



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**EVALUACION FARMACOLOGICA DEL 17 β -AMINOESTROGENO
PENTOLAME SOBRE MARCADORES FIBRINOLITICOS Y DE
INFLAMACION EN RATAS HEMBRA OVARIECTOMIZADAS**

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

PRESENTA
ROSAS ROA PERLA



MÉXICO, D.F.

2016



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: José Fausto Rivero Cruz**
VOCAL: **Profesor: María Eva González Trujano**
SECRETARIO: **Profesor: Ruth Jaimez Melgoza**
1er. SUPLENTE: **Profesor: Oscar Armando Pérez Méndez**
2° SUPLENTE: **Profesor: Araceli Mendieta Rergis**

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

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

ASESOR DEL TEMA:

DRA. RUTH JAIMEZ MELGOZA

SUSTENTANTE (S):

ROSAS ROA PERLA

CONTENIDO

1	RESUMEN.....	6
2	INTRODUCCIÓN	7
2.1	Estrógenos.....	7
2.2	Clasificación	8
2.3	Biosíntesis de estrógenos	9
2.4	Regulación hormonal	12
2.5	Mecanismo de acción	14
2.5.1	Receptores estrogénicos	14
2.5.2	Mecanismos genómicos.....	16
2.5.3	Mecanismos no genómicos	17
2.6	Efectos fisiológicos	18
2.7	Aplicaciones terapéuticas	19
3	ANTECEDENTES.....	21
4	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	24
5	JUSTIFICACIÓN	25
6	HIPÓTESIS.....	26
7	OBJETIVO GENERAL.....	26
7.1	Objetivos específicos	26
8	MATERIALES	27
8.1	Reactivos.....	27
8.2	Material y equipo	27
8.3	Material biológico	28
9	MÉTODOS.....	29

9.1 Ovariectomía	29
9.2 Manejo de animales y tratamiento farmacológico	29
9.3 Toma de muestras.....	30
9.4 Método inmunoenzimático ELISA	30
9.5 Análisis estadístico	31
10 RESULTADOS.....	32
10.1 Efecto estrogénico del pentolame	32
10.2 Efecto del pentolame sobre marcadores hemostáticos	34
10.2.1 Fibrinógeno.....	34
10.2.2 Factor tisular.....	34
10.3 Efecto del pentolame sobre marcadores fibrinolíticos	37
10.3.1 Plasminógeno.....	37
10.3.2 Inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1	37
10.4 Efecto del pentolame sobre marcadores inflamatorios	40
10.3.1 Interleucina 1β (IL-1β)	40
10.3.2 Factor de necrosis tumoral α (TNF-α)	40
11 DISCUSIÓN	43
12 CONCLUSIONES	46
13 REFERENCIAS	47
ANEXO 1	52

ABREVIATURAS

ANOVA	Análisis de varianza
EEM	Error estándar de la media
ERE	Elementos de respuesta a estrógenos
ELISA	Enzyme-linked inmuno sorbent assay
E1	Estrona
E2	Estradiol
E3	Estriol
FSH	Follicle-stimulating hormone
GnRH	Hormona liberadora de gonadotropina
HDL	High density lipoprotein
HSP90	Heat Shock Protein 90
IL-10	Interleucina 10
IL-1β	Interleucina 1β
LH	Luteinizing hormone
LDL	Low density lipoprotein
PAI-1	Inhibidor del plasminógeno tipo 1
RE	Receptor estrogénico
SNC	Sistema nervioso central
SHBG	Globulina fijadora de hormonas sexuales
TF	Factor tisular
TEV	Tromboembolismo venoso
THR	Terapia hormonal de reemplazo
TNF-α	Factor de necrosis tumoral α
WHI	Women´s Health Initiative

1 RESUMEN

Los estrógenos son hormonas esteroides con importantes efectos fisiológicos sin embargo, su uso en terapia anticonceptiva o en la terapia de reemplazo se relaciona con tromboembolismo. El pentolame, es un **17 β -aminoestrógeno que a diferencia del 17 β -estradiol**, ha demostrado tener efectos anticoagulantes.

En el presente trabajo se demostró el efecto del pentolame sobre marcadores del sistema hemostático, fibrinolítico e inflamatorio, por lo tanto, se evaluó el efecto in vivo del pentolame sobre los marcadores fibrinógeno, factor tisular, plasminógeno, PAI-1, TNF- α , **IL-1 β** . Para ello, se llevó a cabo la ovariectomía en ratas hembra Wistar, dos semanas **después se administró pentolame (1, 10, 100 y 1000 μ g/Kg) o** propilenglicol como vehículo (0.3 ml) vía s.c. por tres días. Se obtuvieron sueros para determinar los marcadores por el método de ELISA. Los resultados se analizaron con las pruebas de ANOVA y Dunett.

El pentolame produjo una disminución del fibrinógeno entre 25 y 35%, en todas las dosis administradas, y un aumento en el factor tisular en todas las dosis. Disminuyó significativamente los niveles de plasminógeno entre **20 y 30% ($p < 0.05$) a las dosis de 1, 10 y 100 μ g/Kg. En los marcadores de inflamación, el pentolame disminuyó en un 27 y 35% ($p < 0.05$) de **IL-1 β a las dosis de 10 y 100 μ g/Kg, y aumentó alrededor de 40% ($p < 0.05$)** la citocina TNF- α **a dosis de 1 y 10 μ g/Kg.****

A diferencia de otros estrógenos que se utilizan en la clínica, el pentolame no propicia la trombosis y de acuerdo con los resultados actúa como un fármaco con actividad antiinflamatoria. Estos hallazgos confieren importancia a este grupo de fármacos para continuar con su desarrollo farmacológico y en un futuro puedan utilizarse en la terapia hormonal de reemplazo o junto con progestinas en la terapia anticonceptiva.

2 INTRODUCCIÓN

2.1 Estrógenos

Los estrógenos son hormonas esteroides cuyos efectos fisiológicos en diversos tejidos dependen de su unión al receptor estrogénico (Björnström & Sjöberg, 2005). Éstas participan en diferentes procesos como el desarrollo y mantenimiento de características sexuales secundarias, además, son responsables del control del ciclo menstrual-ovulatorio y de la modulación de algunos procesos metabólicos de minerales, lípidos, carbohidratos y proteínas (Patiño, 2008). En los hombres, producen importantes acciones en el sistema óseo, el comportamiento y la espermatogénesis (Franco, Mendoza, & Lemini, 2003).

Estructuralmente, los estrógenos son derivados químicos del ciclo pentanoperhidrofenantreno, formados por tres anillos ciclohexanos (ABC) y un anillo de ciclopentano (D). El anillo fenólico A es la principal estructura responsable de la afinidad a los receptores estrogénicos (Brunton, 2011).

Su biosíntesis se lleva a cabo principalmente en los ovarios pero también son sintetizados en las glándulas suprarrenales, en la placenta durante el embarazo y en los testículos en bajas cantidades (Patiño, 2008). Los estrógenos endógenos más importantes en el humano son la estrona (E1) que procede fundamentalmente de la conversión extraglandular de la androstendiona en tejidos periféricos, el estradiol (E2) y el estrógeno más abundante en la orina, el estriol (E3) que resulta del metabolismo del estradiol (figura 1) (Tresguerres & Castillo, 2005).

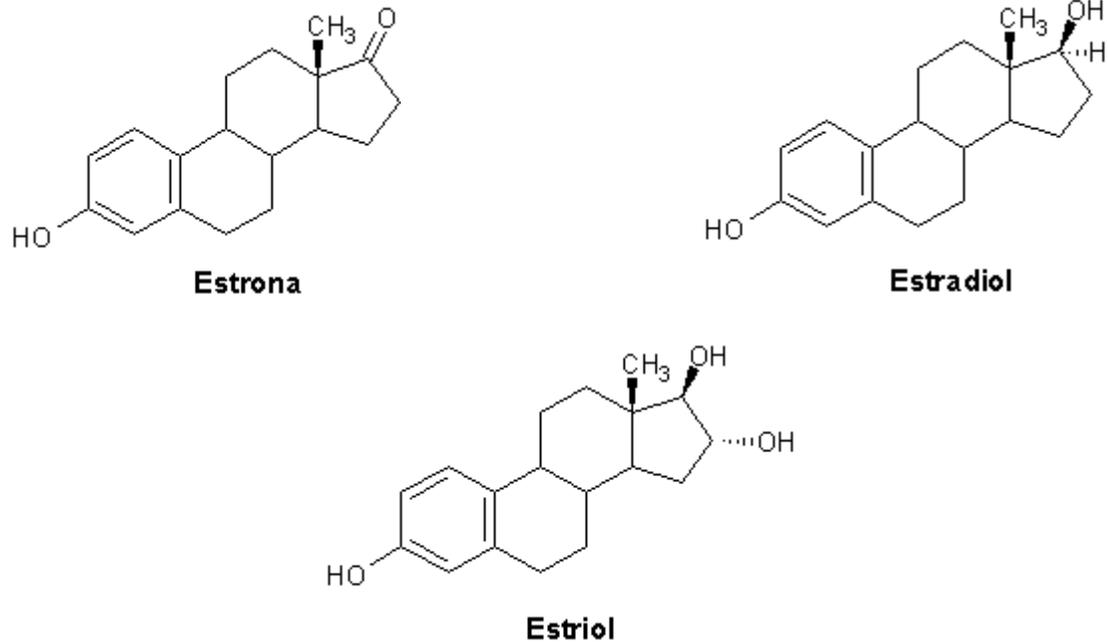


Figura 1. Estructura de los tres estrógenos principales sintetizados a partir de colesterol: estrona (E1), estradiol (E2) y estriol (E3).

2.2 Clasificación

Los estrógenos pueden ser clasificados de acuerdo a su origen, estructura química o actividad biológica. Con respecto a su origen, pueden ser naturales o semi-sintéticos, dentro del primer grupo se encuentran los de origen humano (E1, E2, E3), de origen animal obtenidos principalmente de equinos utilizados ampliamente para la THR entre los que se incluye a la equilina, equilenina, estrona y sales de estradiol (Jaimez, 2015) y los de origen vegetal denominados fitoestrógenos que se encuentran en plantas de trébol, soya, granos enteros y leguminosas (figura 2).

Por otra parte, los estrógenos semi-sintéticos son sustancias que han sido diseñadas basándose en las características estructurales de los estrógenos naturales, generalmente son administrados conjuntamente con una progestina en formulaciones anticonceptivas. Dentro de este grupo se puede ejemplificar al etinilestradiol y mestranol.

Hay también diversas sustancias químicas que comparten actividad estrogénica aún sin poseer estructura esteroidea, es decir, sin estar integrados por el ciclo pentanoperhidrofenantreno, muchos fenoles poseen esta actividad, un ejemplo de ellos son los isoflavonoides (Patiño, 2008).

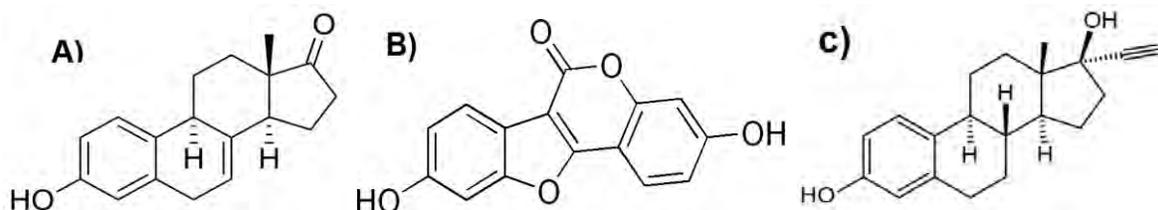


Figura 2. Estructura de algunos estrógenos: A) Equilina, B) Coumestrol (Fitoestrógeno), C) Etinilestradiol.

2.3 Biosíntesis de estrógenos

La síntesis de esteroides (mineralocorticoides, glucocorticoides, progestinas, andrógenos y estrógenos) se lleva a cabo a partir del colesterol mediante la actividad de diversas enzimas entre las cuales se encuentran: enzimas de tipo citocromo P450, deshidrogenasas de esteroides y reductasas (Gómez, Larrea, & Martínez, 2012).

La estroma ovárica está compuesta por células de la teca, en cuya capa externa se sintetizan los andrógenos bajo la regulación de la hormona luteinizante (Ibañez & Potau, 2007); y las células de la granulosa, que aromatizan los andrógenos a estradiol estimuladas por la hormona foliculoestimulante (Björnström & Sjöberg, 2005) (Strauss, 2014).

La síntesis de estrógenos comienza con la conversión de colesterol en pregnenolona a partir del colesterol (figura 3), derivado de la captación de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), de los ésteres de colesterol o bien, de la síntesis nueva a partir de acetilcoenzima A (Tresguerres &

Castillo, 2005). En el ovario existen receptores para proteínas LDL, pero también posee sistemas enzimáticos capaces de sintetizar colesterol el cual es transportado a las membranas mitocondriales mediante una proteína transportadora de esteroides activada por AMPc donde comienza la síntesis. Para la producción final de pregnenolona, la enzima CYP11A1 localizada en la membrana mitocondrial interna, lleva a cabo la escisión de la cadena lateral del colesterol (Gómez, Larrea, & Martínez, 2012).

A partir de la pregnenolona, la síntesis se diferencia por la vía que conduce a la producción de andrógenos o a la vía de síntesis de estrógenos y progesterona. La síntesis de esteroides femeninos se produce en los ovarios aunque también fuera de ellos a partir de los andrógenos (fuente principal de estrógenos en la menopausia) (Lozano, 2008).

De manera específica, la síntesis de estradiol se lleva a cabo con la intervención de las dos células ováricas (células teca y de la granulosa) y la actividad de las gonadotropinas LH y FSH (Hillier, 1991). A partir de la formación pregnenolona, es en el retículo endoplásmico de las células de la teca, donde la pregnenolona es convertida a androstenediona por la remoción de los carbonos 20 y 21, así como la isomerización del doble enlace del anillo B al A del núcleo esteroide. Una vez formada la androstenediona, esta difunde a través de la membrana basal del folículo hasta llegar a las células de la granulosa, estas células poseen el receptor de FSH que, cuando es activado, provoca (a través de la activación de la adenilciclase) la síntesis de la enzima CYP19A1, la aromatasa que convierte la androstenediona a estrona.

Finalmente, mediante la acción de la 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (17 β 1-HED) convierte la estrona a estradiol (Tresguerres & Castillo, 2005). Por tanto, para sintetizar cantidades suficientes de estrógenos, las células de la granulosa y de la teca deben ser funcionales

y las gonadotropinas deben ser secretadas en cantidades apropiadas (figura 3).

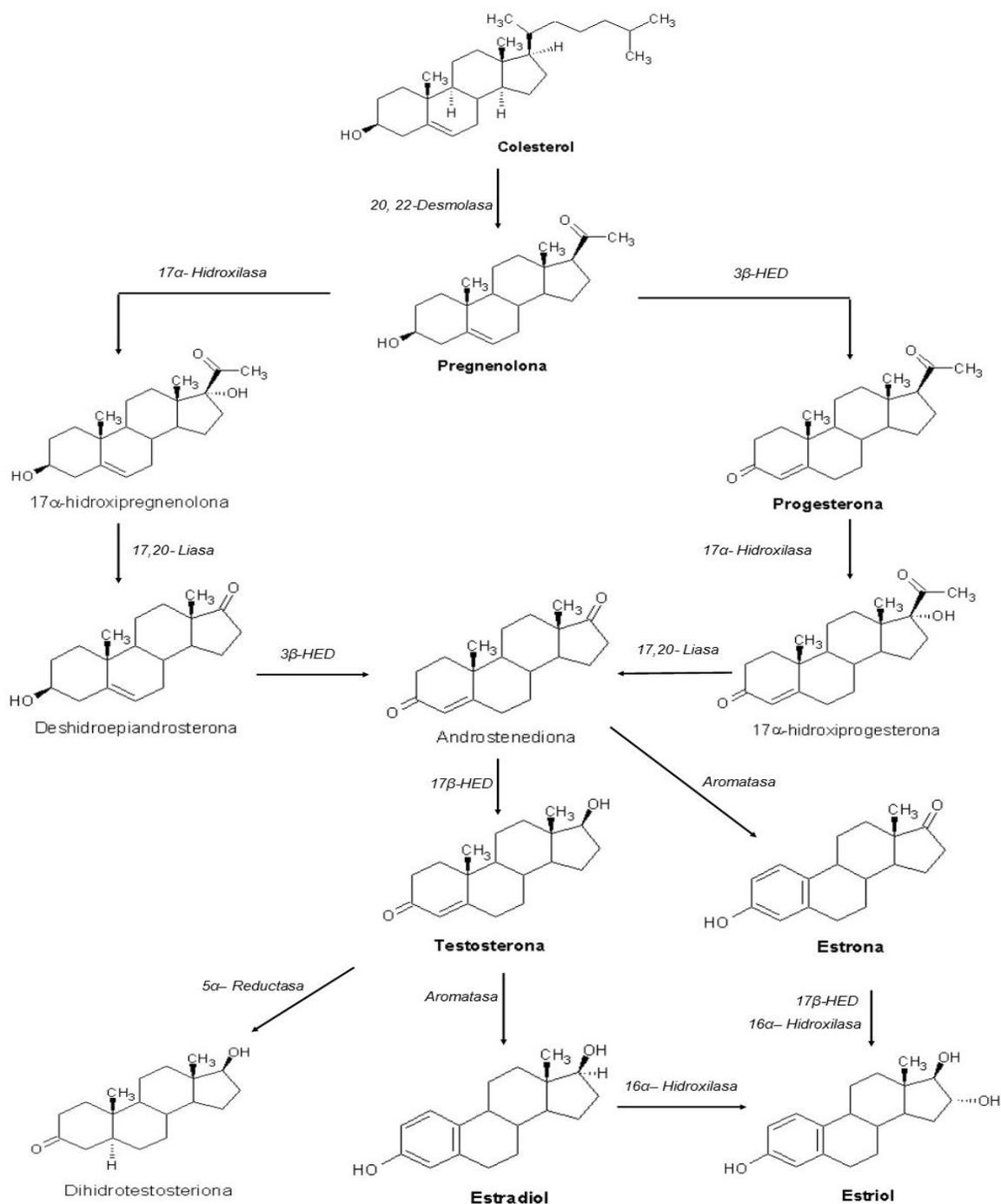


Figura 3. Biosíntesis de estrógenos a partir del colesterol. 3 β -HED: 3 β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa; 17 β -HED: 17 β -hidroxiesteroide-deshidrogenasa.

2.4 Regulación hormonal

El ciclo menstrual se encuentra bajo equilibrio de señales coordinadas entre el hipotálamo, la hipófisis y los ovarios. La secreción de las gonadotropinas LH y FSH en la hipófisis anterior está bajo la regulación hipotalámica de la GnRH (Shaw, Histed, & Srouji, 2010). Durante el ciclo menstrual, estas hormonas son las encargadas de mediar la concentración de estrógenos en la circulación, estimular el desarrollo folicular, la ovulación y la formación del cuerpo lúteo (Birken, O'Connor, Kovalevskaya, & Lobel, 2000) (Strauss, 2014).

Las neuronas secretoras del hipotálamo producen y liberan de manera pulsátil la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) que viaja a través de vasos capilares por el sistema porta-hipofisiario hasta la hipófisis anterior donde estimula a las gonadotropos a sintetizar y secretar LH y FSH (Stuar, 2011). Estas últimas pasan al torrente sanguíneo hasta llegar al ovario donde ejercen sus efectos, la FSH promueve la maduración y crecimiento ovárico y la LH induce la ovulación y formación del cuerpo lúteo (Longo, 2012).

Durante la fase folicular del ciclo menstrual, la FSH promueve el crecimiento de los folículos, la secreción de estrógenos (específicamente estradiol) y la producción de receptores a FSH en las células de la granulosa incrementando así la sensibilidad a esta hormona. Al final de la fase folicular, tanto la FSH como el estradiol inducen la producción de receptores para LH para favorecer la ovulación, a su vez, la rápida secreción de estradiol ejerce un efecto de retroalimentación positiva en la GnRH que favorece la secreción de LH que culmina en un pico de secreción (figura 4) (Casanueva, Vázquez, & Gaztambide, 1995).

Después de la ovulación (en la fase lútea), el folículo vacío es estimulado por la LH para convertirse en cuerpo lúteo para la secreción de estradiol

y progesterona. En combinación, estas últimas ejercen un efecto de retroalimentación negativa para la secreción de FSH y LH. Al final de la fase, la funcionalidad del cuerpo lúteo disminuye así como las cantidades de estradiol y progesterona (figura 4) (Stuar, 2011).

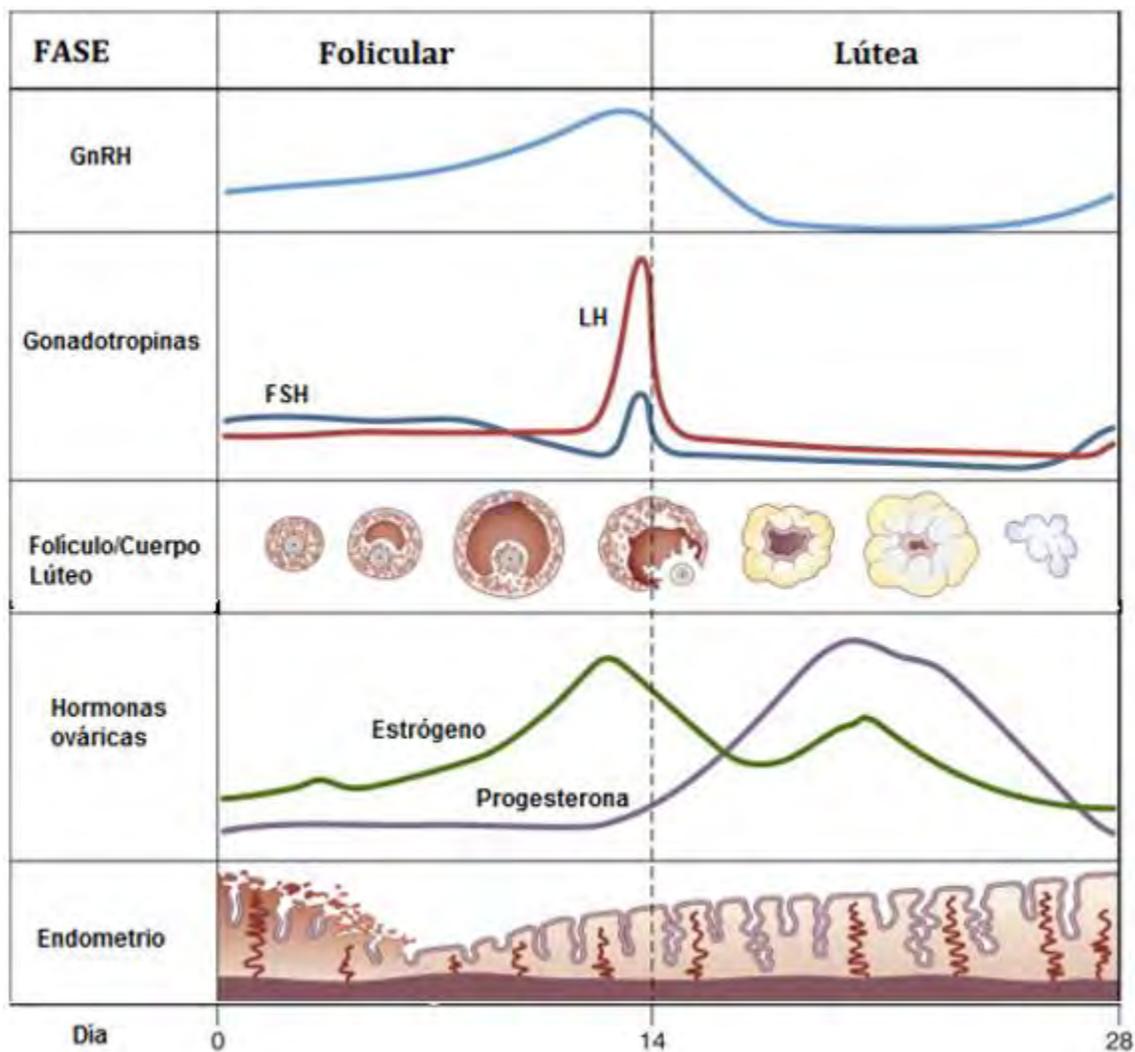


Figura 4. Factores involucrados en el ciclo menstrual. El ciclo ovárico se divide en las fases folicular y lútea, separadas por la ovulación. Durante el ciclo, el endometrio aumenta y disminuye su espesor. Los paneles muestran el aumento de la frecuencia de pulsos de la GnRH durante la fase folicular y la secreción de gonadotropinas, al igual que los patrones de hormonas esteroideas, con predominio

de estrógenos durante la fase folicular y progesterona durante la fase lútea. Es el efecto de retroalimentación positiva de E_2 que provoca el aumento de la mitad del ciclo de LH (y en un grado menor FSH), que es a su vez, directamente responsable de la ovulación. A medida que el cuerpo lúteo disminuye su funcionalidad, los niveles de progesterona y estrógeno decaen. Editado de fuente: (Norman & Henry, 2015).

2.5 Mecanismo de acción

Los esteroides sexuales son transportados en el plasma por una proteína específica denominada globulina fijadora de hormonas sexuales (SHBG) y en una menor cantidad, por la albúmina (Ibañez & Potau, 2007).

Después de disociarse de los sitios de unión a la proteína fijadora de hormonas sexuales, los estrógenos difunden a través de la membrana y se asocian a receptores específicos. Dos son los subtipos de receptores estrogénicos, α y β , los cuales varían según su estructura, localización cromosómica y distribución en tejidos (Nilsson, Makela, & Treuter, 2001).

Los estrógenos se unen a su receptor para activar la transcripción de genes a través de diferentes vías: la vía genómica o bien la no genómica.

2.5.1 Receptores estrogénicos

Los efectos fisiológicos de los estrógenos son mediados a través del receptor de estrógenos (RE) cuyas isoformas (α y β) pertenecen a la familia de los receptores nucleares (Filippo & Rakesh, 2006). RE α y RE β son codificados por diferentes genes y su expresión varía dependiendo del tipo de tejido (Nilsson, Makela, & Treuter, 2001). RE α se expresa principalmente en los órganos reproductivos como útero, mama y ovario, además de hígado y el sistema nervioso central, mientras que RE β se encuentra en mayor porcentaje en tejidos como hueso, endotelio,

pulmones, tracto urogenital, ovario, sistema nervioso central y próstata (Anderson, 2002) (Palmeri, Cheng, & Saji, 2002).

En respuesta a la unión del ligando, RE sufre cambios conformacionales acompañados por la disociación de proteínas formando un dímero (RE-ligando) (Klinge, 2001).

Tanto RE α como RE β **se componen de tres dominios funcionales** independientes pero que interactúan: el dominio -NH₂ terminal (A/B) que es la región menos conservada entre ambos subtipos, el dominio de unión a ADN (C) que además contiene dos estructuras de iones Zinc denominadas **“dedos de Zinc” importantes para la dimerización del receptor** y la unión al promotor (Montano, Muller, Trogaugh, & Katzenellenbogen, 1995). Entre la región de unión a ADN y el dominio E/F, se encuentra la región D o región de bisagra que participa en la unión a la proteína HSP90 (Heat Shock Protein 90), la cual permanece unida al receptor mientras se encuentra en estado inactivo. Finalmente, en el extremo -COOH se encuentra el dominio de unión a ligando (E/F) (figura 5) (Ignar-Trowbridge, et al., 1992).

La actividad transcripcional, además, está regulada por los dominios de activación AF-1 localizado en el extremo -NH₂ terminal y AF-2 que se encuentra en el dominio de unión a ligando (Heldring, Pike, & Andersson, 2007), ambos dependen del reclutamiento de coactivadores, (Tora, Blanco, & Brou, 1990).

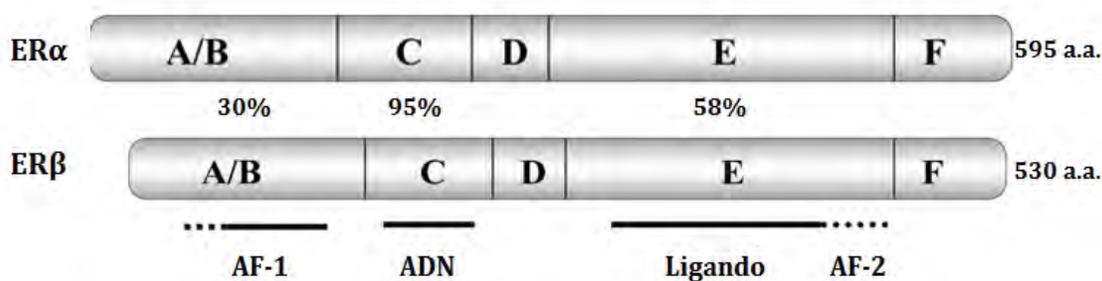


Figura 5. Representación de los receptores estrogénicos y sus dominios. El dominio A/B en el extremo -NH₂ terminal contiene el sitio de AF-1 donde los factores de transcripción interactúan. El dominio C/D contiene la estructura de dedo de zinc que se une al ADN, y el dominio C/F contiene un sitio de unión a ligando, así como AF-2 que interactúan con coactivadores. El porcentaje indica la homología entre los dominios de ambos receptores. Editado de Fuente: (Heldring, Pike, & Andersson, 2007) (Stefan Nilsson, 2001) (Marino, Galluzzo, & Ascenzi, 2006).

2.5.2 Mecanismos genómicos

El mecanismo genómico o clásico de acción del RE (Figura 6), implica que en ausencia del estrógeno el receptor se encuentra inhibido por un complejo proteico dentro de las células diana; posteriormente, al unirse el ligando induce un cambio conformacional en el RE, así como la separación de proteínas de choque térmico (HSP90) y promueve la dimerización y alta afinidad de los receptores a una secuencia palindrómica de ADN, los ERE (elementos de respuesta a estrógenos) situados en regiones promotoras de genes específicos (Klinge, 2001), (Truss & Beato, 1993).

El RE regula la transcripción genética a través de los dominios AF-1 y AF-2. Para producir la actividad máxima se requiere de ambos dominios, sin embargo, actualmente se conoce que la actividad de AF-1 puede ser independiente de hormona mientras que AF-2 es hormona-dependiente (Tora, Blanco, & Brou, 1990).

Así, después de la unión estrógeno-receptor al ADN y de la regulación por los diferentes dominios, el complejo activado interactúa con la maquinaria de transcripción para comenzar con la síntesis de ARNm que da como resultado la síntesis de proteínas específicas que sirven de mediadores en diversas funciones fisiológicas (Harvey, Champe, & Finkel, 2009).

2.5.3 Mecanismos no genómicos

Como se ha mencionado, los estrógenos pueden ejercer su acción por la activación de la expresión génica a través del RE, pero hay otros efectos de los estrógenos que son tan rápidos que no pueden depender de la activación de ARN y síntesis de proteínas (Losel & Wehling, 2003).

Estas acciones se conocen como los mecanismos no genómicos (figura 6) y se cree que están mediadas a través de receptores de membrana. Las acciones de estos receptores han sido asociadas a su participación en la regulación de canales iónicos y receptores acoplados a proteínas G, la estimulación de la actividad de la adenilato ciclasa para la producción de AMPc, y a la activación de diferentes cascadas proteína quinasa (Aronica, Kraus, & Katzenellenbongen, 1999) (Le Mellay, Grosse, & Lieberherr, 1997).

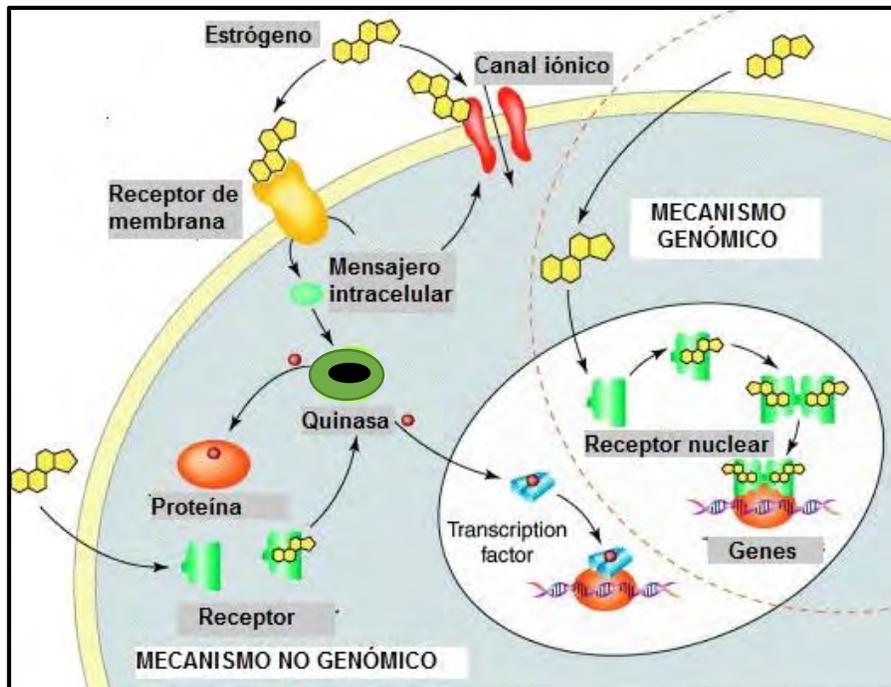


Figura 6. Esquema de los diferentes mecanismos de acción de los estrógenos. El estrógeno puede activar al receptor estrogénico nuclear clásico (RE), al receptor de membrana, o bien, a los canales iónicos. La activación de algunos de estos receptores desencadena eventos de señalización (como mensajeros intracelulares) que resultan en la activación de quinasa. Tanto el mecanismo genómico como el no genómico pueden determinar en última instancia un cambio en la expresión génica. (Nadal, Díaz, & Valverde, 2001)

2.6 Efectos fisiológicos

Los estrógenos tienen actividad en el sistema reproductor ya que participan en el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios y la regulación del ciclo reproductivo, promueven el crecimiento del útero, vagina, vulva, trompas de Falopio y favorecen el desarrollo mamario. A lo largo del ciclo femenino, ocasionan cambios en los órganos reproductivos, la proliferación de mucosa uterina y vaginal (Amado & Florez, 2014).

Durante la edad reproductiva, los estrógenos funcionan como protectores contra enfermedades cardiovasculares debido a que provocan un incremento en las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y favorecen el catabolismo de las lipoproteínas de baja densidad (LDL), como moduladores regulan la síntesis de: vasodilatadores como las prostaciclina y el óxido nítrico, canales de calcio y potasio, y factores de la coagulación, del sistema fibrinolítico y anticoagulantes sanguíneos (Sánchez, Manubens, & Mendoza, 2009).

Además, los estrógenos también pueden actuar sobre tejidos no reproductivos (hueso, endotelio, SNC, sistema inmune, aparato gastrointestinal, corazón) a través de sus receptores. En el sistema óseo, por ejemplo, estimulan la actividad de los osteoblastos e inhiben a los osteoclastos, evitando la resorción ósea y previendo la osteoporosis (Lozano, 2008).

En el sistema nervioso central, se ha demostrado que la presencia de receptores estrogénicos, ayuda a mejorar la memoria, las funciones cognitivas y el estado anímico (Patiño, 2008).

2.7 Aplicaciones terapéuticas

Los usos más frecuentes de los estrógenos son la anticoncepción y la terapia hormonal de reemplazo (THR). Los temores surgidos recientemente sobre los riesgos de la THR ha contribuido a prescribir dosis eficaces más bajas y durante el menor tiempo posible para disminuir los síntomas vasomotores y la atrofia vaginal (Harvey, Champe, & Finkel, 2009).

También se han utilizado habitualmente para el tratamiento sustitutivo en pacientes pre-menopáusicas con déficit de esta hormona que puede

deberse a la ausencia de desarrollo ovárico y menopausia prematura o quirúrgica. En el tratamiento para hipogonadismo primario se ha instaura combinado con progestágenos y tiene la finalidad de simular el ciclo menstrual natural y estimular el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios en mujeres jóvenes entre 11-13 años (Brunton, 2011).

3 ANTECEDENTES

La menopausia, según la OMS, se ha definido como un cese permanente de la menstruación, clínicamente está definida como 12 meses después del último período menstrual que marca la pérdida de la actividad folicular del ovario. En México, se presenta en una edad promedio de 47 años con un rango de entre 41 y 55 años (Blümel, Hernández, & Motta, 2006).

Las mujeres en la transición menopáusica presentan síntomas variables entre los que se encuentran: sofocos, sudores nocturnos, sequedad vaginal y atrofia, problemas para dormir, la disfunción sexual, depresión, ansiedad, estado de ánimo lábil, efectos cognitivos, fatiga, cefalea, dolores en las articulaciones, aumento de peso, e incontinencia urinaria (Deborah & Barrett, 2012).

Con la finalidad de disminuir estos síntomas, prevenir la osteoporosis y la atrofia urogenital, se ha recomendado el uso de la terapia hormonal de reemplazo (THR) que generalmente consta de estrógenos o estrógenos más progestinas (Nelson, Haney, & Humphrey, 2005). Sin embargo, se ha demostrado que el uso prolongado y altas dosis de estrógenos, pueden estar implicados en el desarrollo de cáncer endometrial y trombosis venosa profunda (Canonico, et al., 2007).

Por ello, investigadores de la Facultad de Medicina de la UNAM a cargo de la Dra. Cristina Lemini Guzmán, sintetizaron una serie de fármacos esteroideos a partir de estrona, con la finalidad de obtener fármacos con actividad estrogénica más seguros. Los 17β -aminoestrógenos sintetizados (Figura 7) son, principalmente: **prolame** [17β -(3-hidroxi-1-propilamino)1,3,5(10)- (estratrien-3-ol)], **butolame** [17β -(3-hidroxi-1-butilamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol)], y **pentolame** [17β -(5-hidroxi-1-pentilamino)1,3,5(10)-(estratrien-3-ol)], todos ellos análogos del 17β -

estradiol (E2) con una cadena lateral sustituyente de amino-alcohol en la posición C17 del núcleo esteroideo (Lemini, Jaimez, & Toscano, 2004).

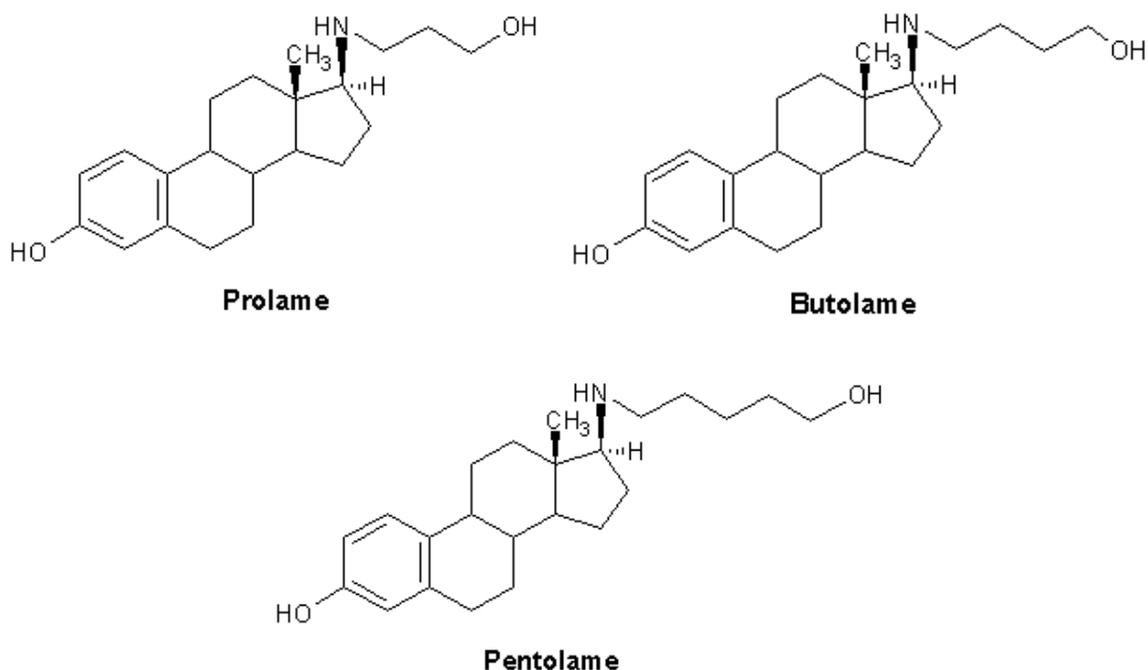


Figura 7. Estructura química de los 17β-aminoestrógenos.

Experimentos anteriores han demostrado la actividad estrogénica de los 17β-aminoestrógenos al incrementar el peso uterino e inhibir las concentraciones LH aunque con menor eficacia y potencia que el E2 (Lemus, et al., 1998). En el sistema nervioso central, se ha demostrado que logran disminuir la ansiedad en ratas ovariectomizadas así como un efecto neuroprotector en la restauración del aprendizaje y la memoria (Nissen, et al., 2012). De igual forma las evaluaciones en el sistema óseo han comprobado su capacidad para restaurar los niveles de calcio, fósforo y magnesio (Ávila, García, Reyes, Antuna, & Lemini, 2009).

En cuanto al efecto anticoagulante de los aminoestrógenos, estudios en rata y ratón, han demostrado tener un efecto contrario al 17β-estradiol al aumentar los tiempos de coagulación (Jaimez, 2001) e inhibir la

agregación plaquetaria (De la Peña, Baños, Izaguirre, Mandoki, & Fernández, 1993). Por lo tanto, es posible reducir el riesgo de eventos tromboembólicos al ser utilizados como agentes terapéuticos, este efecto se ha relacionado con la presencia del grupo amino en la estructura del anillo D de estos compuestos (Rubio-Poo, et al., 1983) (Lemini, et al., 2013).

A pesar de que se ha demostrado que los aminoestrógenos activan ambos tipos de receptores estrogénicos (α y β), sin embargo se han encontrado diferencias en la eficacia de estos tres aminoestrógenos, siendo el prolame el de mayor efecto estrogénico pero, el pentolame, el de mayor efecto anticoagulante (Jaimez, et al., 2000) (Lemini, Franco, Avila, & Jaimez, 2005).

4 PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

El efecto protector de los estrógenos contra enfermedades cardiovasculares y osteoporosis en la edad reproductiva de la mujer ha sido reconocido, sin embargo su uso en anticoncepción y terapia hormonal de reemplazo no está exento de producir efectos adversos.

Particularmente, la terapia hormonal de reemplazo (THR) ha cobrado importancia debido a los efectos beneficiosos en la menopausia, sin embargo, estudios de ensayos clínicos controlados recientemente publicados por la Women's Health Initiative (WHI) provocaron una drástica reducción en las prescripciones de compuestos hormonales puesto que mostraron un aumento en el riesgo de padecer tromboembolia venosa (TEV) y cáncer de mama. Los eventos trombogénicos de los estrógenos en este tipo de terapia parecieron ser dependientes de la dosis administrada (Rossouw, et al., 2002) (Canónico, et al., 2007).

En México y el mundo, la trombosis es un problema de salud que representa una de las primeras causas de mortalidad. Se estima que se presentan alrededor de 15 a 45 casos TEV por cada 100, 000 mujeres al año (Guía de Práctica Clínica, 2010).

Por lo anterior y con el objetivo de desarrollar medicamentos con actividad estrogénica más seguros que puedan ser utilizados en la THR, se han desarrollado una serie de fármacos con estructura esteroide, sustituidos con un grupo amino-alcohol en la posición **17 β** del estradiol a los que genéricamente se les ha denominado 17 β -aminoestrógenos, entre los que se encuentra el pentolame.

5 JUSTIFICACIÓN

El uso de terapias hormonales ha incrementado en los últimos años al igual que los estudios relacionados con los efectos trombóticos que pueden ocasionar. En estos estudios se han encontrado fármacos esteroideos capaces de simular el efecto estrogénico requerido para este tratamiento.

El pentolame es uno de estos nuevos fármacos con actividad estrogénica y que, además, se ha probado que disminuye el tiempo de coagulación total en experimentos en rata y ratón como factor prometedor para disminuir los posibles eventos trombóticos, sin embargo, se desconoce si estos efectos, a su vez, puedan estar relacionados con los procesos fibrinolíticos y la respuesta inflamatoria.

6 HIPÓTESIS

El pentolame produce efectos sobre antiinflamatorios y fibrinolíticos en un modelo de ratas Wistar ovariectomizadas.

7 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto del 17β aminoestrógeno pentolame sobre factores hemostáticos (FT y fibrinógeno), fibrinolíticos (plasminógeno y PAI-1) y marcadores de la inflamación (IL- 1β y TNF- α) en ratas hembra ovariectomizadas.

7.1 Objetivos específicos

- a. Determinar el efecto del pentolame sobre la fase fluida de la hemostasia a través del factor tisular y el fibrinógeno.
- b. Determinar el efecto del pentolame sobre marcadores fibrinolíticos a través del plasminógeno y del inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1.
- c. Evaluar el efecto del pentolame sobre marcadores de la inflamación mediante la determinación de **la interleucina 1β** y TNF- α .

8 MATERIALES

8.1 Reactivos

El 17β aminoestrógeno (pentolame) fue sintetizado y donado al laboratorio por la Dra. Cristina Lemini del Laboratorio de Farmacología Endócrina de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. El propilenglicol USP, tribromoetanol, alcohol tert-amílico, tween 20 y tetrametil bencidina (TMB) se obtuvieron de Sigma-Aldrich®.

- **Anticuerpos de captura:**

El factor de necrosis tumoral α (TNF- α MAB) R&D Systems®, fibrinógeno (FIB PA1) e interleucina-10 (IL-10) Thermo Fisher Scientific®, inhibidor de plasminógeno tipo 1 (PAI-1 C20), interleucina- 1β (IL- 1β M20), plasminógeno (Plasmin E14) y factor tisular (TF-I20) fueron obtenidos de Santa Cruz Biotechnology®.

- **Anticuerpos secundarios acoplados a peroxidasa:**

Bovino anti cabra IgG-HRP, bovino anti oveja IgG -HRP y cabra anti ratón IgG₁-HRP se obtuvieron de Santa Cruz Biotechnology ®

8.2 Material y equipo

Agujas calibre de 23G x 19/7" (0.6 x 19 mm x 178 mm) BD Vacutainer®, mariposa con aguja para extracción de sangre Safety- Lok™, tubos Vacutainer® (al vacío tamaño 13x75 mm, volumen drenado 6 mL de 13 X 100 mm con tapón de seguridad color rojo estériles y desechables) se adquirieron de Becton Dickinson, Franklin Lakes NJ USA. La sutura quirúrgica Catgut crómica 3/0 estéril de Ethicon®. El instrumental quirúrgico (pinzas ason, Kelly, halstead, porta agujas y tijeras mayo e

iris) se adquirieron de Weldon Original®. Las placas para ELISA (multipozos) de NUNC® Brand Products y el espectrofotómetro Stat Fax 3200 de Awareness Technology®.

8.3 Material biológico

Para realizar cada experimento se utilizaron 20 ratas hembras Wistar adultas de entre 200-225g de peso, procedentes del bioterio central de la Facultad de Medicina UNAM y se mantuvieron en ciclos de luz-oscuridad de 12 h x 12 h con agua ozonizada y alimento *ad libitum* Nutri-cubos Purina Lab Chows^{RM}; a temperatura controlada 22°C y humedad al 40%. Todos los experimentos fueron realizados 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.

9 MÉTODOS

9.1 Ovariectomía

La ovariectomía se realizó en ratas hembras Wistar dos semanas antes de iniciar el tratamiento. Para realizar la cirugía, cada animal se pesó y anestesió con tribromoetanol (0.2 g/kg peso del animal) por vía intraperitoneal. Bajo anestesia se rasuró el dorso del animal, se limpió la zona con benzal 1%, y posteriormente, usando el material quirúrgico desinfectado y esterilizado, se realizó una incisión transversal en la piel de aproximadamente 1 cm en la región dorsal, procediendo a una segunda incisión en el músculo para posteriormente localizar los ovarios. Los cuernos uterinos se ligaron con sutura Catgut 3-0 para realizar los cortes y remover los ovarios. Finalmente, la piel fue suturada con hilo de seda 3-0 y la región dorsal se desinfectó con la solución de benzal 1%.

9.2 Manejo de animales y tratamiento farmacológico

Las ratas fueron colocadas en cajas lavadas y desinfectadas, con piso y paredes continuas sólidas con tapa removible de reja y cambio constante de cama con aserrín estéril. Los animales estuvieron en observación todos los días previos al tratamiento para detectar infecciones posquirúrgicas. El tratamiento se inició dos semanas después de la ovariectomía y para ello, los animales fueron distribuidos de manera aleatoria en función del peso corporal. Se obtuvieron 5 lotes con cuatro animales en cada uno de ellos.

Cada lote o grupo de animales recibió un tratamiento por vía subcutánea del fármaco, pentolame, disuelto en propilenglicol usp 99.5% en dosis de 1, 10, 100 y 1000 µg/Kg durante tres días consecutivos. El grupo control recibió solamente el vehículo, propilenglicol (0.3 mL/animal/día). Estos experimentos se realizaron por triplicado.

9.3 Toma de muestras

La toma de muestra se realizó el día posterior a la última administración, para ello los animales fueron anestesiados con tribromoetanol (0.2 g/kg) por vía intraperitoneal, después se limpió la zona ventral con benzal al 1% y se realizó un corte en la piel. Para la toma de muestra se localizó la arteria mesentérica y se extrajo la muestra de sangre por medio de un sistema tipo mariposa y tubos Vacutainer para la obtención de sueros. Después de la toma de muestra, los úteros fueron disecados y pesados como control del efecto uterotrófico de los tratamientos.

Debido a que el volumen obtenido de la muestra fue mayor a 8 mL, los animales bajo anestesia murieron por exsanguinación y se corroboró con dislocación cervical. La disposición final de los cadáveres y los úteros fue la unidad de cremación de la Facultad de Medicina.

Los tubos Vacutainer® con muestra se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. El suero obtenido del sobrenadante de cada tubo fue de aproximadamente 2 mL los cuales se guardaron y congelaron a -20°C para su posterior procesamiento.

9.4 Método inmunoenzimático ELISA

En una placa multipozos para ELISA, se agregaron 100 µL/pozo de suero de rata (antígeno) por duplicado y se incubaron a temperatura ambiente por 4 horas. Después de este tiempo, el sobrenadante se desechó y se realizó el bloqueo con 200 µL/pozo de una solución de PBS1x + tween 20 (0.1%) + leche (5%) dejando incubar a una temperatura de entre 2-4°C durante una noche.

Posteriormente, la solución de leche se desechó de la placa y se realizaron 10 lavados agregando 200 µL/pozo de la solución de PBS1x + tween 20 (0.1%) con intervalos de agitación de 60 segundos.

Se agregaron 100 μL /pozo de los anticuerpos primarios: fibrinógeno (50 $\mu\text{g}/\text{mL}$), FT (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), plasminógeno (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), PAI-1 (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$), IL-1 β (2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) o TNF- α (2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$), y se incubó por 4 horas a temperatura ambiente. El sobrenadante se descartó y nuevamente se realizaron los lavados antes descritos.

Los anticuerpos secundarios como bovino anti cabra IgG-HRP, bovino anti oveja IgG-HRP y cabra anti ratón IgG1-HRP se adicionaron en una dilución 1:5000, se colocaron en sus respectivos pozos (100 μL /pozo) y se incubaron por 3 horas a temperatura ambiente para posteriormente realizar los lavados.

Para las determinaciones, se agregaron 100 μL /pozo de TMB y se incubó a 37°C en oscuridad por 20 min, la reacción se detuvo adicionando 100 μL /pozo de H_2SO_4 1M. La placa se leyó a la absorbancia de 450/492 nm en el espectrofotómetro STAT-FAX 3200.

9.5 Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó mediante el uso software de gráficos y estadística Sigma Plot 11.1® y Sigma Stat 3.0®. La significancia estadística de los grupos con respecto al control se evaluó mediante una prueba de análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparaciones múltiples de Dunnett. Una $p < 0.05$ se consideró como estadísticamente significativa vs control.

10 RESULTADOS

Se realizaron diferentes experimentos para determinar el efecto del pentolame a diferentes dosis sobre sistemas hemostático, fibrinolítico e inflamatorio, en los cuales se obtuvieron siguientes resultados. En todos los resultados, se consideró al grupo control (vehículo) como el 100%.

10.1 Efecto estrogénico del pentolame

Como experimento control del efecto estrogénico del fármaco en estudio, se determinó y se comparó el peso de los úteros de las ratas ovariectomizadas, posteriormente al tratamiento con el vehículo y con pentolame a diferentes dosis. Los resultados obtenidos en mg se muestran en la Figura 8.

Si consideramos al vehículo como un 100%, hubo un aumento entre 20 y 60% en las dosis de 100 y 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ donde ésta última fue estadísticamente significativa (el peso uterino aumentó 80 mg con respecto al vehículo).

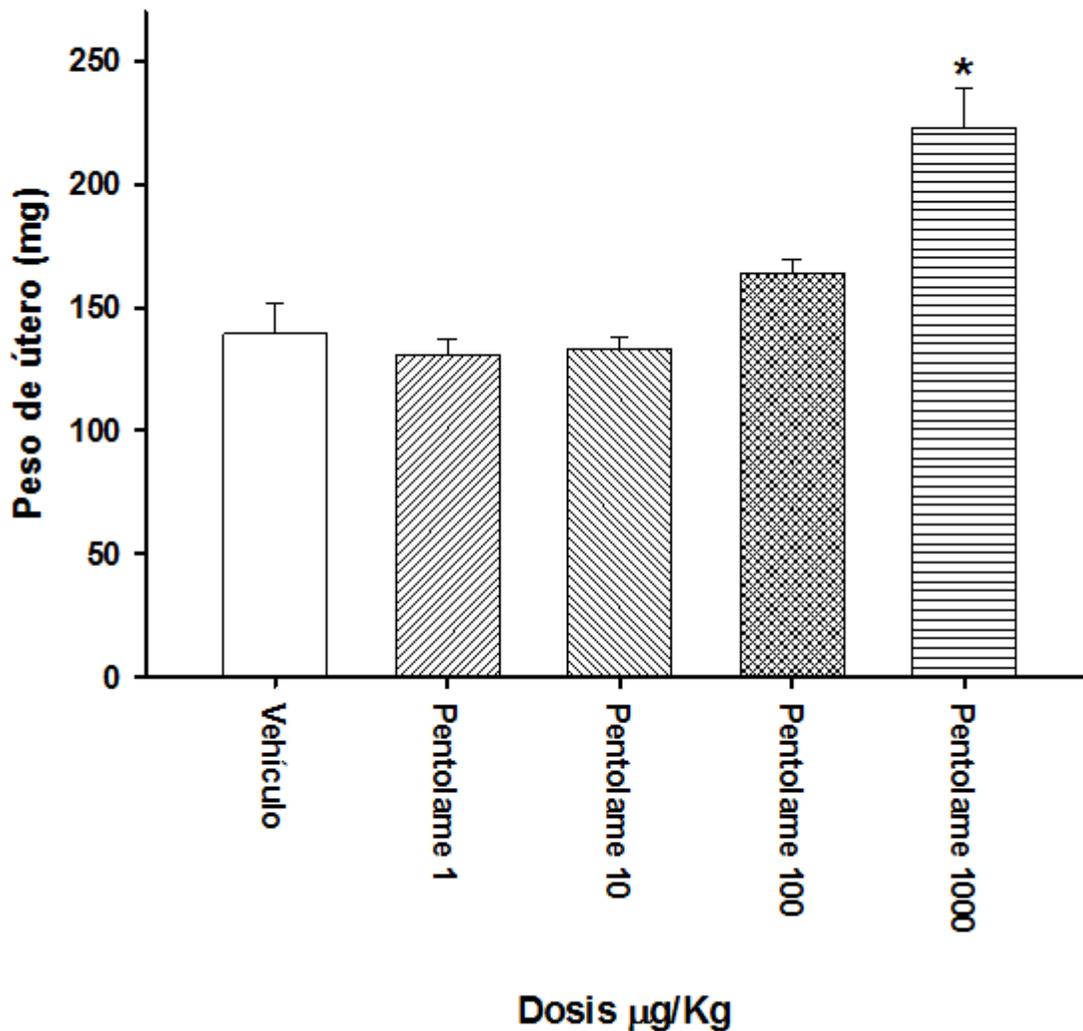


Figura 8. Efecto del 17β -aminoestrógeno pentolame (1, 10, 100 y 1000 µg/Kg) sobre el peso del útero de ratas Wistar ovariectomizadas. Cada barra representa el promedio \pm EEM de tres experimentos ($n = 9-12$ ratas). Prueba de Dunnett. * $p < 0.05$ vs vehículo (100%).

10.2 Efecto del pentolame sobre marcadores hemostáticos

Anteriormente se han descrito los efectos del pentolame sobre el proceso hemostático, en este trabajo, se determinó mediante ELISA si ejercía algún efecto sobre marcadores que participan en este proceso, como son el fibrinógeno y el factor tisular.

10.2.1 Fibrinógeno

Como se muestra en la Figura 9, los resultados mostraron que el pentolame produjo una disminución del fibrinógeno en todas las dosis administradas, en un intervalo de entre 25 y 35%.

En las dosis de 1 y 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, la respuesta disminuyó 25% con respecto al vehículo, en la dosis de 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ el porcentaje se redujo 35% mientras que en la última dosis, 28%. No se observó un efecto dosis-dependiente ni una diferencia significativa en los datos posiblemente debida a la dispersión de los datos.

10.2.2 Factor tisular

El efecto del pentolame sobre el factor tisular se muestra en la Figura 10, en esta se observa una tendencia al incremento en el porcentaje de respuesta a la dosis de 1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (50%), 10 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (30%), 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (20%) y 1000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ (22%). Cabe señalar que el aumento de la respuesta no fue estadísticamente significativo en ninguna dosis.

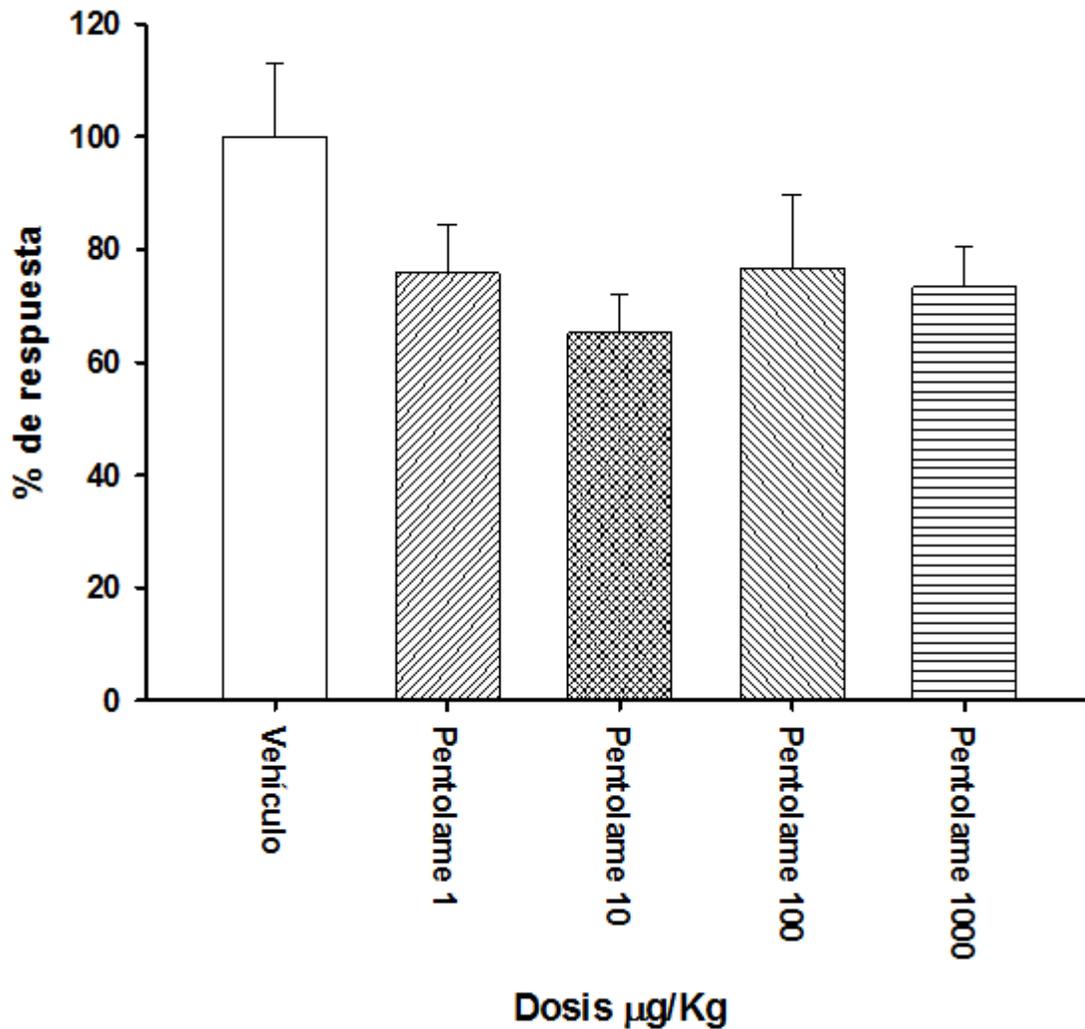


Figura 9. Efecto del 17β -aminoestrógeno pentolame (1, 10, 100 y 1000 µg/Kg) sobre el fibrinógeno. Cada barra representa el promedio \pm EEM de tres experimentos (9-12 ratas por lote) por duplicado. Prueba de Dunnett. * $p < 0.05$ vs vehículo (100%).

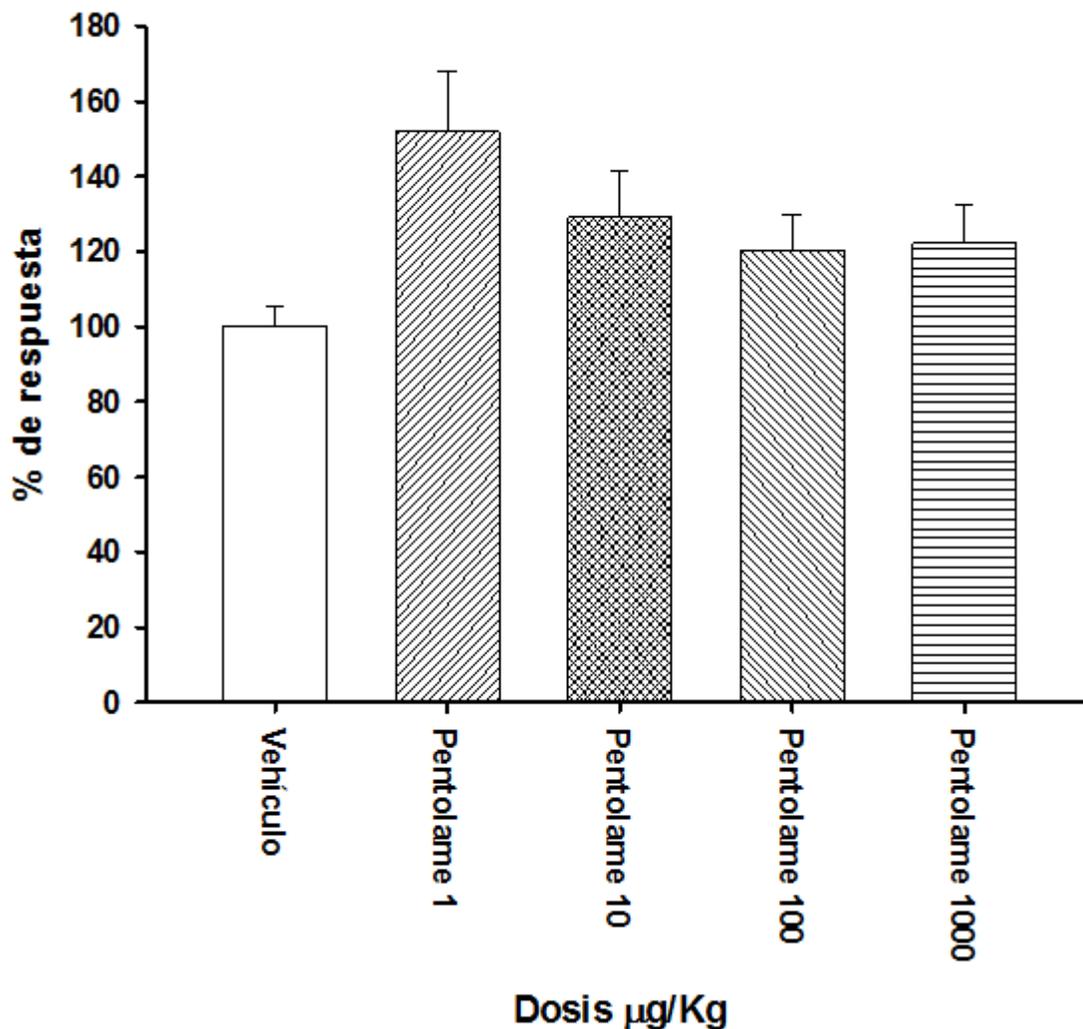


Figura 10. Efecto del 17β-aminoestrógeno pentolame (1, 10, 100 y 1000 µg/Kg) sobre el factor tisular (TF). Cada barra representa el promedio ± EEM de tres experimentos (9-12 ratas por lote) por duplicado. Prueba de Dunnett. *p<0.05 vs vehículo (100%).

10.3 Efecto del pentolame sobre marcadores fibrinolíticos

10.3.1 Plasminógeno

Respecto al efecto de la administración de pentolame sobre el plasminógeno, la figura 11 muestra una disminución significativa de un 30, 27 y 24% al administrar las dosis de 1, 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de pentolame, respectivamente, pero no a la dosis de 1000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$, ya que el porcentaje de respuesta sólo disminuyó alrededor de 3% con respecto al grupo control.

10.3.2 Inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1

El efecto producido en el PAI-1 al administrar pentolame (Figura 12) no corresponde a un efecto dosis dependiente, pero se observa que la respuesta disminuye en todos los lotes de animales administrados con el fármaco (el porcentaje de respuesta para este marcador disminuyó entre 20 y 30%). A pesar de ser esto notable en la gráfica, no es una disminución significativa en ninguna de las dosis que puede atribuirse a la dispersión de los datos.

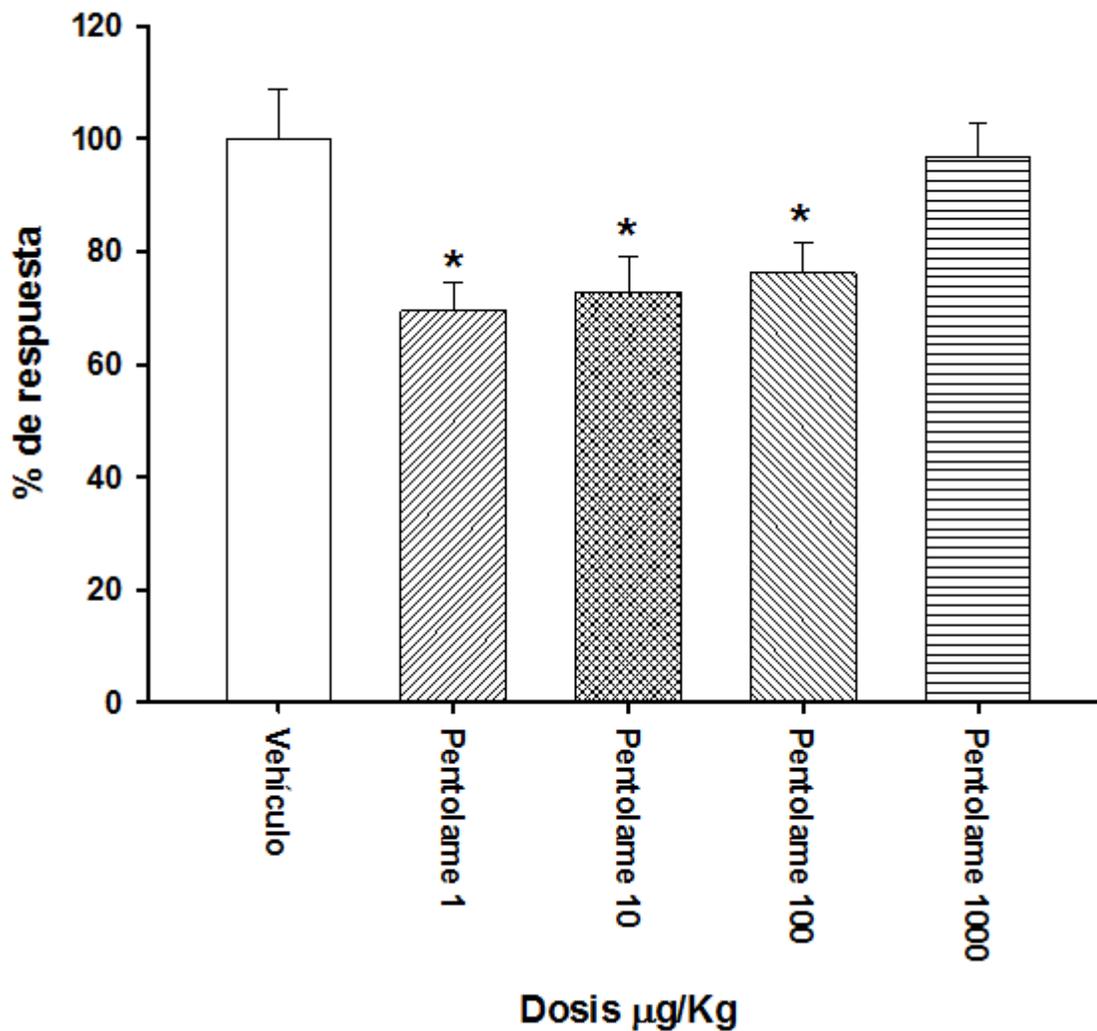


Figura 11. Efecto del 17β-aminoestrógeno pentolame (1, 10, 100 y 1000 µg/Kg) sobre el marcador de plasminógeno. Cada barra representa el promedio ± EEM de tres experimentos (9-12 ratas por lote) por duplicado. Prueba de Dunnett. *p<0.05 vs vehículo (100%).

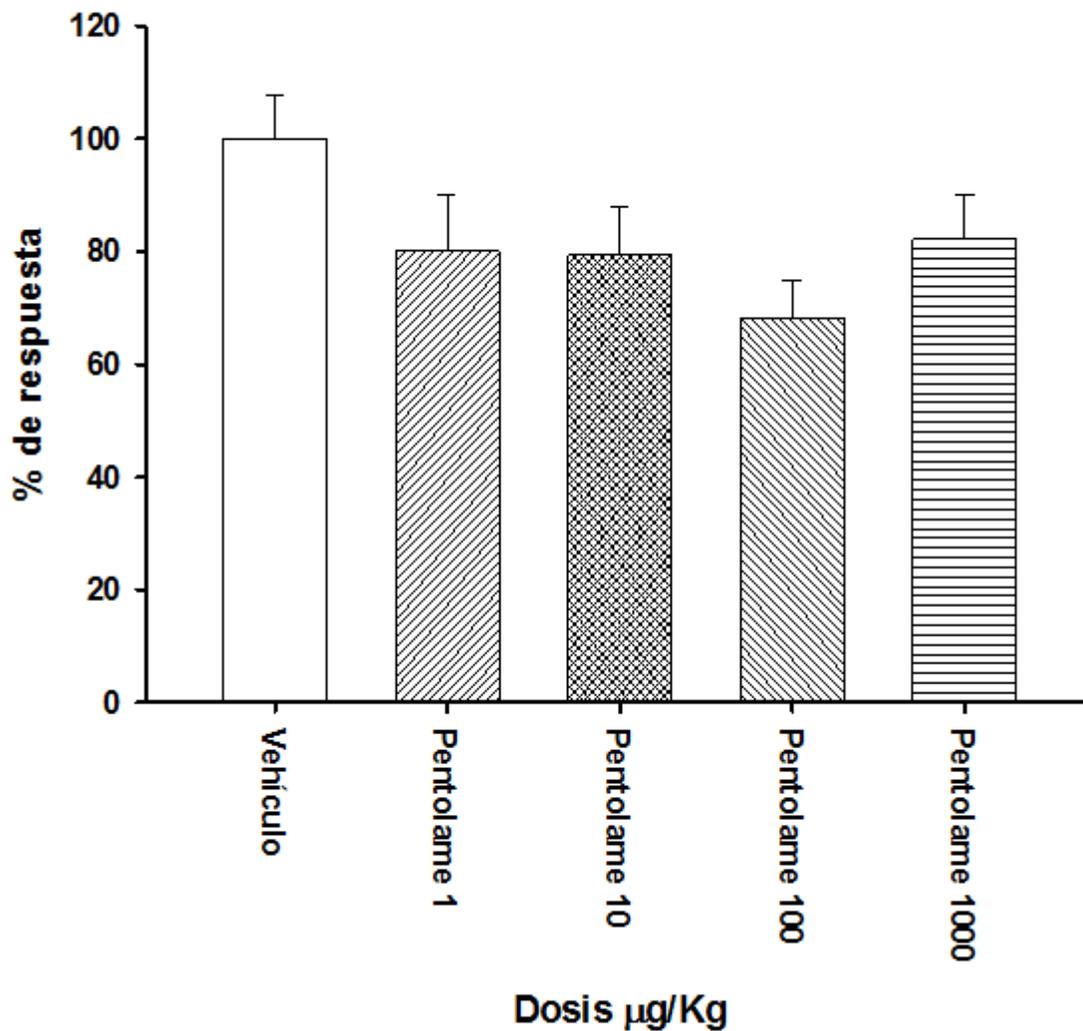


Figura 12. Efecto del 17β-aminoestrógeno pentolame (1, 10, 100 y 1000 µg/Kg) sobre el inhibidor del activador de plasminógeno tipo 1 (PAI-1). Cada barra representa el promedio ± EEM de tres experimentos (9-12 ratas por lote) por duplicado. Prueba de Dunnett. * $p < 0.05$ vs vehículo (100%).

10.4 Efecto del pentolame sobre marcadores inflamatorios

Para evaluar los posibles efectos del pentolame en el proceso inflamatorio, se determinó su efecto a diferentes dosis sobre la interleucina 1β así como el factor de necrosis tumoral α .

10.3.1 Interleucina 1β (IL- 1β)

El efecto producido por el fármaco en el marcador de inflamación, IL- 1β , se indica en la Figura 13, en esta, se aprecia que el porcentaje de respuesta disminuyó significativamente en un 20, 27 y 35% en las dosis de 1, 10 y 100 $\mu\text{g/Kg}$, respectivamente, mientras que a la dosis de 1000 $\mu\text{g/Kg}$ se redujo en un 21%, sin embargo, este último no fue estadísticamente significativo.

10.3.2 Factor de necrosis tumoral α (TNF- α)

Con respecto al TNF- α , también se obtuvo un gráfica en la que se observa una dosis-dependencia como se muestra en la figura 14, en este caso hay un incremento del 45% en la respuesta de la primera dosis (1 $\mu\text{g/Kg}$) que va disminuyendo (40, 35%) en las siguientes (10 y 100 $\mu\text{g/Kg}$) hasta alcanzar los valores del vehículo en la última dosis. Estadísticamente, al ser comparados los lotes de las administraciones de pentolame con el vehículo, el efecto es significativo a las dosis de 1 y 10 $\mu\text{g/Kg}$.

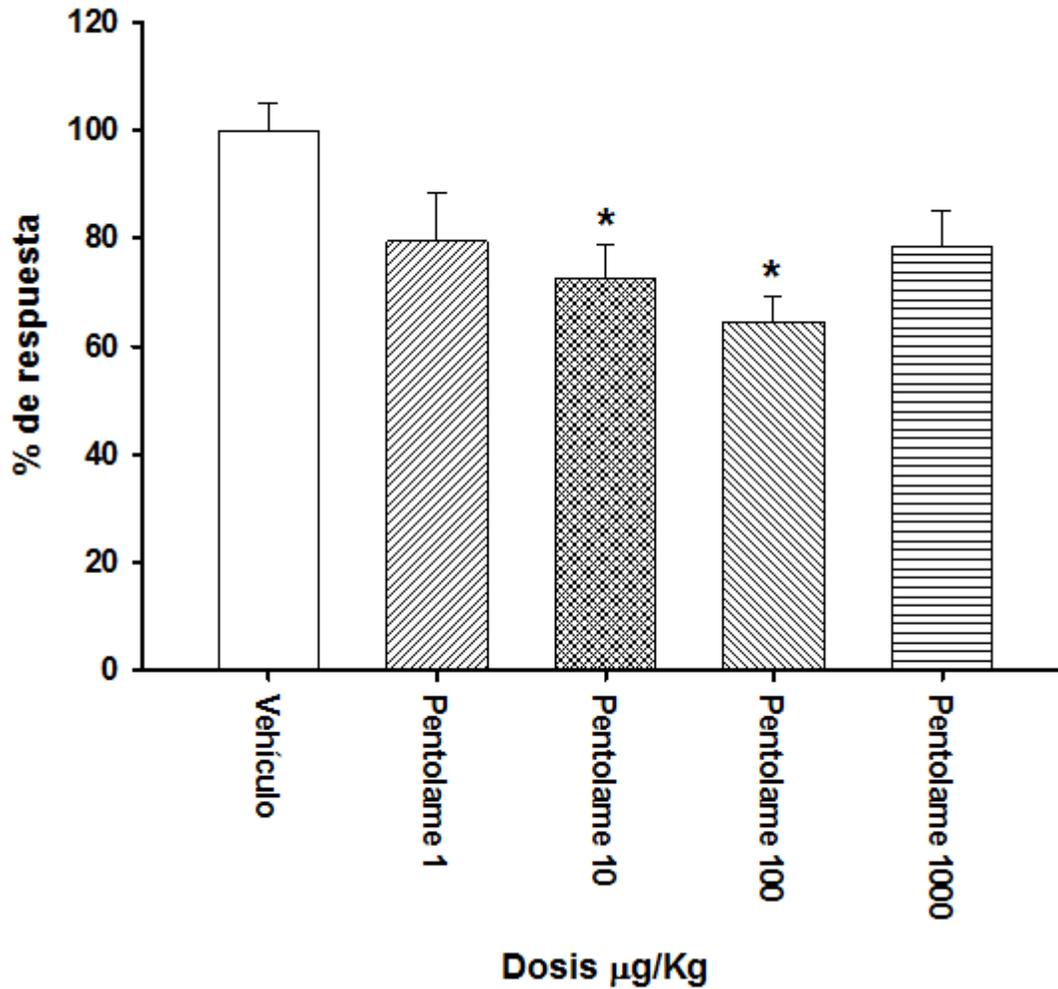


Figura 13. Efecto del 17β-aminoestrógeno pentolame (1, 10, 100 y 1000 µg/Kg) sobre la interleucina 1β (IL-1β). Cada barra representa el promedio ± EEM de tres experimentos (9-12 ratas por lote) por duplicado. Prueba de Dunnett. *p<0.05 vs vehículo (100%).

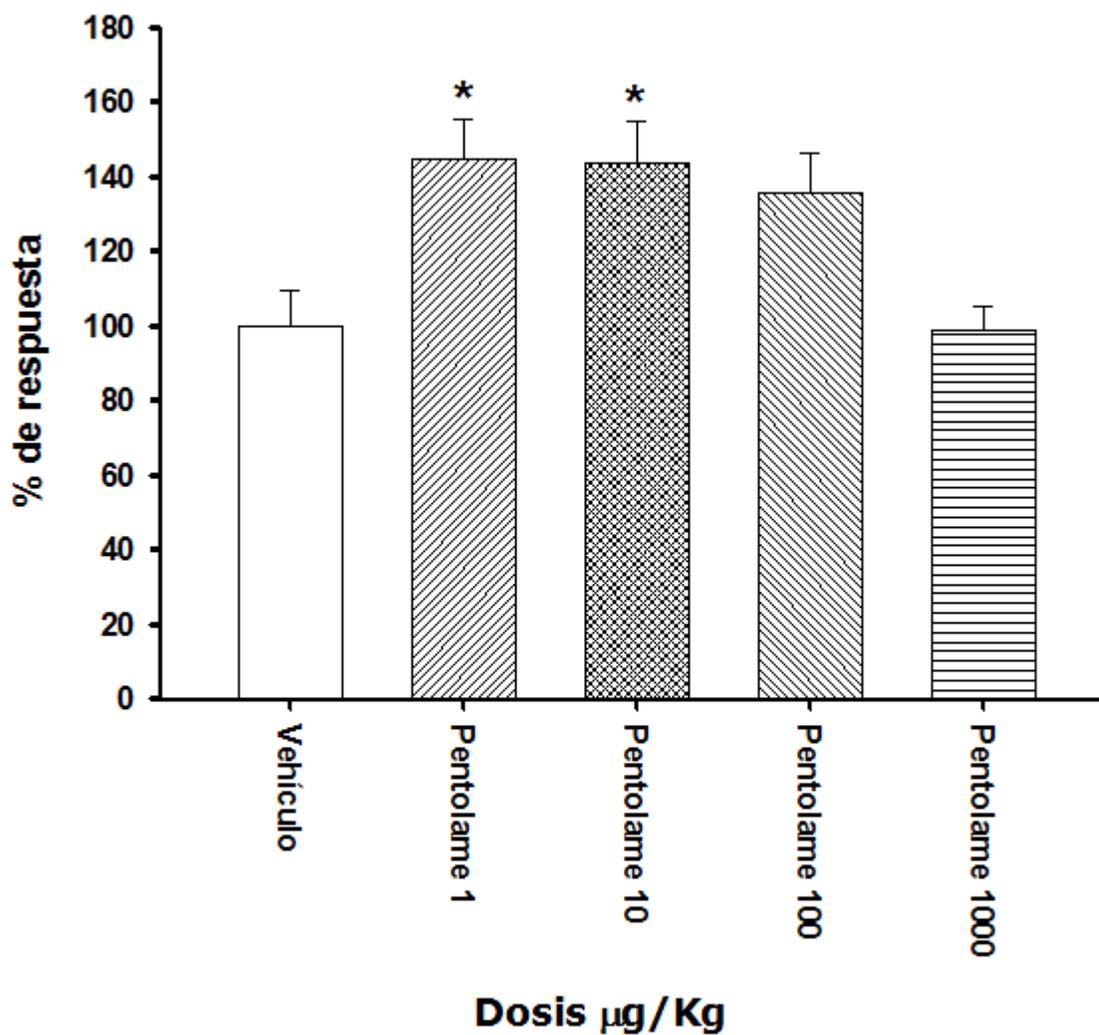


Figura 14. Efecto del 17β-aminoestrógeno pentolame (1, 10, 100 y 1000 µg/Kg) sobre el factor de necrosis tumoral α (TNF-α). Cada barra representa el promedio ± EEM de tres experimentos (9-12 ratas por lote) por duplicado. Prueba de Dunnett. *p<0.05 vs vehículo (100%).

11 DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluó el efecto de un nuevo fármaco, pentolame, sobre los sistemas que participan en procesos trombogénicos como son el sistema hemostático, fibrinolítico e inflamatorio.

Estudios anteriores han demostrado mediante pruebas *in vivo*, que los 17β -aminoestrógenos: prolame, butolame y pentolame, poseen efectos estrogénicos al ser comparados con estradiol (Lemini, Franco, Ávila, & Jaimez, 2005) (Lemus, et al., 1998). Como control de estrogenicidad del fármaco en estudio se comprobó su capacidad para revertir la uterotrofia en ratas ovariectomizadas. Los resultados obtenidos (figura 8) muestran un efecto significativo en la dosis de 1000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ y la tendencia de la gráfica en los diferentes tratamientos señalan un efecto dosis-dependiente en modelos con ratas, aunque en un estudio reciente se ha comprobado que el modelo en ratón muestra mayor susceptibilidad al **administrarse diferentes 17β -aminoestrógenos** (Lemini, Franco, Avila, & Jaimez, 2005)

De igual forma, anteriormente ha quedado demostrado que los vasos sanguíneos son un blanco de acción de los estrógenos debido a que existen receptores de estrógenos en el tejido endotelial (Khalil, 2013). Al ser, el pentolame, un estrógeno sintético que se une a estos receptores (Jaimez, et al., 2000) puede afectar algún proceso hemostático y por lo tanto, relacionarse con procesos fibrinolíticos e inflamatorios.

Estudios *in vivo* han demostrado que la administración de 17β -aminoestrógenos provoca un efecto contrario al 17β -estradiol en la coagulación (Lemus, et al., 1998), específicamente el pentolame, ha sido evaluado en mayores dosis y mayor tiempo de administración en roedores y a pesar de poseer un efecto estrogénico menor al de otros aminoestrógenos, es el que mayor efecto anticoagulante posee al

aumentar en mayor grado el tiempo de coagulación (Lemini, Franco, Avila, & Jaimez, 2005).

Se conoce que los estrógenos orales como el etinilestradiol afectan algunos de los componentes de la cascada de la coagulación como los factores VII, VIII y X, el fibrinógeno, el activador tisular del plasminógeno, el plasminógeno y el PAI-1. (Mammen, 2000). Por lo anterior, el efecto del pentolame se ha evaluado en marcadores hemostáticos como son el factor tisular y el fibrinógeno, ambos importantes para la construcción de la red de fibrina en el proceso de coagulación. En estudios publicados se ha observado que la administración de pentolame (4 mg/100 g) en ratas macho por vía s.c. ha provocado un aumento significativo en los niveles de fibrinógeno y tiempos de coagulación (García Manzano, et al., 2002). En este estudio y como se observa en la figura 9, los niveles de fibrinógeno se redujeron hasta en un hasta en un 35% mientras que en el factor tisular (figura 10) hubo un incremento del porcentaje de respuesta de entre 20 y 50%, al ser el primero, un precursor de la fibrina, y el segundo un factor que al ser expuesto al torrente sanguíneo activa la vía extrínseca de la coagulación, los resultados pueden señalar un efecto inhibitorio de la vía intrínseca de la coagulación; sin embargo, la variabilidad de los datos no hizo posible observar significancia estadística.

En el sistema fibrinolítico, el plasminógeno es el precursor inactivo de la plasmina, enzima encargada de la degradación del coágulo de fibrina, mientras que el inhibidor del activador del plasminógeno-1 (PAI-1) se encarga de inhibir la fibrinólisis, su aumento ha sido asociado con el riesgo de enfermedades cardiovasculares en mujeres post-menopáusicas ante la ausencia de estrógenos y su disminución se encontró al estudiarse en terapia con estrógenos conjugados (Ridker, 1997) (Koh, et al., 1997).

En estudios reportados, se ha encontrado que la expresión del gen de plasminógeno está regulada por estrógenos a través de los ERE (Kobelt, Klammt, Tefs, & Schuster, 2013). En los resultados obtenidos en este experimento, se obtuvo una disminución del marcador de plasminógeno y PAI-1, en el primer caso el efecto inhibitorio fue menor al incrementar las dosis, mientras que en el PAI-1 la inhibición se observa en todas las dosis pero si llegar a ser un efecto estadísticamente significativo lo que puede deberse a un efecto débil del fármaco o a la variabilidad biológica, sin embargo, en la figura 12 también se observa una tendencia que puede llegar a ser significativa si se aumenta el número de animales.

Los procesos inflamatorio y de coagulación se encuentran vinculados a la patología de enfermedades vasculares en donde los mediadores inflamatorios como las citocinas pueden alterar la coagulación y viceversa. La activación de la coagulación a través del sistema inflamatorio se lleva a cabo a través de la inducción de la expresión del FT, el sistema de la proteína C y la inhibición de la fibrinólisis. Específicamente, el factor tisular se ve afectado por el estímulo directo de las citocinas pro-inflamatorias, TNF- α e IL-1 (Petäjä, 2011).

En este trabajo, los resultados señalan una disminución significativa de la IL-1 β y un aumento del TNF- α , en el último caso, el mayor efecto observado es a la dosis de 1 $\mu\text{g}/\text{Kg}$ de pentolame y posteriormente al incrementar la dosis el efecto fue disminuyendo. Para el caso de la IL-1 β , el efecto es dosis dependiente pero se observa una disminución del porcentaje de respuesta con respecto al vehículo desde la primera dosis.

Estudios *in vivo* demuestran que las cantidades de fibrinógeno se ven incrementadas, el fibrinógeno altera la respuesta inflamatoria a través de su interacción con leucocitos (Ligando entre la molécula de adhesión

intercelular-1 MAI-1), aumenta la interacción entre monocitos y células endoteliales así como la agregación plaquetaria.

12 CONCLUSIONES

El pentolame provoca efectos estrogénicos dependientes de la dosis (1-1000 $\mu\text{g}/\text{Kg}$) en ratas hembra Wistar ovariectomizadas.

El pentolame puede ejercer efectos sobre los marcadores hemostáticos disminuyendo los niveles de fibrinógeno y aumentando los de factor tisular.

El tratamiento con pentolame ejerce efectos sobre el sistema fibrinolítico al disminuir la respuesta de los marcadores de plasminógeno y PAI-1.

El pentolame demostró tener efectos anti-inflamatorios al inhibir la respuesta de la citocina pro-inflamatoria IL-1 β y, a su vez, modificar la respuesta de la citocina TNF- α con un efecto dosis-dependiente.

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que el 17 β -aminoestrógeno, pentolame, provoca efectos en el sistema hemostático (como ya se ha encontrado en anteriores estudios), sistema fibrinolítico e inflamatorio, lo que da la pauta para ampliar el perfil de este fármaco en estudio de fase pre-clínica con la posibilidad de llegar a tener una nueva opción de terapia hormonal.

13 REFERENCIAS

- Amado, J., & Florez, J. (2014). Hormonas sexuales: estrógenos, gestágenos, andrógenos y anticonceptivos hormonales. In J. Florez, *Farmacología Humana* (pp. 803-823). España: Elsevier Masson.
- Anderson, E. (2002). The role of oestrogen and progesterone receptors in human mammary development and tumorigenesis. *Breast Cancer Res*, 4, 197-201.
- Aronica, S., Kraus, W., & Katzenellenbogen, B. (1999). Estrogen action via the cAMP signaling pathway: stimulation of adenylate cyclase and cAMP-regulated gene transcription. *PNAS*, 91, 8517-8521.
- Ávila, M., García, S., Reyes, M., Antuna, S., & Lemini, C. (2009). Effect of the 17 β -aminoestrogen pentolame on bone mineral levels in ovariectomized rats. *Proc West Pharmacol Soc*, 52, 43-46.
- Birken, S., O'Connor, J., Kovalevskaya, G., & Lobel, L. (2000). *Gonadotropins and Menopause: New Markers*, In *Menopause*. San Diego: Academic Press.
- Björnström, L., & Sjöberg, M. (2005). Mechanisms of estrogen receptor signaling: convergence of genomic and nongenomic actions on target genes. *Molecular Endocrinology*, 19(4), 833-842.
- Blümel, J., Hernández, J., & Motta, E. (2006). Age at menopausal in Latin America. *Menopause*, 13, 706-712.
- Brunton, L. (2011). *Goodman & Gilman. Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica* (12 ed.). Mc Graw Hill.
- Canonico, M., Oger, E., Plu-Bureau, G., Conard, J., Meyer, G., & Lévesque, H. (2007). Hormone therapy and venous thromboembolism among postmenopausal women: Impact of the route of estrogen administration and progestogens: The ESTHER study. *Circulation*, 115(7), 840-845.
- Casanueva, F., Vázquez, J., & Gaztambide, S. (1995). *Endocrinología Clínica*. Madrid: Díaz de Santos.
- De la Peña, A., Baños, G., Izaguirre, R., Mandoki, J., & Fernández, J. (1993). Comparative effect of synthetic aminoestrogen with estradiol on platelet aggregation. *Steoids*, 58(9), 407-409.
- Deborah, G., & Barrett, E. (2012). Menopause. En L. Goldman, & A. Schafer, *Goldman-Cecile Medicine* (24 ed., Vol. 2, págs. 1565-1571). Elsevier.
- Filippo, A., & Rakesh, K. (2006). Signaling regulation of genomic and nongenomic functions of estrogen receptors. *Cancer Letters*, 238(1), 1-14.

Franco, Y., Mendoza, & Lemini, C. (2003). Mecanismos de acción de los efectos protectores de los estrógenos. *Rev FacMed UNAM*, 46(3), 101-108.

García Manzano, A., González, J., Jaimez, J., Franco, Y., Ávila, M., Rubio-Póo, C., & Lemini, C. (2002). Changes on hemostratic parameters induced by 17 β -estradiol, ethinylestradiol and the 17 β -aminoestrogen pentolame in the male Wistar rat. *Steroids*, 67, 1129-1135.

Gómez, E., Larrea, F., & Martínez, F. (2012). Vías de señalización asociadas a la esteridogénesis. *Rev Esp en Ciencias Químico-Biológicas*, 15(1), 24-36.

Guía de Práctica Clínica. (2010). *Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad tromboembólica venosa*. México: Secretaría de Salud.

Harvey, R., Champe, P., & Finkel, R. (2009). *Farmacología* (4 ed.). Lippincott Williams & Wilkins.

Heldring, N., Pike, A., & Andersson, S. (2007). Estrogen receptors: How do they signal and what are their targets. *American Physiol Society*, 87(3), 905-931.

Hillier, S. (1991). Regulation of follicular oestrogen biosynthesis: a survey of current concepts. *J Endocrinol*, 89, 3-18.

Ibañez, T., & Potau, V. (2007). Ovario: estrógenos, gestágenos, andrógenos, globulina fijadora de hormonas sexuales, inhibinas y cariotipo. *Endocrinol Nutr*, 54(3), 174-181.

Ignar-Trowbridge, D., Nelson, K., Bidwell, M., Curtis, S., Washburn, T., McLachlan, J., & Korach, K. (1992). Coupling of dual signaling pathways: epidermal growth factor action involves the estrogen receptor. *Proc Natl Acad Sci*, 10(46), 58-62.

Jaimez, R. (2001). Efectos anticoagulante y estrogénico de los 17beta-aminoestrógenos prolame, butolame y pentolame en la rata ovariectomizada. (Tesis doctoral). Departamento de Farmacología, Universidad Nacional Autónoma de México.

Jaimez, R. (17 de Agosto de 2015). *Mensaje bioquímico*. Obtenido de http://bq.unam.mx/wikidep/uploads/MensajeBioquimico/Mensaje_Bioq13_V37p261-274_Ruth_Jaimez.pdf

Jaimez, R., Cooney, A., Jackson, K., Lemus, A., Lemini, C., Cárdenas, M., Larrea, F. (2000). In vivo estrogen bioactivities and in vitro estrogen receptor binding and transcriptional activities of anticoagulant synthetic 17 β -aminoestrogens. *JSBMB*, 73(1-2), 59-66.

Khalil, R. A. (2013). Estrogen, vascular estrogen receptor and hormone therapy in postmenopausal vascular disease. *Biochemical Pharmacology*, 86(12), 1627-1642.

- Klinge, C. (2001). Estrogen receptor interaction with estrogen response elements. *Nucl Acids Res*, 29(14), 2905-2919.
- Kobelt, L., Klammt, j., Tefs, K., & Schuster, V. (2013). Estrogen modulates plasminogen promoter activity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 438(1), 110-115.
- Koh, K., Mincemoyer, R., Bui, M., Csako, G., Pucino, F., Guetta, V., et.al. (1997). Effects of hormone-replacement therapy on fibrinolysis in postmenopausal women. *N Engl Med*, 683-690.
- Le Mellay, V., Grosse, B., & Lieberherr, M. (1997). Phospholipase C beta and membrane action of calcitriol and estradiol. *Journal of Biological Chemistry*, 272, 11902-11907.
- Lemini, C., Franco, Y., Avila, M., & Jaimez, R. (2005). Contrasting effects of estradiol and aminoestrogens on blood clotting time in rats and mice. *Eur J Pharmacol*, 510, 229-233.
- Lemini, C., Franco, Y., Ávila, M., & Jaimez, R. (2005). Estrogenic effects of 17 β -aminoestrogens assessed in uteri of rats and mice. *Journal of Pharmacology*, 235-239.
- Lemini, C., Jaimez, R., & Toscano, R. (2004). Confirmation of the C-17 stereochemistry of pentolame by single crystal x-ray analysis of its monohydrate. *Mexican Chemical Society*, 48(4), 249-251.
- Lemini, C., Rubio-Póo, C., Franco, Y., Jaimez, R., Avila, M., Medina, M., & Lemus, A. (2013). In vivo profile of the anticoagulant effect of 17 β -amino-1,3,5(10)estratrien-3-ol. *Eur J Pharmacol*, 700(1-3), 210-216.
- Lemus, A., Jaimez, R., Lemini, C., Menijvar, M., Silva, G., Rubio-Poo, C., . . . Larrea, F. (1998). Estrogenic effects of the synthetic aminoestrogen 17 beta-(5-hydroxy-1-pentylamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol (pentolame). *Steroids*, 63(7-8), 433-4338.
- Longo, D. (2012). *Harrison: Principios de Medicina Interna* (18 ed.). McGraw-Hill.
- Losel, R., & Wehling, M. (2003). Nongenomic actions of steroid hormones. *Cell Biol*, 4, 46-56.
- Lozano, C. (2008). Farmacología del calcio y del hueso. En P. Lorenzo, A. Moreno, I. Lizasoain, J. Leza, M. Moro, & A. Portolés, *Velazquez. Farmacología Básica y Clínica* (18a. ed.). Médica Panamericana.
- Mammen, E. (2000). Oral contraceptive pills and hormonal replacement therapy and thromboembolic disease. *Hematol Oncol Clin North Am*, 13(5), 1045-1159.

- Marino, M., Galluzzo, P., & Ascenzi, P. (2006). Estrogen signaling multiple pathways to impact gene transcription. *Current Genomics*, 7(8), 497-508.
- Montano, M., Muller, V., Trogaugh, A., & Katzenellenbogen, B. (1995). The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcriptional activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol Endocrinol*, 9, 814-825.
- Nadal, A., Díaz, M., & Valverde, M. A. (2001). The estrogen trinity: membrana, cytosolic and nuclear effects. *Physiology*, 16(6), 251-255.
- Nelson, H., Haney, E., & Humphrey, L. (2005). Management of menopause-related symptoms. *Evid Rep Technol Evaluar*, (120):1-6.
- Nilsson, S., Makela, S., & Treuter, E. (2001). Mechanism of estrogen action. *Physiol Rev*, 81, 1535-1565.
- Nissen, I., Estrada, F., Nava-Kopp, A., Irlles, C., De la Peña, A., Fernández, J., et.al. (2012). Prolame ameliorates anxiety and spatial learning and memory impairment induced by ovariectomy in rats. *Physiol Beh*, 106, 278-284.
- Norman, A., & Henry, H. (2015). *Hormones* (3a. ed.). San Diego: Academic Press.
- Palmeri, C., Cheng, G., & Saji, S. (2002). Estrogen receptor beta in breast cancer. *Endocr Relat Cancer*, 9, 1-13.
- Patiño, N. (2008). *Farmacología Médica*. México: Médica Panamericana.
- Petäjä, J. (2011). Inflammation and coagulation. *Thrombosis Research*, 127(2), 34-37.
- Ridker, P. (1997). Fibrinolytic and inflammatory markers for arterial occlusion: the evolving epidemiology of thrombosis and hemostasis. *Thromb Haemost*, 78, 53-59.
- Rossouw, J., Anderson, G., Prentice, R., LaCroix, A., Kooperberg, C., et.al. (2002). Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: Principal results from the women's health initiative randomized controlled trial. *J Am Med Assoc*, 288(3), 321-333.
- Rubio-Poo, C., Lemini, C., Silva, G., Chavez-Lara, B., Mendoza-Patiño, N., & Mandoki, J. (1983). Effects of 17h-(N,N-diethylaminoethyl)-amino-1,3,5(10)-estratrien-3-ol,. *Med Chem Res*, (7), 67-75.
- Sánchez, R., Manubens, R., & Mendoza, M. (2009). Cap. 3 La menopausia. En F. D. Ginecología, Arenas, JM; Laila, JM; Xercavins, J. Médica Panamericana.
- Shaw, Histed, & Srouji. (2010). Estrogen negative feedback on gonadotropin secretion: Evidence for a direct pituitary effect in women. *J Clin Endocrinol Metab*, 95(4), 1955-1961.

Stefan Nilsson, S. M. (2001). Mechanism of estrogen action. *American Physiol Society*, 81(4), 1535-1565.

Strauss. (2014). *Yen & Jaffe's Reproductive Endocrinology*. Saunders.

Stuar, I. (2011). *Fisiología Humana* (12a. ed.). Madrid, España: McGraw-Hill.

Tora, L., Blanco, J., & Brou, C. (1990). The human estrogen receptor has two independent nonacidic transcriptional activation functions. *Cell*, 59, 477-487.

Tresguerres, J., & Castillo, C. (2005). Fisiología del eje hipotálamo-hipófiso-ovárico. En J. Tresguerres, et.al, *Fisiología Humana* (3 ed., págs. 1007-1023). Mc Graw Hill.

Truss, M., & Beato, M. (1993). Steroid hormone receptors: interaction with deoxyribonucleic acid and transcription factors. *Endocrine*, 14, 459-479.

ANEXO 1

Asistencia a Congreso



**XIX Congreso Estudiantil de Farmacología
"Dr. Rafael Méndez Martínez"**

Otorga Constancia y Agradecimiento a:

Perla Roas Roa

Por su participación como:

ASISTENTE

Ciudad de México, D. F., a 6 de noviembre de 2015.


Dra. Rosa Amalia Bobadilla Lugo
Presidenta de la
Asociación Mexicana de Farmacología A. C.
2015 a 2017


Dr. Marco A. Matinez Ríos
Presidente Honorario del Congreso y
Director del Instituto Nacional de Cardiología
"Dr. Ignacio Chávez"


Dr. Enrique Hong Chong
Secretario Ejecutivo de la Asociación Mexicana de Farmacología A. C.



**XIX Congreso Estudiantil de Farmacología
"Dr. Rafael Méndez Martínez"**

Otorga Constancia y Agradecimiento a:

**Perla Rosas Roa, Cristina Lemini Guzmán, Rosa Nallely Fuentes Fonseca,
Ruth Jaimez Melgoza**

Por su participación como Ponente(s) del Trabajo Libre titulado:

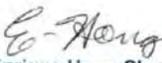
Efectos antiinflamatorios del 17-aminoestrógeno pentolame

Inscrito en la categoría de Investigación Experimental de Pregrado con el tema
Sistema endócrino

Ciudad de México, D. F., a 6 de noviembre de 2015.


Dra. Rosa Amalia Bobadilla Lugo
Presidenta de la
Asociación Mexicana de Farmacología A. C.
2015 a 2017


Dr. Marco A. Matinez Ríos
Presidente Honorario del Congreso y
Director del Instituto Nacional de Cardiología
"Dr. Ignacio Chávez"


Dr. Enrique Hong Chong
Secretario Ejecutivo de la Asociación Mexicana de Farmacología A. C.

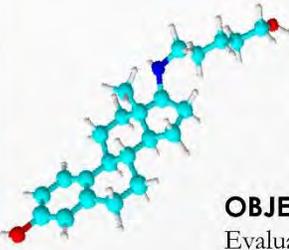


EFFECTOS PRO Y ANTIINFLAMATORIOS DEL 17 β -AMINOESTRÓGENO PENTOLAME

Facultad de Medicina



Perla Rosas Roa, Rosa Nallely Fuentes Fonseca, Cristina Lemini Guzmán, Ruth Jaimez Melgoza.
Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina.



INTRODUCCIÓN

El 17 β -aminoestrógeno pentolame a diferencia del estradiol produce efectos anticoagulantes en modelos animales. En el presente trabajo exploramos el efecto del pentolame sobre la respuesta inflamatoria que está relacionada con la hemostasia.

OBJETIVO

Evaluar el efecto *in vivo* del pentolame sobre la respuesta inflamatoria.

HIPOTESIS

El pentolame produce efectos sobre marcadores biológicos que participan en la respuesta inflamatoria.

MÉTODOS



RESULTADOS

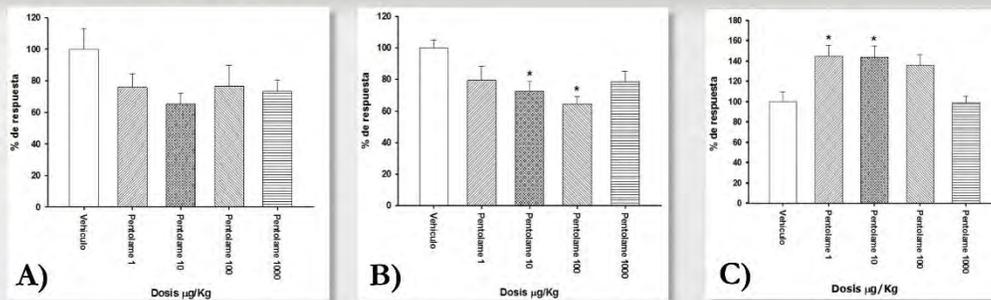


Figura. Efecto del 17 β -aminoestrógeno pentolame (1, 10, 100 y 1000 μ g/Kg) sobre marcadores inflamatorios. A) Fibrinógeno, B) IL-1 β , C) TNF- α . Cada barra representa el promedio \pm EEM de tres experimentos (9-12 ratas por lote) por duplicado. Prueba de Dunnett. * $p < 0.05$ vs vehículo (100%).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos en el presente trabajo demuestran que el pentolame tiene efectos anti-inflamatorios al inhibir la respuesta del fibrinógeno y la citocina IL-1 β , pero también pro-inflamatorios al aumentar la respuesta de la citocina TNF- α .

REFERENCIAS

- Lemini, C., Jaimez, R., & Tovar, R. (2004). Confirmation of the C-17 stereochemistry of pentolame by single crystal x-ray analysis of its monohydrate. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 48(4), 249-251.
- Jaimez, R. (2001). Efectos anticoagulante y estrogénico de los 17beta-aminoestrógenos prolamé, butolame y pentolame en la rata ovariectomizada. (Tesis doctoral). Departamento de Farmacología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Lemini, C., Ruíz-Pérez, C., Fuentes, V., Jaimez, R., Avila, M., Medina, M., & Lemus, A. (2013). In vivo profile of the anticoagulant effect of 17 β -amino-L3,5(10)estratrien-3-ol. *Exp J Pharmacol*, 700(1-3), 210-216.

Agradecimientos
Facultad de Medicina, UNAM.