



11261  
7  
R. 2

UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

---

Facultad de Medicina

"EFECTO DE ESTROGENOS SUBSTITUIDOS EN LA  
POSICION 17-BETA SOBRE LA AGREGACION DE  
PLAQUETAS HUMANAS IN VITRO"

T E S I S  
Que para obtener el Grado de  
MAESTRA EN CIENCIAS BIOMEDICAS  
(Area Farmacología)  
p r e s e n t a  
AURORA DE LA PEÑA DIAZ

Director de Tesis  
DR. JUAN JOSE MANDOKI W.

México, D. F.

1993

TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN



## **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 está 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.

**I. INDICE**

	<b>página</b>
<b>I Indice</b>	<b>3</b>
<b>II Resumen</b>	<b>4</b>
<b>III Introducción</b>	<b>6</b>
<b>IV Objetivo</b>	<b>23</b>
<b>V Parte Experimental</b>	<b>25</b>
<b>VI Resultados</b>	<b>27</b>
<b>VII Discusión de Resultados y Conclusión.</b>	<b>35</b>
<b>VIII Bibliografía</b>	<b>39</b>

## II. RESUMEN

Los estrógenos tienen un efecto bifásico en la coagulación sanguínea. Dosis elevadas administradas por vía intraperitoneal a ratón macho, alargan el tiempo de coagulación por un periodo hasta de 24 h. posteriormente se observa un período de hipercoagulabilidad. Cuando los estrógenos se administran por vía subcutánea se observa únicamente el estado de hipercoagulabilidad.

En la búsqueda de estrógenos con actividad anticoagulante o anti-agregante plaquetaria y sin efectos trombogénicos se sintetizaron: prolame [N-(3-hidroxi-1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -il)3-hidroxi-propilamina], buame [N-(3-hidroxi-1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -il)butilamina] y proacame [N-(3-hidroxi-1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -il)-3-carboxi-propilamina]. Prolame y buame difieren de otros estrógenos conocidos en su efecto en el tiempo de coagulación sanguínea. Producen en el ratón macho, cuando se administran por vía subcutánea, un incremento sostenido del tiempo de coagulación. Proacame, en contraste, lo disminuye.

Se sabe que en el proceso de coagulación, las plaquetas participan de una manera determinante a través de varios eventos coordinados: cambio de forma, adhesión, agregación, y secreción, que son el resultado de señales reconocidas en la superficie de la membrana y que desencadenan mecanismos estimulantes o inhibitorios mediante segundos mensajeros.

Con el fin de conocer la participación de las plaquetas en el efecto anticoagulante mostrado por algunos amino-estrógenos, en este trabajo de tesis se evaluó el efecto de estrógenos modificados, prolame, buame, proacame y de estradiol 17- $\beta$  sobre la agregación de plaquetas humanas *in vitro* estimulada con ADP, epinefrina y colágena.

Se describe brevemente la participación del endotelio vascular, las plaquetas, el sistema de coagulación, el sistema fibrinolítico y los inhibidores plasmáticos en la regulación de la hemostasia, concediéndose un mayor énfasis a las plaquetas por ser sobre su actividad agregante que se evaluaron los efectos de los nuevos estrógenos modificados. Prolame y buame inhibieron significativamente la agregación plaquetaria inducida con ADP, epinefrina y colágena de una manera dosis-dependiente. Estradiol y proacame no mostraron efectos antiagregantes.

Se propone que el efecto inhibitorio observado es un efecto directo no genómico consecuencia de las propiedades estructurales, electrónicas y geométricas de los sustituyentes en la posición 17 $\beta$  de la estructura esteroideal. Los radicales 17 $\beta$  hidroxipropilamina y 17 $\beta$  butilamina proporcionan a la estructura las características adecuadas que podrían modificar la actividad de la membrana plasmática y la

actividad de sistemas enzimáticos que están involucrados en el incremento intracelular de calcio e impedir indirectamente la exposición del receptor IIb-IIIa y por lo tanto la agregación de las plaquetas a través de los puentes de fibrina.

Se sugiere que los amino-estrógenos de este tipo, además de su efecto estrogénico tendrían la ventaja de reducir el riesgo de accidentes trombo-embólicos que se presentan durante el empleo de estrógenos como anticonceptivos o durante el tratamiento antineoplásico.

### III. INTRODUCCION

#### I REGULACION DE LA HEMOSTASIA.

La sangre circula normalmente a través de los vasos sanguíneos sin coagularse y sin que exista activación plaquetaria. La regulación de la hemostasia depende de varios sistemas interrelacionados entre sí:

**Tono vascular y endotelio,** con diferencias locales y regionales.

**Plaquetas.**

**Sistema de coagulación.**

**Sistema fibrinolítico.**

**Inhibidores plasmáticos de la coagulación.**

#### **Endotelio.**

Las células endoteliales participan en la hemostasia, trombosis y aterosclerosis (4). El endotelio intacto no es trombogénico; la presencia de glicosaminoglicanos proporciona cargas negativas a la superficie y no permite la interacción de plaquetas ni de otras células sanguíneas con el subendotelio, actuando como una barrera funcional. La pérdida de esta barrera es un paso inicial en la patogénesis de la aterosclerosis. Las plaquetas se adhieren, forman agregados y liberan el contenido de sus gránulos, especialmente en las regiones de flujo turbulento; en los vasos con flujo laminar la adhesión se dificulta porque las células sanguíneas están separadas de la superficie endotelial por una zona libre de células debido a la repulsión que generan las cargas negativas de endotelio y plaquetas.

#### **Plaquetas.**

Las plaquetas son células en forma de disco, de aproximadamente 1.5 a 2.5  $\mu$  de diámetro. Proviene de los megacariocitos de la médula ósea, estimulados por la trombopoyetina. En el ser humano se encuentran pequeñas poblaciones de megacariocitos también en pulmones, bazo, corazón, hígado y riñones. Estas son células poliploides gigantes, que al fragmentarse producen plaquetas con un promedio de vida de 10 días, siendo su recambio de aproximadamente 42,000 plaquetas/ $\mu$ l/día. Las plaquetas "jóvenes" son más grandes, densas y reactivas que las plaquetas "viejas" y aproximadamente de 15 a 40 % son secuestradas en el tejido retículo endotelial de bazo e hígado por fagocitosis.

En la zona periférica de las plaquetas se encuentran dominios estructurales que corresponden al glicocálix, membrana unitaria y región submembranal. El glicocálix o zona externa es una capa de 150 a 200 Å de espesor, rico en glicoproteínas que confieren carga negativa a la plaqueta. Contiene al menos 8 diferentes glicoproteínas (Ia, IIb, Ic, IIa, IIb, IIIa, IV, V y IX) algunas de ellas identificadas como receptores plaquetarios. En la Tabla I se presentan las más importantes.

**TABLA I.**

**Glicoproteínas de membrana.**

Tomado de Hemostasis and Thrombosis. 2a. Edición. Ed. J.B. Lippincott Co. pág. 573.

Glicoproteína	PM	Subunidades	Número por plaqueta
I b	170,000	$\alpha$ , $\beta$	50,000
II a	138,000		9,600
II b	142,000	$\alpha$ , $\beta$	100,000
III a	95,000		50,000
III b (IV)	97,000		
V	82,000		
IX (17)	17,000-22,000		

La membrana constituye una barrera fisicoquímica entre el medio intracelular y el extracelular. Algunas lipoproteínas presentes en la bicapa son de gran importancia para los procesos de coagulación, en especial el factor 3 plaquetario que al ser expuesto a la superficie durante la activación funciona como un sitio catalítico para algunos factores de coagulación.

En la región submembranal, rodeando la circunferencia de la célula se encuentran de 8 a 24 bandas fibrilares de microtúbulos en diferentes estados de polimerización que mantienen la forma discoide de la célula y que junto con los microfilamentos constituyen el sistema contráctil y participan, en el momento de la activación, en los eventos de cambio de forma, formación de pseudópodos, ondas contráctiles internas y secreción. El espacio entre los micronúbulos y la membrana está ocupado por filamentos dispuestos de manera transversal.

En el citoplasma se encuentra la zona de organelos, en donde se indentifican: **Gránulos de glucógeno.**

**Gránulos  $\alpha$ .** Almacenan en su interior albúmina, factor Va, factor VIII, factor

de vW, fibrinógeno,  $\beta$ -tromboglobulina, factor 4 plaquetario, factor mitogénico, factor de permeabilidad, factor bactericida, factor quimiotáctico, trombospondina y fibronectina,  $\alpha_2$ -antiplasmina, cininógeno de alto peso molecular,  $\alpha_2$ -macroglobulina,  $\alpha_1$ -antitripsina, inhibidor C<sub>1</sub>.

Gránulos densos que almacenan ATP, GTP, ADP, GDP, fósforo, calcio, magnesio y serotonina.

Lisosomas:  $\beta$ -hexosamidasa,  $\beta$ -glucuronidasa,  $\beta$ -galactosidasa y  $\alpha$ -arabinosidasa, colagenasa y elastasa.

**Mitocondrias.**

**Aparato de Golgi**

Sistema tubular denso, sitio del cual se libera calcio para desencadenar los procesos contráctiles.

Sistema canalicular: Está asociado a la superficie de la célula e íntimamente relacionado con el sistema tubular denso. Está formado por invaginaciones de la membrana celular que recorren el citoplasma proporcionando una gran superficie y haciendo accesible el contacto de estimulantes plasmáticos con zonas internas de la célula. Funcionan también como conductos para liberar los componentes de los gránulos durante la fase de secreción.

Como ya se ha mencionado las glicoproteínas presentes en la membrana plasmática son receptores para los agentes agonistas. A continuación se describen las principales características de algunas de ellas.

**Glicoproteína Ib.** Es la más abundante. Es una proteína integral de la membrana, abarca la bicapa lipídica, lo que le permite interactuar con las proteínas del citoesqueleto. Esta unida a la proteína enlazadora de actina, lo cual contribuye a que las plaquetas mantengan su forma de disco. Aporta aproximadamente el 15 % de las cargas negativas totales de la plaqueta, tiene dos subunidades polipeptídicas, la glicoproteína Ib $\alpha$  y la glicoproteína Ib $\beta$ . Bajo un estímulo apropiado, este receptor participa en la unión de las plaquetas con el subendotelio a través del factor von Willebrand (vW). Los enfermos con el síndrome de Bernard-Soulier tienen alteraciones en la función de esta glicoproteína, sus plaquetas son más grandes, se deforman más fácilmente y su adhesión al subendotelio es deficiente.

**Glicoproteínas IIb-IIIa.** Estas dos glicoproteínas forman en la membrana un dímero que se expone a la superficie de la célula durante la activación. Son receptores de fibrinógeno, fibronectina y en menor medida de factor de vW. El fibrinógeno no puede unirse a la GPIIb-IIIa a menos que la plaqueta sea estimulada previamente por algunos agonistas como ADP, epinefrina, colágena, trombina, ácido araquidónico,

factor activador plaquetario (PAF), endoperóxidos, factor vW sin cargas negativas y complejo GPIb-vW. La GP IIb-IIIa también está presente en la membrana de los gránulos  $\alpha$ . Los enfermos con trombostenia de Glanzmann tienen anomalías en el complejo IIb-IIIa y dificultad para la unión plaquetas-fibrinógeno.

**Glicoproteína V.** Es sustrato para trombina (y no para otros agonistas), que la hidroliza y forma un fragmento llamado GPVI

### Fisiología de las plaquetas.

Muchas sustancias pueden iniciar las diferentes señales extracelulares que regulan la función plaquetaria: trombina, plasmina, catecolaminas, PGI<sub>2</sub>, factor relajante derivado de endotelio, colágena, ADP, tromboxano A<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub>, factor activador plaquetario (PAF), factor de vW, prostaglandinas y endoperóxidos (EPs). : Se clasifican en:

**Agonistas fuertes:** trombina, colágena, endoperóxidos, TXA<sub>2</sub> y PAF.

**Agonistas débiles:** ADP, epinefrina, vasopresina y serotonina.

**Antagonistas:** PGI<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> y factor relajante derivado de endotelio.

En la **Tabla 2** se presentan algunos agonistas así como el sitio identificado como receptor.

**Factor de von Willebrand (vW).** Está presente (20%) en los gránulos  $\alpha$ , es sintetizado por las células endoteliales y los megacariocitos. Por la acción de la vasopresina y de su análogo 1-desamino-8-D-arginina vasopresina, se libera del subendotelio a la circulación. En la sangre circula unido al factor VIII. Está formado por varios multímeros de subunidades idénticas unidos por puentes disulfuro, su PM varía de 440 a 20000 kDa; los multímeros más pequeños son dímeros. Se han identificado de 15 a 20 multímeros diferentes y las plaquetas contienen los más grandes. Tiene carbohidratos (ácido siálico), que le confieren carga negativa y que protegen a la molécula de proteólisis. Se libera bajo el estímulo de colágena y trombina. Los multímeros grandes son más eficientes para interactuar con la plaqueta y el subendotelio. Los pacientes con enfermedad de vW tipo IIA tienen concentración normal de factor vW pero carecen de multímeros grandes y presentan tiempos de coagulación prolongados. Son los multímeros grandes los que interactúan principalmente con la colágena. Esta interacción induce cambios conformacionales en

**TABLA 2.**  
**Agonistas plaquetarios.**  
 Tomado de Physiological Reviews (1989); 69: 141.

Agonista	Receptor	Afinidad, n M	Sitios por plaqueta	PM del Sitio de Unión, Kda
Factor de vW	GP Ib			143
Colágena	GP Ia			160
Trombina	GP Ib	K <sub>d1</sub> 0.3	50	143
		K <sub>d2</sub> 11	1,700	
		K <sub>d3</sub> 2,900	590,000	
TxA <sub>2</sub>		K <sub>d</sub> 75-100	1,700-2,200	200
ADP		K <sub>d</sub> 180-380	33,000	
PAF		K <sub>d1</sub> 0.26	245	160-180
		K <sub>d2</sub> 9-37	1,400-1,600	
Vasopresina	Receptor V <sub>1</sub>	K <sub>d</sub> 0.7-1.3	95	
Epinefrina	Receptor α <sub>2</sub> adrenérgico	K <sub>d1</sub> 160-280	150-450	64
		K <sub>d2</sub> 9-14		

la estructura del factor vW y facilita la unión con la GP Ib. Su interacción es indispensable para la adhesión de las plaquetas al subendotelio y es dependiente de Ca<sup>2+</sup>.

**Colágena.** Los monómeros de colágena (tropocolágena) están constituidos por tres cadenas: una α y dos β enrolladas, con uniones intramoleculares cruzadas. Las unidades de tropocolágena se polimerizan para formar microfibrillas de colágena. Las plaquetas pueden adherirse (proceso dependiente de Mg<sup>2+</sup>), tanto a la colágena monomérica como a la fibrilar, pero únicamente las plaquetas adheridas a la colágena fibrilar pueden secretar su contenido y agregarse. La colágena puede interactuar con diversas proteínas como fibronectina, fibrinógeno, FvW/FVIII y se han propuesto varios receptores de colágena en las plaquetas: GPIIa (receptor principal), GP61-KDa, GP 65-KDa, factor XIII plaquetario, complemento C1s.

**Trombina.** Es una proteína neutra. La unión con su receptor de plaqueta es

rápida, saturable y reversible. Interactúa con al menos dos sitios en la superficie de las plaquetas:

1) Se une a su receptor la GPIb que posee sitios de diferente afinidad:

a) Sitio de alta afinidad ( $K_d$  0.3 nM; 50 sitios/plaqueta). Se encuentra en la porción de glicocalicina de GPIb; la fracción catalítica de trombina no participa en esta unión

b) Sitio de mediana actividad ( $K_d$  11 nM; 1700 sitios/plaqueta)

c) Sitio de baja actividad ( $K_d$  2900 nM; 590000 sitios/plaqueta).

2) La trombina también degrada proteolíticamente a la GP V presente en la superficie plaquetaria. La trombina es una proteasa de serina y puede hidrolizar varios enlaces peptídicos. En particular la  $\gamma$ -trombina tiene actividad de esterasa y la capacidad de activar a las plaquetas.

**Acido araquidónico, endoperóxidos y tromboxano A<sub>2</sub> (TXA<sub>2</sub>)** La enzima ciclo-oxigenasa transforma al ácido araquidónico en los endoperóxidos PGG<sub>2</sub> y PGH<sub>2</sub> y por la acción de la enzima tromboxano sintetasa en TXA<sub>2</sub>, compuesto agregante plaquetario muy potente, pero muy lábil, que interactúa con el receptor PGH<sub>2</sub>/TXA<sub>2</sub>. Altas concentraciones de ácido araquidónico tienen un efecto inhibitorio de la agregación plaquetaria porque aumentan la formación de productos de la enzima lipo-oxigenasa (leucotrienos) 12-HPETE y 12-HETE que antagonizan la agregación .

**Adenosindifosfato (ADP).** Produce dos efectos plaquetarios independientes. Uno es la inducción de cambio de forma en las plaquetas (0.1-0.5 $\mu$ M), exposición de receptores a fibrinógeno y agregación (1-5 $\mu$ M). Otro es la inhibición de la enzima adenilatociclasa inducida por PGI<sub>2</sub> (3 $\mu$ M). Es probable que estos efectos sean el resultado de su interacción con diferentes receptores. El ATP es un antagonista competitivo y la epinefrina incrementa 10 veces la afinidad del ADP por su receptor.

**Factor de activación plaquetaria (PAF).** (1-O-alkil-2-O-acetil-sn-glicerol-3-fosforilcolina). Únicamente es activo el estereoisómero R. Se metaboliza rápidamente tanto en plasma como en la plaqueta por la enzima factor activador plaquetario-acetilhidrolasa (PAF-AH). Es un agonista muy potente producido por neutrófilos, basófilos y macrófagos. Interactúa con un receptor específico de alta afinidad ( $K_d$  0.3-3nM, 1399 sitios/plaqueta) independientemente de la concentración extracelular de

calcio, pero la afinidad se incrementa en presencia de  $Mg^{2+}$  y disminuye en presencia de  $Na^+$  y GTP.

**Vasopresina.** Es un estímulo muy potente para activar a las plaquetas humanas y de perro (1.0 nM), sin embargo la concentración circulante no proporciona un estímulo suficiente. El receptor plaquetario tiene alta afinidad (Kd 0.7-1.3 nM; 95 sitios/plaqueta) y es probable que sea similar a los receptores vasculares y hepáticos, (receptores  $V_1$ ); la unión es dependiente de  $Mg^{2+}$ .

**Epinefrina.** Es ocho veces más potente que la norepinefrina para activar a las plaquetas. En experimentos *in vitro* la concentración requerida es mayor (0.1  $\mu M$ ) a las concentraciones fisiológicas (0.1 nM). Concentraciones bajas de epinefrina (10nM) potencian la respuesta a otros agonistas. Tiene dos efectos diferentes en las plaquetas a través de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  (150-450 sitio/plaqueta):

1) Induce la agregación independientemente de la presencia extracelular de ADP o de cualquier otro estímulo

2) Inhibe a la enzima adenilato ciclasa.

Las plaquetas humanas también poseen receptores  $\beta_2$ , en menor proporción que receptores  $\alpha_2$ , (60 sitios/plaqueta) que estimulan a la enzima adenilato ciclasa. El efecto depende del número de receptores adrenérgicos  $\alpha_2$  y  $\beta_2$  que varía de especie a especie.

**Fibrinógeno.** Su presencia es indispensable para el proceso de agregación. Es una glucoproteína de 340 KDa, presente en plasma y en los gránulos  $\alpha$ . Es un hexámero de tres cadenas:  $A\alpha$ ,  $B\beta$  y  $\gamma$ , que están unidas covalentemente por puentes disulfuro. Tiene un dominio central (E) que contiene los grupos amino terminales de las seis cadenas polipeptídicas; los grupos carboxilo terminales están localizados en dos distintos dominios (D). Tres sitios de la molécula de fibrinógeno pueden interactuar con el receptor plaquetario GPIIb-IIIa: el grupo amino terminal de la cadena  $A\alpha$  (Gly-Pro-Arg-Val), la región terminal carboxilica de la cadena  $\gamma$  (secuencia 15-10) y la región carboxilo terminal de la cadena  $A\alpha$  (Arg-Gly-Asp). Una plaqueta activada une un promedio de 40000 moléculas de fibrinógeno. El tetrapéptido Arg-Gly-Asp-Ser es un antagonista potente del receptor de fibrinógeno y también inhibe la adhesión de la plaqueta a fibronectina y a vW. Los péptidos con grupos amino terminales de las cadenas  $A\alpha$  y  $B\beta$  del dominio central E son hidrolizados por trombina, formando fibrinopéptidos A y B, que ya no pueden unirse con el receptor.

En condiciones normales el receptor no está expuesto, se requiere un estímulo previo (ADP, epinefrina, trombina, colágena, ácido araquidónico, PAF, EPs/TxA<sub>2</sub>), así como la presencia de Ca<sup>2+</sup> (0.1-1 mM), que probablemente orienten apropiadamente grupos funcionales de la GP IIb. El AMPc así como un pH menor de 6.5 inhiben la interacción del fibrinógeno.

#### Mecanismos activadores e inhibidores de la función plaquetaria.

El mecanismo activador más importante en las plaquetas, está asociado a la hidrólisis enzimática de fosfolípidos de inositol: inositol 1,4,5, trifosfato (IP3) y 1,2 diacilglicerol (DG) (7). El principal mecanismo inhibidor está asociado al AMPc. Ambos mecanismos son iniciados por la ocupación de receptores en la superficie celular y traducidos internamente por la activación de proteínas G reguladoras, localizadas en la membrana y asociadas a una enzima para formar segundos mensajeros. Los segundos mensajeros ejercen sus acciones induciendo cambios conformacionales en proteínas específicas, ya sea directa o indirectamente por activación de proteincinasas.

La activación o inhibición fisiológica en las plaquetas se inicia cuando un mensajero extracelular interactúa con uno o varios receptores específicos localizados en la superficie celular. En la Figura 1 se presenta un esquema que muestra los mecanismos bioquímicos de activación e inhibición plaquetaria.

#### Proteínas G.

Las plaquetas como otras células poseen proteínas G transductoras que participan en la activación de enzimas específicas para generar segundos mensajeros intracelulares, efectores internos y la respuesta plaquetaria.

**Proteína Gp.** Participa en la activación de la fosfolipasa C (PLC) y en la formación de IP3 y DG, a través de receptores para vasopresina, PAF y EPs/TxA<sub>2</sub>.

**Proteína Gs.** Participa en la activación de adenilato ciclasa, incrementa la concentración intracelular de AMPc, esta unida al receptor de PGI<sub>2</sub>, PGD<sub>2</sub> y al receptor β adrenérgico.

**Proteína Gi.** Participa en la inhibición de adenilato ciclasa, bloquea la producción de AMPc a través de receptores α<sub>2</sub> adrenérgicos, receptor de trombina y del receptor a ADP.

Cada una de estas proteínas tiene tres subunidades (α, β y γ) unidas entre sí y asociadas a GDP a través de la subunidad α. Después del estímulo agonista sobre el receptor, GDP se disocia. En estas condiciones GTP en presencia de Mg<sup>2+</sup> se une a la subunidad α, separándose las subunidades β y γ. El complejo Gα-GTP interactúa con

una enzima que amplifica el mensaje y forma segundos mensajeros. Cuando la enzima GTP-asa, presente en la subunidad  $\alpha$ , hidroliza GTP a GDP, se interrumpe la señal y la subunidad  $\alpha$  se une nuevamente a las subunidades  $\beta\gamma$ .

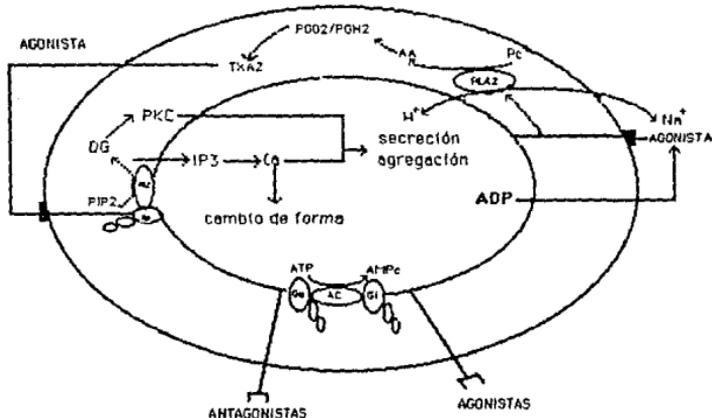


Figura 1. Mecanismos bioquímicos de estímulo e inhibición plaquetaria. Se presentan el sistema enzimático de fosfolipasa C (PLC) y de fosfolipasa A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) que desencadena mecanismos estimulantes así como el sistema de adenilato-cilcasa (AC) que desencadena un mecanismo inhibitorio de la actividad plaquetaria. Tomado de Blood 1989, 74: 1181.

#### Mecanismo Activador.

**Fosfolípidos de inositol y regulación de la concentración intracelular de calcio.**

En las plaquetas hay diversas formas de PLC. Se encuentran en las membranas y en el citoplasma y difieren en su afinidad por substratos, velocidades catalíticas y requerimiento de  $\text{Ca}^{2+}$ . La hidrólisis enzimática de fosfolípidos de inositol por

fosfolipasa C (PLC) genera dos potentes segundos mensajeros: Inositol 1,4,5 trifosfato (IP<sub>3</sub>) y 1,2 -sn-diacilglicerol (DG).

El IP<sub>3</sub> y el DG. inician diferentes mecanismos de activación plaquetaria. El IP<sub>3</sub> incrementa la concentración intracelular de calcio, el DG activa a proteínasasa C (PKC). Cada uno de estos eventos independientemente provocan activación plaquetaria, y juntos, sinérgicamente estimulan diversas respuestas incluyendo secreción y liberación de ácido araquidónico de los fosfolípidos de la membrana.

El IP<sub>3</sub> moviliza calcio del sistema tubular denso (retículo endoplásmico). Las plaquetas en reposo tienen una [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub> de ~ 100 nmol/L. Cuando se estimulan por agonistas, ésta se incrementa al orden micromolar. En las plaquetas en reposo el Ca<sup>2+</sup> se localiza principalmente en:

a) El complejo glicoprotéico de membrana IIb-IIIa con un recambio muy rápido (t<sub>1/2</sub> 0.7 min).

b) Un sitio localizado en el citosol, con un recambio rápido (t<sub>1/2</sub> 17 min), regulado por un intercambiador de membrana Na<sup>+</sup>/Ca<sup>2+</sup>.

c) El sistema tubular denso, con recambio lento (t<sub>1/2</sub> 300 min), dependiente de Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> ATPasa. Es de este sitio que el calcio es liberado al citoplasma después de una activación por agonistas.

El IP<sub>3</sub> se une a receptores específicos del sistema tubular denso. Esta ocupación del receptor abre un canal de calcio, sensible al pH, que permite movimientos de calcio en el citosol e inicia la respuesta celular (cambio de forma, agregación y secreción).

Otra molécula que ha sido considerada un segundo regulador del [Ca<sup>2+</sup>]<sub>i</sub>, es el inositol 1,2-(cíclico)-4,5 trifosfato. Se forma en aproximadamente 10 segundos después de la activación por trombina y también aumenta la liberación de calcio. Existe evidencia de movimientos de cationes divalentes a las plaquetas, como una función de anales canales operados por receptores.

El DG activa a la enzima proteínasasa C (PKC), e inicia su traslocación del citoplasma a la membrana, sitio donde se activa en presencia de calcio y fosfatidil serina. PKC en su forma activa tiene las siguientes funciones:

Induce el metabolismo de ácido araquidónico.

Facilita la unión de fibrinógeno al complejo Gp IIb-IIIa

Fosforila a la proteína 47 que polimeriza los filamentos de actina para la reorganización del citoesqueleto.

Fosforila a la proteína lipocortina inactivándola, (la lipocortina tiene actividad anti-PLA<sub>2</sub>).

La actividad de PKC es controlada por el metabolismo de DG, su actividad

declina paralelamente con la disminución de DG intracelular.

### Calcio y respuestas plaquetarias.

Algunos de los mecanismos efectores a través de los cuales el calcio regula las respuestas de las plaquetas son:

a) Activando el sistema contráctil: activa a la calmodulina, enzima dependiente de calcio que fosforila a la cadena ligera de miosina (su principal sustrato), lo que permite que la actina actúe sobre la miosina.

b) Modificando al citoesqueleto durante la agregación plaquetaria. En la activación de las plaquetas participan diferentes proteasas que dependen de calcio para su actividad.

c) La activación tanto de  $PLA_2$  como de PLC es dependiente de calcio.

d) La activación de PKC requiere de la presencia de calcio y fosfatidil serina.

### Tromboxano $A_2$ y ADP. Amplificación de la señal.

La formación de endoperóxidos y  $TXA_2$  y la secreción de ADP de los gránulos densos son mecanismos de retroalimentación positiva que amplifican la señal activadora (ver Figura 1).

### Mecanismo Inhibidor.

El mecanismo inhibidor más importante en plaquetas (7), está asociado al AMPc. Su síntesis está regulada por la enzima adenilato ciclasa a través de la proteína  $G_s$ . El aumento de la concentración intracelular de AMPc afecta tanto el inicio como el sostén de las respuestas estimulantes. Algunos de sus efectos son:

Antagoniza todas las respuestas dependientes de  $Ca^{2+}$ .

Inhibe a la fosfolipasa C y a la producción de IP3 y DG.

Induce el metabolismo de DG a fosfoinosítidos, disminuyendo la activación de PKC.

Disminuye la unión de trombina a las plaquetas .

### Respuestas Plaquetarias.

Las respuestas plaquetarias pueden clasificarse en dos categorías:

**Respuestas reversibles:** cambio de forma, adhesión y agregación reversible, acciones relacionadas con la función de cerrar los espacios entre las células endoteliales.

**Respuestas irreversibles:** agregación irreversible y secreción, acciones relacionadas con la función hemostática de las plaquetas. Inicialmente, en 2-3 seg, la membrana forma pliegues irregulares, se ensambla el citoesqueleto, los gránulos migran hacia el centro y la plaqueta adquiere una forma esférica, aumentando su área y probablemente incrementando su volumen. Después se inicia la formación de pseudópodos en 7-8 seg. Todos los estimulantes plaquetarios inducen cambios de forma completos, excepto la epinefrina y los ésteres de forbol (no aumentan la  $[Ca^{2+}]_i$ ). Los cambios de forma son independientes de la  $[Ca^{2+}]_i$ ; pueden iniciarse a bajas concentraciones de agonistas sin inicio de agregación y secreción. La actividad procoagulante de la plaqueta aumenta durante el cambio de forma, al facilitarse la unión de la trombina en la superficie plaquetaria.

La adhesión se lleva a cabo en dos etapas: primero la plaqueta se une al endotelio a través de pseudópodos y, posteriormente, al subendotelio, por una superficie de la membrana más extensa. *In vitro* puede adherirse a fibras de colágena o al vidrio y esta adhesión no se inhibe con prostaciclina. En condiciones fisiológicas los cambios de forma preceden a la agregación y secreción y es indispensable la previa formación de pseudópodos.

### Agregación Plaquetaria *in vitro*.

En la agregación plaquetaria *in vitro* pueden distinguirse dos tipos de respuestas:

La agregación primaria, reversible; inducida por bajas concentraciones de agentes estimulantes, en presencia de  $[Ca^{2+}]_i$ . El fibrinógeno se une al receptor pero después se disocia sin secreción del contenido de los gránulos.

La agregación secundaria, irreversible; inducida por concentraciones apropiadas de agonistas. Es una consecuencia de la secreción de los gránulos  $\alpha$  y de los gránulos densos. Los gránulos migran hacia el centro de la célula, se fusionan con el sistema canalicular y liberan su contenido, a través de los canales, a la superficie de la plaqueta. Se ha descrito otro mecanismo en el que los gránulos migran hacia la periferia de la célula, en donde forman multivesículas que se asocian y posteriormente se fusionan a la membrana, liberando su contenido hacia el exterior de la célula. La secreción de

lisosomas sólo ocurre con altas concentraciones de trombina o colágena. La secreción de los gránulos conduce a la formación de endoperóxidos y  $\text{TXA}_2$ .

### Sistema de Coagulación, fibrinolítico e inhibidores plasmáticos.

En resumen, cuando un vaso sanguíneo se lesiona, las plaquetas se adhieren a las fibras de colágena a través del factor  $\nu\text{W}$ ; otras plaquetas se agregan a esta primera capa, formando un agregado plaquetario. Existen receptores específicos en la superficie de las plaquetas que están acoplados a estructuras intracelulares; la unión receptor-agonista induce cambios característicos en el interior de la célula que activan las plaquetas, desaparece la banda marginal de microtúbulos que normalmente confiere la forma discoide, los gránulos de almacenamiento migran hacia el centro de la célula, se forman pseudópodos y se activan las enzimas fosfolipasa C y fosfolipasa  $\text{A}_2$ . La fosfolipasa C, produce difosfato diacilglicerol e inositol trifosfato a partir de fosfatidilinositol difosfato. El inositol trifosfato eleva la concentración intracitoplasmática de calcio y el diacilglicerol activa a la proteincinasa C.

La fosfolipasa  $\text{A}_2$ , libera ácido araquidónico el cual es convertido por la enzima ciclo-oxigenasa a endoperóxidos y a prostaglandinas, para formar tromboxano  $\text{A}_2$ , un potente agregante plaquetario y la prostaglandina  $\text{PGD}_2$ , la cual inhibe la agregación plaquetaria. El ADP también eleva la concentración citoplasmática de calcio, independientemente de la vía de la ciclo-oxigenasa.

La activación de las plaquetas por estos mecanismos conduce a la migración de los gránulos hacia el centro de la célula, por acción del aparato contráctil y secreción del contenido de los gránulos. En presencia de una concentración adecuada de calcio citoplasmático se fusionan las membranas de los gránulos con las membranas del sistema canalicular secretando su contenido al medio externo, pudiendo desencadenar un segundo ciclo de activación plaquetaria.

Las glicoproteínas específicas situadas en la membrana son receptores para proteínas plasmáticas. El complejo GP IIb-IIIa es el receptor para fibrinógeno y se manifiesta con cualquier agonista capaz de inducir agregación plaquetaria. La GP Ib es el receptor del factor de  $\nu\text{W}$ , que también puede interactuar, en menor medida, con la GP IIb-IIIa. También participan en la agregación plaquetaria la trombospondina y la fibronectina.

La activación es inhibida por el AMP cíclico. Las plaquetas contienen adenilato ciclasa, enzima que convierte ATP en AMPc. La adenilato ciclasa es estimulada por

la  $PGD_2$  producida en las plaquetas y por la  $PGI_2$  producida en las células endoteliales. El AMPc estimula a la bomba  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  ATPasa, que reduce la concentración de calcio citoplasmático, antagonizando el efecto de los agentes agonistas. En concentraciones suficientes el AMPc inhibe además de la agregación, la adhesión, la secreción y el cambio de forma. Otros inhibidores son la ADPasa y la trombomodulina presentes en el endotelio.

Durante la activación plaquetaria también se manifiestan lípidos de la membrana, que servirán como receptores a cofactores protéicos como el factor V, secretado por las plaquetas y también presente en el plasma. Funcionan como sitios de ensamblaje para enzimas en la superficie de las plaquetas, acelerando la activación del factor X y de la protrombina. Al mismo tiempo, algunas proteínas plasmáticas reaccionan con el subendotelio activando la fase de contacto de la coagulación. Los tejidos expuestos del sitio dañado proporcionan el factor tisular o tromboplastina para iniciar la fase extrínseca de la coagulación. El resultado es la formación de trombina, que a su vez acelera la activación de factor V y VIII y estimula la secreción plaquetaria. Estos eventos son atenuados tanto por las células endoteliales que sintetizan  $PGI_2$ , trombomodulina y polisacáridos heparinoides, como por proteasas plasmáticas tales como el inhibidor  $C_1$  para la fase de contacto (atenúa al factor XIIa, VIII y calicreína); la  $\alpha_1$ -antitripsina (atenúa al factor XIa), la antitrombina III (atenúa al factor IXa y Xa), la  $\alpha_2$ -macroglobulina y la proteína C que en presencia de un cofactor, la proteína S, atenúa a los factores V y VIII activados.

El principal sustrato para la trombina es el fibrinógeno que después de una hidrólisis inicial forma monómeros de fibrina que polimerizan para formar un coágulo que se estabiliza por uniones cruzadas covalentes inducidas por el factor XIIIa.

El plasminógeno presente en el plasma, se transforma en plasmina por la acción del activador tisular de plasminógeno, sintetizado por las células endoteliales. Normalmente la plasmina no actúa sobre el plasminógeno por la presencia de  $\alpha_2$ -antiplasmina, sin embargo la superficie del coágulo de fibrina está protegida del inhibidor y la fibrinólisis se lleva a cabo, para disolver el coágulo y formar productos de fragmentación de la fibrina.

## II EFECTO DE ESTROGENOS EN EL SISTEMA HEMOSTATICO.

Estudios epidemiológicos han mostrado que el empleo de estrógenos está asociado a trombosis e infarto al miocardio. Los primeros hallazgos, basados en la alta incidencia de enfermedad coronaria en personas del sexo masculino y no así en el

femenino, sugerían que los estrógenos endógenos deberían proteger a las mujeres contra aterosclerosis y trombosis. Mandoki (1) ha demostrado el efecto bifásico de los estrógenos en la coagulación sanguínea. Dosis elevadas administradas por vía intraperitoneal a ratón macho, alargan el tiempo de coagulación por un período hasta de 24 h.; posteriormente se observa un período de hipercoagulabilidad. Cuando los estrógenos se administran por vía subcutánea se observa únicamente el estado de hipercoagulabilidad.

Stamler demostró el efecto protector de los estrógenos conjugados, administrándolos a hombres que habían sufrido previamente un infarto al miocardio, a dosis elevadas (10 mg/día) (2), pero cuando se administraron en dosis menores (5 y 2.5 mg/día), la tendencia trombótica se elevó en lugar de disminuir (3). De manera similar el uso de estrógenos en el tratamiento de cáncer prostático incrementa tanto los accidentes trombóticos arteriales como hemorragias cerebrales. Actualmente, a las dosis empleadas, se ha establecido una relación entre los anticonceptivos orales, los accidentes hemorrágicos cerebrales y los eventos trombóticos. Intervienen también otros factores como la edad, tabaquismo, la dieta, la hipertensión y el sedentarismo.

Debe señalarse que los estrógenos exógenos presentes en los anticonceptivos tienen estructura química diferente a la de los estrógenos naturales, y que su metabolismo y efectos biológicos pueden diferir. No se sabe con certeza si el efecto trombótico es consecuencia del compuesto original o de alguno de sus metabolitos que se forman rápidamente (8-10).

Es probable que el efecto de los estrógenos o de alguno de sus metabolitos, sea el resultado de varios efectos sobre los componentes del mecanismo hemostático: endotelio, tono vascular, flujo sanguíneo, plaquetas, coagulación, fibrinólisis e inhibidores plasmáticos.

Favorecen la fragilidad capilar por sus acciones sobre endotelio vascular, es probable que las hemorragias cerebrales que se han observado con su empleo se deban a este mecanismo. Han aparecido también informes de trombosis e infarto al miocardio como efectos adversos de los anticonceptivos orales (11-16), en donde otros factores participan, incrementando los riesgos. El riesgo de infarto al miocardio no se incrementa después de haber suspendido el uso de anticonceptivos orales (17). El empleo de preparaciones farmacéuticas con menor cantidad de estrógenos y de progestágenos reduce los riesgos, pero no los elimina (18). Los estrógenos disminuyen el tono vascular y favorecen la estasis (19), retardando el flujo sanguíneo y facilitando la trombosis.

Se han publicado datos contradictorios sobre el efecto de estrógenos y

anticonceptivos orales sobre las funciones plaquetarias. Algunos autores informan de un incremento en la cuenta de plaquetas (20-22), adhesividad plaquetaria (26,28) y agregación plaquetaria (27,30,31). Otros no encuentran cambios significativos en la cuenta de plaquetas (23-25), adhesividad plaquetaria (24,27,30,32) o agregación plaquetaria (33-35). También se ha reportado la disminución en la adhesividad plaquetaria (29). Recientemente se ha descrito, en estudios en ratas, la disminución de la actividad de la enzima factor de activación plaquetaria-acetil hidrolasa por estrona, estradiol y estriol (30).

Los anticonceptivos orales incrementan la concentración de fibrinógeno (23, 31-34), la concentración de factor de Hageman (factor XII) (35) y, moderadamente, los factores II, VII, IX y X (23,29,42,35,43,36). No afectan la concentración de precalicreína (35,40), cininógeno de alto peso molecular (44), factor XI (43,44,33) VIII (23,24) y V (23,45). Incrementan también la cantidad de plasminógeno (23,43,45), así como la actividad fibrinolítica (23,27,32-34,45), efecto que puede estar relacionado con el aumento del factor XII (35).

La concentración de  $\alpha_2$ -antiplasmina no se modifica, se incrementa la concentración del inhibidor  $\alpha_1$ -proteínasa (inhibe al factor Xa) y la  $\alpha_2$ -macroglobulina (inhibe a la trombina); este hecho no podría representar un efecto protector de los estrógenos porque la disminución de estos inhibidores no se ha asociado a trombofilia (5).

La antitrombina III es un inhibidor plasmático cuya deficiencia en concentración o en actividad ha sido asociada a trombofilia. Se ha descrito que la concentración de antitrombina III (determinada por métodos antigénicos) es normal, pero su actividad (determinada por métodos funcionales) está disminuida, (deficiencia tipo II) en mujeres que toman anticonceptivos orales. La deficiencia aparece un mes después de haber iniciado el tratamiento y desaparece un mes después de haberlo suspendido y es mayor con las presentaciones que contienen de 75 a 150  $\mu$ g de mestranol o etinilestradiol que con las que contienen 50  $\mu$ g. Los progestágenos no disminuyen la actividad de la antitrombina III, a excepción del lynestrol que genera numerosos metabolitos con actividad estrogénica (14).

La proteína C y su cofactor la proteína S, proteínas con síntesis hepática dependiente de vitamina K, tienen un papel regulador en la coagulación y la fibrinólisis (46). La proteína C activada es una proteasa de serina que inactiva a los factores V y VIII activados, disminuyendo así la formación de trombina. También interactúa con el inhibidor del activador tisular de plasminógeno permitiendo que

exista una mayor concentración del activador tisular de plasminógeno. Favorece de esta manera, la formación de plasmina. Su cofactor la proteína S circula en forma libre o forma activa en 40 % y 60% se encuentra unida, reversiblemente, al complejo proteico C4b inhibidor del sistema del complemento. Durante el empleo de anticonceptivos orales se ha descrito una disminución de la concentración total de PS (46) y un aumento significativo de la concentración plasmática de proteína C (39). Es probable que la proteína C, al igual que otros factores de coagulación hepáticos dependientes de vitamina K, se incremente por un mecanismo similar (39).

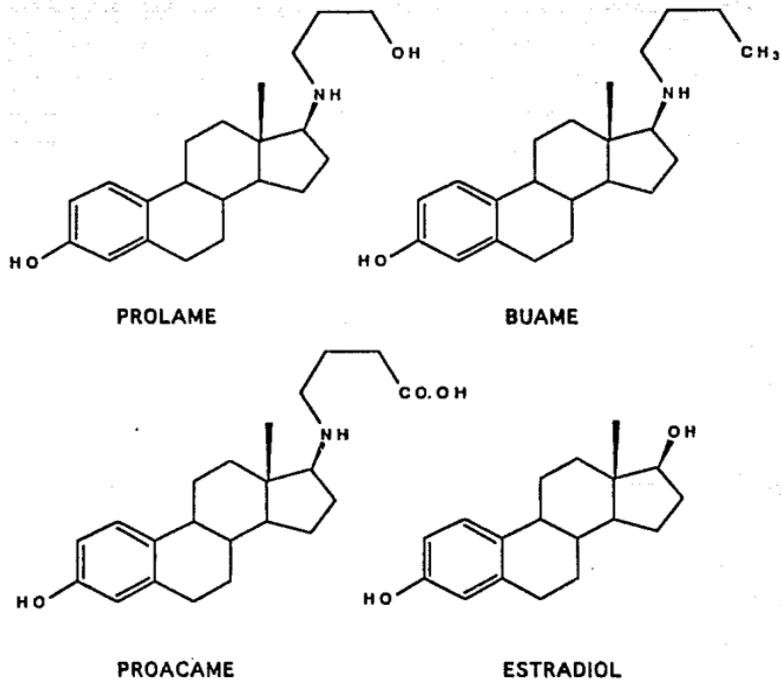
#### IV. OBJETIVO.

Se ha descrito el efecto trombofílico de los estrógenos naturales y sintéticos y el riesgo de sufrir accidentes tromboembólicos con su empleo.

En el proceso de coagulación, las plaquetas participan de una manera determinante a través de varios eventos coordinados: cambio de forma, adhesión, agregación, y secreción, que son el resultado de señales reconocidas en la superficie de la membrana y que desencadenan mecanismos estimulantes o inhibitorios mediante segundos mensajeros.

En la búsqueda de nuevos estrógenos que no favorezcan la trombofilia, se sintetizaron en el Instituto de Química de la UNAM por J.M. Fernández-G.(47,48), estrógenos modificados en la posición 17 $\beta$ : N-(3-hidroxi-1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -il-3-hidroxiopropilamina. (prolame); N-(3-hidroxi-1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -il-3-butilamina.(buame); N-(3-hidroxi-1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -il-3-carboxiopropilamina, (proacame), Figura 2.

El presente trabajo de tesis tiene por objeto determinar el efecto de estos estrógenos modificados y compararlo con el de estradiol 17- $\beta$  (Figura 2), a concentraciones equimoleculares. En este estudio se usarán diversos agentes agregantes: adenosindifosfato (ADP), epinefrina y colágena, con el fin de esclarecer el mecanismo de acción de los efectos observados.



**Figura 2.**  
**Estructura de prolame, buame, proacame y estradiol 17β.**

## V. PARTE EXPERIMENTAL.

### MATERIAL Y METODOS .

#### SINTESIS DE LOS COMPUESTOS.

Los compuestos fueron sintetizados por el Dr. Juan Manuel Fernández-G. del Instituto de Química de la UNAM. Los puntos de fusión no corregidos y los espectros de resonancia magnética nuclear, infrarrojo (en pastilla de KBr) y de masas se determinaron respectivamente en un aparato de Fisher-Johns, un espectrómetro Varian Gemini 200, un espectrofotómetro Perkin-Elmer 283-B y un espectrómetro de masas Hewlett-Packard modelo 5985.

**Prolame:** N-(3-Hidroxi-1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -il)-propanolamina. La síntesis ha sido descrita previamente (47,48).

**Buame:** N-(3-Hidroxi-1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -il)-butilamina. Se obtuvo por métodos ya descritos (63,64), punto de fusión 104 °C. El espectro de masas muestra  $M^+$  = 327 m/e, pico base = 112 m/e. El espectro de infrarrojo muestra una banda ancha centrada en 3420  $\text{cm}^{-1}$ , (OH y NH ) y otra en 1605  $\text{cm}^{-1}$  (NH). El espectro de resonancia magnética nuclear protónica, determinado en  $\text{CDCl}_3$ , utilizando tetrametilsilano como referencia interna, muestra las siguientes señales (ppm): 0.85 (t), 1.15-1.50 (m), 1.55-1.85 (m), 2.0 (s), 2.1-2.3 (m), 6.6 (m), 7.05 (d). Análisis elemental para  $\text{C}_{22}\text{H}_{33}\text{NO}$ .

**Proacame:** Acido N-(3-Hidroxi-1,3,5(10)-estratrien-17 $\beta$ -il)-3-amino-butírico. Se obtuvo por los métodos descritos para el compuesto anterior; punto de fusión desconocido;  $M^+$  = como este compuesto desconocido no fue posible determinar su espectro de masas. El espectro de infrarrojo muestra una banda muy ancha en el intervalo 3460-3140  $\text{cm}^{-1}$ , (OH y NH ) no se observa la banda del carbonilo del ácido carboxílico, sino otra centrada en 1560  $\text{cm}^{-1}$  que corresponde a la vibración asimétrica de estiramiento de un anion carboxilato (65) es decir el proacame se encuentra en forma de zwitterion. El espectro de resonancia magnética nuclear protónica, determinado en  $\text{CDCl}_3$ , utilizando tetrametilsilano como referencia interna, muestra las siguientes señales (ppm): 0.7 (s), 1.15-2.5 (m), 6.6 (m), 7.05 (d). Análisis elemental para  $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{NO}_3$ .

## PLAQUETAS.

En cada determinación se empleó la sangre de cuatro donadores que acudieron al banco de sangre del Instituto Nacional de Cardiología "Ignacio Chávez". Los donadores eran sanos, del sexo masculino, entre 20 y 50 años de edad de más de 50 Kg. de peso, con al menos 6 horas de sueño, en ayuno desde la noche anterior, que no hubieran ingerido bebidas alcohólicas en las últimas 24 horas ni recibido medicamentos, en particular analgésicos anti-inflamatorios por lo menos dos semanas antes del estudio.

La sangre se colectó por venopunción, a la misma hora en cada experimento (8-9 a.m.), en tubos de plástico de polipropileno que contenían citrato de sodio (citric acid trisodium salt dihydrate, Merck) al 3.8 % (0.1 M), en una proporción 1:9, como anticoagulante. El plasma rico en plaquetas (PRP), se separó por centrifugación durante 4 minutos a  $140 \times g$ . a temperatura ambiente ( $20-24^\circ C$ ). Los plasmas se mezclaron tomando posteriormente 2 ml de cada tubo de plasma rico en plaquetas. La cuenta se ajustó a 200,000 plaquetas/ $\mu l$ . El plasma pobre en plaquetas (PPP) se obtuvo con el remanente de sangre, que se centrifugó a  $1000 \times g$  durante 15 minutos a temperatura ambiente y se hizo una mezcla también de 1 ml de cada tubo de plasma pobre en plaquetas.

Las determinaciones se hicieron dentro de las siguientes 2 horas a la toma de la muestra de sangre, en un lumi-agregómetro de dos canales marca Chrono-log Mod 703, a  $37^\circ C \pm 0.3$ , en cubetas de 0.312" de diámetro, con agitación continua utilizando un imán revestido de teflón. Los compuestos se disolvieron en dimetilsulfóxido (Baker).

A 400  $\mu l$  de PRP se adicionó el estrógeno a probar en un volumen fijo de 5  $\mu l$  e inmediatamente después el agente inductor de la agregación plaquetaria ADP, colágena o epinefrina (Sigma Co.), sin permitir un intervalo mayor de 5 segundos.

El voltaje resultante de la transmisión simultánea de luz infrarroja a través del PRP y el PPP fué registrado en papel en un registrador Fisher Recordall Series 5000 a una velocidad de 2.5 cm/min. El tiempo de registro fue siempre el mismo para cada agente estimulante; al final del mismo se midió el máximo de agregación en una escala con unidades arbitrarias.

Los trazos de agregación obtenidos con el PRP, disolvente y agente agregante fueron considerados como 100% y se compararon con los obtenidos con los amino-estrógenos, prolame, buame, procame y estradiol-17 $\beta$  (Syntex) a concentraciones equimoleculares entre 1.25  $\mu M$  y 395  $\mu M$ .

## VI. RESULTADOS.

A continuación se muestran las curvas de agregación plaquetaria obtenidas con prolame, buame, proacame y estradiol 17- $\beta$ , inducidas con ADP 5 $\mu$ M, epinefrina 10  $\mu$ M o colágena 50  $\mu$ g/ml.

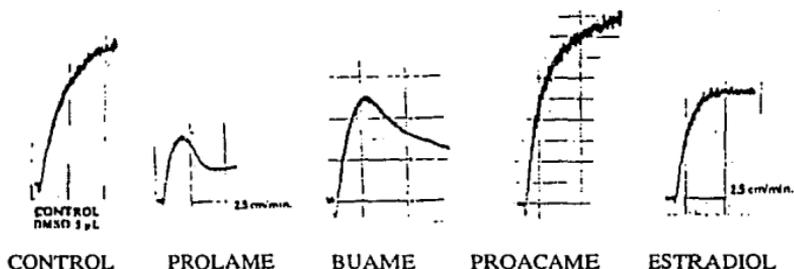


Figura 3. Registro de las curvas de agregación plaquetaria inducida con ADP 5 $\mu$ M en presencia de 395  $\mu$ M de prolame, buame, proacame y estradiol y de 5 $\mu$ l de DMSO como control.

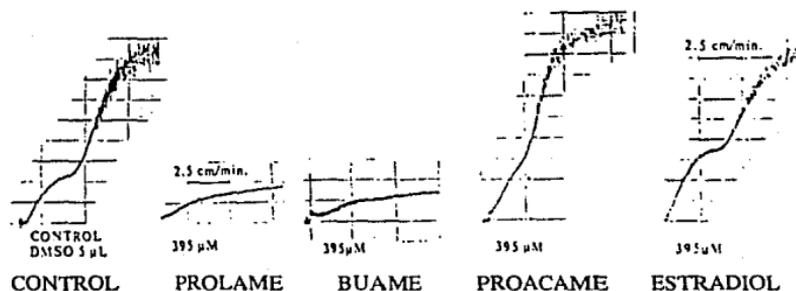


Figura 4. Registro de las curvas de agregación plaquetaria inducida con epinefrina 10 $\mu$ M en presencia de 395  $\mu$ M de prolame, buame, proacame y estradiol y de 5 $\mu$ l de DMSO como control.

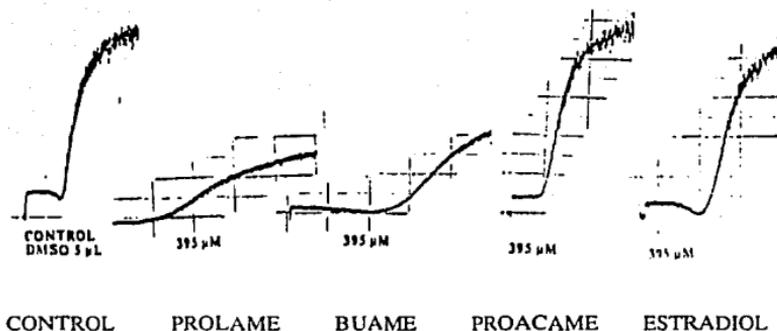


Figura 5. Registro de las curvas de agregación plaquetaria inducida con colágena 50 µg/ml en presencia de 395 µM de prolame, buame, proacame y estradiol y de 5µl de DMSO como control.

Prolame y buame a concentraciones de 125 µM o mayores producen una inhibición significativa de la agregación plaquetaria inducida con ADP, epinefrina y colágena. Proacame y estradiol no tienen efecto significativo sobre la agregación plaquetaria a las concentraciones estudiadas.

En las TABLAS III, IV y V se tabulan los resultados expresados como promedios de agregación plaquetaria en unidades arbitrarias  $\pm$  desviaciones estandar. Se realizó la prueba estadística de Dunnett.

TABLA III

Compuesto, $\mu$ M	n	$\bar{y} \pm Sv.$	% Agregación	P
Estradiol 1.25	7	39.6 $\pm$ 7.24	96.7	>0.05
Prolame 1.25	7	39.3 $\pm$ 6.16	94.4	>0.05
Buame 1.25	11	38.1 $\pm$ 6.02	92.3	>0.05
Proacame 1.25	5	49.2 $\pm$ 7.56	108.7	>0.05
Estradiol 12.5	11	40.0 $\pm$ 7.35	96.7	>0.05
Prolame 12.5	15	42.5 $\pm$ 7.18	102.2	>0.05
Buame 12.5	14	41.0 $\pm$ 7.79	99.5	>0.05
Proacame 12.5	6	46.2 $\pm$ 3.19	100.5	>0.05
Estradiol 39.5	7	42 $\pm$ 7.68	102.4	>0.05
Prolame 39.5	11	37.8 $\pm$ 5.07	90.9	>0.05
Buame 39.5	13	39.3 $\pm$ 4.3	95.3	>0.05
Proacame 39.5	6	45.6 $\pm$ 6.35	100.9	>0.05
Estradiol 125	12	41.8 $\pm$ 8.63	102	>0.05
Prolame 125	17	25.2 $\pm$ 7.23	60.6	<0.01
Buame 125	14	31.9 $\pm$ 5.82	77.4	<0.01
Proacame 125	7	44 $\pm$ 4.09	97	>0.05
Estradiol 395	9	34.3 $\pm$ 6.90	83.7	>0.05
Prolame 395	9	20.4 $\pm$ 3.91	49.0	<0.01
Buame 395	10	26.7 $\pm$ 2.91	67.7	<0.01
Proacame 395	8	47.3 $\pm$ 5.95	104.6	>0.05

Agregación plaquetaria en unidades arbitrarias  $\pm$  desviación estandar en presencia de estradiol, prolame, buame y proacame a concentraciones entre 1.25  $\mu$ M y 395  $\mu$ M. Se empleó ADP 5  $\mu$ M como agente inductor y 5  $\mu$ l de DMSO como control (42.2 $\pm$ 1.9 = 100%)

TABLA IV

Compuesto, $\mu\text{M}$	n	$\bar{y} \pm \text{Sv.}$	% Agregación	P
Estradiol 1.25	7	$43.2 \pm 5.75$	95.7	>0.05
Prolame 1.25	6	$44 \pm 3.24$	107.1	>0.05
Buame 1.25	5	$49.6 \pm 6.69$	106.4	>0.05
Proacame 1.25	5	$45 \pm 2.91$	98.4	>0.05
Estradiol 12.5	10	$41.3 \pm 4.78$	91.5	>0.05
Prolame 12.5	9	$34.5 \pm 9.4$	84.2	>0.05
Buame 12.5	6	$43.8 \pm 12.5$	93	>0.05
Proacame 12.5	5	$41.4 \pm 6.26$	90.5	>0.05
Estradiol 39.5	12	$43.8 \pm 5.48$	97.1	>0.05
Prolame 39.5	9	$29.4 \pm 13.9$	71.8	>0.05
Buame 39.5	7	$38.4 \pm 11.9$	82.4	>0.05
Proacame 39.5	6	$45.5 \pm 4.5$	99.5	>0.05
Estradiol 125	12	$41.9 \pm 5.88$	92.9	>0.05
Prolame 125	8	$22.4 \pm 17$	54.6	>0.05
Buame 125	9	$30.6 \pm 16.8$	65.6	>0.05
Proacame 125	6	$42 \pm 4.85$	91.9	>0.05
Estradiol 395	8	$40.6 \pm 10.9$	90	>0.05
Prolame 395	5	$4 \pm 6.5$	9.7	<0.01
Buame 395	11	$4.7 \pm 4.9$	11	<0.01
Proacame 395	5	$42 \pm 6.2$	91.9	>0.05

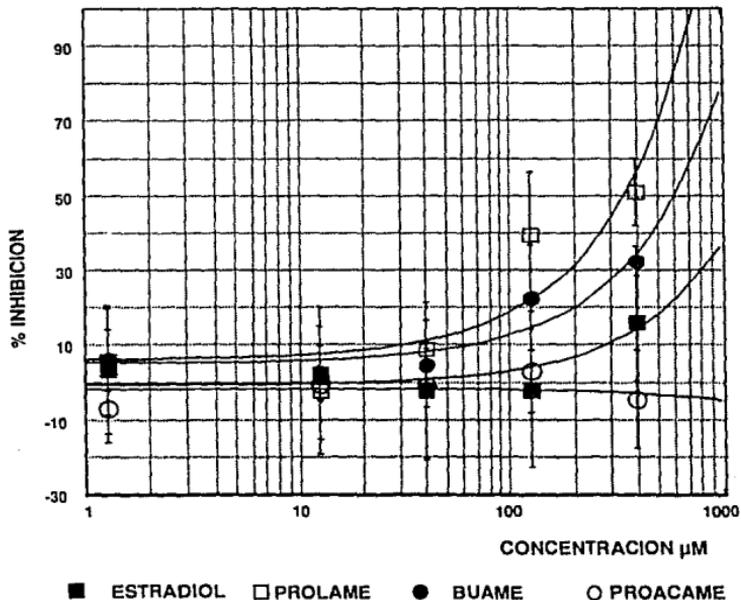
Agregación plaquetaria en unidades arbitrarias  $\pm$  desviación estandar en presencia de estradiol, prolame, buame y proacame a concentraciones entre 1.25  $\mu\text{M}$  y 395  $\mu\text{M}$ . Se empleó epinefrina 10  $\mu\text{M}$  como agente inductor y 5  $\mu\text{l}$  de DMSO como control (44.6  $\pm$  2.4 = 100%)

TABLA V

Compuesto, $\mu\text{M}$	n	$\bar{y} \pm \text{Sv.}$	% Agregación	P
Estradiol 1.25	5	42.4 $\pm$ 2.7	97.6	>0.05
Prolame 1.25	6	41.8 $\pm$ 5.94	91.8	>0.05
Buame 1.25	5	43 $\pm$ 2.34	98.6	>0.05
Proacame 1.25	7	42.5 $\pm$ 6.9	95	>0.05
Estradiol 12.5	5	39.2 $\pm$ 2.38	90.3	>0.05
Prolame 12.5	9	41.5 $\pm$ 4.8	91.2	>0.05
Buame 12.5	7	41.1 $\pm$ 3.8	94.6	>0.05
Proacame 12.5	7	40.5 $\pm$ 3.4	90.6	>0.05
Estradiol 39.5	5	39 $\pm$ 2.58	89.8	>0.05
Prolame 39.5	9	42.8 $\pm$ 6.6	94	>0.05
Buame 39.5	7	40 $\pm$ 2.3	91.7	>0.05
Proacame 39.5	6	39.6 $\pm$ 3.2	88.5	>0.05
Estradiol 125	8	42.3 $\pm$ 1.5	97.4	>0.05
Prolame 125	8	39.3 $\pm$ 4.78	86.4	>0.05
Buame 125	6	34.3 $\pm$ 2.25	78.6	<0.01
Proacame 125	6	42 $\pm$ 2.78	94.3	>0.05
Estradiol 395	8	43.8 $\pm$ 2.41	100.9	>0.05
Prolame 395	6	17 $\pm$ 5.51	37.3	<0.01
Buame 395	5	17.5 $\pm$ 2.3	11	<0.01
Proacame 395	9	42.4 $\pm$ 3.3	94.8	>0.05

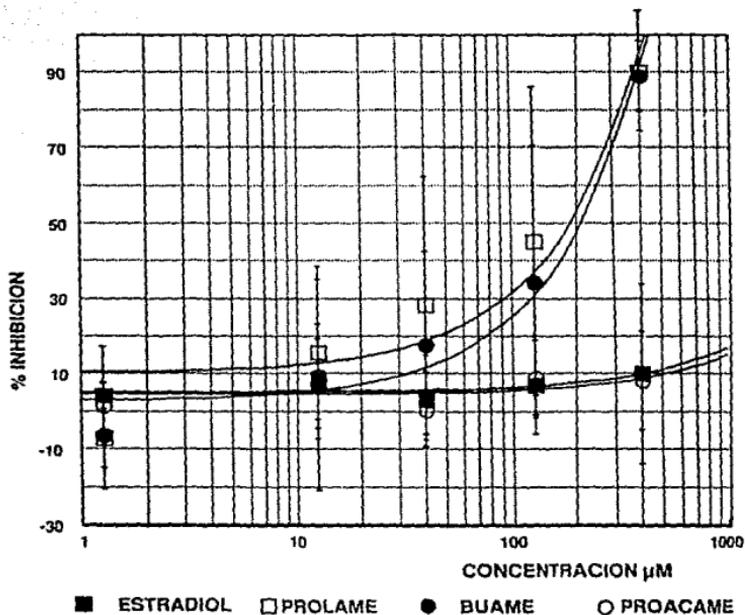
Agregación plaquetaria en unidades arbitrarias  $\pm$  desviación estandar en presencia de estradiol, prolame, buame y proacame a concentraciones entre 1.25  $\mu\text{M}$  y 395  $\mu\text{M}$ . Se empleó colágena 50  $\mu\text{g/ml}$  como agente inductor y 5  $\mu\text{l}$  de DMSO como control (44.3 $\pm$ 1 = 100%)

En las GRAFICAS I, II y III se presentan los porcentajes de inhibición de agregación plaquetaria  $\pm$  desviaciones estandar en porciento obtenidos con prolame, buame, proacame y estradiol 17- $\beta$ .



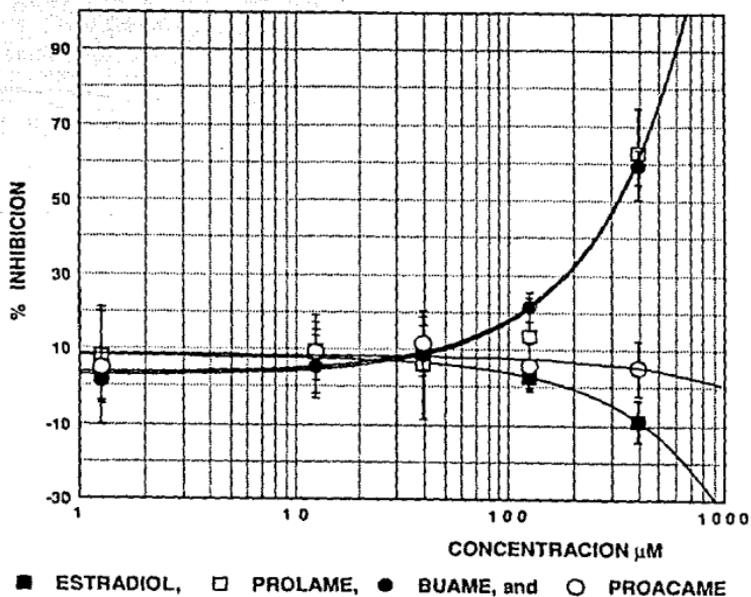
GRAFICA I.

Se muestra el % de inhibición de la agregación plaquetaria inducida con ADP 5  $\mu\text{M}$ . A la concentración de 125 y 395  $\mu\text{M}$  prolame y buame inhiben significativamente la agregación plaquetaria. Estradiol y proacame carecen de efecto inhibitorio.



GRAFICA II.

Se muestra el % de inhibición de la agregación plaquetaria inducida con epinefrina 10  $\mu\text{M}$ . A la concentración de 125 y 395  $\mu\text{M}$  prolame y buame inhiben significativamente la agregación plaquetaria. Estradiol y proacame carecen de efecto inhibitorio.



GRAFICA III.

Se muestra el % de inhibición de la agregación plaquetaria inducida con colágena 50 µg/ml. A la concentración de 125 y 395 µM prolame y buame inhiben significativamente la agregación plaquetaria. Estradiol y proacame carecen de efecto inhibitorio.

## VII. DISCUSION DE RESULTADOS Y CONCLUSION.

Los resultados muestran (Figura 3) que en presencia de 395  $\mu\text{M}$  de prolame y buame se inicia la primera fase de agregación plaquetaria por ADP, producida por un flujo de calcio al interior de las plaquetas en 10-20 mseg que está asociado a canales de calcio operados por receptores (58). Sin embargo, la segunda fase de agregación que coincide con la liberación intracelular de calcio de sitios de almacenamiento (59) se inhibe significativamente por estos compuestos.

El prolame y el buame, a una concentración de 395  $\mu\text{M}$  (Figuras 4 y 5) inhiben notablemente la agregación plaquetaria inducida por epinefrina y colágena, lo que indica que no se libera calcio intracelular porque tanto la epinefrina como la colágena no incrementan directamente la concentración intracelular de calcio en las plaquetas (58). Su mecanismo es indirecto, liberan ácido araquidónico de la membrana celular, que es convertido a tromboxano  $\text{A}_2$  el cual, a su vez, inicia un mecanismo de retroalimentación y estimula a la enzima PLC para formar IP3 (libera calcio de los sitio de almacenamiento intracelulares) y DG.

Proacame carece de efecto inhibitorio sobre la agregación plaquetaria inducida con ADP, epinefrina y colágena. Estos datos concuerdan con los resultados en experimentos in vivo, en los que se estudió el efecto de prolame (53), buame y proacame (54) sobre el tiempo de coagulación. Los resultados mostraron que el prolame incrementa 100 % el tiempo de coagulación, el buame 35.8 % y el proacame en contraste, lo acorta 24 %.

Estradiol a las concentraciones estudiadas carece de efecto inhibitorio sobre la agregación plaquetaria inducida con ADP, epinefrina y colágena. A la concentración de 395  $\mu\text{M}$  en la agregación inducida con ADP se observa una tendencia no significativa a inhibir la agregación. Sin embargo a la misma concentración en la agregación inducida con colágena exhibe una tendencia a incrementarla.

Se ha descrito (49) el siguiente mecanismo genómico para las hormonas esteroidales. Difunden en forma pasiva a través de la membrana celular y se acoplan a un receptor específico. El complejo receptor-hormona se dirige y une al DNA, aumentando la transcripción de los RNAm codificados por el gene al cual esta unido. Los RNAm son traducidos en los ribosomas y dirigen la formación de nuevas proteínas que modifican la función celular.

También se conocen efectos de los estrógenos que no pueden ser relacionados al proceso de transcripción, es decir, no involucran modificaciones en la síntesis de proteínas y son considerados no-genómicos.

Se ha propuesto (52) que el tiempo que transcurre para observar los efectos de los esteroides es un parámetro para distinguir los efectos genómicos de los no genómicos. Los efectos no genómicos, tienen un inicio rápido de segundos o minutos y una duración corta que finaliza cuando desaparece el esteroide del tejido. En cambio, los efectos genómicos tienen un inicio lento de horas o minutos y su efecto persiste después que desaparece el esteroide.

La membrana plasmática es uno de los sitios de acción directa de los estrógenos, ya que en fracciones de membrana de miocitos de útero y en membranas de pituitaria de rata se identificaron sitios de unión de alta afinidad.

La interacción de estradiol con la membrana plasmática puede hacerse a través de receptores o enzimas o influir en la permeabilidad celular.

Una interrogante aún no esclarecida es la naturaleza de los sitios de unión de los esteroides en la membrana. Es posible que sean de naturaleza protéica o es posible también que actúen sobre los componentes lípidicos de la membrana. Un estudio que empleó las técnicas de calorimetría diferencial de barrido, difracción de rayos X de ángulo pequeño y  $^2\text{H}$  resonancia magnética nuclear de estado sólido (61) mostró que el anestésico de naturaleza esteroideal alfaxolona actúa sobre los lípidos de la membrana; se incorpora a la interfase de la membrana plasmática en la región donde están orientados los grupos polares de los fosfolípidos y que su isómero inactivo D16 alfaxolona no se incorpora en la bicapa lipídica.

En menos de 3 minutos pueden ser detectados cambios en la permeabilidad al  $\text{Ca}^{2+}$ , en células de útero en suspensión con estradiol  $10^{-9}$  M. También se han observado cambios inmediatos en la actividad eléctrica neuronal en rebanadas de cerebro o en sinaptosomas (50,51), así como efectos sobre sistemas enzimáticos aislados.

Las plaquetas son células que carecen de núcleo y los efectos inhibidores de prolame y buame y estimulante de proacame sobre la agregación plaquetaria se presentan segundos después de adicionar el agente inductor. Estos son motivos por los que se propone que el efecto observado es un efecto directo no genómico

Las diferencias observadas en cuanto a potencia de prolame y buame y actividad de proacame pueden ser consecuencia de las propiedades estructurales, electrónicas y geométricas de los substituyentes en la posición 17 $\beta$  de la estructura esteroideal (Figura 6). Algunas consideraciones cualitativas de prolame buame y proacame son

las siguientes:

**Pares electrónicos.** El proacame presenta una banda de absorción en  $1560\text{ cm}^{-1}$  en su espectro de infrarrojo, que indica la presencia de un grupo carboxilo disociado lo que sugiere la presencia, en este grupo funcional, de ocho pares electrónicos libres >Prolame presenta dos pares electrónicos libres en el correspondiente grupo funcional oxhidrilo> Buame carece de par electrónico libre ya que el grupo funcional correspondiente es un metilo (ver Figura 6).

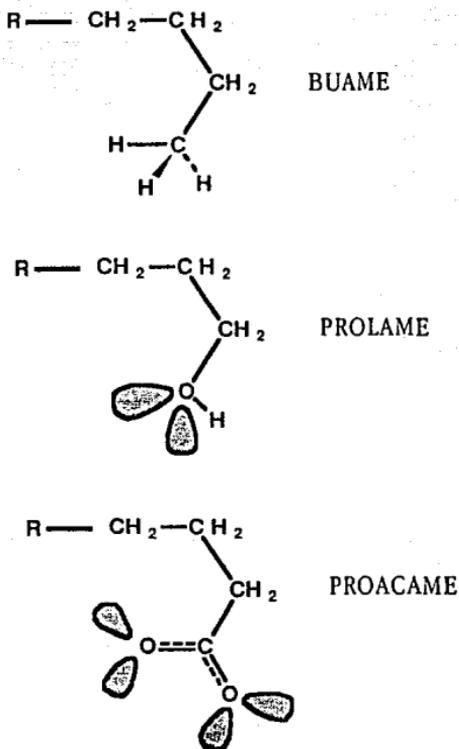
**Polaridad** Proacame > Prolame > Buame.

**Volumen del radical en 17B** Proacame > Prolame (considerando los dos pares de no unión del oxígeno del OH terminal) > Buame

Tomando en cuenta estas consideraciones es posible que la polaridad y el volumen de radical que presentan prolame y buame les confieran las propiedades adecuadas que podrían modificar la actividad de la membrana plasmática y la actividad de sistemas enzimáticos que están involucrados en el incremento intracelular de calcio.

La exposición de receptores de la membrana plaquetaria para el fibrinógeno, la proteína IIb-IIIa, es un proceso que depende de la liberación de calcio intracelular (60). A través de estos receptores se unen las fibras de fibrina que se están generando en la fase plasmática de la coagulación. Estos puentes de fibrina son los responsables de mantener la agregación plaquetaria. Los resultados con prolame y buame sugieren que impiden indirectamente la exposición del receptor IIb-IIIa y por lo tanto la agregación de las plaquetas a través de los puentes de fibrina.

En conclusión los resultados sugieren que algunos amino-estrógenos, tendrían la ventaja de reducir el riesgo de accidentes trombo-embólicos que se presentan durante el empleo de estrógenos como anticonceptivos o durante el tratamiento antineoplásico. Con el fin de comprobar el mecanismo propuesto es necesario continuar con estudios en los que se mida el flujo de calcio en las plaquetas, en presencia de prolame, buame y proacame y de otros amino-estrógenos. Es también importante probar otros amino-estrógenos substituidos en C17 para explorar con mayor amplitud las relaciones estructura química-actividad biológica.



**Figura 6.**  
**Propiedades electrónicas y geométricas del grupo terminal del radical en la posición 17B.**

### VIII. BIBLIOGRAFIA

- 1 Mandoki J.J., Zavala E., Silva G., Mendoza-Patiño N., Rubio-Póo C., Medina-Martínez S., Domínguez-Escoto P.: The dual effect of estrogens on blood clotting time. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 1983; 26: 45.
- 2 Stamler J., Pick R., Katz L.N., Pick A., Kaplan B.M., Berkson, D.M., Century D. *JAMA.* 1963; 183: 632.
- 3 The Coronary Drug Project Research Group. Findings leading to discontinuation of the 2.5 mg/day estrogen groups. *JAMA* 1973; 226:652.
- 4 Engelberg H.: Endothelium in Health and Disease. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* 1989;15: 178.
- 5 Robert W. Colman, Jack Hirsh, Victor J. Marder, Edwin W. Salzman. *Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice.* 2<sup>o</sup> Edition. J.B. Lippincott Company, Philadelphia, Pennsylvania, 1987.
- 6 Siess W.: Molecular Mechanisms of Platelet Activation. *Physiological Reviews* 1989; 69: 58.
- 7 Kroll M.H., Schaffer A.I.: Biochemical Mechanisms of Platelet Activation. *Blood* 1989; 74: 1181.
- 8 Bolt H.M., Bolt W.H.: Pharmacokinetics of mestranol in man in relation to its oestrogenic activity. *Eur. J. Clin. Pharmacol.* 1974; 7: 295.
- 9 Bolt H.M.: Metabolism of estrogens natural and synthetic. *Pharmacol. Ther.* 1979; 4: 166.
- 10 Fishman J., Bradlow H.L., Schneider J.: Radiometric analysis of oxidations in man. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1980; 77: 4957.
- 11 Startwell P.E., Masi A.T., Arthes F.G.: Thromboembolism and oral contraceptives an epidemiologic case-control study. *Am. J. Epidemiol.* 1969; 90: 365.

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

- 12 Vessey M.P., Doll R.: Investigation of relation between use of oral contraceptives and thromboembolic disease: a further report. *Br. Med. J.* 1969; 2: 261.
- 13 Mann J.I., Vessey M.P., Thorogood., Doll R.: Myocardial infarction in young women with special reference to oral contraceptive practice. *Br. J. Med.* 1975; 1: 241.
- 6a Barrett-Connor, E., Bush, T.: Estrogen and coronary heart disease in women. *J.A.M.A* 1991; 265: 1861.
- 6 Rosenberg, L., Palmer, J.R., Lesko, S.M., Shapiro, S.,: Oral contraceptive use and the risk of myocardial infarction. *Am. J. Epidemiol.* 1990; 131: 1009.
- 14 Stadel B.V.: Oral contraceptives and cardiovascular disease. First part. *N Engl J Med* 1981; 305: 612.
- 15 Stadel B.V.: Oral contraceptives and cardiovascular disease. Second part. *N Engl J Med* 1981; 305: 672.
- 16 Shapiro S., Slone D., Rosenberg L.: Oral contraceptive use in relation to myocardial infarction. *Lancet* 1979; 1: 743.
- 17 Rosenberg, L., Palmer, J.R., Lesko, S.M., Shapiro, S.,: Oral contraceptive use and the risk of myocardial infarction. *Am. J. Epidemiol.*:1990; 131: 1009.
- 18 Bottiger L.E., Bowman G., Eklund G., Westerholm B.: Oral contraceptives and thromboembolic disease: Effects of lowering estrogens content. *Lancet* 1980; 1: 1097.
- 19 Goodrich E.M., Wood J.E.: Peripheral venous distensibility and velocity of venous blood flow during pregnancy or during oral contraceptive therapy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1964; 90:740.
- 20 Margulis R.R., Ambrus J.L., Mink I.B., Stryker J.C.: Progestational agents and blood coagulation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1965; 93:161.
- 21 Miller S.P., Lee S.L., Ritz N.: Progestin-estrogen therapy and the hemostatic mechanism, a controlled study. *Metabolism* 1965; 14:398.

22 Ygge J, Brody S., Korsan-Bengtzen K., Nilsson L.: Changes in blood coagulation and fibrinolysis in women receiving oral contraceptives. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1969; 104: 87.

23 Meade T.W., Brozovic M., Chakrabarti R.: An epidemiological study of the haemostatic and other effects of oral contraceptives. *Br. J. Haematol.* 1976; 34: 353.

24 Nilsson I.M., Kullander S.: Coagulation and fibrinolytic studies during use of gestagens. *Acta. Obstet. Gynaecol. Scand.* 1967; 46:286.

25 Tsakok F.H., Koh S., Ratnam S.S.: Effects of oral contraceptives containing 50 µg estrogen on blood coagulation in non-Caucasian women. *Contraception* 1980; 21:505.

26 Adams J.H., Mitchell J.R.A., Sopitt G.D.: Effect of oral contraceptives on lipoprotein activity and platelet stickiness. *Lancet* 1970; 2: 233.

27 Farbiszewski R., Kurowska T.: Platelet adhesiveness, aggregation and fibrinolysis after the oral administration of the contraceptive "Lyndiol". *Throm. Diath. Haemorrh.* 1970;24: 304.

28 Gaspary E.A., Peberdy M.: Oral contraception and blood platelet adhesiveness. *Lancet* 1965; 1: 1142.

29 Ygge J., Brody S., Korsan-Bengtzen K., Nilsson L.: Changes in blood coagulation and fibrinolysis in women receiving oral contraceptives. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1969; 107: 87.

30 Yasuda K., Johnston J.M.: The hormonal regulation of platelet-activating-factor-acetylhydrolase in the rat. *Endocrinology* 1992; 130: 708.

31 Ambrus J.L., Nieswander K.R., Courey N.G.: Progestational agents and blood coagulation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1969; 103: 994.

32 Ball A.P., Mckee P.A.: Fibrin formation and dissolution on women receiving oral contraceptive drugs. *J. Lab. Clin. Med.* 1977; 80: 751.

33 Donayre J. Pincus G.: Effects of Enovid on blood clotting factors. *Metabolism* 1965; 14: 418.

34 Poller L.: Oral contraceptives, blood clotting and thrombosis. *Br. Med. Bull.* 1978; 34: 151.

35 Gordon E.M., Ratnoff O.D., Saito H.: Rapid fibrinolysis, augmented Hageman factor (factor XII) titres and decreased C1 esterase inhibitor titres in women taking oral contraceptives. *J. Lab. Clin. Med.* 1980; 96:762.

36 Ambrus J.L., Nieswander K.R., Courey N.G.: Progestational agents and blood coagulation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1969; 103: 994.

37 Donayre J. Pincus G.: Effects of Enovid on blood clotting factors. *Metabolism* 1965; 14: 418.

38 Rutherford R.N., Hougie C., Banks A.L., Coburn W.A.: The effects of sex steroids and pregnancy on blood coagulability. *Obstet. Gynecol.* 1964; 24:886.

39 Meade T.W., Stirling, Y., Wilkes, H., Mannucci, P.M.: Effects of oral contraceptives and obesity on protein C antigen. *Thromb. Haemostas.* 1985; 53 :198.

40 Poller L., Thompson J.M., Tabiowo A., Priest C.M.: Progesterone oral contraception and blood coagulation. *Br. Med. J.* 1969; 1: 559.

41 Egeberg O., Owren P.A.: Oral contraception and blood coagulability. *Br. Med. J.* 1963;1:220.

42 Hellstern P., Miyashita C., Kholer M.: Thrombin induced platelet malondialdehyde (MDA) formation in normal subjects and in women taking oral contraceptives. *Thromb. Haemost.* 1982; 48:395.

43 Alkjaersig N., Fletcher A.P., Burstein R.: Association between oral contraceptive use and thromboembolism: a new approach to its investigation based on plasma fibrinogen chromatography. *Am. J. Obstet. Gynecol.* 1975; 122: 199.

44 Poller L., Priest C.M., Thomsom J.M.: Platelet aggregation during oral contraception. *Br. Med. J.* 1969; 4: 273.

45 Hedlin A.M.: The effect of oral contraceptive estrogen on blood coagulation and fibrinolysis. *Thromb. Diath. Haemorr.* 1975; 33: 370.

46 Huisveld, I.A., Hospers, J.E.H., Meijers, J.C.M., Starckenburg, A.E., Erich, W.B.M., Bouma, B.N.: Oral contraceptive reduce total protein S, but not free protein S. *Thr. Res.*, 1987; 45: 109.

47 Fernández-G. J.M., Rubio-Arroyo M.F., Rubio-Poo C. and de la Peña A.: Palladium (II) and Platinum (II) Dichloro Complexes Containing Diamine-Estrone Derivatives. *Monatshefte für Chemie*, 1983; 114: 535.

48 Fernández-G. J.M., Rubio-Arroyo M.F., Soriano-García M., Toscano R.A., Pérez-César M.C., Rubio-Poo C., Mandoki J.J., de la Peña A., Lemini C., Mendoza-Patiño N. and F. Cruz.: Synthesis and Molecular Structure of Prolame, N-(3-hydroxy-1,3,5(10)estratrien-17 $\beta$ -yl)-3-hydroxypropylamine, a novel amino-estrogen. *Steroids*, 1985; 45: 151.

49 Goodman A., Rall T., Nies A., Taylor P.: *Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica*. Octava Edición. Ed. Panamericana, 1991.

50 Szego C.M.: Mechanisms of hormone action: parallels in receptor-mediated signal propagation for steroid and peptide effectors. *Life Sciences* 1984; 35: 2383.

51 Weiss DJ. and Gurbide E.: Non-genomic effects of estrogens and antiestrogens. *J. Steroid Biochem* 1988; 31: 671.

52 Mc Ewen B.S., Corini H. and Schumacher M.: Steroid effects on neuronal activity: when is the genome involved?. *Steroids and Neuronal Activity*. John Wiley & Sons, 1990.

53 Rubio-Poo C., Mandoki J.J., Mendoza-Patiño N., Lemini C., de la Peña A., Cruz F., Zavala E., Silva G., García-Mondragón J., Fernández-G. J.M., Soriano-García M.

and Toscano R.A.: The anticoagulant effect of Prolame, N-(3-hydroxy-1,3,5(10)estratrien-17 $\beta$ -yl)-3-hydroxypropylamine, a novel amino-estrogen. *Steroids*. 1985; 45:159

54 Mandoki J.J., Rubio-Poo C., Lemini C., de la Peña A., Fernández-G. J.M., García-Mondragón J., Zavala E., Silva G. and Mendoza-Patiño N.: The Effects of five new 17 $\beta$ -amino-estrogens, ENDIAME, ETOLAME, BUAME, PROACAME, and PICAE on blood clotting time. *Proc. West. Pharmacol. Soc.*, 1991;34: 99

55 Lasslo A., Quintana R.P., Johnson R., Naylor J., Dugdale M.: Relationships between the chemical constitution of aggregation inhibitors and human blood platelet response profile. *Biochim. Biophys. Acta* 1984; 772: 84.

56 Dillingham E., Lasslo A., Carter-Burks G., Bond S., Gollamundi R.: Relationships between chemical structure and inhibition of ADP-stimulated human thrombocyte release of serotonin and platelet factor 4. *Biochim Biophys. Acta* 1989; 990: 128.

57 Petruszewicz J., Lasslo A., Carter-Burks G., Gollamundi R., Dillingham E., Bond S.: Relationships between chemical structure and inhibition of epinephrine-induced human blood platelet aggregation. *Biochim. Biophys Acta*. 1989; 983: 161.

58 Rink T.J., Sage S.O.: Calcium Signaling in human platelets. *Annu. Rev. Physiol.* 1990; 52: 431.

59 Sage S.O., Reast R., Rink T.J.: ADP evokes biphasic Ca<sup>2+</sup> influx in fura-2-loaded human platelets. *Biochem. J.* 1990; 265: 675.

60 Shatill S.J., Brass L.F.: Induction of the fibrinogen receptor on human platelets by intracellular mediators. *J. Biol. Chem.* 1987; 262: 992.

61 Makriyannis A., Yang P. and Mavromoustakos T.: The molecular features of membrane perturbation by anaesthetic steroids: a study using differential scanning calorimetry, small angle X-ray diffraction and solid state <sup>2</sup>H NMR. *Steroids and Neuronal Activity*. John Wiley & Sons, 1990.