

00377



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

**POSGRADO EN CIENCIAS
BIOLOGICAS**

FACULTAD DE MEDICINA

**“CARACTERIZACION FARMACOLOGICA DE LOS
EFECTOS ESTROGENICO Y ANTICOAGULANTE
DEL 17B-AMINOESTROL EN MODELOS
IN VIVO E IN VITRO”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLOGICAS
(ORIENTACION BIOLOGIA EXPERIMENTAL)

PRESENTA
Q.F.B. YANIRA FRANCO MURILLO

DIRECTORA: **M. EN C. CRISTINA LEMINI GUZMAN**

MEXICO, D. F.

JUNIO 2005



m. 345660



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS COORDINACIÓN

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: Yanira Franco Murillo

FECHA: Junio 16/2005

FIRMA:

Ing. Leopoldo Silva Gutiérrez
Director General de Administración Escolar, UNAM
Presente

Por medio de la presente me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 4 de abril del 2005, se acordó poner a su consideración el siguiente jurado para el examen de grado de Maestría en Ciencias Biológicas (Biología Experimental) del(a) alumno(a) **Franco Murillo Yanira** con número de cuenta **92526655** con la tesis titulada: "**Caracterización farmacológica de los efectos estrogénico y anticoagulante del 17B-aminoestrol en modelos *in vivo* e *in vitro***", bajo la dirección del(a) **M. en C. Cristina Lemini Guzmán**.

Presidente:	Dr. Enrique Pedemera Astegiano
Vocal:	Dr. Pablo Damián Matsumura
Secretario:	M. en C. Cristina Lemini Guzmán
Suplente:	Dra. Gabriela Morali de la Brena
Suplente:	Dra. Ana Elena Lemus Bravo

Sin otro particular, quedo de usted.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F. a 13 de junio del 2005

Dr. Juan José Morrone Lupi
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del interesado

Comité Tutorial

Dra Ana Elena Lemus Bravo

Dr. Pablo Damián Matsumura

Agradezco a CONACyT el apoyo financiero otorgado en el proyecto de instalación clave I39338-M.

Quiero dar las gracias:

A Mi tutora la M en C. Crisitina Lemini por todo su apoyo y dirección durante el desarrollo de este trabajo.

A la Dra. Ana Elena Lemus y al Dr. Pablo Damián por todas sus sugerencias a lo largo de la maestría y que enriquecieron este trabajo.

Al Dr. Enrique Pedernera y a la Dra. Gabriela Morali, miembros del jurado, por todo su interés y sugerencias a mi trabajo.

A René Santillán y al Sr. Angel Morales por todo el poyo y colaboración durante el trabajo realizado en el laboratorio de Bioquímica Hormonal. Departamento de Biología de la Reproducción. INNCM "Salvador Zubirán".

A Sarita, gracias por tu amistad y tu aprecio y por hacerme sentir siempre que en ti tengo a una amiga.

A la QFI María Eugenia Nieto y a Irene Bravo por todo su incondicional apoyo durante mi estancia en el laboratorio de Hematología Especial. CMN "La Raza" pero sobre todo por brindarme su amistad y afecto invaluable.

A mis amigos, Deyamira, Héctor y Adrián quienes incondicionalmente me facilitaron material y equipo en el laboratorio de Bioquímica, Facultad de Medicina.

Agradezco la asistencia técnica del Sr. Rodolfo Arias en el laboratorio de Farmacología Endócrina. Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina, UNAM.

Y sobre todo un agradecimiento muy especial a la Dra. Ruth Jaimez Melgoza, insustituible amiga, gracias Ruth porque en todo momento estuviste a mi lado apoyándome en todos los sentidos y porque juntas hemos logrado que un sueño sea hoy una realidad, todo mi amor para ti.

Con todo cariño y un profundo agradecimiento:

Quiero dedicar este trabajo a mi Madre, María de Jesús Murillo, porque siempre has estado ahí brindándome todo tu amor y apoyo incondicionales, porque todos mis esfuerzos y mis logros los has celebrado siempre conmigo y porque también has estado presente en los momentos difíciles, brindándome todo tu amor.

Al dulce recuerdo de mi Padre, Humberto Franco, donde quiera que te encuentres sé que estás conmigo y feliz de que halla llegado a donde estoy.

A mis hermanas, Caro y Susi que siempre me brindaron todo su amor y apoyo sin importar la distancia y por la simple y sencilla razón de que forman parte esencial en mi vida.

A ese preciado e invaluable regalo de la vida, Tessa Shaadi.

A mi queridísima Ruth, porque la vida me ha brindado la enorme fortuna de encontrarnos en el camino y seguir en él.

A mis queridos amigos, Vero y Arturo por abrirme las puertas de su corazón, ofrecirme su amistad, apoyo incondicional y por brindarme la oportunidad de tener a mi extraordinaria amiguita, Marielita.

INDICE

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	3
3. INTRODUCCION	5
4. ANTECEDENTES	8
5. HIPOTESIS	16
6. OBJETIVOS	17
6.1 Objetivo General	
6.2 Objetivos Específicos	
7. MATERIALES Y METODOS	18
7.1 MATERIALES	18
7.1.1 Compuesto radiactivo	
7.1.2 Compuestos radioinertes	
7.1.3 Disolventes	
7.1.4 Material biológico	
7.2 METODOS	20
7.2.1 Purificación del estradiol radiactivo.....	20
7.2.2 Evaluación del efecto estrogénico del 17β-aminoestrol.....	20
7.2.2.1 Determinación de la constante aparente de disociación (K_d) y del número de sitios de unión (NSU) del receptor de estrógenos.....	20
7.2.2.2 Interacción de 17β-aminoestrol con el receptor intracelular de estrógenos.....	22
7.2.2.3 Determinación del efecto de tipo estrogénico del 17β-aminoestrol sobre el peso uterino.....	24
7.2.2.4 Determinación de la actividad de tipo estrogénica del 17β-aminoestrol en un sistema de expresión en levaduras.....	24
7.2.3 Evaluación del efecto del 17β-aminoestrol y estradiol sobre el tiempo de la coagulación sanguínea en el ratón CD1 macho adulto.....	25
7.2.4 Evaluación del efecto del 17β-aminoestrol sobre los parámetros hemostáticos tiempo de protrombina (TP), tiempo de tromboplastina parcialmente activada (TTPa), tiempo de trombina (TT) y la concentración	

del fibrinógeno.....	26
7.2.5 Análisis estadístico.....	27
7.2.6 Determinación de las dosis efectivas e inhibitorias medias.....	28
7.2.7 Análisis de correlación de peso uterino húmedo y seco en los modelos de ratón CD1 y rata Wistar hembras inmaduras.....	28
8. RESULTADOS.....	29
8.1 Características de unión del estradiol al receptor intracelular de estrógenos.....	29
8.2 Interacción del 17 β -aminoestrol con el receptor intracelular específico de estrógenos. Afinidad relativa de unión (ARU) y constante de inhibición (K_i).....	31
8.3 Efecto uterotrófico del 17 β -aminoestrol. Dosis efectiva media (DE_{50}), efecto máximo ($E_{m\acute{a}x}$) y potencia relativa con respecto al estradiol.....	33
8.4 Análisis de correlación en el peso del útero de hembras inmaduras de rata Wistar y ratón CD1.....	35
8.5 Actividad estrogénica del 17 β -aminoestrol en el sistema de expresión RE-ERE en levaduras.....	36
8.6 Efecto del 17 β -aminoestrol y el estradiol sobre el tiempo de la coagulación sanguínea en el ratón CD1 adulto.....	38
8.7 Efecto del 17 β -aminoestrol y el estradiol sobre parámetros hemostáticos en el ratón CD1 adulto.....	41
9. DISCUSION.....	45
10. CONCLUSIONES.....	54
11. BIBLIOGRAFIA.....	56
12. APENDICE.....	65

1. RESUMEN

El uso clínico de los estrógenos se encuentra asociado con el aumento de eventos tromboembólicos. El estradiol (E_2) produce efectos procoagulantes en roedores, que contrastan con los efectos anticoagulantes producidos por los 17β -aminoestrógenos. El objetivo de este trabajo fue la caracterización farmacológica de los efectos estrogénicos y anticoagulantes del 17β -aminoestrol (AE_2), el cual carece de la cadena alquílica o sustituyente en el grupo amino en el C-17 del esteroide. La afinidad del AE_2 al receptor de estrógenos (RE) se evaluó utilizando el citosol de úteros de ratas y ratones hembras prepúberes mediante un análisis de competencia con E_2 - $[^3H]$. La actividad de tipo estrogénica se evaluó en el sistema de levaduras co-transfectadas con el gen subtipo α del receptor humano de estrógenos (RhE α) y con el gen reportero de la β -galactosidasa. La actividad uterotrófica del AE_2 se determinó en ratones CD1 y ratas Wistar hembras inmaduras. Los animales recibieron por vía subcutánea (s.c.) durante tres días consecutivos, diferentes dosis de AE_2 (10-5000 μ g/Kg de peso) y como grupos control, E_2 (0.001-1000 μ g/Kg de peso) y propilenglicol (0.1 ml/animal/día). Se estudió el efecto de la administración s.c. por cinco días consecutivos de diferentes dosis de AE_2 y E_2 (0.1-1000 μ g/Kg de peso) en el ratón CD1 adulto sobre el tiempo total de la coagulación sanguínea (TTC). En otros experimentos, los ratones recibieron la administración única de AE_2 (1, 2, 4, y 8 mg/100 g de peso) o E_2 (3 mg/100g de peso) y se evaluó el TTC, tiempo de protrombina (TP), tiempo de tromboplastina parcialmente activada (TTPa), tiempo de trombina (TT) y la concentración del fibrinógeno 24 y 48 horas post-tratamiento. En todos los experimentos se utilizó como control el disolvente (propilenglicol; 3 ml/Kg). El AE_2 se unió al RE con una afinidad relativa menor a la del E_2 . El AE_2 fue capaz de activar de manera dosis-dependiente la transcripción del gen de la β -galactosidasa. Esta última respuesta fue inhibida por el antiestrógeno ICI-182,780 confirmando que los efectos agonistas del AE_2 son mediados por el RE. El AE_2 también incrementó en forma dosis-dependiente los pesos uterinos de ratas y ratones hembras inmaduras. El efecto máximo observado fue de un 95% en el ratón y de un 49% en la rata en comparación con el efecto máximo del E_2 (100%). Las DE_{50} del AE_2 fueron 0.55 a 0.59 mg/Kg en el ratón y en la rata fueron de 0.58 a 0.76 mg/Kg.

El AE₂ y el E₂ produjeron efectos opuestos en el TTC en todas las dosis administradas (0.1-1000 µg/Kg) y no fueron efectos dosis dependientes. AE₂ produjo un aumento del TTC en un 29% (p<0.01) entre las 48 y 72 horas. Por el contrario, el E₂ disminuyó el TTC hasta en un 30% (p<0.01), efecto que se mantuvo por 8 días. El AE₂ (1, 2, 4, y 8 mg/100 g de peso) incrementó en un 96% el TTC de forma dosis dependiente (24 horas, p < 0.001). La administración única de AE₂ incrementó los parámetros TP, TTPa, TT en un 15%, 55% y 29% respectivamente (p<0.01). En contraste, el E₂ produjo una disminución significativa del TTC en un 20% (p<0.001) y del TTPa en un 23% (p < 0.001) a las 48 horas. La concentración del fibrinógeno se incrementó de manera importante (107% p<0.001) en el grupo tratado con AE₂. El AE₂ es un agonista parcial del RE que tiene una actividad estrogénica considerablemente menor a la del E₂. Los resultados indican que el mecanismo de acción del AE₂ se lleva a cabo modificando las vías intrínseca, extrínseca y común de la coagulación. El AE₂ es el 17β-aminoestrógeno que presenta el mayor efecto anticoagulante hasta ahora descrito de esta familia de fármacos y es el compuesto prototipo de los 17β-aminoestrógenos responsable de la actividad anticoagulante administrado a roedores.

2. ABSTRACT

Clinical use of exogenous estrogens has been associated with an increase of thromboembolic events. In rodents, the naturally occurring estradiol (E_2) exerts procoagulant effects contrasting with the anticoagulant effects observed by some 17β -aminoestrogens. The aim of this work was to characterize the estrogenic and anticoagulant effects of the 17β -aminoestrol (AE_2) which lacks the substitution on the amino group at C-17 of the steroid molecule. The affinity of the AE_2 to the estrogen receptor (ER) was determined in a competitive binding assay using [3H] E_2 in prepuberal rat and mice uterine cytosol. The estrogenic activity was evaluated using a yeast system co-transfected with the subtype α of the human estrogen receptor (hER α) and as the reporter vector of the β -galactosidase gene. AE_2 was evaluated by the uterotrophic assay using immature CD1 mice and Wistar rats. The animals were injected subcutaneously (s.c.) for three consecutive days with AE_2 at different doses (10-5000 μ g/Kg of body weight), as control groups: E_2 (0.001-1000 μ g/Kg of body weight), and propyleneglycol (0.1 ml/animal/day). The effect of the AE_2 on blood clotting time (BCT) was studied in male adult CD1 mice, the animals were injected s.c., for five consecutive days with AE_2 or E_2 at different doses (0.1-1000 μ g/Kg of body weight), and propyleneglycol as control groups. In other experiments, groups of CD1 mice received a single s.c., administration of AE_2 (1, 2, 4, and 8 mg /100 g of body weight), or E_2 (3 mg/100g of body weight) and propyleneglycol (3 ml/Kg) as control groups. The BCT, prothrombin time (PT), activated partial thromboplastin time (aPTT), thrombin time (TT) and fibrinogen concentration were determined 24 and 48 hours post-administration. AE_2 interacts with the ER, although with significantly lower affinity than E_2 . It was demonstrated that AE_2 was able to activate in a dose-dependent manner, the hER α -mediated transcription of the β -galactosidase gene. This response was inhibited by the anti-estrogen ICI-182,780, confirming that the agonist-mediated effect of AE_2 was due to the selective activation of ER. The AE_2 increased uterine weight in mice in a 95% and rats in a 49% as maximum effect compared to E_2 (100%). In mice the ED_{50} to produce uterotrophic effects was between 0.55-0.59 mg/Kg and the ED_{50}

values obtained in rats were 0.58-0.76 mg/Kg. Daily s.c. administration of the AE₂ produced an anticoagulant effect showing an effect after 48 and 72 hours of administration of 29% (p<0.01). In contrast, E₂ reduced significantly the BCT maintaining the procoagulant effect until 8 days after administration (30%; p<0.01). A single administration of AE₂ increased BCT by 96% (24 hours, p < 0.001). The PT, aPTT, TT coagulation parameters were lengthened 15%, 55%, and 29% respectively (p<0.01). On the contrary, E₂ produced a significant decrease on BCT (20%) and diminished aPTT 23%, (p < 0.001) after 48 hours. AE₂ increased the fibrinogen concentration 107% (p<0.001).

In conclusion, AE₂ is a partial agonist of the ER with a significantly lower estrogenic activity than E₂. The result indicated that the mechanisms of action of AE₂ is through of the modification the intrinsic, extrinsic and common pathways of the coagulation. This AE₂ has the greater effect on the blood clotting time compared to other 17β-aminoestrogens previously described. The AE₂ is the prototype compound of the 17β-aminoestrogens family, and the responsible of the anticoagulant activity in rodents.

3. INTRODUCCION

Los estrógenos son hormonas esteroides producidas principalmente en los ovarios; mediante un efecto directo, los estrógenos generan crecimiento y desarrollo de la vagina, el útero y las trompas de Falopio (Williams y Stancel, 1996), participan en el desarrollo y mantenimiento de las características sexuales secundarias de la mujer, en el control del ciclo menstrual-ovulatorio y en la modulación de algunos procesos metabólicos como de minerales, lípidos, carbohidratos y proteínas (Fritsch y Murdoch, 1994; Williams y Stancel, 1996).

Los estrógenos son hormonas lipofílicas que difunden a través de la membrana plasmática de las células y se distribuyen de acuerdo a su especificidad y alta afinidad por su receptor, fijándose en un sitio de unión específico para la hormona en el receptor presente en el núcleo y citoplasma de las células blanco (Ing y O'Malley, 1995). Los receptores de estrógenos se encuentran en el útero, glándula mamaria, hipófisis anterior, hipotálamo, y en tejidos no reproductores como hueso, hígado o endotelio vascular (Ing y O'Malley, 1995; Williams y Stancel, 1996). Al unirse la hormona a su receptor, éste lleva a cabo un cambio conformacional hacia una forma activa capaz de afectar la transcripción génica en el núcleo. Para que lleve a cabo su función de manera eficiente, el receptor debe dimerizarse, interactuar con secuencias específicas en el DNA y acoplarse a otros factores de transcripción para formar un complejo multimérico estable, el cual promueve el inicio de la transcripción y el RNA mensajero producido se traduce en los ribosomas a una proteína con una función biológica (Nilsson y Gustafsson, 2000).

Además de los efectos estrogénicos en el sistema reproductor, también se ha descrito que los estrogénos tienen un papel importante en la modulación de la fisiología cardiovascular (Kalin y Zumoff, 1990; Guetta y Cannon, 1996). Estudios epidemiológicos han demostrado que las mujeres en edad fértil están protegidas contra enfermedades cardiovasculares, protección que desaparece

cuando los ovarios dejan de producir estrógenos durante la menopausia o por la extirpación de los ovarios en mujeres premenopáusicas o en edad fértil (Johansson *et. al.*, 1975).

La protección que ejercen los estrógenos en las mujeres ante las enfermedades coronarias fue documentada desde 1802, cuando Heberdenn escribió: "He visto cerca de cien pacientes con angina de pecho, en los que sólo había tres mujeres y un muchacho de 12 años, el resto fueron hombres y rebasaban los 50 años de edad" (Kalin y Zumof, 1990). Asimismo, en un estudio realizado por la Organización Mundial de la Salud durante 1987 en una población mundial de 100 000 personas, se demostró la prevalencia del género masculino ante las enfermedades coronarias. La relación de la mortalidad por estas enfermedades entre hombres y mujeres fue de 2 a 1, en todos los países analizados; confirmando la influencia del género en los padecimientos cardiovasculares. Por otra parte la edad es un factor importante que participa en los trastornos cardiovasculares ya que en el hombre la mortalidad por infarto al miocardio es cuatro veces mayor, comparada con la mujer durante la etapa reproductiva (Barret-Connor, *et. al.*, 1991; Wren, 1992; Farhat, *et. al.*, 1996; Perrot-Appantat, 1996). Estas diferencias de género disminuyen durante la menopausia y después de los 70 años ya no son significativas (Kalin y Zumoff, 1990).

La acción protectora de los estrógenos en los padecimientos cardiovasculares en las mujeres premenopáusicas se ha explicado tomando en cuenta diversos factores. Uno de ellos es el relacionado con los efectos de los estrógenos sobre el metabolismo de los lípidos ya que incrementa las lipoproteínas de alta densidad (HDL) y el catabolismo de las lipoproteínas de bajo peso molecular (LDL) (Guetta y Cannon, 1996), así como el aumento de la síntesis hepática de apolipoproteína A1 (Apo-A₁), cuya principal función es activar la lipasa de lipoproteína que favorece el transporte de colesterol y otros lípidos a diversos tejidos (Tikkanen, *et. al.*, 1982; Nathan y Chaudhuri, 1997). Otro factor

incluye los efectos vasodilatadores de los estrógenos al promover o inhibir la síntesis de factores derivados del endotelio como prostaciclina, endotelina-1 (ET-1) y óxido nítrico (NO) que se encuentran en las células endoteliales de los vasos sanguíneos (Wakasugi, *et al.*, 1989; Polderman, *et al.*, 1993). A este nivel, también se ha descrito que los estrógenos tienen la capacidad de incrementar la regeneración del endotelio ante el daño ocasionado por la placa ateromatosa (Krasinski, *et al.*, 1997). Asimismo se han considerado de gran importancia los efectos no genómicos del E₂, en los cuales el E₂ se une a receptores presentes en la membrana celular del músculo liso vascular modulando la función de canales iónicos de calcio (Ca²⁺) y potasio (K⁺) (Zhang, *et al.*, 1994; Farhat, *et al.*, 1996; Valverde, *et al.*, 1999; Mendelsohn, 2002; Salom, *et al.*, 2002; Korovkina, *et al.*, 2004).

Durante la menopausia, la producción de E₂ cesa casi por completo y se observa que la mujer pierde su protección ante las enfermedades cardiovasculares, por lo que se ha recomendado la administración de la terapia hormonal sustitutiva (THS) (Chae, *et al.*, 1997). El uso de estrógenos equinos conjugados, el cipionato y el valerato de estradiol entre otros (Schiff y Walsh, 1995; Chrousos, 2005), han mostrado beneficios importantes en algunos trastornos vasomotores ejerciendo su protección ante enfermedades cerebrovasculares y cardiovasculares (Stampfer, *et al.*, 1991 y Zárate, 1999). Sin embargo, numerosos estudios clínicos han revelado que el uso de los estrógenos en la THS o anticonceptiva está asociado con el aumento de las enfermedades tromboembólicas como la trombosis venosa profunda o el embolismo pulmonar (Böttiguer, *et al.*, 1980; Mammen, 1982; 2000; Levy, *et al.*, 1999; Luyer, *et al.*, 2001; Rosendaal *et al.*, 2001 y 2002; Van Hylckama y Rosendaal, 2004; Cushman, *et al.*, 2004; Van-Vliet *et al.*, 2004). Se ha demostrado que cuando los estrógenos se encuentran en niveles altos en la circulación, pueden modificar las concentraciones circulantes de algunos factores de la coagulación y alterar la actividad fibrinolítica, efectos que pueden conducir a un estado de hipercoagulabilidad sanguínea que da lugar a la

trombogénesis. (Caine *et. al.*, 1992; Devor *et. al.*, 1992; Meilahn *et. al.*, 1996, Rosendaal, *et. al.*, 2003).

4.-ANTECEDENTES

Numerosos estudios clínicos han demostrado que los efectos adversos indeseables de los estrógenos se relacionan con la alteración de los factores que participan en la hemostasis (Gerstman, *et. al.*, 1990; Devor, *et. al.*, 1992; Lee, *et. al.*, 1993) produciendo aumento de factores y cofactores que participan en la coagulación, como el FII (protrombina), FV, FVII, FVIII, FIX y el fibrinógeno (Quehenberger, *et. al.*, 1996; Mammen, 2000; Van Hylckama y Rosendaal, 2004). Asimismo, se ha observado una importante disminución de la actividad de los factores anticoagulantes naturales como la antitrombina III, la proteína C y su co-factor la proteína S, y de aquellos que intervienen en la fibrinólisis como el plasminógeno, el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (laTP-1) y el dímero D (Mammen, 2000; Teede, *et. al.*, 2000; Gottsäter, *et. al.*, 2001). Sin embargo, los estudios experimentales tanto *in vivo* como *in vitro* enfocados a esclarecer el mecanismo de acción de los estrógenos sobre la hemostasia son escasos. Se ha descrito en modelos animales como la rata, que los estrógenos naturales y sintéticos ejercen un aumento significativo sobre la adhesividad plaquetaria y la actividad de factores vitamino-K dependientes como los factores II, VII, IX y X, así también la disminución en la actividad de la antitrombina III y del plasminógeno (Emms y Lewis, 1985; Owens, *et. al.*, 1986). Por otra parte, también se ha observado el incremento en los niveles de los factores II, V, XII y una disminución del complejo VII + X en cobayos (Landemore, *et. al.*, 1984). La administración única de dipropionato de estradiol (EDP, 2 mg) en ratas Wistar incrementó la concentración plasmática de trombina y el número de vasos sanguíneos ocluidos en los pulmones por la presencia de coágulos de fibrina (Ohashi, *et. al.*, 2003). También se ha observado que el E₂ estimula la producción del factor von Villebrand (vWF), un factor prohemostático, de células endoteliales de la vena umbilical de humano (Harrison y McKee, 1984). Estos

trombogénesis. (Caine *et. al.*, 1992; Devor *et. al.*, 1992; Meilahn *et. al.*, 1996, Rosendaal, *et. al.*, 2003).

4.-ANTECEDENTES

Numerosos estudios clínicos han demostrado que los efectos adversos indeseables de los estrógenos se relacionan con la alteración de los factores que participan en la hemostasis (Gerstman, *et. al.*, 1990; Devor, *et. al.*, 1992; Lee, *et. al.*, 1993) produciendo aumento de factores y cofactores que participan en la coagulación, como el FII (protrombina), FV, FVII, FVIII, FIX y el fibrinógeno (Quehenberger, *et. al.*, 1996; Mammen, 2000; Van Hylckama y Rosendaal, 2004). Asimismo, se ha observado una importante disminución de la actividad de los factores anticoagulantes naturales como la antitrombina III, la proteína C y su co-factor la proteína S, y de aquellos que intervienen en la fibrinólisis como el plasminógeno, el inhibidor del activador del plasminógeno tipo 1 (IaTP-1) y el dímero D (Mammen, 2000; Teede, *et. al.*, 2000; Gottsäter, *et. al.*, 2001). Sin embargo, los estudios experimentales tanto *in vivo* como *in vitro* enfocados a esclarecer el mecanismo de acción de los estrógenos sobre la hemostasia son escasos. Se ha descrito en modelos animales como la rata, que los estrógenos naturales y sintéticos ejercen un aumento significativo sobre la adhesividad plaquetaria y la actividad de factores vitamino-K dependientes como los factores II, VII, IX y X, así también la disminución en la actividad de la antitrombina III y del plasminógeno (Emms y Lewis, 1985; Owens, *et. al.*, 1986). Por otra parte, también se ha observado el incremento en los niveles de los factores II, V, XII y una disminución del complejo VII + X en cobayos (Landemore, *et. al.*, 1984). La administración única de dipropionato de estradiol (EDP, 2 mg) en ratas Wistar incrementó la concentración plasmática de trombina y el número de vasos sanguíneos ocluidos en los pulmones por la presencia de coágulos de fibrina (Ohashi, *et. al.*, 2003). También se ha observado que el E₂ estimula la producción del factor von Willebrand (vWF), un factor prohemostático, de células endoteliales de la vena umbilical de humano (Harrison y McKee, 1984). Estos

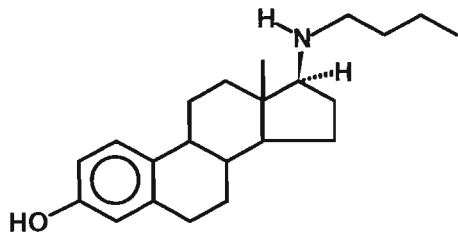
cambios en la concentración o actividad de los factores que participan en la hemostasia sanguínea podrían favorecer un estado de hipercoagulabilidad y como consecuencia el establecimiento de la trombosis.

Una aportación importante, a nivel molecular del efecto del E₂ en la coagulación sanguínea, ha sido la demostración de la modulación y regulación en la expresión del factor XII por el E₂ (Farsetti, *et. al.*, 1995). En estudios en ratas ovariectomizadas tratadas con E₂ se observó que la transcripción génica del FXII fue 6 veces mayor respecto a los animales no tratados, indicando que el E₂ es capaz de inducir la expresión del gen del FXII *in vivo*. En este mismo trabajo, los autores también encontraron en la región promotora del factor XII humano que contiene un sitio palindrómico imperfecto (5'-GGGCAnnnTGACC-3') en la posición -43/-31 parecido a los elementos de respuesta a estrógenos, todo esto podría ser la base del mecanismo a través del cual los estrógenos incrementan la concentración plasmática del FXII (Farsetti, *et. al.*, 1995; Citarella, *et. al.*, 1996). Sin embargo el estudio experimental de los efectos de los estrógenos en la hemostasia sanguínea necesita profundizarse más para que permita conocer los mecanismos de acción involucrados en sus efectos sobre la coagulación sanguínea y asimismo estudiar si existe alguna relación con sus efectos estrogénicos.

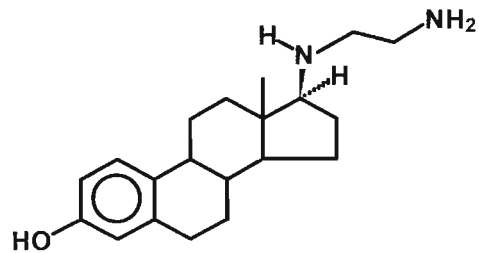
Desde hace ya dos décadas se inició la investigación de los efectos farmacológicos de los 17β-aminoestrógenos, compuestos que exhiben efectos opuestos al E₂ en el sistema de la coagulación. Las propiedades anticoagulantes de los 17β-aminoestrógenos como prodiame, buame, prolame y hexolame entre otros, fueron descritas en la década de los 80's, por Rubio-Póo y colaboradores (1983, 1985; figura 1). En estos trabajos, los autores estudiaron compuestos análogos al E₂ en los que el grupo hidroxilo (-OH) en la posición 17β se substituyó por un grupo amino substituido (-NH-R). La administración de esta serie de compuestos en ratas y ratones produjeron efectos anticoagulantes dosis-dependientes y prolongados (Mandoki, *et. al.*, 1991). Los aminoestrógenos

que produjeron un mayor incremento en el tiempo de la coagulación fueron prolame (54%) y hexolame (43%), además, se observó que los 17β -aminoestrógenos también inducían la presencia de células cornificadas en el epitelio vaginal de ratonas CD1 ovariectomizadas (Rubio-Póo, *et. al.*, 1983, 1985, 1990; Mandoki, *et. al.*, 1991, Lemini, *et. al.*, 1993).

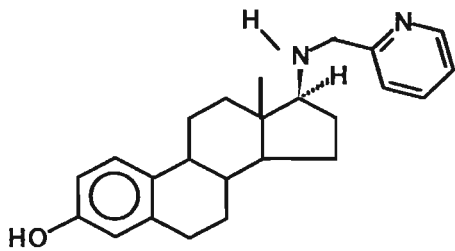
Por otra parte, se describió que los efectos anticoagulantes de los 17β -aminoestrógenos son selectivos y dependen de que el anillo A del esteroide sea aromático, así como del grupo amino sustituido (Rubio Póo, *et. al.*, 1997). Se ha observado que el 17β -aminoestrógeno dedamine produce efectos anticoagulantes significativos y prolongados mientras que su análogo androstán-derivado carece de todo efecto aún a dosis mayores que las utilizadas para dedamine (Rubio Póo, *et. al.*, 1997). Posteriormente, en un estudio en ratas Wistar ovariectomizadas se evaluó la actividad estrogénica y anticoagulante de la serie homóloga prolame, butolame, y pentolame (figura 2). La variación estructural en las moléculas de este grupo fue la longitud de la cadena alquílica unida al grupo amino y el objetivo del estudio fue conocer si existía una relación entre la estructura química de los 17β -aminoestrógenos y sus actividades estrogénica y anticoagulante (Lemus, *et. al.*, 1998; Jaimez, *et. al.*, 2000).



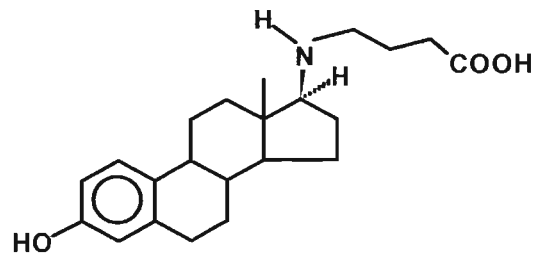
Buame



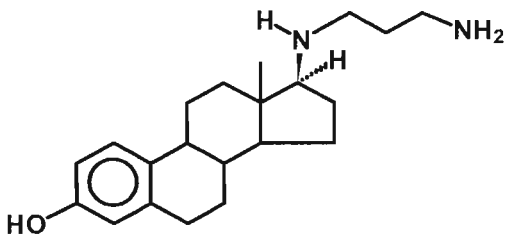
Endiame



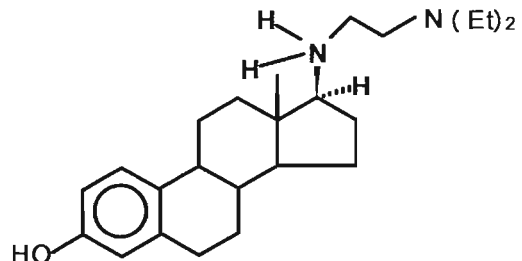
Picae



Proacame



Prodiame



Dedamine

Figura 1. 17β-aminoestrógenos

La afinidad relativa de unión (ARU) al receptor de estrógenos fue evaluada y se observó que el prolame y el butolame (ARU: 0.11% y 0.14%, respectivamente) tuvieron una mayor capacidad para competir con el E₂-[³H] por los sitios de unión del RE que el pentolame (0.03%). Otros marcadores biológicos y específicos de estrogenicidad empleados en diferentes estudios como: el incremento del peso uterino, la cuantificación de la hormona luteinizante, la inducción del receptor de progesterona dependiente de estrógenos en la hipófisis anterior nos permitieron caracterizar la actividad estrogénica de la serie homóloga, demostrando que el prolame fue el 17β-aminoestrógeno que tuvo la mayor actividad de tipo estrogénico, seguido del butolame y del pentolame (Lemus, *et. al.*, 1998; Jaimez, *et. al.*, 2000): Así mismo, a través de la actividad de la cloranfenicol acetil transferasa (CAT), en un sistema de expresión en células HeLa co-transfectadas con los genes de los receptores humanos de estrógenos subtipos α (RhEα) o β (RhEβ) como vector de expresión y como vector reportero al gen de la CAT, fusionado con elementos que responden a estrógenos, los resultados sobre la actividad estrogénica fueron semejantes (Jaimez, *et. al.*, 2000). En el modelo de ratón CD1 hembra inmadura, también se encontró que el prolame fue el aminoestrógeno que presentó la mayor actividad estrogénica, mientras que en la rata Wistar hembra inmadura, el butolame tuvo un mayor efecto sobre el incremento del peso uterino (Lemini, *et. al.*, 2005b). Los resultados de estos estudios demostraron que los 17β-aminoestrógenos son agonistas parciales de los RhEα y RhEβ y que su actividad estrogénica es inversamente proporcional a la longitud de la cadena alquílica en el grupo amino (Jaimez, *et. al.*, 2000). La evaluación de prolame, butolame y pentolame sobre el tiempo de la coagulación sanguínea en ratas Wistar ovariectomizadas demostró que la administración de estos aminoestrógenos en la rata, aumentó el tiempo total de la coagulación entre un 20% a 25%, a diferencia del E₂ que disminuyó en un 30% (p < 0.05) este parámetro (Lemus, *et. al.*, 1998, Jaimez, *et. al.*, 2000, Lemini, *et. al.*, 2005a).

Estos resultados indicaron que las diferencias entre la eficacia y la potencia en los efectos estrogénico y anticoagulante de los 17β -aminoestrógenos se relacionaban con el tipo de sustituyente del grupo amino.

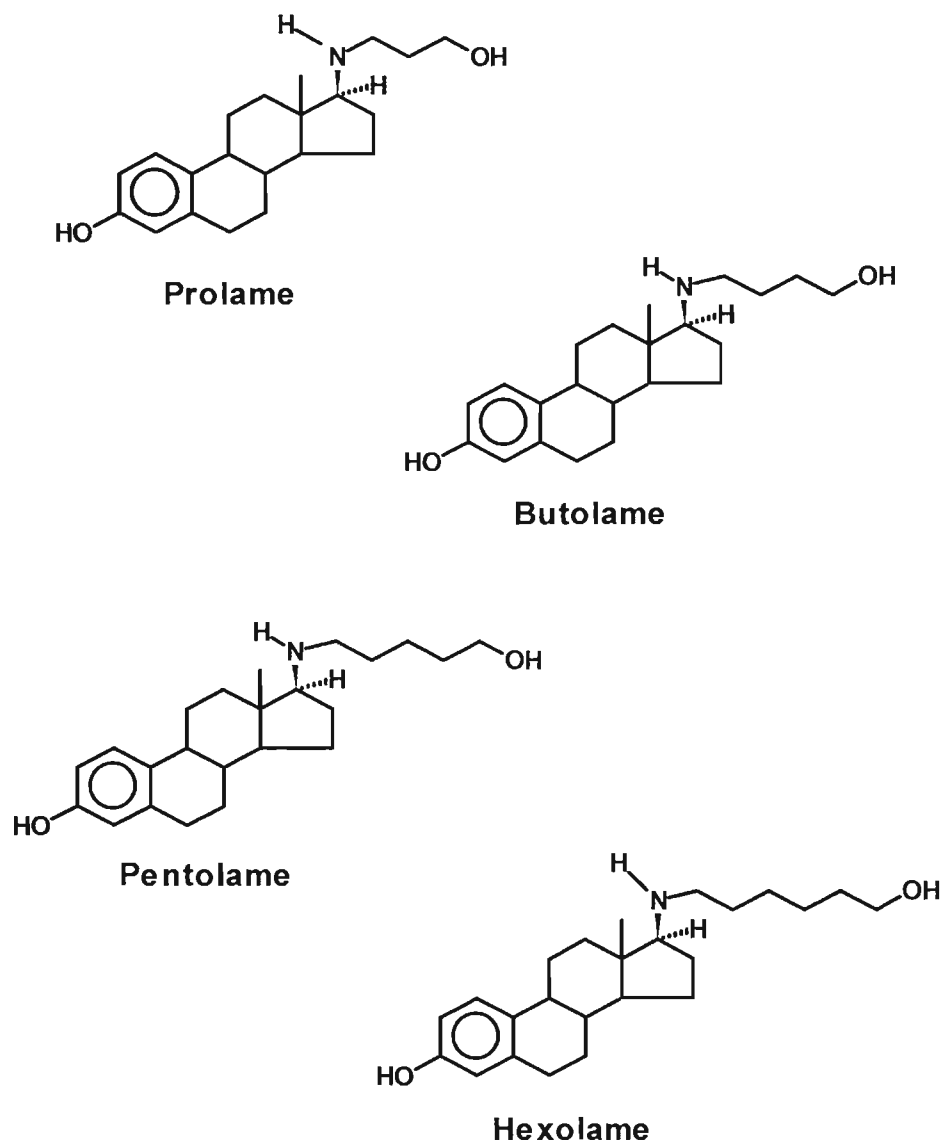


Figura 2. Serie homóloga de los 17β -aminoestrógenos

Recientemente se estudió en la rata Wistar los efectos del pentolame sobre parámetros hemostático, como el tiempo de protrombina, el cual explora la vía intrínseca de la coagulación y se activa cuando la sangre entra en contacto con la tromboplastina tisular (factor extrínseco), tiempo parcial de tromboplastina activada que explora la vía intrínseca de la coagulación, la cual inicia al contacto del factor XII con superficies extrañas a la pared vascular y la concentración del fibrinógeno, que nos permite explorar la vía común de la coagulación, que da lugar a la formación del coágulo sanguíneo (Majluf, 2001). En este estudio el pentolame incrementó en un 115% ($p < 0.05$) la concentración del fibrinógeno a diferencia del E_2 , que no produjo cambios significativos en este parámetro (García-Manzano, *et. al.*, 2002).

La observación de que los efectos anticoagulantes de los 17β -aminoestrógenos mencionados anteriormente, eran muy similares condujeron a investigar los efectos producidos por el 17β -aminoestrol (AE_2 , figura 3). Este compuesto a diferencia de los 17β -aminoestrógenos previamente descritos, carece de la cadena alquílica o sustituyente en el grupo amino del C-17 en el esteroide (Lemini, *et. al.*, 1998), por lo tanto, fue necesario conocer la relación entre esta modificación de la estructura química y sus efectos estrogénicos y sobre la coagulación sanguínea. Asimismo el estudio de los efectos del AE_2 , teniendo como indicador el TTC y de su efecto sobre las vías intrínseca, extrínseca y común de la coagulación, nos permitirían establecer al AE_2 como el compuesto prototipo de este grupo de fármacos responsable de los cambios producidos en los roedores sobre la coagulación sanguínea.

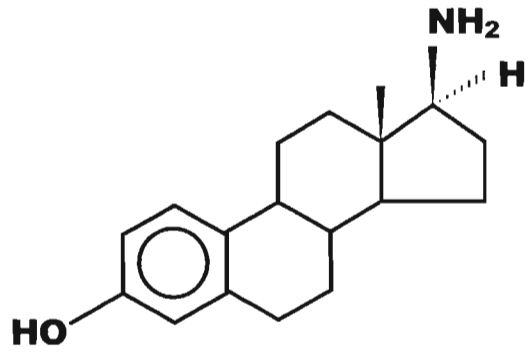


Figura 3. 17β-aminoestrone

5. HIPOTESIS

La inserción del grupo amino (NH_2) sin sustituyentes en lugar del grupo hidroxilo (OH) en el C-17 de la molécula del estradiol, disminuye la actividad estrogénica y produce efectos anticoagulantes, a diferencia de los efectos procoagulantes del estradiol.

6. OBJETIVO GENERAL

Determinar los efectos de tipo estrogénico del 17β -aminoestrol así como sus efectos en la coagulación sanguínea, mediante la evaluación de parámetros hemostáticos, utilizando modelos experimentales *in vivo* e *in vitro*.

6.1 OBJETIVOS ESPECIFICOS

- a) Evaluar la afinidad relativa de unión del 17β -aminoestrol al receptor intracelular de estrógenos del útero de ratas y ratones hembras inmaduras (RE).
- b) Determinar en modelos *in vivo* los efectos de tipo estrogénico del 17β -aminoestrol en la rata Wistar y el ratón CD1 hembras inmaduras sobre el incremento del peso del útero húmedo y seco.
- c) Caracterizar en modelos *in vitro* la actividad de tipo estrogénica del 17β -aminoestrol en un sistema de expresión en levaduras.
- d) Determinar el efecto del 17β -aminoestrol sobre el tiempo de la coagulación sanguínea en el ratón macho CD1 adulto.
- e) Determinar el efecto del 17β -aminoestrol sobre el tiempo de protrombina (TP), tiempo de tromboplastina parcialmente activada (TTPa), tiempo de trombina (TT) y la concentración de fibrinógeno en el ratón macho CD1 adulto.

7. MATERIALES Y METODOS

7.1 MATERIALES

7.1.1 Compuesto radiactivo

El estradiol-[6,7-³H] (E₂-[³H]), con actividad específica de 41.0 Ci/mmola, se adquirió en Amersham International (Buckinghamshire, Inglaterra).

7.1.2 Compuestos radioinertes

El **17β-aminoestrol** (AE₂, 3-hidroxi-1,3,5(10)-estratrieno-17β-amino), se sintetizó utilizando el método descrito por Lemini et. al (1998), a partir de estrona (3-hidroxi-1,3,5(10)-estratrieno-17-ona) donada por Syntex de México.

El estradiol (E₂, 1,3,5(10)-estratrieno-3,17β-diol) se obtuvo de Sigma Chemical Co., (San Luis MO, EU) y su pureza fue establecida por cromatografía en capa fina.

La mifepristona (RU-486, 11β-(4-dimetil-amino)fenil-17β-hidroxi-17-(1-propinil)-4,9-estradien-3-ona) y la progesterona (P₄, 4-pregнено-3,20-diona) se obtuvieron de Sigma Chemical Co., (San Luis MO, EU).

El ICI 182,780 se obtuvo de Zeneca Pharma, (México D.F., México).

7.1.3 Material biológico

Animales

Todos los procedimientos en los que se utilizaron animales de laboratorio, se realizaron siguiendo los lineamientos de la Norma Oficial Mexicana (NOM-

062-ZOO-1999), de especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

Se utilizaron ratas hembras inmaduras (30-40 g) de la cepa Wistar, ratones CD1 hembras inmaduras (10-15 g) y ratones machos adultos (35-40 g) de la cepa CD1, procedentes del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM, que se mantuvieron en ciclos de luz-oscuridad de 12 h x 12 h con agua y alimento *ad libitum*.

Sistema de cuantificación de la actividad estrogénica en levaduras.

Se utilizó el modelo experimental reportado por Lyttle y colaboradores (1992) constituido por levaduras *Sacharomyces cerevisiae* de la cepa RS188N co-transfectadas con un vector de expresión que contiene el gen que codifica para el receptor humano de estrógenos subtipo α (RhE α), y un vector reportero que contiene el gen de la β -galactosidasa (β -Gal) regulado por los elementos de respuesta a estrógenos. Al adicionar algún compuesto con actividad estrogénica, éste se unirá al RhE α y se activará la síntesis de la β -galactosidasa como indicador de actividad estrogénica.

7.2 METODOS

7.2.1 Purificación del estradiol radiactivo

La pureza radioquímica del estradiol isotópicamente marcados con [^3H] se verificó por la técnica de dilución isotópica inversa que incluyó cromatografía en papel en el sistema NB₂ (tolueno:iso-octano/metanol:agua, 2:1/1.5:1) y en el B₃ de Bush (hexano:benceno/metanol:agua, 2:1/4:1).

7.2.2 Evaluación del efecto estrogénico de AE₂

7.2.2.1 Determinación de la constante aparente de disociación (K_d) y del número de sitios de unión (NSU) del receptor de estrógenos

Las constantes fisicoquímicas K_d y NSU del receptor de estrógenos se obtuvieron mediante una cinética de unión y se determinaron de acuerdo al método descrito por Scatchard (1949).

Obtención del citosol

Se utilizó como fuente del receptor de estrógenos el citosol (fracción soluble de la célula) del útero de hembras prepúberes de rata Wistar y ratón CD1. Los animales se decapitaron y los úteros se removieron y lavaron en una solución amortiguadora TEDLM (Tris-HCl 20mM pH 7.4, EDTA 15mM, ditiotreitól 0.25mM, leupeptina 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$, molibdato de sodio 10mM), se secaron con papel filtro y se pesaron.

Los úteros se homogeneizaron en TEDLM en una proporción 1:6 (p/v) con un politón Brikmann PT 10/35 (Brikmann, Instruments Co., Houston TX, EU),

manteniéndose a 4°C. Una vez obtenido el homogeneizado, se centrifugó a 105,000 x g durante 1 h a 4°C en un rotor Beckman SW50.1 (Beckmann, Instruments Inc Palo Alto, CA. EU). El citosol, (2.63 mg de proteína/ml) obtenido después de la ultracentrifugación se utilizó para los estudios de unión. El contenido de proteínas se determinó en alícuotas del citosol por el método de Bradford (1976), utilizando una curva patrón de albúmina de suero de bovino.

Cinética de saturación para el receptor intracelular de estrógenos.

La determinación de la constante de disociación (Kd) y del número de sitios de unión (NSU) al equilibrio se hizo mediante la incubación del citosol con concentraciones crecientes de E₂-[³H], 1, 1.5, 2, 3, 5, 7, 10 y 15 nM. En forma paralela, la unión inespecífica se determinó bajo las mismas condiciones de incubación en presencia de un exceso de 100 veces de E₂ radioinerte (100, 150, 200, 500, 700, 1000 y 1500 nM). El E₂ radiactivo que no se unió al receptor, se separó con una suspensión de carbón-dextrán (250 mg carbón activado y 25 mg de Dextrán T-70 en 100 ml de buffer TEDLM) durante 5 minutos a 4°C con agitación constante. Posteriormente, se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C y del sobrenadante se tomaron alícuotas de 100 µl por triplicado para determinar el contenido de [³H] en un espectrómetro de centelleo líquido, Packard Tri Carb, modelo 1900TR (Packard Downers Grove, IL. EU), con una eficiencia del 69 %. Se usó Instagel® como la solución de centelleo específica para muestras acuosas.

A partir de la actividad específica del E₂-[³H], se calcularon las pmolas de ligando unidas al receptor, en el volumen total de incubación. Para la determinación de la unión específica, se restó la unión no específica de la unión total.

7.2.2.2 Interacción de AE₂ con el receptor intracelular de estrógenos.

La interacción del AE₂ con el receptor intracelular de estrógenos (RE) se estableció por medio del análisis de competencia (Chávez, *et. al.*, 1985), para lo cual se utilizó el citosol obtenido del útero de ratas Wistar y ratones CD1 hembras prepúberes como la fuente del receptor de estrógenos, previamente descrito. Se tomaron alícuotas de 200 µl del citosol (3-5 mg de proteína/ml) y se incubaron durante 18 h a 4°C en presencia de concentraciones a saturación de E₂-[³H] (1 nM) y concentraciones crecientes de AE₂ (1 nM-1 mM). Como controles del experimento se utilizaron concentraciones crecientes de E₂ (1-500 nM), P₄ o RU486 (1 nM-1 mM) radioinertes. La separación de la fracción unida de la libre se llevó a cabo utilizando una suspensión de carbón-dextrán (250 mg carbón activado y 25 mg de dextrán T-70 en 100 ml de buffer TEDM), durante 5 minutos a 4°C con agitación constante y centrifugando a 3000 rpm durante 10 minutos a 4°C. Después de la centrifugación, se tomaron alícuotas del sobrenadante para determinar el contenido de radiactividad en el espectrómetro de centelleo líquido y se usó Instagel® como solución de centelleo. Los resultados se expresaron como el porcentaje de unión al RE tomando la unión del radioligando, en ausencia de E₂ radioinerte, como el 100 por ciento.

Del análisis de competencia se obtuvo la concentración inhibitoria al 50% (IC₅₀).

La afinidad relativa de unión (ARU) de AE₂ se calculó a partir de la constante de inhibición al cincuenta por ciento (K_i) del compuesto, considerando un valor de 100 para el estradiol, utilizando la siguiente fórmula (Cheng y Prussoff, 1973).

$$\text{ARU} = [L]_{50\%} / [C]_{50\%} \times 100$$

ARU = Afinidad relativa de unión.

$[L]_{50\%}$ = Concentración molar del ligando específico que disminuye al 50% la unión del radioligando al receptor.

$[C]_{50\%}$ = Concentración molar de competidor que disminuye al 50% la unión del radioligando al receptor.

$$K_i = IC_{50} / 1 + (C / K_d)$$

K_i = Constante de inhibición

IC_{50} = Concentración molar del inhibidor que disminuye al 50% la unión del radioligando con el receptor.

C = Concentración molar del radioligando.

K_d = Constante de disociación del ligando.

7.2.2.3 Determinación del efecto estrogénico del AE₂ sobre el peso uterino.

El efecto del AE₂ sobre el peso del útero se llevó a cabo mediante métodos descritos por Astwood (1938); Evans *et. al.*, (1941); Reel *et. al.*, (1996); Tchernitchin (1979). Se utilizaron ratas Wistar y ratones CD1 hembras inmaduras a las cuales se les administró AE₂ (10-5000 µg/kg de peso), E₂ (0.01-1000 µg/Kg de peso) y propilenglicol (vehículo, 0.1 ml/animal/día) durante 3 días consecutivos. A las 24 horas siguientes, el útero se removió y se pesó en una balanza analítica para la obtención del peso uterino húmedo (PUH). Los úteros se dejaron secar en la estufa a 70°C por 24 horas y nuevamente se pesaron para obtener el peso uterino seco (PUS).

7.2.2.4 Determinación de la actividad de tipo estrogénica del AE₂ en un sistema de expresión en levaduras.

Análisis de la actividad de β-galactosidasa.

Las levaduras se crecieron durante toda la noche a 32°C con agitación constante en un medio que contiene todos los aminoácidos esenciales y glucosa. Se tomó una alícuota del cultivo de levaduras y se determinó la densidad óptica (D.O) a la longitud de onda de 600 nm. La lectura de la D.O igual a 0.5 equivale a una concentración celular de 2.7×10^7 células/ml. Con la finalidad de inducir al RE en este sistema, se incubaron a las levaduras durante 1 hora con sulfato de cobre (CuSO₄ · 5H₂O), cuya concentración final fue de 100 µM en el volumen total de cada prueba individual (5 ml). En seguida se llevó a cabo el tratamiento con el AE₂ (10-1x10⁴ nM), por un periodo de 4.5 h a 32°C con agitación constante. Transcurrido este tiempo, las levaduras se centrifugaron a 2,500 rpm por 5 minutos y se resuspendieron en buffer Z (Na₂HPO₄ · 7H₂O 30 mM, KCl 10mM y MgSO₄ · 7H₂O 1 mM), se adicionaron perlas de vidrio (472-600

micras) y se agitaron los tubos en vortex durante 15 segundos 6 veces, para poder romper mecánicamente la pared celular. Se utilizaron 20 µl de fluoruro de metil fenil sulfonilo (FMFS) a una concentración de 40 mM como inhibidor de proteasas. Finalmente, las levaduras se centrifugaron a 12,000 rpm por 10 minutos a 4°C, en una microcentrífuga Sorvall RMC-14 (Dupont) y se recuperó el sobrenadante.

Se tomaron alícuotas de 100 µl de sobrenadante (concentración promedio de 0.5 mg/ml de proteína) para incubarlas con 900 µl de buffer Z y con 4.0 mg/ml de β-d-galactósido de o-nitrofenol (GONF) como sustrato de la enzima β-galactosidasa, producto del gen reportero, durante un período de 10 minutos a una temperatura de 32°C, transcurrido este tiempo la reacción se detuvo con 0.5 ml de carbonato de sodio 1M y la mezcla se leyó a una longitud de onda de 420 nm.

7.2.3 Evaluación del efecto de AE₂ y E₂ sobre el tiempo de la coagulación sanguínea en el ratón CD1 macho adulto.

La evaluación del efecto del AE₂ sobre el tiempo de coagulación se llevó a cabo por el método de microhematocrito (Mandoki *et. al.*, 1991; Rubio-Póo *et. al.*, 1983, 1985, 1990; Lemini *et. al.*, 1993). Se utilizaron ratones CD1 adultos y su distribución se llevó a cabo por cuadrados latinos de acuerdo a su peso corporal en varios lotes, conteniendo de 5-7 animales cada lote (Zar, 1984).

En diferentes grupos de experimentos los ratones recibieron por vía subcutánea (s.c.) durante 5 días consecutivos diferentes dosis de AE₂ (0.1-1000 µg/kg) o de E₂ (0.1-1000 µg/kg) disueltos en 0.1 ml de propilenglicol. En otra serie de experimentos se administró al AE₂ (4 y 8 mg/100g) o E₂ (3 mg/100g) disueltos en 0.2 ml de propilenglicol empleado como vehículo. En todos los experimentos se incluyó un grupo control que recibió sólo el vehículo. Transcurridas 24 h después de la última administración se determinó el tiempo

de coagulación. La cola de cada animal se sumergió en agua a 37°C durante 30 seg y posteriormente se hizo una incisión en la punta de donde se tomó la muestra de sangre (40 μ l) con un capilar no heparinizado. En ese momento se accionó un cronómetro y el capilar se depositó sobre una base de madera en forma de triángulo invertido que se inclinó en un ángulo de $\pm 60^\circ$ para permitir que la muestra de sangre se desplazara entre dos marcas del capilar separadas por una distancia de 5 cm. El cronómetro se detuvo cuando la muestra de sangre en el capilar se coaguló registrando el tiempo transcurrido.

Los experimentos se realizaron por lo menos 2 veces entre las 8:30-11:00 h, manteniendo una temperatura ambiente constante entre 22 y 24°C.

7.2.4 Evaluación del efecto del AE₂ sobre los parámetros hemostáticos: tiempo de protrombina (TP), el tiempo de tromboplastina parcialmente activada (TTPa), tiempo de trombina (TT) y la concentración del fibrinógeno.

Se utilizó el plasma obtenido de sangre arterial de ratones CD1 machos adultos, previamente anestesiados (4% de hidrato de cloral; 7 mg/kg). La sangre se mezcló con citrato de sodio al 3.8% (0.11 M; 10:1; sangre/anticoagulante), durante 1 minuto con agitación suave, después se centrifugó a 2500 g durante 10 minutos entre 6-10 °C. Una vez obtenido el plasma, éste se mantuvo a -70°C cuando el tiempo de procesamiento se realizó en un periodo mayor a 30 días y a -20°C en un periodo de 1-30 días a partir de su obtención.

Determinación de los parámetros hemostáticos.

Para la determinación del TP, se utilizó el reactivo de Dade® Tromboplastin C Plus el cual contiene tromboplastina de cerebro de conejo de acuerdo a la técnica descrita por Quick (1974).

El tiempo de tromboplastina parcialmente activada (TTPa), se determinó con el reactivo de Dade® Actin® FS Reactivo de TTP activada que contiene

fosfátidos de soja purificados en ácido elágico 1.0×10^4 M y sílica de acuerdo a la técnica descrita por Proctor y Rapaport (1961).

Para la determinación del TT, se utilizó el reactivo de Dade® de Trombina (trombina bovina, approx. 100 unidades NIH/ml), por el método de Rampling y Gaffney (1976).

Estos parámetros se determinaron en el **equipo** Behring Fibrintimer II (Dade® Behring).

El fibrinógeno se evaluó por el método de Clauss (1957). Su concentración fue determinada a partir de una curva estándar con plasma humano expresada en mg/dl y utilizando el reactivo de Dade® de Trombina. Este parámetro fue determinado utilizando un método mecánico en el equipo Fibrómetro Fibrosystem (Becton-Dickinson Mod 5-117V).

Todos los reactivos se adquirieron en Dade® Behring, S. A. de C. V. México, D.F.

7.2.5 Análisis estadístico

La significancia estadística de las diferencias entre los grupos se estimó por análisis de varianza (ANOVA). Las diferencias entre el grupo control y los grupos tratados se estimaron por los métodos de Dunnett, Dunn, Tukey o t de Student apropiadas para cada caso en particular (Zar, 1984). Los resultados se consideraron significativos cuando el valor de p fue menor a 0.05. Todos los experimentos se realizaron por lo menos 2 veces. Los resultados se expresaron como el promedio \pm el error estándar de la media (eem).

7.2.6 Determinación de las dosis efectivas e inhibitorias medias.

La dosis efectiva media (DE_{50}) y la dosis inhibitoria media (DI_{50}) se calcularon a partir de los datos de las curvas dosis-respuesta utilizando el programa Microcal® Origin® versión 6.1 (Copyright© 1997-2000 Microcal Software Inc.)

7.2.7 Correlación entre los modelos de ratón hembra CD1 y rata Wistar prepeúberes y los parámetros de peso uterino húmedo y seco.

El análisis de correlación se realizó al graficar los parámetros farmacológicos obtenidos para el AE_2 y el E_2 . Los coeficientes de correlación se obtuvieron con el método de Pearson utilizando el programa Microcal® Origin® versión 6.1 (Copyright© 1997-2000 Microcal Software Inc.)

8. RESULTADOS

8.1 Características de la unión al equilibrio del receptor intracelular de estrógenos.

La figuras 4A y 5A muestran la linearización de los datos de acuerdo al método de Scatchard, obtenidos de la curva de saturación (figuras 4B y 5B), la cual representa la unión específica de concentraciones crecientes de E_2 - $[^3H]$, utilizado como radioligando. La saturación de los sitios activos del receptor de estrógenos en la preparación de citosol de útero de hembras inmaduras de rata (Wistar) y ratón (CD1), se logró a partir de la concentración 4 nM del radioligando específico. En la tabla 1 podemos observar la constante aparente de disociación (K_d) y el número de sitios de unión (NSU) del receptor para cada modelo animal, estos resultados fueron similares a los descritos previamente en la literatura para el RE (Chávez, *et. al.*, 1985), indicando que el sistema era adecuado para investigar la interacción del AE_2 con el RE.

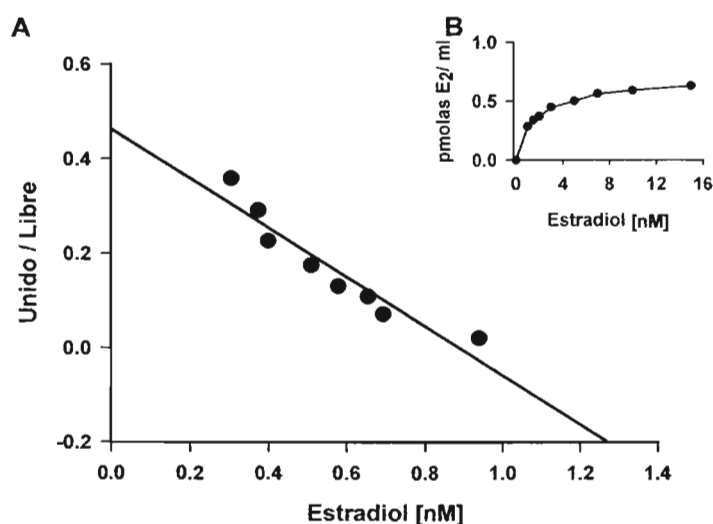


Figura 4. Las constantes de la unión al equilibrio del E_2 con el RE, se obtuvieron a través del análisis de Scatchard (A). Unión específica del E_2 - $[^3H]$ con el RE obtenido de úteros de ratones hembra CD1 prepúberes (B).

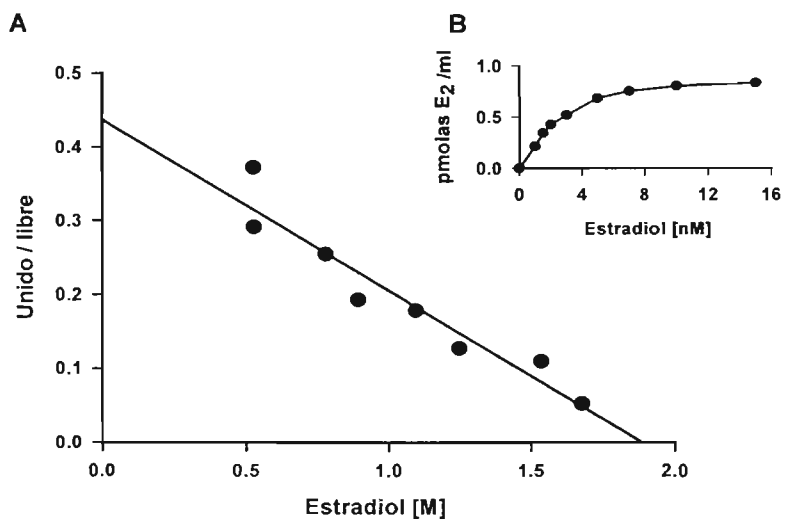


Figura 5. Las constantes de la unión al equilibrio del E_2 con el RE, se obtuvieron a través del análisis de Scatchard (A). Unión específica del E_2 - 3H con el RE obtenido de úteros de ratas Wistar prepúberes (B).

Tabla 1. Constantes de la unión al equilibrio del E_2 - 3H con el RE de citosol de úteros de ratas y ratones hembras prepúberes.

Especie	Kd (M)	NSU
Ratón CD1	2.33×10^{-9}	1.08×10^{-9} M
Rata Wistar	4.48×10^{-9}	1.93×10^{-9} M

8.2 Interacción de AE_2 con el receptor intracelular específico de estrógenos. Afinidad relativa de unión (ARU) y constante de inhibición (K_i).

El análisis de competencia del E_2 y AE_2 por el RE en el citosol de útero de ratas Wistar y ratones CD1, hembras prepúberes, se muestra en las figuras 6 y 7. La afinidad de unión del E_2 radioinerte se consideró como del 100% (tabla 2). El AE_2 interactuó con el RE, sin embargo su capacidad para competir con el E_2 - $[^3H]$ por el RE fue mucho menor que la del E_2 , con una ARU del 0.074% y del 0.029% en ratón CD1 y rata Wistar hembras prepúberes, respectivamente. La K_i de los esteroides competidores se presenta en la tabla 2. La P_4 y el RU-486 son controles negativos del experimento y no interactúan con el RE.

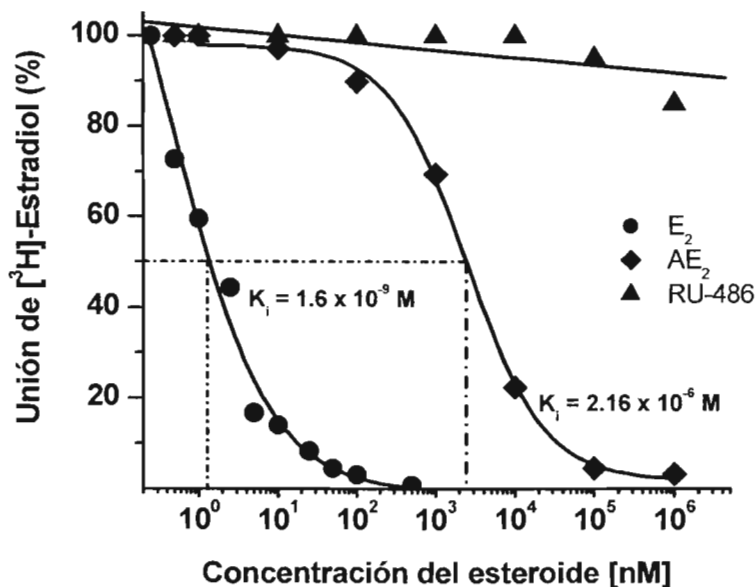


Figura 6. Análisis de competencia del AE_2 con el E_2 - $[^3H]$, por los sitios activos del RE en el citosol de úteros de ratones hembra CD1 prepúberes. Cada punto representa la media de tres experimentos por triplicado.

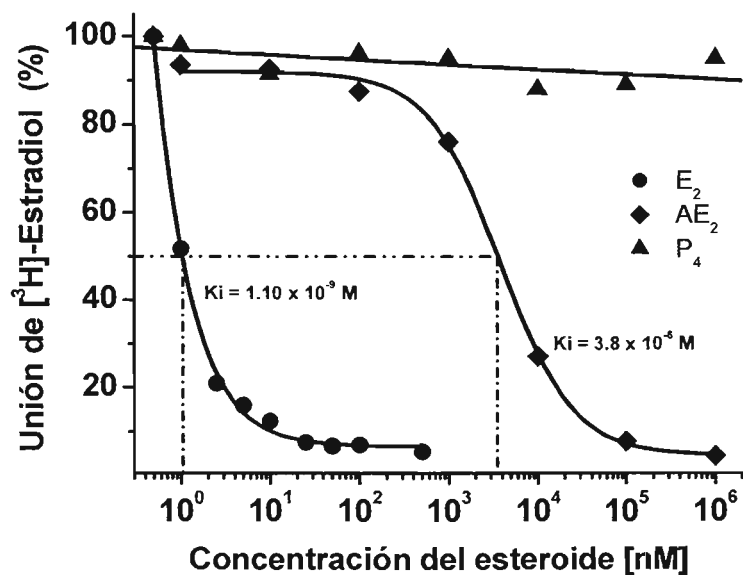


Figura 7. Análisis de competencia del AE₂ con el E₂-[³H], por los sitios activos del RE en el citosol de úteros de ratas Wistar prepúberes. Cada punto representa la media de tres experimentos por triplicado.

Tabla 2. Afinidad relativa de unión (ARU) y constantes de inhibición (K_i) del E₂ y AE₂ por el receptor específico de estrógenos.

Modelo / Esteroide	ARU %	K _i (M)
Ratón CD1		
E ₂	100	1.60 x 10 ⁻⁹
AE ₂	0.074	2.16 x 10 ⁻⁶
Rata Wistar		
E ₂	100	1.10 x 10 ⁻⁹
AE ₂	0.029	3.8 x 10 ⁻⁶

8.3 Efecto uterotrófico de AE₂. Dosis efectiva media (DE₅₀), efecto máximo (E_{máx}) y potencia relativa.

Las curvas dosis-respuesta del AE₂ y del E₂ sobre el incremento del peso uterino húmedo (PUH) y seco (PUS) de ratones CD1 hembras inmaduras se muestran en la figura 8. En este modelo animal se observa que el AE₂ tiene efectos significativos a partir de la administración de 250 µg/kg de peso y su efecto máximo se obtiene con la dosis de 5.0 mg/kg de peso. En cambio E₂ presenta efectos significativos a partir de la dosis de 0.001 µg/kg y su efecto máximo es alcanzado con la administración de 1000 µg/kg; indicando que el AE₂ es un agonista parcial con una menor potencia estrogénica que el E₂ (tabla 3).

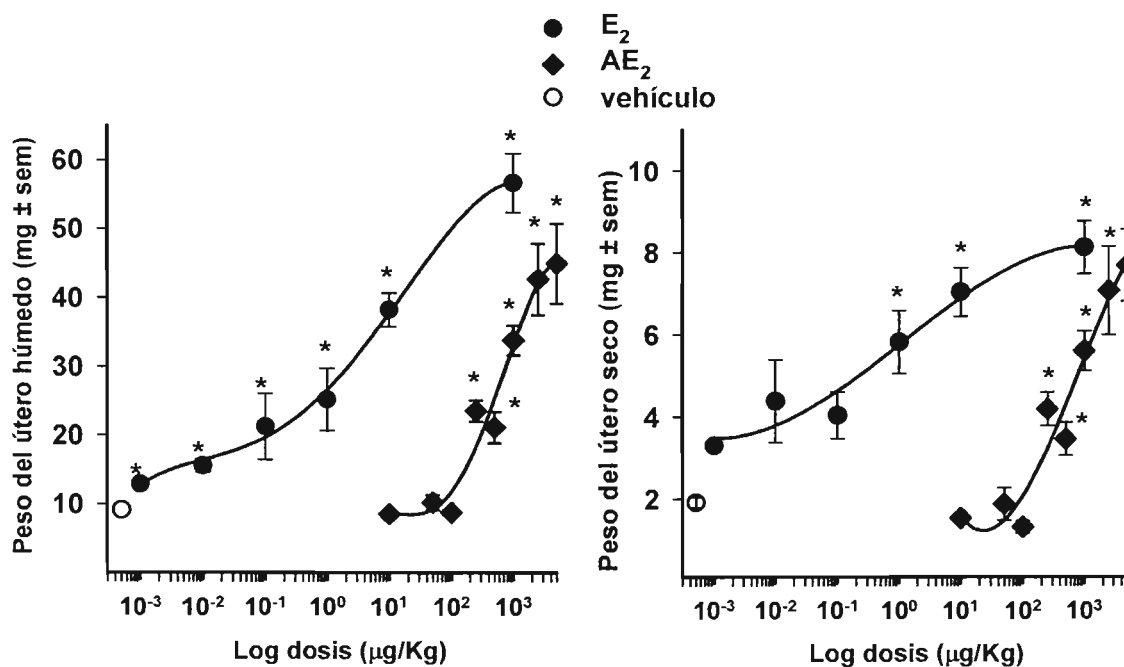


Figure 8. Curva dosis-respuesta de AE₂ y E₂ sobre el peso del útero húmedo y seco de ratones CD1 hembras inmaduras. Los resultados se expresaron como el promedio ± eem. Prueba de Dunn *p < 0.05 vs vehículo, n = 12.

Tabla 3. Parámetros farmacológicos en el ratón CD1 hembra inmadura.

Esteroides	DE ₅₀ PUH	Potencia relativa	E _{máx} (%)	DE ₅₀ PUS	Potencia relativa	E _{máx} (%)
E ₂	4.75	100	100	1.06	100	100
AE ₂	552	0.86	80	593	0.18	95

En la rata Wistar hembra inmadura, el AE₂ incrementó el PUH con la administración de 2.5 y 5 mg/kg, sin embargo solo la dosis de 5.0 mg/kg produjo un incremento significativo del PUS (figura 9).

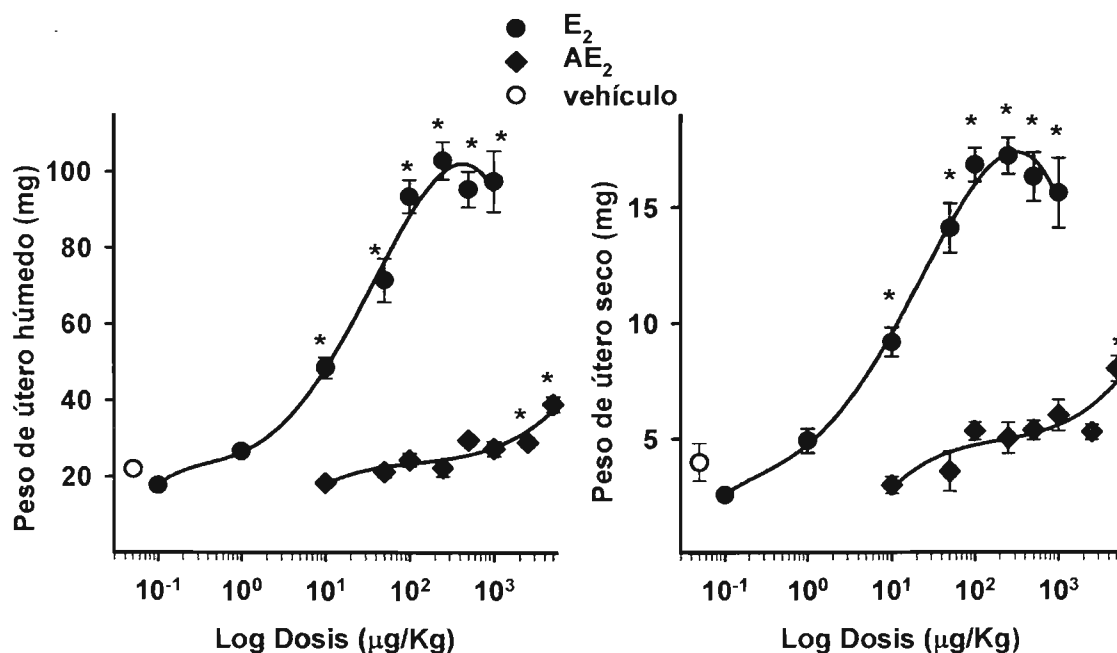


Figura 9. Curva dosis respuesta de AE₂ y E₂ sobre el peso de útero húmedo y seco en ratas Wistar prepúberes. Los resultados se muestran como el promedio ± eem. Prueba de Dunn *p < 0.05, vs vehículo. n = 12.

En los dos modelos se observó una relación dosis dependiente para el AE_2 y el E_2 y se calcularon la dosis efectiva media (DE_{50}) para cada uno de los compuestos. De las DE_{50} calculadas, se obtuvo la potencia relativa del AE_2 con respecto al E_2 (tabla 4). Los resultados indican que el AE_2 exhibe una menor potencia estrogénica entre 116 a 555 veces en el modelo de ratón CD1 hembra inmadura y de 47 a 55 veces menor que el E_2 en el modelo de rata Wistar. Sin embargo cabe destacar que el efecto máximo alcanzado por el AE_2 fue mayor en el modelo de ratón CD1 hembra inmadura.

Tabla 4. Parámetros farmacológicos en la rata Wistar hembra inmadura.

Esteroides	DE_{50} PUH	Potencia relativa	$E_{m\acute{a}x}$ (%)	DE_{50} PUS	Potencia relativa	$E_{m\acute{a}x}$ (%)
E_2	16	100	100	10	100	100
AE_2	764	2.1	39	579	1.8	49

8.4 Análisis de correlación en el peso del útero de hembras inmaduras de rata Wistar y ratón CD1.

Los parámetros farmacológicos derivados de los resultados anteriores (tablas 3 y 4) se usaron para obtener la correlación de los efectos observados en ratón CD1 y rata Wistar, hembras inmaduras, así como entre los parámetros PUH y PUS. El coeficiente de correlación obtenido entre los dos modelos animales fue de $r = 0.976$ ($p = 0.00087$) y $r = 0.97$ ($p = 0.000065$) para los parámetros PUH y PUS.

8.5 Determinación de la actividad estrogénica del AE₂ mediante la inducción de la transactivación en el sistema de expresión RE-ERE en las levaduras *S. cerevisiae*.

El sistema de cuantificación de la actividad de tipo estrogénica en levaduras nos permitió observar el efecto estrogénico del AE₂ mediante la determinación de la actividad de la enzima β -galactosidasa, utilizando E₂ como control positivo. En la figura 10 se puede observar que la mayor actividad de β -galactosidasa, inducida por el AE₂, se observó a la concentración de 10 μ M en comparación con E₂ cuyo efecto máximo se observó a una concentración de 5 nM, ambos compuestos muestran un efecto dosis-dependiente. En estos experimentos la P₄ (1y 10 μ M) no indujo la actividad β -galactosidasa (control negativo).

Para comprobar que el efecto observado en el experimento anterior era mediado por el RE, se estimuló al sistema de levaduras con los compuestos mencionados anteriormente, en presencia del antiestrógeno ICI 182,780. En este experimento se utilizaron las concentraciones de 2 nM para E₂ y 2 μ M para AE₂ que fueron incubados simultáneamente con 1 μ M de ICI 182,780. En la figura 10 podemos observar que la actividad de la β -galactosidasa fue inhibida completamente, ya que las respuestas obtenidas fueron similares a las del vehículo y de la P₄ (control negativo; figura 10). En la tabla 5 podemos observar los parámetros farmacológicos obtenidos del análisis de este estudio.

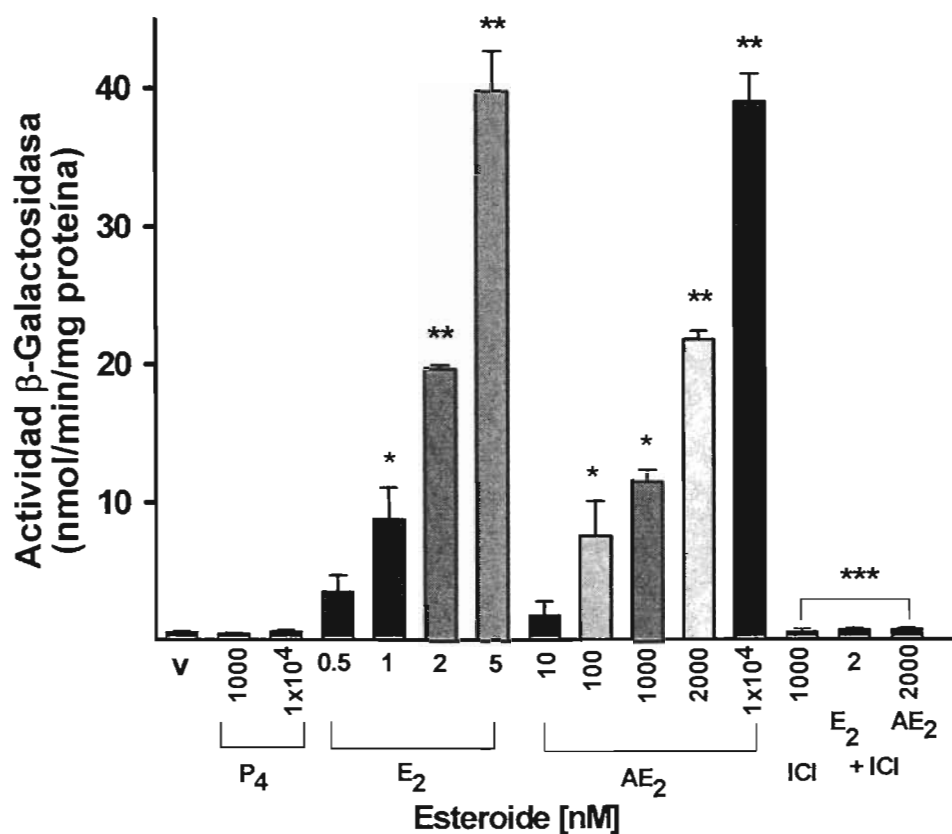


Figura 10. Inducción de la actividad β -galactosidasa mediada por el RhE α en el sistema de expresión de levaduras. Efecto antiestrogénico del ICI-182,780 sobre la actividad β -galactosidasa. Prueba "t" de student *p < 0.05 **p < 0.001 vs vehículo, ***p < 0.0001 vs E₂ 2 nM. n = 9.

Tabla 5. CE₅₀, potencia relativa y E_{máx} del E₂ y AE₂ sobre la actividad de β -galactosidasa en el sistema de levaduras *S. cerevisiae*.

Esteroido	CE ₅₀	Límites de Confianza (20-80%)	Potencia relativa	E _{máx} (%)
E ₂	2.14 nM	1.3 - 3.4 nM	100	100
AE ₂	1.82 μ M	824 - 4032 μ M	0.12	100

8.6 Efecto de AE_2 y E_2 sobre el tiempo de la coagulación sanguínea en el ratón CD1 adulto.

El efecto del AE_2 y el E_2 sobre el tiempo total de la coagulación (TTC) del ratón CD1 a las dosis de 0.1–1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso se puede observar en la figura 11. Los resultados muestran que el AE_2 tiene la capacidad para incrementar el TTC entre un 17% a 29 % con respecto al grupo control de manera significativa ($p < 0.05$), estos efectos se observaron entre las 48 y 72 horas post-tratamiento.

El E_2 disminuye significativamente el TTC entre un 15% a un 28% y sus efectos máximos se observaron 8 días después de la última administración. Los efectos procoagulantes del E_2 se presentaron de manera significativa ($p < 0.05$) a partir de la dosis de 0.1 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso. Las dosis de 100 y 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de peso después de las 24 horas de la última administración, produjeron una disminución del tiempo de la coagulación de manera significativa ($p < 0.05$) y su efecto procoagulante máximo también se observó a los 8 días (192 horas) post-tratamiento en un 28%.

La recuperación de los valores basales fue observada con todas las dosis administradas del AE_2 después de las 96 horas. Para el E_2 fue después de 11 días post-tratamiento (264 horas), no encontrando diferencias significativas respecto al grupo control (Figura 11).

Tiempo de coagulación (% de respuesta)

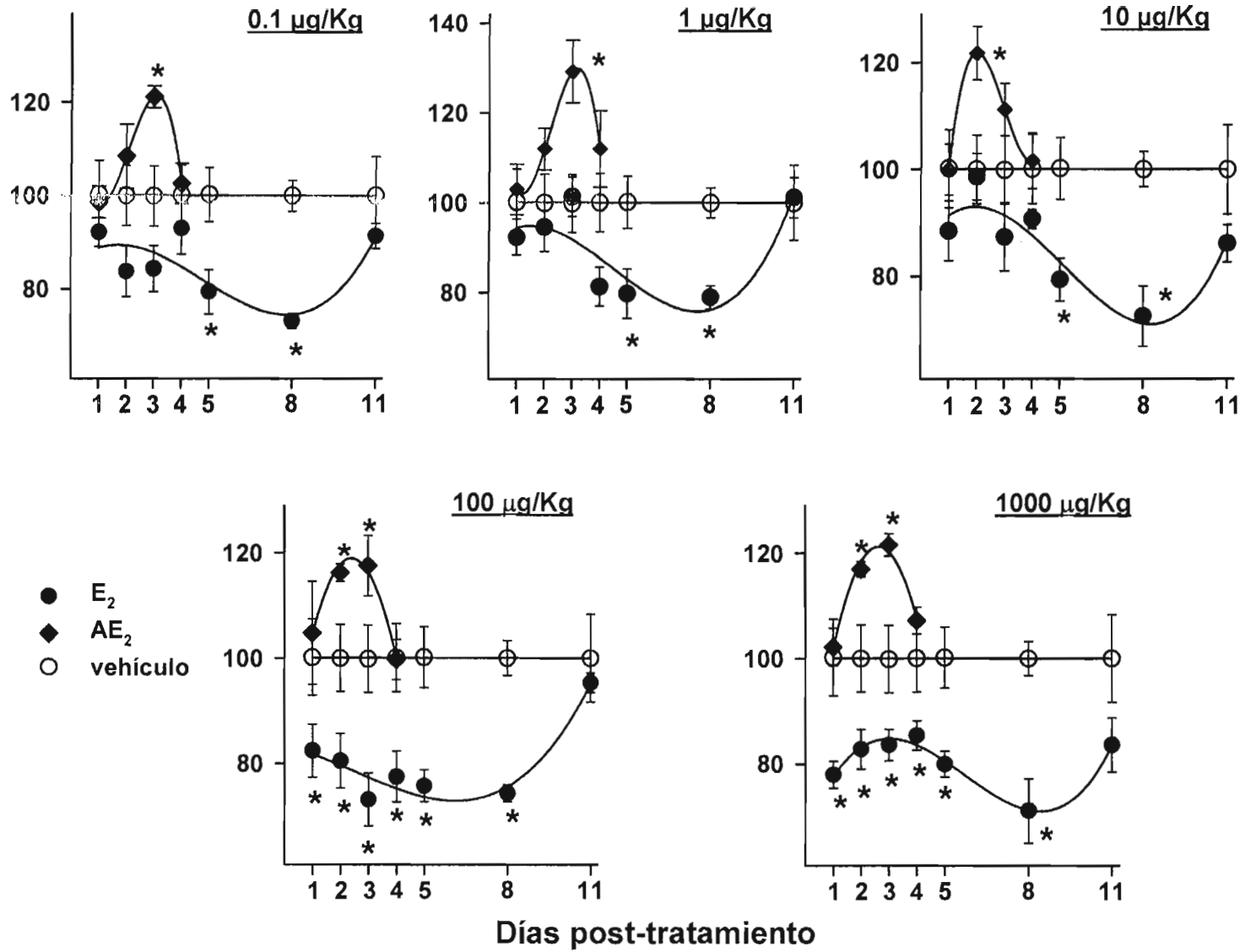


Figura 11. Efecto del AE₂ y E₂, (0.1 - 1000 µg/kg de peso) sobre el tiempo total de la coagulación sanguínea del ratón adulto CD1. Cada punto representa el promedio ± eem. *p < 0.05 vs vehículo (100%). n = 10.

La segunda serie de experimentos se llevó a cabo con la administración única del AE₂ utilizando las dosis de 1, 2, 4 y 8 mg/100 g de peso en el ratón CD1 adulto. La curva dosis respuesta obtenida se presentan en la figura 12A.

El AE₂ incrementó el TTC desde un 33% hasta un 96% de manera significativa ($p < 0.001$ vs vehículo) a las 24 horas post-tratamiento. También se evaluó el curso temporal de la dosis de 8 mg / 100g de peso del AE₂ sobre el TTC. En la figura 12B observamos incrementos de 96, 75, 61, 54, 34% en los días 1, 2, 3, 4, 5 respectivamente ($p < 0.001$ vs vehículo).

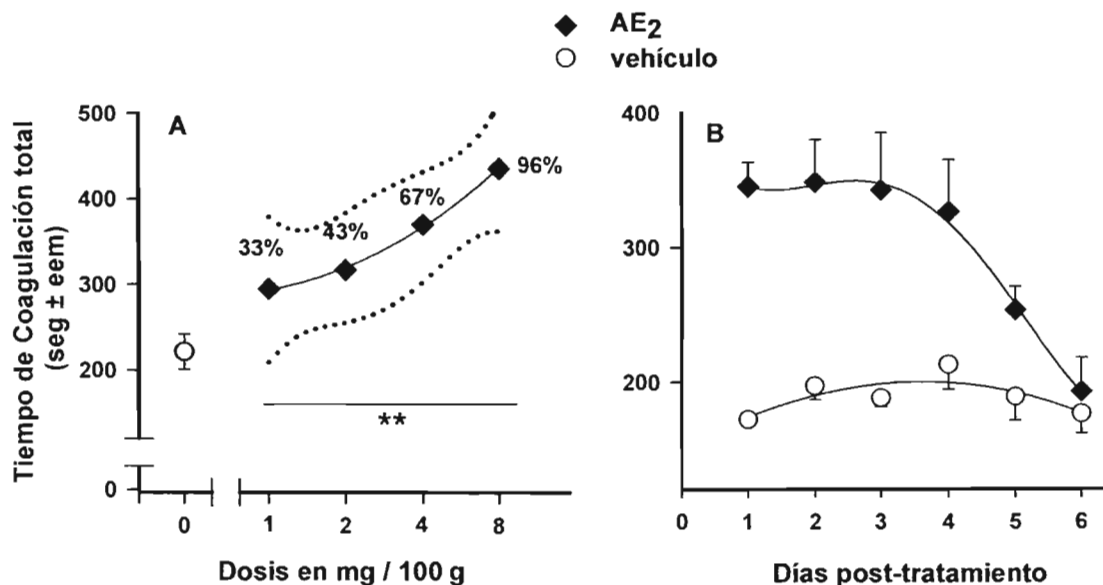


Figura 12. Efecto anticoagulante del AE₂ en el ratón adulto CD1. A: Curva dosis-respuesta.

B: Curso temporal del efecto anticoagulante del AE₂ (8 mg/100g). Prueba de Dunnet ** $p < 0.01$. $N > 7$.

8.7 Efecto de AE₂ y E₂ sobre parámetros hemostáticos.

Con el fin de conocer más acerca de los efectos del AE₂ y el E₂ sobre las vías extrínsecas, intrínseca y común de la coagulación sanguínea, evaluamos la administración única de las dosis de 4 y 8 mg/100 g de peso de AE₂ y 3 mg/100 g de peso de E₂ sobre los tiempos de protrombina (TP), tromboplastina parcialmente activada (TTPa), trombina (TT) y la concentración del fibrinógeno en el plasma de ratones CD1 machos adultos.

Primero se determinó el TTC, en donde encontramos que el AE₂ incrementó este parámetro desde un 34% a 94% de manera significativa ($p < 0.001$ vs vehículo); a las 24 y 48 horas post-tratamiento. El E₂ disminuyó de manera significativa hasta un 20% el tiempo de la coagulación, este efecto se observó de manera significativa a las 48 horas (figura 13).

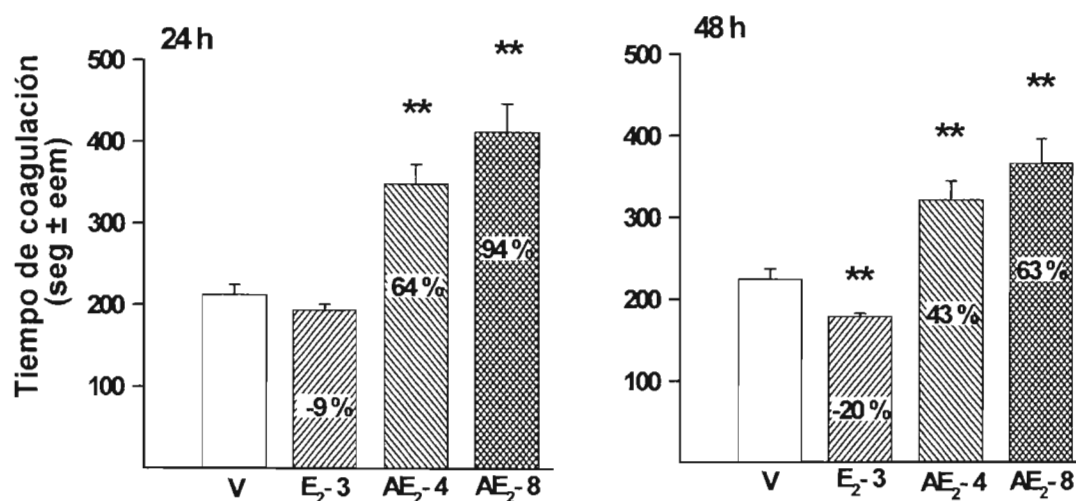


Figura 13. Efecto anticoagulante del AE₂ (4 y 8 mg/100g de peso) y efecto procoagulante del E₂ (3 mg/100g peso) en el ratón adulto CD1. Prueba "t" de Studentt, ** $p < 0.001$ vs vehículo. Cada punto representa el promedio \pm eem. $n = 12$.

Una vez determinado el TTC se tomaron las muestras de sangre de la arteria iliaca de los ratones bajo estudio y se obtuvo el plasma para la evaluación de TP, TTPa, TT y concentración del fibrinógeno.

Efecto del AE₂ sobre el TP, TTPa, TT y la concentración del fibrinógeno.

La figura 14 muestra los efectos del AE₂ y E₂ sobre el TP en el ratón macho CD1. No se observaron cambios en este parámetro 24 horas post-tratamiento. Sin embargo, a las 48 horas pudimos observar que el AE₂ incrementa el TP en un 15% ($p = 0.01$ vs vehículo).

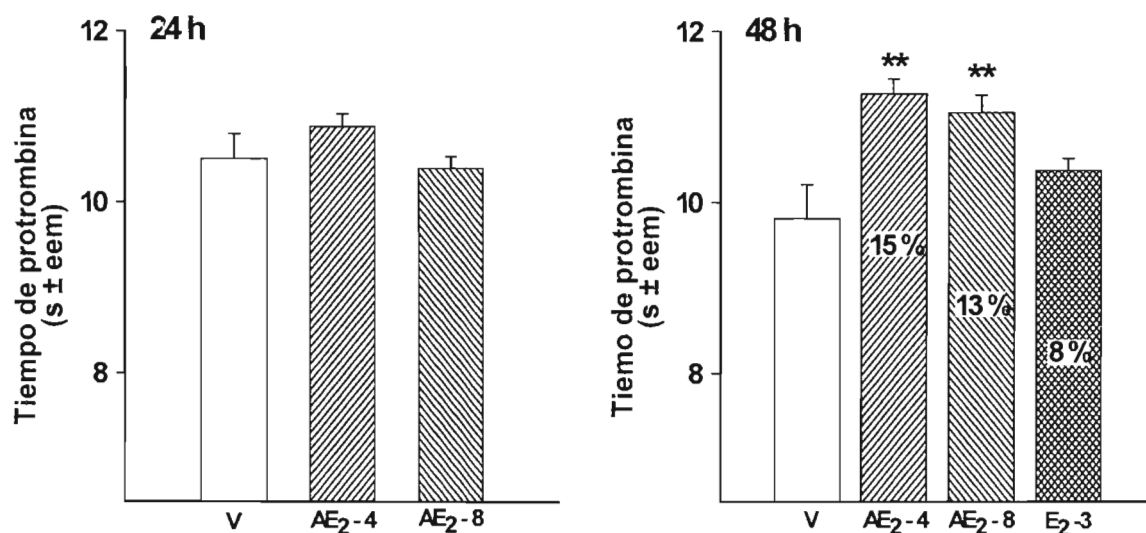


Figura 14. Efecto del AE₂ (4 y 8 mg/100g de peso) y del E₂ (3 mg/100g peso) sobre el tiempo de protrombina (TP) en el ratón adulto CD1, a las 24 y 48 horas post-tratamiento. Prueba "t" de Student, ** $p = 0.01$ vs vehículo. Cada punto representa el promedio \pm eem. $n > 7$.

En la figura 15 podemos ver que el AE₂ incrementa el TTPa hasta un 30% de manera significativa ($p = 0.001$) después de 24 horas y a las 48 horas este aumento es mayor en las dos dosis administradas en un 55% ($p = 0.000005$ vs vehículo).

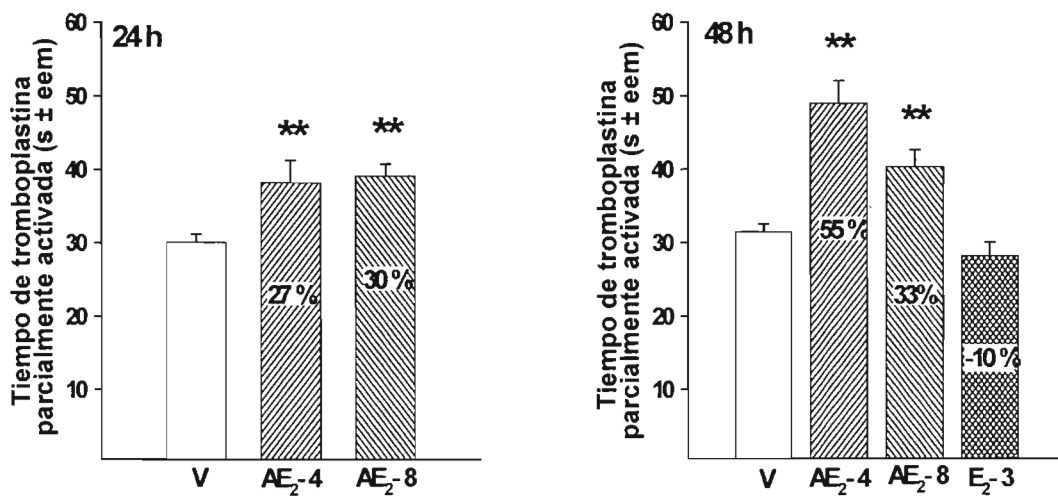


Figura 15. Efecto del AE₂ (4 y 8 mg/100g de peso) y del E₂ (3 mg/100g peso) sobre el TTPa en el ratón adulto CD1, a las 24 y 48 horas post-tratamiento. Prueba "t" de Student, ** $p < 0.001$ vs vehículo. Cada punto representa el promedio \pm eem; $n > 7$.

El AE₂ incrementó el TT hasta en un 29% ($p < 0.001$) a las 24 horas y en un 26% a las 48 horas postratamiento. Por el contrario, la administración de E₂ disminuyó en un 23% ($p < 0.001$) el TT, efectos que se muestran en la figura 16.

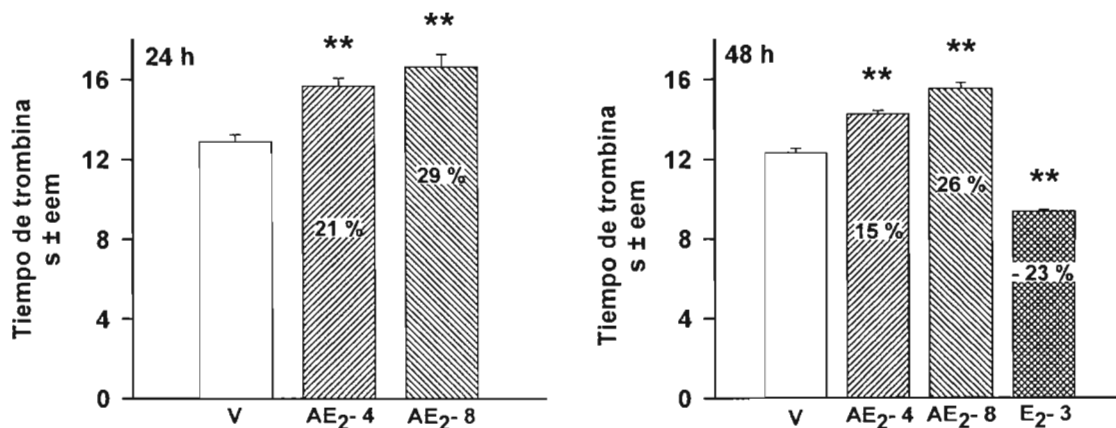


Figura 16. Efecto del AE₂ (4 y 8 mg/100g de peso) y del E₂ (3 mg/100g peso) sobre el tiempo de trombina (TT) en el ratón CD1 macho adulto, a las 24 y 48 horas post-tratamiento. Prueba "t" de Student, **p < 0.001 vs vehículo. Cada punto representa el promedio ± eem. n > 8.

La administración de las dosis de 4 y 8 mg/100g de peso de AE₂ incrementó la concentración del fibrinógeno en un 71% y 107% (p < 0.001) a las 24 horas y a las 48 horas un 41% y 87%, respectivamente (figura 17).

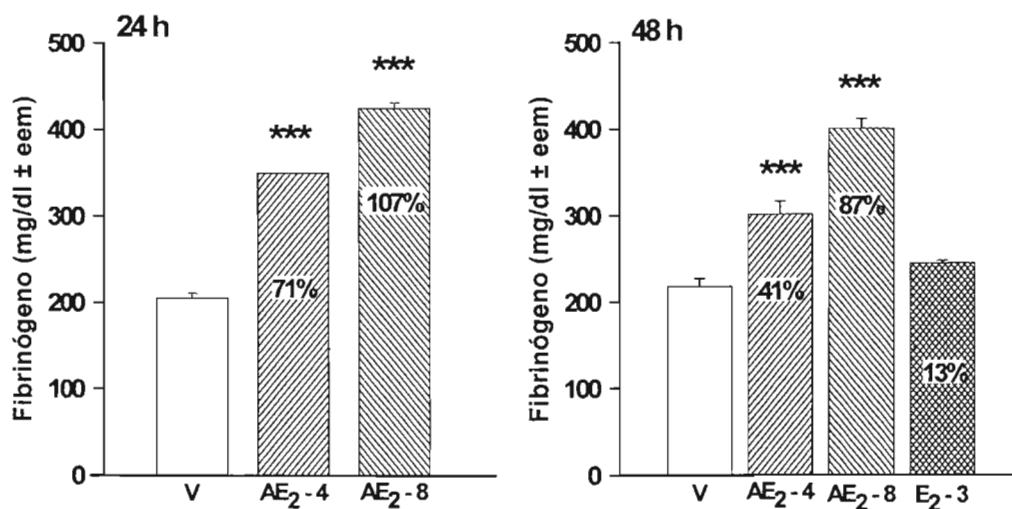


Figura 17. Efecto del AE₂ (4 y 8 mg/100g de peso) y del E₂ (3 mg/100g peso) sobre la concentración del fibrinógeno en el ratón adulto CD1, a las 24 y 48 horas post-tratamiento. Prueba "t" de Student, ***p < 0.001 vs vehículo. Cada punto representa el promedio ± eem. n > 7.

9. DISCUSION

Además del papel fisiológico de los estrógenos en la reproducción en las mujeres, estas hormonas también ejercen efectos moduladores sobre el sistema cardiovascular a diferentes niveles: sobre el metabolismo de lípidos, en la síntesis de factores derivados de endotelio o sobre la función de canales iónicos en las células del músculo liso vascular (Lobo, 1991; Psaty, *et. al.*, 1993; Zhang, *et. al.*, 1992; Chae, *et. al.*, 1997). El papel de los estrógenos sobre la coagulación sanguínea ha sido poco estudiado, sin embargo, en los últimos años y debido a los resultados de estudios epidemiológicos que han reportado un aumento en la frecuencia de enfermedades tromboembólicas asociadas al uso de anticonceptivos orales y la THS, ha despertado el interés por conocer los mecanismos implicados en los efectos trombogénicos de los estrógenos con el fin de mejorar la prescripción y determinar los riesgos de su administración.

Los estrógenos de uso actual producen beneficios importantes en la prevención de padecimientos cardiovasculares (Guetta y Cannon, 1996; Chae, *et. al.*, 1997), sin embargo la posibilidad de que produzcan efectos trombogénicos limita su uso terapéutico.

Los 17β -aminoestrógenos conforman un grupo de compuestos análogos al E_2 que fueron caracterizados como agentes capaces de producir efectos anticoagulantes prolongados en roedores (Rubio-Póo, *et. al.*, 1990; Mandoki, *et. al.*, 1991; Lemini, *et. al.*, 1993). Los efectos anticoagulantes de los 17β -aminoestrógenos son opuestos a los efectos procoagulantes que produce el E_2 . Los primeros estudios de relación estructura química-actividad biológica analizaron la introducción de diferentes grupos funcionales como: $-NH-CH_2-CH_2CH_2-NH_2-$ (prodíame); $-NH-CH_2-CH_2CH_2-OH$; (prolame); $-NH-CH_2-CH_2CH_2-COOH$ (proacame); $-NH-CH_2-CH_2CH_2-CH_3$ (buame) sobre el grupo amino en la posición del C17 del esteroide, en relación a su actividad anticoagulante. La sustitución en el grupo amino se consideró esencial para que se produjera el

efecto hipocoagulante; así en los trabajos realizados posteriormente, se señaló que la actividad anticoagulante de este grupo de fármacos dependía de la naturaleza química del sustituyente (Mandoki, *et. al.*, 1991; Lemini, *et. al.*, 1993; Rubio Póo, *et. al.*, 1993; Lemus, *et. al.*, 1998). Estas conclusiones fueron fundamentadas en el hallazgo de que la introducción de grupos funcionales como el grupo carboxilo como sustituyente del grupo amino (proacame) inhibía la actividad anticoagulante (Mandoki, *et. al.*, 1991) y grupos alquilo e hidroxilo la conservaban (Lemus, *et. al.*, 1993; Jaimez, *et. al.*, 2000). Posteriormente en la serie homóloga, se analizó la influencia del tamaño de la cadena intermedia entre el grupo amino y el grupo hidroxilo como sustituyente terminal en la molécula de los 17 β -aminoestrógenos. La evaluación de la serie prolame, butolame, pentolame y hexolame; señaló que el aumento de la cadena producía una disminución en su actividad estrogénica. Sin embargo la actividad anticoagulante entre los diferentes miembros de estas serie tenían un comportamiento semejante y las diferencias en la magnitud de su efecto anticoagulante no eran significativas (Rubio Póo, *et. al.*, 1993; Lemini, *et. al.*, 1993, Lemus, *et. al.*, 1998; Jaimez, *et. al.*, 2000; Lemini, *et. al.*, 2005a, 2005b). En los últimos años la caracterización de los efectos estrogénicos de los 17 β -aminoestrógenos comparados con el E₂, tanto en modelos *in vivo* como *in vitro*, se incrementó notablemente dando lugar al conocimiento de los mecanismos de acción implicados en las respuestas estrogénicas producidas por este grupo de compuestos (Lemus, *et. al.*, 1998; Jaimez, *et. al.*, 2000). Sin embargo el mecanismo mediante el cual, el efecto anticoagulante se lleva a cabo, es desconocido. La actividad hipocoagulante de los 17 β -aminoestrógenos es selectiva ya que no se presenta en los 17 β -aminoandrostan derivados (Rubio-Póo, *et. al.*, 1997); lo que señala la posibilidad de que estos compuestos puedan comportarse como fármacos moduladores y selectivos del receptor de estrógenos (SERM's) a semejanza del comportamiento farmacodinámico que se ha descrito para algunos fármacos como el tamoxifeno que en algunos tejidos actuó como agonista y en otros como antagonista (Barrett-Connor, 1999; Dutertre y Smith, 2000).

El estudio de los 17 β -aminoestrógenos es de gran interés ya que podría ampliarse el conocimiento de los mecanismos de acción implicados en los efectos de los estrógenos naturales y sintéticos sobre la coagulación sanguínea.

En el presente trabajo se analizó la influencia de la eliminación de los sustituyentes del grupo amino (NH₂) de los 17 β -aminoestrógenos en su actividad biológica. La diferencia estructural entre el AE₂ y E₂ radica en la presencia del grupo NH₂ en lugar del grupo hidroxilo (OH) en el C-17 de la molécula del E₂. Estos grupos funcionales son isósteros (Mathison, *et. al.*, 1989) ya que su estructura electrónica es semejante, sin embargo sus propiedades fisicoquímicas y reactividad son diferentes por lo que producen cambios considerables en su actividad biológica integral modificando el efecto estrogénico y sobre la coagulación sanguínea.

El AE₂ se une al receptor intracelular específico de estrógenos como el E₂ (100%), sin embargo su ARU es significativamente menor (0.074% – 0.029%), resultados similares a los reportados previamente en la literatura para la serie homóloga de los 17 β -aminoestrógenos, prolame, butolame y pentolame en los que se describe una afinidad relativa de unión entre 0.03% a 0.14%, (Jaimez, *et. al.*, 2000). Lo que indicó que el AE₂ posee actividad intrínseca como agonista parcial del RE.

El incremento en el peso del útero es un parámetro ampliamente utilizado como indicador de actividad estrogénica (Astwood, 1938; Evans, *et. al.*, 1941; Branham, *et. al.*, 1993; Reel, *et. al.*, 1996). En las células del epitelio glandular y luminal así como en las del músculo liso y del estroma del útero, se encuentran los receptores para estrógenos. La interacción hormona-receptor induce la activación genómica dando como resultado la transcripción de RNAm específico; produciendo un incremento del RNA y de la síntesis proteica del útero. También aumenta el contenido de algunas enzimas uterinas específicas y su

diferenciación bioquímica, morfológica y funcional pueden ser detectados como *el incremento del peso uterino seco* (Tchernitchin, 1979).

La actividad estrogénica del AE₂ se evaluó por su capacidad para inducir el incremento en el peso del útero de hembras inmaduras ratas Wistar y ratones CD1. La potencia estrogénica del AE₂, con relación al E₂ (100) fue mucho menor (0.18 – 2.1). Estos resultados son semejantes a los obtenidos para prolame, butolame y pentolame en ratas Wistar adultas ovariectomizadas (Lemus, *et. al.*, 1998; Jaimez, *et. al.*, 2000; Lemini, *et. al.*, 2005b). En el modelo hembra inmadura de ratón CD1, se observó que el efecto uterotrófico del AE₂ fue entre un 85-90% (figura 8, tabla 3), mientras que en el modelo de la rata Wistar, su efecto uterotrófico máximo fue del 49% (figura 9, tabla 4). Estas observaciones coinciden con los datos de la literatura en donde se ha descrito que el modelo del ratón es mucho más sensible que el de la rata y las respuestas observadas en el ratón tienen menor variabilidad (Evans, *et. al.*, 1941; Dorfman y Kincl, 1966, Tchernitchin, 1979).

La actividad estrogénica del AE₂ se evaluó *in vitro* por su capacidad para inducir la transcripción génica mediada por el RhE α en un sistema de expresión en levaduras *S. cerevisiae* co-transfectadas con elementos de respuesta a estrógenos, fusionados al gen reportero de la β -galactosidasa y vectores de expresión para el RhE α (Lyttle, *et. al.*, 1992). En este sistema se ha podido establecer el tipo de respuesta y las características de numerosos fármacos como agonistas, agonistas parciales, sinergistas o antagonistas. Los resultados demostraron claramente que el AE₂ activó la expresión del gen reportero mediada por el RhE α como se muestra en la figura 10. La transactivación del gen reportero por el AE₂, fue dependiente de la dosis y su eficacia fue igual a la del E₂, a la concentración de 10 μ M.

La concentración efectiva media (CE50) del AE₂ requerida para inducir la transactivación del gen de la β -galactosidasa fue significativamente mayor que la

del E₂, lo que demostró que su potencia estrogénica relativa fue menor (0.12) que la de la hormona (100). Este resultado correlaciona con los datos obtenidos para el AE₂ en el análisis de competencia por los sitios de unión del RE que fueron significativamente mayores (K_i x 10⁻⁶ M; ARU 0.029% y 0.074%) a los resultados obtenidos para el E₂ (K_i x 10⁻⁹ M; ARU 100%).

La inhibición de la transactivación de la β-galactosidasa inducida por el AE₂ en presencia del antiestrógeno ICI-182,780 confirmó que los efectos agonistas del AE₂ son mediados por el receptor intracelular de estrógenos, ya que el mecanismo de acción antiestrogénico del ICI-182,780 involucra su interacción con el sitio activo del RhE_α (figura 10).

El análisis de correlación entre los modelos animales utilizados en este estudio y los efectos uterotróficos obtenidos del AE₂, mostraron valores muy altos de los coeficientes de correlación (r = 0.976, p < 0.0005) indicando que tanto el modelo de rata Wistar como el modelo de ratón CD1 pueden ser utilizados para evaluar efectos estrogénicos. Sin embargo, es importante destacar que el modelo de hembra inmadura de ratón es mucho más sensible y en él se obtuvieron respuestas mayores que exhiben un efecto máximo porcentual similar al encontrado en el sistema de transactivación en levaduras, *in vitro*.

Los estrógenos utilizados en la THS afectan la coagulación sanguínea que se manifiestan como cambios en los factores VII, IX, X, el factor von Willebrand y el fibrinógeno. Así como en los inhibidores de la coagulación como: la antitrombina III, la proteína S y el inhibidor del factor tisular; que se encuentran relacionados con la generación de eventos tromboembólicos (Gembitski y Begunov, 1994; Izaguirre, 1995, Mammen, 2000).

Los 17β-aminoestrógenos tienen la capacidad de incrementar en forma significativa el tiempo de la coagulación sanguínea en roedores (Rubio-Poó, *et.*

al., 1985, 1990, Mandoki, *et. al.*, 1991; Lemini, *et. al.*, 1993). Recientemente se ha descrito que el 17 β -aminoestrógeno pentolame; produce sus efectos anticoagulantes al incrementar los parámetros hemostáticos como TP, TTPa y la concentración del fibrinógeno afectando de esta manera la fase plasmática de la coagulación sanguínea (García-Manzano, *et. al.*, 2002).

Nuestros resultados confirmaron que el AE₂ igual que otros aminoestrógenos, tiene la capacidad de incrementar el tiempo total de la coagulación. Sus efectos anticoagulantes contrastan con los obtenidos con E₂, el cual produce efectos procoagulantes ya que disminuye de manera significativa el tiempo de coagulación total. (Jaimez, *et. al.*, 2000; Lemini, *et. al.*, 2005a).

El AE₂ produce los efectos anticoagulantes mas prolongados de este grupo de fármacos. La administración única de 8.0 mg/100 g de peso corporal produce un efecto anticoagulante significativo hasta 5 días después de su administración (figura 12B), dosis semejantes del prolame, butolame, pentolame y hexolame producen una duración del efecto anticoagulante máximo de 4 días (Rubio-Póo, *et. al.*, 1990; García-Manzano, *et. al.*, 2002; Lemini, *et. al.*, 2005a).

Para conocer los efectos del AE sobre las diferentes vías de la coagulación: la vía extrínseca, la vía intrínseca y la vía común se evaluaron los parámetros hemostáticos TP, TTPa, TT y la concentración del fibrinógeno permitiéndonos explorar el nivel de acción de este compuesto.

La determinación del TP se encuentra relacionada con los eventos en la *vía extrínseca*, que se activa cuando la sangre se pone en contacto con los tejidos, ya que el único factor que se encuentra fuera de la circulación (extrínseco), es la tromboplastina tisular o factor tisular (FT) (Majluf, 2001).

La vía intrínseca se explora con la prueba del tiempo de tromboplastina parcialmente activada (TTPa). La sangre cuidadosamente obtenida sin

contaminantes de tejido extra-sanguíneo forma un coágulo debido a la activación de la *vía intrínseca*, llamada así porque todas sus proteínas se encuentran en la sangre. Esta vía se inicia al contacto del FXII con superficies extrañas a la pared vascular. La diferencia entre ambas vías radica en la participación inicial de los diferentes factores de la coagulación que están involucrados en la activación del FX. El FXa en presencia del cofactor Va y fosfolípidos (complejo enzimático) actuarán sobre la protrombina (FII) para darán lugar a la formación de trombina, la cual en la vía común, convertirá al fibrinógeno en fibrina dando lugar a la formación del coágulo sanguíneo (Furie y Furie, 1988; Majluf, 2001).

En nuestros resultados observamos que la administración única de AE₂ (4 y 8 mg /100g de peso) tiene la capacidad de incrementar el TP en un 15% ($p = 0.01$) a las 48 horas post-tratamiento. El incremento del TP es asociado con la disminución de la concentración de los factores II, V, VII, los cuales forman parte de la vía extrínseca de la coagulación (Karges, *et. al.*, 1994).

El efecto del AE₂ sobre TTPa fue un incremento del 55% ($p < 0.001$) a las 48 horas, en tanto que el E₂, no modifico este parámetro. Estos resultados concuerdan con los resultados previamente descritos por García-Manzano, *et. al.*, (2002). El incremento en el TTPa se ha relacionado con bajos niveles de los factores IX, X, XI, XII y el cininógeno de alto peso molecular (Colman, 1984; Karges, *et. al.*, 1994; Majluf, 2001). Sin embargo solo la deficiencia del FXI esta relacionada con hemorragias de gravedad variable (Majluf, 2001).

En el TT el AE₂ incrementó en un 29% ($p < 0.001$) a las 24 horas y en un 26% ($p < 0.001$) a las 48 horas, de forma contraria, el E₂ disminuyó este parámetro en un 23% ($p < 0.001$).

El mayor efecto del AE₂ se observó sobre la concentración del fibrinógeno al incrementarla en un 107% ($p < 0.001$) después de 24 horas y en un 87% ($p < 0.001$) a las 48 horas. Estos resultados son similares a los obtenidos con

pentolame en donde se observó un importante incremento del fibrinógeno del 115% ($p < 0.001$) (García-Manzano, *et. al.*, 2002).

La coagulación sanguínea depende de la conversión del fibrinógeno a fibrina inducida por la trombina. El fibrinógeno es una macromolécula simétrica y dimérica; cada mitad esta formada por 3 diferentes cadenas polipeptídicas, $A\alpha$, $B\beta$ y γ , unidas entre ellas por puentes disulfuro. El resultado final de la acción de la trombina sobre el fibrinógeno es la liberación de los fibrinopéptidos A y B convirtiéndolo en fibrina y la polimerización de ésta genera al coágulo sanguíneo (Doolittle, 1987).

El fibrinógeno es sintetizado como un proteína de alto peso molecular (340 kD, APM), el cual es susceptible de ser degradado en la circulación sanguínea, dando lugar a la formación de dos tipos de fibrinógeno de bajo peso molecular de 305 kD (BPM) y 270 kD (BPM'), que provienen de la eliminación de un polipéptido carboxiterminal de 35 kD ya sea de una o de las dos cadenas polipeptídicas $A\alpha$, respectivamente. De acuerdo con Holm (1985a) la distribución fisiológica de los diferentes tipos de fibrinógeno en el plasma humano es: 69.7%, 26.5% y 3.8% de APM, BPM y BPM' respectivamente. Los tiempos de coagulación son mas altos obtenidos en humanos se han relacionado con los fibrinógenos BPM y BPM' y los tiempos de coagulación menores se han relacionado con concentraciones de fibrinógeno APM (Holm, *et. al.*, 1985a, 1985b).

Con esta información nosotros sugerimos que el incremento en la concentración del fibrinógeno provocada por el AE_2 podría estar relacionado con la síntesis de uno o ambos tipos de fibrinógeno de bajo peso molecular y de esa manera correlacionar los incrementos (107%) de este parámetro con los que se encontramos sobre el tiempo total de la coagulación (96%).

El AE₂ ejerce efectos anticoagulantes modificando factores involucrados en las vías intrínseca, extrínseca y común en la cascada de la coagulación; sin embargo es necesario determinar la concentración de cada uno de estos factores y explorar la vía fibrinolítica, componente importante de la hemostasia sanguínea con el objeto de conocer de que manera el AE₂ podría estar modificando las proteínas involucradas en el sistema de la coagulación sanguínea.

10. CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos nos llevaron a inferir las siguientes conclusiones:

- Comprobamos que la inserción del grupo amino en lugar del grupo hidroxilo en el C-17 del estradiol, disminuye la actividad estrogénica y produce efectos anticoagulantes, a diferencia de los efectos procoagulantes del estradiol.
- El 17β -aminoestrol interactúa *in vitro* con el receptor de estrógenos de humano, de rata Wistar y ratón hembra CD1.
- La administración del 17β -aminoestrol indujo el incremento de los pesos uterino húmedo y seco de manera dosis-dependiente en el ratón CD1 y en la rata Wistar hembras inmaduras posiblemente, a través del mecanismo genómico por el cual actúan los estrógenos y con una potencia significativamente menor que la del E_2 .
- Los análisis de correlación indicaron que el efecto estrogénico del 17β -aminoestrol puede ser evaluado mediante el incremento del peso del útero húmedo o seco.
- El modelo de ratón CD1 hembra inmadura es más sensible que el modelo de rata Wistar hembra inmadura para evaluar el efecto uterotrófico producido por el 17β -aminoestrol.
- El 17β -aminoestrol mostró actividad de tipo estrogénica *in vitro*, la cual fue medida a través de la transactivación de la enzima β -galactosidasa y que en presencia de un potente antiestrógeno, el ICI-182,780 dicha transactivación fue inhibida, confirmando que el efecto estrogénico del 17β -aminoestrol es vía receptor específico de estrógenos.
- Los efectos anticoagulantes del 17β -aminoestrol incluyen cambios en la vía extrínseca al incrementar el Tiempo de Protrombina, en la vía intrínseca al modificar el Tiempo de Tromboplastina parcialmente activada y en la vía común al incrementar Tiempo de Trombina y de manera importante la concentración del fibrinógeno.

- El 17β -aminoestrol al incrementar el tiempo total de la coagulación y la concentración de fibrinógeno podría estar estimulando la síntesis de fibrinógeno de bajo peso molecular (BPM, BPM'), el cual esta directamente relacionado con tiempos de coagulación total más prolongados.
- La inserción del grupo amino (NH_2 -) en lugar del grupo hidroxilo (OH -) en el C-17 del estradiol, produce el mayor efecto anticoagulante hasta ahora observado y también el de mayor duración de los 17β -aminoestrógenos.
- El 17β -aminoestrol es el compuesto prototipo de la actividad anticoagulante de la familia de los 17β aminoestrógenos.

11. BIBLIOGRAFIA

- Astwood EB. (1938). A six-hour assay for the quantitative determination of estrogen. *Endocrinology* 23:25-31.
- Barrett-Connor E, Bush TL. (1991). Estrogen and coronary heart disease in women. *JAMA* 265:1861-1867.
- Barrett-Connor E, Cox DA, Anderson PW. (1999). The potential of SERMs for reducing the risk of coronary heart disease. *Trends Endocrinol Metab* 10:320-325.
- Bilsel AS, Onaran N, Moini H, Emerk K. (2000). Long-term effect of 17 β -estradiol and thrombin on tissue factor pathway inhibitor release from HUVEC. *Thromb Res* 99:173-178.
- Böttiger LE, Boman G, Eklund G, Westerholm B. (1980). Oral contraceptives and thromboembolic disease: effects of lowering oestrogen content. *Lancet* 24:1097-1101.
- Bradford MM. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72:248-254.
- Branham WS, Zehr DR, Sheehan Dm. (1993). Differential sensitivity of rat uterine growth and epithelium hypertrophy to estrogens and antiestrogens. *Proc Soc Exp Biol Med* 203:297-303.
- Butt TR, Khan MI, Marsh J, Ecker DJ, Crooke ST. (1988). Ubiquitin-metallothionein fusion protein expression in yeast. *J Biol Chem* 263:16364-16371.
- Caine YG, Bauer KA, Barzegar S, Cate HT; Sacks FM, Walsh BW, Schiff I, Rosenberg RD. (1992). Coagulation activation following estrogen administration to postmenopausal women. *Thromb Haemost* 68:392-395.
- Citarella F, Misiti S, Felici A, Farsetti A, Pontecorvi A, Fantoni A. (1996). Estrogen induction and contact phase activation of human factor XII. *Steroids* 61:270-276.
- Clauss A. (1957). Rapid physiological coagulation method in determination of fibrinogen. *Acta Haematol* 17:237-246.
- Colman RW. (1984). Surface-mediated defense reactions. The plasma contact activation system. *J Clin Invest* 73:1249-1253.

- Cushman M, Kuller LH, Prentice R, Rodabough RJ, Psaty BM, Stafford RS, Sidney S, Rosendaal FR; Women's Health Initiative Investigators. (2004). Estrogen plus progestin and risk of venous thrombosis. *JAMA* 292:1573-1580.
- Chae CU, Ridker PM, Manson JE. (1997). Postmenopausal hormone replacement therapy and cardiovascular disease. *Thromb Haemost* 78(1):770-780.
- Chávez BA, Vilchis F, Pérez AE, García GA, Grillasca I, Pérez-Palacios G. (1985). Stereospecificity of the intracellular binding of norethisterone and its A-ring reduced metabolites. *J Steroid Biochem* 22:121-126.
- Cheng YC, Prusoff WH. (1973). Relationship between the inhibition constant (K_i) and the concentration of inhibitor which causes 50 per cent inhibition (I_{50}) of an enzymatic reaction. *Biochem Pharmac.* 22:3099-3108.
- Chrousos GP. (2005). Hormonas e inhibidores gonadales. En.: Farmacología básica y clínica. BG Katzung, (Ed.). Manual Moderno, México D.F, pp 691-712.
- Devor M, Barrett-Connor E, Renvall M, Feigal D, Ramsdell J. (1992). Estrogen replacement therapy and the risk of venous thrombosis. *Am J Med* 92:275-282.
- Dutertre M, Smith CL. (2000). Molecular mechanisms of selective estrogen receptor modulator (SERM) action. *J Pharmacol Exp Ther* 295:431-437.
- Doolittle RF. (1987). Fibrinogen and fibrin. En: Haemostasis and thrombosis. AL Bloom, DP Thomas (Eds.). Churchill Livingstone, Edinburgh, pp 192-215.
- Dorfman RI, Kincl FA. (1966). Uterotrophic activity of various phenolic steroids. *Acta Endocrinol* 52: 619-626.
- Emms H, Lewis GP. (1985). Sex and hormonal influences on platelet sensitivity and coagulation in the rat. *Br J Pharmacol* 86:557-563.
- Evans JS, Varney RF, Koch FC. (1941). The mouse uterine weight method for the assay of estrogens. *Endocrinology* 28:747-757.
- Farhat MY, Lavigne MC, Ramwell PW. (1996). The vascular protective effects of estrogen. *FASEB J* 10:615-624.
- Farsetti A, Misiti S, Citarella F, Felici A, Andreoli M, Fantoni A, Sacchi A, Pontecorvi A. (1995). Molecular basis of estrogen regulation of Hageman factor XII gene expression. *Endocrinology* 136:5076-5083.

- Fernández JM, Rubio-Arroyo MF, Soriano-García M, Toscano RA, Pérez-César MC. (1985). Synthesis and molecular structure of prolame, N-(3-hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17 β -yl)-3-hydroxypropylamine; an amino-estrogen with prolonged anticoagulant and brief estrogenic effects. *Steroids* 45:151-157.
- Fritsch MK, Murdoch FE. (1994). Estrogens, progestins, and oral contraceptives. En: TM Body, J Lerner, K Minneman, HC Neu, (Eds.). *Human Pharmacology Molecular to Clinical*. Mosby St Louis, Missouri, pp 482-500.
- Furie B, Furie BC. (1988) The molecular basis of blood coagulation. *Cell* 53:505-518.
- García-Manzano A, González-Llaven J, Jaimez R, Franco Y, Avila ME, Rubio-Póo C, Lemini C. (2002). Changes on hemostatic parameters induced by 17 β -estradiol, ethinylestradiol, and the 17 β -aminoestrogen pentolame in the male Wistar rat. *Steroids* 67:1129-1135.
- Gembitskii EV, Begunov AB. (1994). Changes in parameters of the coagulation and fibrinolysis system of the blood in patients with prostate cancer in the framework of estrogen therapy. *Klin Med (Mosk)* 72:30-32.
- Gerstman BB, Piper JM, Freiman JP, Tomita DK, Kennedy DL, Ferguson WJ, Bennett RC. (1990). Oral contraceptive oestrogen and progestin potencies and the incidence of deep venous thromboembolism. *Int J Epidemiol* 19:931-936.
- Gottsäter A, Rendell M, Hulthén UL, Berntorp E, Mattiasson I. (2001). Hormone replacement therapy in healthy postmenopausal women: a randomized, placebo-controlled study of effects on coagulation and fibrinolytic factors. *J Intern Med* 249:237-246.
- Guetta V, Cannon III RO. (1996). Cardiovascular effects of estrogen and lipid-lowering therapies in postmenopausal women. *Circulation* 93:1928-1937.
- Harrison RL, McKee PA. (1984). Estrogen stimulates von Willebrand factor production by cultured endothelial cells. *Blood* 63:657-664.
- Holm B, Nilsen DWT, Kierulf P, Godal HC. (1985a) Purification and characterization of 3 fibrinogens with different molecular weights obtained from normal human plasma. *Thromb Res* 37:165-176.
- Holm B, Brosstad F, Kierulf P, Godal HC. (1985b). Polymerization properties of two normally circulating fibrinogens, HMW and LMW. Evidence that the COOH-terminal end of the α -chain is of importance for fibrin polymerization. *Thromb Res* 39:595-606.

- Ing NH, O'Malley BW. (1995). The steroid hormone receptor superfamily: molecular mechanisms of action. En: *Molecular Endocrinology: Basic Concepts and Clinical Correlations*. BD Weintraub (ed.). Raven Press, Ltd. New York, pp 195-215.
- Jaimez R, Cooney A, Jackson K, Lemus AE, 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 17β -aminoestrogens. *J Steroid Biochem Mol Biol* 73:59-66.
- Johansson BW, Kaij L, Kullander S, Lennér HC, Svanberg L, Astedt B. (1975) On some late effects of bilateral oophorectomy in the age range 15-30 years. *Acta Obstet Gynecol Scand* 54:449-461.
- Karges HE, Funk KA, Ronneberger H. (1994). Activity of coagulation and fibrinolysis parameters in animals. *Arzneim Forsch Drug Res* 44:793-797.
- Kalin MF, Zumoff B. (1990). Sex hormones and coronary disease: a review of the clinical studies. *Steroids* 55:330-352.
- Korovkina VP, Brainard AM, Ismail P, Schmidt TJ, England SK. (2004). Estradiol binding to maxi-K channels induces their down-regulation via proteasomal degradation. *J Biol Chem* 279:1217-1223.
- Krasinski K, Spyridopoulos I, Asahara T, van der Zee R, Isner JM, Losordo DW. (1997). Estradiol accelerates functional endothelial recovery after arterial injury. *Circulation* 95:1768-1772.
- Landemore G, Derlon A, Thomas M, Izard J. (1984). Effects of a natural estrogen, estradiol, on hemostasis in guinea pigs. *Patho. Biol* 32:251-255.
- Lee AJ, Lowe GD, Smith WC, Tunstall-Pedoe H. (1993). Plasma fibrinogen in women: relationships with oral contraception, the menopause and hormone replacement therapy. *Br J Haematol* 83:616-621.
- Lemini C, Rubio-Póo C, Silva G, García-Mondragón J, Zavala E, Mendoza-Patiño N, Castro D, Cruz-Almanza R, Mandoki JJ. (1993). Anticoagulant and estrogenic effects of two new 17β -aminoestrogens, butolame [17β -(4-hydroxy-1-butylamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol] and pentolame [17β -(5-hydroxy-1-pentylamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol]. *Steroids* 58:457-461.
- Lemini C, Cruz-Ramos E, Toscano RA, Cruz-Almanza R. (1998). A comparative structural study of the steroid epimers: 17β -amino-1,3,5(10)-estratrien-3-ol, 17α -amino-1,3,5(10)-estratrien-3-ol, and some derivatives by ^1H NMR, and x-ray diffraction analysis. *Steroids* 63:556-564.

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

- Lemini C, Franco Y, Avila ME, Jaimez R. (2005a). Contrasting effects of estradiol and 17 β -aminoestrogens on blood clotting time in rats and mice. *Eur J Pharmacol* 510:229-233.
- Lemini C, Franco Y, Avila ME, Jaimez R. (2005b). Estrogenic effects of 17 β -aminoestrogens assessed uteri of rats and mice. *Eur J Pharmacol* 510:235-239.
- Lemus AE, Jimenez R, Lemini C, Menjivar M, Silva G, Rubio-Póo C, Valenzuela F, Larrea F. (1998). Estrogenic effects of the synthetic aminoestrogen 17 β -(5-hydroxy-1-pentylamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol (pentolame). *Steroids* 63:433-438.
- Levi M, Middeldorp S, Büller HR. (1999). Oral contraceptives and hormonal replacement therapy cause an imbalance in coagulation and fibrinolysis which may explain the increased risk of venous thromboembolism. *Cardiovasc Res* 41:21-24.
- Lobo RA. (1991). Clinical review 27: Effects of hormonal replacement on lipids and lipoproteins in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 73:925-930.
- Luyer P, Khosla S, Owen WG, Miller VM. (2001). Prospective randomized study of effects of unopposed estrogen replacement therapy on markers of coagulation and inflammation in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab* 86:3629-3634.
- Lyttle CR, Damian-Matsumura P, Juul H, Butt TR. (1992). Human estrogen receptor regulation in a yeast model system and studies on receptor agonists and antagonists. *Steroid Biochem Molec Biol* 42:677-685.
- Majluf AS. (2001). Mecanismos hemostáticos. En: Fundamentos de Hematología. GJ Ruiz Argüelles (Ed.). Editorial Médica Panamericana. México, D.F., pp 264-288.
- Mammen EF. (1982). Oral contraceptives and blood coagulation: a critical review. *Am J Obstet Gynecol* 142:781-790.
- Mammen EF. (2000). Oral contraceptive pills and hormonal replacement therapy and thromboembolic disease. *Hematol Oncol Clin North Am* 14:1045-1059.
- Mandoki JJ, Zavala E, Silva G, Mendoza-Patiño N, Rubio-Póo C, Medina-Martínez S, Domínguez-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, Fernández-G JM, García-Mondragón J, Zavala E, Silva G, Mendoza-Patiño N. (1991). The effects of

- five new 17 β -amino-estrogens, buame, endiame, etolame, picae, and proacame on blood clotting time. *Proc West Pharmacol Soc* 34:99-106.
- Mathison IW, Solomons WE, Morgan PH, Tidwell RR. (1989). Structural features and pharmacologic activity. En: Principles of Medicinal Chemistry. WO Foye (Ed.). Lea & Febiger. Philadelphia, pp 49-77.
- Meade TW, Dyer S, Howarth DJ, Imeson JD, Stirling Y. (1990). Antithrombin III and procoagulant activity: sex differences and effects of the menopause. *Br J Haematol* 74:77-81.
- Meilahn EN, Cauley JA, Tracy RP, Macy EO, Gutai JP, Kuller LH. (1996). Association of sex hormones and adiposity with plasma levels of fibrinogen and PAI-1 in postmenopausal women. *Am J Epidemiol* 143:159-166.
- Mendelsohn ME. (2002). Genomic and nongenomic effects of estrogen in the vasculature. *Am J Cardiol* 90:3F-6F.
- Nathan L, Chaudhuri G. (1997). Estrogens and atherosclerosis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37:477-515.
- Nilsson S, Gustafsson JA. (2000). Estrogen receptor transcription and transactivation basics aspects of estrogen action. *Breast Cancer Res* 2:360-366.
- Norma Oficial Mexicana (NOM-062-ZOO-1999). Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de animales de laboratorio. Diario Oficial de la Federación, Diciembre 6, 1999. México.
- Ohashi R, Sugimura M, Kanayama N. (2003). Estrogen administration enhances thrombin generation in rats. *Thromb Res* 112:325-328.
- Owens MR, Cimino CD, Donnelly J. (1986). Measurements of rat plasma coagulation proteins during prolonged exposure to diethylstilbesterol. *Thromb Res* 42:343-354.
- Perrot-Applanat M. (1996). Estrogen receptors in the cardiovascular system. *Steroids* 61:212-215.
- Polderman KH, Stehouwer CD, van Kamp GJ, Dekker GA, Verheugt FW, Gooren LJ. (1993). Influence of sex hormones on plasma endothelin levels. *Ann Intern Med* 118:429-432.
- Psaty BM, Heckbert SR, Atkins D, Siscovick DS, Koepsell TD, Wahl PW, Longstreth WT Jr, Weiss NS, Wagner EH, Prentice R, Furberg CD. (1993). A

review of the association of estrogens and progestins with cardiovascular disease in postmenopausal women. *Arch Intern Med* 153:1421-1427.

Proctor RR, Rapaport SI. (1961) The partial thromboplastin time with kaolin. A simple screening test for first stage plasma clotting factor deficiencies. *Am J Clin Pathol* 36:212-219.

Quehenberger P, Loner U, Kapiotis S, Handler S, Schneider B, Huber J, Speiser W. (1996). Increased levels of activated factor VII and decreased plasma protein S activity and circulating thrombomodulin during use of oral contraceptives. *Thromb Haemost* 76:729-32.

Quick, A.J. (1974) Letter: Normal values for coagulation tests. *N Engl J Med* 290:751.

Ramplung M, Gaffney P. (1976). Measurement of fibrinogen in plasma. En: JF Davidson, M Samama (Eds.). *Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis*. Raven Press. New York, pp 91-105.

Reel JR, Lamb JC IV, Neal BH. (1996). Survey and assessment of mammalian estrogen biological assays for hazard characterization. *Fundam App Toxicol* 34:288-305.

Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Vandenbroucke JP. (2001). Oral contraceptives, hormone replacement therapy and thrombosis. *Thromb Haemost* 86:112-123.

Rosendaal FR, Helmerhorst FM, Vandenbroucke JP. (2002). Female hormones and thrombosis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 22:201-210.

Rosendaal FR, Van Hylckama A, Tanis BC, Helmerhorst FM. (2003). Estrogens, progestogens and thrombosis. *J Thromb Haemost* 1:1371-1380.

Rubio-Póo C, Mandoki JJ, Jayme V, Mendoza-Patiño N, Alvarado C, Silva G, Zavala E, Fernández-González JM, Rubio-Arroyo M. (1983). Prodiame: A new estrogen with sustained anticoagulant effect. *Proc West Pharmacol Soc* 26:111-113.

Rubio-Póo C, Mandoki JJ, Mendoza-Patiño N, Lemini C, De la Peña A, Cruz F, Zavala E, Silva G, García-Mondragón J, Fernández-González JM, Soriano-García M, Toscano AR. (1985). The anticoagulant effect of prolame, N-(3-hydroxy-1,3,5(10)estratrien-17 β -yl)-3-hydroxypropyl-amine, 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 RT, Fernández-G JM, Mandoki JJ. (1990). The anticoagulant effect of hexolame, N-(3-hydroxy-1,3,5(10)-

estratrien-17 β -yl)-6-hydroxyhexylamine, another amino-estrogen with prolonged anticoagulant effect. *Steroids* 55:83-86.

Rubio-Póo C, Lemini C, Silva G, Chávez Lara B, Mendoza-Patiño N, Ortiz R, Mandoki JJ. (1997). Effects of 17 β -(N,N-diethylaminoethyl)amino-1,3,5(10)-estratrien-3-ol, and its androstane analog on blood clotting time. *Med Chem Res* 7:67-75.

Salom JB, Burguete MC, Pérez-Asensio FJ, Centeno JM, Torregrosa G, Alborch E. (2002). Acute relaxant effects of 17 β -estradiol through non-genomic mechanisms in rabbit carotid artery. *Steroids* 67:339-346.

Scatchard G. (1949). The attractions of proteins for small molecules and ions. *Ann NY Acad Sci.* 51: 660-672.

Schiff I, Walsh B. (1995). Menopause. En: Principles and Practice of Endocrinology and Metabolism. KL Becker, JP Bilezikian, WJ Bremner, W Hung, CR Kahn, DL Loriaux, ES Nylén, RW Rebar, GL Robertson, L Wartofsky (Eds.). JB Lippincott Company. Philadelphia, pp 915-923.

Stampfer MJ, Colditz GA, Willett WC, Manson JE, Rosner B, Speizer FE, Hennekens CH. (1991). Postmenopausal estrogen therapy and cardiovascular disease. Ten-year follow-up from the nurses' health study. *N Engl J Med* 325:756-762.

Teede HJ, McGrath BP, Smolich JJ, Malan E, Kotsopoulos D, Liang Y, Peverill RE. (2000). Postmenopausal hormone replacement therapy increases coagulation activity and fibrinolysis. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 20:1404-1409.

Tchernitchin A. (1979). The role of eosinophil receptors in the non-genomic response to oestrogens in the uterus. *J Steroid Biochem* 11:417-424.

Tikkanen MJ, Nikkila EA, Kuusi T, Sipinen SU. High density lipoprotein-2 and hepatic lipase: reciprocal changes produced by estrogen and norgestrel. *J Clin Endocrinol Metab* 54:1113-1117.

Valverde MA, Rojas P, Amigo J, Cosmelli D, Orio P, Sahamonde MI; Mann GE, Vergara C, Latorre R. (1999). Acute activation of Maxi-K channels (hSlo) by estradiol binding to the β subunit. *Science* 285:1929-1931.

Van Hylckama AV, Rosendaal FR. (2004). Interaction between oral contraceptive use and coagulation factor levels in deep venous thrombosis. *J Thromb Haemost* 1:2186-2190.

- Van Vliet HAAM, Winkel TA, Noort I, Rosing J, Rosendaal FR. (2004). Prothrombotic changes in users of combined oral contraceptives containing drospirenone and cyproterone acetate. *J Thromb Haemost* 2:2060-2062.
- Wakasugi M, Noguchi T, Kazama YI, Kanemaru Y, Onaya T. (1989). The effects of sex hormones on the synthesis of prostacyclin (PGI₂) by vascular tissues. *Prostaglandins* 37:401-410.
- Williams CL, Stancel GM. (1996). Estrógenos y progestágenos. En: Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica. JG Hardman, LE Limbird, PB Molinoff, RW Ruddon, A Goodman (Eds.). McGraw Hill Interamericana. México, D.F., pp 1497-1530.
- Wren BG. (1992). The effect of oestrogen on the female cardiovascular system. *Med J Aust* 157:204-208.
- Zar JH. (1984). Multiple Comparisons. En Biostatistical Analysis. JH Zar (Ed.). Prentice-Hall. Englewood Cliffs, pp 185-205.
- Zárate TA. (1999). La versatilidad de los estrógenos se aprovecha en el tratamiento de la posmenopausia. *Gac Med Mex.* 135:341-344.
- Zhang F, Ram JL, Standley PR, Sowers JR. (1994). 17 β -Estradiol attenuates voltage-dependent Ca²⁺ currents in A7r5 vascular smooth muscle cell line. *Am J Physiol* 266:C975-C980.

12. APENDICE

Cascada de la coagulación sanguínea

Vía intrínseca

Vía extrínseca

