



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

## SINTESIS Y EVALUACION FARMACOLOGICA DE 17BETA-AMINOESTEROIDES SOBRE LA COAGULACION SANGUINEA EN EL RATON CD1.

296539



EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA

**T E S I S**  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A  
**MONICA BUENDIA BERMEJO**

MEXICO, D. F.

2001





Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

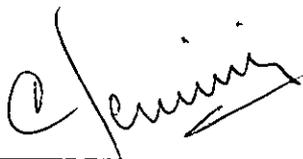
Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**JURADO ASIGNADO:**

Presidente	ELIA BROSLA NARANJO RODRIGUEZ
Vocal	ATONATIU EDMUNDO GOMEZ MARTINEZ
Secretario	CRISTINA LEMINI GUZMAN
1er.suplente	ANDRES NAVARRETE CASTRO
2do.suplente	ATENEA HERNANDEZ ALONSO

FACULTAD DE MEDICINA.  
DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA. Edificio D, LAB 3.



Asesor: CRISTINA LEMINI GUZMAN.



Sustentante: MONICA BUENDIA BERMEJO.

---

Para meditar:

Sobre la arena de la playa caminaba con el Señor. En el firmamento se dibujaban escenas de mi vida y en la arena dos juegos de pisadas: uno era el mío, el otro del Señor. Cuando mire hacia atrás para ver las huellas, note varias veces que a lo largo del camino de mi vida había solamente un juego de pisadas, y esto había sucedido en los tiempos más dolorosos de mi vida.

Pregunte al Señor:

Señor, me dijiste que cuando decidiera seguirte caminarías siempre a mi lado, pero he notado que en los momentos más difíciles hay solamente un par de pisadas. ¿Por qué cuando más te necesitaba me abandonaste?

El señor me contestó:

Hijo: te quiero y nunca te abandonaré; cuando veas solamente un par de pisadas es que yo te llevaba en mis brazos.

---

---

---

## AGRADECIMIENTOS

A mis padres Guillermina y Ramón por apoyarme en todo momento, al brindarme su amor y confianza.

A la M en C Cristina Lemini por su orientación, consejos y cariño durante todo este tiempo.

A la Dra. Ruth Jaimez Melgoza por su ayuda y orientación en la realización de este trabajo. Así como su amistad.

A mis hermanos: Julie, Alberto y Eduardo por estar conmigo en las buenas y en las malas brindándome su amor incondicional.

A la familia Bermejo por su unión y apoyo brindando tanto en alegrías como en problemas.

A mi amorcito Hugo por su ayuda, pero sobre todo por enseñarme el sentido de amar.

A los amigos: Moni Huicochea (y familia), Gabriela Guzmán y Karla Sainz. Por todos los buenos momentos compartidos.

Al apoyo técnico de farmacología: Yolanda Alvarez, Rodolfo Arias, Miguel Hernández y Marcos Gudiño.

A mi jefa Martha Elva Camarena por su comprensión, confianza y aliento para seguirme superando

---

---

---

## DEDICATORIA

Muy en especial a mis padres y hermanos por todos los momentos difíciles que hemos pasado y aunque no estamos juntos como quisieramos nos une el amor y el respeto que tenemos uno del otro.

Sobre todo a ti Betito por tu fuerza y valor como ser humano.

Los quiere mucho Monica

---

---

---

**INDICE****ABREVIATURAS**

<b>I.</b>	<b>RESUMEN.....</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>INTRODUCCION.....</b>	<b>2</b>
	1. Antecedentes	
	2. Hipótesis.....	12
	3. Objetivos	
<b>III.</b>	<b>PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>14</b>
	1. Métodos químicos	
	2. Métodos farmacológicos.....	17
<b>IV.</b>	<b>RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>	<b>21</b>
	1. Síntesis de los 17 $\beta$ -aminoesteroides	
	2. Evaluación farmacológica de los 17 $\beta$ -aminoesteroides	
<b>V.</b>	<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>39</b>
<b>VI.</b>	<b>BIBLIOGRAFIA.....</b>	<b>40</b>
<b>VII.</b>	<b>APENDICE</b>	
	1. Espectros	

## ABREVIATURAS

cm	Centímetros
d	Señal doble
dd	Señal doble de dobles
DNA	Ácido desoxirribonucleico
E <sub>2</sub>	17β-estradiol
EM	Espectrometría de masa
esm	Error estándar de la media
g	Gramo(s)
h	Hora(s)
Hz	Hertz
ip	Intraperitoneal
IR	Espectroscopía de infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
Kg	Kilogramos
lit	Literatura
m	Señal múltiple
m/z	Unidad de masa-carga
M <sup>+</sup>	Ión molecular
mg	Miligramos
MHz	Megahertz
ml	Mililitro
mm	Milímetros
mmol	Milimol
mol	Mol
mRNA	RNA mensajero
NS	No significativo
Ovx	Ovarectomizadas
p.f	Punto de fusión
ppm	Partes por millón

RMN <sup>1</sup> H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
RNA	Acido ribonucleico
s	Señal simple
sc	subcutánea
seg	Segundos
t	Señal triple
TMS	Tetrametilsilano
v máx	Frecuencia máxima
δ	Desplazamiento químico
μl	Microlitros
°C	Grados centígrados

## I. RESUMEN

La síntesis de compuestos orgánicos dirigida al descubrimiento y desarrollo de nuevos fármacos para uso terapéutico es un campo de investigación actual que esta encaminado a la búsqueda de mayor eficacia y selectividad de los medicamentos.

Dentro del programa síntesis y evaluación biológica de esteroides es de particular interés evaluar los efectos producidos por los andrógenos y estrógenos tanto naturales como sintéticos. Estos grupos de esteroides están involucrados en la diferenciación, el mantenimiento de las características sexuales y la reproducción.

Recientemente se han descrito efectos anticoagulantes de  $17\beta$ -aminoestrógenos en animales de laboratorio que son efectos opuestos a los producidos por los estrógenos de uso actual. Los  $17\beta$ -aminoestrógenos conservan sus efectos estrogénicos, propiedades que confieren a éstas sustancias el uso como estrógenos alternativos por lo que su estudio farmacológico es de gran interés.

El presente trabajo está dirigido a la síntesis de los  $17\beta$ -aminoesteroides  $17\beta$ -amino-1,3,5(10)estratrien-3-ol (**3**) y del derivado androstano análogo;  $3\beta$ -hidroxi- $17\beta$ -amino-androstan-5-eno (**6**) para su evaluación sobre la coagulación sanguínea en el ratón CD1 hembra y macho, con el objeto de conocer la influencia de la aromaticidad y la sustitución del grupo amino sobre el carbono 17 en la actividad biológica señalada.

Se prepararon los productos (**3**) y (**6**) por métodos descritos, realizando su caracterización mediante técnicas espectroscópicas. Los resultados obtenidos nos muestran que (**3**) produce efecto anticoagulante mientras que (**6**) carece de este efecto, lo que señala la importancia de la aromaticidad en el efecto biológico. Por otra parte los resultados demuestran que la sustitución de la cadena en el grupo alcohol-amino tiene influencia sobre la actividad biológica mencionada.

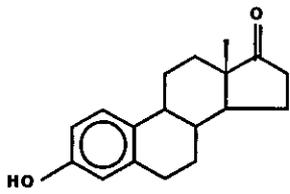
## II. INTRODUCCION

### 1. ANTECEDENTES

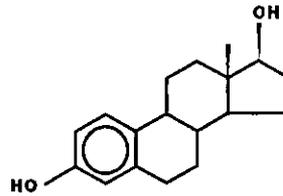
La investigación dirigida al desarrollo de nuevos fármacos para uso terapéutico es un campo de gran interés. En la actualidad se cuenta con gran número de medicamentos para el tratamiento de diversas enfermedades, sin embargo; además de los efectos terapéuticos deseados todos producen efectos adversos, de lo que ha surgido la necesidad de obtener nuevos fármacos con mayor eficacia y selectividad.

Las hormonas esteroides comprenden: estrógenos, andrógenos, progestágenos, mineralocorticoides, y glucocorticoides. Los tres primeros son frecuentemente llamados "hormonas sexuales" cuya función principal es el desarrollo y mantenimiento de las características sexuales y la reproducción. Los glucocorticoides y mineralocorticoides, conocidos como adrenocorticoides, están asociados con el metabolismo de carbohidratos y de iones inorgánicos respectivamente (figura 1), (Goodman y Gilman, 1996).

Los estrógenos son esteroides con 18 átomos de carbono que difieren de los andrógenos en que carecen del grupo metilo en el carbono 10 y en contraste con otros esteroides su anillo A es aromático, que es una característica importante para producir actividad estrogénica. Los estrógenos naturales estrona y estradiol son secretados por las células de la granulosa de los folículos ováricos, cuerpo lúteo, placenta y en pequeñas cantidades, por la corteza suprarrenal y los testículos. El estradiol es el principal producto de secreción del ovario durante la primera parte del ciclo menstrual. Después de la ovulación, estrógenos y progestágenos son sintetizados por las células de la granulosa en el cuerpo amarillo. El estriol es el principal producto metabólico del estradiol y se produce en grandes cantidades en la placenta durante el embarazo (figura 2), (Katzung, 1991).

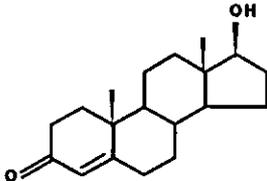


Estrona

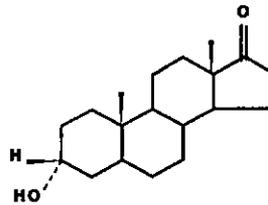


Estradiol

Estrógenos

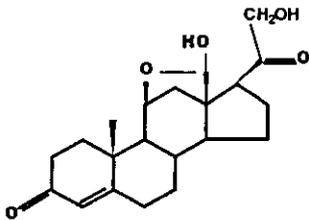


Testosterona



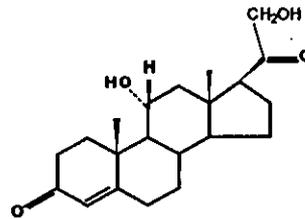
Androsterona

Andrógenos



Aldosterona

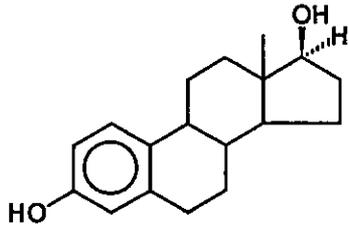
Mineralocorticoides



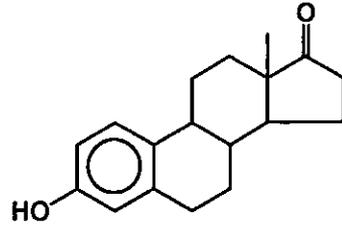
Hidrocortisona

Glucocorticoides

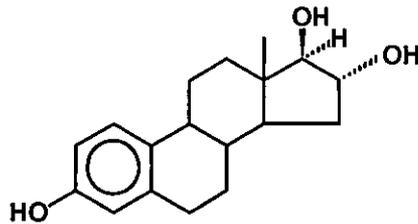
Figura 1. Hormonas esteroides



Estradiol



Estrona



Estriol

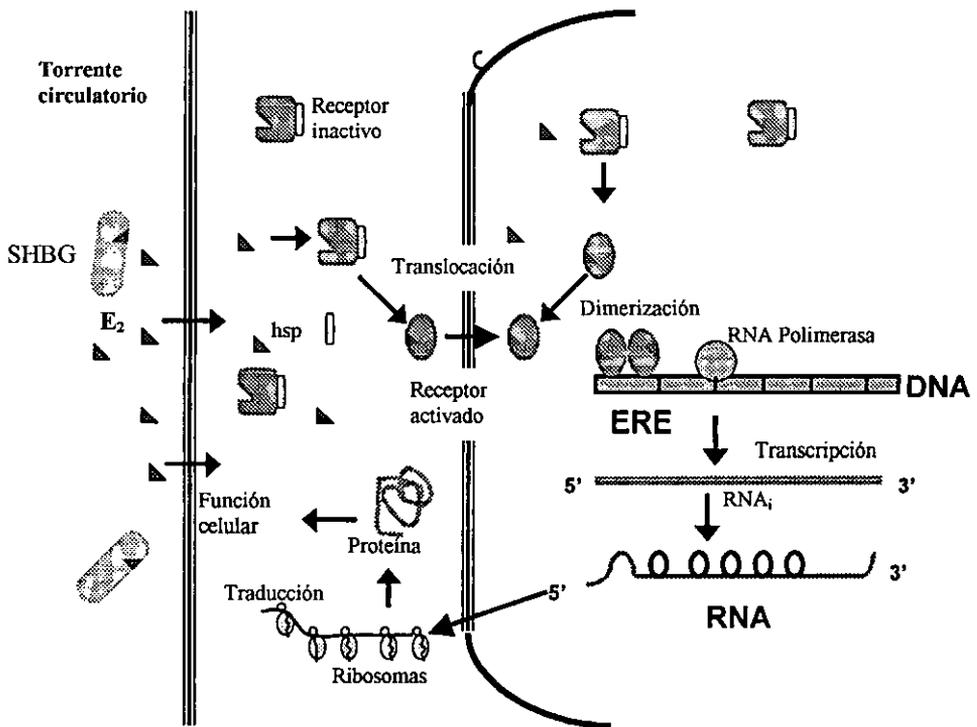
Figura 2. Principales hormonas con actividad estrogénica

Estas sustancias que están involucradas en la diferenciación sexual, son los principales responsables de los cambios de la pubertad en las niñas. En esta etapa estimulan el desarrollo de la vagina, útero y trompas de falopio, producen crecimiento de los conductos en las glándulas mamarias, aceleran el crecimiento y a su vez el cierre de las epífisis de los huesos largos. Actúan junto con los progestágenos produciendo los cambios en los órganos genitales que tienen lugar durante el ciclo menstrual y el embarazo (Greenspan F. 1995). Así mismo se encargan del mantenimiento de las características sexuales y la reproducción en la mujer adulta actuando a través de mecanismos genómicos en los que regulan la transcripción y la proliferación celular. También se ha descrito que pueden actuar a nivel membranal produciendo efectos no genómicos que se observan en un periodo corto y que son de latencia muy breve (Goodman y Gilman, 1996; Katzung, 1991).

Los estrógenos al igual que otras hormonas esteroides, actúan principalmente por medio de la regulación de la expresión de genes. Estas hormonas lipofílicas, difunden de forma pasiva a través de la membrana plasmática y se distribuyen de acuerdo con su especificidad y alta afinidad por el receptor que está presente en el núcleo y citoplasma de las células blanco (útero, vagina, glándula mamaria, hipófisis anterior, hipotálamo, pituitaria, hueso e hígado). Estos receptores los fijan ávidamente mediante componentes denominados estrófilos o receptores de estrógeno que parecen estar codificados por un gen único, cuya masa molecular es de aproximadamente 66,000 Da con un sitio de unión a la hormona específico. Por ejemplo, experimentalmente se ha calculado que la constante de disociación del  $E_2$  en el citosol es de aproximadamente  $1 \times 10^{-10}$  M, lo que indica su alta afinidad por este compartimento celular (Williams CL y Stancel GM, 1996).

El complejo hormona-receptor se transforma en la célula, lo que se acompaña de una translocación al interior del núcleo y fijación a la cromatina; una vez activado por el ligando, el complejo hormona-receptor se une a una región

específica de DNA mediante elementos de respuesta a estrógenos específicos (EREs), los cuales están fuertemente implicados en la modulación de la frecuencia y el inicio de la transcripción, donde estimula la actividad de la polimerasa del RNA y por tanto su síntesis. El RNA de nueva formación y mRNA específicos, son transportados al citoplasma para iniciar la síntesis de proteínas, las cuales pueden ser: enzimas, factores reguladores y proteínas estructurales. Lo que finalmente es la respuesta característica de los estrógenos en los tejidos blanco (figura 3) (Granner DK, 1995).



**Figura 3. Mecanismo de acción de las hormonas esteroides**

Los estrógenos se utilizan principalmente como componentes de anticonceptivos orales (en combinación con progestágenos), para el tratamiento de la menopausia y en deficiencias estrogénicas. Otros usos menos frecuentes son en el tratamiento de acné, hirsutismo, osteoporosis senil, supresión de la lactancia después el parto y como agentes antitumorales en el tratamiento de cáncer prostático (Henriksson, 1991; Kontturi, 1991). Los beneficios de estos agentes son considerables sin embargo, diversos autores han señalado que su uso prolongado, puede aumentar el riesgo de trombosis venosa y arterial y la posibilidad de infarto al miocardio. Estos efectos adversos se han relacionado con la dosis administrada y la potencia estrogénica del agente utilizado (Donayre y Pincus, 1965; Nillson y Kullander, 1967; Ambrus *et al*, 1969; Hedlin, 1975; Meade *et al*, 1976; Gordon *et al*, 1980, Tasakok y Koh, 1980; Kalin y Zumoff, 1990; Rosenberg *et al*, 1990; Barrett-Connor y Bush, 1991).

Los efectos trombogénicos de los estrógenos han sido explicados por numerosos autores donde actúan favoreciendo la coagulación de la sangre, ya que producen aumento en las concentraciones circulantes de los factores de coagulación II, VII, IX, y X (Ygge *et al*, 1969; Huch *et al*, 1987). También inducen aumentos en la concentración de fibrinógeno, plasminógeno y disminución en la actividad fibrinolítica (Nillson y Kullander 1967; Alkjaersig *et al*, 1975; Hedlin, 1975). La alteración de todos estos factores están asociados con efectos trombogénicos. Además, los estrógenos pueden producir disminución del tono vascular favoreciendo la estasis y retardar el flujo sanguíneo que también son factores que favorecen la trombosis (Meade *et al*, 1976).

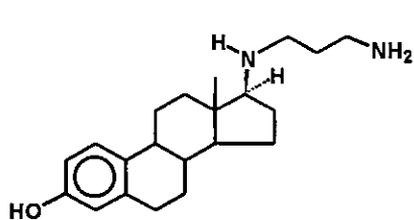
Por otra parte desde los años 80 el grupo de Mandoki (1983) llevó a cabo experimentos sobre la coagulación sanguínea en animales de laboratorio y observaron que la administración intraperitoneal (ip) de dosis farmacológicas de estrógenos naturales como el estradiol, estrógenos equinos conjugados,

estrógenos sintéticos como el dietilestilbestrol, producen efectos bifásicos sobre la coagulación sanguínea en la rata Wistar y el ratón CD1. La primera fase se caracteriza por un efecto anticoagulante de duración breve (3-7 horas) que va seguida de una fase de hipercoagulación de mayor duración (varios días). Si la administración del estrógeno se lleva a cabo por vía subcutánea (sc) solo se observa el efecto hipercoagulante. Estos estudios explican en parte por que en algunos casos la administración de estrógenos puede producir efectos trombogénicos y en otros casos efectos opuestos.

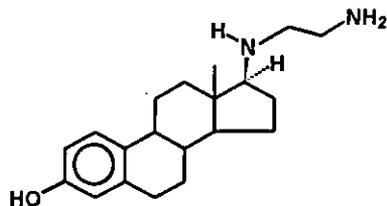
Avances recientes en la farmacología de esteroides han generado la introducción de agentes terapéuticos que poseen propiedades farmacodinámicas diferentes a las de naturaleza endócrina. Los esteroides que poseen grupos aminos extranucleares, se conocen como aminoesteroides (Buckett y Marwick, 1975). Este grupo de fármacos ha dado lugar a compuestos de diferente tipo de actividad biológica en relación al compuesto del que proceden. Por ejemplo; bloqueadores neuromusculares como el bromuro de pancuronio, algunos analgésicos, anestésicos locales y  $17\beta$ -aminoestrógenos con propiedades anticoagulantes (Rubio-Póo *et al*, 1983, 1985, 1990; Mandoki *et al*, 1991; Lemini *et al*, 1993).

Las propiedades anticoagulantes de los  $17\beta$ -aminoesteroides fueron descubiertas en 1983, por Rubio *et al*. Estos autores encontraron, compuestos análogos del estradiol en los que el hidroxilo en la posición  $17\beta$  se substituye por un grupo amino monosustituido, estos compuestos producen en roedores efectos anticoagulantes dosis-dependientes y de duración prolongada, (figura 4). Este grupo de fármacos se une al receptor de estrógenos y produce efectos estrogénicos agonistas parciales, ya que su efecto estrogénico es de menor potencia que el producido por estradiol (Lemus *et al*, 1998; Jaimez *et al*, 2000). La obtención de compuestos que produjeran tanto efectos estrogénicos como efectos anticoagulantes serían de gran utilidad clínica ya que podrían ser utilizados como

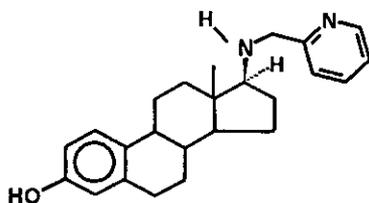
estrógenos alternativos a los de uso actual sin la posibilidad de producir efectos trombogénicos



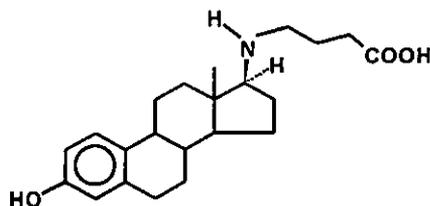
Prodiame



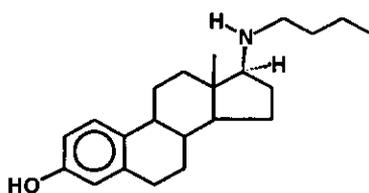
Endiame



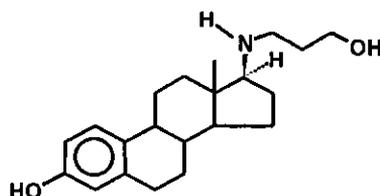
Picae



Proacame



Buame



Prolame

Figura 4.  $17\beta$ -aminoestrógenos prodiame, endiame, picae, proacame, buame y prolame

Se ha descrito que los efectos anticoagulantes de los 17 $\beta$ -aminoestrógenos mencionados anteriormente son selectivos, ya que otros esteroides sustituidos con grupos amino en el carbono 17 no los producen. Esto se ha observado en el caso del 17 $\beta$ -aminoestrógeno dedamine que produce efectos anticoagulantes significativos durante un periodo de 96 horas después de la administración de una sola dosis, y su análogo androgénico carece de todo efecto aún a dosis mayores que las administradas de dedamine (figura 5, Rubio Póo *et al*, 1997).

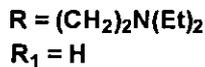
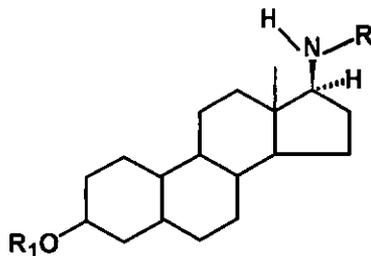
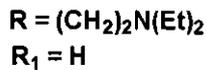
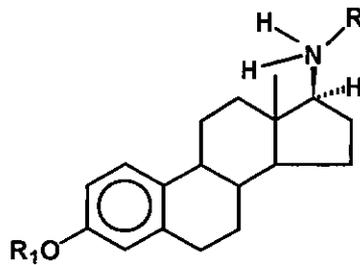


Figura 5. Dedamine y el andrógeno análogo

En trabajos recientes se ha encontrado que la longitud de la cadena del grupo amino tiene una influencia sobre la actividad estrogénica. Así en la serie homóloga prolame, butolame, pentolame y hexolame (figura 6) el efecto estrogénico disminuye conforme aumenta el número de carbonos de la cadena del grupo amino-alcohol en el carbono 17 (Rubio-Póo *et al*, 1985, 1990; Mandoki *et al*, 1991).

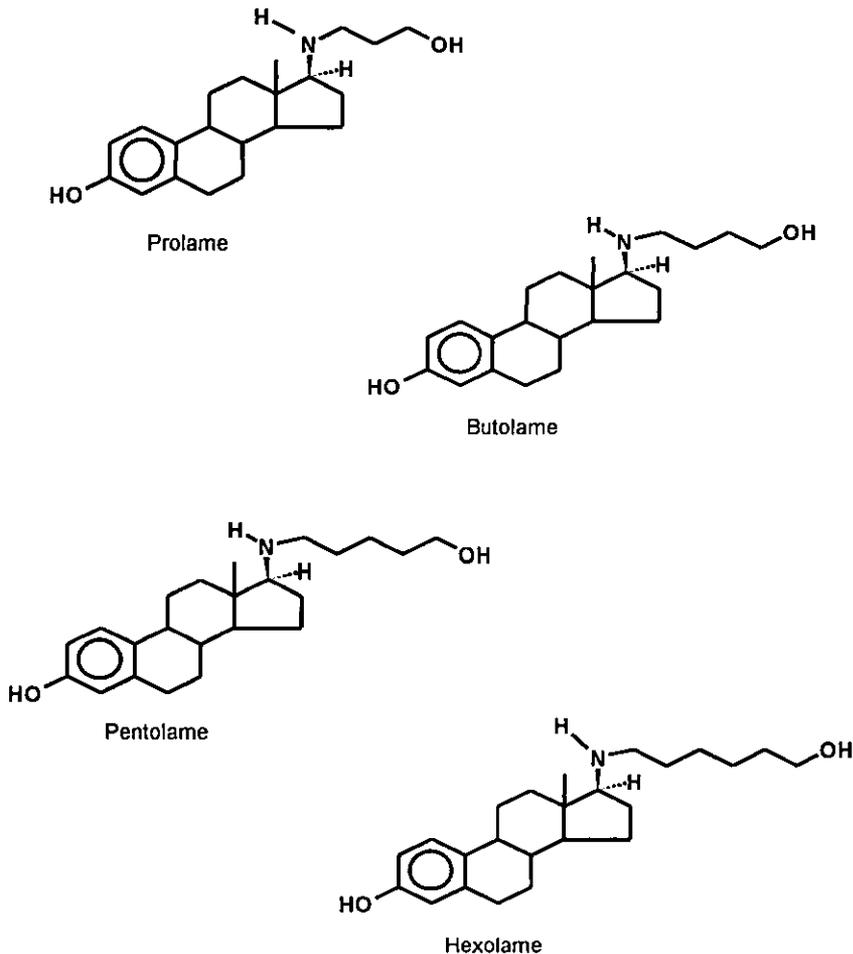


Figura 6. Serie homóloga de los 17 $\beta$ -aminoestrógenos

De las observaciones anteriores ha surgido el interés de conocer la influencia que ejerce el sustituyente del grupo amino del carbono 17 sobre la actividad anticoagulante de los  $17\beta$ -aminoestrógenos. Así mismo obtener mayor información para confirmar si la aromaticidad es un factor importante para provocar el efecto que producen los aminoestrógenos sobre el tiempo de la coagulación sanguínea. Los antecedentes mencionados nos permitieron plantear la siguiente:

### **1. HIPOTESIS**

El compuesto **(3)** produce mayor efecto sobre el tiempo de la coagulación que la observada en el pentolame y el prolame, mientras que el compuesto **(6)** carece de este efecto.

Para demostrar nuestra hipótesis se plantearon los siguientes objetivos:

### **3. OBJETIVO GENERAL**

Hacer estudios comparativos de la actividad anticoagulante entre aminoestrógenos y un aminoandrógeno para establecer una relación entre la estructura química y la actividad biológica que permita la propuesta de estructuras nuevas para la obtención de fármacos más selectivos y eficaces en la terapia de sustitución hormonal así como en el tratamiento del cáncer prostático.

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Sintetizar los aminoesteroides:  $17\beta$ -amino-1,3,5(10) estratrien-3-ol (**3**) y el derivado androstano análogo;  $3\beta$ -hidroxi- $17\beta$ -amino-androstan-5-eno (**6**).
- 2.- Evaluar los efectos de los compuestos  $17\beta$ -amino-1,3,5(10)estratrien-3-ol (**3**) y el derivado androstano  $3\beta$ -hidroxi- $17\beta$ -amino-5-androsteno (**6**) sobre el tiempo de coagulación sanguínea en el ratón CD1 macho y hembra ovariectomizada.
- 3.- Comparar los efectos del estradiol y los  $17\beta$ -aminoestrógenos prolame, pentolame (cuya actividad sobre la coagulación sanguínea del ratón ha sido estudiada anteriormente y que se utilizan como compuestos de referencia) y los compuestos  $17\beta$ -amino-1,3,5(10)estratrien-3-ol (**3**) y  $3\beta$ -hidroxi- $17\beta$ -amino-5-androsteno (**6**).
- 4.- Conocer la influencia de la aromaticidad y la sustitución del grupo amino sobre el carbono 17.

### III. PARTE EXPERIMENTAL

#### 1. METODOS QUIMICOS

Todos los solventes y reactivos utilizados fueron grado analítico y se emplearon sin purificación. La estrona y la dehidroisoandrosterona fueron obtenidas mediante una donación de los laboratorios Syntex S.A. (México), el clorhidrato de hidroxilamina y el sodio se adquirieron de Aldrich (Milwaukee, WI). La pureza de los productos fue establecida por espectroscopía (IR, RMN-H y EM) y el seguimiento de las reacciones se realizó empleando cromatografía en capa fina con placas de 3 por 5 cm de gel de sílice 60 Merck F-254, utilizando como revelador yodo. Los puntos de fusión de los compuestos fueron determinados en un aparato Electrothermal 9100 de capilares. Los espectros de infrarrojo (IR) se obtuvieron en pastillas de bromuro de potasio usando un espectrofotómetro Nicolet FT-55X. Los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN-H) se registraron mediante un espectrofotómetro Varian-Gemini de 200 MHz, en  $\text{CDCl}_3$ - $\text{DMSO-d}_6$  y están reportados en partes por millón (ppm), usando como referencia interna tetrametilsilano. Los espectros de masas fueron obtenidos en un espectrofotómetro Hewlett-Packard 5985-B por impacto electrónico con introducción directa de la muestra a 70 ev.

#### Síntesis del $17\beta$ -amino-1,3,5(10)estratrien-3-ol (**3**)

El compuesto (**3**) fue preparado a partir de la oxima de la estrona, utilizando como agente reductor sodio en propanol (figura 7). Después del aislamiento se obtuvo un sólido amarillo pálido que se purificó por cromatografía en capa fina en un sistema hexano/cloroforno/metanol (85:4:1 v/v). El producto fue recristalizado varias veces utilizando metanol.

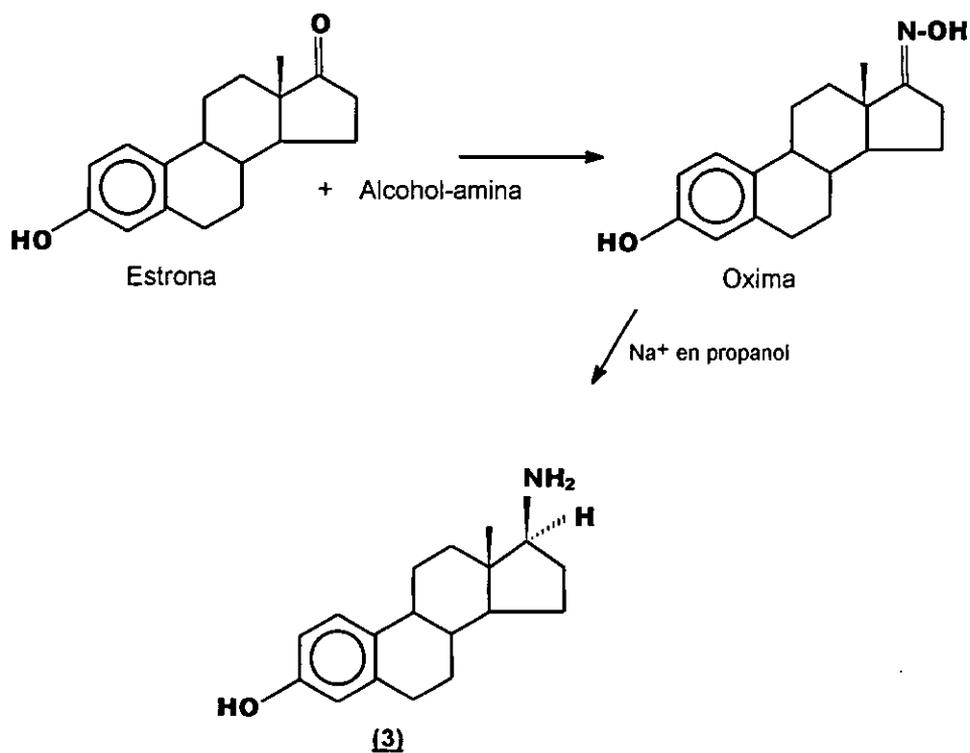


Figura 7. Síntesis de la 17β-amina

### Síntesis del 3 $\beta$ -hidroxi-17-oximino-5-androsteno (5)

A una solución de 1.8 g (25.9 mmoles) de clorhidrato de hidroxilamina en etanol (20 ml; 95 %) se adicionó a 2.0 g (6.9 mmoles) de 3 $\beta$ -hidroxi-17-oxo-5-androsteno (4) en 20 ml de piridina (figura 8). Se calentó a reflujo por 5 horas. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente y se diluyó con agua (200 ml), el producto que se formó fue un sólido blanco que fue filtrado y lavado con ácido clorhídrico al 5%, y después se secó al vacío. Se obtuvieron 1.920 g (98% de rendimiento) con p.f. 194.5-197.5°C, (lit. 193-197°C, 191-193°C, 204-206°C<sup>40</sup>) Rf 0.62 en tetrahidrofurano-metanol.

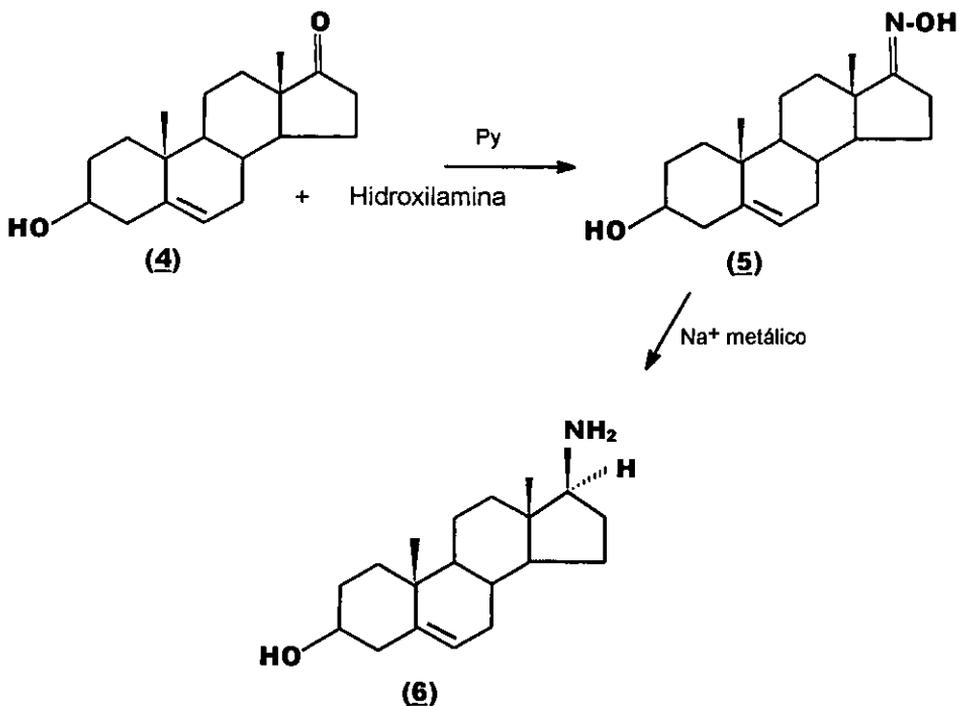


Figura 8. Síntesis de 17 $\beta$ -aminoandrógono

### Síntesis del 3 $\beta$ -hidroxi-17 $\beta$ -amino-5-androsteno (**6**)

A una solución de la oxima (**5**) (2 g, 6.6 mmoles) en 100 ml de etanol absoluto, se adicionaron 10 g, (435 mmoles) de sodio metálico (en pequeñas porciones) durante una hora (figura 8). La mezcla de reacción se dejó a reflujo por dos horas, y posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se adicionaron 50 ml de agua helada y el precipitado formado se lavó con agua a 60°C, se dejó secar durante 16 horas a temperatura ambiente y después 3 horas al vacío.

## 2. METODOS FARMACOLOGICOS

**Fármacos.** El estradiol (1,3,5(10) estratrien-3,17 $\beta$ -diol), se obtuvo de Syntex S.A. El prolame (17 $\beta$ -(3-hidroxi-1-propilamino)-1,3,5,(10)-estratrien-3-ol) y pentolame (17 $\beta$ -(5-hidroxi-1-pentilamino)-1,3,5,(10)-estratrien-3-ol) se obtuvieron por los métodos descritos anteriormente (Lemini *et al*, 1993, 1998; Rubio-Póo *et al*, 1997). Los compuestos (**3**) y (**6**) se prepararon como se describió en la sección anterior.

**Animales.** Los experimentos se llevaron a cabo en ratones macho de 25-30 g y ratones hembra ovariectomizada de 25-30 g de la cepa CD1 procedentes del bioterio de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los animales fueron mantenidos a temperatura constante de 20-22°C en periodos de luz-obscuridad de 12h/12h y se alimentaron con nutricubos de la marca Purina y agua *ad libitum*. Los ratones hembra adultas fueron ovariectomizadas (Ovx) tres semanas antes de iniciar el estudio. Los animales Ovx fueron monitoreados antes de iniciar el experimento. Se tomaron muestras de exudado vaginal que fueron teñidas y fijadas con solución de Harris, estas preparaciones fueron observadas al microscopio evaluando como respuesta positiva la abundancia de leucocitos y ausencia de células cornificadas.

**Diseño Experimental.** Los animales fueron marcados de manera individual para su identificación, mediante pequeñas muescas hechas en el borde de las orejas siguiendo la clave empleada en el laboratorio. En todos los experimentos un mínimo de seis animales por grupo se distribuyeron para recibir diferentes tratamientos. La distribución se realizó de acuerdo a un arreglo de cuadrados latinos con base a su peso corporal. El estradiol, prolame, pentolame y los compuestos (3) y (6) se administraron por vía subcutánea. En todos los experimentos los animales del grupo control recibieron solamente el propilenglicol que se utilizó como disolvente.

**Evaluación del tiempo de coagulación.** El tiempo de coagulación se estimó conforme al método reportado por Mandoki *et al.* La cola del animal se calentó en un baño con agua a 40°C por un minuto, para aumentar el flujo sanguíneo, después se secó la cola y se cortó una pequeña parte en su extremo, con una hoja de afeitar. Se colectaron 25 µl de muestra de sangre en un tubo capilar para hematocrito, la sangre se hizo fluir por gravedad entre dos marcas de 45 mm inclinando el tubo capilar alternativamente entre un ángulo de +60 y -60 con respecto al plano horizontal. El cronómetro se activó cuando la sangre hizo contacto con el capilar y se detuvo cuando esta dejó de fluir (punto final de la reacción). Los diferentes grupos de animales recibieron por vía subcutánea una sola administración de estradiol (60 mg/kg), prolame (41 mg/kg) pentolame (80 mg/kg) y los compuestos (3) y (6) (60 y 64 mg/kg respectivamente). Como grupo control se utilizó un grupo de animales que recibieron solo el vehículo (propilenglicol; 5 ml/Kg).

La determinación del tiempo de coagulación se llevó a cabo en forma balanceada, de acuerdo a un arreglo de cuadrados latinos de manera que todos los grupos fueran evaluados en el mismo intervalo de tiempo. Todos los experimentos se realizaron en forma ciega, de manera que el experimentador ignorara el grupo al cual pertenecía cada animal. Las determinaciones de las

curvas dosis-respuesta, en el tiempo de coagulación se realizaron 24 horas después de la administración.

**Análisis estadístico.** Las diferencias observadas entre los grupos fueron obtenidas mediante análisis de varianza y pruebas de comparaciones múltiples utilizando los métodos de Student-Newman-Keuls o Dunnet. Se consideraron diferencias significativas entre los grupos cuando los valores de  $p$  fueron menores de 0.05. (Zar, 1990).

#### **Técnicas utilizadas en los experimentos.**

**Ovariectomía.** Esta intervención quirúrgica se llevó a cabo en ratonas hembra adultas en las que se indujo la anestesia con hidrato de cloral (7ml/Kg; solución al 4%). Posteriormente se rasuró y desinfectó el campo quirúrgico en la parte dorsal del animal. Se hizo una incisión transversal de aproximadamente 1 cm y una segunda incisión bilateral longitudinal en el músculo, a una distancia aproximada de 0.5 cm de los músculos espinales dentro de la cavidad peritoneal. Se localizaron los ovarios en el tejido graso y se procedió a su disección. Se suturó en los diferentes planos. Los animales se dejaron recuperar por tres semanas, después de las cuales se tomaron frotis vaginales para certificar la intervención quirúrgica. Solo fueron incluidos en los experimentos animales que presentaban abundancia de leucocitos y escasez de células cornificadas los frotis vaginales.

**Frotis vaginal.** Para la obtención del exudado vaginal o frotis vaginal, se sujetó al ratón y se introdujo en el orificio vaginal una asa estéril impregnada de solución salina, posteriormente la muestra impregnada del exudado vaginal se depositó sobre un portaobjetos y se dejó secar para proceder a la tinción de la muestra empleando el procedimiento de Harris. Los frotis se observaron en el microscopio, realizando un barrido del portaobjetos en forma "s" para evaluar la abundancia

relativa de leucocitos y células cornificadas presentes en la muestra empleando una escala de +1 a +4.

**Técnica de tinción de Harris.** La muestra de exudado vaginal obtenida anteriormente se procesó de la manera siguiente:

- 1) Sumergió en alcohol de 96° durante 10 minutos;
- 2) lavó con agua destilada;
- 3) sumergió en solución de hematoxilina durante 8 min;
- 4) lavó con agua destilada;
- 5) pasó rápidamente por alcohol ácido;
- 6) lavó con agua destilada;
- 7) sumergió en agua amoniacal hasta que la preparación viró a un color azul;
- 8) sumergió en eosina alcohólica de 30 a 60 seg;
- 9) sumergió en alcohol de 96° durante 10 seg;
- 10) sumergió en alcohol absoluto durante 10 seg;
- 11) dejó secar al aire;
- 12) observó en el microscopio a 40X y evaluó.

#### IV. RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados del análisis espectroscópico para los compuestos **(3)** y **(6)**, fueron los siguientes:

Se obtuvieron 0.302g (1.10 mmoles 37%) del producto **(3)** con p.f. 225-226°C (lit. 200°C 221-222.5°C, 222-224°C, 223-226°C, 231-233°C).  $[\alpha]_D^{25} = +57.7^\circ$  (MeOH),  $[\alpha]_D = +75.3^\circ$  (EtOH), (lit.  $[\alpha]_D^{22} = +73.4^\circ$  (EtOH)<sup>1</sup>). IR (KBr): 3426 y 3286 (N-H, O-H), 1611 (anillo aromático),  $\text{cm}^{-1}$ . <sup>1</sup>H RMN 300 MHz (CDCl<sub>3</sub>-DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  0.68 (s, 3H, 18-CH<sub>3</sub>), 1.12-2.32 (m, 12H), 2.78 (m, 4H, 17-CH, protones bencílicos), 6.56 (d, J = 2.4 Hz, 1H, H-4), 6.62 (dd, J = 8.1 Hz and 2.4 Hz, 1H, H-2), 7.14 (d, J = 8.1 Hz, 1H, H-1). <sup>1</sup>H NMR 300 MHz (C<sub>6</sub>D<sub>6</sub>-DMSO-d<sub>6</sub>):  $\delta$  0.54 (s, 3H, 18-CH<sub>3</sub>), 2.57 (t, J = 8.7 Hz 1H, 17-H), 2.79 (m, 3H, protones bencílicos). EM m/z 271 (M<sup>+</sup>, 95%), 254 (57.8%), 213 (50%), 56 (100%). Análisis calculado para: C<sub>18</sub>H<sub>25</sub>NO (271.40) C, 79.66; H, 9.28; N, 5.16. Encontrado: C, 79.68; H, 9.27; N, 5.27. (Apéndice 1).

En la síntesis del compuesto **(6)**, se obtuvieron 1.420 g (82% de rendimiento). El producto fue recrystalizado en tetrahydrofurano-metanol y presentó las siguientes características: p.f. 157-165°C. (lit. 158-164°C, 152-170-172°C, 165-168°C, 158-159 y 166-168°C). IR (KBr): 3693 y 3606 (N-H, O-H), 2942 (CH), 1602 y 1045  $\text{cm}^{-1}$  (lit IR,  $\mu$  max 3400-3020, 2920 y 1734  $\text{cm}^{-1}$ ). <sup>1</sup>H RMN 200 Mz (CDCl<sub>3</sub>-DMSO-d<sub>6</sub>)  $\delta$  0.65 (s, 3H, 18-CH<sub>3</sub>), 1.00 (s, 3H, 19-CH<sub>3</sub>), 2.21 (m), 2.57 (m, 2H, -OH y NH) 2.63 (m, 3H, -CH-CH<sub>2</sub> y 17-CH), 3.35 (m) 5.29 (d, J=2.6 Hz, protón vinílico). Lit H-RMN (CDCl<sub>3</sub>)  $\delta$  0.65 (s, 3H, 18-CH<sub>3</sub>) 1.00 (m), 2.57 (m). EM m/z 280 (M<sup>+</sup> 7%), 279 (27%), 167 (53%), 149 (100%). (Apéndice 1).

La síntesis de los 17 $\beta$ -amino esteroides **(3)** y **(6)** se muestra en las figuras 7 y 8. El primer paso consistió en la reacción de la estrona **(1)** ó 3 $\beta$ -hidroxi-17-oxo-5-androsteno **(4)** con hidroxilamina que dio lugar a la obtención de las oximas

correspondientes **(2)** y **(5)**. Las oximas se obtuvieron en un rendimiento de 90-98%, estas sustancias se caracterizaron comparando sus constantes físicas: punto de fusión y Rf así como sus características espectroscópicas con la descritas en la literatura (Pettit *et al*, 1966; Lemini *et al*, 1998).

Posteriormente se llevó a cabo la reducción de las oximas en solución etanólica empleando sodio metálico como agente reductor. El 17 $\beta$ -amino-1,3,5(10)estratrien-3-ol **(3)** se obtuvo en un rendimiento del 90 % y el 3 $\beta$ -hidroxi-17 $\beta$ -amino-5-androsteno **(6)** en un 82%. Estos productos fueron purificados por cristalización fraccionada utilizando una mezcla de disolventes de cristalización metanol-tetrahidrofurano. La caracterización de los aminoesteroides **(3)** y **(6)** fue establecida comparando sus constantes físicas particularmente su punto de fusión con el descrito en la literatura así como sus características espectroscópicas (IR, RMN) de estos aminoesteroides, que coincidieron con las descritas en la literatura (Pettit *et al*, 1966; Lemini *et al*, 1998). El amino estrógeno **(3)** presenta en su espectro de infrarrojo las bandas en 3426-3286 cm<sup>-1</sup> correspondientes a los grupos OH y NH. En su espectro de resonancia magnética nuclear aparece la señal del metilo angular en 0.68 ppm como un singulete que coincide con la posición de la señal descrita para este compuesto por otros autores (Lemini *et al*, 1998; anexo 1). El aminoandrostano derivado **(6)** en su espectro de infrarrojo presenta las bandas en 3693-3606 cm<sup>-1</sup> (OH y NH) no se observan bandas de C=C aromáticos y en su espectro de resonancia magnética nuclear se pueden apreciar los singuletes de los metilos angulares en 0.65 (carbono18) y 1.00 ppm (carbono 19) (Apéndice 1). Los espectros de masas de los aminoesteroides **(3)** y **(6)** presentan señales de sus iones moleculares correspondientes a su peso molecular en ambos casos.

Estos datos fueron suficientes y concluyentes para la asignación estructural de los compuestos obtenidos para su identificación.

## 2. Evaluación farmacológica de los 17 $\beta$ -aminoesteroides

Se evaluó el efecto de los 17 $\beta$ -aminoesteroides: 17 $\beta$ -amino-1,3,5(10)estratrien-3-ol (**3**) y el androstano derivado análogo; 3 $\beta$ -hidroxi-17 $\beta$ -amino-5-androsteno (**6**) sobre el tiempo de la coagulación sanguínea en el ratón macho y hembra Ovx CD1.

Estos efectos se evaluaron 24, 48 y 72 horas después una administración subcutánea de los compuestos señalados. En una primera fase se evaluaron los 17 $\beta$ -aminoestrógenos prolame y pentolame comparando su efecto sobre la coagulación sanguínea con el del aminoandrógeno (**6**), así como los efectos producidos por la administración de estradiol (41, 80, 64, 60 mg/Kg de peso corporal, respectivamente). Los resultados de este estudio se muestran en las figuras 9, 10 y 11; tablas 1, 2 y 3).

El pentolame produjo un incremento significativo ( $p < 0.05$ ) en el tiempo de la coagulación sanguínea 24 y 48 horas después de su administración en el ratón CD1 (39 y 66 % respectivamente) (figura 9 y 10, tabla 1 y 2). Mientras que a las 72 horas después de la administración este efecto disminuyó a un 18% (figura 11, tabla 3; NS).

Por otra parte el estradiol redujo el tiempo de la coagulación sanguínea en el ratón macho CD1 en un 20% de manera significativa ( $p < 0.05$ ) después de 48 horas (figura 10, tabla 2). Los resultados obtenidos con la administración del aminoandrógeno (**6**) no mostraron diferencias con respecto al grupo control.

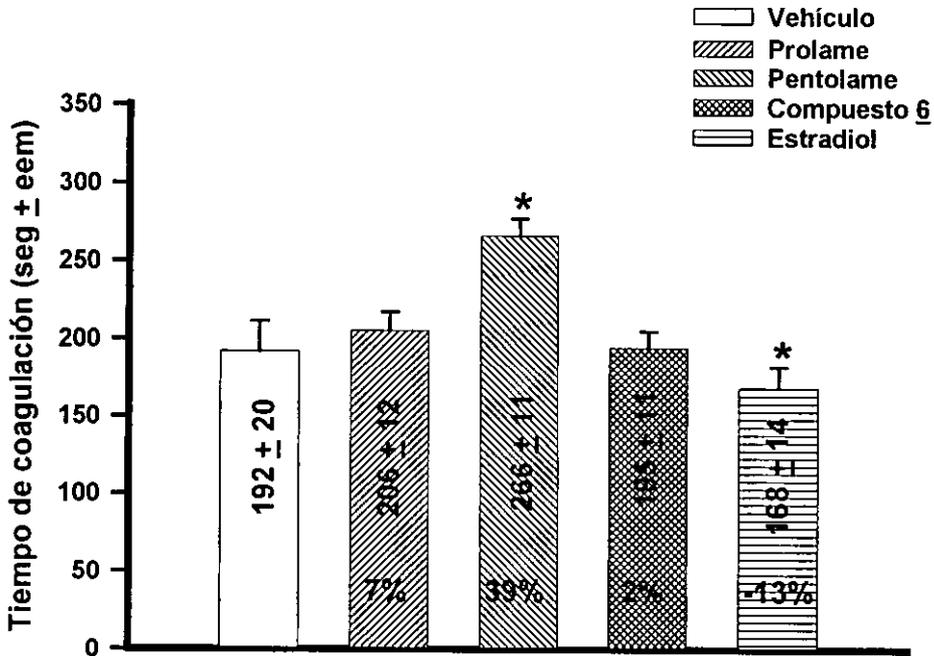


Figura 9. Efecto de prolame, pentolame, compuesto 6 y estradiol sobre el tiempo de coagulación sanguínea en ratón macho CD1. Determinado 24 horas después de su administración. \* p<0.05.

**TABLA 1.**  
**EFFECTO SOBRE EL TIEMPO DE COAGULACIÓN SANGUÍNEA DE 17β-AMINOESTEROIDES Y 17β-ESTRADIOL EN RATON MACHO CD1. \***

TRATAMIENTO	DOSIS/DIA (mg/Kg)	N	PESO CORPORAL (g ± esm)	TIEMPO DE COAGULACION (seg ± esm)	PORCENTAJE DE EFECTO	P
Propilenglicol	5ml	10	30±0.9	192±20	100	
Prolame	41	12	30±0.8	206 ± 12	107	0.94
Pentolame	80	5	30±0.7	266 ± 11	139	0.04
(6)	64	20	31±0.5	195 ± 11	102	0.67
Estradiol	60	10	31±0.5	168 ± 14	87	0.12

\* Evaluación después de 24 hrs de administración.

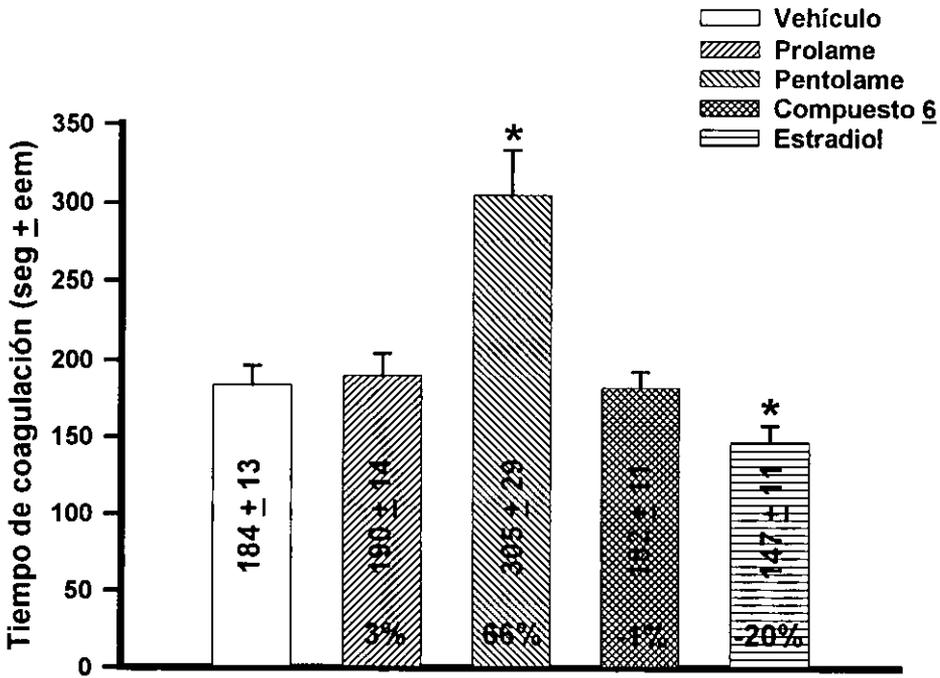


Figura 10. Efecto de prolame, pentolame, compuesto 6 y estradiol sobre el tiempo de coagulación sanguínea en ratón macho CD1. Determinado 48 horas después de su administración. \* $p < 0.05$ .

**TABLA 2.**  
**EFFECTO SOBRE EL TIEMPO DE COAGULACIÓN SANGUÍNEA DE 17β-AMINOESTEROIDES Y 17β-ESTRADIOL EN RATON MACHO CD1. \***

TRATAMIENTO	DOSIS/DIA (mg/Kg)	N	PESO CORPORAL (g±esm)	TIEMPO DE COAGULACION (seg±esm)	PORCENTAJE DE EFECTO	P
Propilenglicol	5ml	10	30±0.9	184 ± 13	100	
Prolame	41	12	30±0.8	190 ± 14	103	0.75
Pentolame	80	5	30±0.7	305 ± 29	166	0.00054
(6)	64	20	31±0.8	182 ± 11	99	0.92
Éstradiol	60	10	31±0.5	147 ± 11	80	0.044

\* Evaluación después de 48 hrs de administración.

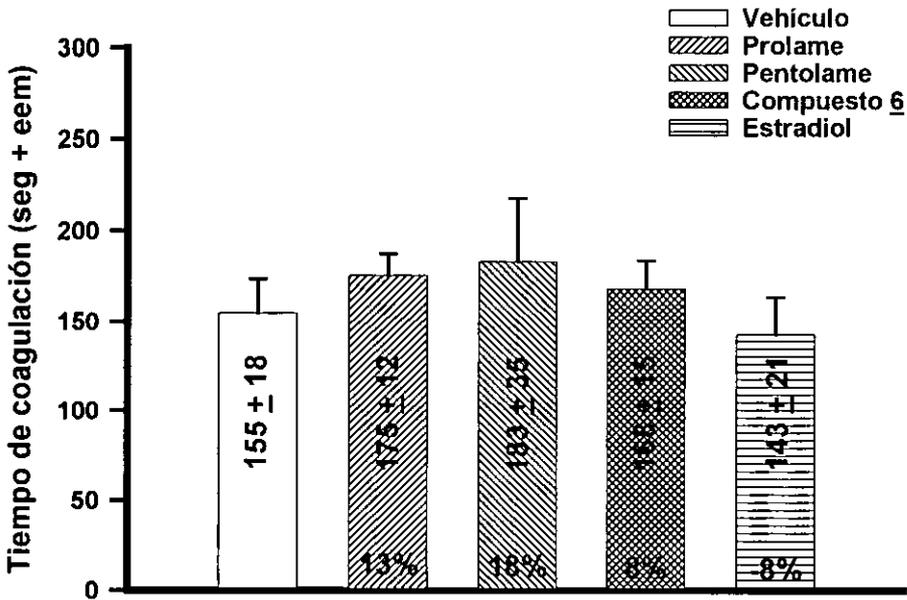


Figura 11. Efecto de prolame, pentolame, compuesto 6 y estradiol sobre el tiempo de coagulación sanguínea en ratón macho CD1. Determinado 72 horas después de su administración.

**TABLA 3.**  
**EFFECTO SOBRE EL TIEMPO DE COAGULACIÓN SANGUÍNEA DE 17β-AMINOESTEROIDES Y 17β-ESTRADIOL EN RATON MACHO CD1. \***

TRATAMIENTO	DOSIS/DIA (mg/Kg)	N	PESO CORPORAL (g ± esm)	TIEMPO DE COAGULACION (seg ± esm)	PORCENTAJE DE EFECTO	P
Propilenglicol	5ml	10	30±0.9	155 ± 18	100	
Prolame	41	12	30±0.8	175 ± 12	113	0.38
Pentolame	80	5	30±0.7	183 ± 35	118	0.49
(6)	64	20	31±0.8	168 ± 15	108	0.61
Estradiol	60	10	31±0.5	143 ± 21	92	0.67

\* Evaluación después de 72 hrs de administración.

La segunda fase de experimentos se llevó a cabo utilizando ratonas hembras maduras que fueron ovariectomizada tres semanas antes de iniciar el tratamiento. En estos experimentos se llevó a cabo la administración única de los  $17\beta$ -aminoestrógenos: pentolame y el  $17\beta$ -aminoestrógeno (**3**) comparando sus efectos con los del amino andrógeno (**6**) y los producidos por estradiol utilizando las dosis de 80, 60, 64, 60 mg/kg respectivamente. Los resultados obtenidos se muestran en las figuras 12, 13 y 14; tablas 4, 5 y 6.

El pentolame en este modelo produjo su efecto máximo a las 24 horas produciendo un incremento en el tiempo de coagulación sanguínea de 35% ( $p < 0.05$ ) (figura 12, tabla 4), mientras que el  $17\beta$ -aminoestrógeno (**3**) produjo en estas condiciones un efecto del 66% ( $p < 0.0009$ ).

El compuesto (**3**) a las 48 horas después de la administración tiene un efecto del 35% ( $p < 0.05$  vs vehículo) que podemos observar en la figura 13 y tabla 5. Después de 72 horas de la administración ya no se observan cambios en el tiempo de coagulación en ninguno de los compuestos evaluados (figura 14, tabla 6). El amino-andrógeno (**6**) (5% NS) y el estradiol (-8% NS) no produjeron cambios en el tiempo de coagulación en el ratón CD1 Ovx en ninguna de las evaluaciones realizadas (figura 12-14, tablas 4-6).

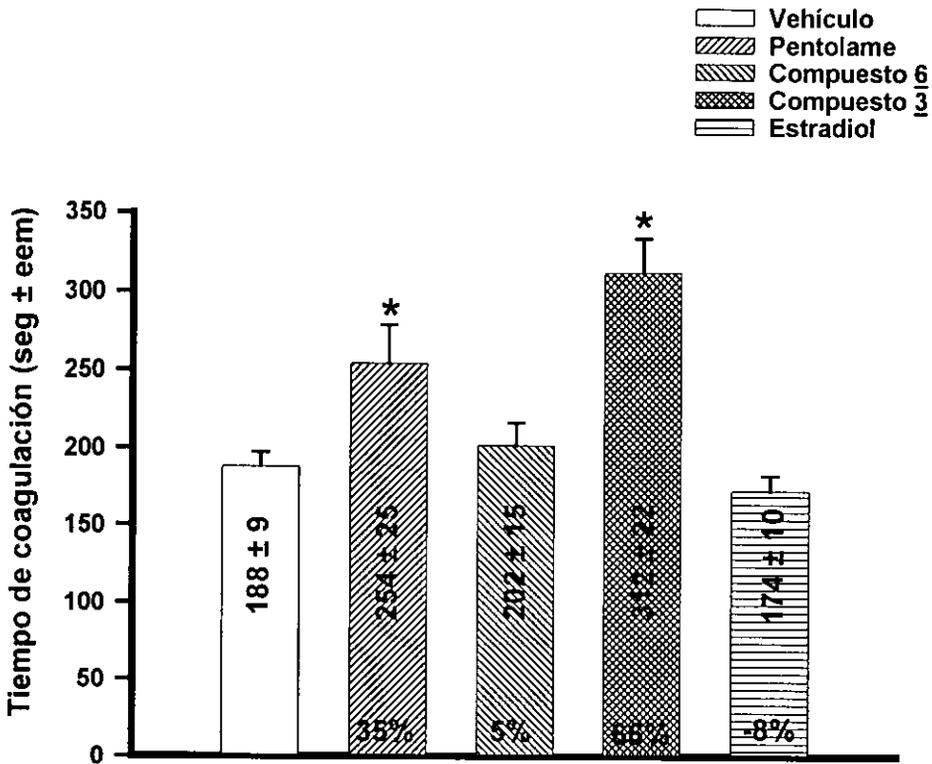


Figura 12. Efecto de pentolame, compuesto 6, compuesto 3 y estradiol sobre el tiempo de coagulación sanguínea en ratón CD1 Ovx. Determinado 24 horas después de su administración. \*p<0.05.

**TABLA 4.**  
**EFFECTO SOBRE EL TIEMPO DE COAGULACIÓN SANGUÍNEA 17 $\beta$ -AMINOESTEROIDES Y 17 $\beta$ -ESTRADIOL EN RATON HEMBRA CD1. \***

TRATAMIENTO	DOSIS/DIA (mg/Kg)	N	PESO CORPORAL (g $\pm$ esm)	TIEMPO DE COAGULACION (seg $\pm$ esm)	PORCENTAJE DE EFECTO	P
Propilenglicol	5ml	5	33 $\pm$ 1	188 $\pm$ 9	100	
Pentolame	80	6	34 $\pm$ 1.3	254 $\pm$ 25	135	0.047
(6)	64	10	33 $\pm$ 0.9	202 $\pm$ 15	105	0.57
(3)	60	6	34 $\pm$ 1.5	312 $\pm$ 22	166	0.00099
Estradiol	60	5	32 $\pm$ 1.7	174 $\pm$ 10	92	0.27

\* Evaluación después de 24 hrs de administración.

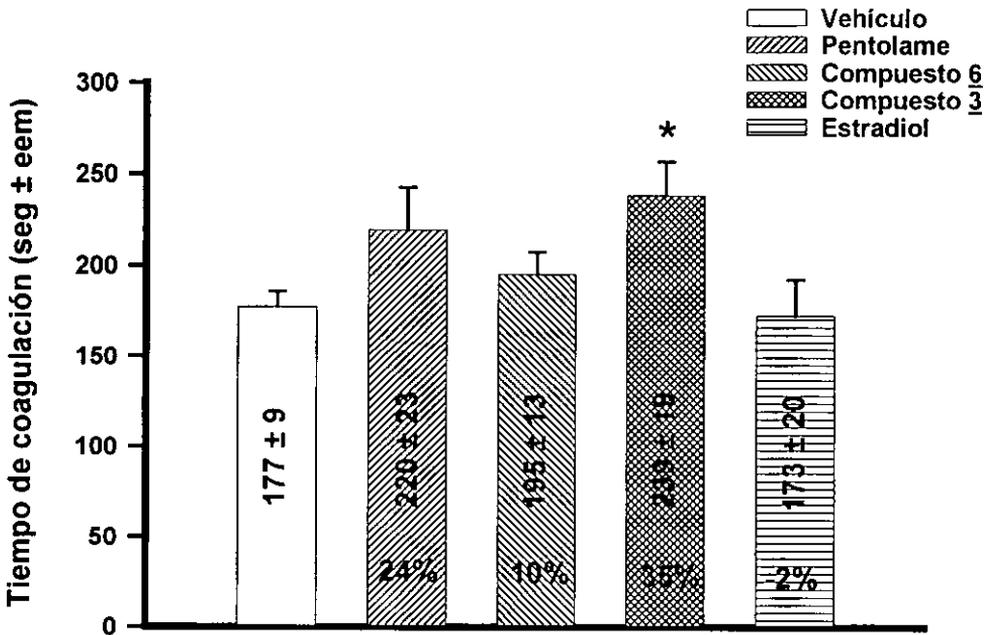


Figura 13. Efecto de pentolame, compuesto 6, compuesto 3 y estradiol sobre el tiempo de coagulación sanguínea en ratón CD1 OvX. Determinado 48 horas después de su administración.  $p < 0.05$ .

TABLA 5.  
EFECTO SOBRE EL TIEMPO DE COAGULACIÓN SANGUÍNEA DE 17 $\beta$ -AMINOESTEROIDES Y 17 $\beta$ -ESTRADIOL EN  
RATON HEMBRA CD1. \*

TRATAMIENTO	DOSIS/DIA (mg/Kg)	N	PESO CORPORAL (g $\pm$ esm)	TIEMPO DE COAGULACION (seg $\pm$ esm)	PORCENTAJE DE EFECTO	P
Propilenglicol	5ml	5	33 $\pm$ 1	177 $\pm$ 9.0	100	
Pentolame	80	6	34 $\pm$ 1.3	220 $\pm$ 23	124	0.15
(6)	64	10	33 $\pm$ 0.9	195 $\pm$ 13	110	0.78
(3)	60	6	34 $\pm$ 1.5	239 $\pm$ 19	135	0.017
Estradiol	60	5	32 $\pm$ 1.7	173 $\pm$ 20	98	0.83

\* Evaluación después de 48 hrs de administración.

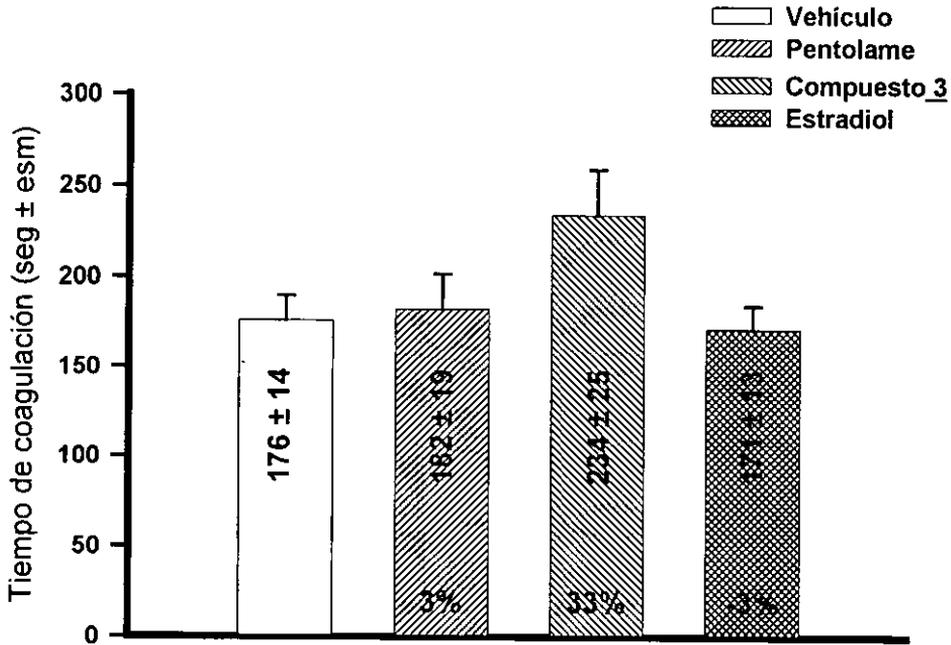


Figura 14. Efecto de pentolame, compuesto 3 y estradiol sobre el tiempo de coagulación sanguínea en ratón CD1 Ovx. Determinado 72 horas después de su administración.

**TABLA 6.**  
**EFFECTO SOBRE EL TIEMPO DE COAGULACIÓN SANGUÍNEA DE 17β-AMINOESTEROIDES Y 17β-ESTRADIOL EN RATON HEMBRA CD1. \***

TRATAMIENTO	DOSIS/DIA (mg/Kg)	N	PESO CORPORAL (g ± esm)	TIEMPO DE COAGULACION (seg ± esm)	PORCENTAJE DE EFECTO	P
Propilenglicol	5ml	5	33 ± 1	176 + 14	100	
Pentolame	80	6	34 ± 1.3	182 + 19	103	0.80
(3)	60	6	34 ± 1.5	234 + 25	133	0.089
Estradiol	60	5	32 ± 1.7	186 + 15	97	0.81

\* Evaluación después de 72 hrs de administración.

En la figura 15 se muestran los resultados globales obtenidos en el ratón CD1 Ovx. Podemos observar que el pentolame y el compuesto **(3)** producen aumentos significativos ( $p < 0.05$  y  $p < 0.01$  vs vehículo) del tiempo de la coagulación a las 24 y 48 horas después de la administración. El compuesto **(3)** presenta un efecto máximo mayor al producido por el pentolame y este efecto se observa hasta las 72 horas después de la administración ( $p < 0.01$  vs vehículo).

Esto significa que el compuesto **(3)** es más eficaz que su análogo el pentolame. En esta figura también observamos que el androstano derivado no tiene efectos sobre el tiempo de la coagulación y esto nos permite confirmar la importancia del anillo aromático A para observar el efecto sobre el tiempo de la coagulación sanguínea.

Estas observaciones apoyan la hipótesis de que es necesaria la presencia del anillo aromático como un requisito estructural para producir el efecto en el tiempo de la coagulación sanguínea. Por otra parte es importante considerar la influencia de la cadena de sustitución del grupo amino, debido a las variaciones observadas en nuestros resultados, en donde el compuesto **(3)** es más eficaz que el prolame y el pentolame.

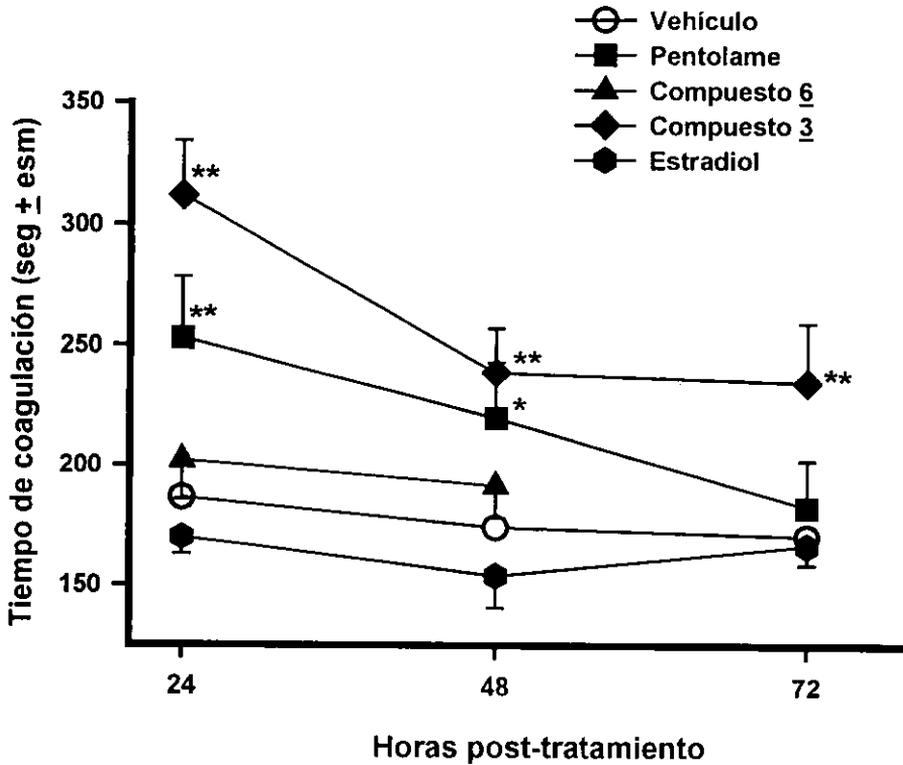


Figura 15. Efecto de pentolame, compuesto 6, compuesto 3 y estradiol sobre el tiempo de coagulación sanguínea en ratón CD1 Ovx. Determinado a las 24, 48 y 72 horas después de su administración. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ .

## V. CONCLUSIONES

Se sintetizaron y caracterizaron por métodos espectroscópicos de infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear (RMN) y espectroscopia de masas (EM) los compuestos: 17 $\beta$ -amino-1,3,5(10)estratrien-3-ol (**3**) y 3 $\beta$ -hidroxi-17 $\beta$ -amino-5-androsteno (**6**). Sus constantes fisico-químicas fueron concluyentes en la asignación estructural de los compuestos obtenidos para su identificación y la certificación de su pureza.

Los compuestos (**3**) y (**6**) fueron evaluados *in vivo* utilizando ratones macho y hembra Ovx. Los resultados obtenidos señalan que cambios estructurales en el anillo A tienen una influencia definitiva en la producción de la actividad anticoagulante de este grupo de fármacos, que indica la necesidad de la aromaticidad en el proceso.

Por otra parte el aminoestrógeno (**3**) cuya estructura carece de sustitución sobre el grupo amino posee actividad anticoagulante mayor que la observada por pentolame y prolame, lo que señala que la longitud de la cadena influye en este efecto

Los resultados obtenidos nos permiten continuar con la obtención y la evaluación de compuestos dirigido hacia el desarrollo de fármacos con aplicaciones terapéuticas.

**ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA**

## BIBLIOGRAFIA

- Alkjaersig N , Fletcher A.P., Burstein R. (1975). Association between oral contraceptive use and thromboembolismo: a new approach to investigation based on plasma fibrinogen chromatography. *Am J Obstet Gynecol.* **122**:199-205.
- Ambrus JL, Nieswander KR, Courey NG. (1969). Progestational agents and blood coagulation. *Am J Obstet Gynecol.* **103**: 994-999.
- Barrett-Connor E, Bush TL. (1991). Estrogen and coronary heart disease in women. *JAMA.* **265**: 1861-1867.
- Blickenstaff RT, Foster E, Gerzon K, Young P.(1985). Synthesis of some analogs of estradiol. *Steroids* **46**: 889-902.
- Brunner H, Sperl G. (1993). Synthese und antitumoraktivität von cis-dichloroplatin(II)-komplexen mit östradiolderivaten. *Monatsh Chem.* **124**: 83-102.
- Buckett WR y Marwick FA. (1975). Local anesthetic and antiarrhythmic properties of an aminosteroid: 3 $\alpha$ -dimethyl-amino-5 $\alpha$ -androstan-2 $\beta$ -ol-17-one (ORG.NA13). *Br J Pharmac.* **54**: 3-9.
- Chavis C, Gourcy Ch, Borgna JL Imbach JL. (1982). New steroidal nitrosoureas. *Steroids* **39**:129-147.
- Donayre J, Pincus G. (1965). Effects of Enovid on blood clotting factors. *Metabolism* **14**: 418.

- 
- Goodfriend L, Sehon AH. (1958). Preparation of an estrone-protein conjugate. *Can J Biochem Physiol.* **35**: 1177-1184.
  - Goodman y Gilman. (1996). Las bases farmacológicas de la terapéutica en: Estrogénos y progestágenos vol. II 9a. edición, Editorial McGRAW-Hill Interamericana. 1497-1531.
  - Gordon EM, Ratnoff OD, Saito H, Donaldson VH, Pensky j, Jones PK. (1980). Rapid fibrinolysis, augmented Hageman factor (factor XII) titres, and decreased C1 esterase inhibitor titres in women taking oral contraceptives. *J Lab Clin Med.* **96 (5)**: 762-769.
  - Granner DK. (1995). Hormonal action. En: Principles and practice of endocrinology and metabolism. Second edition, edited by Kenneth L, Backer JB. Lippincott Company Philadelphia. 20-34.
  - Greenspan F., Baxter John D. (1995). Endocrinología básica y clínica en: Ovarios 3ª edición, editorial El manual moderno, S.A. de C.V., 485-540.
  - Hecker E, Farthofer G. (1963). Östrogene und antiöstrogene Wirkung einiger Östranabkömmlinge in vitro und in vivo. *Biochim Biophys Acta.* **71**:196-198.
  - Hedlin AM. (1975). The effect of oral contraceptive estrogen on blood coagulation and fibrinolysis. *Throm Diath Haemost.* **33**: 370.
  - Hellstern P, Miyashita C, Kholer M. (1982). Thrombin induced platelet malondialdehyde (MDA) formation in normal subjects and in women taking oral contraceptives. *Thromb Haemost.* **48**: 395-401.

- 
- Henriksson P. (1991). Estrogen in patients with prostatic cancer. *Drug Safety*. **6(1)**: 47-53.
  
  - Huch KM, Elam MB, Chesney C.M.(1987). Oral contraceptive steroid induced platelet coagulant hiperactivity: dissociation of in vivo and in vitro effect. *Thromb. Res.* **1**: 41-50.
  
  - Jaimez R, Cooney A, Jackson K, Lemus A, Lemini C, Cárdenas M, García R, Silva G, Larrea F. (2000). In vivo estrogen bioactivities and in vitro estrogen receptor binding and transcriptional activities of anticoagulant synthetic 17 $\beta$ -aminoestrogens. *J.Steroid Biochem Mol Biol.* **73**: 59-66.
  
  - Kalin MF, Zumoff B. (1990). Sex hormones and coronary disease: a review of the clinical studies. *Steroids* **55**: 330-352.
  
  - Kaspar P, Witzel H. (1985). Steroid binding to the cytosolic estrogen receptor from rat uterus. Influence of the orientation of substituents in the 17-position of the 8 $\beta$ - and 8 $\alpha$ -series. *J Steroid Biochem.* **23**: 259-265.
  
  - Katzung BG.(1991). *Farmacología básica y clínica en: Hormonas gonadales e inhibidores*, 4a edición, El Manual Moderno. 501-505.
  
  - Kontturi M. (1991). Metabolic side-effects of estrogen therapy for prostatic cancer. *Scand J Urol Nephrol Suppl.* **138**:127-130.
  
  - Lemini C., Cruz-Ramos E., Toscano R. A., Cruz-Almanza R. (1998). A comparative structural study of the steroid epimers: 17 $\beta$ -amino-1,3,5(10)-estratrien-3-ol, 17 $\alpha$ -amino-1,3,5(10)-estratrien-3-ol, and some derivatives by <sup>1</sup>H NMR, and X-ray diffraction analysis. *Steroids* **63**: 350-360.

- Lemini C., Rubio-Póo C., Silva G., Zarco de Coronado I. (1998). Evidence of non-genomic effect of a  $17\beta$ -diamino estrogen, an estradiol derivative on motor activity in rodents. *Med Science Res.* **26**: 47-49.
- Lemini C, Rubio-Poo C., Garcia-Mondragón J., Zavala E., Mendoza-Patiño N., Castro D., Cruz-Almanza R., y Mandoki J.J. (1993). Anticoagulant and estrogenic effects of two new  $17\beta$ -amino-estrogens, butolame [ $17\beta$ -(4-hydroxy-1-butilamino)-1,3,5(10)estratrien-3-ol] and pentolame [ $17\beta$ -(5-hydroxy-1-pentilamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol]. *Steroids* **58**: 457-461.
- Lemus AE, Jaimez C, Lemini C, Menjivar M, Silva G, Rubio-Póo C, Valenzuela F, Larrea F. (1998). Estrogenic effects of the synthetic aminoestrogen  $17\beta$ -(5-hydroxy-1-pentilamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol (pentolame). *Steroids* **63**: 221-224.
- Mandoki JJ, Zavala E, Silva G, Mendoza-Patiño N, Rubio-Póo C, Medina-Martinez S y Dominguez-Escoto P. (1983). The dual effects of estrogens on blood clotting time. *Proc West Pharmacol Soc.* **26**: 45-48.
- Mandoki JJ, Rubio-Póo C, Lemini C, De la Peña A, Fernandez-G JM, García-Mondragón J, Zavala E, Silva G, y Mendoza-Patiño N. (1991). The effects of five new  $17\beta$ - amino-estrogens, buame, endiame, etolame, picae, and proacame on blood clotting time. *Proc West Pharmacol Soc.* **34**: 99-106.
- Meade TW, Brozovic M, Chakrabarti R. (1976). An epidemiological study of the haemostatic and other effects of oral contraceptives. *Br J Haematol* **34**: 353.
- Nilsson IM, Kullander S. (1967). Coagulation and fibrinolytic studies during use of gestagens. *Acta Obstet Gynaecol Scand.* **46**: 286-291.

- Pettit GR, Smith RL, Gupta Ak y Occolowitz JL. (1966). Structural biochemistry IV 3 $\beta$ -hydroxi-17 $\beta$ (L-proyl)amino-androst-5ene. *Ca J Chem.* **45**:501-507.
- Regan BM, Hayes N. (1956). 17- and 17a-Aza-D-homosteroids. *J Am Chem Soc.* **78**: 639-643.
- Robinson CH, Ermann C, Hollis DP. (1965). The synthesis of 17 $\alpha$ -amino-androsten-3 $\beta$ -ol, NMR spectra of 17-substituted androstanes. *Steroids* **6**: 509-518.
- Rosenberg L, Palmer JR, Lesko SM, Shapiro S. (1990). Oral contraceptive use and the risk of myocardial infraction. *Am J Epidemiol.* **131**:1009-16.
- Rubio-Póo C, Mandoki J.J, Jayme V, Mendoza-Patiño N, Alvarado C, Silva G, Zavala E, Fernandez-G J.M.& Rubio-Arroyo M. (1983). Prodiame: A new estrogen with sustained anticoagulan effect. *Proc West Pharmacol Soc.* **26**: 111-113.
- Rubio-Póo 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. & Toscano A.R. (1985). The anticoagulant effect of prolame, a novel amino-estrogen. *Steroids* **45**:159-170.
- Rubio-Póo C, Lemini C, García-Mondragón J., de la Peña A, Jayme V, Mendoza-Patiño N, Zavala E. Silva G, Blickenstaff R.T., Fernandez-G. J.M, & Mandoki J.J. (1990). The anticoagulant effect of hexolame another amino-estrogen with prolonged anticoagulant effect. *Steroids* **55**: 83-86.

- 
- Rubio-Póo C, Lemini C, Silva G, Chavez-Lara B, Mendoza-Patiño N, Ortíz R, Mandoki JJ. (1997). Effects of 17 $\beta$ -(N,N-diethylaminoethyl) amino - 1,3,5(10)-estratrien-3-ol, a diamino-estrogen, and its androstane analogue on blood clotting time. *Med Chem Res.* **7**: 67-75.
  
  - Williams CL, Stancel GM. ( 1996). Estrogenos y progestágenos. En: *Las Bases farmacológicas de la terapéutica*. Novena edición. Hardman JG, Limbird LE, Molinoff PB, Ruddon RW, Goodman Gilman A (eds). México.
  
  - Szendi Z, Dombi G, Vincze I. (1996). Steroids, LIII: New routes to aminosteroids. *Monatsh Chem* **127**: 1189-1196.
  
  - Tsakok F, Koh S. (1980). Effects of oral contraceptives containing 50 $\mu$ g estrogen on blood coagulation in non-Caucasian women. *Contraception* **21**: 505.
  
  - Vincze I, Hackler L, Szendi Z, Schneider G. (1996). Steroids 54. Amino acylamidosteroids. *Steroids* **61**: 697-702.
  
  - Wang F, Chiba K, Tada M. (1992). Facile deoxygenation of phenols and enols using sodium borohydride-nickel chloride. *J Chem Soc Perkin Trans.* **1**: 1897-1900.
  
  - Weeler OH, Reyes-Zamora C. (1969). Steroid derivatives of cysteamine and cysteine. *Can J Chem.* **47**: 160-163.
  
  - Ye Y, Huang Y, Wang Z, Chen S, Tian Y. (1993). Synthesis of new amino acid and peptide derivatives of estradiol and their binding affinities for the estrogen receptor. *Steroids* **58**: 35-39.

- Ygge J, Brody S, Korsan-Bengtzen K, Nilson L. (1969). Changes in blood coagulation and fibrinolysis in women receiving oral contraceptives. *Am J Obstet Gynecol.* **107**: 87-92.
  
- Zar JH. (1984). Multiple Comparisons. En *Biostatistical Analysis* (2ª Ed.). B Kurts (Ed.). Prentice-Hall, International Englewood Cliffs, N.J. pp 176-205.

