



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA



EXAMENES PROFESIONALES  
FAC. DE QUIMICA

SINTESIS Y EVALUACION DE LOS EFECTOS  
ANTICOAGULANTES Y ESTROGENICOS DE  
CLORHIDRATOS DE 17 $\beta$ -AMINOESTROGENOS.

T E S I S  
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA  
P R E S E N T A :  
GUZMAN LEON GABRIELA

ASESOR: M. EN C. CRISTINA LEMINI GUZMAN.



TESIS CON  
FALLA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

263165

1998.

1



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:**

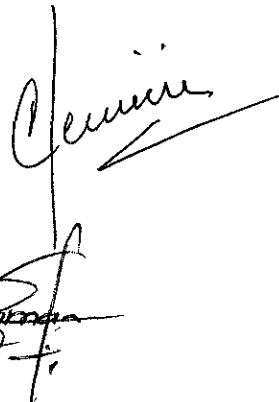
**Presidente:** Prof. SILVA LEAL GRISELDA  
**Vocal:** Prof. PAEZ AGUIRRE ROSA MARIA  
**Secretario:** Prof. LEMINI GUZMAN CRISTINA  
**1er.suplente:** Prof. PEREZ SEVERIANO FRANCISCA  
**2do.suplente:** Prof. PONCE MONTER HECTOR ANTONIO

**FACULTAD DE MEDICINA.**

**DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGIA. Edificio A 6° Piso**

**Asesor:** M. en C. CRISTINA LEMINI GUZMAN

**Sustentante:** GUZMAN LEON GABRIELA

The image shows two handwritten signatures in black ink. The top signature is for Cristina Lemini Guzman, written in a cursive style. The bottom signature is for Gabriela Leon Guzman, also in a cursive style. Both signatures are positioned to the right of their respective names in the text above.

## CONTENIDO

**I.- RESUMEN**

**II.- INTRODUCCION**

1. Antecedentes
2. Justificación
3. Objetivos.

**III.- PARTE EXPERIMENTAL**

1. Métodos químicos
2. Métodos farmacológicos

**IV.- RESULTADOS Y DISCUSION.**

- 1.- Síntesis de clorhidratos de  $17\beta$ -aminoestrógenos
- 2.- Evaluación farmacológica de clorhidratos de  $17\beta$ -aminoestrógenos
  - 2.1.- Efectos sobre la coagulación sanguínea del ratón
  - 2.2.- Actividad estrogénica.

**V.- CONCLUSIONES**

**VI.- ESPECTROS**

**VII.- BIBLIOGRAFIA**

## I. RESUMEN

Dentro del programa síntesis y evaluación biológica de efectos de esteroides es de particular interés evaluar los efectos producidos por los estrógenos. Este grupo de esteroides están involucrados en la diferenciación, el mantenimiento de las características sexuales y la reproducción, actuando a través de mecanismos genómicos en los que regulan la transcripción y la proliferación celular y efectos que implican una acción a nivel membranal que se produce en un periodo corto y que son de latencia muy breve.

Los estrógenos se utilizan frecuentemente como componentes de anticonceptivos orales, en la terapia sustitutiva, así como agentes antitumorales en el tratamiento de cáncer prostático. Sin embargo, se ha señalado que su uso puede aumentar el riesgo de trombosis venosa y arterial así como la posibilidad de infarto al miocardio. Estos efectos adversos se han relacionado con la dosis administrada y la potencia estrogénica.

Estudios experimentales, han descrito que la administración de dosis grandes de estrógenos naturales y sintéticos producen efectos bifásicos y procoagulantes en la coagulación sanguínea de los roedores. En contraste con estas observaciones se ha descrito que los  $17\beta$ -aminoestrógenos producen efectos anticoagulantes de duración prolongada. Trabajos recientes, señalan que solo los  $17\beta$ -aminoestrógenos producen actividad anticoagulante en roedores y no otros esteroides con grupos amino en el C17 mostrando selectividad en su acción.

La obtención y evaluación biológica de nuevos  $17\beta$ -aminoestrógenos es de interés para llevar a cabo estudios de relación estructura química-actividad-biológica que permitan la proposición de estructuras nuevas para la obtención de fármacos más selectivos y eficaces que puedan ser utilizados como estrógenos alternativos sin producir efectos trombogénicos.

Los objetivos de este trabajo fueron: 1) La preparación de los amino-estrógenos análogos de  $17\beta$  estradiol: clorhidrato de  $17\beta$ -(5-Hidroxi-1-pentilamino)-1,3,5,(10)-estratrien-3-ol, diclorhidrato  $17\beta$ -(N-N'dietilaminoetil)-amino-3,5(10)-estratrien-3-ol y diclorhidrato  $17\beta$ -(N-N'dietilaminoetil)-amino-3,5(10)-estratrien-3-metil éter. 2) Evaluar la actividad biológica de los clorhidratos mencionados anteriormente, sobre la coagulación sanguínea y su efecto estrogénico en el ratón CD1.

## II. INTRODUCCION

### 1. Antecedentes.

Los compuestos descritos como esteroides están ampliamente distribuidos en el reino vegetal y animal e incluyen: esteroleos, ácidos biliares, agliconas cardiotónicas, sapogeninas, alcaloides esteroidales, provitamina D<sub>3</sub> y hormonas esteroidales (1).

El término "hormona" (del griego *hormao*, excitar), fué dado por Starling en 1905 para nombrar a los agentes químicos producidos por las glándulas de secreción interna que son liberados a la circulación para regular los procesos metabólicos de diversas células. Estos producen su efecto a un punto distante de su fuente de producción (1).

Las hormonas esteroidales comprenden: estrógenos, andrógenos, progestágenos, mineralocorticoides y glucocorticoides. Los tres primeros son frecuentemente llamados "hormonas sexuales" cuya función principal es el desarrollo y mantenimiento de las características sexuales y la reproducción. Los glucocorticoides y mineralocorticoides, se asocian con el metabolismo de carbohidratos y de iones inorgánicos respectivamente (2).

Los estrógenos son esteroides C-18 que difieren de los andrógenos en que carecen del grupo metilo en C-10 y en contraste con todos los otros esteroides su anillo A es aromático, lo cual es una característica importante para la actividad estrogénica. Se producen en las células de la granulosa de los folículos ováricos, cuerpo lúteo y placenta y en pequeñas cantidades, por la corteza suprarrenal y los testículos. Están involucrados en la diferenciación, el mantenimiento de las características sexuales y la reproducción, actuando a través de mecanismos

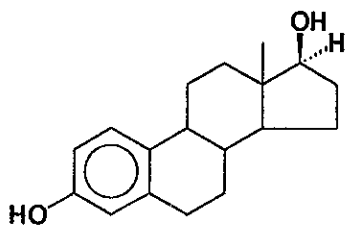
genómicos en los que regulan la transcripción y la proliferación celular. También pueden actuar a nivel membranal produciendo efectos no genómicos que se observan en un período corto y que son de latencia muy breve (3).

Los estrógenos que se producen en mayor cantidad en el humano son: estradiol, estrona, y estriol (Figura 1). El estradiol es el principal producto de secreción del ovario durante la primera parte del ciclo menstrual. Después de la ovulación, estrógenos y progestágenos son sintetizados por las células de la granulosa y el cuerpo amarillo. El estriol es el principal producto metabólico del estradiol y se produce en grandes cantidades en la placenta durante el embarazo (2, 3).

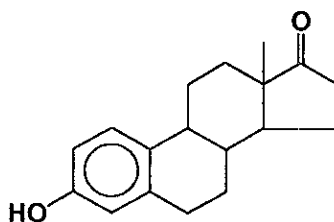
Las hormonas estrogénicas son los principales agentes responsables de los cambios que ocurren en la pubertad en las niñas y el mantenimiento de las características sexuales en la mujer adulta. En la pubertad estimulan el desarrollo de la vagina, útero y trompas de falopio, producen crecimiento de los conductos en las glándulas mamarias, son responsables del crecimiento acelerado y del cierre de las epífisis de los huesos largos. Actúan junto con los progestágenos produciendo los cambios en los órganos genitales que tienen lugar durante el ciclo menstrual y el embarazo (2, 3).

El principal uso terapéutico de los estrógenos es como componentes de anticonceptivos orales, en terapia sustitutiva en la menopausia. También son útiles para el tratamiento del acné, hirsutismo, la osteoporosis senil, y la supresión de la lactancia después el parto y como agentes antitumorales en el cáncer prostático (1-3). Sin embargo, se ha señalado que su uso, en forma prolongada, puede aumentar el riesgo de trombosis venosa y arterial y la posibilidad de infarto al miocardio. Estos efectos adversos se han asociado con la dosis administrada y la potencia estrogénica (4-18).

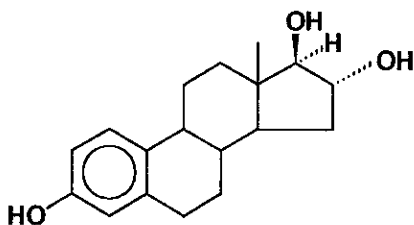




**Estradiol**



**Estrona**



**Estriol**

**FIGURA 1: Hormonas estrogénicas que se producen en mayor proporción en el humano.**

Estudios clínicos y experimentales han señalado que los estrógenos favorecen la coagulabilidad sanguínea, ya que producen aumento en las concentraciones circulantes de los factores de coagulación II, VII, IX, y X (10, 14). También producen aumentos en la concentración de fibrinógeno (11), de plasminógeno (17) y aumento en la actividad fibrinolítica (13,16). Factores asociados con efectos trombogénicos. Además pueden producir disminución del tono vascular favoreciendo la estasis y retardar el flujo sanguíneo factores que favorecen la trombosis (18).

La administración intraperitoneal de dosis grandes de estrógenos producen efectos bifásicos sobre la coagulación sanguínea en roedores (19). En la primera fase se observa un efecto anticoagulante de duración breve (3-7.5 horas) seguida de la fase de hipercoagulabilidad de mayor duración (varios días). Si la administración se lleva a cabo por vía subcutánea solo se observa el efecto hipercoagulante.

En contraste con los efectos descritos anteriormente, Rubio y cols. (20) encontraron que compuestos semejantes al estradiol en los que el hidroxilo en la posición 17 $\beta$  se sustituye por un grupo amino monosustituído, producen en roedores efectos anticoagulantes dosis-dependientes y de duración prolongada (21-24).

Los efectos anticoagulantes de los 17 $\beta$ -aminoestrógenos son selectivos, estudios en los que se han comparado 17 $\beta$ -aminoestrógenos y 17 $\beta$ -aminoandrógenos con el mismo sustituyente en C-17 han mostrado que los últimos no son capaces de producir efectos anticoagulantes en roedores (25).

## 2. Justificación

Uno de los problemas que se presentan cuando se evalúan los efectos que producen los esteroides, en sistemas biológicos *in vivo* o *in vitro* es su alta liposolubilidad. Cuando los 17 $\beta$ -aminoestrógenos se administran en dosis altas su solubilidad es baja, esto dificulta su absorción y la evaluación de sus efectos biológicos. Estos compuestos tienen características básicas y su solubilidad en agua puede aumentarse mediante la preparación de sus clorhidratos. La formación de clorhidratos de 17  $\beta$ -aminoestrógenos facilita su administración.

Los 17 $\beta$ -aminoestrógenos producen efectos anticoagulantes en los roedores sin embargo, sus clorhidratos no han sido evaluados y se desconoce la influencia de este cambio de las propiedades fisicoquímicas del fármaco sobre la actividad biológica señalada.

Con este fin se prepararon: el clorhidrato de 17 $\beta$ -(5-Hidroxi-1-pentilamino)-1,3,5,(10)-estratrien-3-ol (**4a**), el diclorhidrato 17 $\beta$ -(N-N'dietilaminoetil)-amino-3,5(10)-estratrien-3-ol (**4b**)( Figura 2).

Por otra parte con el objeto de conocer el papel que desempeña el hidroxilo en posición 3 del anillo aromático del estrógeno sobre la actividad anticoagulante, se preparó el derivado metilado de **4b**, el diclorhidrato 17 $\beta$ -(N-N'dietilaminoetil)-amino-3,5(10)-estratrien-3-metil éter (**4c**).

Los clorhidratos de los 17  $\beta$ -aminoestrógenos posiblemente conserven sus efectos anticoagulantes y estrogénicos, sin embargo por ser compuestos ionizados se infiere que este efecto podría ser de menor magnitud que el observado en los compuestos **3a** y **3b**.

### 3. Objetivos.

1. Llevar a cabo la síntesis de amino-estrógenos análogos de  $17\beta$  estradiol: clorhidrato de  $17\beta$ -(5-Hidroxi-1-pentilamino)-1,3,5,(10)-estratrien-3-ol (**4a**), diclorhidrato  $17\beta$ -(N-N'dietilaminoetil)-amino-3,5(10)-estratrien-3-ol (**4b**) y diclorhidrato  $17\beta$ -(N-N'dietilaminoetil)-amino-3,5(10)-estratrien-3-metil éter (**4c**), que se muestran en la figura 2.
2. Evaluar la actividad biológica de los clorhidratos **4a**, **4b** y **4c** comparando sus efectos sobre la coagulación sanguínea en el ratón CD1 con el producido por sus bases libres **3a**, **3b** y **3c**.
3. Evaluar el efecto estrogénico de los clorhidratos **4a**, **4b** y **4c** en ratón hembra adulta ovariectomizada y ratón hembra infantil CD1, comparando sus efectos con los producidos por el  $17\beta$ -estradiol.

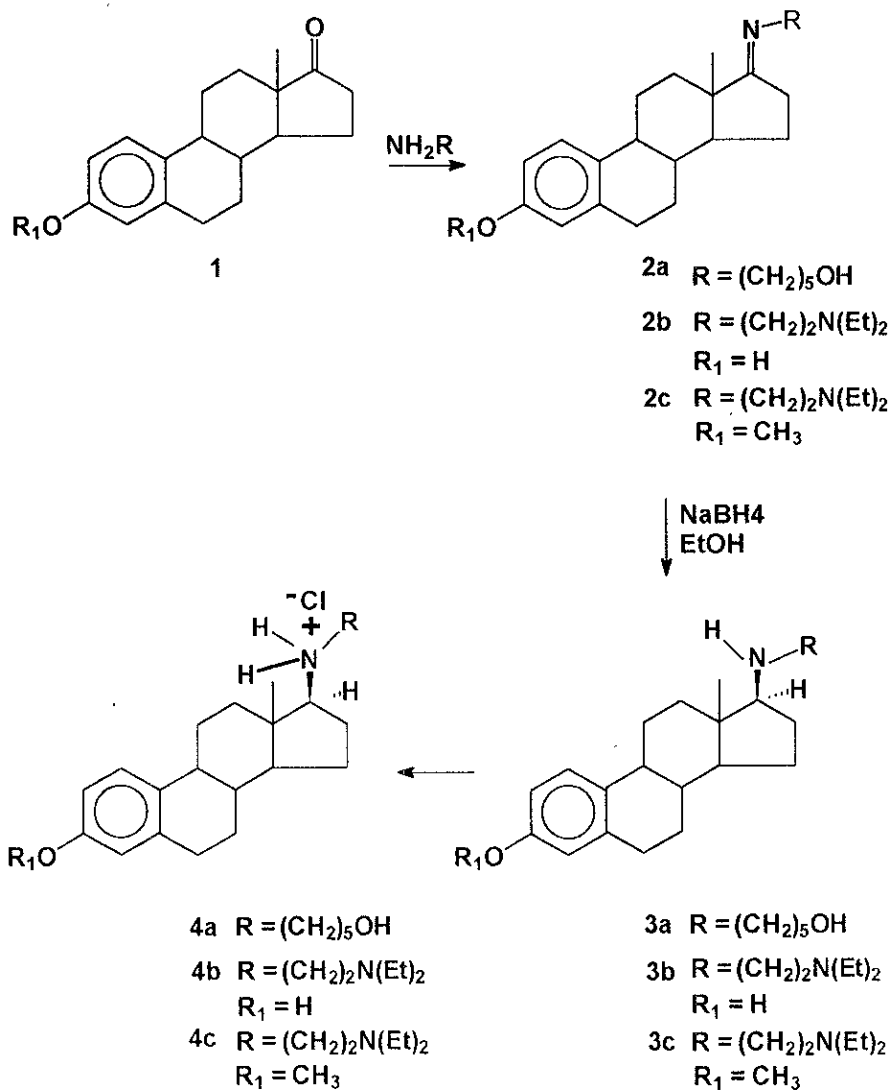


Figura 2: Obtención y estructuras de los aminoestrógenos sintetizados.

### III. PARTE EXPERIMENTAL

#### 1. Métodos Químicos.

Todos los solventes y reactivos utilizados fueron grado analítico y fueron empleados sin purificación. La estrona fué obtenida de los laboratorios Syntex S.A., 5-amino-1-pentanol, N,N'-dietiletilendiamina y borohidruro de sodio de Aldrich. La pureza de los productos fué establecida por espectroscopía (IR, RMN-H, y EM) y el seguimiento de las reacciones se realizó empleando cromatografía en capa fina con placas de 3 por 5 cm de gel de sílice 60 Merck F-254, utilizando como revelador yodo. Los puntos de fusión de los compuestos fueron determinados en un aparato Electrothermal de capilares y no están corregidos. Los espectros de infrarojo (IR) fueron obtenidos en pastillas de bromuro de potasio usando un espectrofotómetro Nicolet FT-55X. Los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno (RMN-H) fueron registrados mediante un espectrofotómetro Varian-Gemini de 200 MHz, en  $\text{CDCl}_3$ ,  $-\text{DMSO}_d_6$  y están reportados en partes por millón (ppm), usando como referencia interna tetrametilsilano. Los espectros de masas fueron obtenidos en un espectrofotómetro Hewlett-Packard 5985-B por impacto electrónico con introducción directa de la muestra a 70 ev.

#### **17 $\beta$ -(5-Hidroxi-1-pentilimino)-1,3,5(10)-17(20)-estratetraen-3-ol) (2a).**

Una mezcla de 1.5 g (5.5 mmoles) de estrona, 1 g (9.69 m mol) de 5-amino-1-pentanol y 10 ml de éter isopropílico se calentaron hasta disolución. Se evaporó el disolvente y se calentó a 80-85° C por 4 horas. La mezcla de reacción se dejó enfriar a temperatura ambiente, se formó un sólido blanco, que se trituró con 20 ml de acetona. El producto obtenido se filtró y secó al vacío. Se obtuvieron (1.920 gr, 98% de rendimiento) con: p.f. 178-180° C. IR,  $\nu$  max 3330-3105 (OH), 1665

(C=N), 1610 (anillo aromático),  $\text{cm}^{-1}$  RMN-H,  $\delta$  0.87 (s, 3H, 18- $\text{CH}_3$ ), 1.25-2.53 (m), 2.83 (m, 2H, 16- $\text{CH}_2$ ), 3.27 (m, 2H,  $\text{CH}_2\text{-N=}$ ), 3.68 (t,  $J=5$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{-OH}$ ) 6.58 (d,  $J=2.5$  Hz, 1H, H-4), 6.64 (dd,  $J=8.5$  Hz y  $J=2.5$  Hz, 1H, H-2) 7.1 (d,  $J=8.5$  Hz, 1H, H-1).

#### **17 $\beta$ -(5-Hidroxi-1-pentilamino)-1,3,5,(10)-estratrien-3-ol (3a).**

El producto **2a** (1 g, 4.5 mmoles) se disolvió en 20 ml etanol, y se agregaron 1.0 g de borohidruro de sodio en porciones durante 30 minutos. La mezcla de reacción se calentó a reflujo 30 minutos y posteriormente se dejó reaccionar a temperatura ambiente durante 20 horas. Se agregaron a la reacción 100 ml de agua y se enfrió con un baño de hielo, el precipitado formado se filtró, lavó con agua y secó al vacío. Se obtuvieron 0.960 g (96% de rendimiento del amino-estrógeno **3a**). El producto fué recristalizado de éter isopropílico-metanol y presenta las siguientes características: p.f. 164-165° C. IR,  $\nu_{\text{max}}$  3400-3240 (OH y NH), 1605 (anillo aromático)  $\text{cm}^{-1}$  RMN-H,  $\delta$  0.72 (s, 3H, 18- $\text{CH}_3$ ), 1.18-2.32 (m), 2.64 (m, 2H,-OH y NH) 2.78 (m, 3H,-N- $\text{CH}_2$  y 17-CH), 3.63 (t,  $J=6.40$  Hz, 2H,  $\text{CH}_2\text{OH}$ ), 6.57 (d,  $J=2.6$  Hz, 1H, H-4), 6.64 (dd,  $J=8.5$  z y 2.6=Hz, 1H, H-2), 7.11 (d,  $J=8.5$  Hz, 1H, H-1). EM  $m/z$  357 (M 18%), 284 (29%), 142 (100%).

#### **Clorhidrato de 17 $\beta$ -(5-Hidroxi-1-pentilamino)-1,3,5,(10)-estratrien-3-ol (4a).**

El producto **3a** 1g ( 4.5 mmoles) se disolvió en 20 ml de acetato de etilo y se adicionaron 0.5 ml de HCl concentrado. Precipitó un producto que se lavó con acetato de etilo (3 x 5 ml). El precipitado se filtró y secó al vacío, produciendo un rendimiento cuantitativo del clorhidrato. Se recristalizó de acetato de etilo-metanol y presentó las siguientes características: p.f. 257-258° C. IR,  $\nu_{\text{max}}$  3340-3220 (OH y NH), 2420 (NH) 1615 (anillo aromático)  $\text{cm}^{-1}$ .

#### **17 $\beta$ -(N,N'-dietilaminoetil)-imino-1,3,5(10)-estratetraen-3-ol (2b).**

Una mezcla de 2.0 g (7.4 mmoles) de estrona, y 2 ml (14.2 mmol) de N,N'-

dietiletilendiamina fueron calentados por 24 horas a 80-85°C. La mezcla de reacción, un aceite café, se enfrió a temperatura ambiente y fué tratado con éter isopropílico (10 ml x 2). El sólido blanco obtenido fué cristalizado de metanol-éter isopropílico, filtrado y secado al vacío produciendo 2.45 g. (6.6 mmol, rendimiento del 89%) de producto **2b** con punto de fusión 158-160°C. IR (KBr): 3320 (OH), 1675 (C=N), 1610 (anillo aromático) cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-NMR (CDCl<sub>3</sub>-DMSO<sub>d</sub><sub>6</sub>): 0.85 (s, 3H, 18-CH<sub>3</sub>), 1.04 (t, 6H, J=7 Hz, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.22-2.53 (m), 2.56 (q, 4H, J=7Hz CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.68 (t, 2H, J=8 Hz, CH<sub>2</sub>-N), 2.80 (m, 2H, 16-CH<sub>2</sub>), 3.34 (m, 2H, CH<sub>2</sub>-N=), 6.56 (d, J= 2.4 Hz, 1H, H-4), 6.61 (dd, J=8.4Hz y 2.4 Hz, 1H, H-2), 7.09 (d, J=8.4 Hz, 1H, H-1).

#### **17β-(N-N' dietilaminoetil)-amino-1,3,5(10)-estratrien-3-ol (3b).**

A una solución de **2b**, (1.2 g, 3.3 mmol) en etanol (20 ml), fué añadido borohidruro de sodio (1.0 g, 26.4 mmol) en pequeñas porciones durante 30 minutos. La mezcla de reacción fué calentada a reflujo por 30 minutos y posteriormente se mantuvo con agitación a temperatura ambiente toda la noche. Se añadió agua (100 ml) a la mezcla de reacción, y fué enfriada en un baño de hielo. El precipitado obtenido fué filtrado, lavado con agua y secado al aire. El producto fué recristalizado de metanol-éter isopropílico para obtener **3b** como un sólido blanco (0.98 g, 82%) con punto de fusión 162-164°C. IR (KBr): 3400 (OH), 3220 (NH), 1605 (anillo aromático) cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>-DMSO<sub>d</sub><sub>6</sub>): 0.74 (s, 3H, 18 CH<sub>3</sub>), 1.01 (t, 6H, J=7Hz CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>), 1.18-2.32 (m), 2.52 (q, 4H, J=7 Hz CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>), 2.57-2.86 (m, 4H, -NH-CH<sub>2</sub> y CH<sub>2</sub>-N), 6.54 (d, J =2.7 Hz, 1H, H-4), 6.61 (dd, J= 8.4 Hz y 2.7 Hz, 1H, H-2), 7.09 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-1). MS: m/z 370 ( M<sup>+</sup> ,0.1%), 284 (M<sup>+</sup> -86, 3%), 86 (100%).

#### **Diclorhidrato de 17β-(N-N' dietilaminoetil)-amino-1,3,5(10)-estratrien-3-ol (4b).**

El diclorhidrato correspondiente (**4b**) fué obtenido al disolver **3b** (0.74 g, 2 mmol) en 10 ml de acetato de etilo, y añadir 0.5 ml de HCl concentrado. El sólido formado fué filtrado y recristalizado de metanol-acetato de etilo, obteniéndose un



rendimiento cuantitativo del mismo con las siguientes características: p.f. 268-270°C. IR (KBr): 3580-3120 (OH y NH), 2650, 2460 (NH<sup>+</sup>), 1615 (anillo aromático) cm<sup>-1</sup>. MS: m/z 154, 136, 137 (100%), 289 (41%), 307 (89%), 371 (29%), 391 (6%), M<sup>+</sup> 443 (2%).

**Diclorhidrato de 17β-(N-N' dietilaminoetil)-amino-1,3,5(10)-estratrien-3-metil éter (4c).**

Una mezcla de 0.786 g (2 mmoles) de 3 metoxiestrona, y 1 ml (7 mmol) de N,N'-dietiletilendiamina fueron calentados por 24 horas a 80-85°C. La mezcla de reacción, un aceite café, fué enfriado a temperatura ambiente y secado al vacío durante 30 minutos, el producto **2c** no fue posible aislarlo ya que se descomponía rápidamente, esta mezcla se lavó con éter isopropílico. El residuo crudo se disolvió en etanol (20 ml), fué añadido borohidruro de sodio (1.0 g, 26.4 mmol) en pequeñas porciones durante 30 minutos. La mezcla de reacción se calentó a reflujo por 30 minutos, se mantuvo con agitación a temperatura ambiente toda la noche. Posteriormente se enfrió la reacción y añadió agua (100 ml). El producto obtenido se extrajo con acetato de etilo (3 x 20 ml). Los extractos orgánicos se juntaron y fueron lavados con agua, secados sobre sulfato de sodio anhidro y el disolvente fué evaporado a presión reducida. El diclorhidrato correspondiente (**4c**) fué obtenido al disolver **3c** en 20 ml de acetato de etilo, y añadir 0.5 ml de HCl concentrado. El sólido formado (0.604g 1.5 mmol) se filtró y recristalizó de metanol-acetato de etilo dos veces. Se obtuvo un rendimiento global de **4a** a **4c** del 92%. **4c** presentó las siguientes características: p.f. 223-224 °C. IR (KBr): 3700 (NH), 2575, 2453 (NH<sup>+</sup>), 1607 (anillo aromático) cm<sup>-1</sup>. <sup>1</sup>H-RMN (CDCl<sub>3</sub>-DMSO<sub>d6</sub>): 1.07 (s, 3H, 18 CH<sub>3</sub>), 1.47 (m, 12H), 1.75 (m, 2H), 2.12-2.33 (m, 5H), 2.53-2.64 (m, 1H), 2.87 (m, 9H), 3.0-6.6 (m, 8H), 3.76 (s, 3H, 3-OCH<sub>3</sub>), 4.01 (s, 2H), 6.61 (d, J = 2.7 Hz, 1H, H-4), 6.70 (dd, J = 8.4 Hz y 2.7 Hz, 1H, H-2), 7.17 (d, J = 8.4 Hz, 1H, H-1). MS: m/z 384 (M<sup>+</sup>-2HCl, 0.1%), 86 (100%).

## 2. Métodos Farmacológicos.

**Fármacos.** Las sustancias utilizadas en los experimentos: estradiol (3-hidroxi-estra-1,3,5(10)trien-3,17 $\beta$ -diol, E<sub>2</sub>), fué obtenido de Syntex S.A. y el clorhidrato de 17 $\beta$ -(5-Hidroxi-1-pentilamino)-1,3,5,(10)-estratrien-3-ol (**4a**), diclorhidrato 17 $\beta$ -(N-N'dietilaminoetil)-amino-3,5(10)-estratrien-3-ol (**4b**) y diclorhidrato 17 $\beta$ -(N-N'dietilaminoetil)-amino-3,5(10)-estratrien-3-metil éter (**4c**), fueron preparados como se describe en la primera sección (24-26).

**Animales.** Los experimentos se llevaron a cabo en ratones macho de 25-30g, hembra inmaduras de 20 días de nacidas, con peso de 9-12g y ratones hembra adulta de 25-30g de la cepa CD1 procedentes del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. Los ratones hembra adultas fueron ovariectomizadas (Ovx) tres semanas antes de iniciar el estudio. A los animales Ovx se les tomaron muestras de exudados vaginales para certificar la intervención quirúrgica antes de iniciar el tratamiento. Los animales fueron mantenidos a temperatura constante de 20-22° en periodos de luz-obscuridad de 12h-12h y se alimentaron con nutricubos de la marca Purina y agua *ad libitum*.

**Diseño Experimental.** Los animales fueron marcados de manera individual para su identificación, mediante pequeñas muescas hechas en el borde de las orejas siguiendo la clave empleada en el laboratorio. En todos los experimentos un mínimo de seis animales por grupo fueron distribuidos para recibir diferentes tratamientos. La distribución se realizó de acuerdo a un arreglo de cuadrados latinos en base a su peso corporal. E<sub>2</sub>, **4a**, **4b** y **4c** se administraron por vía subcutánea. En todos los experimentos los animales del grupo control recibieron solamente el disolvente.

**Tiempo de coagulación.** Este fué estimado conforme al método reportado por Mandoki, Rubio y cols. (19). La cola del animal se calentó en un baño con agua a

40°C por un minuto, para aumentar el flujo sanguíneo, después, se secó la cola y se cortó una pequeña parte en su extremo, con una hoja de afeitar. Se colectaron 25  $\mu$ l de muestra de sangre en un tubo capilar para hematocríto, la sangre se hizo fluir por gravedad entre dos marcas de 45 mm inclinando el tubo capilar alternativamente entre un ángulo de +60 y -60 con respecto al plano horizontal. El cronómetro se puso en marcha cuando la sangre hizo contacto con el vidrio y se paró cuando dejó de fluir (punto final de la prueba).

La determinación del tiempo de coagulación se llevó a cabo en forma balanceada, de acuerdo a un arreglo de cuadrados latinos de manera que todos los grupos fueran evaluados en el mismo intervalo de tiempo. Todos los experimentos se realizaron en forma ciega, de forma que el experimentador ignorara el grupo al cual pertenecía cada animal. En las determinaciones de las curvas dosis-respuesta, los tiempos de coagulación fueron medidos, 24 horas después de la última inyección.

**Actividad Estrogénica.** La actividad estrogénica de **4a**, **4b** y **4c** fué evaluada por el método de peso uterino de Evans, Varney y Koch (27). En cada bioensayo, diferentes grupos de animales con un mínimo de 6 por lote. Se distribuyeron en base a un arreglo de cuadrados latinos, en estratos basados en el peso corporal y se asignaron a los diferentes tratamientos al azar. En todos los experimentos se incluyó un grupo que recibió estradiol ( $E_2$ ) y otro grupo al que solo se le administró el vehículo (V).

A los diferentes grupos se les administraron por vía subcutánea, durante tres días consecutivos: **4a**, **4b** y **4c** en las dosis mostradas en las tablas correspondientes, el control positivo estradiol  $E_2$ , 10  $\mu$ g/Kg g de peso corporal/día y el vehículo aceite de maíz o solución salina (V), 10 ml/Kg de peso corporal/día. Al cuarto día se tomaron muestras de exudado vaginal, los animales fueron sacrificados por dislocación cervical. Los úteros fueron removidos, se eliminó el

líquido intraluminal y se obtuvo su peso en una balanza analítica. Los exudados vaginales fueron teñidos y fijados con solución de Harris y las preparaciones observadas al microscopio evaluando como respuesta positiva la abundancia de células cornificadas y ausencia de leucocitos. Los resultados del peso uterino fueron calculados por 100g de peso corporal y expresados en porcentaje.

**Análisis Estadístico.** Los datos obtenidos fueron sometidos a un análisis de varianza y pruebas de comparaciones múltiples utilizando los métodos de Student-Newman-Keuls o Dunnet (28). Se consideraron diferencias significativas entre los grupos cuando los valores de p fueron menores de 0.05

## **Técnicas Utilizadas en los Experimentos.**

**Ovariectomía.** Esta intervención quirúrgica se llevó a cabo en ratonas hembra adultas en las que se indujo la anestesia con hidrato de cloral (7ml/Kg; solución al 4%). Posteriormente se rasuró y desinfectó el campo quirúrgico en la parte dorsal del animal. Se hizo una incisión transversal de aproximadamente 1 cm y una segunda incisión bilateral longitudinal en el músculo, a una distancia aproximada de 0.5 cm de los músculos espinales dentro de la cavidad peritoneal. Se localizaron los ovarios en el tejido graso, procediendo a su disección. Se suturó en los diferentes planos. Los animales se dejaron recuperar por tres semanas, después de las cuales se tomaron frotis vaginales para certificar la intervención quirúrgica. Solo fueron incluidos en los experimentos animales que presentaban abundancia de leucocitos y escasos de células cornificadas (29).

**Frotis Vaginal.** El frotis vaginal se tomó en las ratonas Ovx antes de iniciar el experimento, en experimentos iniciales durante el tratamiento y en todos los casos al término de éste. En las ratonas infantiles solo se tomó al finalizar el tratamiento.

Para la obtención del exudado vaginal o frotis vaginal, se sujetó al ratón y se introdujo en el orificio vaginal una asa estéril impregnada de solución salina, posteriormente la muestra impregnada del exudado vaginal se depositó sobre un portaobjetos, y dejó secar para proceder a la tinción de la muestra empleando el procedimiento de Harris (30). Los frotis se observaron en el microscopio, realizando un barrido del portaobjetos en forma "s" para evaluar la abundancia relativa de células cornificadas, poligonales, redondas y leucocitos presentes en la muestra empleando una escala de +1 a +4.

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

- 1) Sumergió en alcohol de 96° durante 10 minutos; 2) lavó con agua destilada; 3)

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

**Extracción de Útero.** Se sacrificó a los ratones por dislocación cervical, y se llevó a cabo una incisión longitudinal en el abdomen para la disección de los cuernos uterinos del ratón. El útero se colocó en una caja de Petri con solución salina donde se limpió el tejido eliminando la grasa. Posteriormente el órgano se secó sobre un papel filtro eliminando el líquido intraluminal con la ayuda de una espátula. Se colocó en una caja previamente pesada para obtener el peso uterino (31).

## IV. RESULTADOS Y DISCUSION

### 1. Síntesis de los clorhidratos de los 17 $\beta$ amino estrógenos.

La síntesis de los clorhidratos de los 17 $\beta$  amino estrógenos **4a**, **4b** y **4c** se muestra en la figura 2. Estos fueron preparados siguiendo los procedimientos descritos por Irmischer (32) y Blickenstaff (33) que fueron modificados por nosotros.

El primer paso consistió en la reacción de adición-eliminación que ocurre entre la estrona y la amina correspondiente. La mezcla de reacción fué calentada a una temperatura entre 80 y 85°C durante 2 horas, los productos de reacción, las iminas **2a**, y **2b** se obtuvieron en rendimientos del 89 y 92% respectivamente. Las iminas se caracterizaron comparando su punto de fusión y espectro infrarrojo con una muestra preparada originalmente por Lemini y cols. (24) en donde puede apreciarse la banda característica del grupo imino (C=N), a 1665 cm<sup>-1</sup> y la desaparición de la banda del grupo carbonilo del producto original (estrona). El espectro de resonancia magnética nuclear (RMN) del compuesto **2a** presenta en 0.87 ppm la señal del metilo angular de C18 y las señales del metileno vecino al grupo CH=N en 3.27 ppm. En 3.68 ppm aparece un triplete correspondiente al metileno vecino al grupo OH de la cadena en C-17.

De igual forma puede apreciarse en el espectro de infrarrojo de **2b** la banda debida a la vibración C=N en 1675 y en su espectro de RMN las señales correspondientes al metilo angular en C-18 en 0.85 ppm. También aparecen un triplete correspondiente a los metilos de los grupos etilo en 1.04 ppm y la señal de los metilenos como un cuarteto con una J=7Hz en 2.56 ppm.

Posteriormente se llevó a cabo la reducción de los compuestos **2a**, **2b** y **2c**

en solución etanólica empleando borohidruro de sodio como agente reductor. Los 17- $\beta$  amino estrógenos **3a**, **3b** y **3c** se obtuvieron en un rendimiento del 82 al 96%. Estos productos fueron purificados por cristalización fraccionada utilizando éter isopropílico-metanol y éter etílico-metanol como disolventes de cristalización.

La identificación de estos compuestos se llevó a cabo de igual manera por comparación de su punto de fusión con el de una muestra auténtica y por comparación de sus características espectroscópicas con los espectros reportados (24, 25).

El amino estrógeno **3a** presenta en su espectro de infrarrojo las bandas en 3400-3240  $\text{cm}^{-1}$  características de los grupos OH y NH. En su espectro de resonancia magnética nuclear aparece la señal correspondiente al metilo angular en 0.72 ppm que está de acuerdo con la señal reportada para este compuesto (22). De igual forma el aminoestrógeno **3b** presenta en su espectro de infrarrojo las bandas características de los grupos OH en 3400 y la vibración NH en 3220  $\text{cm}^{-1}$ . En su espectro de RMN aparece la señal correspondiente al metilo angular como singulete en 0.74 ppm, un triplete correspondiente a los metilos del grupo etilo en 1.01 ppm. La señal de los metilenos aparece en 2.52 como un cuarteto con una constante de acoplamiento de 7 Hz.

El producto **3c** no pudo ser aislado, ya que al tratar de purificarlo se descompone, para su identificación fué necesario obtenerlo como el diclorhidrato **4c** que se discutirá posteriormente.

El clorhidrato **4a** fué obtenido disolviendo la amina **3a** en acetato de etilo y adicionando ácido clorhídrico concentrado a la solución. La precipitación del clorhidrato se observó inmediatamente después de la adición del ácido. Este producto fué purificado por recristalización con una mezcla metanol-acetato de etilo. El espectro de infrarrojo de **4a** muestra una banda en 3340-3220  $\text{cm}^{-1}$



correspondiente a las vibraciones N-H y OH. En 2420  $\text{cm}^{-1}$  aparecen la bandas característica de grupos  $\text{NH}^+$ . Su punto de fusión también es semejante al que ha sido descrito (25).

El diclorhidrato **4b** se obtuvo de manera similar a la señalada anteriormente. **4b** presenta también en su espectro de infrarrojo la bandas del grupo  $\text{NH}^+$  en 2650 y 2460  $\text{cm}^{-1}$ . En su espectro de masas se observa la señal correspondiente a su ión molecular que corresponde al peso molecular del compuesto sintetizado.

El diclorhidrato **4c** se identificó por las señales observadas en su espectro de infrarrojo en 3700  $\text{cm}^{-1}$ , debida a la vibración NH, también aparecen dos señales en 2575 y 2453 debidas a la señal característica que producen grupos amina ionizados ( $\text{NH}^+$ ). En su espectro de RMN aparecen en 1.07 la señal del metilo angular del carbono 18. La señal del metilo que forma parte del grupo metoxilo en el carbono 3 aparece en 3.76 ppm como un singulete. Su espectro de masas muestra una señal correspondiente a  $m/z$  384 que nos indica que el compuesto pierde dos moléculas de HCl. Estos datos fueron suficientes para establecer la identidad del compuesto **4c**.

## 2. Evaluación farmacológica de clorhidratos de $17\beta$ aminoestrógenos

### 2.1 Efectos sobre la coagulación sanguínea del ratón.

En trabajos anteriores se ha descrito que el  $17\beta$  aminoestrógeno **3a** empieza a producir sus efectos anticoagulantes en roedores después de 12 horas de administración única, alcanzando su efecto máximo entre las 24 y las 36 horas. Posteriormente estos efectos declinan paulatinamente hasta alcanzar valores normales entre las 72 y 96 horas después de su administración (24, 25). En consecuencia con lo anterior el efecto de **4a**, **4b** y **4c** sobre el tiempo de coagulación sanguínea fué evaluado 24 horas después de la última administración en ratón macho CD1.

El pentolame **3a** y su clorhidrato **4a** fueron evaluados en el ratón macho CD1. Se llevaron a cabo dos tipos de experimentos:

El primero consistió en la administración única de diferentes dosis :10, 20 40 y 80 mg/kg de pentolame (**3a**) y su clorhidrato (**4a**). Evaluando el efecto anticoagulante 24 horas después. Los resultados de estos experimentos se muestran en las tablas 1 y 2. En la gráfica 1 y 2 pueden observarse las curvas dosis-efecto de **3a** y la comparación de **3a** y **4a**.

Los efectos anticoagulantes máximos producidos por una administración de **3a** fueron de 65 %, mientras que su clorhidrato produjo solo 34% de efecto. En ambos casos el efecto observado fué dependiente de la dosis administrada, sin embargo los efectos producidos por **4a** fueron en todos los casos menores a los producidos por su base correspondiente **3a**. (tabla 1 y 2)

El segundo experimento consistió en administrar diariamente, por tres días las dosis 10, 20, 40 y 80 mg/Kg de **4a**, la evaluación de sus efectos anticoagulantes se llevó a cabo 24 horas después de la última administración.

Tabla 1. Curva dosis-efecto anticoagulante de pentolame (3a) en ratón macho adulto CD1.

TRATAMIENTO	DOSIS/RATON/DIA (mg/Kg)	N	PESO CORPORAL DE RATON (g±esm)	TIEMPO DE COAGULACIÓN (seg±esm)	DIFERENCIA %
V	10 mL	12	29±0.6	185±9	----
Pentolame (3a)	10	12	30±0.7	207±8	11 (NS)
Pentolame (3a)	20	12	30±0.6	231±20	24*
Pentolame (3a)	40	12	30±0.6	275±19	48*
Pentolame (3a)	80	12	30±0.7	307±18	65*

V = aceite de maíz

NS = diferencias entre pentolame (3a) y vehiculo no significativas.

\*  $p < 0.05$ , comparación vs vehiculo (aceite de maíz) utilizando la prueba de Dunnett.

Tabla 2. Curva dosis-efecto anticoagulante de 4a en ratón macho adulto CD1 24 horas después de una sola administración.

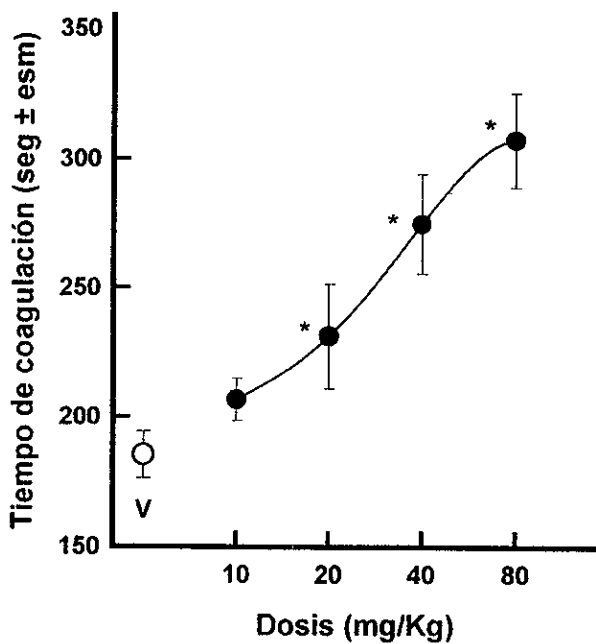
TRATAMIENTO	DOSIS/RATON/DIA (mg/Kg)	N	PESO CORPORAL DE RATON. (g±esm)	TIEMPO DE COAGULACIÓN . (seg±esm)	DIFERENCIA %
V	5 mL	7	29±1.3	192±12.4	-----
4a	10	7	33±0.9	197±14.2	2 (NS)
4a	20	7	32±1.0	219±12.6	14 (NS)
4a	40	7	30±0.5	224±21	16 (NS)
4a	80	7	31±0.8	257±31	34*

V = Propilenglicol

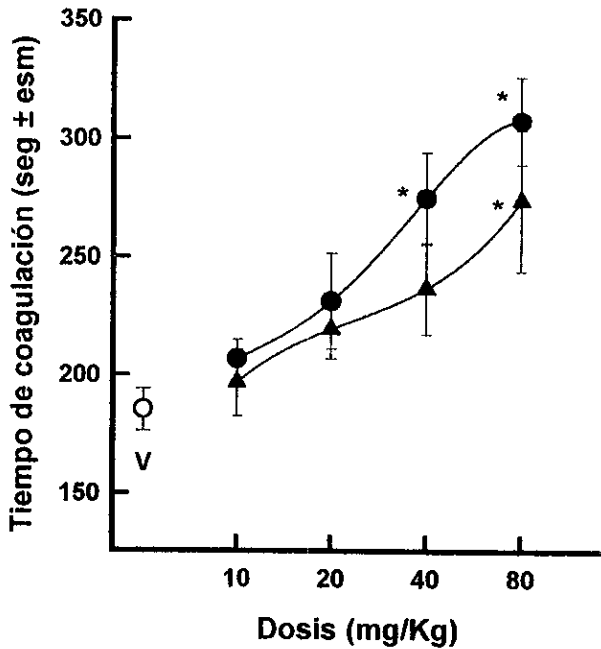
4a = clorhidrato de pentolame.

NS = diferencias no significativas entre 4a y V.

\* p<0.05, comparación vs vehículo utilizando la prueba de Dunnett.



Gráfica 1: Curva dosis-respuesta de pentolame (3a), sobre la coagulación sanguínea del ratón. V = vehículo. \* $p < 0.05$  (comparado con V).  $n = 12$ .



Gráfica 2: Curva dosis-respuesta de pentolame (3a) y clorhidrato de pentolame (4a) sobre la coagulación sanguínea del ratón. V = vehículo. \* $p < 0.05$  (comparado con V).  $n=12$ . ● 3a, ▲ 4a

Bajo las condiciones señaladas los grupos de animales tratados produjeron efectos semejantes a los observados por una sola administración. Estos resultados se encuentran ilustrados en la gráfica 3 y tabla 3. Es probable que el clorhidrato **4a** tenga una farmacocinética diferente a la de su base correspondiente, favoreciéndose su eliminación.

La administración por vía subcutánea de diferentes dosis (5, 10, 20, 40 y 80 mg/Kg) del aminoestrógeno **3b** en ratones, produjo efectos anticoagulantes dependientes de la dosis. Los resultados de este estudio (tabla 4) mostraron que la administración de la dosis de 20, 40 y 80 mg/Kg presentaron un alargamiento del tiempo de coagulación de +22%, +48 y 68% respectivamente, en relación al grupo control que solo recibió el vehículo (Gráfica 4). El análisis de los datos mediante la prueba de Dunnett indicó que estas diferencias fueron significativas.

El diclorhidrato **4b** no pudo evaluarse en dosis equivalentes a las utilizadas para la evaluación base libre **3b** debido a que su toxicidad aumentó considerablemente, en la tabla 5 y gráfica 5 se muestran los resultados obtenidos de estos estudios.

La administración subcutánea de tres dosis consecutivas de 1.25, 2.5 mg/Kg de **4b** produjeron diferencias de tiempo de coagulación de -6% y 11% con respecto al vehículo, que no fueron significativas (NS). La dosis de 5 mg/Kg alargó de manera significativa ( $p < 0.05$ ) en 20% el tiempo de coagulación de los animales tratados. En la Gráfica 5 se comparan los efectos producidos por **3b** y **4b**.

En la Gráfica 6 pueden observarse los efectos sobre el tiempo de coagulación sanguínea del ratón por la administración de diferentes dosis de los compuestos **4b** y **4c**. Como puede apreciarse el producto metilado del compuesto **4b** produce efectos anticoagulantes que son significativos a las dosis de 20 y 40

Tabla 3. Curva dosis-efecto anticoagulante de 4a en ratón macho adulto CD1 24 horas después de tres administraciones.

TRATAMIENTO	DOSIS/RATON/DIA (mg/Kg)	N	PESO CORPORAL DE RATON. (g±esm)	TIEMPO DE COAGULACIÓN . (seg±esm)	DIFERENCIA %
V	5 mL	7	29±1.3	193±18.6	---
4a	10	6	33±0.9	210±14	9 (NS)
4a	20	7	32±1.0	214±10.2	11 (NS)
4a	40	8	30±0.5	228±18.5	18 (NS)
4a	80	8	31±0.8	239±20.3	24*

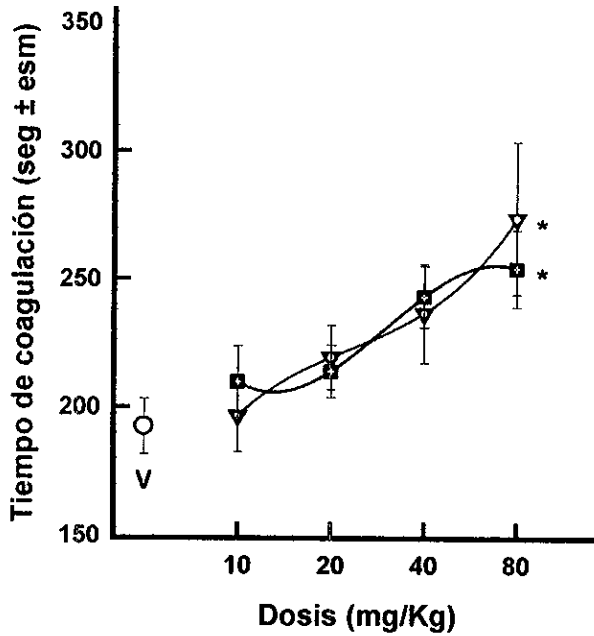
V = Propilenglicol

4a = clorhidrato de 3a.

NS = diferencias no significativas entre 4a y V.

\* p<0.05, comparación vs vehículo utilizando la prueba de Dunnett.





Gráfica 3: Curva dosis-efecto de 4a en la coagulación sanguínea del ratón. V = vehículo; \* $p < 0.05$  (comparado con V).

- ▽ 4a después de administración única
- 4a después de tres administraciones.

Tabla 4. Curva dosis-efecto anticoagulante de 3b en ratón macho adulto CD1 24 horas después de una sola administración.

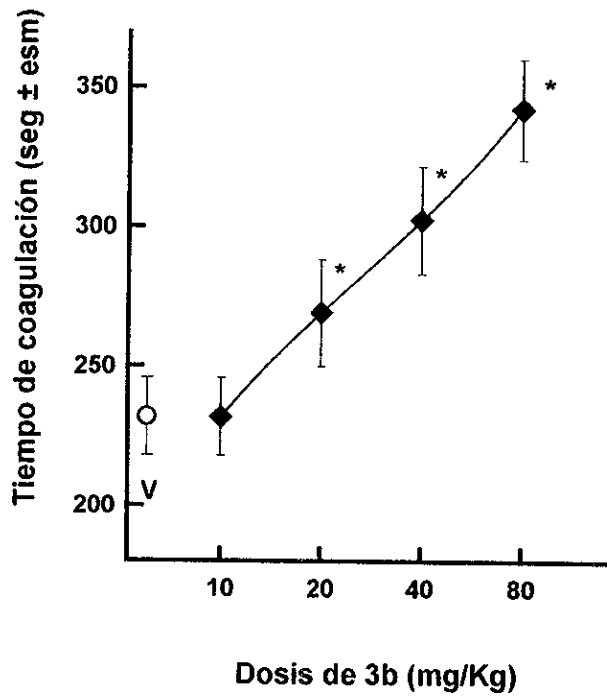
TRATAMIENTO	DOSIS/RATON/DIA (mg/Kg)	N	PESO CORPORAL DE RATON (g±esm)	TIEMPO DE COAGULACIÓN (seg±esm)	DIFERENCIA %
V	10 mL	19	25±0.8	174±8	----
3b	5	13	24±1.1	204±12	17 (NS)
3b	10	13	26±0.9	205±16	18(NS)
3b	20	13	24±0.8	212±10	22*
3b	40	12	26±0.7	257±13	48*
3b	80	12	26±0.8	292±10	68*

V = aceite de maíz

3b = Dedame

NS = diferencias entre 3b y V no significativas.

- $p < 0.05$ , comparación vs vehículo (aceite de maíz) utilizando la prueba Dunnett.



Gráfica 4: Curva Dosis-respuesta de 3b, en la coagulación sanguínea del ratón. V = vehículo. \* $p < 0.05$  (comparado con V).  $n = 13$ .

Tabla 5. Curva dosis-efecto anticoagulante de 4b en ratón macho adulto CD1.

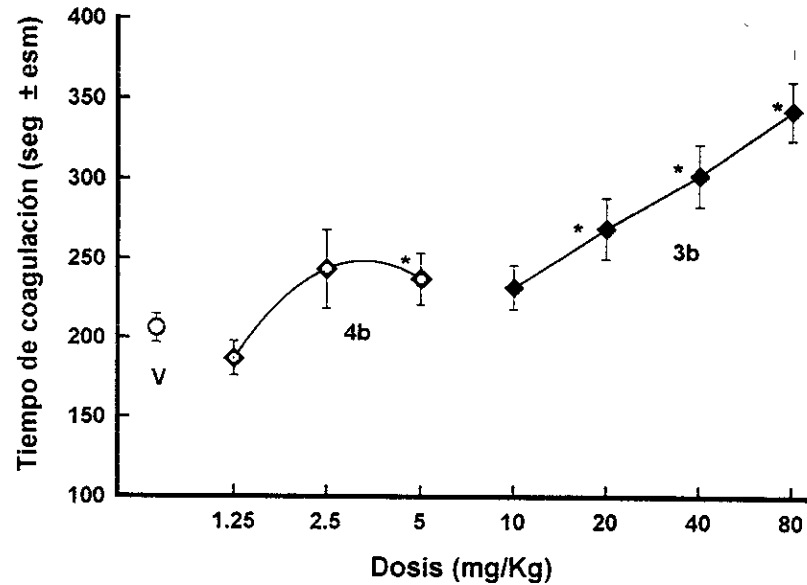
TRATAMIENTO	DOSIS/RATON/DIA (mg/Kg)	N	PESO CORPORAL DE RATON (g±esm)	TIEMPO DE COAGULACIÓN (seg±esm)	DIFERENCIA %
V	10 mL	17	26±0.5	198±8	---
4b	1.25	13	27±0.7	187±11	-6 (NS)
4b	2.5	13	27±0.5	220±10	11(NS)
4b	5	12	26±0.7	237±20	20*

V = solución salina

4b = Diclorhidrato de dedame.

NS = diferencias no significativas entre 4b y V.

\*  $p < 0.05$ , comparación de DEHCl vs vehiculo utilizando la prueba t student.



Gráfica 5: Curvas dosis-respuesta de 3b y 4b en la coagulación sanguínea del ratón. V = vehículo, \*p<0.05 (comparado con V).

Tabla 6. Curva dosis-efecto anticoagulante de 4c en ratón macho adulto CD1.

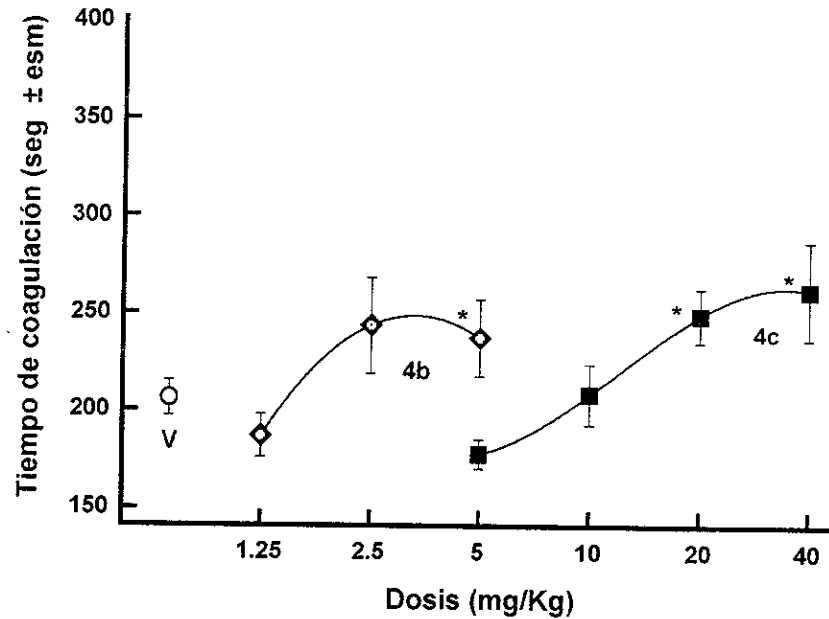
TRATAMIENTO	DOSIS/RATON/DIA (mg/Kg)	N	PESO CORPORAL DE RATON (g±esm)	TIEMPO DE COAGULACIÓN (seg±esm)	DIFERENCIA %
V	10 mL	17	26±0.5	198±8	-----
4c	5	7	27±0.8	178±7	-10 (NS)
4c	10	7	27±0.9	208±16	5 (NS)
4c	20	7	27±0.8	249±14	26*
4c	40	6	27±0.7	262±25	32*

V = solución salina

4c = Diclorhidrato de 3c.

NS = diferencias no significativas entre 4c y V.

\* p<0.05, comparación vs vehículo utilizando la prueba de Dunnett.



Gráfica 6: Curvas dosis-respuesta de los diclorhidratos 4b y 4c en la coagulación sanguínea del ratón. V = vehículo, \* $p < 0.05$  (comparado con V).

mg/Kg. En las tabla 5 y 6 se muestran los resultados de sus curvas dosis-efecto.

La administración subcutánea de las dosis de 20 y 40 mg/Kg del compuesto **4c** produjo efectos de alargamiento del tiempo de coagulación de +26 y +32% respectivamente comparados con el vehículo de administración ( $p < 0.05$ ). Las dosis más bajas produjeron aumentos del tiempo de coagulación que no fueron significativos.

## 2.2 Actividad estrogénica.

Se llevó a cabo un estudio comparativo del efecto estrogénico de los clorhidratos de  $17\beta$ -aminoestrógenos **4a**, **4b**, y **4c** y el  $17\beta$ -estradiol ( $E_2$ ). Este efecto se estimó por el método de Evans, Varney y Koch (27) determinando el peso uterino de ratón hembra adulta Ovx y ratón hembra inmadura CD1.

El tratamiento consistió en la administración por vía subcutánea, durante tres días consecutivos de las dosis de 3 y  $15\mu\text{g/Kg}$  de **4b**; 3, 15 y  $75\mu\text{g/Kg}$ , de los aminoestrógenos **4c** y **4a**., en todos los experimentos se utilizó como un control positivo  $E_2$  ( $10\mu\text{g/Kg}$ ) y el vehículo de administración (V,  $10\text{ml/Kg}$ )

Los efectos sobre peso uterino producidos por la administración de **4a** y **4b** en dosis de  $15\mu\text{g/Kg}$  fueron de menor magnitud cuando se compararon con una dosis equivalente  $10\mu\text{g/Kg}$  de  $E_2$ , (tabla 7, y 8). En contraste cuando se comparó el efecto sobre el peso uterino de la administración de  $15\mu\text{g/Kg}$  de **4c** con  $E_2$ , el aminoestrógeno produjo diferencias mayores que las que se observaron con la hormona natural. En la tabla 9 se muestran los resultados de estos experimentos.

La administración de dosis de  $75\mu\text{g/Kg}$  de los compuestos **4a** y **4c** produjeron efectos semejantes a los observados en el  $E_2$ .



Tabla 7. Comparación del efecto de 4a y E<sub>2</sub> sobre el peso uterino de ratonas hembras inmaduras.

TRATAMIENTO	DOSIS/RATON/DIA ( $\mu$ g/Kg)	N	PESO INICIAL DE RATON. (g $\pm$ esm)	PESO FINAL DE RATON. (g $\pm$ esm)	PESO UTERINO (mg/100g $\pm$ esm)	DIFERENCIA %
V	10 mL	6	10 $\pm$ 0.6	8 $\pm$ 0.7	75 $\pm$ 20.9	-----
A	10 mL	6	10 $\pm$ 0.5	11 $\pm$ 0.8	101 $\pm$ 6.9	-----
E <sub>2</sub>	10	6	10 $\pm$ 0.5	9 $\pm$ 0.6	223 $\pm$ 21.9	121*
4a	3	6	10 $\pm$ 0.4	13 $\pm$ 0.6	101 $\pm$ 25.5	35 (NS)
4a	15	6	10 $\pm$ 0.6	8 $\pm$ 0.6	159 $\pm$ 13.2	112*
4a	75	6	10 $\pm$ 0.6	9 $\pm$ 0.5	204 $\pm$ 17.7	172*

V = Solución salina

A = Aceite de maíz

E<sub>2</sub> = Estradiol

4a = Clorhidrato de 3a

\* p<0.05. Comparado con el vehículo por el método de Student-Newman-Keuls.

Tabla 8. Comparación del efecto de 4b y E<sub>2</sub> sobre el peso uterino de ratonas hembras Ovx

TRATAMIENTO	DOSIS/RATON/DIA ( $\mu$ g/Kg)	N	PESO INICIAL DE RATON. (g $\pm$ esm)	PESO FINAL DE RATON. (g $\pm$ esm)	PESO UTERINO (mg/100g $\pm$ esm )	DIFERENCIA %
V	10 mL	5	36 $\pm$ 1.6	36 $\pm$ 1.8	36 $\pm$ 4	-----
A	10 mL	5	35 $\pm$ 0.8	34 $\pm$ 1.1	43 $\pm$ 4	-----
E <sub>2</sub>	10	5	36 $\pm$ 1.6	38 $\pm$ 1.9	178 $\pm$ 11	314*
4b	3	5	35 $\pm$ 2.0	35 $\pm$ 1.9	55 $\pm$ 4	53*
4b	15	5	35 $\pm$ 1.9	37 $\pm$ 4	75 $\pm$ 7	108*

V = solución salina

A = aceite de maíz

E<sub>2</sub> = estradiol.

4b = diclorhidrato de 3b

\* p<0.05. Comparado con el vehículo por el método de Student-Newman-Keuls.

Tabla 9. Comparación del efecto de 4c y E<sub>2</sub> sobre el peso uterino de ratonas hembras inmaduras.

TRATAMIENTO	DOSIS/RATON/DIA ( $\mu$ g/Kg)	N	PESO INICIAL DE RATON. (g $\pm$ esm)	PESO FINAL DE RATON. (g $\pm$ esm)	PESO UTERINO (mg/100g $\pm$ esm)	DIFERENCIA %
V	10 mL	6	10 $\pm$ 0.6	8 $\pm$ 0.7	75 $\pm$ 21	-----
A	10 mL	6	10 $\pm$ 0.5	11 $\pm$ 0.8	101 $\pm$ 7	-----
E <sub>2</sub>	10	6	10 $\pm$ 0.5	9 $\pm$ 0.6	223 $\pm$ 22	121*
4c	3	6	10 $\pm$ 0.5	9 $\pm$ 0.9	94 $\pm$ 17	25 (NS)
4c	15	6	10 $\pm$ 0.5	8 $\pm$ 0.5	207 $\pm$ 25	176*
4c	75	6	10 $\pm$ 0.4	10 $\pm$ 0.6	214 $\pm$ 32	185*

V = Solución salina

A = Aceite de maíz

E<sub>2</sub> = Estradiol

4c = Diclorhidrato de 3c

\* p<0.05. Comparado con el vehículo por el método de Student-Newman-Keuls.

## V CONCLUSIONES

De los objetivos planteados en este trabajo se logró sintetizar y caracterizar por métodos espectroscópicos de infrarrojo (IR), resonancia magnética nuclear (RMN) y espectroscopía de masas (EM) los compuestos: clorhidrato de 17 $\beta$ -(5-Hidroxi-1-pentilamino)-1,3,5,(10)-estratrien-3-ol (**4a**), diclorhidrato 17 $\beta$ -(N-N'dietilaminoetil)-amino-3,5(10)-estratrien-3-ol (**4b**) y diclorhidrato 17 $\beta$ -(N-N'dietilaminoetil)-amino-3,5(10)-estratrien-3-metil éter (**4c**), que se muestran en la figura 2.

El clorhidrato de 17 $\beta$ -(5-Hidroxi-1-pentilamino)-1,3,5,(10)-estratrien-3-ol (**4a**) produce efecto anticoagulante de menor magnitud que su correspondiente base. Estos efectos fueron observados después de 24 horas de administración única en el ratón CD1. Los efectos producidos después de tres administraciones fueron muy semejantes a los de administración única. Esto posiblemente sea debido a que los compuestos tienen una cinética de absorción-eliminación diferente a la de sus bases correspondientes.

El diclorhidrato 17 $\beta$ -(N-N'dietilaminoetil)-amino-3,5(10)-estratrien-3-ol (**4b**) produce efectos tóxicos en los animales tratados, y por lo tanto no pudo ser evaluado a dosis equivalentes a las de su amina libre (**3b**). Una dosis de 5 mg/Kg de peso es capaz de producir un 20% de alargamiento del tiempo de coagulación en el ratón de manera significativa. Lo que demuestra su actividad anticoagulante, sin embargo su alta toxicidad limitan el aumento de la dosis.

El diclorhidrato 17 $\beta$ -(N-N'dietilaminoetil)-amino-3,5(10)-estratrien-3-metil éter (**4c**) produce efectos anticoagulantes dosis-dependientes de menor potencia que **3a**.

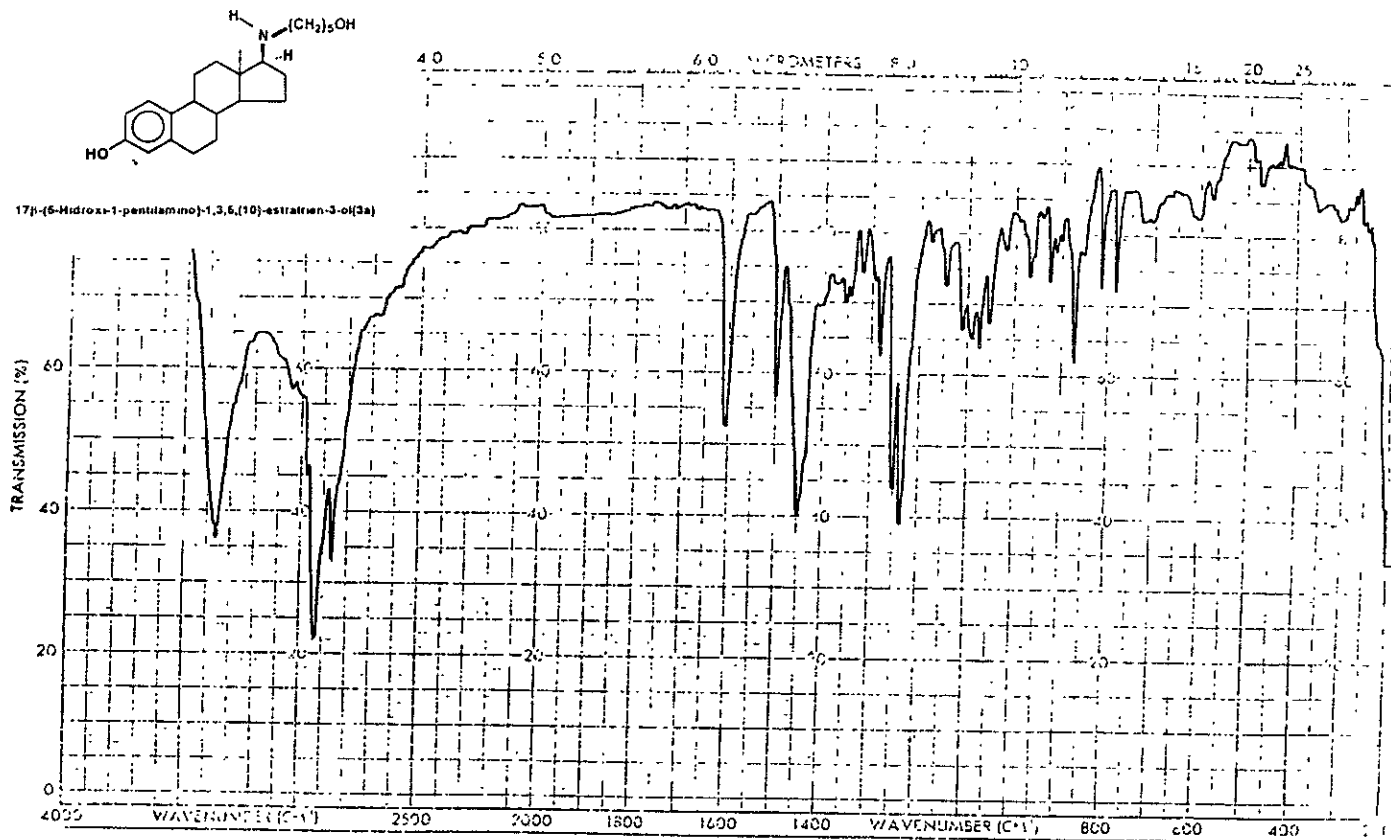
El bloqueo del grupo OH en posición 3 del estrógeno por un grupo metilo no elimina la actividad anticoagulante. No obstante debe considerarse que el efecto producido podría ser debido a que el organismo pueda biotransformar a **4c** en metabolitos activos desmetilados.

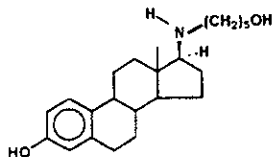
La evaluación de los efectos estrogénicos de los clorhidratos **4a**, **4b** y **4c** en ratón hembra Ovx CD1 nos condujo a las siguientes conclusiones:

Los clorhidratos **4a**, **4b** y **4c** administrados por vía subcutánea en el ratón hembra Ovx CD1 producen efectos estrogénicos de menor potencia que el estradiol. De los experimentos realizados el orden de potencia entre los compuestos mencionados fué:**4c>4a>4b**.

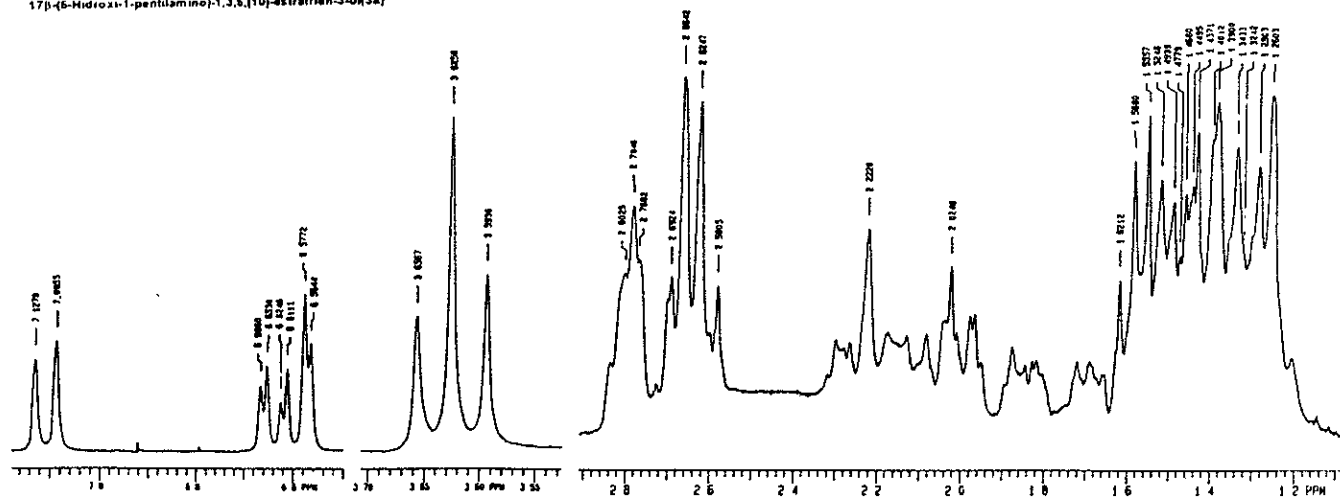
Estos resultados preliminares nos indican que el compuesto **4c** es motivo de interés futuro ya que puede producir efectos anticoagulantes, tiene una mayor solubilidad en solventes polares y su efecto estrogénico es mayor que el de los otros clorhidratos de 17 $\beta$ -aminoestrógenos estudiados.

## VI. ESPECTROS

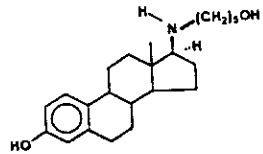




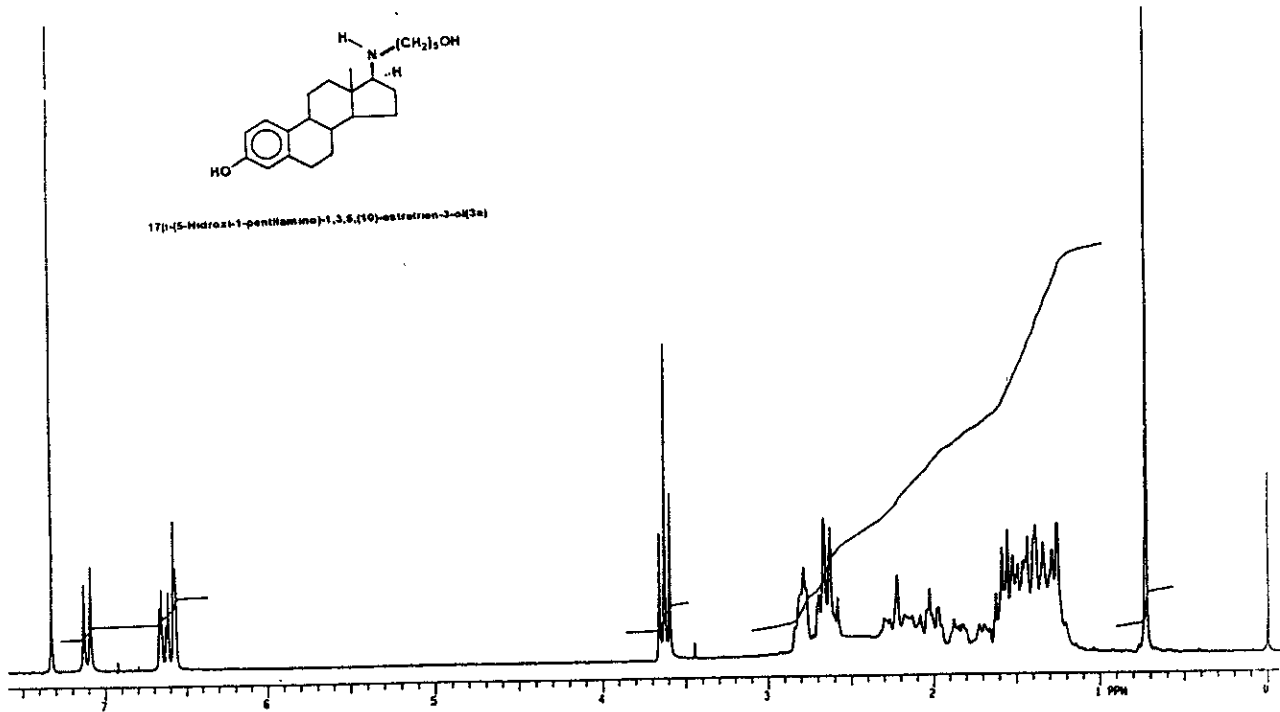
17β-(6-Hidroxi-1-pentilamino)-1,3,5,10-estratrien-3-ol(3a)

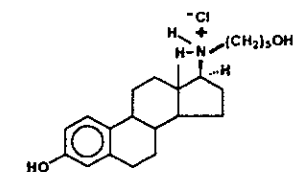




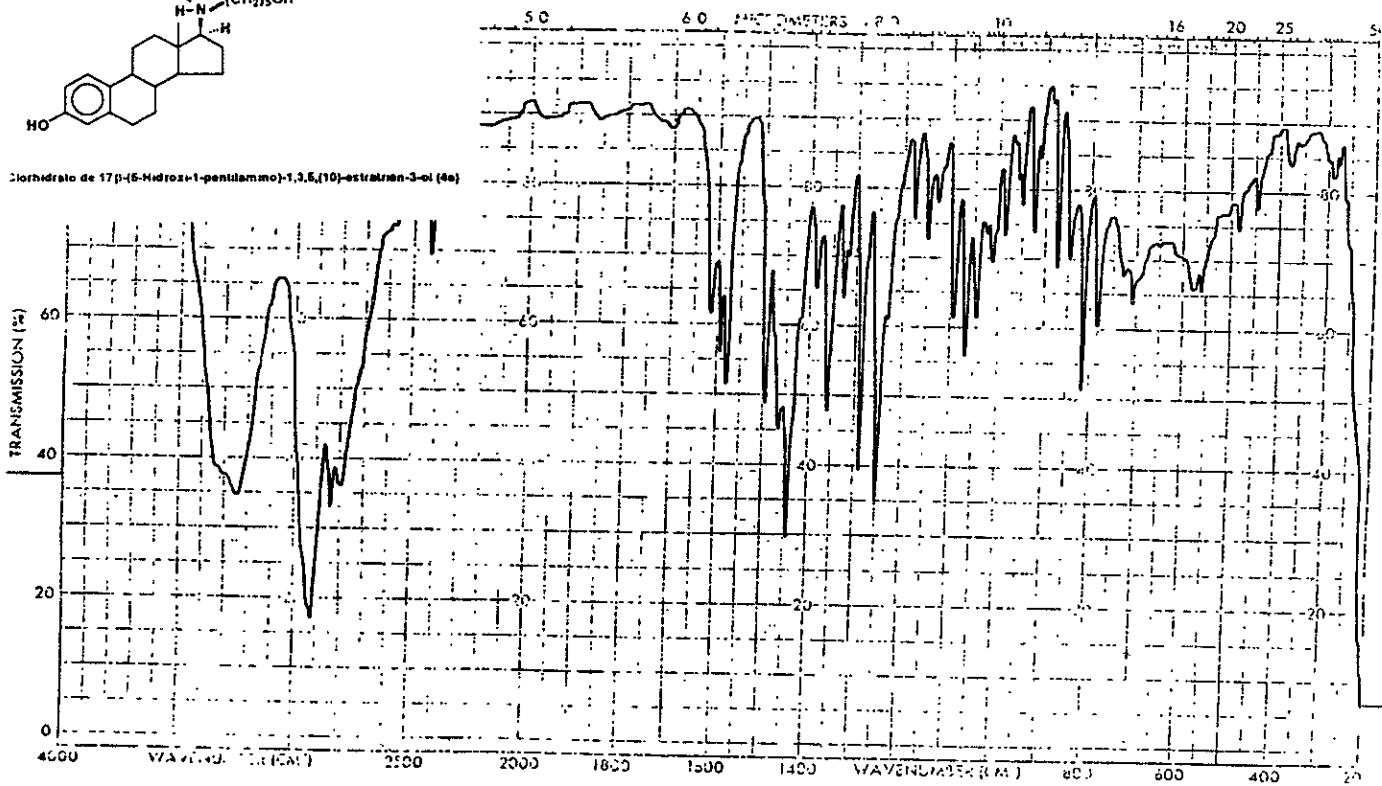


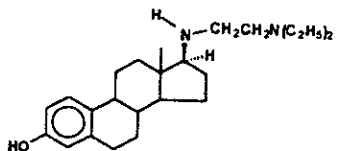
17β-(5-Hidroxi-1-pentilamino)-1,3,5,10-estratrien-3-ol(3α)



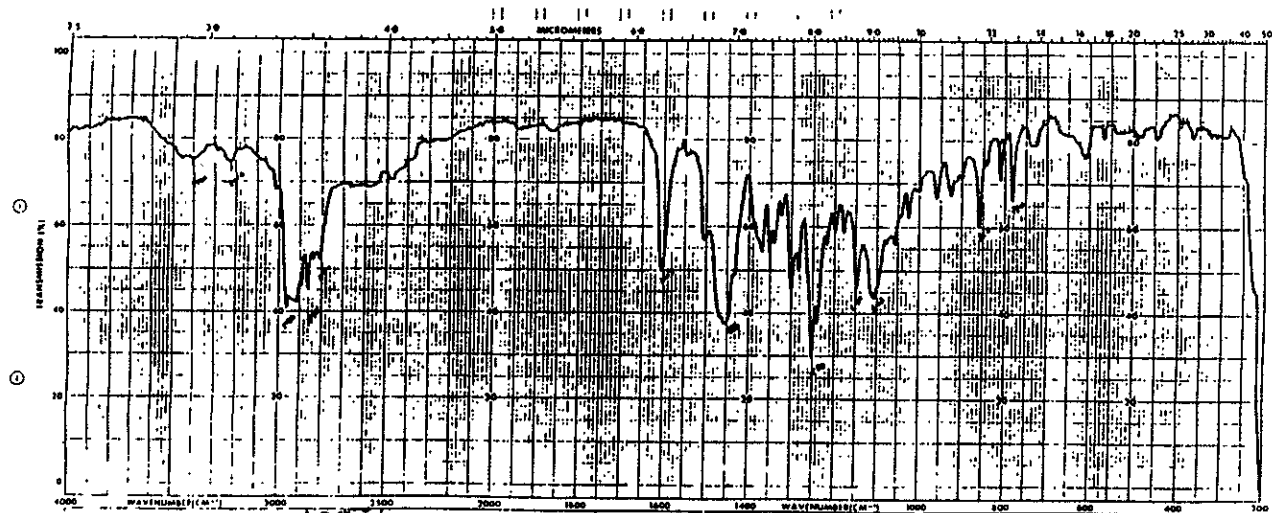


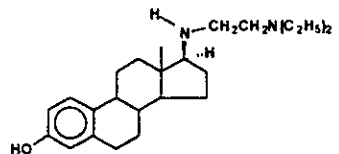
Clorhidrato de 17β-(6-Hidroxi-1-pentilamino)-1,3,6,10-estratrien-3-ol (4α)



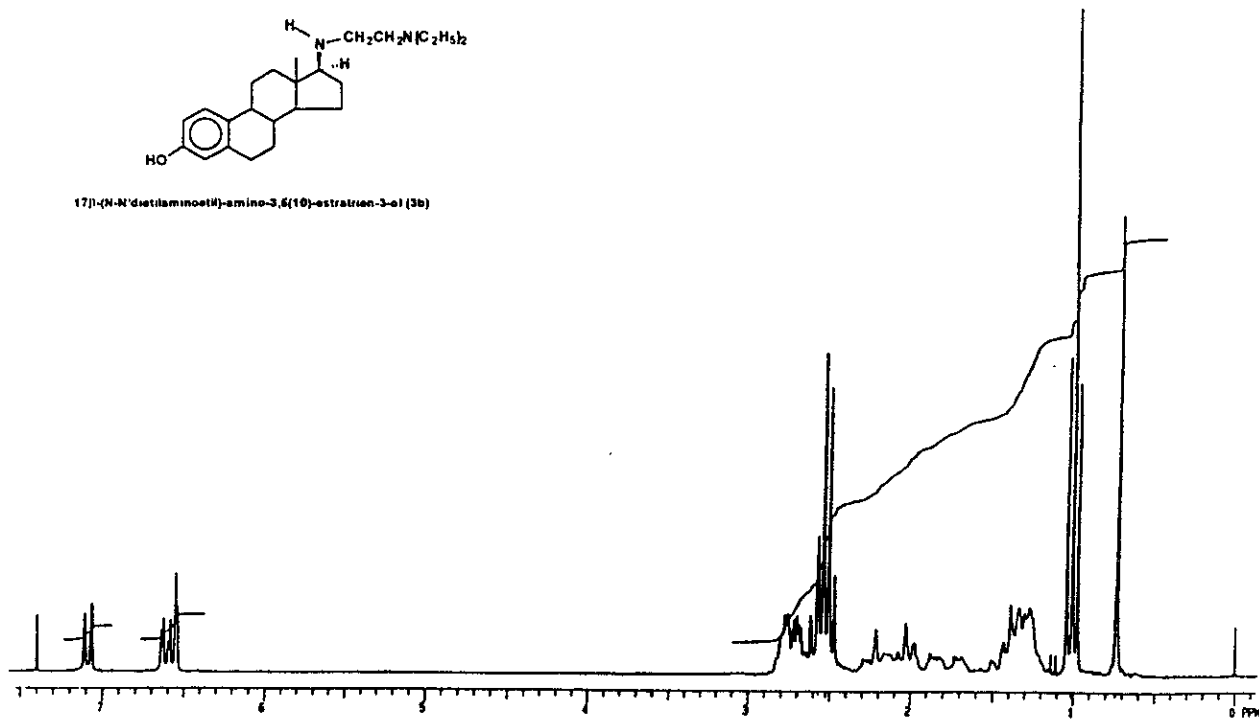


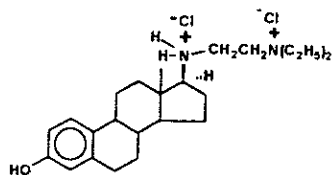
17β-(N,N'-diethylaminoethyl)amino-3,6(10)-estratrien-3-ol (3b)



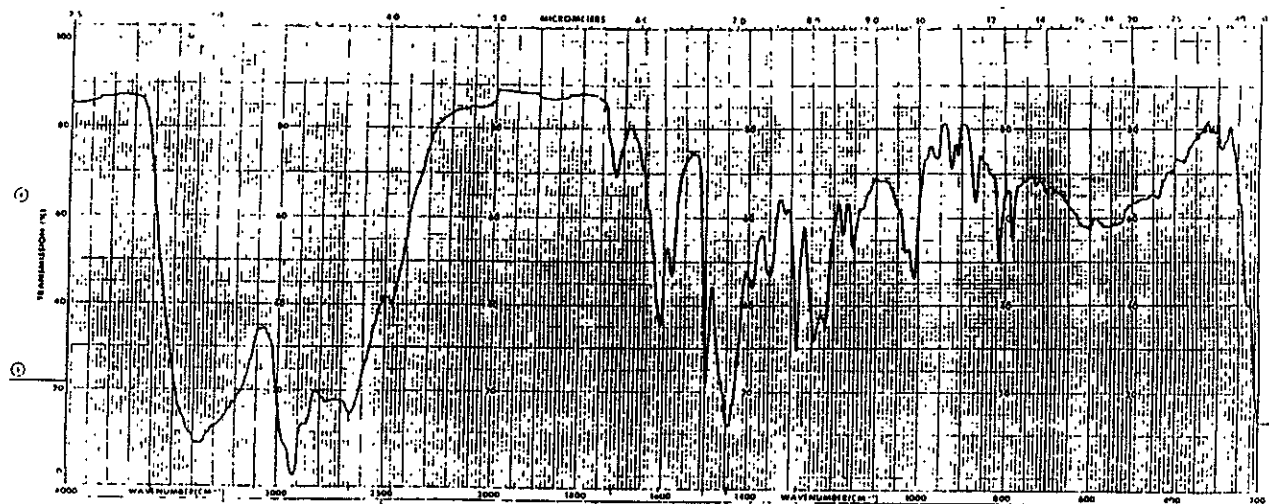


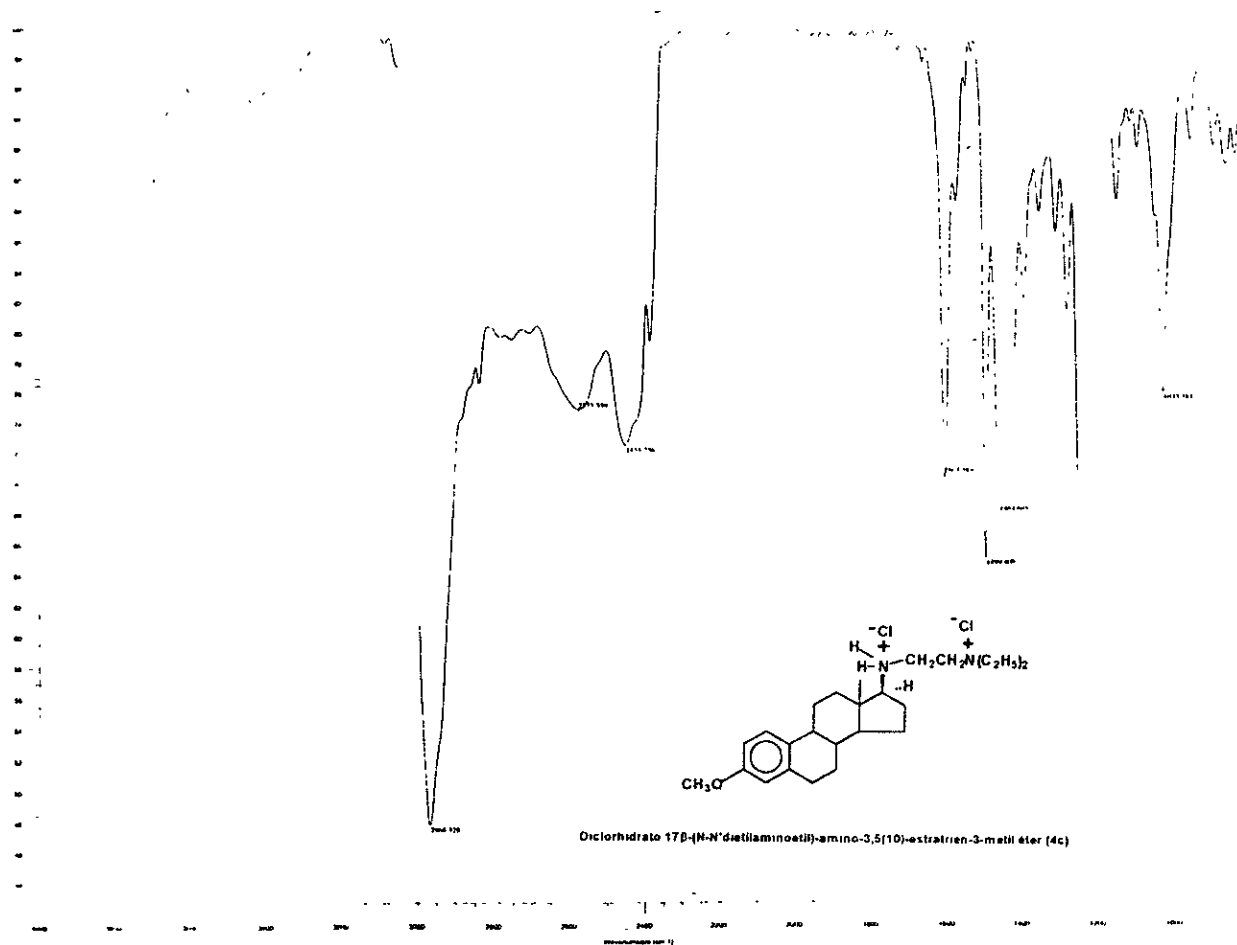
17β-(N,N'-diethylaminoethyl)-amino-3,6,10-estratrien-3-ol (3b)

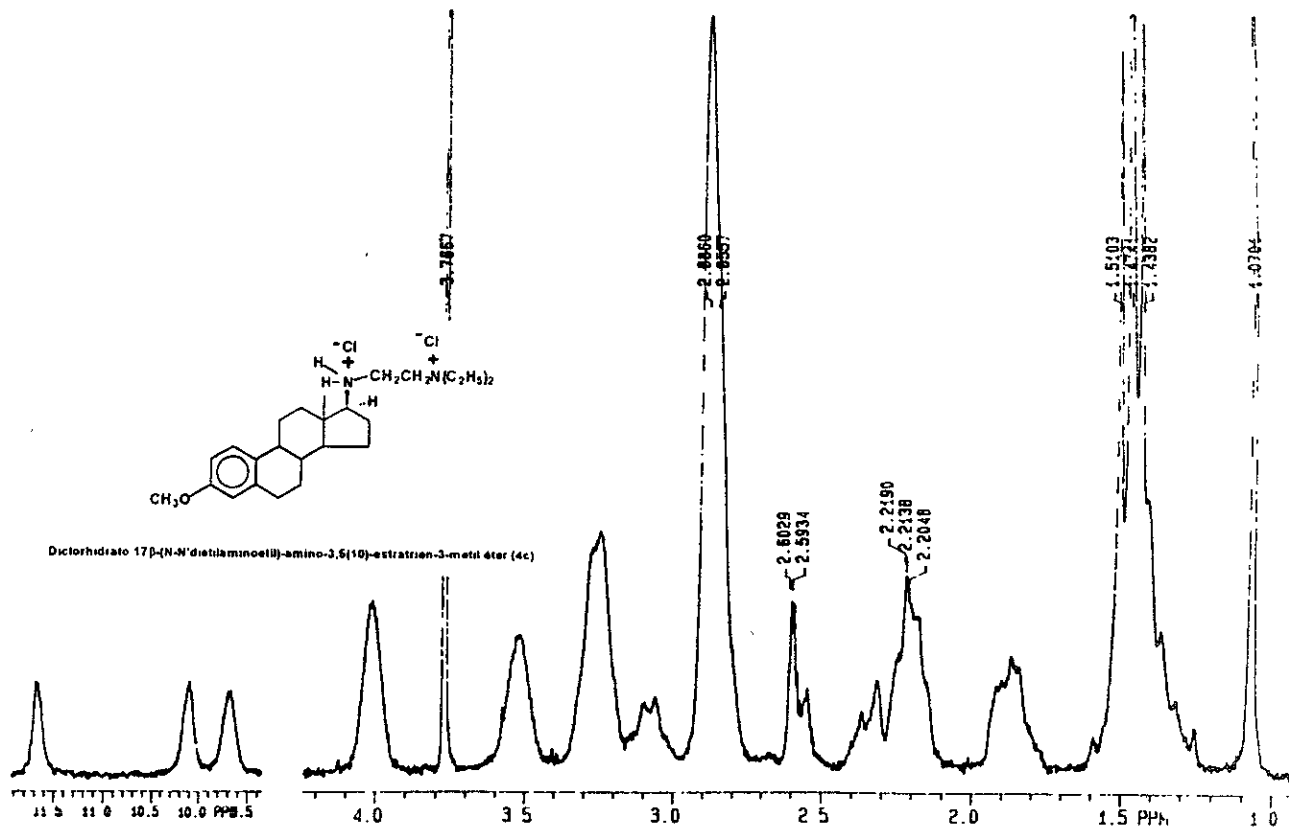


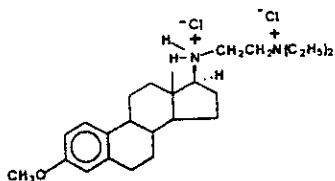


Dihlorhidrato 17β-(N,N'-dietilaminoetil)-amino-3,6,10-estratrien-3-ol (4b)

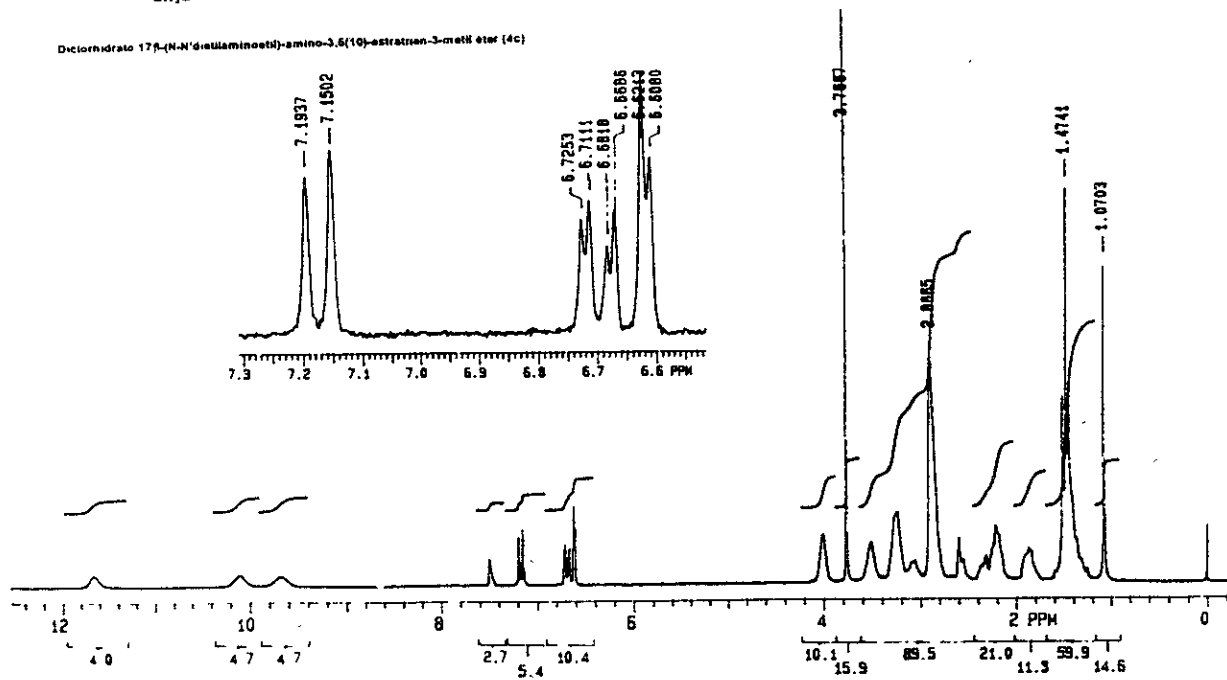








Diclorhidrato 17β-(N,N'-dietilamino)estradiol-3-O-metil éter (4c)





## VII BIBLIOGRAFIA

- 1.- Burger, A., Medicinal Chemistry, Steroids Hormones, 2a. ed., Ed. Interscience Publisher, INC., New York, 1960, p 691-703.
- 2.- Katzung, B.G., Farmacología Básica Y Clínica en: Hormonas Gonadales e Inhibidores, 4a edición, El Manual Moderno, México D.F. 1991, p 501-505.
- 3.- Goodman, A. and Gilman, Rall, T.W., Nies, A. S., Taylor, P., Las Bases Farmacológicas de la Terapéutica en: Estrogénos y Progestágenos 8a. edición, Editorial Médica Panamericana 1986, p 1341-1350.
- 4.- Kalin, M.F. and Zumoff, B.: Sex hormones and coronary disease: a review of the clinical studies. *Steroids*, **55**:330-352, 1990.
- 5.- The Coronary Drug Project Research Group.: Findings Leading to discontinuation of the 2.5/mg/day estrogen group. *J.A.M.A.* **226**:652-657, 1973.
- 6.- Rosenberg, L., Palmer, J.R., Lesko, S.M., Shapiro, S.: Oral contraceptive use and the risk of myocardial infraction. *Am. J. Epidemiol.* **131**:1009, 1990.
- 7.- Huch, K.M., Elam, M.B., and Chesney, C.M.: Oral contraceptive steroid induced platelet coagulant hiperactivity: dissociation of in vivo and in vitro effect. *Thromb. Res.* **1**:41-50, 1987.
- 8.- Ygge, J., Brody, S., Korsan-Bengtson, K., Nilson, L.: Changes in blood coagulation and fibrinolysis in women receiving oral contraceptives. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **107**:87, 1969.
- 9.- Hellstern, P., Miyashita, C., Kholer, M.: Thrombin induced platelet malondialdehyde (MDA) formation in normal subjects and in women taking oral contraceptives. *Thromb. Haemost.* **48**:395, 1982.
- 10.- Gordon, E.M., Ratnoff, O.D., Saito, H.: Rapid fibrinolysis, augmented Hageman factor (factor XII) titres and decreased C1 esterase inhibitor titres in women taking oral contraceptives. *J Lab. Clin. Med.* **96**:762, 1980.
- 11.- Alkjaersig, N., Fletcher, A.P., Burstein, R.: Association between oral contraceptive use and thromboembolismo: a new approach to investigation based on plasma fibrinogen chromatography. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **122**:199, 1975.
- 12.- Ambrus, J.L., Nieswander, K.R., Courey, N.G.: Progestational agents and blood coagulation. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **103**:994, 1969.
- 13.- Nilsson, I.M., Kullander, S.: Coagulation and fibrinolytic studies during use of gestagens. *Acta Obstet. Gynaecol. Scand.* **46**:286 1967.

- 14.- Donayre, J., Pincus, G.: Effects of Enovid on blood clotting factors. *Metabolism* **14**:418, 1965.
- 15.- Tsakok F.,H.,Koh, S.: Effectsof oral contraceptivescontaining 50µg estrogen on blood coagulation in non-Caucasian women. *Contraception*, **21**:505, 1980.
- 16.- Hedlin, A.M.:The efectct of oral contraceptive estrogen on blood coagulation and fibrinolysis. *Throm. Diath. Haemost.* **33**:370, 1975.
- 17.- Meade, T.W., Brozovic, M., Chakrabarti, R.: An epidemiological study of the haemostatic and other effects of orai contraceptives. *Br. J. Haematol.* **34**:353, 1976.
- 18.- Barrett-Connor, E., Bush, T.: Estrogen and coronary heart disease in women. *J.A.M.A.* **265**:1861,1991.
- 19.- Mandoki, J.J., Zavala, E., Silva, G., Mendoza-Patiño, N., Rubio-Póo, C., Medina-Martínez, S. & Dominguez-Escoto, P.: The Dual Effects of Estrogens on Blood Clotting time *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **26**:45-48, 1983.
- 20.- Rubio-Póo, C., Mandoki, J.J., Jayme, V., Mendoza-Patiño, N., Alvarado, C., Silva, G., Zavala, E., Fernandez-G., J.M.& Rubio-Arroyo, M.: Prodiame: A New Estrogen With Sustained Anticoagulan Effect. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **26**:111-113, 1983.
- 21.- Rubio-Póo, C., Mandoki, J.J., Mendoza-Patino, N., Lemini C., de la Peña, A. Cruz., Zavala, E., Silva, G., García-Mondragón, J., Fernández-G., J.M., Soriano-García, M. & Toscano, A.R.: The anticoagulant effect of Prolame, a novel amino-estrogen *Steroids* **45**:159-170, 1985.
- 22.- Mandoki, J.J., Rubio-Póo, C., Lemini, C., De la Peña, A., Fernandez-G, J.M., García-Mondragón, J., Zavala, E., Silva, G., y Mendoza-Patiño, N.: The effects of five new 17β- amino-estrogens, buame, endiame, etolame, picae, and proacame on blood clotting time. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **34**:99-106, 1991.
- 23.- Rubio-Póo, C., Lemini, C., García-Mondragón, J., de la Peña, A., Jayme V., Mendoza-Patiño, N., Zavala, E. Silva, G., Blickenstaff, R.T., Fernandez-G., J.M., & Mandoki, J.J.: The anticoagulant effect of hexolame another amino-estrogen with prolonged anticoagulant effect. *Steroids* **55**:83-86, 1990.
- 24.- Lemini, C., Rubio-Poo, C., Garcia-Mondragón, J., Zavala, E., Mendoza-Patiño, N., Castro, D., Cruz-Almanza, R., Y Mandoki J.J. Anticoagulant and estrogenic effects of two new 17β--amino-estrogens, butolame [17β- (4-hydroxy-1-butilamino)-1,3,5(10)estratrien-3-ol] and pentolame [17β-(5-hydroxy- 1-pentilamino)- 1,3,5(10) -estratrien -3-ol]. *Steroids* **58**:457-461 1993.
- 25.- Rubio-Póo C, Lemini C, Silva G, Chavez-Lara B, Mendoza-Patiño N, Ortíz R, Mandoki JJ. Effects of 17β-(N,N-diethylaminoethyl) amino -1,3,5(10)-

- estratrien-3-ol, a diamino-estrogen, and its androstane analogue on blood clotting time. *Med Chem Res* **7**:67-75 1997.
- 26.- Lemini C, Rubio-Póo C, Silva G, Zarco de Coronado I. Evidence of non-genomic effect of a 17 $\beta$ -diamino estrogen, an estradiol derivative on motor activity in rodents. *Med Sci Res* **26**:47-49 1998.
- 27.- Evans, J.S., Varney, R.F., and Koch, F.C.: The mouse uterine weight method for assay of estrogens. *Endocrinology* **28**:747-752, 1941.
- 28.- Snedecor, G.W., and Cochran, W.G.: *Statistical Methods*, 8a. ed., Iowa State University Press, Ames, 1989, p 96-98.
- 29.- Allen, E., and Doisy, E.A.: An ovarian hormone. *J. Am. Med. Assoc.* **81**:819-821, 1923.
- 30.- Zarrow, M.X., Yochim, J. M., McCarthy, J.L, Sanborn, R.C., en: *Experimental Endocrinology a sourcebook of basic techniques*. En: *The estrogens* p 28-30 Academic Press New York and London 1964.
- 31.- Lawson, H.D., Heller, O.G. The immature rat uterus in the assay of estrogenic activity. *Endocrinology*, **24**:35-44, 1939.
- 32.- Irmischer, K.: Die umsetzung ubon steroidketonen mit aminoalkoholen. *Chem. Ber.* **95**:907-917, 1962.
- 33.- Blickenstaff, R.T., Foster, E., Gerzon, K. y Young, P.: Synthesis of some analogues of estradiol. *Steroids* **46**:889-902, 1985.