es decir, a mayor exposición de estrógenos, mayor será el riesgo de presentar la enfermedad. Por ejemplo una menarquia temprana y menopausia tardía, nuliparidad, nacimiento del primer hijo después de los 30 años y el uso de terapia hormonal de reemplazo (Martín & Weber, 2000).

Los carcinomas de mama representan una enfermedad heterogénea, debido a los diferentes sub-tipos de tumores que se han identificado con base en criterios patológicos estándares, en los que incluye morfología celular, el fenotipo invasivo y el establecimiento de marcadores clínicos y moleculares; entre ellos el receptor de estrógenos alfa (ER α), el receptor de progesterona y el factor de crecimiento epidermal tipo 2 (EGF-2). El ER α es de gran importancia debido a que el 60 al 70% de los tumores son positivos a esa proteína. Lo cual permite aplicar una terapia dirigida hacia el bloqueo de dicho receptor, de tal manera que pacientes con tumores ER+ podrán responder favorablemente a las terapias endócrinas (Allred, 2010).

El descubrimiento y desarrollo de los moduladores selectivos de receptor estrogénico (SERM por sus siglas en inglés) para su uso en el tratamiento contra tumores ER (+), permitió el enfoque de terapia dirigida con pocos efectos secundarios comparados con la quimioterapia tradicional (Shao & Brown, 2004).

2.1 RECEPTOR DE ESTRÓGENOS

Actualmente se conocen dos tipos de receptores denominados como ER α y ER β , codificados por los genes ESR1 y ESR2 (Deroo & Korach, 2006), localizados en los cromosomas 6q y 14q (Herynk & Fuqua, 2004), formados por una sola cadena de 565 y 530 aminoácidos respectivamente. Los receptores de estrógenos se expresan principalmente en mama, útero, ovario, hueso, pulmones, tracto urogenital, sistema nervioso central y próstata. Sólo ER α se asocia con el inicio y la progresión del cáncer de mama, mientras que la función ER β en cáncer de mama todavía no está claro (García-Becerra et al., 2012).

Ambos receptores están conformados por seis dominios denotados (A-F), codificados por 8-9 exones (Figura 1). El dominio N-terminal o (A/B) se localiza la función de transactivación AF-1, una región responsable de la actividad transcripcional de ER en ausencia de ligando (Shao & Brown, 2004).

El dominio C o de unión al DNA (DBD), es una región principalmente hidrofóbica con un alto contenido de aminoácidos básicos y cisteínas, que interactúan con el Zn²⁺, para formar dos “dedos de zinc”, que son los responsables del reconocimiento y unión a los EREs (Green et al., 1986). Por otro lado el dominio D, funciona a manera de bisagra, como un puente flexible capaz de unir el dominio de unión a ligando (LBD) con el de fijación al DNA; contiene secuencias de dimerización del receptor y de localización nuclear (Klinge, 2000).

La región carboxilo-terminal (E/F) del receptor, se encuentra el dominio de unión a ligando (LBD) consta de una segunda señal de localización nuclear, un sitio de dimerización y una región de doce hélices implicadas en la unión del ligando, la cual condiciona el grado de afinidad con la cual se unirá al ligando (Kumar et al., 1987). El dominio E también alberga la función de activación 2 (AF2), responsable de la activación dependiente de ligando de ER. El dominio F situado en el C-terminal es una pequeña región que modula tanto AF1 y AF2, aunque no es necesario para la activación transcripcional (García-Becerra et al., 2012).

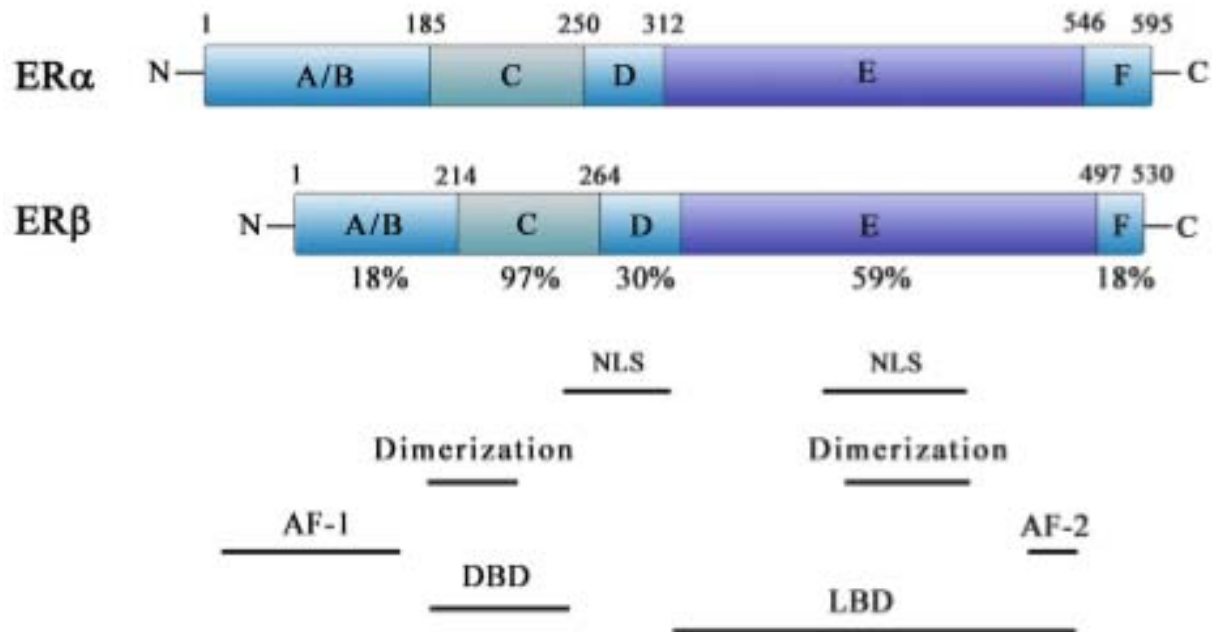


Figura 1. Representación esquemática del ER α y ER β . El dominio A / B en el extremo N-terminal contiene el sitio AF-1. El dominio C incluye el dominio de unión al ADN (DBD) y un sitio de dimerización. El dominio D contiene una señal de localización nuclear. El dominio E / F se encuentra en el extremo C-terminal y comprende la unión al ligando, así como el dominio AF-2, una segunda señal de localización nuclear, y otro sitio de dimerización (García-Becerra et al., 2012).

2.2 MODULADORES SELECTIVOS DEL RECEPTOR DE ESTRÓGENOS

Los moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERMs) son fármacos que se unen al receptor estrogénico (ER) donde simulan la actividad de los estrógenos en ciertos tejidos, mientras inhiben su acción en otros. La mayor parte son compuestos no esteroideos con estructura terciaria, que les permite interactuar con el receptor estrogénico para poder inhibir los efectos del estrógeno sobre algunos tejidos, mientras manifiestan efectos antiestrogénicos sobre otros (Terán & Teppa, 2005).

Actualmente se conoce un amplio número de sustancias con un perfil farmacológico de SERM (Figura 2). Un primer grupo son los derivados de trifeniletileno, entre los que se encuentran el clomifeno, tamoxifeno y sus derivados: 3-hidroxitamoxifeno (droloxifeno), clorotamoxifeno (toremifeno) y GW 5638 (SERMs de primera generación). Dos de estos fármacos son bien conocidos por sus aplicaciones clínicas: el clomifeno y el tamoxifeno.

El clomifeno se utiliza para inducir la ovulación por sus efectos antiestrogénicos a nivel hipotálamo-hipofisario, incrementando la liberación de gonadotropinas en la fase folicular del ciclo (Marín, 1998). El tamoxifeno (ICI 46,474 Nolvadex®) es un fármaco introducido en 1969 para la prevención y tratamiento en el cáncer de mama dependiente de estrógenos debido a sus efectos antagonistas en este tejido (Maximov et al., 2013), pero se han reportado efectos adversos en mujeres mayores de 50 años tales como hiperplasia de endometrio, cáncer de útero, tromboembolismo venoso, accidente cerebrovascular y embolia pulmonar (Davies et al., 2013; Fisher et al., 1994). Un segundo grupo de SERMs incluye a los benzotiofenos, como: raloxifeno y sus derivados, considerado un SERM de segunda generación; disminuye la incidencia de cáncer de mama invasivo en mujeres postmenopáusicas con riesgo elevado de cáncer de mama y osteoporosis; por sus efectos agonistas en hueso se utiliza para prevenir y disminuir los riesgos de fractura vertebral y de cadera (Pinkerton & Thomas, 2014).

2.3 ANTIESTRÓGENOS

Existe un tercer grupo de fármacos denominados antiestrogénos puros (fulvestrant ICI 182,780; ICI 164,384; ZM 189,154), empleados en el tratamiento del carcinoma de mama resistente al tamoxifeno; pero no pueden considerarse SERM por no ejercer efectos estrógeno-agonista a ningún nivel. La unión de estos fármacos con el RE es competitiva e irreversible y degrada al RE, lo que conduce a una pérdida considerable de masa ósea (Marín, 1998). En mujeres en edad fértil puede producir infertilidad.

2.4 FITOESTRÓGENOS

La genisteína es considerada dentro de los fitoSERMs. Es un compuesto no esteroide derivado de las plantas con ciertas propiedades estrogénicas y antiestrogénicas, presenta acciones benéficas entre ellas aumento de la mineralización ósea y efectos favorables en las vías urinarias y sin efectos uterotróficos (Terán & Teppa, 2005). (Figura 2).

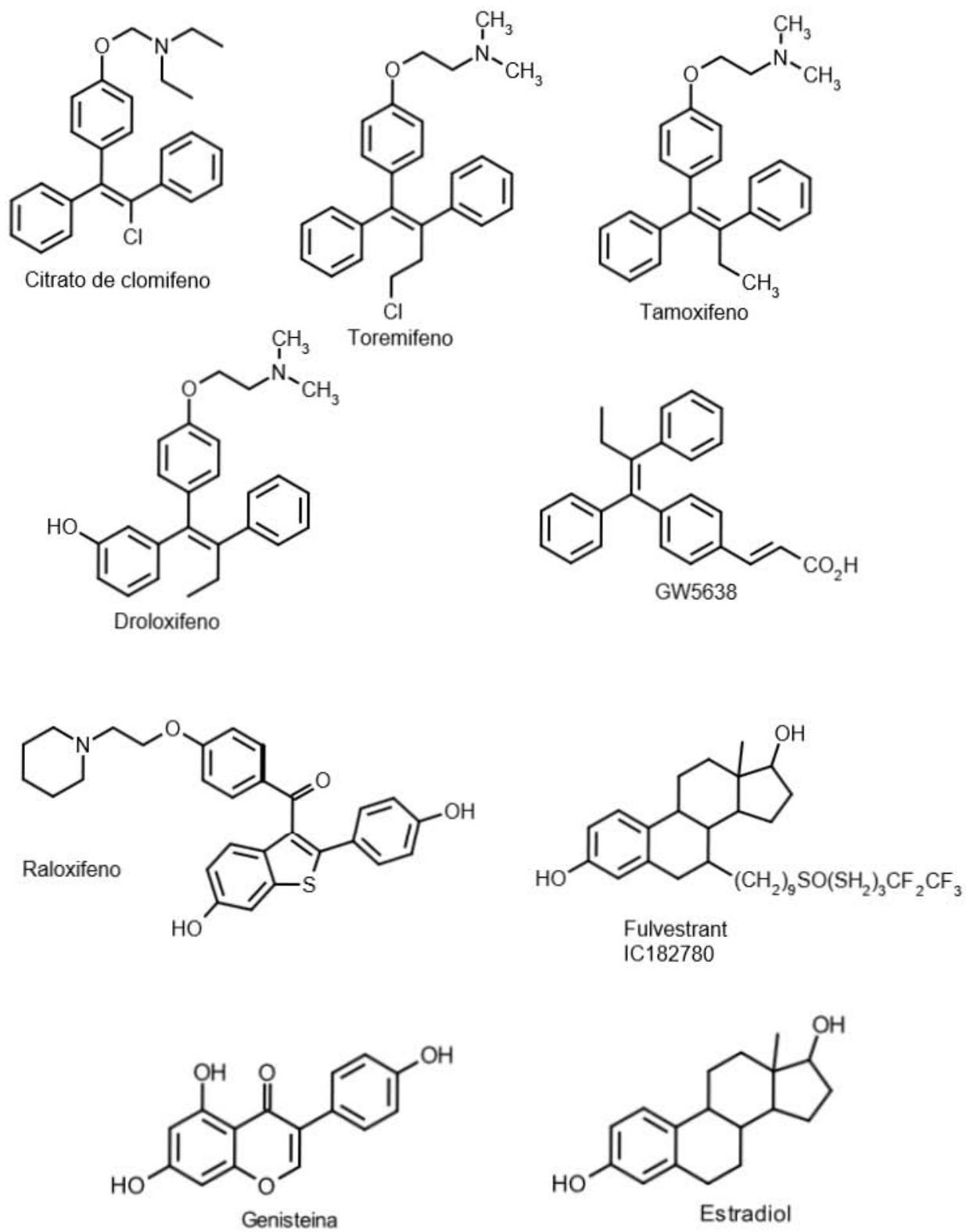


Figura 2. Estructura química de diferentes SERMs y el 17β- estradiol (Terán & Teppa, 2005).

2.5 MECANISMO DE ACCIÓN DE LOS SERMS

Para explicar cómo actúan los SERMs es necesario mencionar el mecanismo de acción de los estrógenos que se unen a un factor de transcripción (FT) específico localizado en el citoplasma y núcleo celular denominado receptor de estrógenos (RE) (vía clásica) (Noriega & Langley, 2008; Björnström & Sjöberg, 2005). Los REs llevan a cabo la transcripción a través de interactuar con un complejo de proteínas correguladoras (coactivadores o correpresores) que actúan como señalizadores intermedios entre el RE y la maquinaria transcripcional. De este modo, los receptores de estrógenos se encuentran en la célula dentro del núcleo en ausencia de la molécula de estrógeno de modo inactivo y sin influencia en el ADN. Cuando una molécula de estrógeno entra en la célula, se une al RE, provocando cambios conformacionales en el receptor, así como la disociación de sus proteínas de choque calórico (hsp), la dimerización de los receptores y la translocación al núcleo. La unidad transcripcional (estrógeno-receptor) a su vez se une a una secuencia de DNA palindrómica denominada elementos de respuesta estrogénica (ERE), que se localizan en regiones promotoras o amplificadoras de diversos genes blanco (Shao & Brown, 2004). Tras la unión del complejo estrógeno-receptor al ADN, los genes más cercanos se activan, transcribiéndose a ARNm y conduciendo, finalmente, a la síntesis de las proteínas específicas que influyen en el funcionamiento de la célula (Figura 3) (Santamaría et al., 2010).

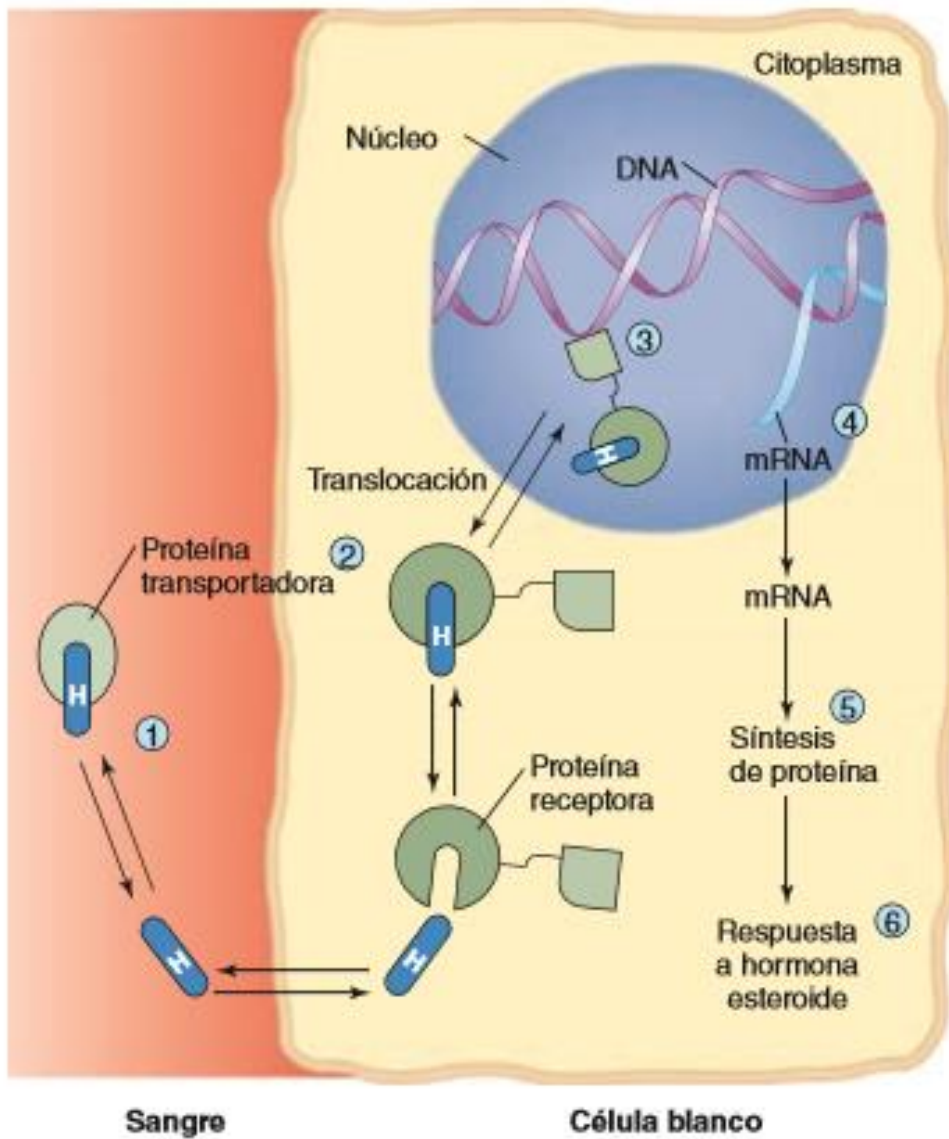


Figura 3. **El mecanismo de acción de hormona esteroide.** 1) Las hormonas esteroideas, que se transportan unidas a proteínas transportadoras en el plasma, se disocian de sus transportadores plasmáticos y pasan a través de la membrana plasmática de su célula blanca. 2) La hormona esteroide se une a receptores, que pueden estar en el citoplasma. 3) El receptor unido a hormona se transloca hacia el núcleo, donde se une al DNA. 4) Esto estimula la transcripción genética, lo que da como resultado síntesis de un nuevo mRNA. 5) El mRNA recién formado codifica para la producción de nuevas proteínas, que 6) producen los efectos hormonales en las células blanco (Stuart, 2011).

Además de la vía clásica existen otros mecanismos propuestos para la activación transcripcional por el receptor de estrógenos, entre ellas se encuentra la vía alternativa o AP-1, donde la unión del estrógeno con el receptor activa a c-Jun y c-Fos que promueven y activan los estrógenos diana que requiere la presencia constante de la función AF-1 del dominio A/B así como de proteínas correguladoras (Navarro, 2001).

El efecto antagonista de los SERMs se explica porque no activa la vía ERE, es decir, bloquean por inhibición competitiva la función del receptor ($ER\alpha$ y $ER\beta$), se unen a ellos con similar afinidad que los estrógenos, reprimiendo únicamente la función de activación transcripcional 2 (AF-2) de la proteína provocado por un cambio conformacional en AF-2 diferente al creado por la unión a ligandos agonistas lo cual bloquea la interacción con coactivadores de AF-2 y permite la entrada de correpresores (CoR), que bloquean la transcripción, esto facilita la activación de AF-1, la dimerización del receptor y su unión a genes regulados por estrógenos (Björnström & Sjöberg, 2005). En células de mama, la competencia por la unión a la proteína evita la formación del complejo de transcripción mediada por el ER, bloqueando la expresión de genes implicados en la proliferación celular (Jordan 2002; MacGregor & Jordan, 1998).

El efecto agonista de los SERMs se explica porque activan la vía alternativa del ERE AP-1 donde la unión del estrógeno con el receptor activa 2 proteínas, c-Jun y c-Fos que promueven y activan genes diana que requiere la presencia constante de la función AF-1 del dominio A/B así como de proteínas correguladoras (Navarro, 2001).

2.6 FARMACOCINÉTICA DE LOS SERMS

Los SERM se administran por vía oral en dosis que van de 20 a 60 mg/día. El tamoxifeno tiene una biodisponibilidad del 80-85% y es metabolizado en el sistema enzimático citocromo P450. La biodisponibilidad del raloxifeno es del 2% y es metabolizado por conjugación con glucurónidos. El fulvestrant se administra por vía intramuscular (250 mg/mes) su concentración máxima sérica alrededor de los primeros 7 días del tratamiento y se mantienen durante 30 días con una concentración mínima estimada del 30% de su concentración máxima su metabolismo es por vía hepática mediante reacciones de oxidación, hidroxilación y conjugación con glucuronatos. Se elimina principalmente por

vía digestiva (90%) y una mínima porción por vía renal. Todos los SERMs se unen estrechamente a las proteínas plasmáticas (> 95%) y tienen tiempos de vida media prolongados (27.7 horas a 10 días). La vía de eliminación es generalmente hepática y pueden interactuar potencialmente con otros medicamentos, como warfarina, inhibidores de la aromatasa, esteroides, rifampicina y colestiramina (Morello et al., 2003).

3. ANTECEDENTES

El tamoxifeno (IC1-46. 474 o Nolvadex) fue sintetizado por Arthur Walpole para la regulación de la fertilidad. Sin embargo Craig Jordan demostró su acción estrogénica sobre algunos tejidos y antiestrogénica en otros, con lo que se determina que el tamoxifeno es un modulador selectivo de los receptores de estrógeno (SERM). En 1983, The Lancet publicó el estudio NATO (Nolvadex Adjuvant Trial Organisation), el cual demostró que el tamoxifeno usado por dos años mejoraba la supervivencia y también reducía la incidencia de cáncer de mama contralateral (Jordan, 2000).

Posteriormente se realizaron diversos estudios preventivos de cáncer con tratamiento de tamoxifeno, donde demostraron sus beneficios, al disminuir el riesgo de recurrencia y muerte en las mujeres con cáncer de mama positivos a receptores de estrógeno, independientemente de la edad, la menopausia y el estatus ganglionar. Entre estos estudios destacan: Surgical Adjuvant Breast y Bowel Project P-1, que realizaron el primer ensayo clínico prospectivo aleatorizado, el cual demostró una disminución en incidencia del 49% en cáncer de mama invasivo con el tratamiento de tamoxifeno (20 mg/día durante 48 meses) en mujeres pre y posmenopáusicas de alto riesgo. El ensayo fue interrumpido por el comité de ética al evidenciar la indiscutible ventaja de las pacientes que tomaban este medicamento sobre el grupo placebo. Además reportaron efectos adversos que ocurrían predominantemente en mujeres mayores de 50 años como incidencia de cáncer de endometrio, accidente vascular cerebral, embolia pulmonar y riesgo de trombosis venosa profunda pero sin relación a la edad (Fisher et al., 1994). El estudio de Royal Marsden y un estudio Italiano de Prevención, no mostraron una ventaja clara sobre pacientes que tomaban tamoxifeno 20 mg/día comparado con placebo durante 5 años. Sin embargo el estudio Italiano de Prevención implementó un subgrupo

que correspondía a mujeres menopáusicas que recurrían a la terapia hormonal de remplazo (THR) y tamoxifeno, estas presentaban una menor incidencia de cáncer de mama sobre aquellas que solo recibían THR y placebo (Peralta, 2006).

La FDA (Food and Drug Administration) en 1977 aprobó el uso de tamoxifeno en el tratamiento de cáncer de mama avanzado, en 1988 como adyuvante en cáncer primario y en 1990 como adyuvante en mujeres pre y postmenopáusicas con ganglios negativos (Osborne, 1998).

Un meta-análisis actualizado, publicado por EBCTCG (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group) reivindica los beneficios del tamoxifeno en pacientes con cáncer de mama con receptores positivos, comparando 2 años de tratamiento adyuvante frente a 5 años, concluyendo que en el tratamiento prolongado disminuye sustancialmente la recurrencia de cáncer de mama, la mortalidad por cáncer de mama, y la mortalidad global (a pesar de un pequeño incremento absoluto del cáncer de endometrio y de embolia pulmonar). Por su parte el estudio ATLAS (Adjuvant Tamoxifen Longer Against Shorter) en el 2013 reportó que existe una reducción más efectiva con 10 años de tamoxifeno (20 mg/día) adyuvante en comparación con 5 años pero que los efectos adversos se incrementaron por lo menos en las mujeres posmenopáusicas. Concluyendo que hay una reducción absoluta en la mortalidad por cáncer de mama que la magnitud del aumento absoluto en la mortalidad debida a los efectos adversos. (Davies et al., 2013) Actualmente existe un estudio en curso el ATTOM (Adjuvant Tamoxifen Treatment Offer More?) que compara 2 años frente a tratamiento aún más prolongado (Espinós, et al., 2008).

Sin embargo a pesar de que el tamoxifeno sigue siendo la primer línea de tratamiento de cáncer de mama temprano y avanzado se ha reportado que el 50% de los pacientes con enfermedad avanzada no responden al tratamiento (resistencia de *novo*). Además algunos estudios muestran la existencia de pacientes que presentan recaídas a pesar de una respuesta inicial positiva al fármaco (García-Becerra et al., 2012).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La terapia hormonal inducen cambios en el sistema hemostático caracterizados por el aumento en los factores de coagulación como el fibrinógeno (Van & Rosendaal, 2003), la protrombina (Poort et al., 1996), así como la reducción de los inhibidores de la coagulación, el inhibidor de la vía del factor tisular (TFPI) (Raps et al., 2013). También se ha comprobado un cambio en el sistema fibrinolítico por aumento de los niveles del activador del plasminógeno tisular (tPA) y reducción de los niveles del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1) (Meijers et al., 2000). Todos estos cambios alteran el equilibrio entre el sistema de la coagulación y las vías anticoagulantes y en consecuencia pueden conducir un estado de hipercoagulación que puede derivar en una trombosis venosa (Morten, 2013).

En el caso de tamoxifeno algunos trabajos señalan que disminuye los eventos tromboticos (Caicedo, 2007) mientras otros han documentado un aumento (Fisher et al., 1994). De igual manera se ha publicado que el tamoxifeno confiere un efecto cardioprotector, mientras que otros autores atribuyen un riesgo cardiovascular (Pinkerton & Thomas, 2014), y otros reportan que el fármaco no tienen ningún efecto cardiovascular (Fisher et al., 1994). Las enfermedades cardiovasculares están relacionadas con el aumento de algunos marcadores inflamatorios, tales como IL1, IL6, TNF α así como la proteína C reactiva.

5. JUSTIFICACIÓN

Debido a que el tamoxifeno se ha considerado el fármaco de primera elección en el tratamiento y prevención del cáncer de mama y que la información respecto a los efectos adversos sobre la hemostasia del tamoxifeno son controversiales. En el presente trabajo consideramos relevante evaluar los efectos del tamoxifeno sobre los marcadores involucrados en la patogénesis de la trombosis tales como la coagulación, la fibrinólisis y la respuesta inflamatoria, en un modelo de ratas ovariectomizadas.

6. HIPÓTESIS

El tamoxifeno al ser administrado de manera crónica podría inducir cambios en el sistema hemostático, el sistema fibrinolítico y la respuesta inflamatoria en un modelo de ratas Wistar ovariectomizadas.

7. OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto crónico *in vivo* del tamoxifeno sobre los marcadores del sistema hemostático, fibrinolítico y de respuesta inflamatoria.

7.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a. Determinar el efecto del tamoxifeno sobre la vía extrínseca de coagulación a través del tiempo de protrombina y el factor tisular.
- b. Determinar el efecto del tamoxifeno sobre la vía intrínseca de la coagulación a través de la tromboplastina parcial activada.
- c. Evaluación de la fase fluida de la hemostasia a través de la determinación del fibrinógeno.
- d. Evaluación del tamoxifeno sobre el sistema fibrinolítico a través del plasminógeno y del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1.
- e. Determinar el efecto del tamoxifeno sobre la respuesta inflamatoria a través de la interleucina 1- β y el factor de necrosis tumoral- alfa.

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 MATERIALES

8.1.1 Reactivos

El tamoxifeno, -[4-[(Z)-1,2-difenilbut-1-enil]fenoxi]-N,N-dimetiletanamina, tribromoetanol, alcohol tert-amílico, tween 20, PBS, tetrametil bencidina (TMB), se obtuvieron de Sigma-Aldrich®. La tromboplastina C plus, Actin FS®, plasma estándar de rata macho Wistar, cloruro de calcio (CaCl₂), trombina, buffer Veronal y buffer de imidazol adquiridos en Dade®.

Anticuerpos de captura:

Anti-fibrinógeno (PAI-1 85429), anti-factor de necrosis tumoral- alfa (TNF- α MAB510), inhibidor del factor tisular (TF I-20), interleucina 1 beta (IL-1 β M-20), inhibidor de la activación del plasminógeno (PAI-1 C-20) y plasminógeno (PLG E-14).

Anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa:

Bovino anti cabra IgG-HRP, bovino anti oveja IgG –HRP y Cabra anti ratón IgG₁-HRP.

Los anticuerpos de captura y secundarios conjugados con peroxidasa se compraron en American Diagnostica Inc., USA, Santa Cruz Biotechnology Inc ó R&D

8.1.2 Material y equipo

El equipo vacutainer BD® (equipo alado calibre de 23G x 19/7” y tubos con vacío para plasma y suero) se adquirieron de Becton Dickinson® Franklin Lakes NJ USA. La sutura quirúrgica Catgut crómica 3/0 estéril marca surgical®. Las cubetas con agitadores SIEMENS® para el coagulómetro semiautomático Fibrintimer BFTII®. Las placas multipozos para ELISA se compraron en NUNC® Brand Products.

8.1.3 Material biológico

Durante los experimentos se utilizaron ratas Wistar hembras adultas (200-225g) procedentes del bioterio central de la Facultad de Medicina de la UNAM, se mantuvieron en ciclos de luz-oscuridad de 12h x 12h con agua y alimento *ad libitum* a temperatura controlada entre 20-23°C y humedad de 30 a 40%. Todos los experimentos se realizaron con apego a la Norma Oficial Mexicana (NOM-062-Z00-1999-SENASICA, 2001), especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

8.2 MÉTODOS

8.2.1 Ovariectomía

La ovariectomía se realizó en ratas Wistar dos semanas antes de iniciar su tratamiento farmacológico. Se anestesió con tribromo etanol (0.2 g/Kg peso del animal) por vía intraperitoneal. Se realizó una incisión transversal de aproximadamente 1 cm en la región dorsal, procediendo a una segunda incisión bilateral longitudinal en el músculo, dentro de la cavidad peritoneal hasta la localización del útero los ovarios. Los cuernos uterinos se ligaron con catgut 3 y los ovarios se removieron. Finalmente se suturó la piel con hilo de seda 3-0 y la región dorsal se desinfectó con la solución de benzal al 1% (Bennet & Vickery, 1970).

8.2.2 Manejo de animales y tratamiento farmacológico

Los animales fueron distribuidos por el método de cuadrados latinos en función a su peso corporal en 4 lotes de 4 a 5 animales por grupo. Cada grupo recibió un tratamiento por vía subcutánea de tamoxifen disueltos en propilenglicol en dosis de 100, 300 y 1000 µg/Kg, durante quince días consecutivos. El grupo control se le administro propilenglicol (vehículo; 0.2 mL/animal/día). Cada experimento se realizó por duplicado.

8.2.3 Toma de muestras

Los animales fueron pesados y anestesiados con tribromo etanol (0.2 g/Kg peso del animal) por vía intraperitoneal. La toma fue hecha un día después de la última administración (8:00-10:30 am), la muestra de sangre se obtuvo de la arteria mesentérica por medio de un sistema Vacutainer® 23G. Se realizaron dos tomas de muestra sanguínea para obtención de plasma citrado (5 ml) y suero (5 ml). Los tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. Los plasmas y sueros, obtenidos del sobrenadante, se guardaron en tubos de 1.5 ml a -20°C para su posterior procesamiento. Los animales se sacrificaron por exanguinación bajo anestesia y se corroboró por dislocación cervical. La disposición final de los cadáveres fue la unidad de cremación.

Los úteros de todos los animales de cada grupo se disecaron y se pesaron para confirmar el efecto de tamoxifeno sobre útero.

8.2.4 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 protrombina (TP)

El tiempo de protrombina fue realizado mediante el método de Quick (1954); cada muestra plasmática (100 µL) 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 µL de plasma que se mezcló con 50 µL de Actin FS®, se incubó durante 120 s 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 FIBRINÓGENO

Para determinar el efecto del tamoxifeno sobre fibrinógeno, fue necesario asegurar que el reactivo utilizado en la clínica pudiera usarse en un modelo de rata. Para esto fue necesario realizar la curva de estandarización con las diluciones pool de plasmas de ratas ovariectomizadas sin tratamiento (1:5, 1:15, 1:40) (Figura 15).

Determinación de fibrinógeno

La muestra problema en una dilución 1:10 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 el 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.

8.2.5 Determinación de marcadores biológicos

Las determinaciones de los diferentes marcadores biológicos como fibrinógeno, plasminógeno, TNF- α , TF, IL-1 β y PAI-1 se realizaron mediante ELISA indirecto mediante el siguiente protocolo.

PROTOCOLO PARA ELISA

1. En una placa para ELISA se agregaron 50 μ L/pozo de antígeno (suero de rata (1:10) y se incubó a temperatura ambiente por 4 h.
2. El sobre nadante se desechó y se bloqueó con una solución de PBS1x + tween 20 al 0.1% + leche al 5% (200 μ L/pozo) y se incubó a 2-4°C durante toda la noche.

3. La solución de leche, se desechó y con una solución de PBS1x + tween 20 al 0.1%, (200 μ L/pozo) se lavaron los pozos, 10 veces, con intervalos de agitación de 60 s.
4. Los anticuerpos primarios, plasminógeno, TFI, IL1 β y PAI de concentración (1:300), fibrinógeno (1:100) y TNF- α (1:1000) se agregaron 100 μ L/pozo y se incubó por 3 h a temperatura ambiente.
5. El sobrenadante se descartó y con la solución de PBS1x & tween 20 al 0.1%, (200 μ L/pozo) se lavaron los pozos, 10 veces, con intervalos de agitación de 60 s.
6. Los anticuerpos secundarios como Bovino anti cabra IgG-HRP, bovino anti oveja IgG-HRP y Cabra anti ratón IgG₁-HRP de concentración (1:5000), se colocaron 100 μ L/pozo y se incubó por 3 h a temperatura ambiente.
7. El sobrenadante se descartó y con la solución de PBS1x + tween 20 al 0.1%, (200 μ L/pozo) se lavaron los pozos, 10 veces con intervalos de agitación de 60 s.
8. Se agregaron 100 μ L/pozo de TMB y se incubó a temperatura ambiente, en oscuridad por 20 min.
9. La reacción se detuvo, adicionando 100 μ L/pozo de H₂SO₄ 1M.
10. La placa se leyó a una absorbancia de 450/492 nm, con el test #14 del espectrofotómetro STAT-FAX 3200.

8.2.6 Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó mediante el uso software de gráficos y estadística Sigma Plot 10® y Sigma Stat 3.0® (Jandel Scientific Software). El análisis de los datos se aplicó mediante las pruebas de análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples de Dunnet. Una $p < 0.05$ se consideró como estadísticamente significativa.

9. RESULTADOS

9.1 EFECTO SOBRE EL PESO CORPORAL

Antes de realizar la toma de las muestras de los animales que recibieron tratamiento y los controles (propilenglicol), se pesaron todos los animales por lote. Los resultados los podemos observar en la figura 4 donde el eje de las abscisas representa las diferentes dosis administradas de tamoxifeno y el grupo control, mientras que las ordenadas (Y) son los promedios del peso en gramos de cada lote. En la gráfica observamos que con las tres dosis administradas, el peso corporal disminuyó en un 20% de manera significativa ($p < 0.05$) respecto al grupo control.

9.2 EFECTO SOBRE EL PESO DEL ÚTERO

Para confirmar el efecto uterotrófico del tamoxifeno se pesaron los úteros de los grupos que recibieron el tratamiento y el grupo control. El tamoxifeno produjo un aumento del útero, estadísticamente significativo ($p < 0.05$ vs vehículo) en las diferentes dosis administradas (100, 300, 1000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) de 40, 35 y 48% respectivamente (Figura 5).

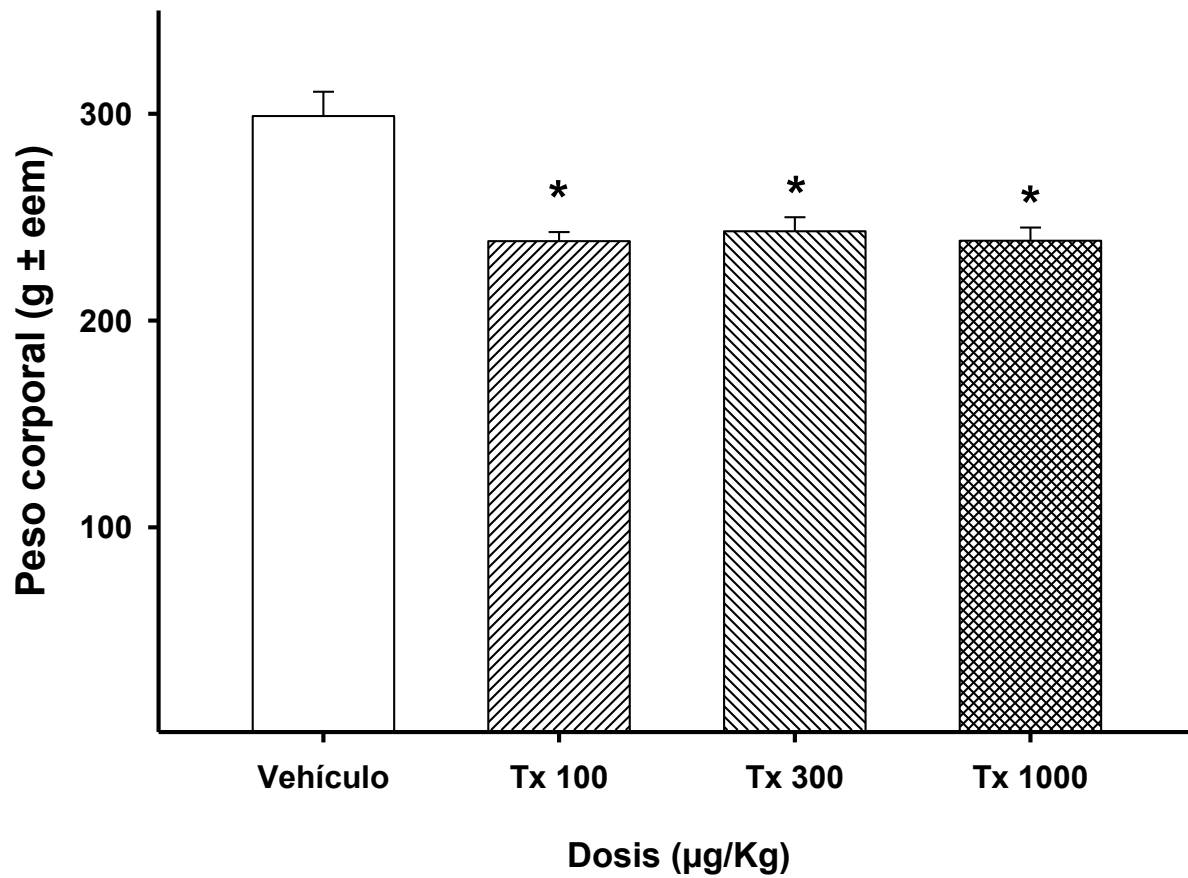


Figura 4: Efecto del tamoxifeno (Tx) (100, 300, 1000 µg/Kg) sobre el peso corporal de las ratas Wistar ovariectomizadas. Cada punto representa el promedio ± EE de dos experimentos (3-5 animales). El control del experimento es el vehículo. * $p < 0.05$ vs vehículo, prueba Dunnett.

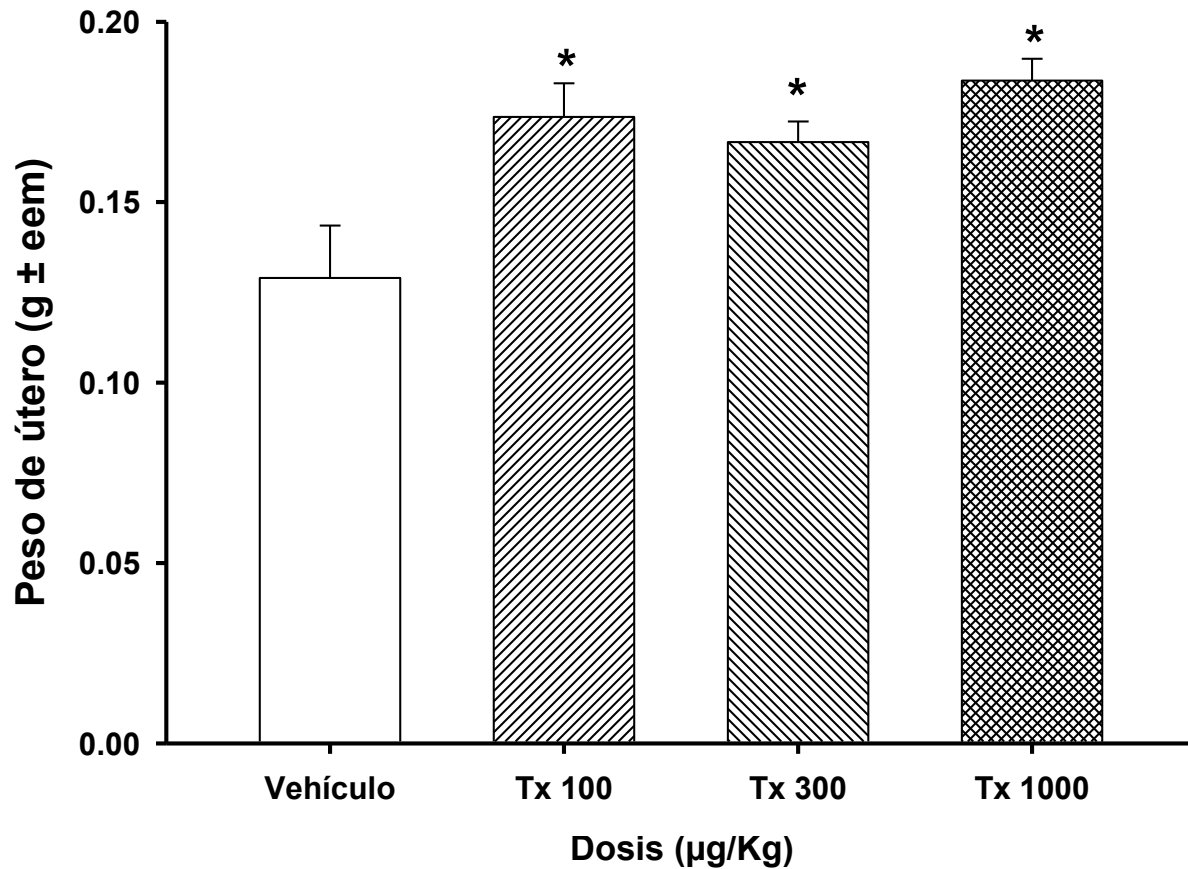


Figura 5: Efecto del tamoxifeno (Tx) (100, 300, 1000 µg/Kg) sobre el peso del útero de ratas Wistar ovariectomizadas. Cada punto representa el promedio ± EE de dos experimentos (3-5 animales). El control del experimento es el vehículo. * $p < 0.05$ vs vehículo, prueba Dunnett.

9.3 EFECTO HEMOSTÁTICO DEL TAMOXIFENO

Existen pruebas de escrutinio hemostático que evalúan clínicamente al paciente con riesgo a hemorragia o trombosis. Dos de las principales pruebas son el tiempo de protrombina (TP) que mide la formación del coágulo en la vía extrínseca y el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) que analiza la vía intrínseca.

9.3.1 Efecto del tamoxifeno sobre TP

En la figura 6, observamos que el tiempo de protrombina no se ve alterado con ninguna de las dosis utilizadas ya que no existe un cambio estadísticamente significativo con respecto al control.

9.3.2 Efecto del tamoxifeno sobre TTPa

El tamoxifeno aumenta el tiempo de la prueba de TTPa de manera significativa respecto al control ($*p < 0.05$) en las dosis de 100 y 1000 $\mu\text{g/Kg}$ (20 y 27%) respectivamente, mientras que con la dosis de 300 $\mu\text{g/Kg}$ no observamos cambios significativos respecto al control (Figura 7).

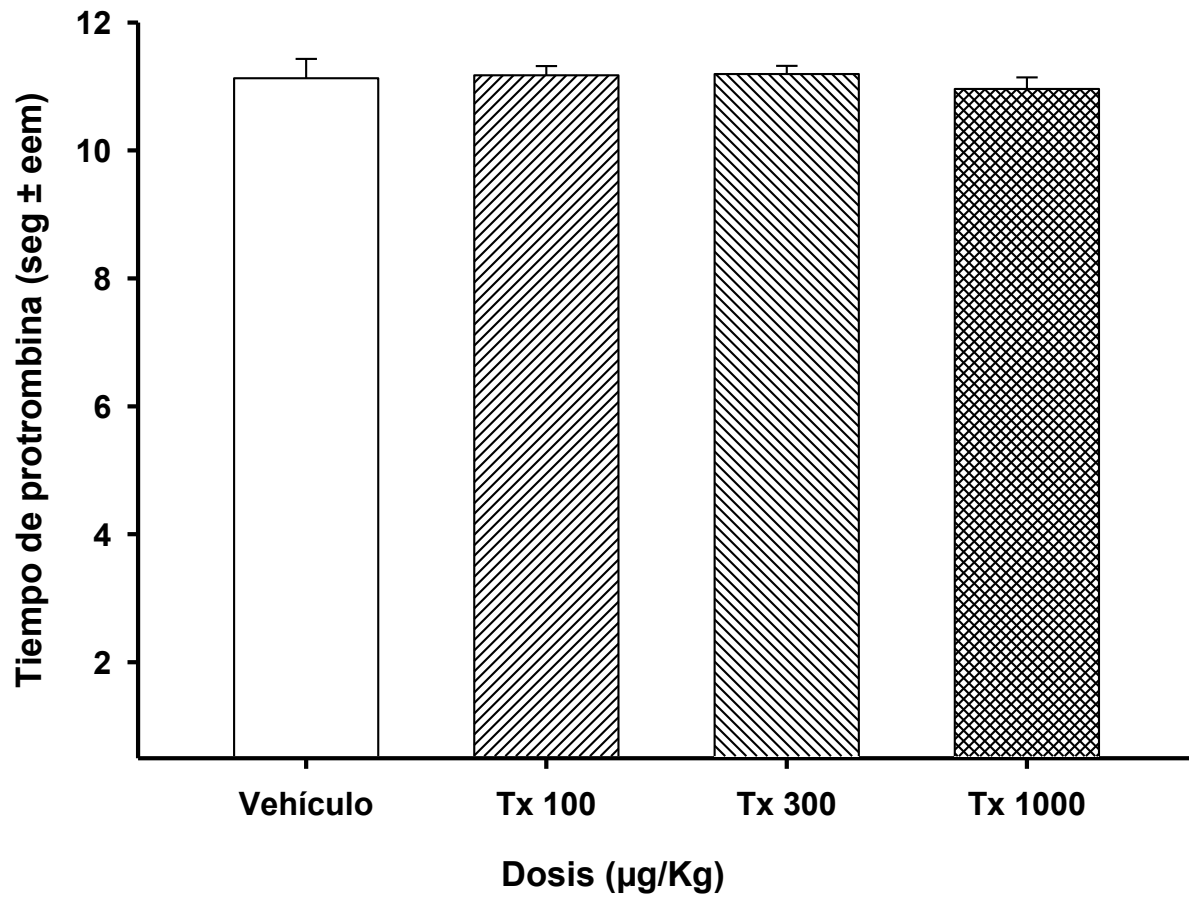


Figura 6: Efecto del tamoxifeno (Tx) (100, 300 y 1000 µg/Kg) sobre el tiempo de protrombina (TP). Cada punto representa el promedio ± EE de dos experimentos (3-5 animales) por duplicado. *p<0.05 vs vehículo 100%.

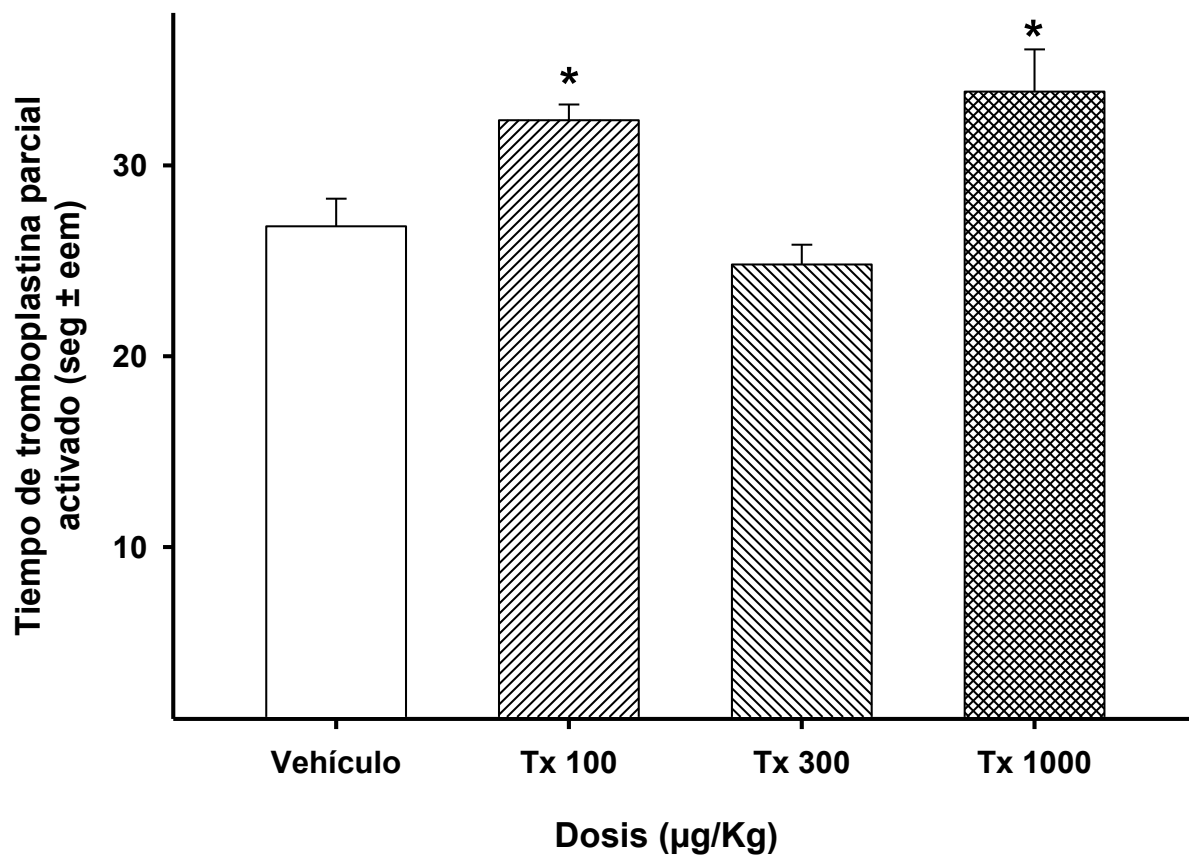


Figura 7: Efecto del tamoxifeno (Tx) (100, 300 y 1000 µg/Kg) sobre el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa). Cada punto representa el promedio ± EE de dos experimentos (3-5 animales) por duplicado. *p< vs vehículo 100%.

9.3.3 Efecto del tamoxifeno sobre fibrinógeno

La figura 8 representa los resultados de las concentraciones del fibrinógeno por la administración de tamoxifeno, donde observamos un cambio significativo respecto al control (* $p < 0.05$) en las dosis de 300 y 1000 $\mu\text{g/Kg}$ (27 y 41%; respectivamente), mientras que con la dosis de 100 $\mu\text{g/Kg}$ solo observamos un ligero aumento que no fue estadísticamente significativo respecto al grupo control.

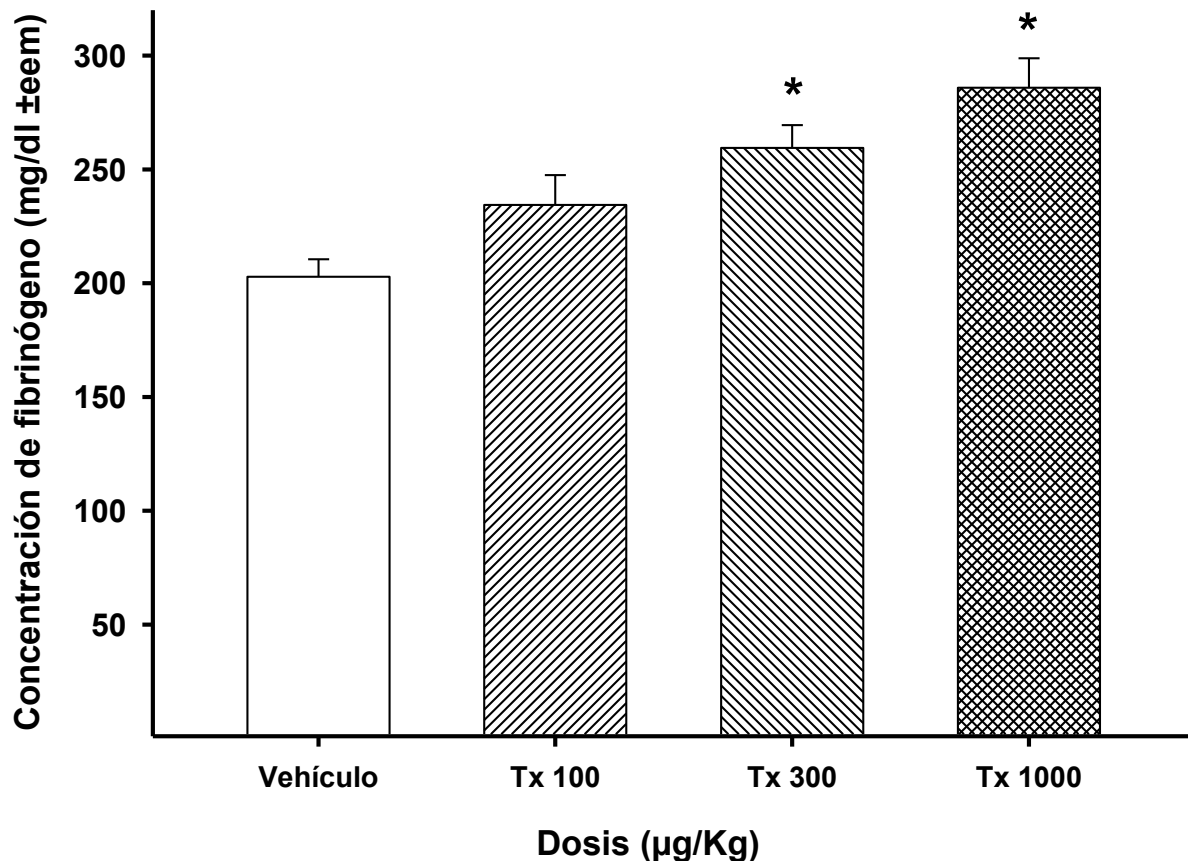


Figura 8: Efecto del tamoxifeno (Tx) (100, 300 y 1000 $\mu\text{g/Kg}$) sobre la concentración de fibrinógeno (mg/dL). Cada punto representa el promedio \pm EE de dos experimentos (3-5 animales) por duplicado. * $p < 0.05$ vs vehículo 100%.

Los marcadores biológicos que se determinaron mediante ELISA indirecto fueron: factor tisular, fibrinógeno, plasminógeno, PAI-1, IL-1 β y TNF- α .

9.3.4 Factor tisular (FT)

La figura 9 muestra que la administración crónica del tamoxifeno no tiene efecto sobre el factor tisular en ninguna de las dosis administradas.

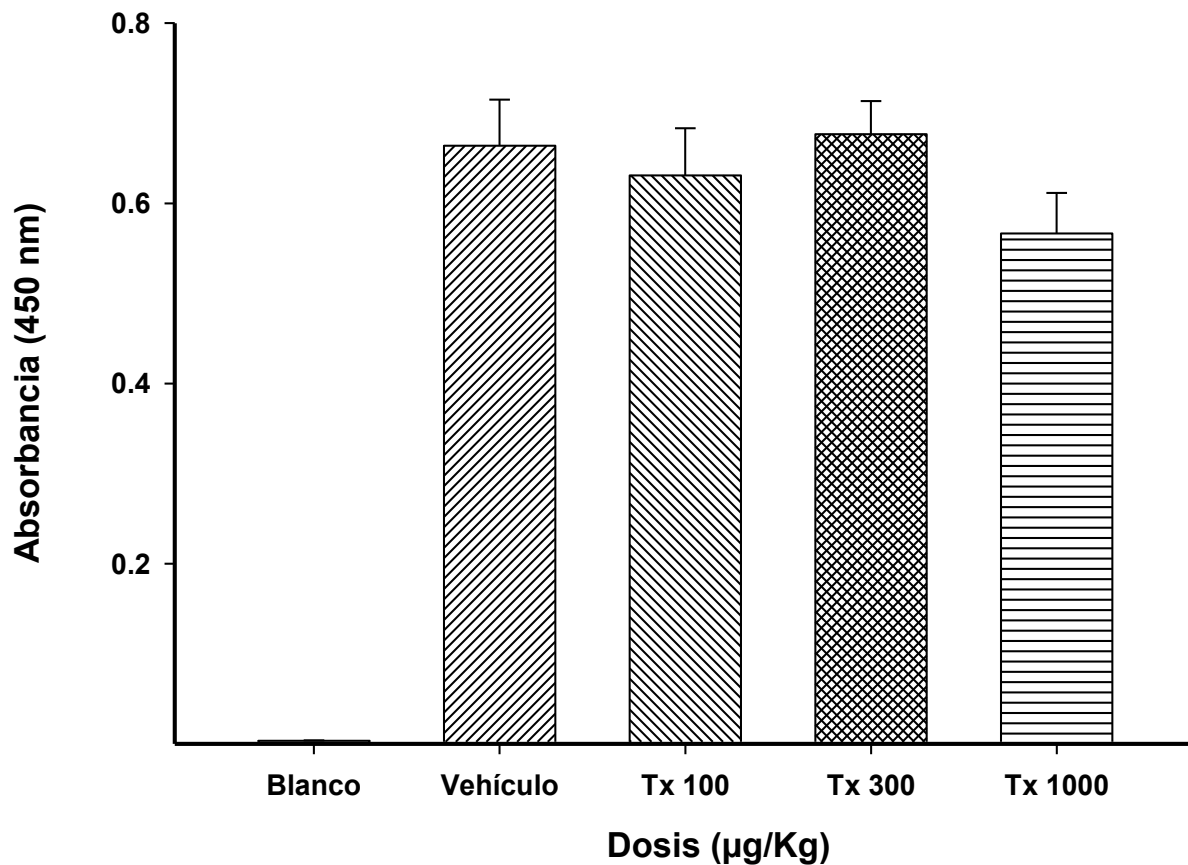


Fig. 9. Efecto del tamoxifeno (Tx) (100, 300 y 1000 µg/Kg) sobre la detección del factor tisular reportado en absorbancia por el método de ELISA Indirecto. Cada punto representa el promedio \pm EE de dos experimentos (3-5 animales), n= 16. *p< 0.05 vs vehículo 100%.

9.3.5 Fibrinógeno

El tamoxifeno a dosis de 100 $\mu\text{g/Kg}$ disminuyó significativamente 39% (* $p < 0.05$) al fibrinógeno. Por otro lado las dosis de 300 $\mu\text{g/kg}$ y 1000 $\mu\text{g/Kg}$ disminuyeron el 33 y 29% respectivamente respecto al control, sin embargo ninguno de estos aumentos fueron estadísticamente significativos con respecto al grupo control (Figura 10).

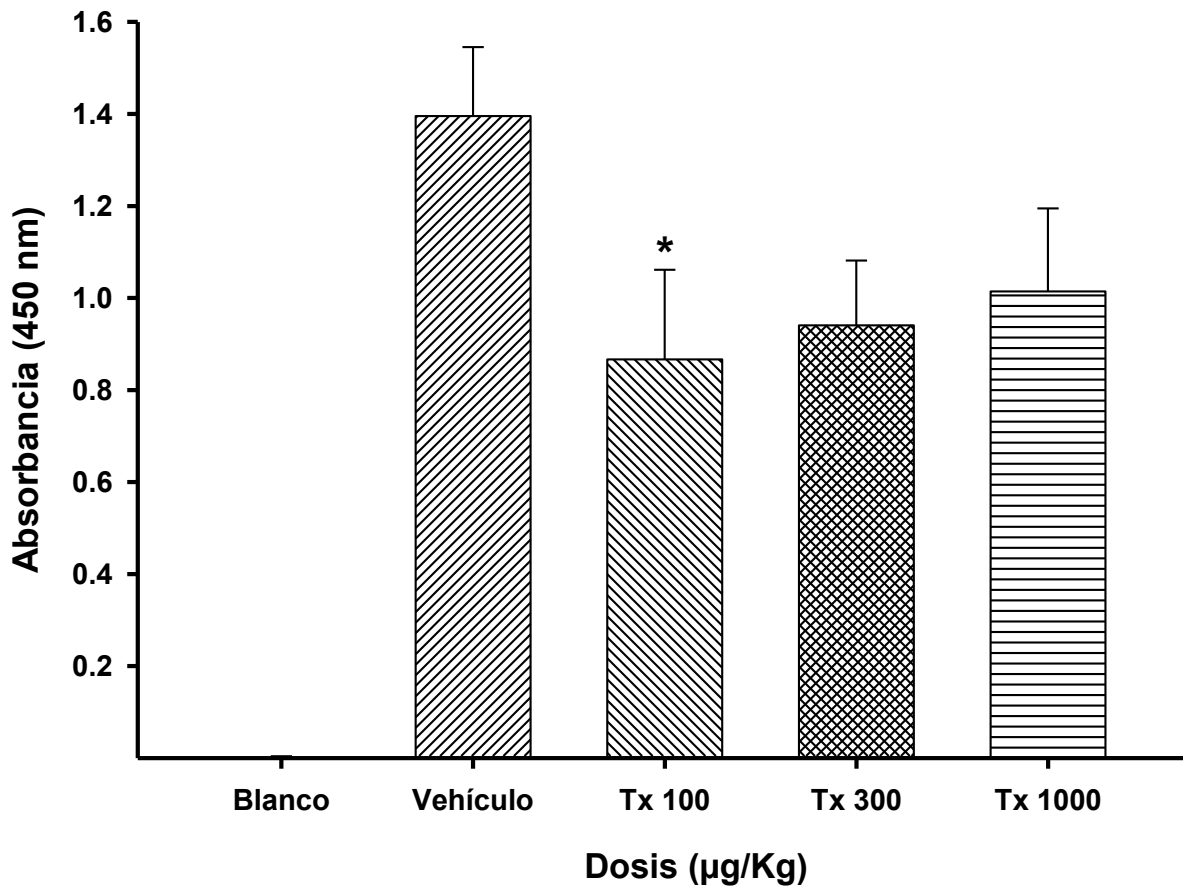


Figura 10. Efecto del Tamoxifeno (Tx) (100, 300 y 1000 $\mu\text{g/Kg}$) sobre la detección de fibrinógeno reportado en absorbancia por el método de ELISA Indirecto. Cada punto representa el promedio \pm EE de dos experimentos (3-5 animales) repetido $n = 16$. * $p < 0.05$ vs vehículo 100%.

9.3.6 Plasminógeno

La figura 11, se muestra el resultado de la administración crónica del tamoxifeno, donde podemos apreciar que hay un aumento leve y no significativo con las dosis de 100 y 300 $\mu\text{g/Kg}$, mientras que hay una disminución con la dosis de 1000 $\mu\text{g/Kg}$ del 20 % que tampoco es significativa.

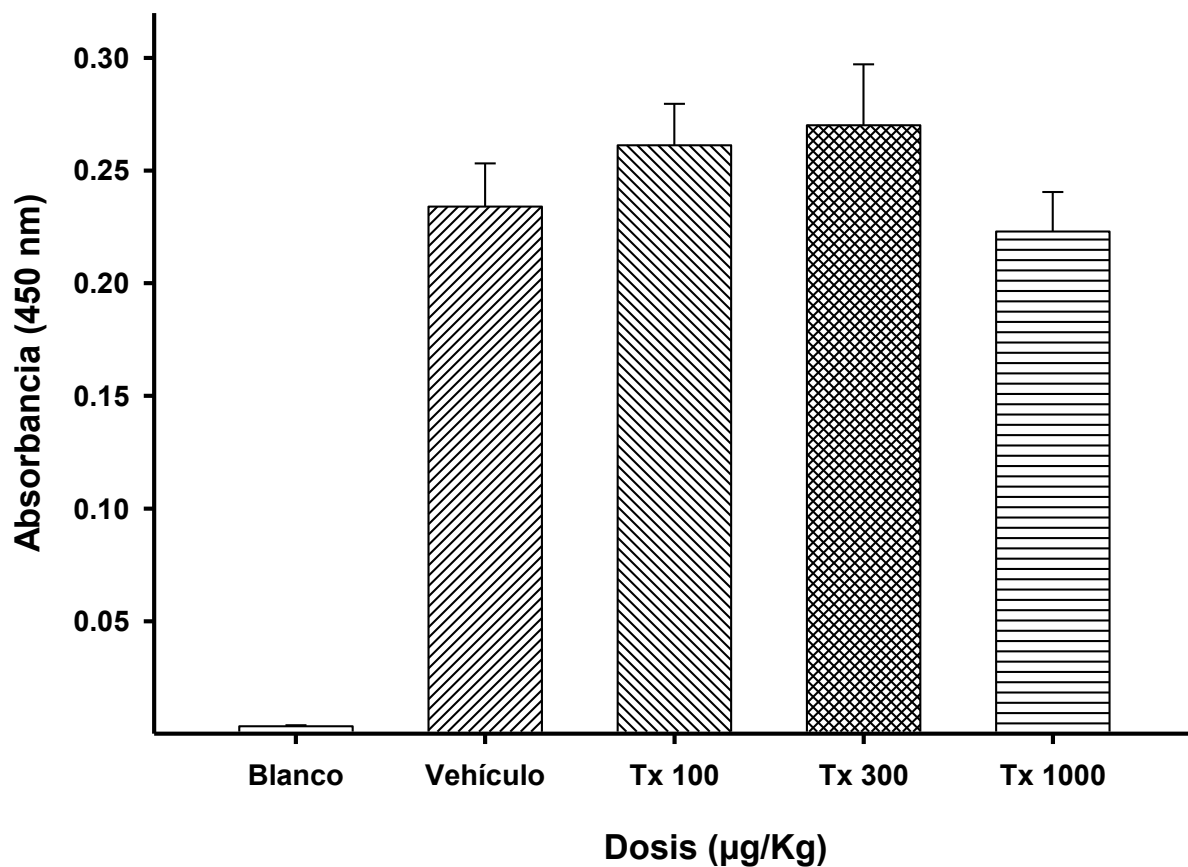


Figura 11. Efecto del Tamoxifeno (Tx) (100, 300 y 1000 $\mu\text{g/Kg}$) sobre la detección de plasminógeno reportado en absorbancia. Cada punto representa el promedio \pm EE de dos experimentos (3-5 animales), $n= 16$. * $p<0.05$ vs vehículo 100%.

9.3.7 Inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (PAI-1)

En la figura 12 observamos que el tamoxifeno disminuye al PAI-1 en las dosis de 100 y 300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, sin embargo solo la dosis de 300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (-20%) es estadísticamente significativa respecto al grupo control. Mientras que las dosis de 1000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ no promueve algún cambio.

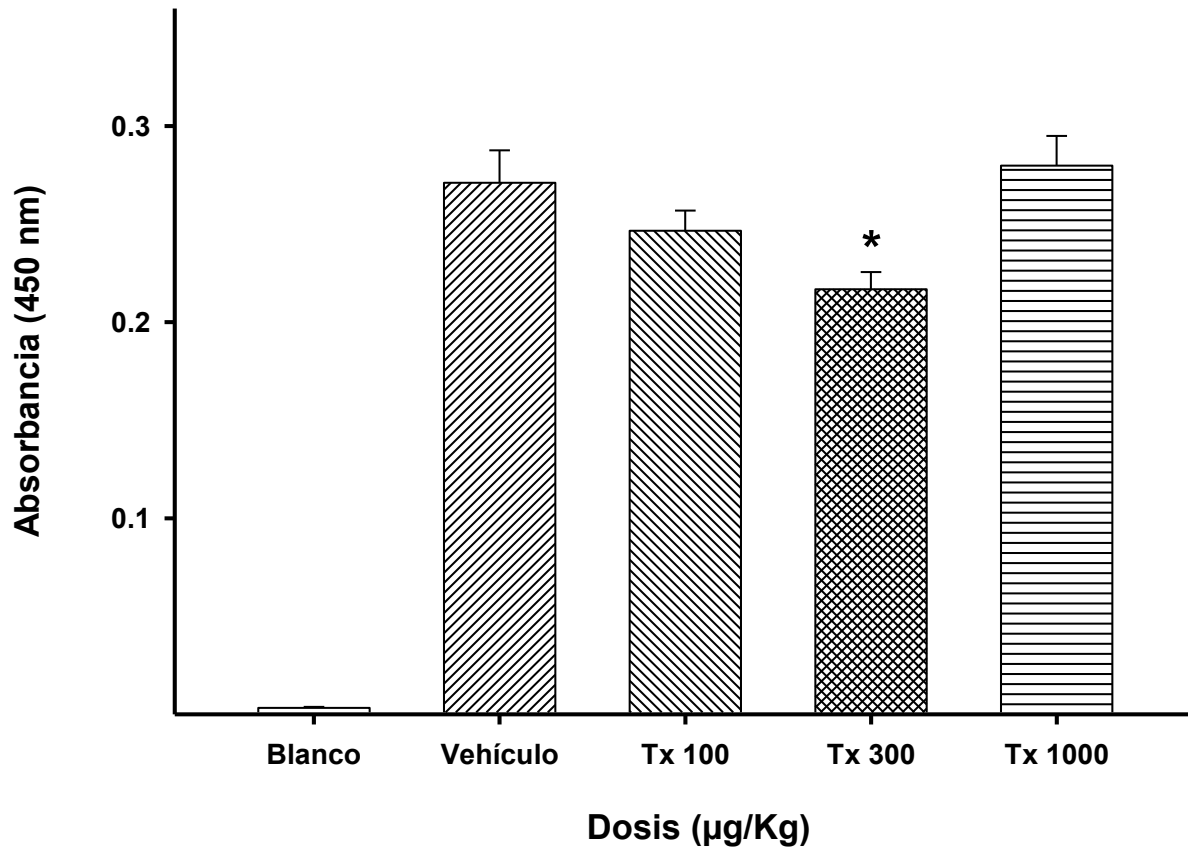


Figura 12. Efecto del tamoxifeno (Tx) (100, 300 y 1000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) sobre la detección del Inhibidor de la activación del plasminógeno por el método de ELISA Indirecto. Cada punto representa el promedio \pm EE de dos experimentos (3-5 animales) repetido $n=4$. * $p < 0.05$ vs vehículo 100%

9.3.8 Interleucina 1- β (IL 1- β)

El tamoxifeno disminuye la IL-1 β en 39 y 33% con las dosis de 100 y 300 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ pero sin alcanzar la significancia estadística. Con la dosis de 1000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ observamos un aumento del 29% que tampoco fue significativo respecto al grupo control (Figura 13).

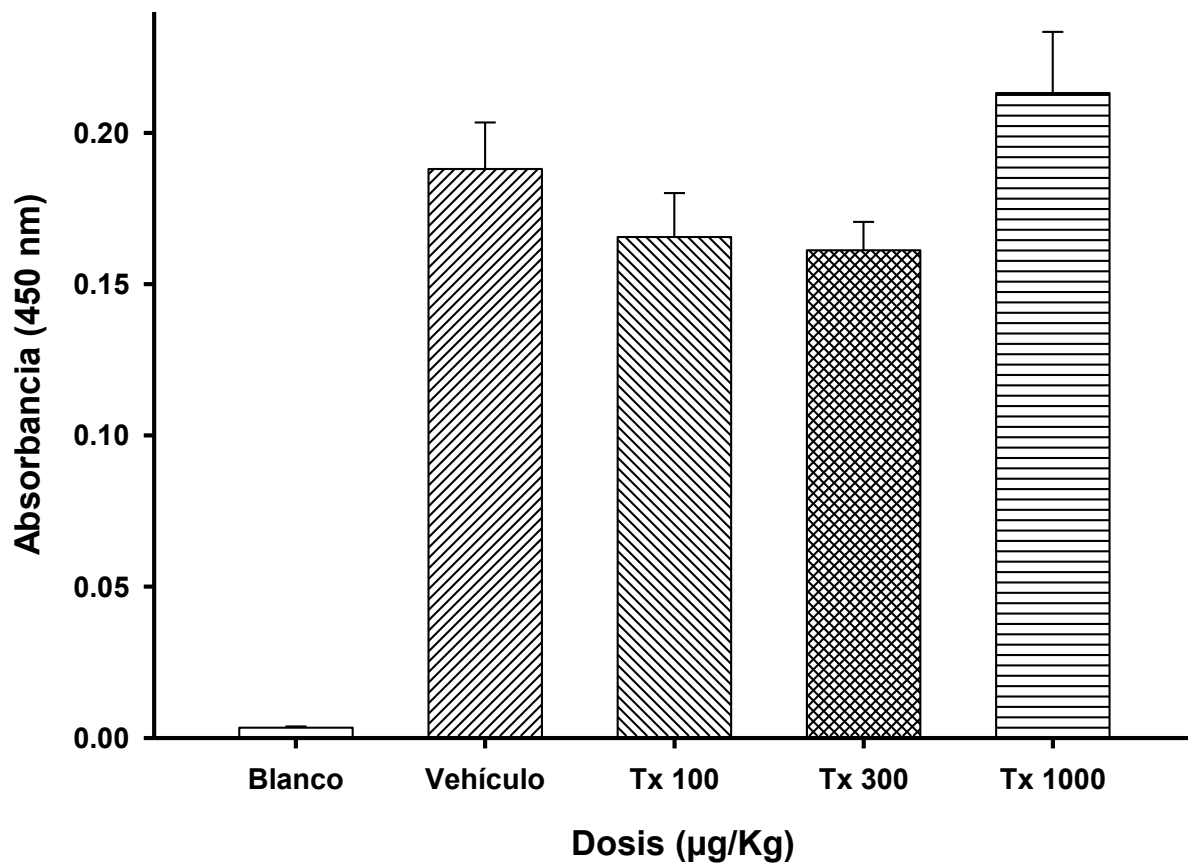


Fig. 13. Efecto del tamoxifeno (Tx) (100, 300 y 1000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) sobre la detección de la interleucina (IL-1 β) por el método de ELISA Indirecto. Cada punto representa el promedio \pm EE de dos experimentos (3-5 animales), n= 16. * $p < 0.05$ vs vehículo 100%.

9.3.9 Factor de necrosis tumoral-alfa (TNF- α)

La figura 14 muestra que el tamoxifeno con la dosis de 100, 300 y 1000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ disminuye la concentración de TNF- α , sin embargo solo las dosis de 300 y 1000 μg (-34% y -56% respectivamente) fueron estadísticamente significativas con respecto al grupo control ($p < 0.05$).

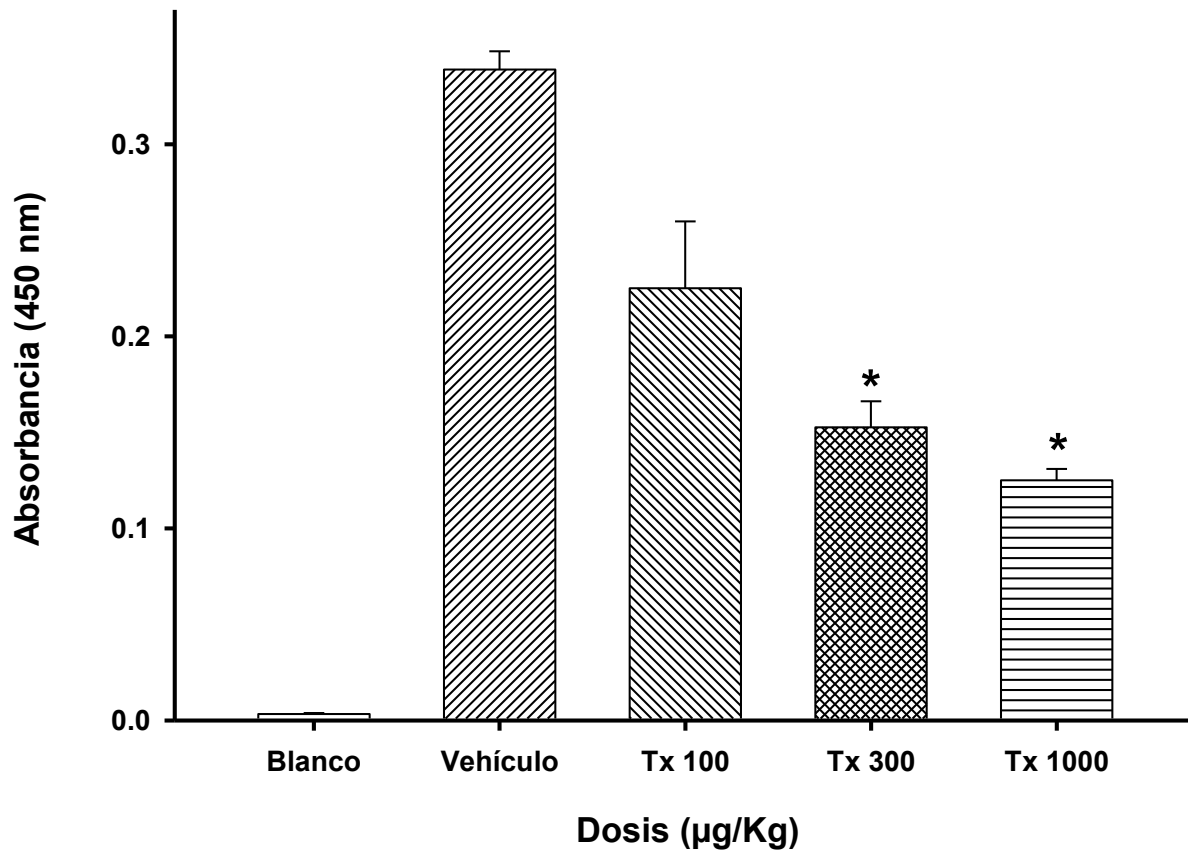


Figura 14. Efecto del tamoxifeno (Tx) (100, 300 y 1000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) sobre la detección de la interleucina (IL- β) por el método de ELISA Indirecto. Cada punto representa el promedio \pm EE de dos experimentos (3-5 animales), $n = 16$. * $p < 0.05$ vs vehículo 100%.

10. DISCUSIÓN

Peso corporal

El efecto de tamoxifeno sobre el peso corporal en las diferentes dosis (100, 300, 1000 µg/Kg) administradas presentan una disminución de alrededor de un 20%. Estos resultados podrían deberse a un efecto anorexigénico del mismo compuesto que produce la pérdida de masa ósea, tejido muscular o pérdida de tejido adiposo. Es posible que esto se deba a su efecto estrogénico en el hueso y los lípidos séricos (Terán & Teppa 2005). Sin embargo, para poder determinar el factor o los factores que influyen sobre el peso, es necesario cuantificar los parámetros relacionados ya que incluso se puede deber a un efecto secundario por la administración del fármaco.

Efecto uterotrófico

En el presente trabajo utilizamos el peso del útero como un control positivo de actividad estrogénica ya que posee receptores estrogénicos que se unen a los esteroides gonadales iniciando una respuesta celular que induce el crecimiento del epitelio y estroma endometriales; asimismo, inducen la formación de los receptores de progesterona en la hipófisis anterior (Pineda & Dooley, 2008; Grossman, 1985). Una prueba para demostrar el efecto estrogénico de un fármaco es revertir el efecto de atrofia inducido por la ovariectomía (Takeyoshi et al., 2002).

En la figura 5 se muestra un aumento significativo del peso de útero con respecto al vehículo, además el peso no incrementa conforme aumenta la dosis. Sin embargo la literatura ha reportado que el tamoxifeno es capaz de estimular una respuesta estrogénica parcial en el útero de rata inmadura y ovariectomizadas. (Maximov et al., 2013), lo cual reafirma su efecto estrogénico sobre el útero.

Vías de la coagulación

En las pruebas de la vía extrínseca (TP y FT) el tratamiento crónico con el tamoxifeno parece no afectarla, sin embargo podrían evaluarse factores específicos de la vía, como el factor VII o el factor X.

El tamoxifeno aumenta el tiempo de la prueba de TTPa de manera significativa respecto al grupo control (* $p < 0.05$) con las dosis de 100 y 1000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (20 y 27%), lo cual nos indica que hay un efecto sobre esta vía y que puede deberse a una disminución de la actividad de los factores hemostáticos (XII, XI, IX, VIII) (Ruiz-Argüelles, 2013).

El tamoxifeno produjo un aumento significativo sobre las concentraciones plasmáticas del fibrinógeno (300 y 1000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$; 27 y 41%) respectivamente, mientras que observamos una disminución en las concentraciones séricas del mismo (100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$; -39%). El fibrinógeno puede aumentar o disminuir dependiendo de un estímulo a nivel de la hemostasia o de la inflamación. Se ha establecido en estudios *in vitro* que la síntesis de fibrinógeno es incrementada por algunas sustancias incluyendo las hormonas (Grieninger et al., 1983). La cantidad y la calidad del fibrinógeno alteran varias pruebas de coagulación: TP, TTPa, TT (De Maat et al., 1999). Además del papel del fibrinógeno en la coagulación, éste puede facilitar la respuesta inflamatoria a través de su interacción con leucocitos, al actuar como ligando de la molécula de adhesión intercelular-1 (MAI-1), y aumentando la interacción entre monocitos y células endoteliales así como facilitando la agregación plaquetaria. Al mismo tiempo regula y aumenta la concentración de proteínas MAI-1 en la superficie de las células endoteliales, lo que aumenta la adhesión de leucocitos y plaquetas (Kamath & Lip; 2003). En el proceso trombótico el fibrinógeno es el precursor del trombo de fibrina, modulando su tamaño, su estructura y su forma. Niveles elevados de fibrinógeno inducen la formación de trombo, fuertemente adheridos y pocos susceptibles a la acción de la fibrinólisis endógena. Además, interfieren con los receptores de plasminógeno disminuyendo la capacidad del sistema fibrinolítico (Hermes et al., 2005).

Sistema fibrinolítico

El plasminógeno es un zimógeno, monocatenario con un peso molecular de 92 kDa que se transforma en plasmina, una proteína encargada de degradar las redes de fibrina, que forman el coágulo y son generadas a partir del fibrinógeno, este mecanismo es denominado fibrinólisis (Páramo et al., 2009; Martínez-Murillo, 2003). En los resultados obtenidos las concentraciones de plasminógeno no muestra cambios significativo al comparar el control con las diferentes dosis administradas de tamoxifeno lo cual significa que el fármaco no presenta un efecto pro-fibrinolítico.

El inhibidor de la activación de plasminógeno tipo1 (PAI-1) se produce en el endotelio, se secreta al plasma e inactiva rápidamente al activador tisular del plasminógeno y por lo tanto regula la activación de la plasmina. En el estudio la administración de 300 µg/kg con tamoxifeno, presenta un disminución del 20% respecto al vehículo. Este resultado es similar a un estudio implementado en 20 mujeres posmenopáusicas (Tamoxifeno 20mg). El cual muestra una disminución del factor fibrinolítico (PAI-1) (Cosman et al., 2005).

Respuesta inflamatoria

Algunas citocinas proinflamatorias como las IL-1, IL-6, y TNF- α , son muy utilizadas como marcadores bioquímicos del riesgo cardiovascular. El TNF- α está implicado en la producción de citocinas y proteínas de fase aguda, en el aumento en la expresión de moléculas de adhesión, en la activación de neutrófilos y la co-estimulación en la activación de células T (Fragoso-Lona et al., 2009). Sin embargo, estudios han revelado que una administración combinada de tamoxifeno y TNF- α aumentan la actividad del promotor superóxido dismutasa de manganeso, el cual suprimir el desarrollo de cáncer (Daosukho et al., 2002) El tamoxifeno en las dosis de 300 y 1000 µg/Kg la concentración de TNF- α muestra un disminución significativa del 34% y 56% respectivamente con respecto al vehículo. De igual manera el marcado IL-1 β presenta una disminución conforme aumenta la dosis pero no tienen ningún significado estadístico.

11. CONCLUSIONES

- El tratamiento crónico con tamoxifeno disminuye el peso corporal de los animales tratados.
- El tamoxifeno ejerce un efecto uterotrófico.
- En el presente modelo experimental no observamos efectos significativos del tratamiento crónico del tamoxifeno sobre la vía extrínseca de la coagulación.
- El tamoxifeno tiene efectos sobre la vía intrínseca de la coagulación y la vía común.
- El tamoxifeno ejerce cambios leves en el sistema fibrinolítico.
- El tratamiento crónico de tamoxifeno inhibe marcadores biológicos que participan en los procesos de inflamación.
- En el modelo experimental de rata Wistar hembra ovariectomizada, el tamoxifeno actúa como un compuesto antitrombótico y antiinflamatorio.

12. PERSPECTIVAS

Para determinar el factor o los factores que influyen sobre el peso de la rata Wistar ovariectomizada será necesario evaluar los parámetros relacionados con la masa ósea, tejido muscular y tejido adiposo. Se podría obtener más información en el tratamiento crónico con el tamoxifeno sobre la vía extrínseca y vía intrínseca al evaluarse los factores de coagulación (VII, X, XII, XI, IX, VIII).

13. BIBLIOGRAFÍA

1. Allred, D. C. (2010) Issues and updates: evaluating estrogen receptor-alpha, progesterone receptor, and HER2 in breast cancer. *Mod. Pathol.* **23** (2): S52-59
2. Bennet, J. P. & Vickery, B. H. (1970). Chap17. Rats and mice: Hafez ESE, editor. In *Reproduction and breeding techniques for laboratory animals* (pp. 299-316). Philadelphia (PA): Lea and Febiger.
3. Björnström, L. & Sjöberg, M. (2005). Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Mol. Endocrinol.* **19**: 833-842
4. Caicedo, J. J., Quintero, E., Robledo, J. F., Perry, F., Ramírez, C., Duarte, C., Javier, A., Díaz, S., Orozco, A., Viaña, L. F., Torregrosa, E., Torres, F. & Sánchez, R. (2007). Cáncer de seno y hormonoterapia Estado actual. *Rev. Colomb Cir.* **22** (1):47-71.
5. Clauss, A. (1957). Gerinnungsphysiologische schnellmethode zur bestimmung des fibrinogens. *Acta Hematol.* **17**: 237-240.
6. Cosman, F., Baz-Hecht, M., Cushman, M., Vardy, M. D., Cruz, J. D., Nieves, J. W., Sión, M. & Lindsay, R. (2005). Short-term effects of estrogen, tamoxifen and raloxifene on hemostasis: a randomized-controlled study and review of the literature. *Thromb. Res.* **161**(1):1-13.
7. Daosukho, C., Kiningham, K., Kasarskis, E. J., Ittarat, W. & St.Clair, D. K. (2002). Tamoxifen enhancement of TNF- α induced MnSOD expression: modulation of NF-kB dimerization. *Oncogene.* **21**: 3603 – 3610.
8. Davies, C., Pan, H., Godwin, J., Gray, R., Arriagada, R., Raina, V., Abraham, M., Medeiros, A. V. H., Badran, A., Bonfill, B., Bradbury, J., Clarke, M., Collins, R., Davis, S. R., Delmestri, A., Forbes, J. F., Haddad, P., Hou, M. F., Inbar, M., Khaled, H., Kielanowska, J., Kwan, W., Mathew, B. S., Mittra, I., Muller, B., Nicolucci, A., Peralta, O., Pernas, F., Petruzella, L., Pienkowski, T., Radhika, R., Rajan, B., Rubach, M. T., Tort, S., Urrútia, G., Valentini, M., Wang, Y. & Peto, R., (2013). Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of oestrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomised trial; *Lancet.* **381**: 805–816.
9. De Maat, M., Lowe, G. & Haverkate, F. (1999). Fibrinogen. In: Laboratory techniques in thrombosis: a manual. (Ed. By Jespersen, J., Bertina, R. M. & Haverkate F.). *Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.* Pp. 79-88.
10. Deroo, B. J. & Korach, K. S. (2006). Review series estrogen receptors and human disease. *J. Clin. Invest.* **116**:561-570.
11. Espinó, J., Reyna, C., de la Cruz, S., Olier, C., Hernández, A., Fernández, H. O., Santisteban, & García, F. J., (2008). Tratamiento hormonal en el cáncer de mama. *Rev. Med. Universidad de Navarra.* **52**(1): 40-48.

12. Fisher, B., Costantino, J. P., Lawrence, W. L., Redmond, C. K., Kavanah, M., Cronin W. M., Vogel, V., Robidoux, A., Dimitrov, N., Atkins, J., Daly, M., Wieand, S., Tan-Chiu, E., Ford, L. & Norman Wolmark N. (1994). Endometrial cancer in tamoxifen-treated breast cancer patients: findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP) B-14. *J. Natl. Cancer Inst*, **86**(7):527–537.
13. Fragoso-Lona, J. M., Ramírez-Bello, J., Cruz-Roblesa, D., Pérez-Méndez, O. & de la Peña, A., Vargas-Alarcón, G. 2009. Marcadores pro y antiinflamatorios en la enfermedad arterial coronaria y el síndrome isquémico coronario agudo. *Arch. Cardiol. Mex.* **79**(1):54-62.
14. García-Becerra, R., Santos, N., Díaz, L., & Camacho, J. (20012). Mechanisms of Resistance to Endocrine Therapy in Breast Cancer: Focus on Signaling Pathways, miRNAs and Genetically Based Resistance. *Int. J. Mol. Sci.* **14**: 108-145.
15. García-Manzano, A., González-Llaven, J., Lemini, C. & Rubio-Poo, C. (2001). Standardization of rat of blood clotting tests with reagents used for humans. *Proc. West Pharmacol. Soc.* **44**:153-155.
16. Grossman, C. (1985). Interactions between the gonadal steroids and the immune system. *Science.* **227**: 257-261.
17. Green, S., Kumar, V., Krust, A. Walter, P. & Chabon, P. Structural and functional domains of the estrogen receptor. (1986). *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **51 Pt2**: 751-8
18. Grieninger, G., Plant, P. W., Liang, T. J., Kalb, R. G., Amrani, D., Mosesson, M. W., Hertzberg, K. M. & Pindyck, J.(1983). Hormonal regulation of fibrinogen synthesis in cultured hepatocytes. *Ann N. Y. Acad. Sci.* **27**(408):469–89.
19. Hermes, T. X., Castellanos, R. & Fernández-Britto, J. E. (2005). Fibrinógeno y riesgo trombótico cardiovascular: algunas reflexiones. *Rev Cubana Invest Biomed.* **24**(3):1-17.
20. Herynk, M. H. & Fuqua, S. A W. (2004). Estrogen receptor mutation in human disease. *Endocr. Rev.* **25**: 869-98
21. Jordan, V. C. (2000). Tamoxifen: a personal retrospective. *Lancet Oncol.* **1**:43-49
22. Jordan, V. C. (2002). The secrets of selective estrogen receptor modulation: Cell-specific coregulation. *Cancer Cell.* **1**: 215-217
23. Kamath, S. & Lip, G. Y. H. 2003. Fibrinogen: biochemistry, epidemiology and determinants. *Q. J. Med.* **96**:711–729.
24. Klinge, M. C. (2000) Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressor. *Steroids.* **65**:227-51.
25. Kumar. V., Green, S., Stack, G., Berry, M., Jin, J. & Chambon, P. (1987). Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell.* **51**:941-51

26. MacGregor, J. I. & Jordan, V. C. (1998). Basic guide to the mechanisms of antiestrogen action. *Pharmacol. Rev.* **50**:151-96
27. Marín, F. (1998). Moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERMs). *Cuad. Med. Reprod.* **4**(2):1-14
28. Martin, A. M. & Weber, B. L. (2000). Genetic and hormonal risk factors in breast cancer. *J. NATL. Cancer Inst.* **92**:1126-35
29. Martínez-Murillo, C. 2003. Bases de la hemostasia y trombosis. *Gac Méd Méx.* **139** (2):S28-S30.
30. Maximov, P. Y, Lee, T. M. & Jordan, V. C. 2013. The discovery and development of selective estrogen receptor modulators (SERMs) for clinical practice. *Curr. Clin. Pharmacol*; **8**:135-55.
31. Meijers, J. C., Tekelenburg, W. L., Bouma, B. N., Bertina, R. M. & Rosendaal, F. R. 2000. High levels of coagulation factor XI as a risk factor for venous thrombosis. *N Engl J Med*; **342**:696–701.
32. Morello, K. C., Wurz, G. T. & DeGregorio, M. W. (2003) Pharmacokinetics of Selective Estrogen Receptor Modulators. *Clin. Pharmacok.* **42** (4): 361-372.
33. Morten, S. P. 2013. Mechanisms of hormonal therapy related thrombosis. *Thromb. Res. Suppl.* **131**:S4-S7.
34. Navarro, D. A. (2001). Moduladores selectivos del receptor estrogénico. Su utilidad en la menopausia. *Rev. Cubana Endocrinol.* **12** (2):124-127.
35. Noriega-Reyes, Y. & Langley, M. Elizabeth (2008). Correguladores del receptor de estrógenos y su implicación en el cáncer mamario. *Cancerología.* **3**:29-40.
36. Osborne, C. K. (1998). Tamoxifen in the treatment of breast cancer. *N. Engl. J. Med.* **339**:1609-1618
37. Páramo, J. A., Panizo, E., Pegenaute, C. & Lecumberri, R. (2009). Coagulación 2009: una visión moderna de la hemostasia. *Rev. Med. Univ. Navarra.* **53**(1):19-23.
38. Peralta, M. (2006). Quimioprevención en cáncer de mama. *Rev. Med. Clin. Condes.* **17**(4): 186 - 193
39. Pineda, M. & Dooley, M. P. (2008). *Veterinary endocrinology and reproduction.* 5th edition. Philadelphia, USA. Lea & Febiger.
40. Pinkerton, J. V., & Thomas, S. 2014. Use of SERMs for treatment in postmenopausal women, J. Steroid. Biochem. *Mol. Biol.* **42**:142-54.
41. Proctor, R. R. & Rapaport, S. I. (1961). The partial thromboplastin time with kaolin. A simple screening test for first stage plasmaclotting factor deficiencies. *Am. J. Clin. Pathol.* **36**:212-219.
42. Poort, S. R., Rosendaal, F. R., Reitsma, P. H. & Bertina, R. M. 1996. A common genetic variation in the 3'- untranslated region of the prothrombin gene is associated with elevated plasma prothrombin levels and an increase in venous thrombosis. *Blood.* **88**:3698–703.

43. Quick, A. (1954) Letter. Normal values for coagulation test. *N. Engl. J. Med.* **290**:751.
44. Raps, M., Helmerhorst, F. M., Fleischer, K., Dahm A. E., Rosendaal, F. R., Reitsma P, Rosing, J., Sandset, P. M. & Van, H. V. A.. 2013. The effect of different hormonal contraceptives on plasma levels of free protein S and free TFPI. *Thromb. Haemost.* **109**(4):606-13.
45. Rodríguez, C. S. A. & Capurso, G. M. (2006). Epidemiología del cáncer de mama. *Ginecol. Obstet. Mex.* **74**: 585-593.
46. Ruiz-Argüelles, G. J. (2013). Cap. 18. Mecanismos hemostáticos. 4^a ed. México. *Fundamentos de Hematología*. (pp229-244). México: Editorial Médica Panamericana.
47. Santamaría, S. M., Rodríguez J. J., Maslyk, M. M., Pascual-Teresa, B. & Ramos, A. (2010). SERMs: un largo camino desde el tamoxifeno hasta las nuevas estrategias para el diseño de fármacos más selectivos. *An. Quím.* **106**(3):199–206.
48. Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria (SENASICA). Dirección General de Salud Animal. 2001. Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio. Diario oficial de la federación. pp89.
49. Shao, W. & Brown, M. (2004). Advances in estrogen receptor biology: prospects for improvements in targeted breast cancer therapy. *Breast Cancer Res.* **6**:39-52.
50. Stuart, I. F. (2011). Fisiología Humana. 12^a ed. USA, New York: McGraw-Hill. Capítulo 11
51. Terán, D. J. & Teppa, G. A. D. (2005) Moduladores selectivos de los receptores estrogénicos (SERMs): bioquímica, farmacología y aplicación clínica en ginecología. *Ginecol. Obstet. Mex.* **73**(8):424-35.
52. Takeyoshi, M., Sawaki, M., Noda, S., Muroi, T. & Yamasaki, K. (2002). Effect of gonadotropin-releasing hormone antagonist on ovarian and uterine weights in immature female rats. *Reprod. Toxicol.* **16**: 367-369.
53. Van, H. V. A. & Rosendaal, F. R. 2003. High levels of fibrinogen are associated with the risk of deep venous thrombosis mainly in the elderly. *J. Thromb Haemost.* **1**:2677–8.

14. ANEXO I

14.1 CURVA DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE FIBRINÓGENO

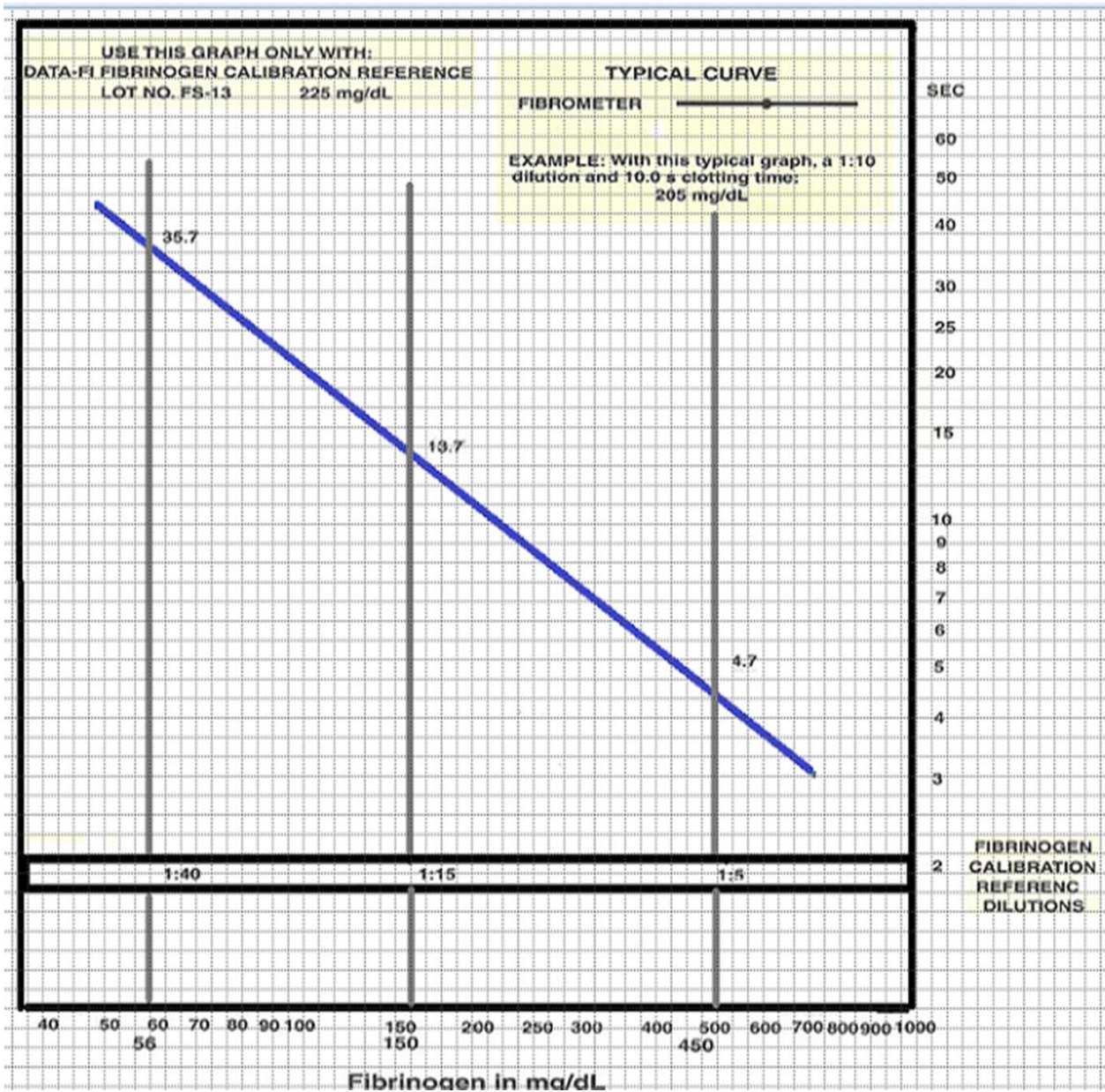


Figura 15. Estandarización de fibrinógeno en plasma estándar, diluciones de 1:5, 1:15 y 1:40. Cada punto representa el promedio de al menos 5 ratas macho sin tratamiento por triplicado. Basado en el Método Clauss.