

11261
Eej
7

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE MEDICINA

**SINTESIS QUIMICA Y ENSAYO BIOLÓGICO DE
MONOESTERES Y DIESTERES DE ESTRADIOL
CON ACIDOS GRASOS DE CADENA LARGA
(PALMITATO, OLEATO Y ESTEARATO).**

T E S I S

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

(BIOLOGÍA MOLECULAR)

P R E S E N T A

MARCO AURELIO VAZQUEZ ALCANTARA

FALLA DE ORIGEN

MÉXICO, D. F.

1988



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.

INDICE

Introduccion.....	1
Objetivos.....	2
Material y Metodos.....	3
Resultados.....	9
Conclusion y Discusion.....	27
Perspectivas del trabajo.....	33
Referencias.....	35

INTRODUCCION

El estradiol es la hormona sexual femenina que participa en diversos eventos metabolicos, fundamentalmente en el area de la biologia de la reproduccion. Perteneca al grupo generico de los esteroides, cuyo sustrato quimico comun es el ciclopentano perhidrofenantreno; en 1922 Allen y Doisy (1) extraen y purifican parcialmente un potente estrogeno del liquido folicular. El cual Butenandt (2), y Doisy (3), lo purifican, al que denominarian estrina y foliculina respectivamente. Sin embargo esta molecula seria llamada estrona en 1930 por Collip. Browne (4) aisla el estriol del tejido placentario y no es sino hasta mediados de los 30s que el estradiol fue identificado por Mac Corquodale (5). A partir de esta fecha innumerables estudios se han llevado a cabo con la molecula del estradiol el mas potente de los tres estrogenos.

Posteriormente Miescher (6-7), modifico quimicamente la molecula del E2 al esterificar acidos grasos en uno o ambos grupos hidroxilos, estos nuevos compuestos poseen un efecto biologico mas prolongado que la hormona sola. Junkman (8) encontro una relacion directa entre la longitud de la cadena y la duracion del efecto estrogenico obtenido.

En 1977 Hochberg (9-11) aisla de suprarrrenales de bovino un derivado lipoidico esteroidal del cual forman parte esteres de pregnenolona, tambien identifico un compuesto que

parte importante de dicho derivado lipoidico, esterios de estradiol los cuales fueron aislados en diferentes especies animales incluyendo al humano (12-15).

El hecho de obtener un efecto prolongado al esterificar acidos grasos al estradiol lo presenta como un topico sumamente atrayente desde el punto de vista farmacologico, asi como un medio para tratar de resolver el mecanismo de accion este derivado responsable de este efecto.

OBJETIVOS

En esta tesis se plantean los siguientes objetivos:

- 1.- Sintetizar quimicamente la serie de esterios de estradiol con cada uno de los siguientes acidos grasos:
Estearico Oleico y Palmitico.
 - a) Monoesterios en C-3
 - b) Monoesterios en C-17
 - c) Diesterios

- 2.- Evaluar la pureza de los compuestos obtenidos utilizando los siguientes parametros:
 - a) Resonancia Magnetica Nuclear

- b) Espectroscopia en Infrarojo
- c) Espectroscopia en Ultravioleta
- d) Cronatografia en Placa Fina
- e) Punto de Fusion

3.- Evaluar la accion biologica estrogenica, de los esteroides sintetizados utilizando el modelo animal de experimentacion de la rata ovariectomizada de acuerdo a los siguientes parametros:

- a) Efecto organotrofico
- b) efecto Antigonadotropico
- c) Concentraciones Plasmaticas de Estradiol

MATERIAL Y METODOS:

Sintesis quimica:

Se utilizaron los siguientes reactivos: estradiol-17B-(1,3,5 (10)-estratrien-3,17B diol), estrona (1,3,5,(10)-estratrien-3 ol) comprados a Syntex Mexico. los acidos grasos: palmítico (acido hexadecanoico 16:0), estearico (acido octadecanoico 18:0) y oleico (acido cis-9-octadecenoico 18:1) se obtuvieron de Sigma Co. (St. Louis Mo. USA) El benzoato de estradiol y el enantato de estradiol fueron unados por Aplicaciones Farmaceuticas de Mexico. El cloruro de tionilo fue obsequiado por Bayer de Mexico.

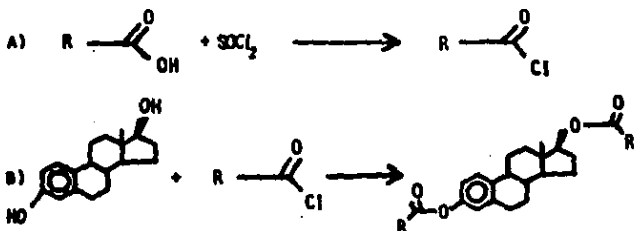
Los puntos de fusion de los esteres de estradiol solidos fueron determinados en un aparato Fisher-Johns. Los espectros en infrarojo se obtuvieron en un espectrometro de infrarojo 599B Perkin Elmer. El espectro de resonancia magnetica nuclear fue obtenido en un espectrometro EM390 y el barrido de ultravioleta se obtuvo de un espectrometro ultravioleta SP Unicam 1800.

El procedimiento general para la sintesis quimica del cloruro del acido consistio en un sistema seco de 5 mL de cloruro de tionilo destilado al cual se le adiciono 1 g del acido graso correspondiente previamente disuelto en benceno seco. La mezcla se puso a reflujar por un lapso de 24 hrs. y el excedente tanto del cloruro de tionilo como del benceno fueron evaporados bajo condiciones de presion reductora. Posteriormente el cloruro del acido fue purificado por destilacion al vacio; el esquema general de la sintesis quimica se muestra en la figura 1.

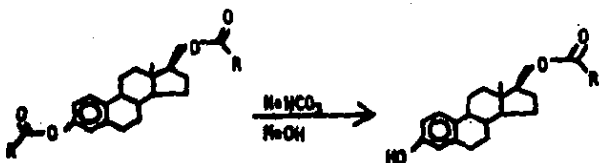
El estradiol-17B fue esterificado con cada uno de los acidos grasos correspondientes en ambos hidroxilos libres para obtener el di ester de la siguiente manera: 200 mg de estradiol-17B fueron disueltos en 10 mL de piridina anhidra y agregados a un matraz que contenia el cloruro del acido y la mezcla fue agitada por un tiempo de 20 h, de acuerdo a la tecnica descrita previamente (16). La mezcla de la reaccion fue lavada con dos porciones de 50 mL de hexano y filtrada para remover el precipitado, asi el

FIGURA 1

1) FORMACION DEL DIESTER DE ESTRADIOL

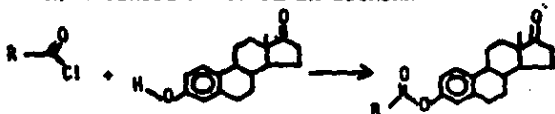


2) HIDROLISIS DEL DIESTER PARA FORMAR EL MONOESTER EN 17β

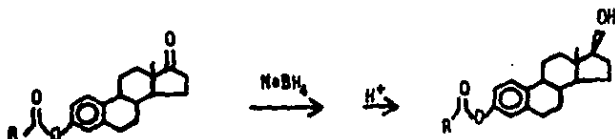


3) SINTESIS DEL MONOESTER DE ESTRADIOL EN 3-β

A) ESTERIFICACION DE LA ESTRONA



B) REDUCCION DEL 17-CETO



filtrado fue evaporado y purificado en una columna de silica gel G-60 (Merck Mexico) en un sistema de solventes Benceno/Hexano 50:50 (v/v.)

La sintesis de los 17 monoesteres de estradiol fue realizada mediante la hidrolisis suave de 200 mg del diester de estradiol correspondiente disuelto en 50 mL de metanol, con 100 mg de bicarbonato de sodio. El analisis por cromatografia en placa fina (TLC) demostro que la hidrolisis completa del diester se llevo a cabo en una hora, el producto fue recogido en 250 mL de eter etilico, lavado, secado y evaporado.

La sintesis de los monoesteres de estradiol en el hidroxilo del carbon 3 fue realizada con el siguiente procedimiento: 200 mg de estrona fueron adicionados al cloruro del acido para generar el monoester de estrona, siguiendo la tecnica descrita anteriormente, una vez que el ester de estrona fue obtenido, el grupo cetona del carbon 17 es reducido por medio de la adicion de borohidruro de sodio disuelto en metanol a una temperatura de 4°C. La reaccion fue seguida por TLC la cual indico una reduccion completa despues de 5 minutos, para eliminar el exceso de borohidruro de sodio se agregaron 10 mL de acido acetico, la mezcla fue diluida con agua y los monoesteres de estradiol en C-3 se extrajeron en 250 mL de eter etilico, fueron purificados y cromatografiados en una columna de silica gel.

Ensayo biológico:

Ratas adultas cepa Wistar con peso promedio entre 200-250 g fueron ovariectomizadas bilateralmente un mes antes de utilizarse en los experimentos, los animales estuvieron bajo condiciones de iluminación con ciclos de luz oscuridad y temperatura controlada, (0700-1900) h. y 20°C respectivamente, estuvieron provistas de alimento y agua ad libitum y se dejaron en ayunas 24 hrs. antes de sacrificarlas.

Los animales recibieron uno de los compuestos en una sola inyección por vía subcutánea utilizando aceite de ricino como vehículo en un volumen de 125 µl.

En un primer ensayo se evaluaron dos diésteres, estradiol dipalmitato y estradiol dioleato, así como estradiol-3-benzoato y estradiol-17-enantato como controles utilizando 1 µmol como dosis única de cada uno de los compuestos y tiempos de estudio de 3, 5, 12 y 15 días posteriores al tratamiento.

En el segundo ensayo biológico se probaron los nueve compuestos sintetizados. 3 Diésteres (Estradiol Dipalmitato EDP, Estradiol Dioleato EDO y Estradiol Diestearato EDS), 3 monoésteres en C-3 (Estradiol-3-palmitato EMP-3, Estradiol-3-oleato EMO-3 y Estradiol-3-estearato EMS-3) y 3 monoésteres en C-17 (Estradiol-17-palmitato EMP-17, Estradiol-17-oleato EMO-17 y Estradiol-17-estearato EMS-17)

asi como 3 compuestos de referencia 2 esteroides comerciales (Estradiol 3-benzoato EB-3 y Estradiol 17-anantato EE-17) y Estradiol-17B E2.

Se dividieron los animales en 4 grupos de la siguiente manera: Diesteres, monoesteres en C-3, monoesteres en C-17 y controles. Los tiempos de estudio en que fueron evaluados los efectos organotrofico y antigonadotropico asi como las concentraciones plasmaticas de E2 fueron 0,5,10,20,30 y 60 dias posteriores a la administracion de cada farmaco. Los sueros fueron almacenados a -20°C hasta que se realizaron las determinaciones hormonales.

Los reactivos para el radioinmunoanálisis de gonadotropinas fueron provistos por el Programa de distribución hormonal de pituitaria de rata NIAMDD (Baltimore MA. USA), las hormonas Luteinizante LH y Foliculo estimulante FSH fueron determinadas por la tecnica de radioinmunoanálisis de doble anticuerpo de acuerdo a los protocolos de NIAMDD. El estradiol-17B fue determinado en suero por radioinmunoanálisis especifico con antisuero provisto por la Organizacion Mundial de la Salud OMS (programa de reactivos) (17). Las determinaciones de radiactividad fueron hechas en un aparato Packard Tri-Carb 300 y auto Gama 500 (Packard Instruments). Los Coeficientes de variacion intra e inter ensayo para LH fueron de 6.3% y 8.9%, para FSH 4.0% y 9.5% y para E2 7.8% y 8.3%.

La etapa estiral en todas las ratas fue determinada por citología vaginal exfoliativa.

RESULTADOS:

Síntesis Química:

Varios métodos fueron empleados para evaluar la pureza e identidad de los derivados esteroideos sintetizados. Las propiedades físicas y químicas de los ésteres de estradiol son presentadas en las tablas 1 a 3. Los datos obtenidos en la resonancia magnética nuclear (nmr) muestra un corrimiento químico del triplete correspondiente al hidrógeno del C-17 de 3.8 a 4.9 ppm para el EDP y EDD y de 3.8 a 4.6 para el EDS, tabla 1. Similarmente los protones aromáticos sufrieron un corrimiento de 6.7-7.4 a 7.0-7.6 ppm en todos los diésteres.

La diesterificación fue determinada por espectroscopia en infrarrojo (ir) corroborando la ausencia de bandas de absorción a 3500 y 3250 cm^{-1} que corresponden a los grupos hidroxilos del estradiol-17 β . La pureza de los diésteres fue evaluada también en base a los datos de punto de fusión (m.p.) y TLC.

Las características físico-químicas de los monoésteres en C-17 muestran con el análisis de nmr un corrimiento hacia el campo químico bajo del hidrógeno en C-17 como se esperaría al esterificarse un ácido graso en C-17 y el no

corrimiento de los protones aromaticos en el espectro de nmr, confirmandose asi la esterificacion en el hidroxilo 17. La espectroscopia en infrarojo mostro la banda de absorcion a 3400 cm^{-1} la cual demuestra que solo un hidroxilo permanece. Los datos de nmr, i.r., m.p. TLC y U.V. son presentados en la tabla 2.

La tabla 3 muestran los resultados obtenidos cuando los estradiol-3-monoesteres son ensayados para valorar su pureza la resonancia magnetica nuclear muestra la permanencia de un triplete a 3.8 ppm indicando la presencia de un grupo hidroxilo en C-17, el corrimiento de los protones aromaticos de 6.7-7.0 a 6.8-7.3 ppm indicando que el esteroide fue esterificado en posicion del C-3. El espectro en infrarojo mostro que solo un hidroxilo habia quedado libre al presentar la banda de absorcion correspondiente a un alcohol, de 3400 a 3500 cm^{-1} .

TABLA I
 PROPIEDADES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS DEL DIPALMITATO
 DIOLEATO Y DIESTEARATO DE ESTRADIOL Y DEL 17- β ESTRADIOL*

METODO	DIPALMITATO DE ESTRADIOL	DIOLEATO DE ESTRADIOL	DIESTEARATO DE ESTRADIOL	17- β ESTRADIOL
	en CDCl ₃	en CDCl ₃	en CDCl ₃	en CDCl ₃ /DMSO
n.m.r. (ppm)	1.3 (s, 52 H, 26 CH ₂) 4.83 (t, j=7.5 Hz, 2 H, C-17 H) 7.0-7.2 (m, 1 H, C-2 and H-6 H) 7.55 (d, j=7.5 Hz, 1 H, C-1 H)	1.5 (s, 44 H, 22 CH ₂) 4.85 (t, j=7.5 Hz, 1 H, C-17 H) 5.46 (m, 4 H vinylic chaines) 7.0-7.15 (m, 2 H, C-2 and C-4 H)	1.25 (s, 60 H, 30 CH ₂) 4.86 (t, j=7.5 Hz, 1 H, C-17 H) 6.76-6.86 (m, 2 H, C-2 and C-4 H) 7.5 (d, j=7.5 Hz, 1 H, C-1 H)	0.8 (s, 3 H, C-18, Me) 3.8 (t, j=7.5 Hz, 1 H, C-17 H) 6.65 (m, 2 H, C-2 and C-4 H) 7.3 (d, j=7 Hz, 1 H, C-1 H)
i.r. (cm ⁻¹)	Pellet KBr 2900, 2840 1760, 1730 1660, 1170	Film CHCl ₃ 3000, 2900 1840, 1755 1730, 1130	Pellet KBr 2900, 2840 1760, 1730 1460, 1220, 1170	Pellet KBr 3500, 3250 2940, 2820 1250, 1050
u.v. (mm, in CHCl ₃)	in CHCl ₃ 275, 269	in CHCl ₃ 275, 269	in CHCl ₃ 275, 269	in CHCl ₃ 286, 280
mp (°C)	65-67	oil	71-72	173-179

Los símbolos en NMR representan: s, singulet; d, doublet;
t, triplet; m, multiplet.

TABLA 2

PROPIEDADES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS DEL 17-PALMITATO,
17-OLEATO Y 17-ESTEARATO DE ESTRADIOL Y DEL 17- β ESTRADIOL

METODO	17-PALMITATO DE ESTRADIOL	17-OLEATO DE ESTRADIOL	17-ESTEARATO DE ESTRADIOL	17- β ESTRADIOL
	en $CDCl_3$	en $CDCl_3$	en $CDCl_3$	en $CDCl_3/DMSO$
n.m.r. (ppm)	1.3 (m, 26 H, 15 CH_2) 4.7 (t, $j=7.5 H_z$, 1 H, C-17 H) 6.6 (m, 2 H, C-2, and C-4 H) 7.2 (d, $d=7.5 H_z$, 1 H, C-1 H)	1.25 (m, 22H, 11 CH_2) 4.8 (t, $j=7.5 H_z$, 1 H, C-17 H) 5.3 (m, 4 H, Vinilicos Chaines) 6.7 (m, 1 H, C-2, and C-4 H) 7.2 (d, $j=7.5 H_z$, 1 H, C-1 H)	1.2 (m, 30 H, 15 CH_2) 4.65 (t, $j=7.5 H_z$, 1 H, C-17 H) 6.8 (m, 2 H, C-2, and C-4 H) 7.1 (d, $t=7.5 H_z$, 1 H, C-1 H)	0.8 (s, 3 H, C-18, Me) 3.9 (t, $j=7.5 H_z$, 1 H, C-17 H) 6.65 (m, 2 H, C-2 and C-4 H) 7.3 (d, $j=7.5 H_z$, 1 H, C-1 H)
i.r. (cm^{-1})	Pellet KBr 3440, 2910, 2850 1710, 1630, 1350 1220, 1180, 1080	Pellet KBr 3420, 2920, 2860 2890, 1700, 1630 1495, 1380, 1250 1230	Pellet KBr 3430, 2920, 2860 1700, 1290, 1250 1260, 1160, 1010	Pellet KBr 3500, 3250 2940, 2880 1250, 1050
u.v. (Absor in nm)	in $CHCl_3$ 289-293	in $CHCl_3$ 284-250	in $CHCl_3$ 289-293	in $CHCl_3$ 286-290
mp ($^{\circ}C$)	79-81	62-65	74-75	175-179

simbolos en el NMR: s, singlet; d, doublet; t, triplet; m, multiplet

TABLE 3

PROPIEDADES FISICAS Y ESPECTROSCOPICAS DEL PALMITATO-3, OLEATO-3 Y ESTEARATO-3 DE ESTRADIOL Y DEL 17- β ESTRADIOL.

	PALMITATO-3 de	OLEATO-3 de	ESTEARATO-3 DE	17- β ESTRA-
	ESTRADIOL	ESTRADIOL	ESTRADIOL	DIOL
	en $CDCl_3$	en $CDCl_3$	en $CDCl_3$	en $CDCl_3/DMS$
n.m.r. (ppm)	1.3 (m, 26 H, 13 CH_2) 3.65 (t, $J=7.5 H_z$, 1 H, C-17 H) 6.8 (m, 2H, C-2, C-4 H) 7.2 (d, $J=7.5 H_z$, 1 H, C-1 H)	1.35 (m, 22 H, 11 (CH_2)) 3.75 (t, $J=7.5 H_z$, 1 H, C-17 H) 3.35 (m, 4 H, vinylica chain) 6.85 (m, 2 H, C-2, C-4 H) 7.3 (d, $J=7.5 H_z$, 1 H, C-1 H)	1.29 (m, 30 H, 15 (CH_2)) 3.65 (t, $J=7.5 H_z$, 1 H, C-17 H) 6.8 (m, 2 H, C-2, C-4 H) 7.25 (d, $J=7.5 H_z$, 1 H, C-1 H)	1.25 (s, 3 H, C-18 Me) 3.8 (t, $J=7.5 H_z$, 1 H, C-17 H) 6.85 (m, 2 H, C-2, C-4 H) 7.3 (d, $J=7.5 H_z$, 1 H, C-1 H)
i.r. (cm^{-1})	Pellet KBr 3515, 2950 2875, 1780 1640, 1480 1380, 1240 1170, 1150	Film $CHCl_3$ 3475, 2950 2900, 1780 1570, 1480 1400, 1240 1170, 1150	Pellet KBr 3400, 2910 2850, 1760 1635, 1490 1465, 1340 1210, 1150	Pellet KBr 3300, 3250 2940, 2880 1250, 1050
u.v. (λ_{max} in nm)	in $CHCl_3$ 277, 270, 246	in $CHCl_3$ 277, 270, 246	in $CHCl_3$ 277, 270, 247	in $CHCl_3$ 246-280
m.p. ($^{\circ}C$)	54-55	oil	55-57	173-179

SIMBOLOS EN NMR: s, SINGLET; d, DOUBLET; t, TRIPLET; m, MULTIPLET

Ensayo Biológico:

En la primera etapa de evaluación biológica solo se inyectaron dos compuestos sintetizados, el EDP y el EDO utilizando como compuestos de referencia el EB y EE (estradiol-3-benzoato y estradiol-17-enantato), todos los fármacos se aplicaron a una dosis de 1 umol como dosis única por vía subcutánea y la respuesta estrogénica fue evaluada a los 3,5,12 y 15 días después del tratamiento.

Se utilizaron ratas hembras sin ovariectomizar y ratas ovariectomizadas sin tratamiento así como ratas ovariectomizadas a las que se les administró exclusivamente el vehículo, todo este grupo animal fue utilizado como grupo control.

Los efectos organotrópicos de los ésteres estudiados se muestran en las figuras 2 y 3, el efecto agudo encontrado en el grupo de animales que recibió EB con respecto al diámetro y peso uterino es evidente, mientras que el EE mostró tener un efecto sostenido con los mismos parámetros. Los grupos que recibieron EDP y EDO no tuvieron diferencias significativas entre sí con relación al efecto organotrópico.

El aumento de las hormonas gonadotrópicas se hizo presente como era de esperarse al castrar a los animales, y se utilizó la disminución de las hormonas LH y FSH como parámetro de la respuesta estrogénica al administrar los

PESO HUMEDO UTERINO

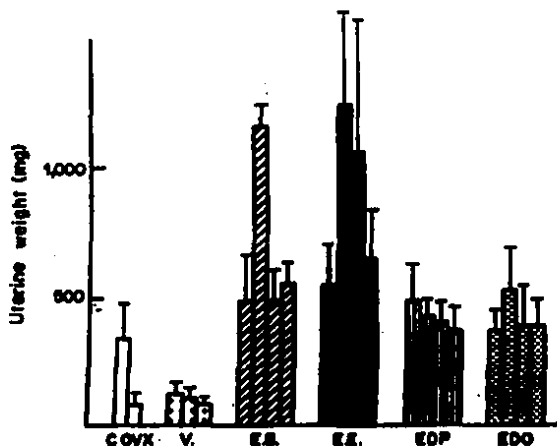


Figura 2. Efecto organotropico peso humedo uterino despues de una sola aplicacion por via subcutanea (1 umol) de cada compuesto. Los resultados estan expresados como el promedio y su desviacion estandar de 5 animales, a 3,5,12 y 15 dias despues del tratamiento. (C) ratas control intactas, (OVX) ratas ovariectomizadas sin tratamiento, (V) ratas que recibieron solo el vehiculo, (EDP) Dipalmitato de estradiol (EDO) Diolato de estradiol.

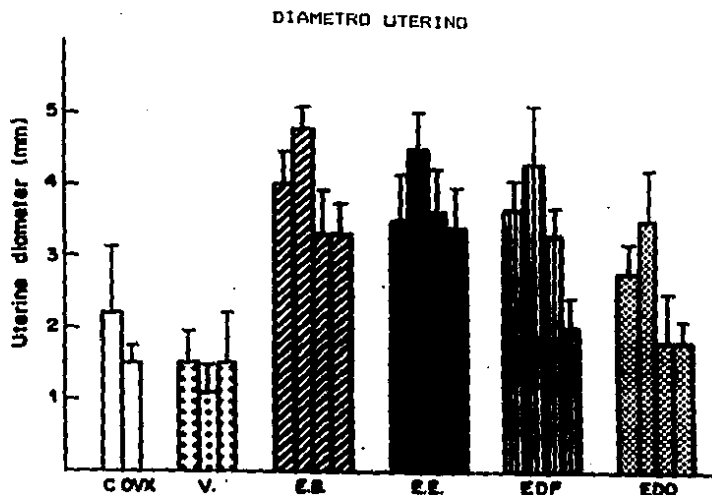


Figura 3. Efecto organotropico diametro uterino despues de una sola aplicacion por via subcutanea (1 umol) de cada compuesto. Los resultados estan expresados como el promedio y su desviacion estandar de 5 animales, a 3,5,12 y 15 dias despues del tratamiento.

derivados esteroidales. El efecto inhibitorio sobre las gonadotropinas fue mas pronunciado cuando se aplicaron los diesteres EDP y EDO con respecto a los esterres comerciales como lo muestra la figura 4 .

Las concentraciones sericas de estradiol indicaron una rapida e irregular absorcion de la hormona en el caso de las ratas que recibieron ED-3, y un retardo en la absorcion se observo cuando el enantato de estradiol o los diesteres fueron aplicados. Con el EDP y EDO se nota una tendencia a incrementar la concentracion del E2 en forma paulatina pero sostenida, encontrandose que la concentracion maxima de la hormona corresponde al dia 12 despues de su administracion como se aprecia en la figura 5.

En la segunda fase de la evaluacion biologica se utilizo 0.1 umol de cada uno de los nueve compuestos sintetizados asi como los de uso comercial, el tiempo de estudio se amplio a 5,10,20,30 y 60 dias despues del tratamiento. El efecto organotropico, antigonadotropico asi como el perfil serico del estradiol fue usado para evaluar la respuesta estrogenica de larga duracion.

La tabla 4 muestra los resultados de la citologia vaginal la accion prolongada de los C-17 monoesteres fue evidente con este parametro, seguida por los diesteres y monoesteres en C-3. sin embargo uno de los compuestos de referencia concretamente el enantato de estradiol presenta mucha

CONCENTRACIONES SERICAS DE LH y FSH

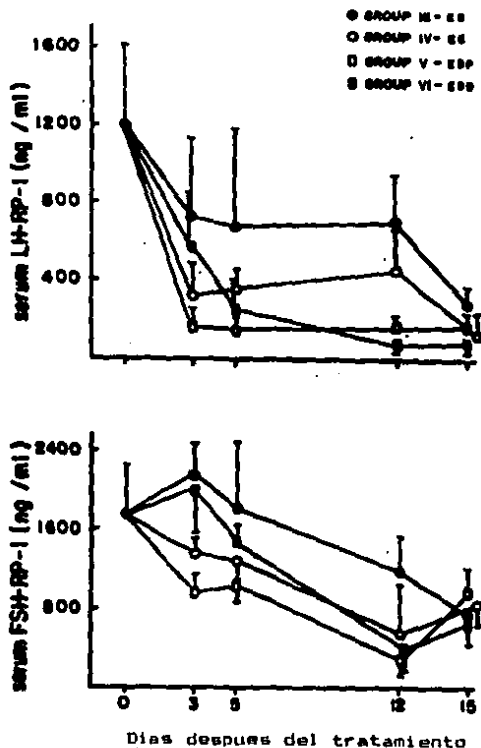


Figura 4. Efecto inhibitorio de Benzoato de estradiol EB, enantato de estradiol EE, EDP y EDD sobre gonadotropinas hipofisarias despues de administrar subcutaneamente una dosis de 1 μ mol de cada ester a ratas ovariectomizadas evaluando el efecto a los 3,5,12 y 15 dias despues de su aplicacion. Los valores son el promedio y su desviacion estandar de 5 animales. Los resultados de LH y FSH en ratas intactas sin tratamiento fueron de 74 ± 43 y 135 ± 42 ng/mL respectivamente.

CONCENTRACIONES DE ESTRADIOL SERICO

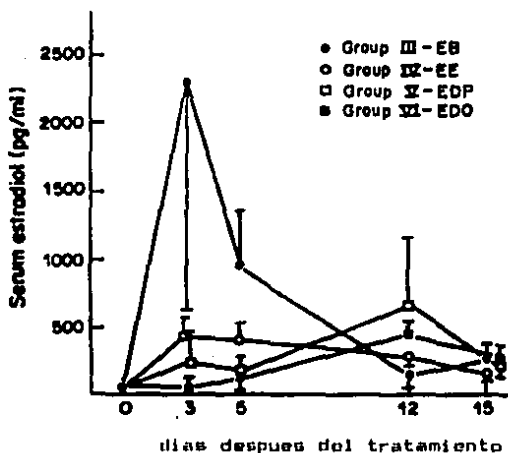


Figura 5. concentraciones sericas de estradiol despues de administrar cada uno de los compuestos, los valores de las ratas intactas sin tratamiento fueron de 115 ± 41 pg/mL

TABLA 4
PORCENTAJE DE DESCAMACION VAGINAL

	Días después del tratamiento					
	0	5	10	20	30	60
EMP-3	0	100	100	100	80	60
EMO-3	0	100	100	100	85	55
EMS-3	0	100	100	100	80	60
EMP-17	0	100	100	100	100	90
EMO-17	0	100	100	100	100	88
EMS-17	0	100	100	100	100	80
EDP	0	45	100	100	90	60
EDO	0	40	80	100	100	55
EDS	0	60	100	100	100	40
E2	0	100	40-50	0		
EB	0	100	100	80	60	20
EE-17	0	100	100	100	95	90

Los tres primeros monoésteres corresponden a los derivados esterificados en el C-3 los siguientes tres ésteres son los monoésteres en C-17, los tres siguientes son los diésteres y los tres restantes son estradiol 17- β Benzoato de estradiol y enantato de estradiol.

similitud a la familia de los esteroides en C-17 con este parametro.

En la figura 6 se muestran los resultados de peso y diametro uterino, concentraciones sericas de LH, FSH y E2 del grupo de animales que fue tratado con E2, EB-3 y EE-17. Un efecto organotropico agudo maximo es mostrado a los 2 dias despues de inyectar el E2, con una inhibicion completa de ambas gonadotropinas a los 5 dias, teniendo una concentracion maxima (C max) para E2 el primero y segundo dia, en el caso de EB-3 y EE-17, en cambio cuando se valoran los efectos biologicos organicos tienen un maximo de efectividad entre 5 y 10 dias para EB-3, y hasta los 30 dias para EE-17, la inhibicion de gonadotropinas se mantiene para el benzoato de estradiol a los 20 dias y hasta los 30 dias para el enantato de estradiol, la C max de E2 en suero es en el dia 5 para EB-3, mostrando dos picos maximos el EE-17 en el 1er y 20 dia .

Los monoesteres en posicion 17 muestran un efecto organotropico y antigonadotropico desde el 5o dia incrementandolo hasta el dia 30 para EMP y EMO que coincide con la C max de E2 para ambos compuestos. El EMS presenta un patron diferente, manteniendo el efecto organico durante los 60 dias del estudio, este compuesto presenta un efecto inhibitorio maximo de LH y FSH entre los 10 a 30 dias, y una C max para estradiol serico en el 5o dia, en todos los monoesteres en C-17. La Inhibicion de LH se mantiene por

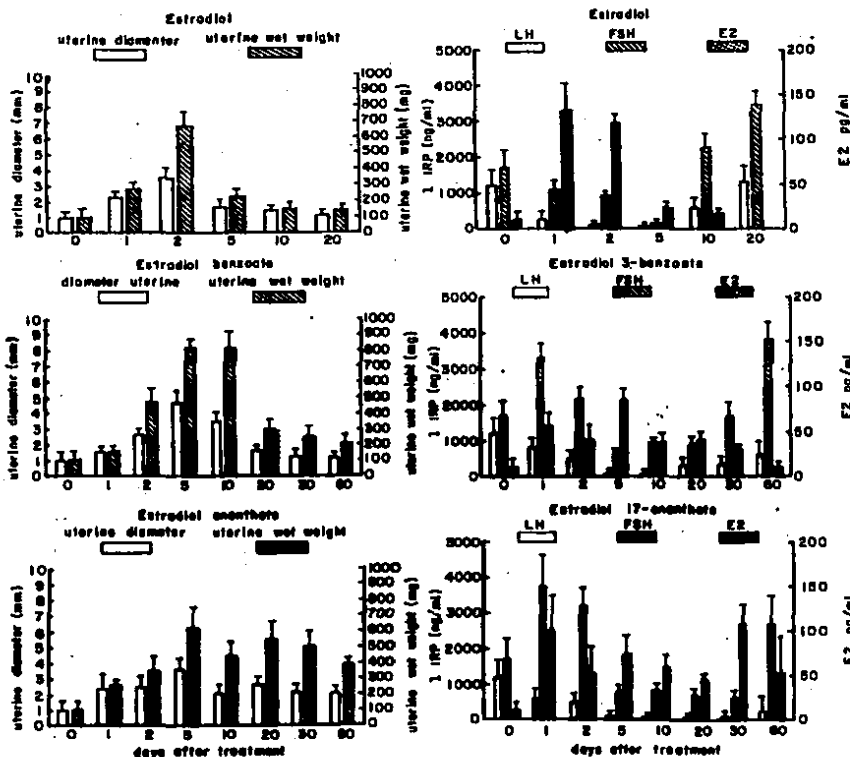


Figura 6. Efecto organotropico de estradiol y gonadotropinas LH y FSH asi como niveles sericos de estradiol 17-B, a ratas ovariectomizadas a las cuales se aplicaron en una sola ocasion una dosis de 0.1umol de cada compuesto, evaluando la respuesta estrogenica a los 0,1,2,5,10,20,30 y 60 dias despues de su administracion los resultados son el promedio con su desviacion estandar de 5 animales.

todo el tiempo del experimento, sin embargo los valores de FSH a los 60 días después del tratamiento presentan mayores concentraciones que las iniciales, figura 7.

El efecto de peso y diámetro uterino, inhibición de gonadotropinas así como la C max para E2 serico, al administrar los derivados de estradiol en C-3 son máximos a partir del 5o día y disminuyen su potencia y concentración entre los 20 y 30 días después de haberse aplicado el fármaco, Figura 8.

El perfil de acción de los diésteres de estradiol muestra un efecto estrogénico organotrópico tardío, hacia el día 10 para EDP y EDS, y hasta el día 20 para EDO, con una inhibición gonadotrópica efectiva del día 10 al 20 para este grupo de compuestos apolares. figura 9.

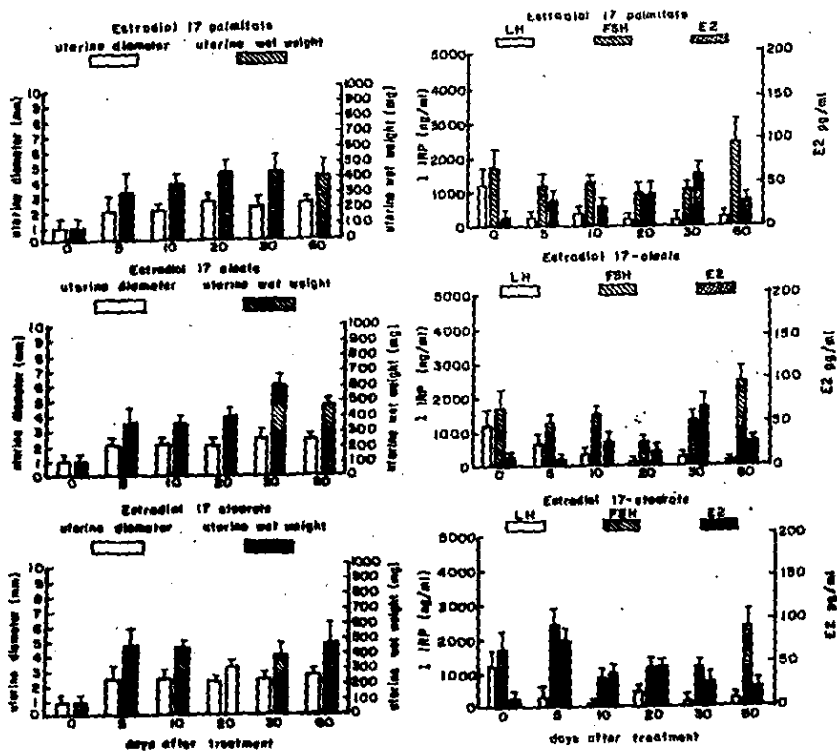


Figura 7. Efecto rganotropico diametro y peso uterino, efecto inhibitorio de gonadotropinas LH y FSH, así como concentraciones de estradiol serico, a ratas ovariectomizadas a las cuales se aplicaron en una sola ocacion una dosis de 0.1 umol de cada compuesto, evaluando la respuesta estrogenica a los 0,5,10,20,30 y 60 dias despues del tratamiento, los valores son el promedio con su desviacion estandar de 5 animales.

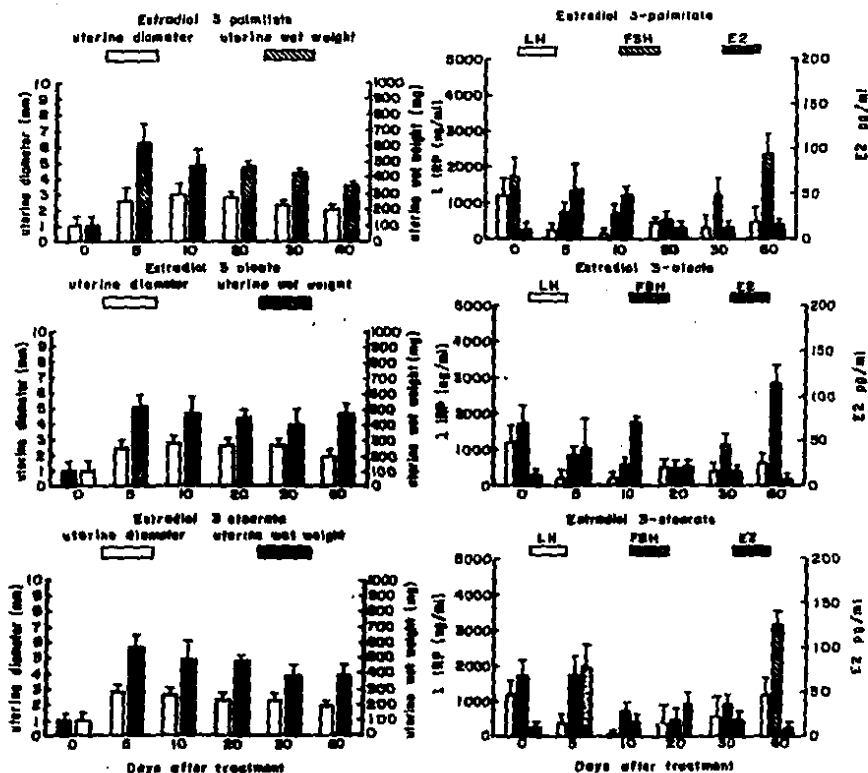


Figura 9. Efecto rganotropico diametro y peso uterino, efecto inhibitorio de gonadotropinas LH y FSH, asi como concentraciones de estradiol serico, a ratas ovariectomizadas a las cuales se aplicaron en una sola ocacion una dosis de 0.1 umol de cada compuesto, evaluando la respuesta estrogenica los 0,5,10,20,30 y 60 dias despues del tratamiento, los valores son el promedio con su desviacion estandar de 5 animales.

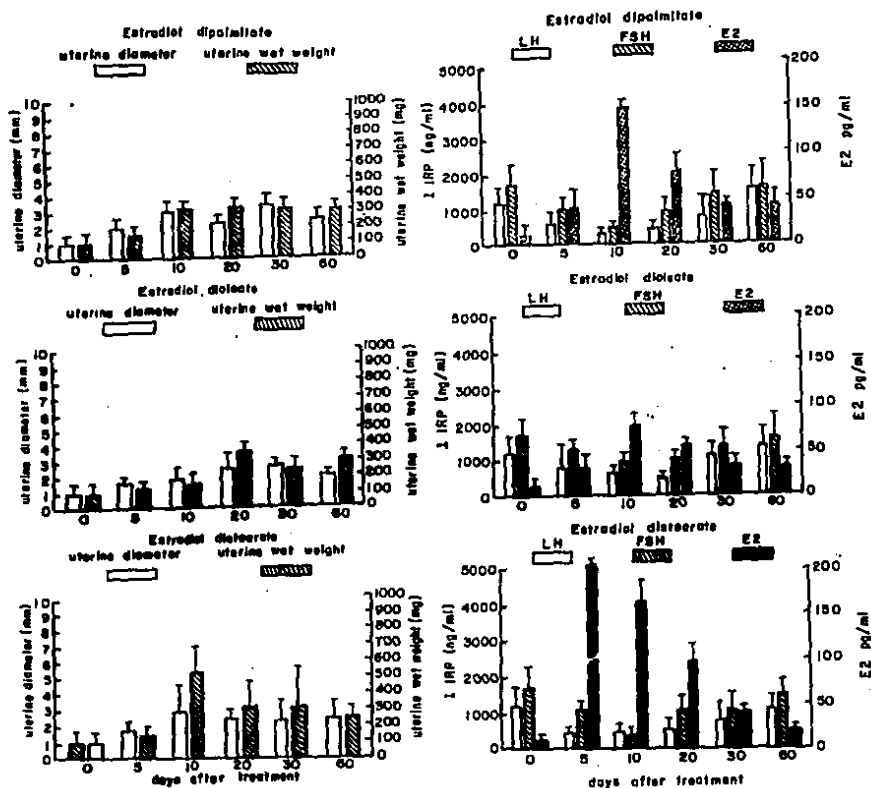


Figura 9. Efecto rganotropico diametro y peso uterino, efecto inhibitorio de gonadotropinas LH y FSH, así como concentraciones de estradiol serico, a las ratas ovariectomizadas a las cuales se aplicaron en una sola ocaion una dosis de 0.1 μ mol de cada compuesto, evaluando la respuesta estrogenica los 0,5,10,20,30 y 60 dias despues del tratamiento, los valores son el promedio con su desviacion estandar de 5 animales.

CONCLUSIONES Y DISCUSION

En el primer experimento fueron utilizados dos diesteres de estradiol, EDP y EDO, evaluandose la accion estrogenica de ambos. El tiempo de estudio se limito a solo 15 dias y la concentracion del farmaco aplicado por via subcutanea fue de 1 umol en una sola dosis. En estos experimentos, el grupo de animales recibio 272 microgramos de estradiol, mostrandose un efecto organotropico y antigonadotropico efectivos durante todo el tiempo del estudio, esta dosis es muy grande si la comparamos con las concentraciones fisiologicas de estradiol plasmatico en la rata, las que oscilan entre 60-120 pg/mL (16,18-22) asi como con las dosis utilizadas en experimentos para restaurar el ciclo hormonal en la rata ovariectomizada que es de 20 ug (23).

Del segundo experimento conviene resaltar lo siguiente:

- 1.- La pureza de los nueve compuestos fue comprobada satisfactoriamente.
- 2.- Los analisis a que fueron sometidos los derivados corroboraron que estos correspondian a los productos de sintesis esperados.
- 3.- La respuesta estrogenica fue evaluada despues de una dosis de 0.1 umol, 10 veces menor que en el primer experimento.
- 4.- El tiempo de estudio se amplio a 60 dias posteriores a la administracion de cada compuesto

En ambos estudios se utilizaron como controles, grupos de animales tratados con estradiol-3-benzoato y estradiol-17-enantato, compuestos utilizados en forma comercial cuya dosis en humanos es de 10 mg. estos farmacos mostraron en nuestro estudio que el benzoato de estradiol es rapidamente absorbido e hidrolizado pues su efecto organico y las concentraciones maximas de E2 serico se encuentran alrededor de los 5 primeros dias. Conservando un efecto estrogenico prolongado entre los 10 y 20 dias despues de su aplicacion.

En el caso del enantato de estradiol, el ester es importante desde el punto de vista que este derivado pertenece a los de la familia que ocurren naturalmente y concuerda con su efecto estrogenico de larga duracion muy parecido a los monosteres en C-17, sintetizados y evaluados en este estudio.

Cuando se analizo el efecto antigonadotropico de todos los compuestos sintetizados la inhibicion de LH fue mas pronunciada que para FSH, en los grupos de ratas que recibieron E2, EB-3 y EE-17 presentaron niveles mas elevados que los de las ratas castradas sin tratamiento, este fenomeno es debido probablemente al efecto de retroalimentacion positiva inicial que tienen las primeras moleculas de estradiol percibidas en hipotalamo para producir posteriormente el efecto de retroalimentacion negativa del E2 (24-25).

Es interesante la observación de que el estearato, como monoéster o diéster produjo los efectos estrogénicos más agudos de los nueve compuestos sintetizados.

Cabe señalar que la constante de asociación y disociación del estradiol con sus receptores juega un papel muy importante en el efecto que la hormona tenga en las células blanco (27), sin embargo se conoce que los ésteres de estradiol no compiten con los receptores a estradiol (28) y solo la hormona libre y no los ésteres de cadena larga producen el efecto biológico.

En este campo todavía no se ha identificado la o las enzimas responsables involucradas con la actividad de esterasa, y el mecanismo de hidrólisis no ha sido postulado, sin embargo esta o estas enzimas quedan comprendidas en el grupo de las hidrolasas correspondiéndoles el número 3 por la comisión internacional de enzimas, y pueden ser subclasificadas en base a su sustrato, en Alilesterasas (29) pues hidroliza a compuestos que son sustratos alifáticos (ácidos grasos), y en arylesterasas cuando existe un componente arílico como sustrato, un ejemplo sería el heptanoato de estradiol.

Estudios in vitro de la actividad enzimática hidrolítica con algunos ésteres esteroidales sintéticos como los de testosterona, noretisterona, dehidroepiandrosterona y levonorgestrel han sido realizados (30-31), estos autores proponen que pueden existir por lo menos dos sistemas

**ESTA TESIS NO DEBE
SALIR DE LA BIBLIOTECA**

enzimáticos, uno para ésteres con ácidos grasos de cadena corta y otro para hidrolizar ésteres con radicales alifáticos de cadena larga, los resultados de la hidrólisis de ésteres de levonorgestrel no presentaron una relación entre el efecto estrogénico y la velocidad de hidrólisis de dichos ésteres.

Lo que trasciende con respecto a estos estudios es que todos estos ésteres diferentes a los ésteres de estradiol es que se encuentran esterificados en el hidroxilo del carbono 17 y en todos ellos se efectuaron hidrólisis in vivo e in vitro en animales de experimentación lo que apoya que existen sistemas enzimáticos que reconocen al núcleo químico y la posición de la esterificación de estos compuestos esteroideos.

Algunos reportes han demostrado que aplicando un compuesto esteroideo sintético como el Mestranol a humanos, este sufre modificaciones químicas, generándose un metabolito conjugado de este esteroideo en la posición C-17 (32-33), se hace énfasis en el hidroxilo 17 pues es en este carbono donde se encuentran los derivados naturales del estradiol (15), la esterificación e hidrólisis naturales, parecen tener un papel importante en el transporte del estradiol como derivado lipídico hacia el interior de la célula blanco (34) donde los mecanismos de hidrólisis naturales tendrán una participación relevante para liberar al estradiol ya que estos ésteres tienen tiempos de vida media a nivel sanguíneo de cien y hasta doscientas veces

mayores que para el estradiol solo, en el caso de la rata (35) y de alrededor de diez veces en el humano (36), por lo tanto las células además de contar con las enzimas que identifiquen la longitud de las cadenas hidrocarbonadas de los diferentes ácidos grasos así como la saturación o insaturación de estos, tendrán que reconocer la posición del radical esterificado. De ahí la importancia de este mecanismo en la hidrólisis de las diferentes familias de ésteres de estradiol, los ésteres en C-17 por ser de origen natural se presentan como compuestos atractivos desde el punto de vista farmacológico pretendiendo tener con estos, efectos mínimos indeseables, a diferencia de los que producen otros compuestos sintéticos como el etinil estradiol o mestranol (32-33), que son considerados estrógenos potencialmente carcinogénicos.

Es evidente que la modificación química de la hormona, ya sea en el hidroxilo del C-17 o C-3, produce un efecto de larga duración, por lo tanto la hidrólisis debe contar con mecanismos para liberar al estradiol cuando la hormona se encuentra esterificada con ácidos grasos en uno o ambos hidroxilos, ya sea con ácidos grasos saturados o insaturados, ya que la composición en el humano de estos ésteres de estradiol es mayor con ácidos grasos saturados como palmitato y estearato, que corresponden al 50% de los ésteres de estradiol (37). Aunque el papel fisiológico y patológico de estos compuestos no es claro aun, su participación es evidente en procesos patológicos como el

cancer de mama (37) y en problemas de acné e hirsutismo (38).

Los resultados con estos experimentos nos permiten obtener las siguientes conclusiones:

- I La esterificación con ácidos grasos de cadena larga confiere un tiempo de acción estrogénica más prolongado al estradiol, que cuando se administran ésteres de cadena corta o estradiol sólo.
- II La posición en que es esterificado el ácido graso influye en el tiempo de duración de la acción de la hormona. Los derivados en C-17 muestran un efecto en el crecimiento y diámetro uterino en los 5 primeros días, sin embargo las concentraciones de estradiol sérico no muestran niveles elevados de la hormona, sugiriendo que la biodisponibilidad del estradiol a partir del éster es en cantidades suficientes como para generar la respuesta estrogénica.
- III Los monoésteres en C-3 y los diésteres mostraron un efecto estrogénico de menor duración, en el caso del EDS este diéster presentó valores de E2 sérico de 240 pg/mL dato de difícil explicación ya que no correlaciona con esta concentración tan alta de la hormona

PERSPECTIVAS DEL TRABAJO:

Con los datos obtenidos surgen varias preguntas:

- a) Es la respuesta estrogénica de larga duración consecuencia de que la molécula se hace más apolar con la longitud de la cadena hidrocarbonada esterificada, y que a su vez esta característica le permite liberarse en forma paulatina y sostenida a través del tiempo dependiendo del sitio de administración hasta su completa distribución en toda la economía?
- b) Son los mecanismos de hidrólisis los que regulan las concentraciones de estradiol libre capaces de generar una respuesta biológica?
- c) Cuántas enzimas o sistemas enzimáticos existen para hidrolizar a los diferentes ésteres de estradiol, no solo los derivados naturales sino a los sintéticos? (enzimas que hidrolizan en C-3 y por supuesto en C-17.)

Para contestar estas preguntas se pretende llevar a cabo la siguiente estrategia:

1. Utilizar diversas dosis, vías y esquemas de aplicación así como diferentes vehículos y otras especies animales para realizar estudios farmacocinéticos con ésteres marcados isotópicamente.

2.- Efectuar estudios in vitro e in vivo de hidrolisis de esteres de estradiol con diferentes tejidos y en diferentes especies animales para localizar el lugar celular donde se encuentran la o las hidrolasas.

3.-Tratar de purificar la o las hidrolasas involucradas en este proceso metabolico.

REFERENCIAS

- 1.- Allen, E. and Doisy E.A.
An ovarian hormone: A preliminary report on its localization extraction and partial purification and action in test animals.
J.A.M.A. 81: 819, 1923.
- 2.- Butenandt, A.
A crystalized female sexual hormone.
Naturwissenschaften 17:879, 1929.
- 3.- Doisy, E.A., Verler, C.D. and Thayer, S.
Folliculin from urine from pregnant woman.
Am. Physiol. 90:329, 1929.
- 4.- Browne, J. S. L.
Further observations on ovary stimulating hormone of placenta. Cited by Collip, J.B. Canad. Med. Ass. J. 22: 761, 1930.
- 5.- Mac Corquodale D.W., Thayer, S.A. and Doisy E.A.
The isolation of the principal estrogenic substance of liquor folliculi. J. Biol. Chem. 115: 435, 1936.
- 6.- Miescher K, Scholz C, Tschopp E.
The activation of female sex hormones. 11
alpha-oestradiol and its bi-esters.
Biochem J. 32: 725, 1938.
- 7.- Miescher K, Scholz C, Tschopp E.
The activation of female sex hormones. 111 Monoesters of alpha-oestradiol.
Biochem J. 32: 1273, 1938.
- 8.- Junkman J.
Long-acting steroids in reproduction.
In Pincus G. (eds) Rec. Prog. Hor. Res. Acad. Press.
New York, vol. XIII: 389, 1957.
- 9.- Hochberg R.B., Bandy L., Ponticorvo L. and Liberman S.
Detection in bovine adrenal cortex of lipoidal substances that yields pregnenolone upon treatment with alkali. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74:941, 1977
- 10.- Mellon-Nussbaum S, Ponticorvo L, and Liberman S.
Characterization of the lipoidal derivatives of pregnenolone prepared by incubation of steroid with adrenal mitochondria J. Biol. Chem. 254: 12500, 1979
- 11.- Mellon-Nusbaum S. and Hochberg R.B.
Biosynthesis of lipoidal derivatives of pregnenolone and

- dehydroisoandrosterone by the adrenal
J. Biol. Chem. 255:5566, 1980
- 12.-Schatz F. and Hochberg R.B.
 Lipoidal derivative of estradiol: The biosynthesis a non polar estrogen metabolite. *Endocrinology* 109:697,1981
 - 13.-Mellon-Nussbaum G, Ponticorvo L, Schatz F, and Hochberg RB. Estradiol Fatty acid esters. *J Biol Chem* 257:5678, 1982.
 - 14.-Hanocko L, and Hochberg RB. Estradiol Fatty Acid Esters Occur Naturally in Human Blood. *Science* 222:1334(1983).
 - 15.-Larner JM, Maclusky N, and Hochberg RB. The Naturally occurring C-17 fatty acid esters of estradiol are long acting estrogens. *J Steroid Biochem* 22:407(1985).
 - 16.-Vazquez-Alcantara M.A., Juarez-Dropeza M.A., Miranda-Zamora R, Diaz-Zagoya J.C. and Garza-Flores J. Synthesis and biological assessment of long-acting estradiol fatty acid esters in ovariectomized rats *J. Steroid Biochem.* 23:599, 1985
 - 17.-World Health Organization
 Special Programme for Research Development and Research Training in Human Reproduction. Method Manual, London 1984
 - 18.-Sterin-Speziale N, Gimeno N.F., Bonacossa A. and Gimeno A.L. The effect of estradiol on isolated rat uterine motility and prostaglandins generation
Prostaglandins 20:233, 1980
 - 19.-Thaler-Dao H, Baintot M, Ramonatzio M, Chavis C. and Crastos de Peulet A.
 Prostaglandin biosynthesis by the rat uterus during oestrous cycle temporal correlation with plasma E2 and P4 concentrations. *Prostaglandins* 23:347, 1983
 - 20.-Butcher R.L., Collins W.E. and Fugo N.W.
 Plasma concentrations of LH, FSH, Prolactin, P4 and E2 throughout the 4 day estrous cycle of the rat.
Endocrinology 94:1704, 1974
 - 21.-Kaira S.P. and Kaira P.S.
 Temporal Relationships among circulatory levels of E2 and LH during de rat estrous cycle. Effect of exogenous P4. *Endocrinology* 95:1711, 1974
 - 22.-Shaikh A.A. and Shaikh S.A.
 Adrenal and ovarian steroid secretion in rat estrous cycle. Temporally related to gonadotropins and steroid level in plasma *Endocrinology* 96: 37, 1975

- 23.-Burnet F.R. and Mac-Kinnon P.C.B.
Restoration by oestradiol benzoate of a neural and hormonal rhythm in ovariectomized rat.
J. Endocr. 64:27, 1975
- 24.-Yamaji T., Dierschke D.J., Bhattacharya A.N. and Knobil E.
The negative feed-back control by estradiol and progesterone of LH secretion in the Ovariectomized rhesus monkey.
Endocrinology 90:771, 1972
- 25.-Callantini M.R., Humphery R.R. and Nasset B.L.
LH release by 17-B estradiol in the rat
Endocrinology 79:455, 1966
- 26.-Caligaris L., Astrada J.J. and Talsisnik S.
Release of LH induced by estrogens injection into ovariectomized rats. *Endocrinology* 88:810, 1971
- 27.-Weichman B.M. and Notides A.C.
Estrogen receptor activation and the dissociation kinetics of estradiol, estriol and estrone.
Endocrinology 106:434, 1980
- 28.-Janocko L., Larner J.M. and Hochberg R.B.
The interaction of C-17 esters of estradiol with the estrogen receptor.
Endocrinology 114: 1180, 1980
- 29.-Walker C.H. and Mackness M.I.
Esterases: Problems of identification and classification.
Biochem Pharmacol. 32:3265, 1983
- 30.-Bellman O., Jurgen Duhme H. and Gerhards E.
in vitro studies on enzymatic cleavage of steroids esters in female organism
Act. Endocr. 81:839, 1976
- 31.-Naderi B. and Fotherby K.
Long-acting contraceptive agents: in vivo hydrolysis of esters of norethisterone and levonorgestrel.
Steroids 41:397, 1983
- 32.-Williams J.G., Longcope C.H. and Williams K.I.H.
Metabolism of 4-3H and 4-14C 17 alpha ethynylestradiol 3-methyl ether (mestranol) in women.
Steroids 25:343, 1975
- 33.-Pharmacology of steroid contraceptive drugs
Edited by Garabino G. and Hernandez H.W.
Raven Press, New York 1977
- 34.-Adams JB, Hall RT and Nott S Esterification-deesterifi-

cation of estradiol by human mammary cancer cells in culture. J Steroid Biochem 24:1159, 1985

- 35.-Larner JM and Hochberg RB. The Clearance and Metabolism of Estradiol and Estradiol 17 esters in the Rat. Endocrinol 117:1209,1985
- 36.-Hershcopf RJ, Bradlow HL, Fishman J, Swaneck GE, Larner JM and Hochberg RB. Metabolism of estradiol fatty acid esters in man. J.Clin Endocrinol Metab 61:1071, 1985
- 37.-Larner JM, Eisenfeld AJ, and Hochberg RB. Synthesis of Estradiol Fatty Acid Esters By Human Breast Tumors:Fatty Acid Composition And Comparison to estrogen and Progesterone receptors content. J Steroid Biochem 23:637 (1985).
- 38.-Jones DL, and James VHT. The Identification and Quantification of Possible Origin of Nonpolar Conjugates in Human Plasma. J Steroid Biochem 22:243, 1985