



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

***PERFIL HEMOSTÁTICO DE 17β-(5-HIDROXI-1-PENTILAMINO)-1,3,5 (10)-
ESTRADIEN-3-OL (PENTOLAME) IN VIVO.***

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

PRESENTA

BONY BETSY CISNEROS GÁMEZ



MÉXICO, D.F.

2014



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.

JURADO ASIGNADO:

PRESIDENTE: Profesor: Elia Brosla Naranjo Rodríguez

VOCAL: Profesor: Andrés Navarrete Castro

SECRETARIO: Profesor: Ruth Jaimez Melgoza

1er. SUPLENTE: Profesor: Oscar Armando Pérez Méndez

2° SUPLENTE: Profesor: Araceli Mendieta Rergis

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

Laboratorio de Estrógenos y Hemostasia. Facultad de Medicina. UNAM.

ASESOR DEL TEMA:

Dra. Ruth Jaimez Melgoza

SUSTENTANTE:

Bony Betsy Cisneros Gámez

ÍNDICE

1. RESUMEN	5
2. INTRODUCCIÓN	6
2.1 Biosíntesis de estrógenos	6
2.2 Efectos sobre el sistema reproductivo	6
2.3 Estrógenos naturales	8
2.4 Farmacocinética	8
2.5 Mecanismo de acción	9
2.6 Efectos adversos	9
3. ANTECEDENTES	11
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	13
5. JUSTIFICACIÓN	15
6. HIPÓTESIS	16
7. OBJETIVOS	17
7.1 Objetivo general	17
7.2 Objetivos particulares	17
8. MATERIALES Y MÉTODOS	18
8.1 Materiales	18
8.1.1 Reactivos	18
8.1.2 Material y equipo	18
8.1.3 Material biológico	18

8.2 Métodos	19
8.2.1 Ovariectomía	19
8.2.2 Manejo de animales y tratamiento farmacológico	19
8.2.3 Toma de muestras	20
8.2.4 Determinación de las pruebas hemostáticas	20
8.2.5 Análisis estadístico	23
9. RESULTADOS	23
9.1 Efecto estrogénico del pentolame	23
9.2 Efecto hemostático del pentolame	25
9.2.1 Tiempo de protrombina	25
9.2.2 Tiempo de tromboplastina parcial activada	25
9.2.3 Fibrinógeno	25
9.2.4 Factor VII	29
9.2.5 Factor X	29
9.2.6 Factor XI	29
9.2.7 Factor XII	29
10. DISCUSIÓN	34
11. CONCLUSIONES	37
12. AGRADECIMIENTOS	38
13. BIBLIOGRAFÍA	39
14. ANEXO I: Curvas de calibración	42
15. ANEXO II: Asistencia a congreso	47

1. RESUMEN

Los estrógenos son hormonas esteroideas sintetizadas principalmente en el ovario a partir del colesterol, inducen efectos fundamentalmente en el ciclo reproductivo de la mujer a través de mecanismos genómicos y no genómicos. Se suelen administrar estrógenos naturales o sintéticos como método anticonceptivo o terapia de remplazo hormonal, sin embargo están asociados con un aumento en el tiempo de coagulación, con riesgo a sufrir eventos tromboembólicos. En cambio los 17 β -aminoestrógenos producen un efecto opuesto al estradiol respecto a la coagulación.

Se estudió el efecto estrogénico y el efecto hemostático del 17 β -aminoestrógeno pentolame. Se realizaron las ovariectomías a ratas Wistar, los animales se separaron en lotes, a cada grupo se le administraron diferentes dosis de pentolame (1, 10, 100 y 1000) μ g/mL o el vehículo (propilenglicol 0.3 mL) durante tres días por vía subcutánea. A las 24 horas después del tratamiento con pentolame, las ratas fueron sacrificadas posteriormente los úteros de los animales se extrajeron y se pesaron. Se obtuvo el plasma para realizar las pruebas de coagulometría, se determinó el tiempo de protrombina (TP), el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa), la concentración de fibrinógeno y la actividad del FVII, FX, FXI y FXII.

El pentolame aumentó el peso de los úteros de las ratas respecto al control. En el sistema hemostático el pentolame incrementó significativamente el TTPa (45-47%; $p < 0.05$). Las dosis del pentolame no cambiaron el TP y la concentración de fibrinógeno respecto al control. Los factores de coagulación no tuvieron cambios en su porcentaje de actividad. Los resultados de este trabajo indican que el pentolame a las dosis evaluadas sólo afecta a la vía intrínseca de la hemostasia secundaria y no se observa un efecto significativo sobre la vía extrínseca y en fibrinógeno.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 BIOSÍNTESIS DE ESTRÓGENOS

Los estrógenos son hormonas sexuales esteroideas, que derivan de una estructura básica de 18 átomos de carbono con un anillo aromático, un núcleo relativamente plano y rígido y un grupo alcohol en posición C17 (Lorenzo P. et al, 2004). Los estrógenos son biosintetizados a partir del colesterol; a través de un proceso complejo que requiere más de veinte etapas a partir del acetil-CoA para formar el colesterol. La etapa más determinante de la velocidad del proceso es la conversión del HMG-CoA en ácido mevalónico, catalizado por la enzima reductasa (Delgado A. et al, 2004). Una vez formado el colesterol, su cadena lateral se rompe para formar pregnenolona que se convierte directamente en progesterona por la acción de dos enzimas, la deshidrogenasa e isomerasa, después se forma androstenediona precursor de la testosterona, en el cual se aromatiza el anillo A del esteroide, con pérdida de C19 por la acción de la aromatasa (CYP19) para convertirse en estrógeno (Flores J, 2014) (Figura 1).

Los estrógenos son producidos principalmente en el ovario, pero también, en la placenta; en menor cantidad se sintetizan en los testículos, y en la corteza suprarrenal (Rang H. et al, 2012). La síntesis gonadal está regulada por las gonadotropinas, la hormona luteinizante (LH) estimula la producción de andrógenos por células de la teca en la fase folicular del ciclo menstrual, en tanto que la hormona folículo estimulante (FSH) estimula la conversión de andrógenos en estrógenos, por parte de las células granulosa. En la fase luteínica del ciclo menstrual, la síntesis de estrógenos y progesterona está más bien bajo el control de la LH (Fox S.I, 2012).

2.2 EFECTOS SOBRE EL SISTEMA REPRODUCTIVO

El papel que desempeñan los estrógenos es muy importante en el sistema reproductivo, estimulan el desarrollo de los caracteres sexuales secundarios durante la pubertad en las niñas; favoreciendo el desarrollo mamario, la deposición de grasa. La regulación del ciclo reproductivo que se produce por la

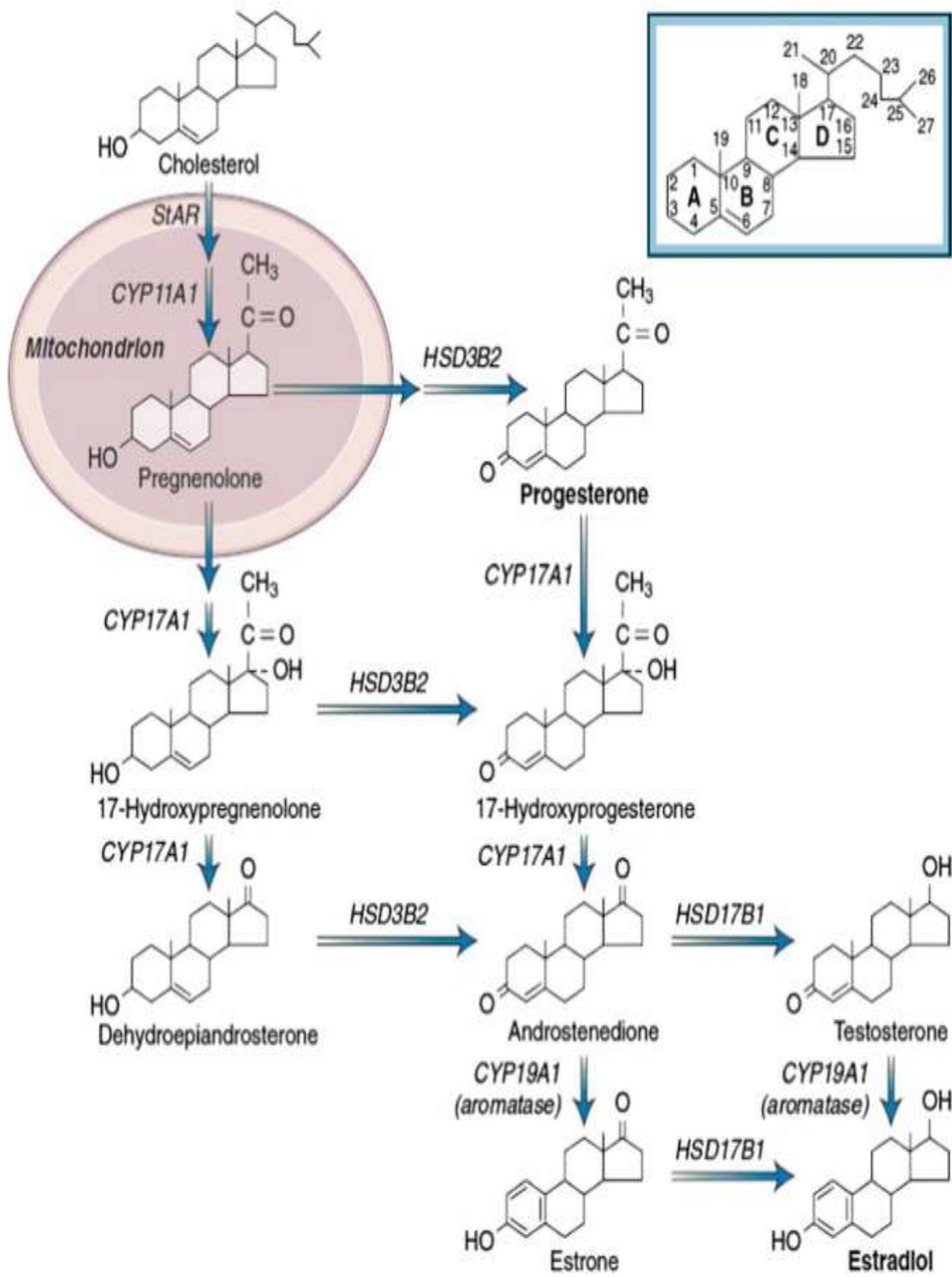


Figura 1. Biosíntesis de los estrógenos. Melmed S. et al, 2011.

interacción de los estrógenos con el eje hipotálamo-hipófisis-ovario, modulando negativamente la liberación periódica de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) con lo que se estimula la liberación pulsátil de LH y FSH y, en consecuencia, no se produce estimulación ovárica, lo que condiciona una disminución de estrógenos, y pérdida del control negativo de la liberación de GnRH y la consiguiente activación del ciclo. Las variaciones cíclicas de los estrógenos ocasionan cambios en útero, vagina, vulva, trompas de Falopio (Flores J, 2014; Katzung B, 2013; Lorenzo P. et al, 2004).

2.3 ESTRÓGENOS NATURALES

En las mujeres existen tres principales formas de estrógenos fisiológicos: estrona, el principal estrógeno durante el periodo menopaúsico; estradiol (E2), el estrógeno más potente y principal en mujeres premenopáusicas con un máximo preovulatorio de 250-300 pg/mL (Flores J, 2014). El estriol es el estrógeno menos potente y tiene un papel más importante durante el embarazo cuando es producido por la placenta. (Jie C. et al, 2013).

2.4 FARMACOCINÉTICA

Los estrógenos se absorben bien por cualquier vía, pero por vía oral sufren una rápida inactivación hepática. Por ello es necesario administrarlos en forma de ésteres (como benzoato, dipropionato, valerato, etc), que se absorben y metabolizan más lentamente y, por lo tanto tienen una acción más prolongada. El metabolismo ocurre en el hígado, donde el estradiol es transformado en compuestos con menor actividad, como estriol, y por oxidación a otras sustancias no estrogénicas. Se conjugan con ácido glucurónico y sulfatos por la fase II hepática y se eliminan tanto en orina como en secreción biliar (Lakhani N. et al, 2003).

2.5 MECANISMO DE ACCIÓN

Estas hormonas son sustancias lipofílicas que necesitan ser transportadas por la globulina específica o albúmina en circulación, se disocian de estas proteínas plasmáticas al atravesar el componente lipídico de la membrana celular e introducirse a la célula diana. Los esteroides ejercen sus acciones biológicas a través de distintos mecanismos, genómicos y no genómicos (Noriega-Reyes M. et al, 2008). El mecanismo clásico o genómico (Figura 2) se caracteriza por estar mediado por receptores nucleares α y β que se activan al unirse a los estrógenos, estos receptores son factores de transcripción, el complejo estrógeno-receptor se une a elementos de respuesta directa o indirectamente a través de la proteína activadora (AP1) en el sitio promotor, reclutando proteínas correguladoras, incrementando o disminuyendo los niveles de ARNm asociado con la síntesis de proteínas enzimáticas específicas que modifican el metabolismo de la célula diana según los efectos que inducen la hormona sobre la misma. Tiene un período de latencia de horas, aparecen lentamente (Bonnie J. et al, 2014; Finkel R, 2009; Fox S.I, 2012). En cambio, el mecanismo no genómico es la activación de otras cascadas de transducción de señales por medio de un receptor estrógeno-regulado anclado a la membrana, se instaura rápidamente y su período de latencia se lleva a cabo en segundos (Noriega-Reyes M. et al, 2008).

2.6 EFECTOS ADVERSOS

La administración de estrógenos como fármaco son indicados principalmente en mujeres en edad fértil conjuntamente con progestinas en formulaciones anticonceptivas y en el tratamiento hormonal sustitutivo (THS) en estados posmenopáusicos. Estos estrógenos utilizados clínicamente ejercen varios efectos metabólicos entre los que se encuentran: retención hidrosalina, aumento de la concentración sérica de triglicéridos y aumento en la incidencia de cáncer endometrial y de mama. (Mendoza N, 2008). Ocasionalmente pueden producir cierto grado de tolerancia a la glucosa. (Rang H. et al 2012).

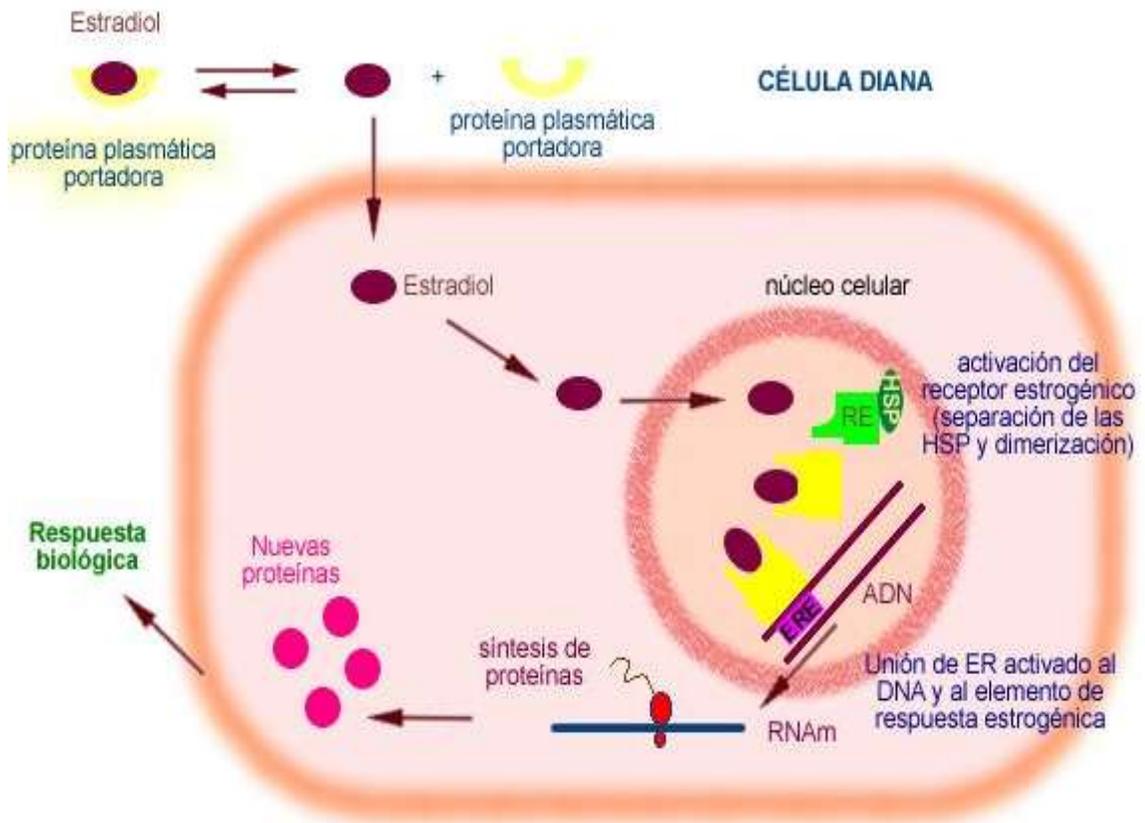


Figura 2. Mecanismo de acción de los estrógenos (genómico).

http://www.iqb.es/ginecologia/menopausia/th1_02.htm.

Los estrógenos orales en las mujeres posmenopáusicas aumentan la coagulabilidad de la sangre al incrementar la concentración de factores II, VII, IX y X y disminuir la antitrombina. También aumentan la concentración de plasminógeno y la adhesividad plaquetaria, (Finkel R, 2009; Rang H, 2012). Se ha reportado un aumento del riesgo de cardiopatía coronaria en las pacientes que reciben suplementos de estrógeno (Rossouw J.E. et al, 2002). Estudios epidemiológicos indican que las pacientes bajo tratamiento anticonceptivo o terapia hormonal sustitutiva tienen mayor riesgo de desarrollar trombosis venosa profunda (Lorenzo P. et al, 2004).

3. ANTECEDENTES

En la búsqueda de nuevos fármacos más seguros con actividad estrogénica, un grupo de investigadores de la Facultad de Medicina han formulado una serie de fármacos sintéticos con estructura esteroide, sustituidos con un grupo aminoalcohol en la posición 17 β del estradiol a los que genéricamente se les ha denominado 17 β -aminoestrógenos: prolame 17 β -(3-hidroxi-1-propilamino)-1,3,5(10)-estratieno-3-ol, butolame 17 β -(4-hidroxi-1-butilamino)-1,3,5(10)-estratieno-3-ol y pentolame 17 β -(5-hidroxi-1-pentilamino)-1,3,5(10)-estratieno-3-ol, se sintetizaron en el laboratorio a partir de estrona con la mezcla de una amina primaria mediante una aminación reductiva (Lemini C. et al, 2004).

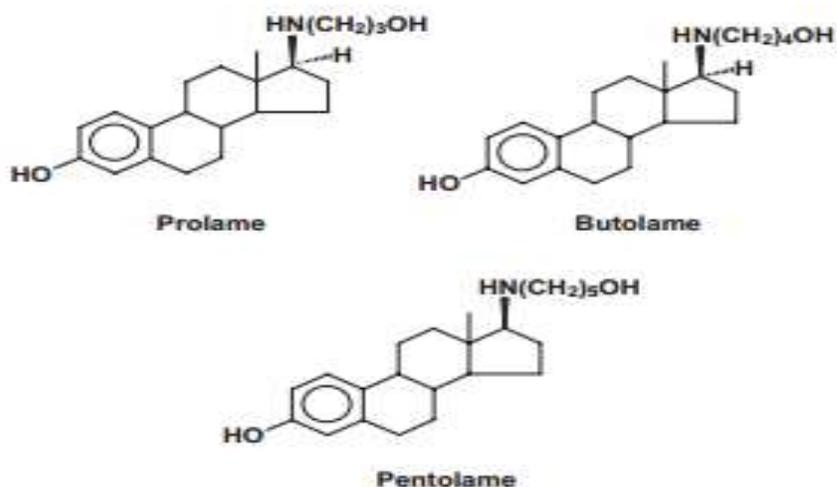


Figura 3. Estructura de los 17 β -aminoestrógenos (Lemini C. et al, 2005)

Los aminoestrógenos poseen actividad estrogénica en útero e hipófisis ya que aumentan el peso de útero e inhiben la liberación de LH, aunque con un efecto menor al estradiol. El pentolame ha sido capaz de restaurar en la hipófisis anterior, la presencia de receptores de progesterona dependientes de estrógenos, además de inhibir la liberación de LH, incrementar el peso uterino en ratas con ovariectomía (Lemus AE. et al, 1998; Jaimez R. et al, 2001).

El tratamiento con aminoestrógenos a ratas ha mostrado efectos en el sistema nervioso central (SNC), estos efectos incluyen la disminución de la ansiedad causada por la ovariectomía, la restauración del aprendizaje espacial y memoria (neuroprotector) (Nissen I. et al, 2012).

Se evaluó también su efecto en hueso, comprobando que los aminoestrógenos son capaces de restaurar los niveles de calcio, fosforo, magnesio y silicio (Ávila ME. et al, 2009; Limón D. et al, 2012).

Diferentes estudios demuestran que los 17β -aminoestrógenos producen un efecto anticoagulante en rata y ratón (Lemini C. et al, 1993). Este efecto que poseen podría servir para el desarrollo de agentes terapéuticos, como alternativas estrogénicas sin riesgo de eventos tromboembólicos (García-Manzano A. et al, 2002). Estudios *in vitro* con aminoestrógenos reportaron una inhibición dosis-dependiente de la agregación plaquetaria (De la Peña A. et al, 1993).

El efecto anticoagulante de los aminoestrógenos se relaciona con la presencia del grupo amino en el anillo D (Rubio-Póo C. et al, 1993). La diferencia de latencia y duración en el efecto anticoagulante entre los aminoestrógenos se debe probablemente a sus propiedades de solubilidad y polaridad que cambian su transporte transmembranal, biotransformación y procesos de eliminación. Tales modificaciones estructurales podrían también marcar diferencia en su reactividad y activación de los receptores que determinan la magnitud del efecto biológico (Lemini C. et al, 2013). Se ha reportado que los aminoestrógenos activan ambos receptores el receptor estrogénico α y el receptor estrogénico β (Jaimez R. et al, 2000).

El pentolame presenta el mayor efecto anticoagulante de los aminoestrógenos (Lemini C. et al, 2005). Al ser administrado el pentolame a ratas ovariectomizadas muestra un mayor efecto anticoagulante sostenido por varios días, a diferencia del estradiol que es bifásico; con la presencia de la fase procoagulante (Lemus AE. et al, 1998). La concentración de fibrinógeno aumenta a altas dosis de pentolame (4mg/100g). Además se observaron un incremento en los valores de tiempo de

protrombina y tiempo de tromboplastina parcial activada (García-Manzano A. et al, 2002).

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las mujeres premenopáusicas tienen baja incidencia en enfermedades cardiovasculares comparadas con hombres de misma edad (Hayward C. et al, 2000). Esta protección es atribuida a los estrógenos, ya que durante la menopausia, la concentración de estrógenos decrece, y aumenta el riesgo de eventos trombóticos (Canónico M. et al, 2010). Sin embargo la administración de estrógenos exógenos tanto en terapia de remplazo hormonal como en anticonceptivos orales se ha asociado con un aumento en la frecuencia de aparición de enfermedades como trombosis venosa profunda o embolismo pulmonar (Rosendaal F. et al, 2001, 2002).

El uso de este tipo de fármacos en las mujeres ha sido motivo de controversia porque aunque muchos autores consideran que sus beneficios superan los riesgos, en la mayoría de las mujeres se han reportado un aumento del riesgo de accidentes tromboembólicos (Mendoza N, 2008). Esto es importante analizar en los estudios clínicos ya que estos efectos podrían ser debido a que las mujeres ya estaban predispuestas a tener factores de riesgo de trombosis, tales como hipercolesterolemia, hipertensión, obesidad, diabetes, tabaquismo, etc (Novella S. et al, 2012).

Otros factores importantes que han causado discrepancia en diferentes estudios son el tipo de estrógeno utilizado, célula o tejido estudiado, si el tratamiento es crónico o agudo, el intervalo de dosis utilizadas, las variaciones circadianas (Rubio-Póo C. et al, 1998; Novella S. et al, 2012).

Existe la teoría en la cual se postula que los efectos del estrógeno administrado en la terapia hormonal de remplazo previene enfermedades cardiovasculares solo cuando el tratamiento es iniciado antes de los efectos detrimentales producidos por la menopausia, en el climaterio premenopáusico (Novella S. et al, 2012).

Investigadores afirman los estrógenos fisiológicos producen un efecto benéfico al reducir el riesgo de arteriosclerosis e infarto al miocardio (Gordon T. et al, 1978). Estos efectos están basados principalmente en su influencia en el metabolismo de lipoproteínas, que conduce a la prevención de arteriosclerosis produciendo efectos vasodilatadores; por lo tanto, se induce una caída en la presión arterial con una subsecuente mejora en el flujo sanguíneo (Henderson B. et al, 1998).

También se ha demostrado que el uso de anticonceptivos orales es la mayor causa de enfermedades trombóticas en la mujer premenopáusica, con alto riesgo durante el primer año de consumo de hormonas (una de cada mil mujeres al año) (Rosendaal F. et al, 2002). En la terapia de estrógenos a hombres con cáncer de próstata ha resultado un incremento en complicaciones vasculares; infarto al miocardio, tromboembolismo venoso y accidente cerebrovascular (Gembitskii E. et al 1994).

El mecanismo por el cual ocurren estos efectos adversos no se conoce completamente; sin embargo, los estrógenos alteran factores que participan en la hemostasis, produciendo aumento de factores y cofactores que participan en la coagulación sanguínea como: Factor I (fibrinógeno), Factor II (protrombina), Factor V, Factor VII, Factor VIII y Factor IX. (Mendoza N, 2008).

5. JUSTIFICACIÓN

El uso de anticonceptivos orales y de la terapia hormonal de reemplazo han aumentado considerablemente con los años, el riesgo de presentar un tromboembolismo es de ocho casos por cada 10.000 mujeres que los toman (National Institutes of Health, 2004).

Estos estrógenos exógenos producen un efecto procoagulante, en cambio el 17 β -aminoestrógeno pentolame disminuye el tiempo de coagulación total en experimentos *in vivo*, sin embargo se conoce poco acerca de su efecto sobre factores específicos de la hemostasia. El propósito de evaluar y caracterizar farmacológicamente al pentolame, abre la posibilidad de desarrollar fármacos con efectos benéficos más seguros y menos tóxicos.

6. HIPÓTESIS

Si se conoce que la administración de los 17β -aminoestrógenos produce un efecto opuesto al estradiol sobre el tiempo de coagulación total en modelos animales, el pentolame tendrá efecto sobre las vías de la coagulación al inhibir los factores que participan en la formación del coágulo.

7. OBJETIVOS

7.1 OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de pentolame sobre factores de la vía extrínseca, intrínseca y común de la coagulación (I, VII, X, XI, XII) en ratas ovariectomizadas.

7.2 OBJETIVOS PARTICULARES

- a)** Realizar las curvas de estandarización de todos los parámetros a evaluar.
- b)** Determinar el efecto del el 17β -aminoestrógeno pentolame sobre el tiempo de protrombina y el tiempo de tromboplastina parcial activada.
- c)** Determinar el efecto del pentolame sobre la vía extrínseca de la coagulación a través de la determinación de factor de coagulación (FVII).
- d)** Determinar el efecto del pentolame sobre la vía intrínseca de la coagulación a través de la determinación de factor de coagulación (FXI) y (FXII).
- e)** Determinar el efecto del pentolame sobre la vía común de la coagulación a través de la determinación de factor de coagulación fibrinógeno (FI) y (FX).

8. MATERIALES Y MÉTODOS

8.1 MATERIALES

8.1.1 Reactivos

El Pentolame fue sintetizado y donado por la Dra. Cristina Lemini Guzmán del Laboratorio de Farmacología Endócrina. El propilenglicol usp, tribromoetanol y alcohol tert-amílico se obtuvieron de Sigma-Aldrich®. Los plasmas deficientes de factores (VII, X, XI, y XII), la tromboplastina C plus, Actin FS®, pool de plasma rata macho Wistar (carece de variación hormonal), cloruro de calcio (CaCl₂), buffer Veronal (10 mM de barbital, 125 mM de NaCl, pH 7.4) y buffer de imidazol (30 mM, 125 mM, 0.1% azida de sodio, pH= 7.35) adquiridos en Dade®.

8.1.2 Material y equipo

El equipo tipo mariposa con aguja para extracción de sangre Safety- Lok™, aguja calibre de 23G x 19/7" (0.6 × 19mm ×178mm) BD Vacutainer, tubos Vacutainer® para la toma y recolección de sangre, de vidrio al vacío, tamaño del tubo 13×75mm, volumen drenado 4.5mL con tapón de seguridad Hemogard®, color azul, con citrato de sodio 0.015 M (3.2%) como anticoagulante, estériles y desechables, se adquirieron en Becton Dickinson, Franklin Lakes NJ USA. La sutura quirúrgica Catgut crómica 3/0 estéril de Ethicon®. Las cubetas con agitadores SIEMENS® para el coagulómetro semiautomático Fibrintimer BFTII®. El instrumental quirúrgico (pinzas a son, Kelly, halstead, porta agujas y tijeras mayo e iris) se adquirieron de Weldon Original®.

8.1.3 Material biológico

Durante los experimentos se utilizaron 38 ratas hembras Wistar adultas (200-225 g) procedentes del bioterio central de la Facultad de Medicina de la UNAM que se mantuvieron en ciclos de luz-oscuridad de 12h x 12h con agua potable y el alimento fue Nutri-cubos Purina Lab Chows^{RM} *ad libitum* y temperatura controlada 22°C, humedad 30%. Todos los experimentos se realizaron con apego a la Norma

Oficial Mexicana (NOM-062-Z00-1999-SENASICA, 2001), especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio.

8.2 MÉTODOS

8.2.1 Ovariectomía

La ovariectomía se realizó en ratas hembras Wistar dos semanas antes de iniciar el tratamiento. Los animales se pesaron y se anestesiaron con tribromo etanol (0.2g/kg peso del animal) por vía intraperitoneal. Bajo anestesia se les rasuró el dorso, se limpió la zona con benzal al 1%, usando el material quirúrgico desinfectado y esterilizado se realizó una incisión transversal en la piel de aproximadamente 1 cm en la región dorsal, procediendo a una segunda incisión bilateral longitudinal en el músculo, dentro de la cavidad peritoneal hasta la localización de los ovarios, los cuernos uterinos se ligaron con catgut 3-0 para realizar los cortes en los oviductos y remover los ovarios. Finalmente se suturó la piel con hilo de seda 3-0 y la región dorsal se desinfectó con la solución de benzal al 1%.

8.2.2 Manejo de animales y tratamiento farmacológico

Las ratas fueron colocadas en cajas lavadas y desinfectadas, con piso y paredes continuas sólidas con tapa removible de reja y con aserrín estéril con cambio diario de cama. Los animales estuvieron en observación todos los días previos al tratamiento para detectar infecciones posquirúrgicas.

Al inicio del tratamiento la marcación fue con números naturales en la cola de los animales se marcaron con números en la cola y se distribuyeron por el método de cuadrados latinos en función a su peso corporal en 5 lotes, 4 ratas en cada lote, excepto en el lote del control con 3 ratas. Se realizaron 2 experimentos en los cuales cada lote o grupo de animales recibió un tratamiento por vía subcutánea de pentolame disuelto en propilenglicol usp 99.5% en dosis de 1, 10, 100 y 1000

$\mu\text{g}/\text{Kg}$, durante tres días consecutivos. El grupo control recibió solamente propilenglicol usp 99.5% (vehículo; 0.3mL/animal/día).

8.2.3 Toma de muestras

La toma de muestra se realizó un día post administración (8:00-10:30 horas del día), los animales se anestesiaron con tribromo etanol (0.2g/kg peso del animal) por vía intraperitoneal, después se limpió la zona ventral con benzal al 1% y se realizó un corte de 4 cm en la piel. Se localizó la arteria mesentérica para extraer la muestra de sangre por medio de un sistema tipo mariposa Vacutainer® 23G y tubos Vacutainer que contienen 3.2% de citrato de sodio. Después de la toma de muestra se disecaron los úteros de todos los animales y se pesaron para comprobar el efecto uterotrófico de los tratamientos. Debido a que la toma de la muestra es mayor a 8 mL los animales bajo anestesia murieron por exsanguinación y se corroboró con dislocación cervical. La disposición final de los cadáveres y los úteros fue la unidad de cremación de la Facultad de Medicina.

Los tubos se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente. El plasma obtenido del sobrenadante de cada tubo fue de aproximadamente 2 mL, se guardaron en 2 viales de 1.5 mL a -20°C para su posterior procesamiento.

8.2.4 Determinación de las pruebas hemostáticas

La determinación de las pruebas hemostáticas se realizó basándonos en la estandarización de los métodos clásicos modificados por García-Manzano A. (2001).

ESTANDARIZACIÓN Y CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS FACTORES DE COAGULACIÓN

Para determinar el efecto del pentolame, fue necesario asegurar que los reactivos utilizados en la clínica pudieran usarse en un modelo de rata. Para esto fue necesario realizar las curvas de estandarización con las diluciones.

Curva estándar de FVII y FX

La curva estándar para los factores de la vía extrínseca y vía común, se realizó mediante diluciones del plasma deficiente del factor a evaluar (1:20, 1:40, 1:200, 1:2000).

Curva estándar de FXI y FXII

La curva estándar para los factores de la vía intrínseca, se realizó con diferentes diluciones del plasma deficiente del factor a evaluar (1:5, 1:10, 1:50, 1:500).

Curva estándar de fibrinógeno

La curva estándar del fibrinógeno (FI), se realizó con diluciones de plasma (1:5, 1:15, 1:40).

Determinación del tiempo de protrombina (TP)

El tiempo de protrombina fue realizado mediante el método de Quick (1954); cada muestra plasmática (50µL) se incubó a 37°C durante un minuto y la reacción se activó con 100µL de reactivo de tromboplastina.

Determinación del tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa)

La prueba de TTPa se realizó utilizando 50µL de plasma que se mezcló con 50µL de Actin FS®, se incubó durante 120s a 37°C y la reacción se activó con CaCl₂ utilizando el método de Proctor y Rapaport (1961).

DETERMINACIÓN DE LOS FACTORES DE COAGULACIÓN (métodos coagulométricos)

Determinación del factor XI y XII

La muestra problema en una dilución de 1:5 se mezcló con el plasma deficiente del factor a evaluar y se adiciono Actin® (fosfolípidos), posteriormente, se incubó durante 120s a 37°C y la reacción se activó con cloruro de calcio (Proctor y Rapaport, 1961). El tiempo que tardó en detenerse la reacción se graficó con la curva estándar y la extrapolación del tiempo que resultó en la actividad en porcentaje de cada factor.

Determinación del factor VII y X

La muestra problema en una dilución de 1:20 se mezcló con el plasma deficiente del factor a evaluar. La muestra se incubó durante 60s a 37°C, la reacción se activó con el reactivo de tromboplastina (método de Quick, 1954). El tiempo que tardó en detenerse la reacción se graficó como la curva estándar y la extrapolación del tiempo resultó en la actividad en porcentaje de cada factor.

Determinación de fibrinógeno

La muestra problema en una dilución 1:10 se incubó 120s a 37°C, la reacción se activó con el reactivo de trombina. Los tiempo obtenido se graficó en la curva estándar y los valores extrapolados representan la concentración de fibrinógeno en mg/mL (método de Clauss, 1957).

Todas las muestras obtenidas en el presente trabajo se procesaron en el coagulómetro Fibrintimer BFT II®. Los experimentos se realizaron por duplicado y cada muestra se determinó por duplicado. Los grupos tratados fueron comparados con respecto a su propio control (vehículo=100%) y entre ellos.

8.2.5 Análisis estadístico

El análisis de los datos se realizó mediante el uso software de gráficos y estadística Sigma Plot 10® y Sigma Stat 3.0® (Jandel Scientific Software). El análisis de los datos se aplicó mediante las pruebas de análisis de varianza y la prueba de comparaciones múltiples de Dunnet. Una $p < 0.05$ se consideró como estadísticamente significativa.

9. RESULTADOS

9.1 EFECTO ESTROGÉNICO DEL PENTOLAME

Como un control de actividad estrogénica se determinó el efecto del pentolame sobre el peso del útero de las ratas ovariectomizadas al final del experimento. Los resultados se expresan en peso del útero en mg a diferentes dosis de pentolame y se muestran en la Figura 4.

La dosis más altas 100 y 1000 mg/kg del pentolame produjo un aumento significativo de 99% y 177% respectivamente (vehículo 100%) en el peso del útero de ratas ovariectomizadas ($*p < 0.05$ vs vehículo), el efecto es dependiente a las dosis.

Las dosis bajas de 1 y 10 mg/kg del pentolame también presentaron un aumento en el peso del útero, el efecto fue muy parecido entre estas dosis, pero no fue significativo.

El pentolame a dosis altas revirtió la atrofia uterina al producir crecimiento y recuperación del peso del útero.

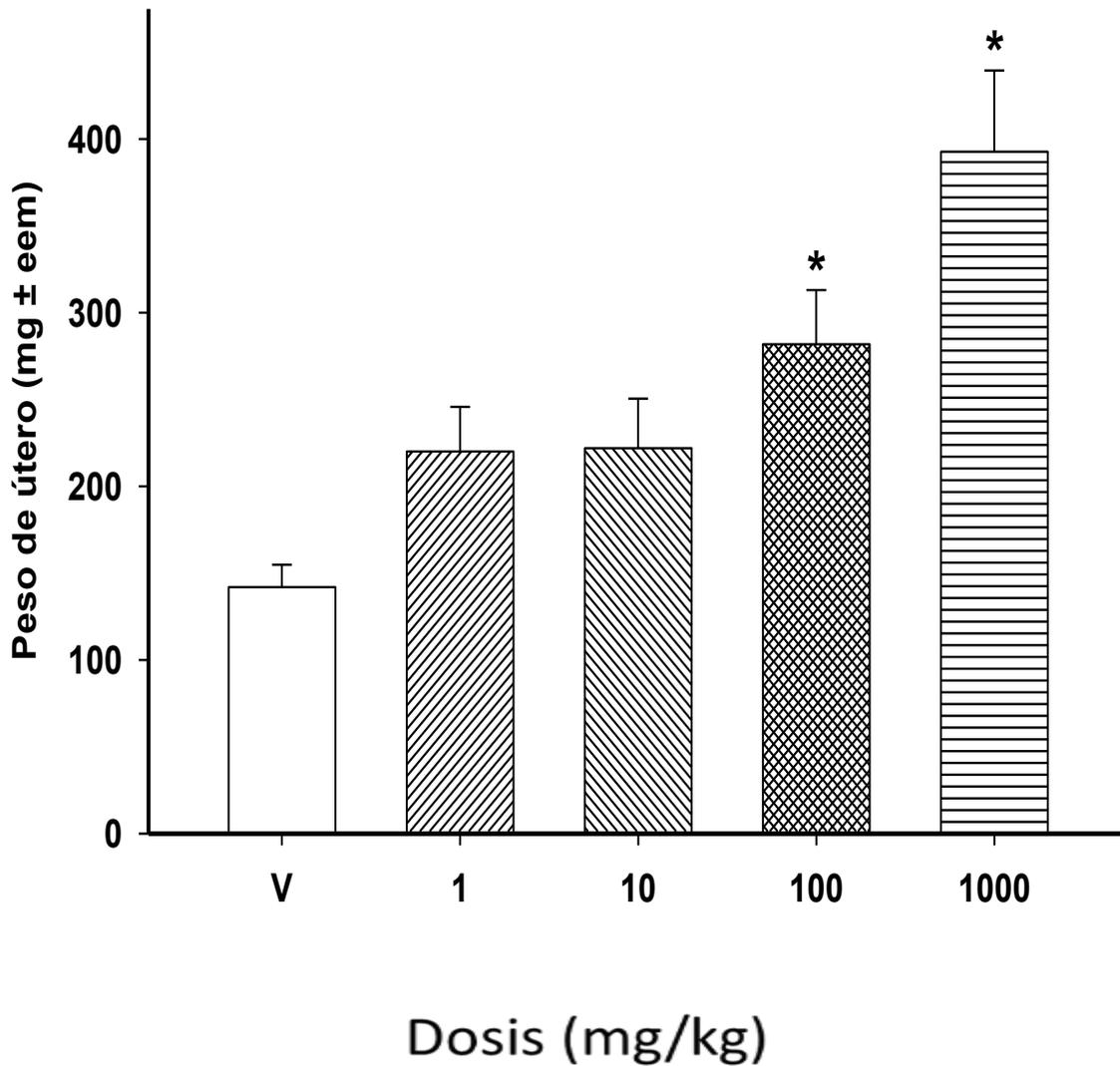


Figura 4: Efecto del pentolame (1, 10, 100, 1000 mg/kg) sobre el peso del útero de ratas Wistar ovariectomizadas. Cada punto representa el promedio \pm EE de dos experimentos (6 ratas en vehículo y 8 ratas en cada dosis). Prueba Dunnett: El control del experimento es el vehículo. * $p < 0.05$ vs vehículo.

9.2 EFECTO HEMOSTÁTICO DEL PENTOLAME

Existen pruebas de escrutinio hemostático que evalúan clínicamente al paciente con riesgo a hemorragia o trombosis. Dos principales pruebas son el tiempo de protrombina (TP) que mide la formación del coágulo en la vía extrínseca y el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa) que analiza la vía intrínseca.

9.2.1 Efecto del pentolame sobre TP

En la Figura 5, el tiempo de protrombina no se ve alterado por algún cambio importante en las cuatro dosis del pentolame ya que son muy parecidas al vehículo, no existe un cambio estadísticamente significativo con respecto al control.

9.2.2 Efecto del pentolame sobre TTPa

El pentolame aumenta el tiempo de la prueba de TTPa de manera significativa respecto al control ($*p < 0.05$) en las dosis de 1, 10 y 100 $\mu\text{g}/\text{kg}$ (47, 45, 45 %), mientras que la dosis de 1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ no mostró el aumento como las otras (Figura 6).

9.2.3 Efecto del pentolame sobre fibrinógeno.

En la Figura 7 se muestran los resultados de las concentraciones del fibrinógeno por administración con pentolame, donde observamos que ninguna de las dosis evaluadas produjeron un cambio significativo respecto al vehículo, todas las dosis son muy parecidas al vehículo y presenta una gran dispersión en los datos.

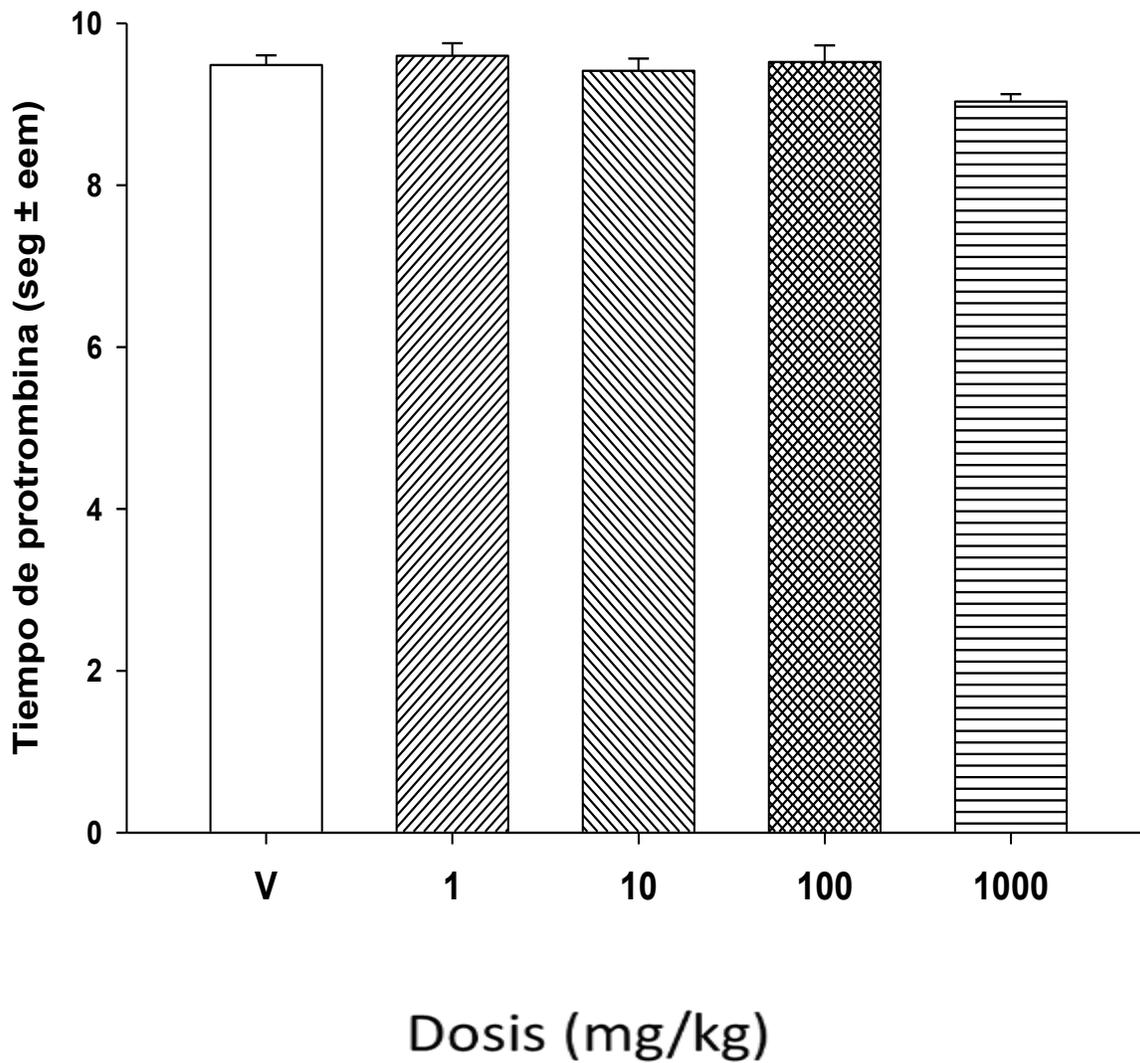


Figura 5: Efecto del 17β -aminoestrógeno pentolame (1, 10, 100, 1000 mg/kg) sobre el tiempo de protrombina (TP). Cada punto representa el promedio \pm EE de dos experimentos (6 ratas en vehículo y 8 ratas en cada dosis) por duplicado. Prueba Dunnett: * $p < 0.05$ vs vehículo 100%.

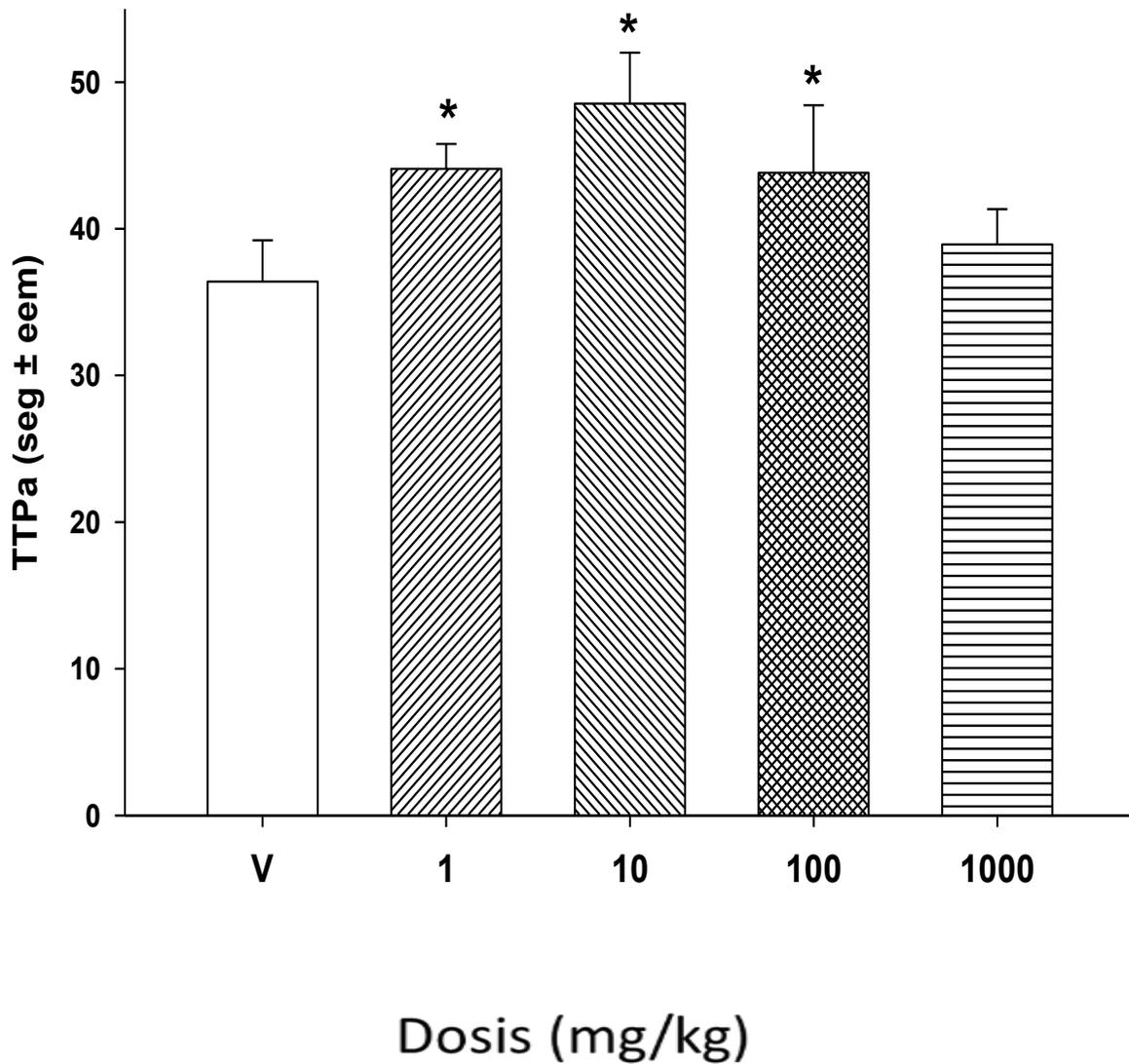


Figura 6: Efecto del 17 β -aminoestrógeno pentolame (1, 10, 100, 1000 mg/kg) sobre el tiempo de tromboplastina parcial activada (TTPa). Cada punto representa el promedio \pm EE de dos experimentos (6 ratas en vehículo y 8 ratas en cada dosis) por duplicado. Prueba Dunnett: * $p < 0.05$ vs vehículo 100%.

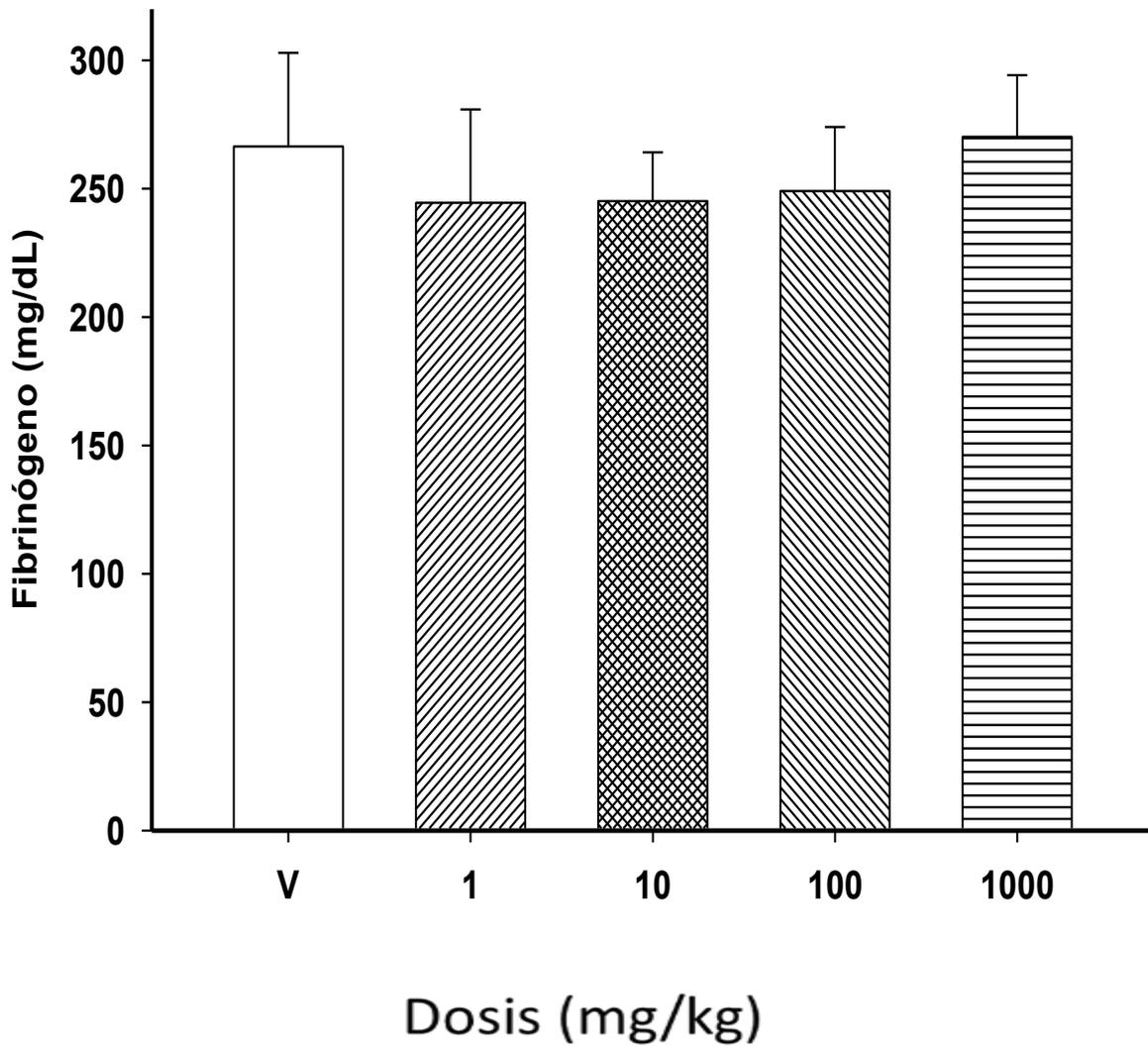


Figura 7: Efecto del 17 β -aminoestrógeno pentolame (1, 10, 100, 1000 mg/kg) sobre la concentración de fibrinógeno (mg/dL). Cada punto representa el promedio \pm EE de dos experimentos (6 ratas en vehículo y 8 ratas en cada dosis) por duplicado. Prueba Dunnett: * $p < 0.05$ vs vehículo 100%.

9.2.4 Efecto del pentolame sobre FVII

Se midió el efecto de pentolame sobre la actividad del Factor VII para evaluar la vía extrínseca. En la Figura 8, el pentolame no disminuyó o aumentó de manera significativa (* $p < 0.05$ vs control).

9.2.5 Efecto del pentolame sobre FX

La vía común de la coagulación se evaluó al medir la actividad del Factor X de los plasmas de las ratas que se les administró diferentes dosis de pentolame, el resultado de la Figura 9 fue la disminución de la actividad del factor en todas las dosis sin embargo no fue significativa (-17, -20, -13, -12%).

9.2.6 Efecto del pentolame sobre FXI

Se eligieron los factores XI y XII para evaluar la vía intrínseca, en la Figura 10, la actividad del factor XI presenta una dispersión muy grande en los valores obtenidos; debido a esto, el aumento que tienen las dosis del pentolame no logra hacer diferencia con el control.

9.2.7 Efecto del pentolame sobre FXII

El pentolame no ejerció efecto sobre el Factor XII (Figura 11) y no se observó ningún cambio significativo en la actividad (* $p > 0.05$ vs control).

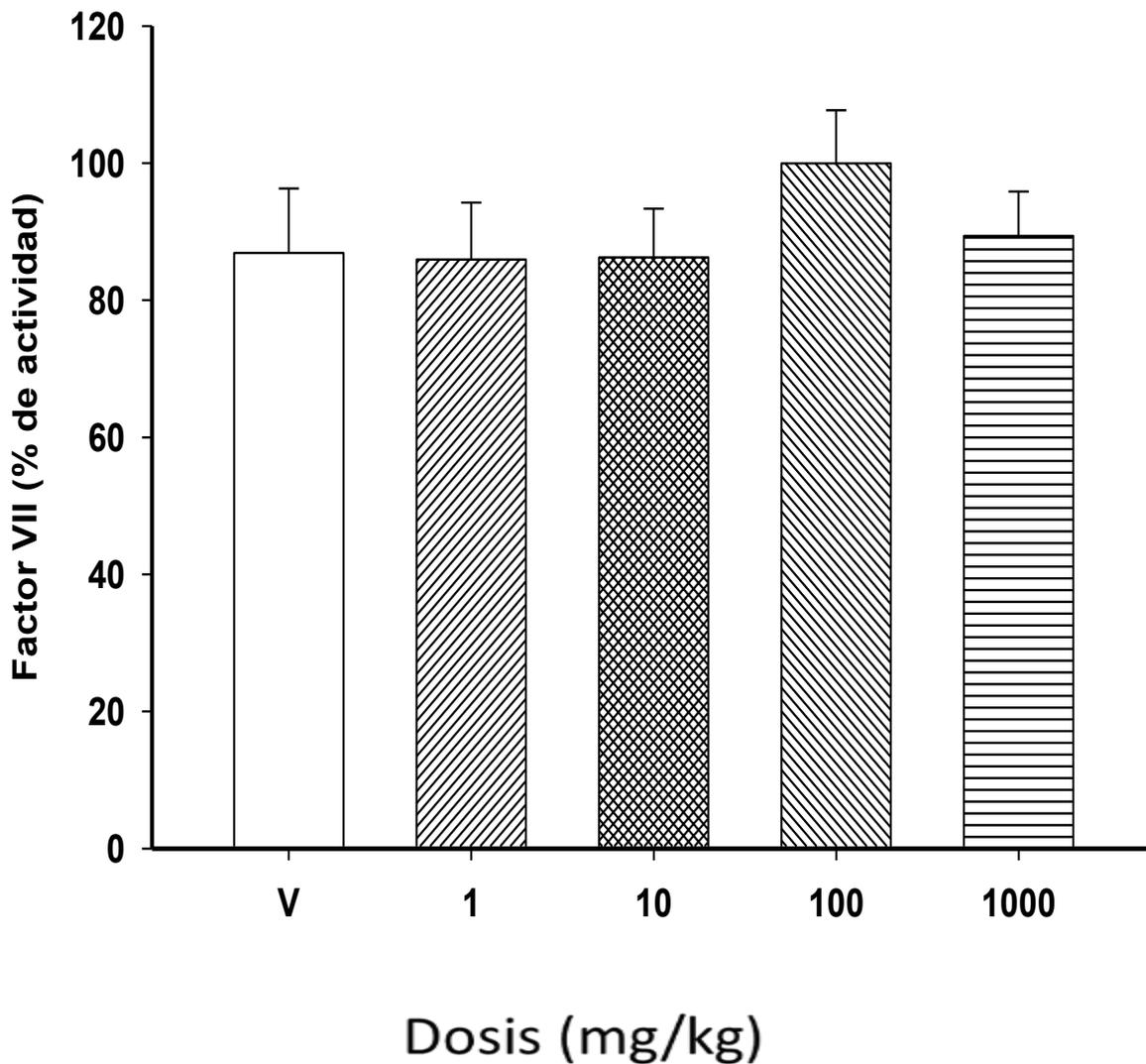


Figura 8: Efecto del 17β -aminoestrógeno pentolame (1, 10, 100, 1000 mg/kg) sobre la actividad del factor VII. Cada punto representa el promedio \pm EE de dos experimentos (6 ratas en vehículo y 8 ratas en cada dosis) por duplicado. Prueba Dunnett: * $p < 0.05$ vs vehículo 100%.

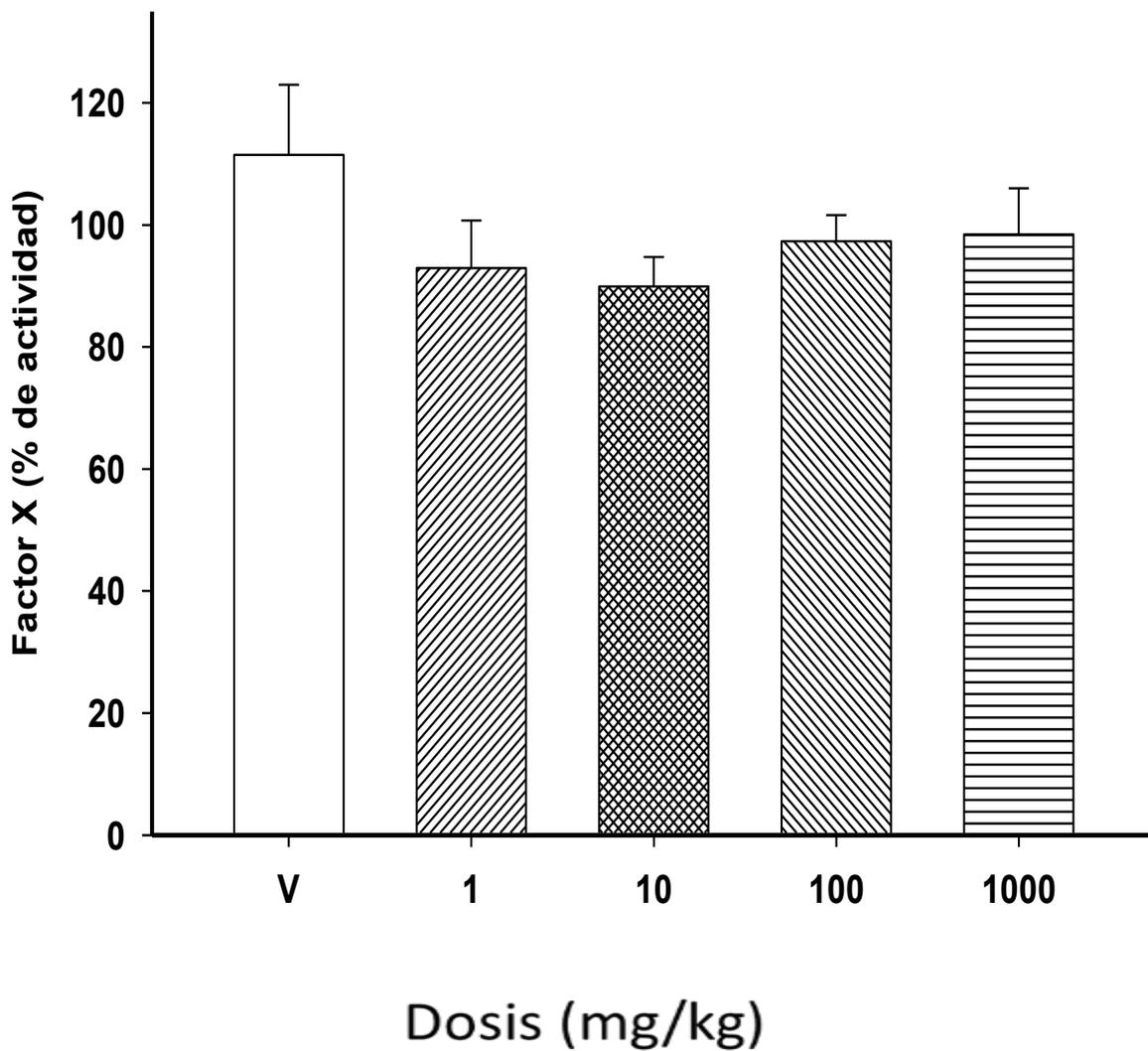


Figura 9: Efecto del 17β-aminoestrógeno pentolame (1, 10, 100, 1000 mg/kg) sobre la actividad del factor X. Cada punto representa el promedio ± EE de dos experimentos (6 ratas en vehículo y 8 ratas en cada dosis) por duplicado. Prueba Dunnett: *p<0.05 vs vehículo 100%.

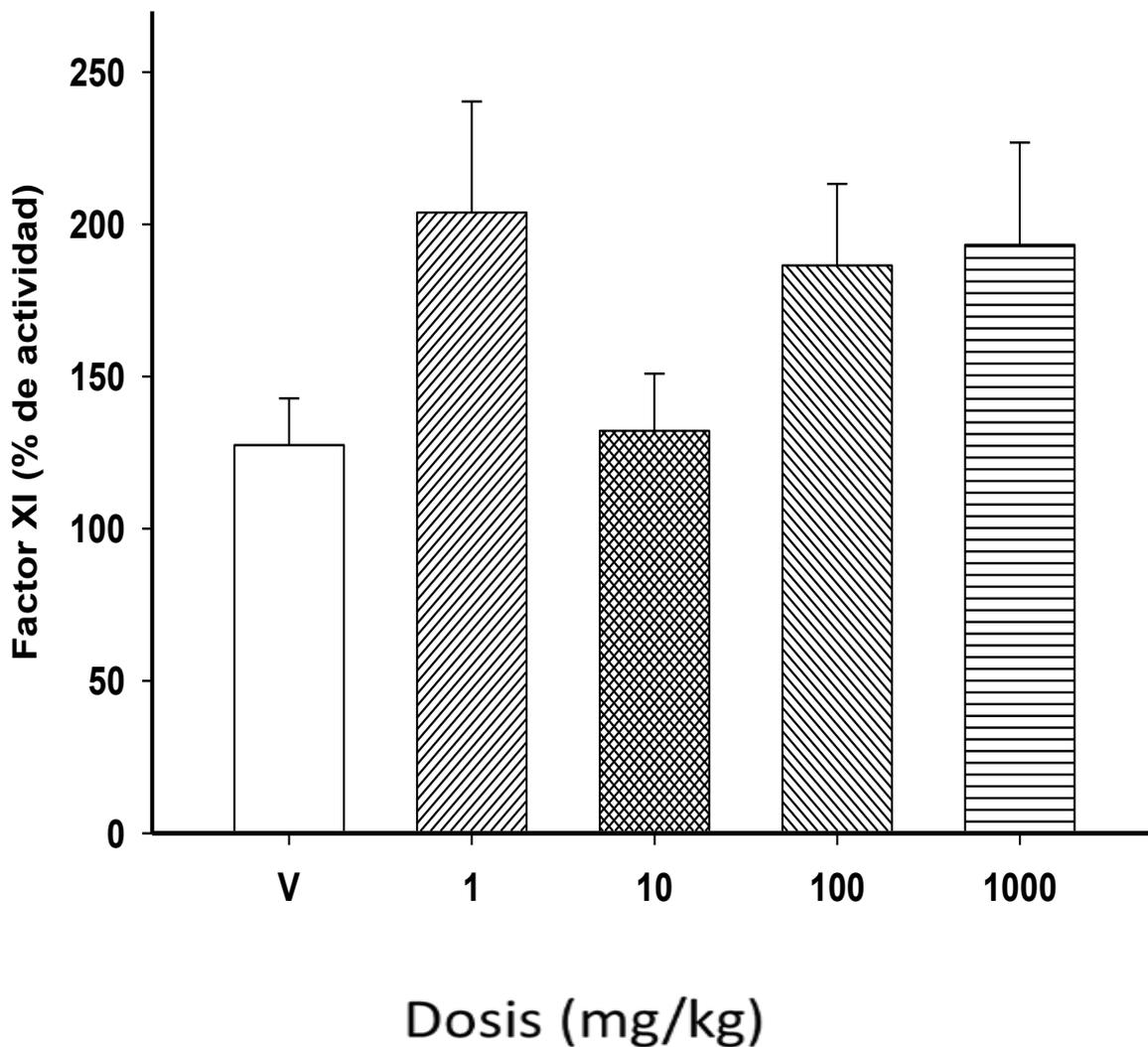


Figura 10: Efecto del 17β -aminoestrógeno pentolame (1, 10, 100, 1000 mg/kg) sobre la actividad del factor XI. Cada punto representa el promedio \pm EE de dos experimentos (6 ratas en vehículo y 8 ratas en cada dosis) por duplicado. Prueba Dunnett: * $p < 0.05$ vs vehículo 100%.

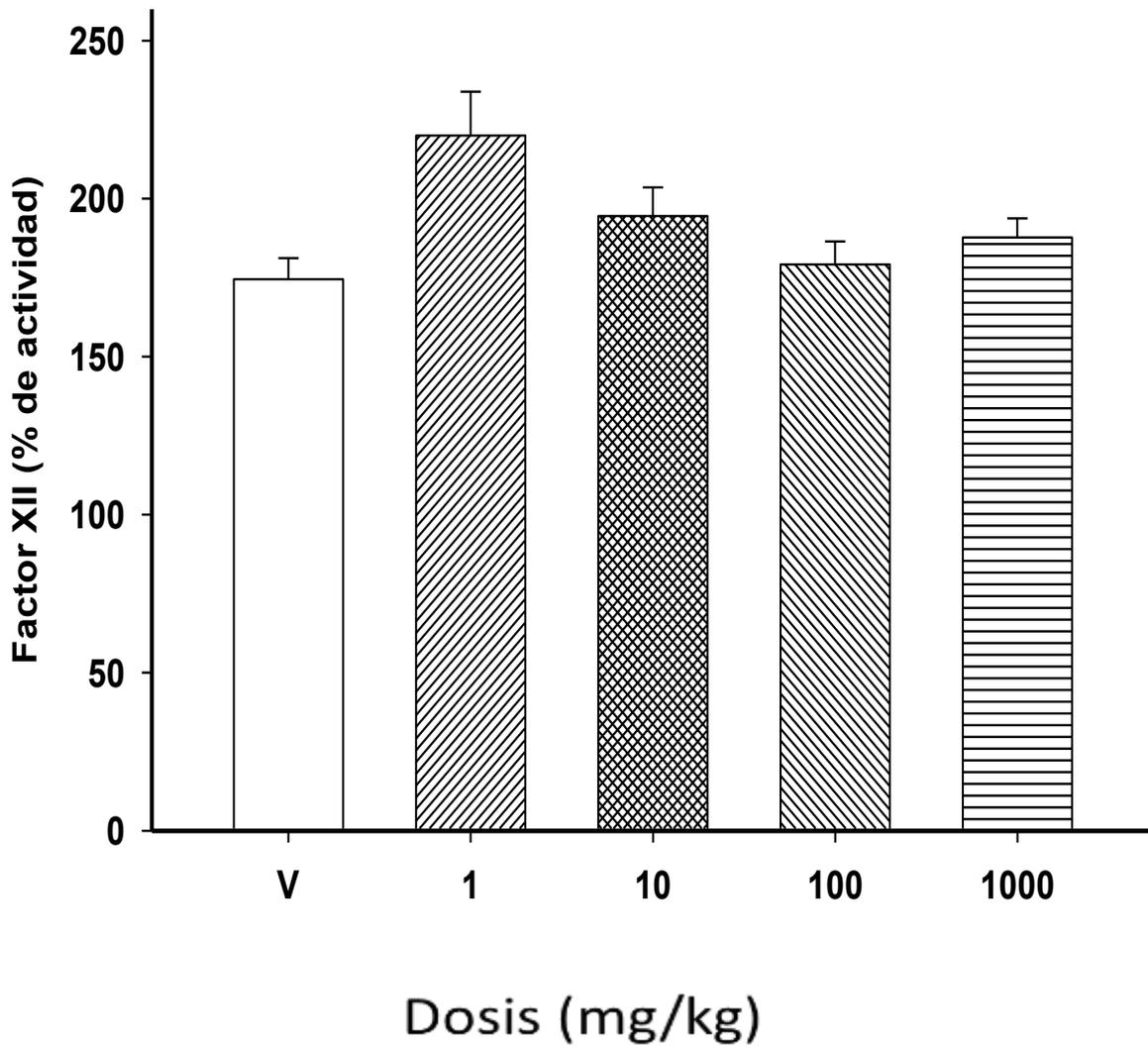


Figura 11: Efecto del 17β -aminoestrógeno pentolame (1, 10, 100, 1000 mg/kg) sobre la actividad del factor XII. Cada punto representa el promedio \pm EE de dos experimentos (6 ratas en vehículo y 8 ratas en cada dosis) por duplicado. Prueba Dunnett: * $p < 0.05$ vs vehículo 100%.

10. DISCUSIÓN

La experimentación que se ha realizado en previos trabajos con los 17 β -aminoestrógenos *in vivo*, han demostrado que estos fármacos semisintéticos tienen efecto estrogénico (Jaimez R. et al, 2000).

El útero posee receptores estrogénicos que se unen a los esteroides gonadales iniciando una respuesta celular que induce el crecimiento del epitelio y estroma endometriales; asimismo, inducen la formación de los receptores de progesterona en la hipófisis anterior (Grossman C, 1985; Mc Donald's L, 2008).

Una prueba para demostrar el efecto estrogénico de un fármaco es revertir el efecto de atrofia inducido por la ovariectomía (Takeyoshi M. et al, 2002).

El efecto estrogénico de los aminoestrógenos es menor en potencia y eficacia comparados con el 17 β -estradiol (Lemini C. et al, 2005). La actividad estrogénica de los 17 β -aminoestrógenos está inversamente relacionada con el número de carbonos en la cadena del grupo alcohol-amino (Jaimez R. et al, 2000; Lemini C. et al, 2005).

En la figura del peso del útero se muestra un aumento significativo con respecto al vehículo, además de que el peso se incrementó conforme se aumenta la dosis de pentolame, al igual que en la literatura el efecto es dosis-dependiente (Lemini C. et al, 2005).

Existen diversos estudios donde el pentolame muestra un efecto opuesto al estradiol en el tiempo de coagulación; mientras el estradiol produce un efecto bifásico durante el paso del tiempo después de la administración, al mismo tiempo se incrementa el efecto del pentolame. El tiempo de coagulación es un parámetro que nos indica la actividad de todos los factores que participan en la cascada de eventos hacia la formación del coagulo (García-Manzano A. et al, 2002; Jaimez R. et al, 2001).

El pentolame aumentó significativamente el tiempo de tromboplastina parcial activada en las dosis 1µg (47%, *p<0.05), 10 µg (45%, *p<0.05), 100 µg (45%, *p<0.05) y al comparar los resultados con el experimento de García-Manzano A. et al (2002) en el cual se administró una alta dosis de pentolame (4mg/100g) a un grupo de ratas macho Wistar durante dos días consecutivos, también se obtuvo un incremento (29%, *p<0.05), lo que significa que esta respuesta podría deberse a un efecto inhibitorio en la vía intrínseca de la coagulación. En este mismo experimento la dosis del pentolame (4mg/100g) logró aumentar el tiempo de tromboplastina un 24% con respecto al vehículo (*p<0.05), en cambio con nuestras dosis (1-1000) µg/kg no se observó ninguna respuesta, con dosis bajas de pentolame la vía extrínseca no se altera. En otro estudio más reciente (Lemini C. et al, 2013) se utilizaron dos dosis altas de 17β-amino-1,3,5(10)estratrien-3-ol (aminoestrol), 4 y 8 mg/100g en ratones macho CD1, ambas dosis aumentaron modestamente los valores de TP (13-15%, p<0.05). Sin embargo la prueba TTPa incremento 33-55% (p<0.05). Lo cual concuerda con nuestro trabajo donde los aminoestrógenos generan un aumento en TTPa y en los resultados de tiempo de protrombina no se observa un cambio considerable, a menos que se utilice una dosis más alta.

El efecto del pentolame sobre el fibrinógeno que se reporta en la literatura es un aumento respecto al vehículo, con una dosis de 4mg/100g donde se observó un incremento muy significativo de 115% (p<0.01 vs vehículo) (García-Manzano A. et al, 2002), mientras que las dosis utilizadas en este trabajo (1-1000) µg/kg no se obtuvo ese cambio significativo, y al contrario, produjo cierta disminución leve respecto al vehículo. En el estudio donde se utilizó el aminoestrol a dosis de 4 y 8 mg/100g se observaron sobre fibrinógeno, incrementos dosis-dependientes de 71 y 107 % respectivamente (p<0.001) (Lemini C. et al, 2013).

Se ha establecido en estudios *in vitro* que la síntesis de fibrinógeno es incrementada por algunas sustancias incluyendo las hormonas (Grieninger G. et al, 1983). La cantidad y la calidad del fibrinógeno alteran varias pruebas de coagulación: TP, TTPa, TT (De Maat M. et al, 1999). Las altas dosis de aminoestrógenos probablemente estimulan la síntesis hepática de fibrinógeno

produciendo altos niveles en ratones y una elevada concentración de fibrinógeno se sugiere que está más asociado con tiempos de coagulación prolongados (Lemini C. et al, 2013).

Los resultados del factor VII no se vieron modificados por el pentolame, todas las dosis son muy parecidas al vehículo. Esta actividad del factor concuerda con la prueba de protrombina, las dosis 1-1000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de pentolame no modifican la vía extrínseca. Por otro lado con los tiempos prolongados en TTPa se esperaba una deficiencia del factor XI, del XII o ambos, sin embargo no sucedió así, del factor XI se obtuvieron resultados muy dispersos e incrementos pero no significativos y la actividad del factor XII de las dosis del pentolame fueron muy parecidas a la actividad del vehículo.

El factor X presentó una ligera disminución en su actividad, pero no tan grande para que sea un cambio significativo, y junto con los resultados de fibrinógeno se puede decir que la vía común de la coagulación no está afectada por dosis bajas de pentolame, solo con dosis altas el aminoestrógeno logra el aumento del fibrinógeno.

11. CONCLUSIONES

- El 17β -aminoestrógeno pentolame produce efectos estrogénicos por el incremento del peso en útero de la rata ovariectomizada.
- El TTPa se incrementa por lo que la vía intrínseca del sistema de coagulación se altera con las dosis de pentolame utilizadas en este trabajo (1-100) $\mu\text{g}/\text{kg}$.
- Las dosis administradas de pentolame no altera las pruebas de coagulometría: TP, fibrinógeno ni los factores específicos evaluados.

12. AGRADECIMIENTOS

A la Doctora Cristina Lemini por proporcionarme el reactivo 17β -aminoestrógeno pentolame para este trabajo.

A la Facultad de Medicina por el presupuesto otorgado y sus instalaciones para realizar la presente tesis experimental.

13. BIBLIOGRAFÍA

- Ávila ME, García SA, Reyes M, Antuna S, Lemini C. (2009). Effect of the 17 β -aminoestrogen pentolame on bone mineral levels in ovariectomized rats. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **52**:43-46.
- Boonie J, Korach S. (2014). Estrogens receptors and human disease. *J.C.I.* **116**: 561-570.
- Canonico M. et al. (2010). Postmenopausal hormone therapy and risk of idiopathic venous throboembolism: results from the E3N cohort study. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **30**: 340-345.
- Clauss A. (1957) Gerinnungsphysiologische schnellmethode zur bestimmung des fibrinogens. *Acta. Hematol.* **17**: 237-240.
- De la Peña A. et al, (1993). Comparative effect of synthetic aminoestrogen with estradiol on platelet aggregation. *Steroids.* **58**: 407-9.
- De Maat M, Lowe G, Haverkate F. (1999). Fibrinogen. In: Jepsen J, Bertina R, Haverkate F, editors. Laboratory techniques in thrombosis: a manual. *Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.* Pág. 79-88.
- Delgado A, Minguillón C, Joglar J. (2004). Introducción a la química terapéutica, Segunda edición. Madrid, España: Ediciones Díaz de Santos. Capítulo 19.
- Finkel R, Michelle A.C. (2009). Farmacología, 4ª ed. España: Lippincott Williams & Wikins, Capítulo 25.
- Flórez J. (2014). Farmacología Humana, 6ª ed. España: Elsevier, Capítulo 51.
- Fox S.I. (2011). Fisiología Humana, 12ª ed. Madrid, España: McGraw-Hill. Capítulo 20.
- García-Manzano A, González-LI J, Jaimez R, Franco Y, Avila M, Rubio-Póo C, Lemini C. (2002). Changes on hemostatic parameters induced by estradiol ethinylestradiol, and the 17 β -aminoestrogen pentolame in the male Wistar rat. *Steroids.* **5697**: 1-7.
- García-M, González-Llaven, Lemini C, Rubio-Póo C. (2001). Standarization of rat of blood clotting tests with reagents used for humans. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **44**: 153-155.
- 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.
- Gordon T, Kanell WB, Hjortland MC, McNamara PM. (1978). Menopause and coronary heart disease. The Framingham study. *Am. Int. Med.* **89**: 157–161.
- Grossman C. (1985). Interactions between the gonadal steroids and the immune system. *Science.* **227**: 257-261.

- Grieninger G, Plant PW, Liang TJ, Kalb RG, Amrani D, Mosesson MW, et al. (1983). Hormonal regulation of fibrinogen synthesis in cultured hepatocytes. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **27**(408):469–89.
- Hayward C. et al, (2000). The roles of gender, the menopause and hormone replacement on cardiovascular function. *Cardiovasc. Res.* **46**:28-49.
- Henderson BE, Paganini-Hill A, Ross RK. (1988). Estrogen replacement therapy and protection from acute myocardial infarction. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **159**:312–7.
- Jaimez R, Cooney A, Jackson K, Lemus AE, Lemini C. (2000). *In vivo* estrogen bioactivities and *in vitro* estrogen receptor binding and transcriptional activities of anticoagulant synthetic 17 β -aminoestrogens. *Steroid. Biochem. Mol. Biol.* **73**: 59-66.
- Jaimez R. (2001) Efectos anticoagulante y estrogénico de los 17 β -aminoestrógenos prolame, butolame y pentolame en la rata ovariectomizada. (Tesis doctoral). Departamento de Farmacología, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Jie C, Shen Y, Li R. (2012). Estrogen synthesis and signaling pathways during aging: from periphery to brain. *Trends. Mol. Med.* **19**:197-209.
- Katzung B. (2013). Farmacología básica y clínica, 12^a ed. México: Mc Graw-Hill, Capítulo 40.
- Lakhani N, Venitz J, Figg W. (2003). Sparreboom A. Pharmacogenetics of estrogen metabolism and transport in relation to cancer. *Curr. Drug. Metab.* **4**: 505–513.
- Lemini C. et al. (1993). Anticoagulant and estrogenic effects of two new 17 β -aminoestrogenos, butolame [17 β -(4-hidroxy-1-butyl-amino)-1,3,5(10)-estratien-3-ol]. *Steroids.* **58**:457-61.
- Lemus AE, Jaimez 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)-estratien-3-ol(pentolame). *Steroids.* **63**:433-438.
- Lemini C, Jaimez R, Toscano R. (2004). Confirmation of the C-17 stereochemistry of Pentolame by single crystal X-ray analysis of its monohydrate. *Rev. Soc. Quim. Méx.* **48**: 249-251.
- Lemini C, Franco Y, Avila ME, Jaimez R. (2005). Contrasting effects of estradiol and 17 β -aminoestrogens on blood clotting time in rats and mice. *Eur. J. Pharmacol.* **510**: 229-233.
- Lemini C, Rubio-Póo C, Franco Y, Jaimez R, Ávila ME, Medina M, Lemus AE. (2013). In vivo profile of the anticoagulant effect of 17 β -amino-1,3,5(10)estratien-3-ol. *Eur. J. Pharmacol.* **700**: 210-216.
- Limón D, Díaz A, Hernández M, Fernández-G J, Torres-Martínez A, Pérez-Severiano F, Rendón-Huerta E, Montaña L, Guevara J. (2012). Neuroprotective effect of the aminoestrogen prolame against impairment of learning and memory skills in rats injected with amyloid- β -25-35 into the hippocampus. *Eur. J. Pharmacol.* **685**: 74-80.
- Lorenzo P, Moreno A. Farmacología básica y clínica/ Velázquez, 17^o ed. Buenos Aires, Madrid Panamericana, 2004, pág. 637-652.

- Mc Donald L, Pineda M. (2008). Veterinary endocrinology and reproduction. Quinta edición. Lea & Febiger. Philadelphia, USA.
- Melmed S, Polonsky K, Larsen P, Kronenberg H. (2011). Williams Textbook of Endocrinology, 12° ed., Saunders press, Philadelphia, PA. Pág. 599–602.
- Mendoza N. (2008). Farmacología médica, México: Médica Panamericana, pág 409-417.
- National Institutes of Health (NIH). Recuperado el 2 de marzo de 2004 de: <https://www.nhlbi.nih.gov/news/press-releases/2004/nih-asks-participants-in-womens-health-initiative-estrogen-alone-study-to-stop-study-pills-begin-follow-up-phase.html>
- Nissen I, Estrada F.S, Nava-Kopp A, Irlles C, De la Peña A, Fernández-G J, Govezensky T, Zhang L. (2012). Prolame ameliorates anxiety and spatial learning and memory impairment induced by ovariectomy in rats. *Physiol. Beh.* **106**: 278-284.
- Noriega-Reyes M, Langley E. (2008). Correguladores del receptor de estrógenos y su implicación en el cáncer mamario. *Cancerología* **3**: 29-40.
- Novella S., Heras M., Hermenegildo, Dantas A. (2012). Effects of estrogen on vascular inflammation a matter of timing. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **32**: 2035-2042.
- Proctor R, Rapaport SI. The partial thromboplastin time with kaolin. A simple screening test for first stage plasma clotting factor deficiencies. *Am. J. Clin. Pathol.* **36**:212-219.
- Quick A. Letter. Normal values for coagulation test. *N. Engl. J. Med.* **290**:751.
- Rang H.P, Dale P.P. Farmacología, 7ª ed. Madrid, España: Elsevier Science, 2012.
- Rosendaal F., Helmerhorst F., Vandenbroucke J. (2001). Oral contraceptives, hormone replacement therapy and thrombosis. *Thromb. Haemost.* **86**: 112-123.
- Rossouw J.E. et al. (2002). Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA.* **288**:321–333.
- Rubio-Póo C, Lemini C, Silva G, Chavez-Lara B, Mendoza-Patiño N, Ortiz R, et al. (1993). Effects of 17 β -(N,N-diethylaminoethyl)amino-1,3,5(10)-estratrien-3-ol, and its androtane analog on blood clotting time. *Med. Chem. Res.* **7**:67-75.
- Rubio-Póo C, Silva G, Jaimez R, y Lemini C. (1998). Seasonal variations in blood clotting time in mice treated with an anticoagulant aminoestrogen. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **41**: 179-182.
- Takeyoshi M, Sawaki M, Noda S, Muroi T, Yamasaki K. (2002). Effect of gonadotropin-releasing hormone antagonist on ovarian and uterine weights in immature female rats. *Reproduc. Toxicol.* **16**: 367-369.

14. ANEXO I

CURVAS DE CALIBRACIÓN PARA LA DETERMINACIÓN DE LA ACTIVIDAD DE LOS FACTORES DE COAGULACIÓN.

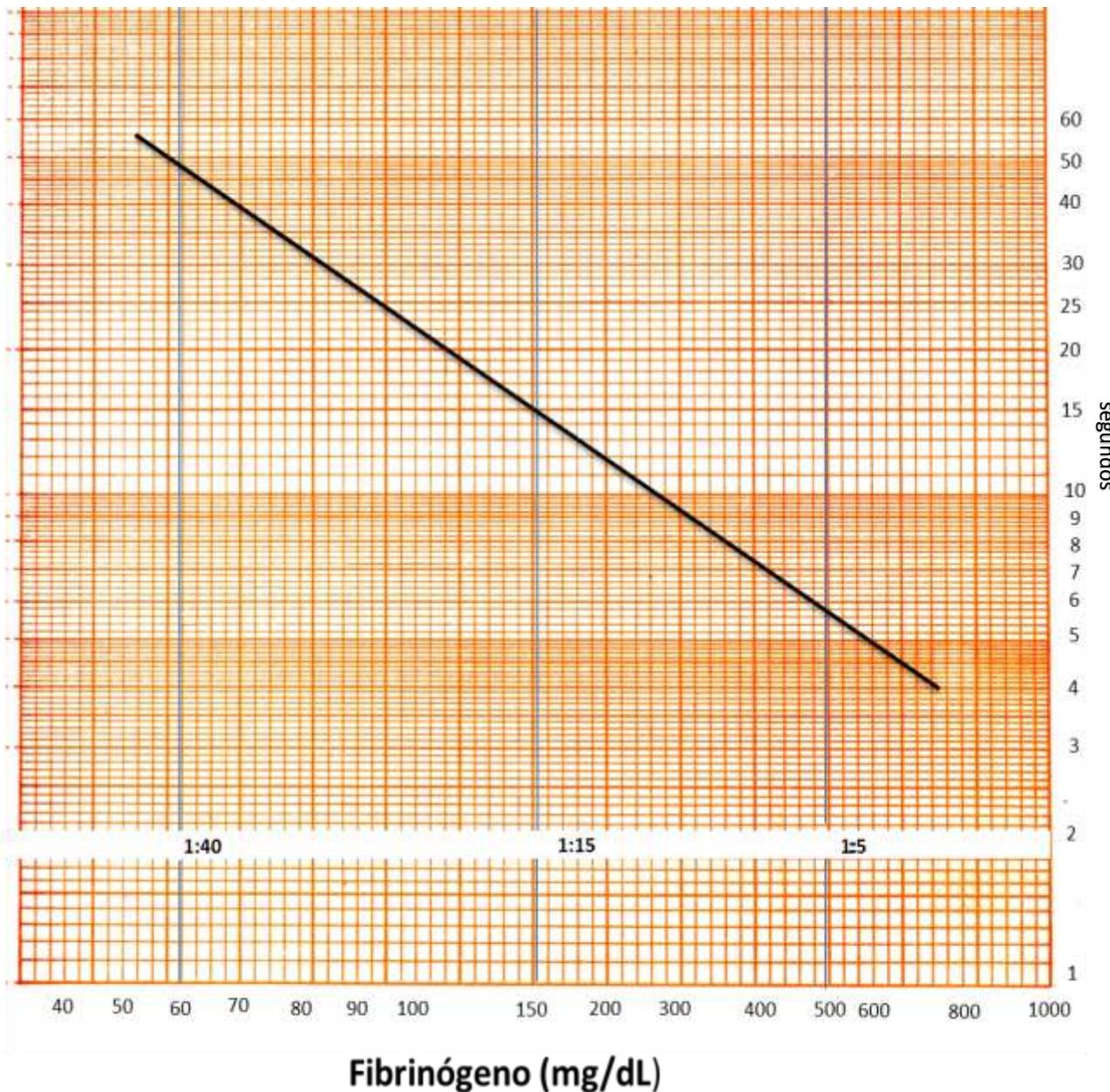


Figura 12. Estandarización de fibrinógeno en plasma estándar, diluciones de 1:5, 1:15 y 1:40. Cada punto representa el promedio de al menos 5 ratas macho sin tratamiento por triplicado. Basado en el Método Clauss.

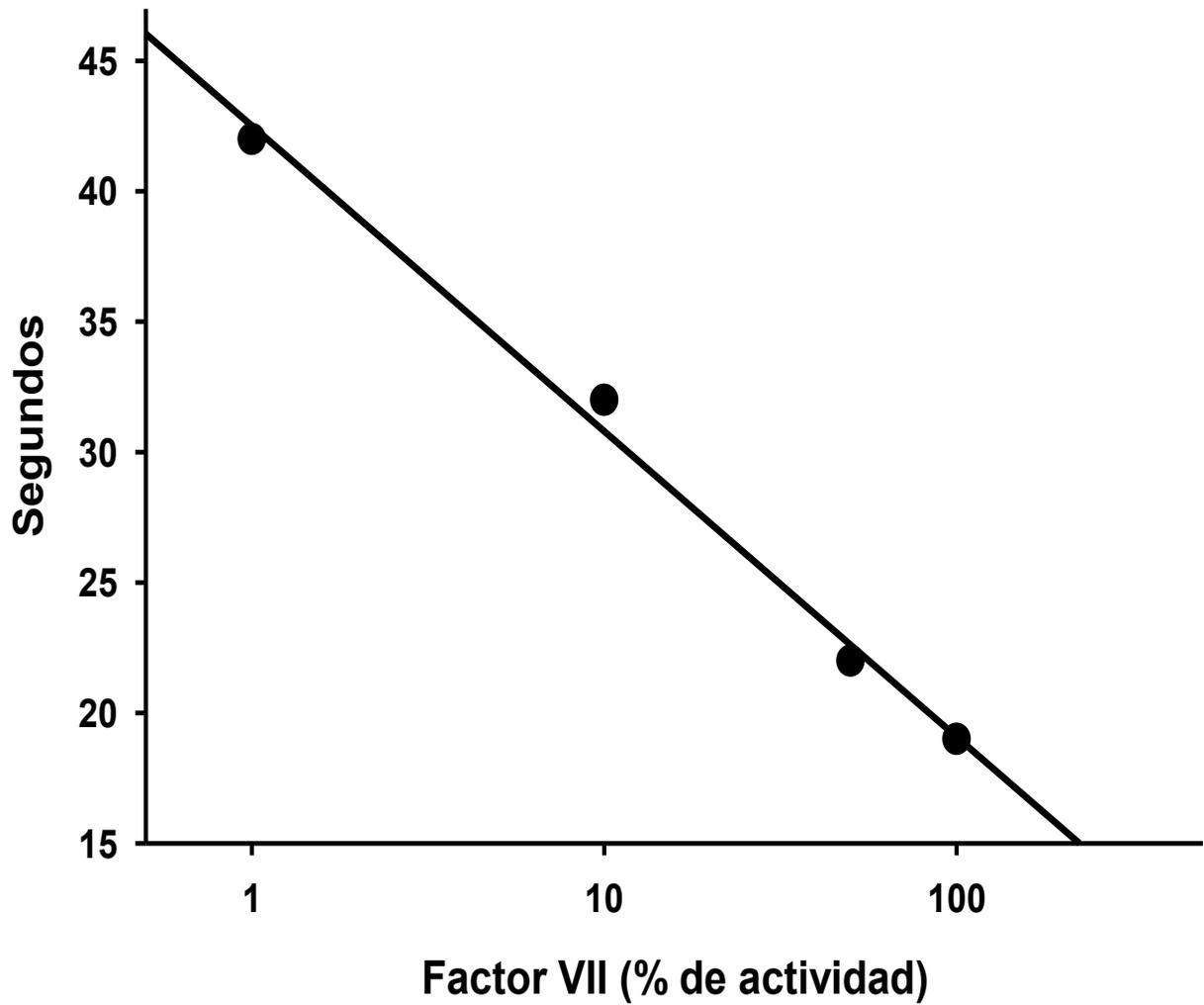


Figura 13. Estandarización del FVII en plasma de rata Wistar macho, diluciones de 1:20, 1:40, 1:200 y 1:2000. Cada punto representa el promedio de al menos 5 ratas macho sin tratamiento por triplicado. $R^2=0.99$.

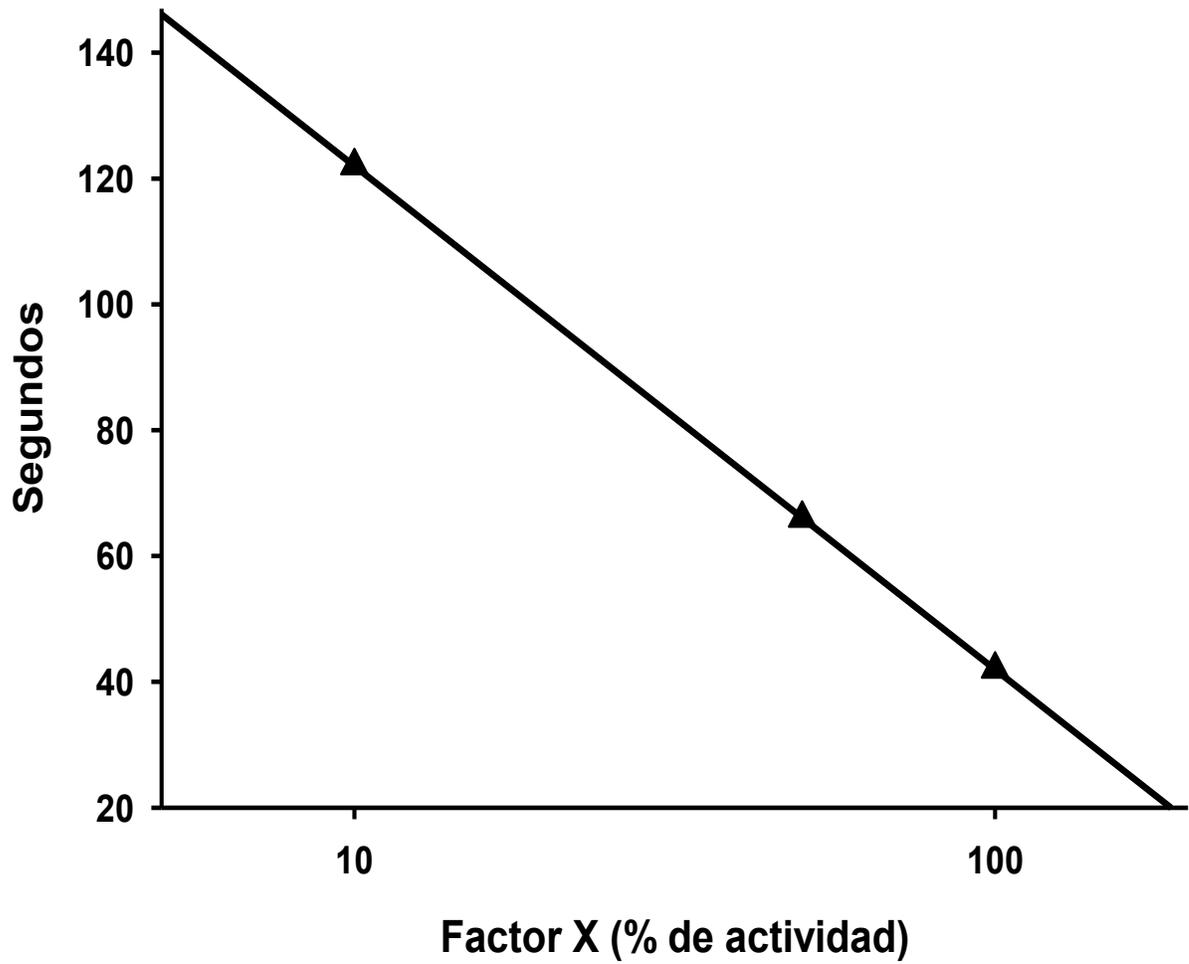


Figura 14. Estandarización del FX en plasma de rata Wistar macho, diluciones de 1:20, 1:40, 1:200 y 1:2000. Cada punto representa el promedio de al menos 5 ratas macho sin tratamiento por triplicado. $R^2=0.99$.

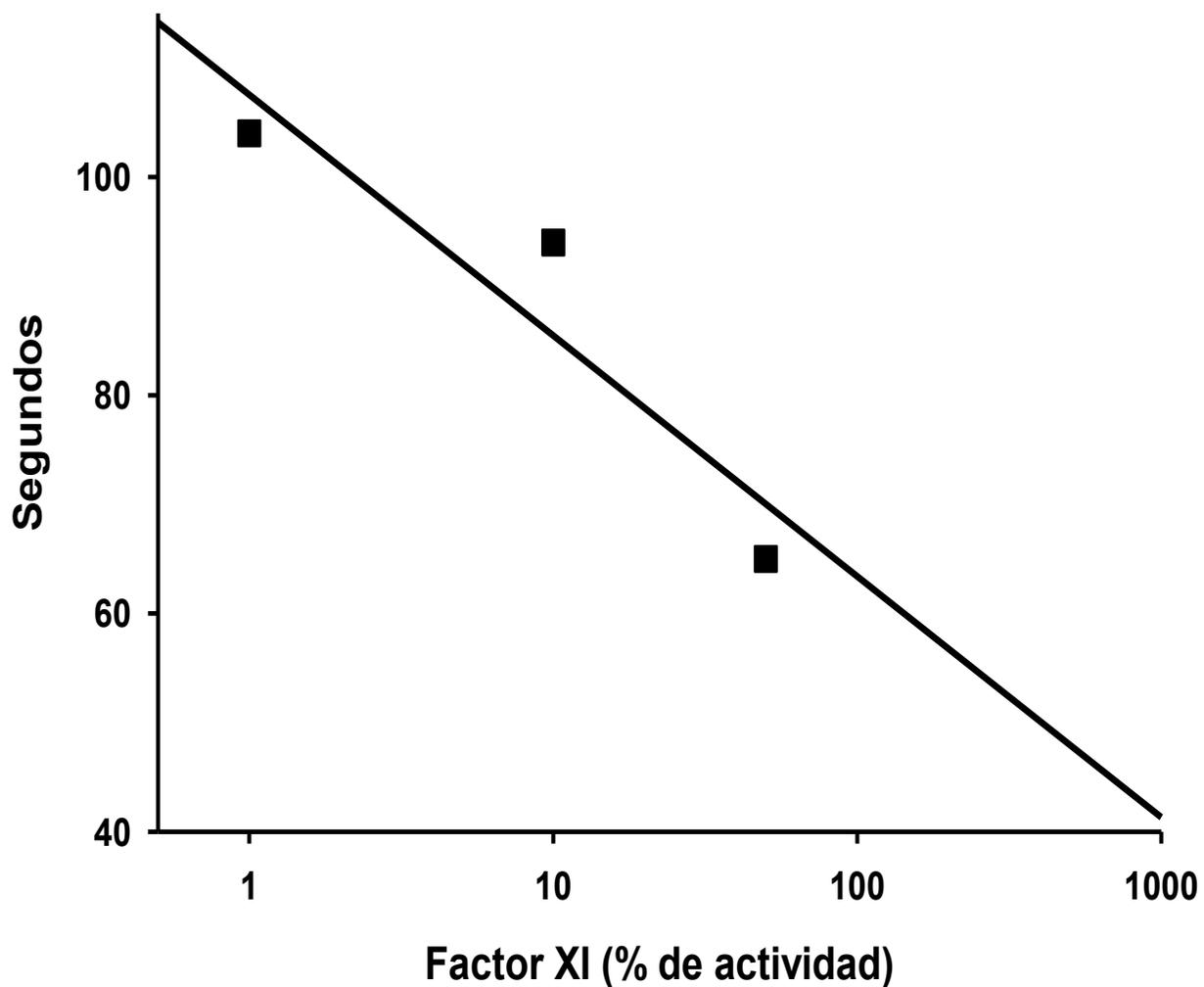


Figura 15. Estandarización del FXI en plasma de rata Wistar macho, diluciones de 1:5, 1:10, 1:50 y 1:500. Cada punto representa el promedio de al menos 5 ratas macho sin tratamiento por triplicado. $R^2=0.86$.

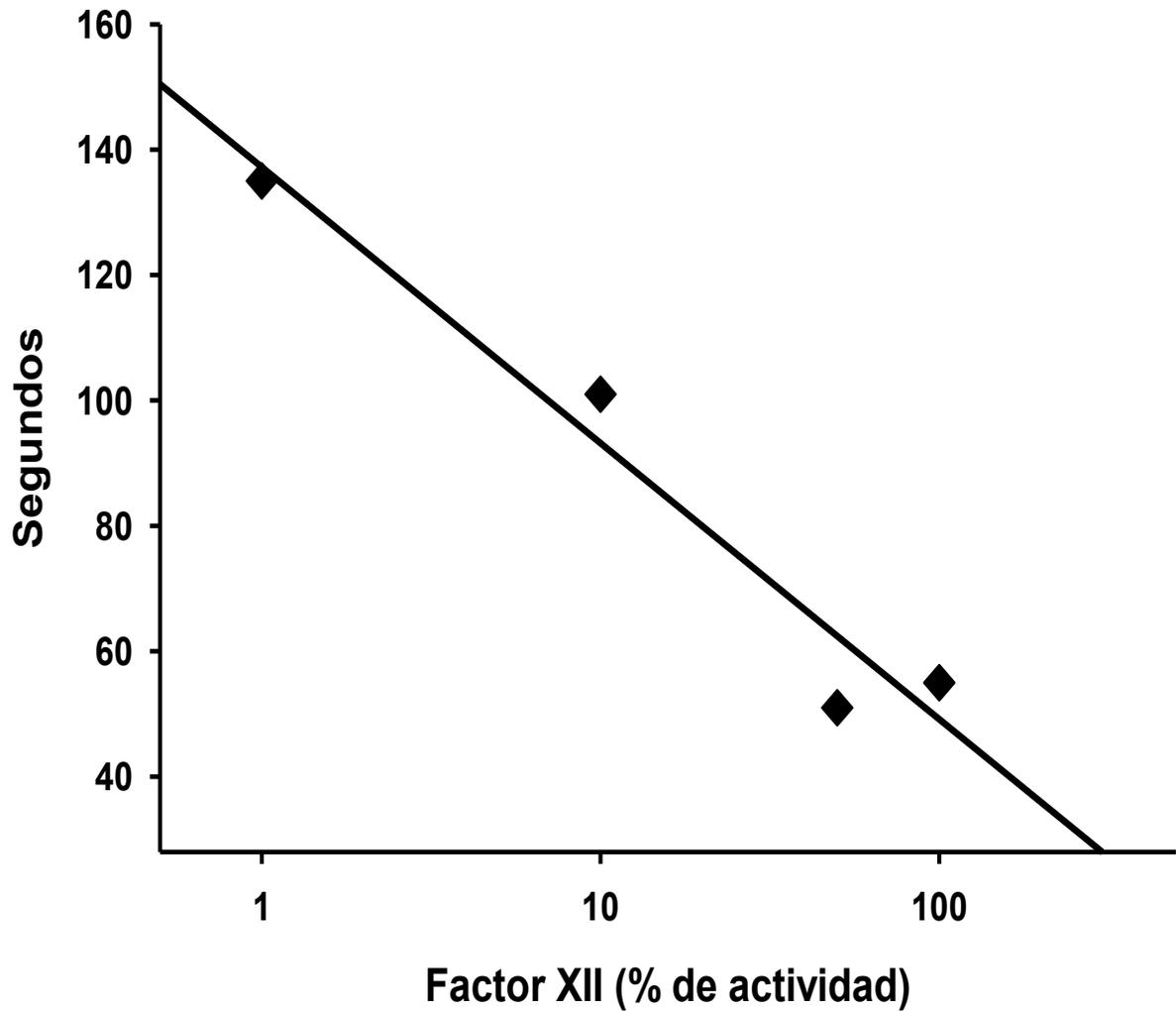


Figura 17. Estandarización del FXII en plasma de rata Wistar macho, diluciones de 1:5, 1:10, 1:50 y 1:500. Cada punto representa el promedio de al menos 5 ratas macho sin tratamiento por triplicado. $R^2=0.95$

15. ANEXO II
Asistencia a Congreso



XXXVI Congreso Nacional de Farmacología
XII Congreso de Investigación en Medicina de la ESM-IPN
XVI Congreso Estudiantil de Farmacología en honor al Dr. Sergio Estrada Parra
Dra. Rosa Amalia Bobadilla Lugo, Presidenta Honoraria del Congreso



Otorga constancia a:

Bony Betsy Cisneros Gámez, Fabiola Monroy Villaseñor, Denys Alva Chavarría, Cristina Lemini Guzmán, Ruth Jaimez Melgoza



Por su participación como PONENTE(S) DEL CARTEL TITULADO:

**EVALUACION DEL EFECTO DEL 17 β -AMINOESTRÓGENO PENTOLAME
SOBRE FIBRINOGENO Y TNF-ALFA EN RATAS WISTAR OVRIECTOMIZADAS
MEDIANTE ELISA**



*Unidad Politécnica para el Desarrollo Empresarial y para la Competitividad del IPN
y Centro General de Formación e Innovación Educativo del IPN
Ciudad de México, D. F., del 12 al 14 de mayo de 2014.
Por el Comité Organizador*

Dr. José Miguel Cervantes Alfaro
Presidente de la Asociación Mexicana de Farmacología A. C.

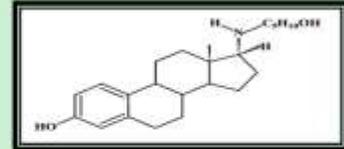


EVALUACIÓN DEL EFECTO DEL 17β-AMINOESTRÓGENO PENTOLAME SOBRE FIBRINÓGENO Y TNF-ALFA EN RATAS WISTAR OVARIECTOMIZADAS MEDIANTE ELISA.

Bony Betsy Cisneros-Gómez¹, Fabiola Monroy-Villaseñor², Denys Alva-Chavarría¹, Cristina Lemini¹, Ruth Jaimes¹
 1. Departamento de Farmacología. Facultad de Medicina. UNAM.
 2. Biología Experimental. UAM-Iztapalapa.

INTRODUCCIÓN

El **Pentolame** es un 17β-aminoestrógeno, semisintético de interés farmacológico con potencial terapéutico, posee actividad anticoagulante y estrogénica moderada.



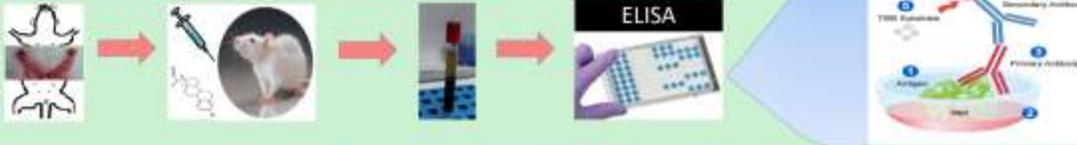
HIPÓTESIS

El pentolame produce efectos sobre la respuesta inflamatoria.

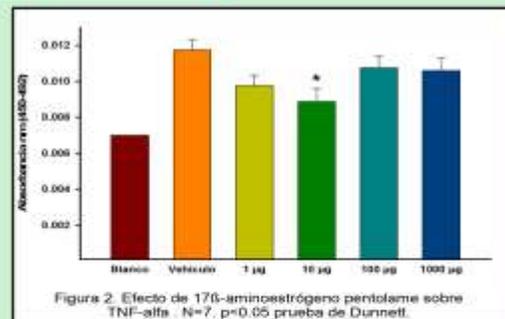
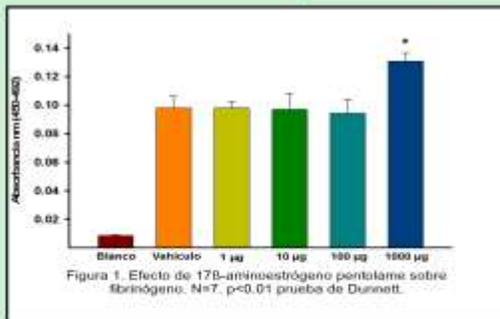
OBJETIVO

Evaluar el efecto del pentolame sobre fibrinógeno y TNF-alfa en rata Wistar ovariectomizada.

METODOLOGÍA



RESULTADOS



La administración de pentolame produjo un aumento significativo del fibrinógeno del 32% en la dosis de 1mg/kg, mientras que observamos una disminución de TNF-alfa de -17, -25, -18 y -10% en todas las dosis evaluadas.

CONCLUSIONES

El pentolame aumenta los niveles de fibrinógeno de manera independiente del efecto que produce en el marcador de inflamación el TNF-alfa.

BIBLIOGRAFÍA

Lopez C et al. In vivo profile of the anticoagulant effect of 17β-amino-1,3,20(10)-estratrien-3-ol. *European Journal of Pharmacology* (2013).
 González G et al. The antithrombotic effect of the oestrogen prolame (9α-(3-hydroxy-1,3,5(10)-estratrien-17β-yl)-3-hydroxypropylsterine) is linked to an increase in nitric oxide production by platelets and endothelial cells. *Atherosclerosis* 208 (2010).
 García-Morales A et al. Changes haemostatic parameters induced by 17β-estradiol, ethinyl-estradiol, and the 17β-aminoestrogen pentolame in the male Wistar rat. *Steroids* 57 (2002).

Agradecimientos:
 Facultad de Medicina, UNAM.