

T
177

60279

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA



Casa abierta al tiempo

**SÍNTESIS DE AMINOESTEROIDES:
EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA DEL EFECTO
ANTICOAGULANTE E IMPORTANCIA DE LA
AROMATICIDAD**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTOR EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
P R E S E N T A
CONSUELO RUBIO PÓO

MEXICO D. F.

Junio de 1997

124703

**EL DOCTORADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA ESTÁ EN
EL PADRÓN DE POSGRADO DE EXCELENCIA DE
CONACYT Y CUENTA CON EL APOYO POR MEDIO DEL
CONVENIO PEP-200-93**

El jurado designado por la División de Ciencias Biológicas de las Unidades
Iztapalapa y Xochimilco aprobó la tesis que presentó

CONSUELO RUBIO PÓO

El día 19 de Junio de 1997

Comité Tutorial:

Tutor: Dra. Rocío Ortiz Muñiz *Rocío Ortiz Muñiz*

Asesor: Dr. Rubén Román Ramos *Rubén Román Ramos*

Asesor: Dr. Manuel Salmón Salazar *Manuel Salmón Salazar*

Sinodal: Dr. Luis Antonio Barragán Díaz-Infante *Luis Antonio Barragán Díaz-Infante*

Sinodal: Dr. Armando Cabrera Ortiz *Armando Cabrera Ortiz*

**El ayer no es más que un sueño,
el mañana no es más que una visión,**

**pero el presente bien vivido,
hace de cada ayer un sueño de felicidad y
de cada mañana una visión de esperanza;**

por lo tanto

prestemos atención a *este día*.

Sabiduría Hindú.

**A TODAS LAS PERSONAS, QUE DE ALGUNA MANERA CONTRIBUYERON A
MI FORMACIÓN ACADÉMICA: MI AGRADECIMIENTO, RESPETO Y CARIÑO
PARA SIEMPRE.**

A MI COMITÉ TUTORIAL INTEGRADO POR LA DRA. ROCÍO ORTÍZ MUÑIZ, EL DR. RUBÉN ROMÁN RAMOS Y DR. MANUEL SALMÓN SALAZAR, POR EL APOYO CONFIANZA Y RESPETO CON QUE SIEMPRE ME DISTINGUIERON, SUS INVALUABLES CONSEJOS Y ORIENTACIÓN, MI GRATITUD Y CARIÑO.

MI PROFUNDO AGRADECIMIENTO Y CARÍÑO A LA M. EN C. CRISTINA LEMINI GUZMAN, TITULAR DEL LABORATORIO DE FARMACOLOGÍA ENDÓCRINA, DEL DEPARTAMENTO DE FARMACOLOGÍA DE LA FACULTAD DE MEDICINA, DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MEXICO, EN DONDE SE REALIZÓ EL PRESENTE TRABAJO CON EL APOYO FINANCIERO DE LOS PROYECTOS: DGAPA IN205396 Y CONACYT 2400PM.

AGRADEZCO AL DR. RAYMUNDO CRUZ ALMANZA DEL INSTITUTO DE QUÍMICA-UNAM POR LAS FACILIDADES OTORGADAS PARA LA REALIZACIÓN DE LAS CONSTANTES ESPECTROSCÓPICAS DE LOS PRODUCTOS OBTENIDOS.

ABREVIATURAS

ADP	Adenosina difosfato
J	Constante de acoplamiento
δ	Desplazamiento químico
DEB	Dietilestilbestrol
Ev	Electro Volts
cm^{-1}	Números de onda
eem	Error estandar de la media
EM	Espectrometría de masa
IR	Espectroscopía de infrarrojo
E ₂	Estradiol
ES	Estrógenos sintéticos
vWF	Factor von Willebrand
ν^{max}	Frecuencia máxima
°C	Grados centígrados
g	Gramo(s)
h	Hora(s)
M ⁺	Ion molecular
HDL	Lipoproteínas de alta densidad
LDL	Lipoproteínas de baja densidad
l	Litro
MHz	Megahertz
μg	Microgramos
μl	Microlitros
mg	Miligramos
ml	Mililitros

mmol	Milimoles
mol	Moles
ppm	Partes por millón
P.M.	Peso molecular
p.f.	Punto de fusión
RMN-H	Resonancia magnética nuclear de hidrógeno
br	Señal ancha
d	Doblete
dd	Señal doble de dobles
M	Múltiplete
s	Singulete
SNC	Sistema nervioso central
sc	Subcutánea
TMS	Tetrametilsilano
t	Triplete
TXA ₂	Tromboxane A ₂
m/z	Unidad de masa-carga

CONTENIDO

	PÁGINAS
I. RESUMEN	3
ABSTRACT	5
II INTRODUCCIÓN	8
1. Antecedentes	17
2. Justificación	24
3. Hipótesis	24
4. Objetivos	25
III MATERIAL Y MÉTODOS	29
1. Métodos químicos	29
2. Métodos farmacológicos	32
IV RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
1. Síntesis química	
a) Síntesis de dedame (VIII)	36
b) Síntesis de dedamán (IX) homólogo derivado del androstano	37
c) Caracterización e identificación de los compuestos sintetizados	37
2. Evaluación farmacológica sobre la coagulación sanguínea	38
a) Comparación del efecto anticoagulante de dedame y pentolame	38
b) Curva dosis-respuesta del dedame en ratón CD ₁ macho.	39
d) Curva dosis-respuesta de dedamán en ratón CD ₁ macho	39

	d) Curso temporal de dedame	40
	3.- Efecto estrogénico de dedame (VIII) en ratón hembra CD₁ adulta	40
	4.- Ritmos estacionales del efecto anticoagulante de dedame (VIII)	42
V	CONCLUSIONES	70
VI	BIBLIOGRAFÍA	72
VII	ESPECTROS	84

I.- RESUMEN

Las evidencias señaladas en la literatura sobre la acción de los estrógenos en los trastornos cardiovasculares, se encuentran divididas en dos sentidos: el primero relacionado al aspecto de que la administración de estas hormonas en humanos para inhibir la ovulación y como tratamiento del cáncer prostático, incrementa la coagulabilidad sanguínea y el riesgo de trombosis, el segundo, basado en que la administración de dosis fisiológicas como sustitutos en la menopausia, tiene un efecto protector. En contraste los 17β -aminoestrógenos cuando se inyectan por vía subcutánea a roedores producen un efecto anticoagulante prolongado (varios días) y de gran magnitud, sin efectos procoagulantes dependientes de la dosis. La sustitución en el carbono 17β por una hidroxiamina, como prolame (IV) [17β -(3'-hidroxi-1'-propilamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol, butolame (V) [17β -(4'-hidroxi-1'-butilamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol, pentolame (VI) [17β -(5'-hidroxi-1'-pentilamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol y hexolame (VII) [17β -(6'-hidroxi-1'-hexilamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol, todos ellos tienen un grupo amino alcohol en la cadena $\text{NH}-(\text{CH}_2)_n\text{-OH}$, y n desde tres hasta seis metilenos, respectivamente. Estos compuestos producen un efecto anticoagulante semejante, en magnitud y duración.

En este trabajo se describe la síntesis, e identificación de un nuevo aminoestrógeno: dedame (VIII) [17β -(N, N-dietilaminoetilamina)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol, con acortamiento en la cadena lateral aminada a dos metilenos, y adición de dos grupos etilo, con objeto de aumentar la liposolubilidad. También se describe la obtención de un homólogo derivado del androstano dedamán (IX) [17β -(N, N-dietilaminoetil)-amino- 5α -androstan- 3β -ol. Este compuesto fue sintetizado con el objeto de ver si el anillo aromático, es necesario para obtener el efecto anticoagulante o si otros esteroides, con el mismo cambio estructural tam-

bién lo presentan. La síntesis se llevó a cabo por los métodos descritos en la literatura, que consisten en dos reacciones: una de adición y otra de reducción, con las que se obtienen los dos compuestos deseados, el aminoestrógeno derivado de la estrona y el aminoandrógeno derivado de la isoandrosterona.

La evaluación farmacológica de dedame, se efectuó en ratón CD₁, macho para el efecto anticoagulante y en hembra para el efecto estrogénico. Los resultados obtenidos con dedame demuestran que este compuesto tiene un efecto dosis-dependiente, de gran magnitud sobre el tiempo de coagulación total, efecto que va disminuyendo paulatinamente y es estadísticamente significativo hasta las 72 horas. En cambio el homólogo derivado del androstano no afecta a la coagulación sanguínea, ni aún a dosis al doble de las utilizados para el dedame.

El efecto estrogénico del dedame fue evaluado por cornificación vaginal en ratón CD₁ hembra adulta con peso corporal de 25-30g y por efecto uterotrópico en ratón CD₁ hembra infantil con peso corporal de 10-13g . En ambos casos el efecto estrogénico fue menor que el que presenta el estradiol, comparado en dosis equimoleculares.

El efecto anticoagulante del dedame fue estudiado en las diferentes estaciones del año: primavera, verano, otoño e invierno. En cada una de ellas se observó un efecto anticoagulante dosis-dependiente de + 68 a + 92 % ($P < 0.05$). La dosis de 8 mg/100g estudiada en invierno, es la que presenta el mayor efecto anticoagulante, y perdura hasta 72 horas, con significancia estadística.

El efecto anticoagulante prolongado y la ausencia de una fase procoagulante, sugiere que el dedame puede ser útil en el tratamiento del cáncer prostático y síndrome climatérico, así como componente estrogénico de los anticonceptivos, reduciéndose el riesgo de eventos tromboembólicos.

ABSTRACT

The evidence cited in the literature provides arguments for two contrasting schools of thought. The first is related to the observation that administration of estrogens increases blood coagulability and risk of thrombosis when high doses of these substances are used in the preparation of anticonceptives, and prostatic cancer. However, a second series of observations show that these hormones provide a preventive effect against cardiovascular disease, particularly when are administered as substitutes after menopause.

In contrast, various 17β -amino-estrogens administered subcutaneously, produce prolonged dose-dependent increases in blood clotting time that last several days without procoagulant effect in rats and mice. To learn whether the structure of the steroid attached to the amino side-chain is important for the anticoagulant effect, and as a part of our studies of structure-activity relationships, different steroids have been substituted in the 17β position for a hydroxylamine like prolame (IV) [17β -(3'-hydroxy-1'-propilamina)-1,3,5(10)-estratrien-ol], including butolame (V) [17β -(4'-hydroxy-1'-butilamina)-1,3,5(10)-estratrien-ol], pentolame (VI) [17β -(5'-hydroxy-1'-pentilamina)-1,3,5(10)-estratrien-ol], and hexolame (VII) [17β -(6'-hydroxy-1'-hexilamina)-1,3,5(10)-estratrien-ol] ⁽⁹²⁾. These compounds have an amino alcohol side chain-NH-(CH₂)_n-OH at C-17 with 3 to 6 methylenes, respectively and lengthen blood clotting times in laboratory animals. In this study the synthesis of two new 17β -aminoesteroids is described and proof of chemical purity was established by normal spectral analysis (IR, NMR, MS.). They are dedame (VIII), [17β -(N,N-diethylaminoethyl)-amino-1,3,5(10)-estratrien-3-ol] and the corresponding androgen analogue dedaman (IX), [17β -(N,N-diethylaminoethyl)-amino-5 α -androstan-3 β -ol]. The anticoagulant activity of

two new compounds with the same side-chain is reported. A single subcutaneous injection of dedame (VIII) in male mice produced sustained dose-dependent increases in blood clotting time which could be observed even after 3 days. On the fourth day no significant effects were observed. The estrogenic action was assessed by the vaginal cornification in adult ovariectomized mice CD₁ (body weights 25-30 g), and increases in uterine weight test in infantile animals (21 days old, body weights 10-14 g). It produces vaginal cornification and uterine weight, which are of shorter duration and smaller of magnitude than those of estradiol. The dedaman study would therefore seem to provide information regarding the influence of aromaticity of ring A on the anticoagulant activity of 17 β -aminoestrogens, this compound had no anticoagulant activity at equivalent doses. Thus, aromaticity of the ring appears to be important for anticoagulant activity. The effect of dedame (VIII) on the blood clotting time was studied in spring, summer, autumn and winter when it was administered as a single subcutaneous injection in corn oil, it produced dose-dependent lengthening of blood clotting time in all seasons after 24 hours. The effect of a single subcutaneous injection of the larger doses (8 mg/100g) of dedame (VIII) studied in winter could still be observed after 72 hours.

The prolonged anticoagulant effects, and the apparent absence of a procoagulant phase, suggest that these 17 β -aminoestrogens may be useful in the treatment of prostatic cancer, the menopausal syndrome, or as the estrogenic components of contraceptives; they would probably reduce, instead of increase, the risk of thromboembolic accidents.

II. INTRODUCCIÓN

Las alteraciones en la coagulación sanguínea son sin duda las determinantes más importantes en la génesis de la trombosis. La asociación entre la hipercoagulabilidad sanguínea y enfermedades tromboembólicas es extensa e inequívoca. Numerosos autores en diversos trabajos han demostrado que la administración de estrógenos a humanos producen cambios marcados en la coagulación de la sangre ⁽¹⁻¹²⁾

La sangre se encuentra en constante equilibrio entre los factores procoagulantes, los anticoagulantes y la actividad fibrinolítica. Que la sangre coagule o no, dependerá de cómo se mantenga este equilibrio.

Los mecanismos procoagulantes son: perturbación del endotelio (pérdida de las células y exposición del subendotelio); activación de las plaquetas (interacción con colágena o subendotelio); la coagulación sanguínea, se precipita por (aumento de los factores, viscosidad y flujo); inhibición del sistema fibrinolítico.

Los mecanismos anticoagulantes o protectores son: endotelio intacto; neutralización de la activación de los factores de la coagulación por componentes como heparina o trombomodulina; inhibición de los factores de la coagulación por proteasas; disminución de la actividad de los factores de la coagulación y agregación plaquetaria; depuración de los factores de la coagulación por el hígado; disolución de trombos de fibrina, por el sistema fibrinolítico. Evidencias señaladas en la literatura con relación a los efectos que producen los estrógenos en la coagulación sanguínea, cuando hay un aumento en la concentración plasmática de los mismos, en estados tales, como en el embarazo, durante la ovulación o cuando se administran estrógenos sintéticos (ES), en terapia anticonceptiva, menopausia o en el tratamiento del cáncer prostático ^(3,5), se encuentran divididas en dos sentidos: uno relacionada a la

trombogénesis y complicaciones cardiovasculares y el otro en relación al efecto protector contra las enfermedades cardiovasculares, a continuación se describen algunos aspectos que fundamentan estos dos aspectos.

Trombogénesis relacionada a complicaciones cardiovasculares

La mayor parte de los autores relacionan la asociación de estrógenos y el estado de hipercoagulabilidad tales como: complicaciones cardiovasculares serias que incluyen eventos oclusivos cerebro vasculares, trombosis arterio-venosa, infarto del miocardio. En dichos trabajos se señala que existe una relación directa entre la dosis de ES e hipercoagulabilidad sanguínea ⁽¹⁰⁻¹²⁾; los estrógenos, afectan a la mayoría de los mecanismos que intervienen en la coagulación de la sangre de la siguiente manera:

1) Daño en la pared de los vasos.

El daño en el endotelio va seguido de la formación de trombos, que puede ser por: traumas físicos (mecánico, eléctrico y térmico); elementos liberados por las plaquetas y leucocitos que interaccionan con las plaquetas y la pared; microorganismos, que ocurre directamente por bacterias o estados virales; inmunológico, por la actividad de anticuerpos directamente sobre el endotelio o por material liberado de las plaquetas y leucocitos como resultado de la interacción del compuesto antígeno-anticuerpo circulante que se forma; sustancias como: epinefrina que provoca liberación de ADP, vitamina D en dosis tóxicas; anticonceptivos, por aumento o disminución del flujo sanguíneo, ya que en ambos casos se presenta daño endotelial ⁽¹³⁾.

Varios autores ^(13,17) sostienen que la coagulación sanguínea no se realiza cuando el endotelio está intacto. Estos autores produjeron daño sin desprendimiento de la membrana basal en las células endoteliales de la vena femoral de ratas y ocasionaron el depósito de trombina, ⁽¹⁷⁻¹⁹⁾ ellos sostienen que el componente estrogénico que contiene los anticonceptivos es el factor

más importante que afecta la pared de los vasos sanguíneos, produciendo vasodilatación, reducción del flujo sanguíneo y estasis; además pérdida del tono del músculo liso en la capa media, disminución de la elasticidad e hiperplasia de la íntima. La estasis es potencialmente trombogénica, porque impide la circulación de los factores de la coagulación que mezclados con los inhibidores producen acidosis local, que aumenta la tendencia hacia la coagulación sanguínea ⁽²⁰⁾. La vasodilatación, reducción del flujo, estasis, y acidosis local son factores potencialmente trombogénicos ⁽¹³⁻¹⁵⁾⁽²¹⁾.

Los estudios epidemiológicos sugieren que el riesgo de eventos tromboembólicos es pequeña o no aumenta en no fumadores ⁽²²⁾ y que la mitad de los infartos del miocardio en mujeres jóvenes o de mediana edad son atribuibles a su asociación con tabaquismo. La presencia de otros factores ⁽²³⁻²³⁾ como: edad, hipertensión sistémica, diabetes mellitus, alcohol, obesidad, hiperlipidemia ⁽²⁵⁻²⁶⁾ y otros, tiene menor influencia en la producción de trombosis que la asociación de anticonceptivos y cigarrillo.

2) Alteración en la conducta plaquetaria.

Las plaquetas se adhieren al subendotelio de venas arterias y capilares cuando la capa es removida, con ayuda de células rojas y Ca^{++} presente en el fluido. Otros agentes que alteran a la conducta plaquetaria pueden ser: interacción con ADP, colágena, trombina, ácidos grasos, bacterias y virus, complejos antígeno-anticuerpo, tromboxano A_2 , epinefrina y fibrinógeno ⁽²⁷⁻³¹⁾. Todos estos agonistas participan en la agregación plaquetaria actuando a través de los mecanismos comunes que involucran la elevación en la concentración de calcio ionizado, acciones que son fundamentalmente trombogénicas.

Algunos autores ⁽³²⁾ encontraron que pacientes que únicamente tomaban progestágenos, como acetato de clomadinona, no presentan anormalidad plaquetaria, en cambio con el uso de estrógenos sintéticos se causa incremento en la movilidad y se han detectado proteínas de

baja densidad en la fracción de lecitina del plasma, que probablemente sea la causa de la conducta electroforética anormal de las plaquetas. Estudios similares ⁽³³⁻³⁵⁾ pero independientes mostraron los mismos resultados, y encontraron aumento en la adhesividad plaquetaria después de cirugía, traumatismos y mujeres bajo tratamiento anticonceptivo ^(36,77).

3) Coagulación Sanguínea.

Los mecanismos de la coagulación sanguínea se realizan a través de una serie de pasos enzimáticos que dan como resultado la activación de los factores de la coagulación, tanto a través del camino intrínseco, como del extrínseco y termina con la formación de fibrina. A los factores que estimulan la coagulación se les da el nombre de procoagulantes y a los que la inhiben de anticoagulantes ⁽³⁸⁾. Que la sangre coagule o no depende del equilibrio entre estos dos factores.

Se ha descrito ⁽³⁹⁾ que la administración de ES en las dosis que contienen los anticonceptivos, producen aumentos en las concentraciones circulantes plasmáticas de los factores tanto del camino intrínseco como extrínseco. El hematocrito y los niveles de fibrinógeno aumentan por lo que se eleva la viscosidad sanguínea ⁽⁴⁰⁾. El daño en la pared de los vasos también expone a la coagulación sanguínea por interacciones con el endotelio. El tiempo de tratamiento hormonal parece ser un factor importante, ya que si no se administran en forma crónica (más de 6 meses) no se pueden demostrar estas elevaciones ⁽⁴¹⁾. Sin embargo, los niveles se normalizan cuando se disminuye el tratamiento o se suspende dando compuestos que solamente contienen progestágenos. Los factores aumentados por la administración de estrógenos son: fibrinógeno (I), molécula de gran tamaño con peso molecular de 340,000, formada por tres cadenas de polipéptidos A α , B β y gamma con peso molecular de 67,600, 52,300, y 48,900 respectivamente, que se sintetiza en el hígado, cuya concentración plasmática es de 300mg/dl, y su tiempo de vida media de 3 días. Su efecto principal es ser el pre-

cursor de la fibrina ⁽⁴²⁾. En el embarazo normalmente existe un incremento en los niveles de fibrinógeno, aumenta gradualmente a partir del tercer mes de 350 a 650 mg/dl, en forma similar ocurre con la administración de terapia anticonceptiva ⁽⁴³⁾. El aumento del factor protrombina (II), que es una α_2 -proteína sintetizada en el hígado cuando la vitamina K está disponible con peso molecular de 71,600 que se encuentra en concentración de 80 mg/L, su tiempo de vida media es variable, ha sido estimada en 1 a 3 días. A través de procesos enzimáticos la trombina, ⁽⁴⁴⁾ enzima proteolítica, transforma al fibrinógeno en fibrina. El proconvertin, factor (VII) de la coagulación es una glicoproteína con acción limitada al camino extrínseco, sintetizada a partir de la vitamina K en el hígado, su peso molecular está estimado en 50,000 y el tiempo de vida media en 4 a 5 días ⁽⁴²⁾. El factor antihemofílico (VIII), es una glicoproteína es sintetizada en el hígado que está presente en el plasma como complejo no-covalente con el factor Von Wildebraum (vWF) y su función en la coagulación es acelerar al factor IXa para que active el factor X y se convierta en factor Xa, su ausencia o disminución produce la hemofilia A o B, que se identifica por estados hemorrágicos ^(42,45). El factor de Christmas (IX), es sintetizado en el hígado a partir de la vitamina K, con peso molecular es de 57,000 y su acción es la de activar al factor X con la presencia de calcio. Cuando hay deficiencias se presenta un estado de hipocoagulabilidad que se conoce como la enfermedad de Christmas ⁽⁴²⁾. El factor de Stuart o Prower (X), juega un importante papel en la coagulación sanguínea ya que es activado por el camino intrínseco y extrínseco, sintetizado en el hígado a partir de la vitamina K. Su peso molecular es de 58,800, y secretado al plasma. Su tiempo de vida media es de 35 a 60 horas y su acción en la coagulación, es la de convertir a la protrombina en trombina ⁽⁴²⁾. El Hageman (XII), es una sola cadena de β -globulina, con peso molecular de 76,000, se encuentra presente en concentración de 30 μ g/ml, y responsable de la activación a través del camino intrínseco de la coagulación sanguínea ⁽⁴²⁻⁴⁶⁾. El efecto de los anticonceptivos orales en la hemostasia ⁽⁴⁷⁻⁴⁸⁾ está relacionado

con la concentración del componente estrogénico (etinil-estradiol), que contienen los anti-conceptivos y que responden a un efecto dosis-dependiente ⁽⁴⁷⁾. Se detectan aumentos en los niveles plasmáticos del factor IX durante el embarazo o cuando se administran grandes dosis de dietilestilbestrol (DEB), o hexestrol para suprimir la lactancia ⁽⁴¹⁾, y los aumentos de los factores factor VII y X, se detectan en mujeres con tratamiento hormonal por más de seis meses.

4) Mecanismos protectores

La trombosis clínicamente significativa, es prevenida por una serie de integrantes de la pared de los vasos y mecanismos protectores que incluyen: inestabilidad de los factores de la coagulación; inactivación por inhibidores circulantes (antitrombina III, proteína C y S); ADP-easas del plasma; inhibición hepática; sistema retículo endotelial; y sistema fibrinolítico. Los anticonceptivos que contienen etinil-estradiol o mestranol como componente estrogénico, (50 µg), reducen las concentraciones de antitrombina III, y ésta no se modifica con los estrógenos equinos conjugados ⁽⁴⁹⁾. La antitrombina III es una α_2 -globulina y, sin lugar a duda, el factor anticoagulante más importante como protector contra la trombosis, su efecto más importante es que inactiva a la trombina, por lo que niveles reducidos de antitrombina III, generan un aumento de las concentraciones plasmáticas de trombina considerada potencialmente trombogénica ya que es uno de los factores que precipitan de la hipercoagulabilidad. Se sabe que familias con historia de niveles bajos de antitrombina III, proteína C y S ⁽⁵⁰⁾, presentan frecuentemente eventos obstructivos tromboembólicos, durante el embarazo, en el período post-parto o después de un aborto ⁽⁵¹⁻⁵⁶⁾. La proteína C, es una glicoproteína dependiente de la vitamina K, con peso molecular de 62,000 y su concentración plasmática es de 4 mg/L su tiempo de vida media de aproximadamente 10 horas ⁽⁴²⁾. El factor más estudiado responsable de su activación es la trombina a su vez activada por trombomodulina en ausen-

cia de ésta el proceso es extremadamente lento y aumentado por la presencia de iones calcio. Actúa como anticoagulante que degrada en forma activa, ayudada por su cofactor la proteína S, a los factores de la coagulación V y VIII. Su deficiencia puede desarrollar trombosis cerebral o mesentérica. La proteína S plasmática es una sola cadena proteínica con peso molecular de 69,000 que necesita de la vitamina K y una carboxilasa para su biosíntesis en el hígado, es el co-factor de la proteína C activada en la inactivación de los factores de la coagulación V y VIII. Su deficiencia es asociada a un aumento de tromboembolismo ⁽⁵⁹⁻⁶⁹⁾.

5) Sistema fibrinolítico.

Cuando se forma un coágulo gran cantidad de plasminógeno (proteína plasmática) se incorpora al mismo junto con otras proteínas plasmáticas, la lisis no se produce, si el plasminógeno no es activado, pero los tejidos contiene sustancias que liberan al activador del plasminógeno (t-PA), transformando el plasminógeno en plasmina, enzima proteolítica que digiere los anillos de fibrina, fibrinógeno, protrombina, factor V, VIII y XII. De tal manera, que siempre que se forma plasmina, puede causar la lisis en un coágulo por destrucción de los factores de la coagulación. Los coágulos formados en los tejidos se disuelven más fácilmente, que los intravasculares ⁽⁷⁰⁾. El t-PA se sintetiza y es almacenado en las células epiteliales de la pared de los vasos y es liberado en respuesta a varios estímulos.

La activación de los sistemas de coagulación dependen del balance entre éstos y el funcionamiento normal fibrinolítico, mecanismo protector que previene la trombosis. Evidencias clínicas apoyan el concepto de que los defectos en la fibrinólisis son determinantes para la formación de coágulos. La menor actividad lítica en las venas de las extremidades inferiores, comparativamente con la de los superiores, incrementa la incidencia de trombosis en los miembros inferiores ⁽⁷¹⁻⁷³⁾. La disminución de la actividad del sistema fibrinolítico está relacionada a reducción en los niveles del activador del t-PA, ⁽⁷⁴⁻⁷⁶⁾ pero también a un aumento

en la concentración de antiplasmina ⁽⁷⁵⁾. Los ES disminuyen esta actividad, porque producen aumentos en los niveles de antiplasmina y disminución del activador del plasminógeno. Estos cambios impiden el equilibrio de la sangre y se propicie un estado de hipercoagulabilidad que favorece la trombogénesis. Este riesgo aumenta con la presencia de otros factores como: edad, hipertensión arterial sistémica, diabetes mellitus, alcohol, obesidad, hiperlipidemia, pero sobre todo el consumo de cigarrillos ⁽²¹⁻²²⁾.

Efecto protector contra las enfermedades cardiovasculares

Los estrógenos naturales tienen efecto protector contra las enfermedades cardiovasculares, y cuando se administran como substitutos en la menopausia a dosis fisiológicas. ⁽⁷⁷⁻⁸⁵⁾. En concentraciones bajas, estas hormonas aumentan los niveles de lipoproteínas de alta densidad (HDL), factor considerado como cardioprotector. La administración de estradiol (E_2) ⁽⁸¹⁻⁸⁴⁾, en concentraciones bajas y por una acción selectiva, aumenta los niveles de HDL en el plasma evitando su oxidación. ⁽⁷⁸⁾. En contraste, dosis farmacológicas inhiben, *in vitro*, la incorporación de oxígeno en las lipoproteínas de baja densidad (LDL-colesterol), aumentando su concentración plasmática, este factor es considerado trombogénico. Ningún andrógeno o progestina tienen estas acciones. A la interacción específica entre E_2 y HDL, se atribuye la protección antioxidante que preserva la función de HDL aumentando sus niveles. Estudios recientes ⁽⁷⁹⁾ demostraron que el remplazo estrogénico en la menopausia disminuyen la incidencia de aterosclerosis inhibiendo el daño en la íntima de la carótida en modelos de ratas y ratón tratados con E_2 y postulan la hipótesis de que los estrógenos aceleran la reparación endotelial *in vivo*, en modelos de animales y probablemente también tengan esta función benéfica en humanos. Otros aspectos útiles de la terapia estrogénica se basa en su efecto vasodilatador e inhibidor de la agregación plaquetaria al actuar sobre la pared de los vasos e indirectamente a través de la liberación de mediadores químicos, aumentando la producción

de prostaciclina, sustancia con acción vasodilatadora que inhibe la agregación plaquetaria. Disminuye la producción de tromboxano A_2 con acción antagónica ya que ocasiona vasoconstricción y agregación plaquetaria ⁽⁸²⁻⁸⁶⁾. La administración de 17β -estradiol aumenta el flujo sanguíneo periférico en mujeres post-menopáusicas, aunque su mecanismo no se ha definido claramente. Estas acciones pueden explicar algunos de los efectos protectores favorables que se manifiestan en el sistema cardiovascular.

Se estudiaron ⁽⁸⁷⁾ pacientes con terapia de anticonceptivos orales administrados en dosis bajas de 20 μg de etinil-estradiol y 150 μg de desogestrol por día, contra dosis de 50 μg de etinil-estradiol y 125 μg de desogestrol y evaluaron su efecto en la coagulación sanguínea los días 17 y 21 del ciclo menstrual; se observó aumento en los depósitos de fibrina en el subendotelio vascular cuando usaron dosis elevadas y cambios no significativos con las dosis bajas, las tomas elevadas de etinil-estradiol, en los anticonceptivos, ocasionan incrementos en las interacciones de fibrina endotelio con mayor riesgo de tromboembolismo.

1.- ANTECEDENTES:

Estudios en animales

Estudios desarrollados por nuestro grupo ⁽⁸⁸⁾ en *animales de laboratorio*, mostraron que la administración intraperitoneal de 17 β -estradiol, estrona, o estrógenos equinos conjugados a ratón macho CD₁, producen después de una latencia variable un efecto bifásico sobre la coagulación sanguínea. Inicialmente se observa una acción anticoagulante de duración breve entre 3 a 7.5 horas, seguida de otra procoagulante más prolongada que puede ser hasta de varios días. La magnitud de la acción depende de cada hormona particular, así como de la concentración de la misma, por ejemplo, los estrógenos equinos conjugados empleados diariamente por tres días en dosis bajas de 20 mg/kg, producen acortamiento en el tiempo de coagulación de (-15 % P < 0.004), en cambio con dosis de 100 mg/kg, se observa el efecto contrario (+ 21 % P < 0.0001). El estradiol administrado en las mismas dosis de 20 mg/kg (+21 % P < 0.006), y con dosis de 100 mg/kg, se produce un acortamiento en el tiempo de coagulación total de (-14 % P < 0.03). El efecto bifásico de los estrógenos en el tiempo de coagulación es similar al que presenta la administración de E₂ en la concentración de colesterol en suero o el de la adrenalina en la presión arterial. Es decir la magnitud de la dosis y cada hormona en particular, puede ser un hecho determinante en el balance riesgo beneficio.

Aminoesteroides

En comunicaciones anteriores ⁽⁸⁹⁻⁹⁵⁾, se informó que cambios estructurales en el carbono 17 del estradiol, por un grupo amino, producen un efecto anticoagulante prolongado (varios días), y de gran magnitud cuando se administran por vía subcutánea a roedores. El primer compuesto de este tipo fue el N-(3-hidroxiestra-1,3,5(10)-triene-17 β)-1.3-propilendiamino.

prodiame (II) (Fig. 1), que produce en ratones machos CD₁ un alargamiento de 95 % del tiempo de coagulación total, 24 horas después de la tercera inyección por vía subcutánea. El efecto va disminuyendo lentamente, a las 48 horas es de 33 % ($P < 0.002$), y a las 72 hs del 28 % ($P < 0.02$), sin provocar alteraciones hipercoagulantes, dependientes de la dosis. Sin embargo, las dosis requeridas (36 mg/100g) para observar este efecto biológico, ocasionan efectos indeseables sobre el sistema nervioso central (SNC) con incremento de la actividad motora y convulsiones⁽⁸⁹⁾. En trabajos recientes, estos mismos autores⁽⁹¹⁻⁹⁵⁾, continuando con el estudio sobre la relación estructura química-actividad biológica de estos estrógenos, encontraron que la sustitución en el carbono 17 por una alquilamina: N-(3-hidroxi-1,3,5(10)-estratrien-17 β -ilo)-butilamine. Buame (III), (Fig. 1)⁽⁹⁵⁾ presenta un prolongación en el tiempo de coagulación total de 51 % ($P < 0.01$), la duración de su efecto después de una sola administración s. c. a ratones machos CD₁ va disminuyendo del primer al cuarto día, la diferencia es significativa hasta las 72 horas. O bien un hidroxiamina: [17 β -(3'-hidroxi-1'-propilamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol] prolame (IV), que se muestra en la Figura 2⁽⁹¹⁾, produjo un compuesto de mayor potencia anticoagulante que la observada con el prodiame (II), sin los efectos neurotóxicos. El efecto anticoagulante se determinó en ratón macho CD₁, rata Wistar adulta e infantil, y en todos los casos se observó un alargamiento en el tiempo de coagulación total de 75 % ($P < 0.01$) a las 24 h, la duración anticoagulante va disminuyendo y es estadísticamente significativa hasta las 72 horas. La longitud de la cadena aminada en el carbono 17, desde 3 metilenos, puede ser aumentada a seis sin que el efecto anticoagulante se pierda. Los resultados obtenidos con el homólogo, con 4 metilenos en la cadena lateral: [17 β -(4'-hidroxi-1'-butilamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol], butolame (V), (Fig. 2)⁽⁹³⁾, fue probada en forma similar a la anterior, en ratón macho CD₁, después de una sola administración s. c. presentó un aumento en el tiempo de coagulación total de +54 % ($P = 0.01$) a las 24 h, y va disminuyendo gradualmente a las 48 h (+50 %), siendo significativo hasta el tercer

día, con disminución de 25 % y 16 % (n.s.). El aumento a 5 metilenos dio el compuesto: [17 β -(5'-hidroxi-1'-pentilamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol], pentolame (VI), (Fig. 2) ⁽⁹³⁾, produjo con una sola dosis (8mg/100g), después de 24 h de su administración 86 % (P < 0.01), el efecto va disminuyendo lentamente de 81 %, a 28 % (P=0.006) a las 96 horas. El alargamiento de la cadena a 6 metilenos: [N-(3-hidroxi-1,3,5(10)-estratrien-17 β -yl)-6-hidroxihexilamino], hexolame (VII), (Fig. 2) ⁽⁹²⁾, también fueron estudiado en ratón CD₁ adulto y rata Wistar infantil administrando el producto por vía sc con dosis de 1, 2, 4 y 8 mg/100g. La determinación del tiempo de coagulación total fue medido 24 hs después y produjo un alargamiento del tiempo de coagulación en ratón de + 62 % (P < 0.01), en rata infantil de + 36 % (P < 0.01). La duración del efecto medido en los días 1, 2, 3 y 4, después de la inyección, siendo estadísticamente significativa la diferencia comparada con el grupo control, solamente a las 24 horas, y va disminuyendo paulatinamente hasta el tercer día de (+ 13 % n.s.).

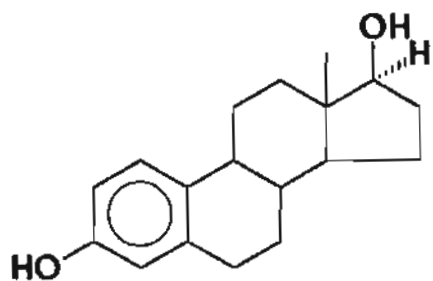
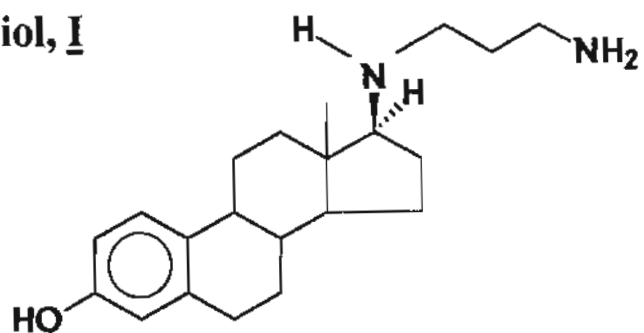
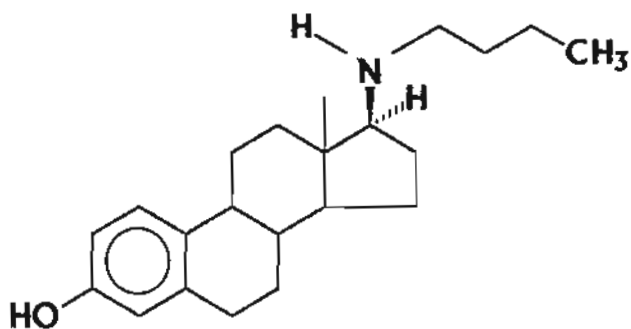
Sobre la acción estrogénica de estos compuestos, podemos decir que el butolame (V) y hexolame (VII) producen efectos menores que el prolame (IV) y pentolame(VI), pero los cuatro compuestos presentan menor efecto estrogénico que el estradiol, con el cual fueron comparados. ⁽⁹¹⁻⁹³⁾

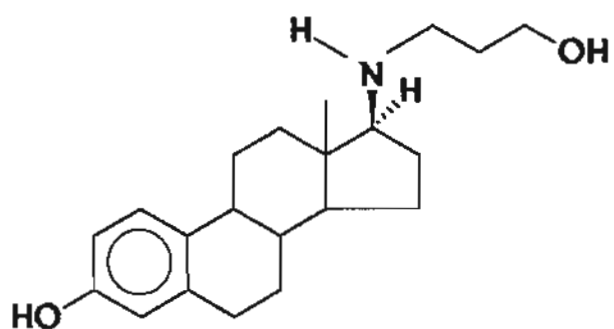
Todos estos compuestos homólogos (Fig. 2), comparten la actividad anticoagulante en forma semejante tanto en magnitud como en duración. La administración de una sola dosis, produce alteraciones en el ratón que pueden ser observadas, aún después de 72 horas (30 % P < 0.05). Esta última serie de estrógenos tienen efectos anticoagulantes 10 veces más potentes que las del primer compuesto estudiado de este grupo.

Ritmos Biológicos

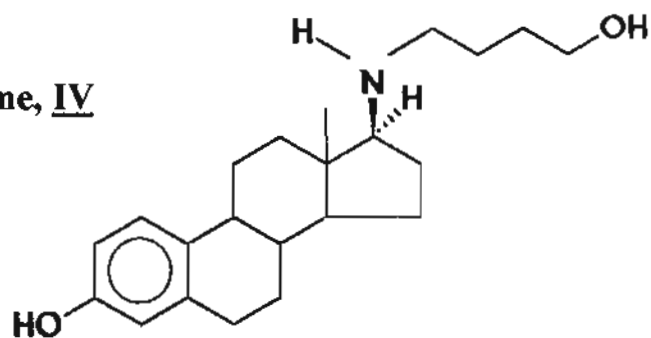
En el curso de nuestras investigaciones sobre aminoestrógenos y tiempo de coagulación total, detectamos que existen cambios en las diferentes estaciones del año, de tal manera que no se puede comparar un estudio efectuado en una estación, con otro ensayo realizado en otra, lo que motivó nuestro interés por este trabajo. Las variaciones de los ritmos biológicos se presentan por luz/obscuridad, fueron descritos por primera vez por el astrónomo francés Jean-Jacques de Mairan, en 1729⁽⁹⁶⁾. El estudio de los ritmos biológicos se ha convertido en una nueva, fascinante e importante área de la medicina (cronobiología). Se piensa que el tiempo gobierna la fisiopatología y el tratamiento de las enfermedades, porque todas las funciones biológicas incluyendo células, tejidos, órganos y el cuerpo entero siguen un ciclo de actividad y función, que pueden ser: ritmos circadianos (que se aproxima a las 24 horas), ultradianos (período inferior a 6 horas y mayor de 30 minutos), infradianos (período de más de 28 horas y menos de 6 días), anuales (se aproximan al año sideral), estacionales (en las diferentes estaciones del año). Otra clasificación los ordena en ritmos de frecuencia baja, media y alta. Los de frecuencia baja tienen períodos desde 6 días hasta varios años (circalunares, circaestacionales, circaanuales). Los ritmos de frecuencia media son los que tienen períodos entre 30 minutos y 6 días (ultradianos, infradianos y circadianos), los de frecuencia alta tienen períodos entre 0.5 milisegundos hasta 30 minutos (respiración, ritmo cardíaco, actividad neuronal). Dependiendo del tiempo y del tratamiento, las enfermedades deben ser vistas con este cambio de mentalidad tenemos por ejemplo, muy temprano en la mañana la frecuencia cardíaca y la presión arterial aumentan bruscamente, así como la agregación plaquetaria y otros factores de la coagulación⁽⁹⁶⁻¹⁰³⁾. Los ritmos biológicos producen alteraciones que ocurren diariamente. Cambios similares a los circadianos se han observado en las diferentes estaciones del año, variaciones generadas por el reloj circanual en forma independiente a la influencia de la liberación de hormonas.

Las variaciones estacionales, observadas por nosotros en el tiempo de coagulación total, efectuados en ratones machos CD₁, siguen el reloj circanual, que también se ha demostrado en las exacerbaciones de asma, que ocurren frecuentemente durante ciertas estaciones, y en la prevalencia de ciertos desórdenes psiquiátricos ⁽¹⁰³⁾ que han sido ligados con cambios estacionales ⁽¹⁰¹⁻¹⁰³⁾.

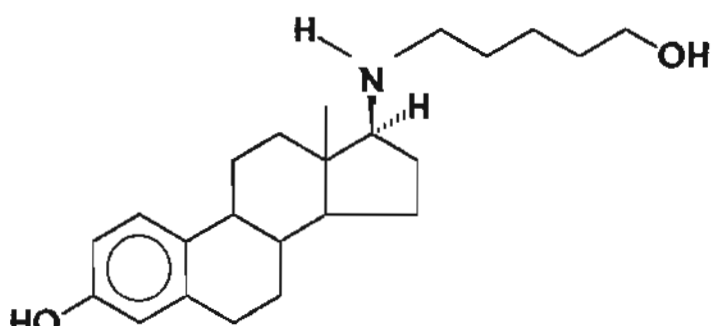
**Estradiol, I****Prodiame, II****Buame, III****FIGURA 1: Estradiol y Amino estrógenos**



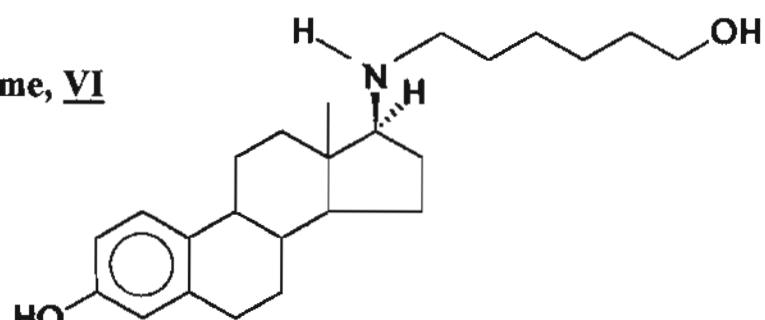
Prolame, IV



Butolame, V



Pentolame, VI



Hexolame, VII

FIGURA 2: Serie homóloga de aminoestrógenos

2.- JUSTIFICACIÓN:

El uso de estrógenos, para inhibir la ovulación o como tratamiento del cáncer prostático, produce efectos secundarios principalmente trombogénicos y feminizantes. Encontrar un estrógeno que prolongue el tiempo de coagulación, sería una aportación valiosa ya que evitaría las acciones mencionadas. En estudios anteriores hemos informado el poder anticoagulante de los 17β -amino estrógenos, cuando se administran a roedores, y tienen menor actividad estrogénica que el 17β -estradiol. Esta actividad depende de su estructura química el grupo amino sustituido en el carbono 17 es un requerimiento estructural necesario para que se presente este efecto, sin embargo, es necesario continuar la investigación en la línea de relación estructura química-actividad biológica.

3.-HIPÓTESIS:

La reducción de un metileno de la cadena lateral del grupo amino no afecta la actividad anticoagulante y estrogénica de los 17β -aminoestrógenos .

La adición de dos grupos etilo en el amino terminal aumentan la liposolubilidad de estos compuestos.

El anillo aromático de los aminoestrógenos es indispensable para los efectos anticoagulantes y estrogénicos

4.- OBJETIVOS:

1.- Obtención por medio de síntesis química de los siguientes 17β -aminoesteroides cuyas fórmulas están a continuación.

a).- 17β -(N, N-dietilaminaetilamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol. (Compuesto VIII)

Con acortamiento de un metileno y adición de dos etilos en el grupo amino terminal (Fig. 3 y Esquema I)

b).- 17β -(N, N-dietilaminoetilamino)- 5α -androstano-3-ol. (Compuesto IX)

Con acortamiento de un metileno, y adición de 2 etilos en el grupo Amino terminal. Ausencia del anillo aromático, por ser un derivado del androstano. (Fig. 3 y Esquema II).

2.-Caracterización e identificación de dichos compuestos

a) Métodos espectroscópicos comunes: Infrarrojos, (IR), Resonancia Magnética Nuclear de hidrógeno (RMN-H), y Espectrometría de masas (EM).

b) Análisis elemental

3.- Evaluación del efecto anticoagulante de los compuestos obtenidos.

4.- Determinación de la actividad estrogénica de dedame (VIII), obtenido.

5.-Estudio sobre la influencia de los ritmos biológicos en la actividad anticoagulante del dedame (VIII)

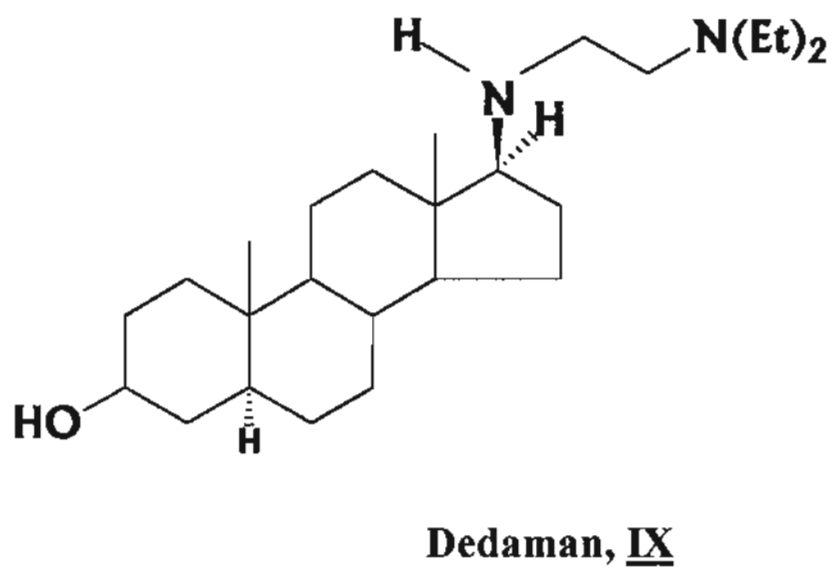
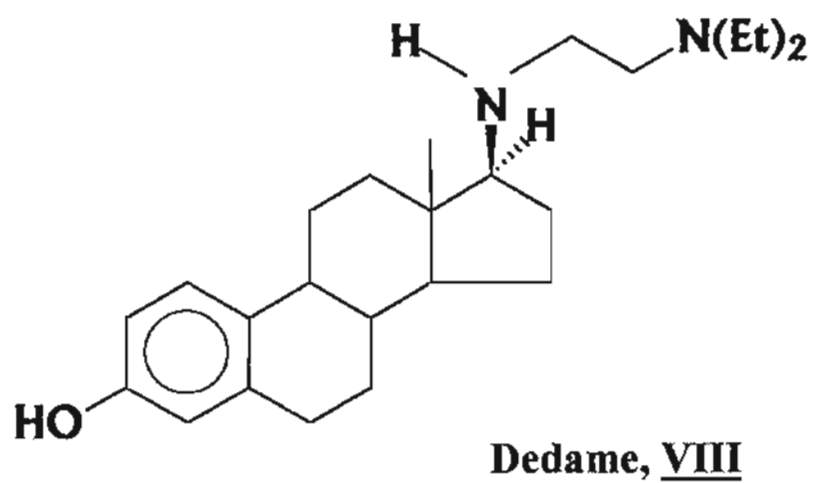
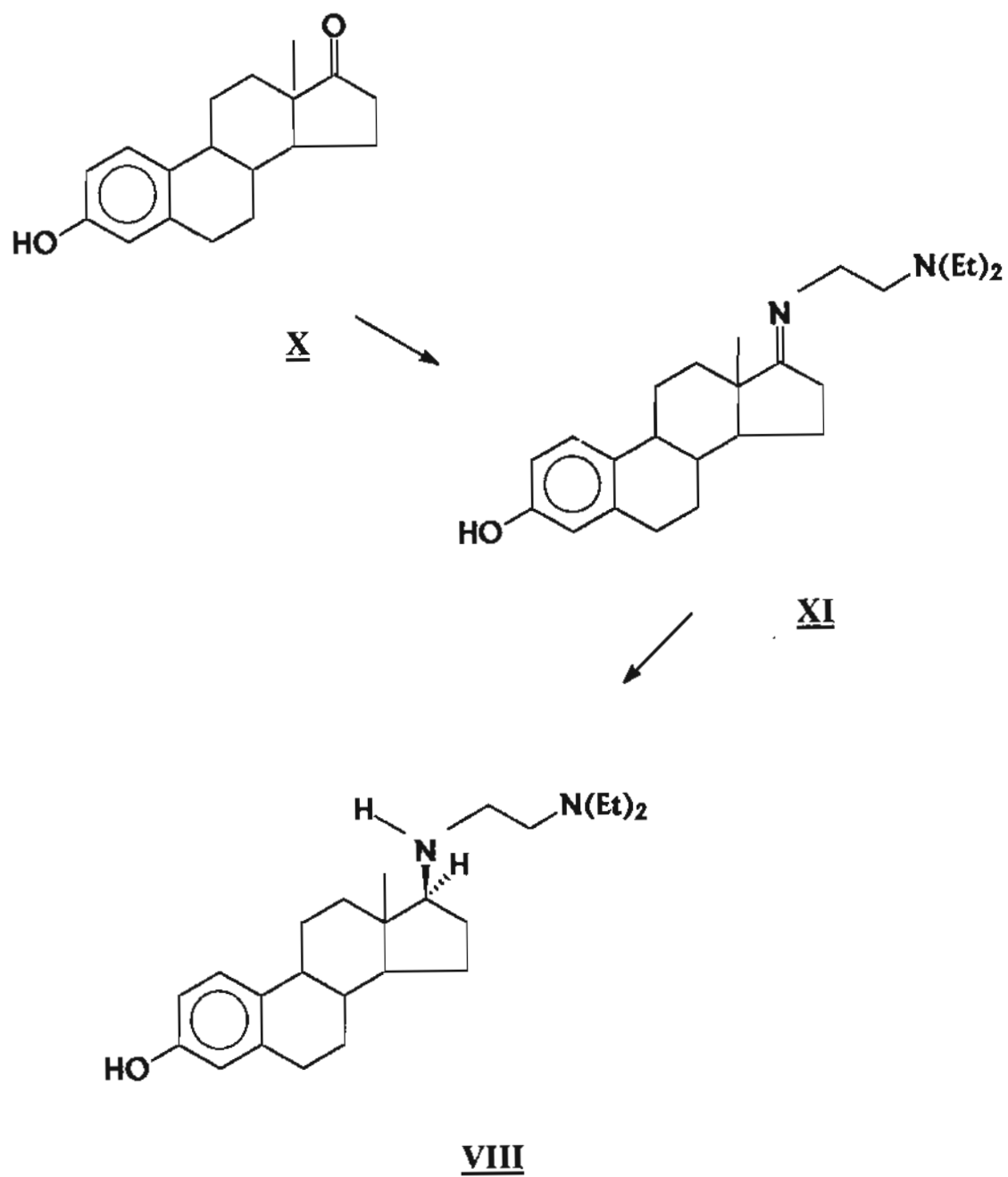
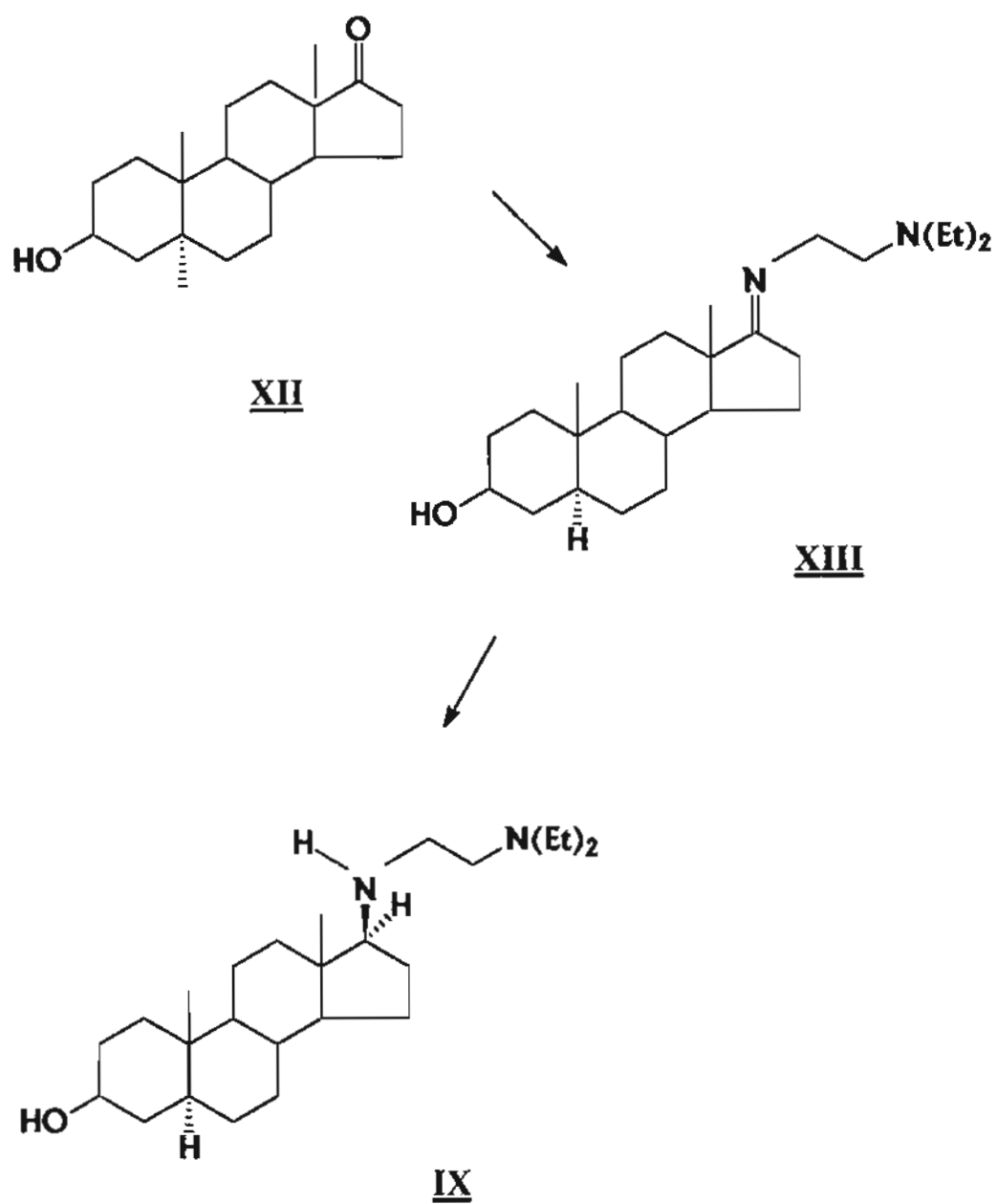


FIGURA 3: Amino estrógenos propuestos



ESQUEMA I: Síntesis del 17β-(N,N-dietilamino)estradiol



ESQUEMA II: Síntesis del 17β-diethylaminoetilamino)-5α-androstan-3β-ol

III. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Métodos químicos:

Los disolventes y reactivos utilizados, fueron de grado analítico y empleados sin purificación. La estrona (3-hidroxiestra-1,3,5(10)-trien-17-ona), estradiol (estra-1,3,5(10)-trien-3,17-diol) e isoandrosterona (3 β -hidroxi-5 α -androstano-17-ona) se obtuvieron de los laboratorios Syntex de México. Etanolamina, N, N' dietiletilendiamina, hidruro de boro y sodio, se adquirieron de Aldrich, Milwaukee, WI, USA. La caracterización de los productos se estableció por espectroscopía (IR, RMN-H y EM), y análisis elemental. Las condiciones de reacción se establecieron para cada caso en particular siguiendo su curso por cromatografía en capa fina, en placas de gel de sílice 60 Merck F-254, utilizando como revelador yodo. Los análisis elementales fueron determinados en los laboratorios Galbraith, INC. de Knoxville, TN, USA. Los puntos de fusión de los compuestos se realizaron en un aparato Electrothermal 9001 de capilares. Los espectros de infrarrojo (IR) fueron obtenidos en pastillas de bromuro de potasio (KBr) usando un espectrofotómetro Nicolet FT-55X. Los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrógeno ¹(RMN-H) se registraron mediante un espectrofotómetro Varian-Gemini de 200 MHz, en CDCl₃-DMSO-d₆ y están reportados en parte por millón (ppm), usando como referencia interna tetrametilsilano (TMS). Los espectros de masas fueron obtenidos en un espectrofotómetro cuádruple de masas Hewlett-Packard 5985-B por impacto electrónico (70 ev) con introducción directa de la muestra.

17 β -(N,N-dietilaminoetilimino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol (XII)

Se mezclaron 2g de estrona (7.4 mmoles) y 2 ml de N,N-dietiletilendiamina (14.2 mmol), y se calentó a una temperatura de 80-85° C, por 24 horas. Se formó una mezcla aceitosa color

café, que se dejó enfriar a temperatura ambiente y fue tratada con éter isopropílico (10 ml dos veces), formándose un sólido blanco que se filtró y fue recristalizado en metanol-éter isopropílico. El producto obtenido fue filtrado y secado al vacío, obteniéndose 2.450g (6.6 mmol, 89 % de rendimiento), de compuesto **XI**, que presentó las siguientes características: p.f. 158-160 °C. IR, (KBr) ν^{\max} , 3320 (OH), 1675 (C=N), 1610 (anillo aromático) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$, (CDCl_3 - DMSO_d_6) δ 0.85 (s, 3H, 18- CH_3), 1.04 (t, 6H, $J=7$ Hz, CH_3 CH_2), 1.22-253 (m), 2.56 (q, 4H, $J=7$ Hz CH_2 - CH_3), 2.68 (t, 2H, $J=8$ Hz, CH_2 -N), 2,80 (m, 2H, 16- CH_2), 3.34 (m, 2H, CH_2 -N=), 6.56 (d, $J=2.4$ Hz, 1H, H-4), 6.61 (dd, $J=8.4$ Hz y 2.4 Hz, 1H, H-2), 7.09 (d, $J=8.4$ Hz, 1H, H-1). Análisis calculado para $\text{C}_{24} \text{H}_{36} \text{N}_2\text{O}$: C, 78.21; H, 9.85; N, 7.60. Análisis encontrado: C, 78.00; H, 10.08; N, 7.53.

17 β -(N,N-dietilaminoetilamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol (VIII)

El producto de la primera reacción (1.2g, 3.3 mmol) se disolvió en 20 ml de metanol, y se le agregó 1.0g de hidruro de boro y sodio (26.4 mmol), en porciones, durante 30 minutos. Posteriormente la mezcla se calentó a reflujo durante 30 minutos y se dejó agitando a temperatura ambiente durante 16 horas. Se agregó agua (100 ml) a la reacción, se enfrió en baño de hielo. El precipitado que se formó fue filtrado, lavado con agua y secado al vacío. El producto se recristalizó con metanol-éter isopropílico dando un sólido blanco (0.98g, 82 %), con las características siguientes: p f. 162-164 °C. IR, (KBr) ν^{\max} 3400 (OH), 3220 (NH), 1605 (anillo aromático) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 - DMSO_d_6): δ 0.74 (s, 3H, 18 CH_3), 1.01 (t, 6H, $J=7$ Hz CH_3 CH_2), 1.18-2.32 (m), 2.52 (q, 4H, $J=7$ Hz CH_2 CH_3), 2.57-2.86 (m, 4H, -NH- CH_2 y CH_2 -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^+ , 0.1 %), 284 ($\text{M}^+ -86$, 3 %), 86 (100 %). Análisis calculado para $\text{C}_{24} \text{H}_{38} \text{N}_2\text{O}$: C, 77.78; H, 10.34; N, 7.56. Análisis encontrado: C, 77.43; H, 10.53; N, 7.33.

Diclorhidrato de 17 β -(N,N-dietilaminoetilamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol (VIII)

El compuesto IX (0.74g, 2 mmol) se disolvió en 10 ml de acetato de etilo y se adicionó 0.5 ml de ácido clorhídrico concentrado. El sólido formado fue filtrado y recristalizado en acetato de etilo-metanol, dando las siguientes características: p.f. 268-270 °C. IR (KBr), ν^{\max} 3580-3120 (OH y NH), 2650, 2460 (NH⁺), 1615 (anillo aromático) cm^{-1} . MS: m/z M⁺ 443 (2 %), 391 (6 %), 371 (29 %), 307 (89 %), 289 (41 %), 154, 137, 136,(100 %). Análisis calculado para C₂₄ H₄₀ N₂OCl₂. CH₃OH: C, 63.25; H, 9.35; N, 5.91. Análisis encontrado: C, 62.94; H, 9.27; N, 5.91.

17 β -(N,N-dietilaminoetilamino)-5 α -androstan-3 β -ol. (IX)

Fue obtenido a partir de isoandrosterona (3 β -hidroxi-5 α -androstano-17-ona), en forma semejante, a la anteriormente descrita en un rendimiento de 57 %. El producto fue recristalizado en metanol-éter isopropílico, como un sólido blanco con p. f. 84-85 °C. IR (KBr): 3520-3110 (OH y NH), cm^{-1} . ¹H-NMR (CDCl₃-DMSO-d₆): δ 0.61 (s, 3H, 18-CH₃), 0.75 (s, 3H, 10-CH₃), 0.93 (t, 6H, J=7.5 Hz CH₂-CH₃), 1.06-1.98 (m), 2.43 (q, 4H, J=7.5 Hz CH₂-CH₃), 3.35 (m, 4H, -NH-CH₂ y CH₂-N), 4.42 (bs, 1H, 3 OH, intercambiable con D₂O). MS: m/z 304 (M⁺ -86, 1.4 %), 86 (100 %). Análisis calculado para C₂₅ H₄₆ N₂O.CH₃OH.H₂O: C 70.86; H, 11.89; N, 6.36. Encontrado: C, 71.13; H, 11.94; N 6.33. El diclorhidrato del producto IX presentó las siguientes características: p.f. 300-302 °C. IR (KBr): 3580-3330 (OH y NH), 2495 (NH⁺) cm^{-1} . MS: m/z 460 (7 %), 391 (100 %), 307 (58 %), 289 (30 %), 154 (100 %), 136 (100 %), 100 (50 %), 86 (40 %). Análisis calculado para C₂₅ H₄₈ N₂OCl₂.CH₃OH: C, 63.11; H, 10.60; N, 5.67. Encontrado: C, 63.41; H, 10.50; N, 5.80.

2. Métodos de valoración biológica

2.1 Tiempo de coagulación total:

Los experimentos se llevaron a cabo en ratón macho adulto (25-30g) de la cepa CD₁ provenientes del bioterio de la Facultad de Medicina de la UNAM. La temperatura se mantuvo constante entre 20-22 °C con ciclos de luz-oscuridad de 12-12h, con alimento y agua *ad libitum*. Los animales fueron marcados para su identificación individual, haciéndoles pequeñas muescas en el borde de las orejas, de acuerdo a la clave usada en el laboratorio. Después, fueron distribuidos en diferentes grupos experimentales (6-12 animales por grupo), de manera balanceada con base en pesos corporales en un arreglo de cuadrados latinos. Los experimentos se realizaron y evaluaron en forma ciega (el experimentador no sabía a que grupo pertenecía cada animal) y balanceada de acuerdo a un arreglo de cuadrados latinos, con el objeto de no tener diferencias en la evaluación en el tiempo entre los grupos, teniendo siempre un grupo control, que recibió el vehículo por vía subcutánea. Las sustancias utilizadas en los experimentos fueron disueltas en aceite de maíz e inyectados en la misma forma. El tiempo de coagulación total se evaluó 24 horas después de la administración, por el método de microhematocrito (Mandoki y Rubio) ⁽¹⁰⁴⁾, expresando los resultados en segundos. La cola del animal se calentó en un baño con agua a 40 °C por un minuto, para aumentar el flujo sanguíneo, se secó y cortó una pequeña parte del extremo, con una hoja de afeitar. Se colectaron 25 µl de muestra de sangre en un tubo capilar para hematocrito, la sangre se hizo fluir por gravedad entre dos marcas de 45 mm inclinando el tubo capilar alternativamente entre un ángulo de + 60 y -60 grados con respecto al plano horizontal. El cronómetro se accionó cuando la sangre hizo contacto con el vidrio y el punto final de la reacción se estimó cuando la sangre dejó de fluir.

2.2 Ritmo biológico estacional

Los cambios que se presentan en la coagulación sanguínea del ratón durante las diferentes estaciones del año, bajo la influencia de la administración del diaminoestrógeno 17β -(N,N-dietilaminoetilamino)-1,3,5(10)-estratrien-3 ol, (VIII) se llevaron a cabo mediante la obtención de curvas dosis efecto en la mitad de cada estación: primavera, verano, otoño e invierno, en ratón macho de la cepa CD₁, utilizando (7-10 animales por grupo), a los que se administró una vez por vía subcutánea: el vehículo (V, aceite de maíz, grupo control) y el diaminoestrógeno en las dosis de 1, 2, 4 y 8 mg/100g de peso corporal.

3. Efecto estrogénico

Para el estudio del efecto estrogénico fueron utilizados ratón hembra adulta (25-30g de peso corporal) e infantiles (10-14g), de la cepa CD₁, que fueron marcadas y distribuidas en la forma descrita anteriormente para la determinación del tiempo de coagulación total. Este efecto fue evaluado por los métodos de cornificación vaginal y peso uterino

3.1.- Para la determinación de cornificación vaginal descrita por Allen-Doisy ⁽¹⁰⁵⁾, utilizando ratón hembra CD₁ adulta de 25-30g, ooforectomizada tres semanas antes del tratamiento. La efectividad de la operación, se demostró por el examen de los exudados vaginales en cuyos frotis solamente se encontraron leucocitos. Cuatro grupos de estos animales fueron tratados. El primero recibió por vía subcutánea, estradiol 1 μ g /ratón /día /3 días, como control positivo; el segundo recibió dosis equimoleculares del 17β -(3'-hidroxi-1'-dietiletilendiamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol, (1.3 μ g /ratón /día /3 días). El tercero recibió el compuesto 17β -(5'-hidroxi-1'-pentilamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol (1.3 μ g

/ratón /día /3 días). Y el cuarto grupo, designado como control negativo solamente recibió el vehículo a razón de 0.1 ml /ratón /día /3 días. Los frotis vaginales se obtuvieron con isótopos de algodón los días 4, 7, 9 y 11. Las preparaciones se tñieron con solución de hematoxilina y eosina. La presencia de células cornificadas y la ausencia de leucocitos en los frotis fue considerada como respuesta positiva.

3.2.- El efecto uterotrópico se determinó en ratón CD₁ hembra infantil, de 21 días de nacidas con un peso corporal de 10-14 g, y fueron evaluadas por el método de Evans ⁽¹⁰⁶⁾, los animales se distribuyeron en 6 lotes y fueron inyectados por vía subcutánea, con dosis de estradiol (0.03 µg/ratón/día/3 días, como control positivo), cuatro grupos de animales recibieron el producto en estudio, Dedame (VIII) en dosis de 0.01, 0.04, 0.16, y 0.64 µg /ratón /día /3 días. El grupo control recibió únicamente el vehículo (0.1 ml/ ratón/ día/ 3 días). Al cuarto día los animales se sacrificaron por dislocación cervical y los úteros fueron extraídos y pesados. Los resultados se expresaron en mg/ 100g de peso corporal.

3.3.- El efecto antiuterotrópico fue evaluado en 6 grupos de ratón hembra CD₁ infantil usando las mismas dosis de Dedame VIII, utilizadas para evaluar el efecto uterotrópico de 0.01, 0.04, 0.16, y 0.64 µg /ratón /día /3 días, simultáneamente a los diferentes grupos de animales se les administró una dosis de estradiol de (0.03 µg /ratón /día /3 días), un grupo control fue inyectado únicamente con el vehículo (0.1 ml/ 100g), y otro grupo recibió únicamente estradiol (0.03µg/ratón/día/3 días). Al cuarto día los animales fueron sacrificados y los úteros fueron extraídos y pesados.

La significancia estadística de la diferencia entre el grupo control y los tratados fueron estimados por la prueba de Dunnett (varios grupos tratados), después de asegurar la homogeneidad de las varianzas entre el grupo control y los tratados por (prueba de F), y por

la prueba de “ t ” de Student. Las regresiones y la significancia de las desviaciones en la linealidad, fueron estimadas por análisis de varianza. Se consideraron estadísticamente significativas las diferencias cuando los valores de P fueron < 0.05 ⁽¹⁰⁷⁻¹⁰⁸⁾.

IV- RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.- Síntesis Química:

Los compuestos (VIII y IX) propuestos, se sintetizaron por los métodos Irmscher ⁽¹⁰⁹⁾ y Blickenstaff ⁽¹¹⁰⁾ que fueron modificados por nosotros ⁽⁹³⁾. La ruta sintética consiste en la reacción de adición de la N,N'dietiletilendiamino sobre estrona (3-hidroxiestra-1,3,5(10)-trien-17-one) (X), a 80 °C dando la imina (XI) en un 89 % de rendimiento. La imina se caracterizó por su espectro de infrarrojo en el cual aparece la banda característica C=N a 1675 cm⁻¹ y desaparece la banda del grupo carbonilo del producto original. El espectro de resonancia magnética nuclear muestra una señal en 0.85 ppm correspondiente al metilo angular de C-18 y en 3.34 las señales del metileno vecino al grupo C=N. En 2.68 ppm que aparece como un triplete correspondiente al metileno vecino al grupo dietilamino terminal.

Posteriormente se llevó a cabo la reducción de la imina XI en solución etanólica empleando borohidruro de sodio como agente reductor. El 17β-diamino-estrógeno deseado (VIII) se obtuvo en 82 % de rendimiento, se purificó por cristalización fraccionada con metanol-éter isopropílico y fue identificado por sus características espectroscópicas: su espectro de IR, muestra bandas de 3400 y 3220 cm⁻¹ características de los grupos OH y NH₂ respectivamente. En resonancia magnética nuclear aparece la señal correspondiente al metilo angular en 0.74 ppm, que ha sido descrita en la misma posición en otros 17β-amino-estrógenos ^(92,93,109). Su espectro de masas muestra una señal de m/z de 370 que corresponde al ion molecular VIII. El diclorhidrato de [17β-(N,N-dietilaminoetilamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol] fue obtenido disolviendo el 17β

diaminoestrógeno VIII en acetato de etilo y adicionando ácido clorhídrico concentrado a la solución . Se observó la precipitación del clorhidrato inmediatamente después de la adición del ácido. El sólido formado fue filtrado y recristalizado en metanol-acetato de etilo, dando un rendimiento cuantitativo. Su espectro infrarrojo además de las bandas de las vibraciones OH y NH, las bandas características en 2650 y 2460 de los grupos NH^+ .

El derivado del androstano IX, fue sintetizado a partir de 3β -hidroxi- 5α -androstano- 17β -ona (isoandrosterona, XII), en condiciones semejantes a las descritas para el dedame (VIII), se obtuvo primero la imina (XIII) y posteriormente del compuesto (IX). El rendimiento global fue de 57 %. De igual manera se purificó por recristalización fraccionada utilizando la mezcla de disolventes metanol-éter isopropílico. El espectro infrarrojo de este producto también muestra las bandas en 3520 y 3110 cm^{-1} correspondientes a los grupos OH y NH, en sus espectros de resonancia magnética nuclear aparecen como señales sencillas en 0.61 y 0.75 ppm, las señales de los metilos angulares C-18 y C-10, respectivamente. Pueden identificarse en 2.43 una señal cuádruple que integra para 4 hidrógenos con una constante de acoplamiento $\delta = 7.5 \text{ Hz}$ correspondiente a los metilos de los grupos etilos (CH_2 CH_3) y en 3.35 ppm una señal múltiple que corresponde a los metilos del grupo etilen-diamino (NH - CH_2 - CH_2 -N).

El diclorhidrato del compuesto (IX) en su espectro de IR muestra la señal en 2495 cm^{-1} correspondiente a las vibración NH^+ y en su espectro de masas la señal de m/z de 460 correspondiente al pico base que está de acuerdo con el peso molecular del compuesto obtenido. p.f. 84-85°C. Análisis calculado para $\text{C}_{25} \text{H}_{46}\text{N}_2\text{O} \cdot \text{CH}_3\text{OH} \cdot \text{H}_2\text{O}$: C, 70.86; H, 11.89; N, 6.36. Análisis encontrado C, 71.13; H, 11.94; N, 6.33

La asignación de la amina como 17β en el dedame se basa en experiencias previas que se tienen por la obtención de este tipo de compuestos por nuestro grupo ⁽⁹³⁾ y de otros autores ^(90, 110). La reducción de la imina (XI), con borohidruro de sodio da preferentemente el

isomero β . Estudios en cristalografía de rayos X han mostrado la producción del 17β -amino derivado

2. Evaluación farmacológica de los compuestos: Dedame (VIII) y Dedaman (IX), sobre la coagulación sanguínea

a) Comparación del efecto anticoagulante del compuesto VIII (Dedame) con el compuesto VI (Pentolame)

La importancia de la comparación en el efecto sobre la coagulación sanguínea del dedame (IX), con otro aminoestrógeno que posee un efecto anticoagulante de gran magnitud y duración, sintetizado y reportado anteriormente por nosotros ⁽⁹³⁾, tiene por objeto determinar si los cambios estructurales de este nuevo compuesto (VIII), permiten que persista el efecto anticoagulante y cual es su magnitud y duración con respecto al compuesto ya conocido (compuesto VI). Cuando se compararon con un grupo control, que recibió únicamente el vehículo (aceite de maíz), los efectos producidos por la administración de (8 mg/100g) de dedame (VIII) y pentolame (VI) en el mismo experimento, pueden verse en la Tabla I. En ella se observa que los resultados obtenidos después de 24 horas de su administración s.c. a ratones CD₁ machos adultos, para dedame (VIII), fueron de (+ 92 % P < 0.01) y con pentolame (VI), de (+ 62 % P < 0.01). Esto nos demuestra que la magnitud del efecto anticoagulante de dedame es semejante pero de mayor magnitud que la obtenida con pentolame, probablemente debido al aumento de la liposolubilidad del nuevo compuesto, por la adición de dos grupos etilos en el grupo amino terminal.

b) Curva dosis-respuesta en ratón

En la Figura 4 y Tabla 2 se muestran las curvas dosis-respuesta del efecto anticoagulante del compuesto VIII. Estos resultados fueron obtenidos después de una sola administración de las dosis de 1, 2, 4 y 8 mg/100g por vía subcutánea a ratones CD₁ machos. Se observó que el efecto anticoagulante es dosis dependiente ya que produce un aumento lineal en el tiempo de coagulación total de los animales tratados con dedame (VIII), con respecto al logaritmo de la dosis. El coeficiente de regresión señala que no hay significancias estadísticas en la desviación de la linealidad ($b=77.9$ $P=0.017$). Con la dosis mayor (8 mg/100g), el tiempo de coagulación total produjo un aumento de 92 % ($P < 0.01$) con respecto al grupo control. Este efecto anticoagulante que presenta este producto es semejante al observado con los otros 17-aminoestrógenos que hemos descrito ⁽⁹¹⁻⁹⁵⁾, pero de mayor magnitud. La evaluación anticoagulante se llevó a cabo 24 horas después de administrado, ya que la experiencia previa en determinaciones anteriores de homólogos relacionados, el efecto máximo se observa entre las 24 y 36 horas.

c) Curva dosis-respuesta del compuesto IX derivado del androstano.

El 17 β -(N,N-dietilaminoetilamino)-5 α -androstano-3 β -ol (IX) derivado del androstano, cuya característica importante es que carece del anillo aromático. Este estudio se llevó a cabo con cuatro grupos de ratones CD₁ (12 animales por grupo), machos adultos que recibieron una sola administración por vía s. c. y evaluados 24 horas después. Los grupos fueron inyectados con las dosis de 2, 4, 8 y 16 mg/100g de dedaman (IX), un grupo control tratado únicamente con el vehículo. En la Figura 4 y Tabla 3, pueden verse los resultados que nos muestran que el derivado del andorstano (IX) no afectó el tiempo

de coagulación total con ninguna de las dosis, ni a la doble de la usada con su homólogo estrogénico. En contraste el dedame (VIII) con dosis de 4 mg/100g produjo una prolongación en el tiempo de coagulación total de + 52 % ($P < 0.05$), y con la dosis de 8 mg/100g fue de + 98 % ($P < 0.05$). La falta de actividad anticoagulante del derivado del androstano indica que el anillo aromático "A", tiene un papel importante en la actividad anticoagulante de los 17β -aminoesteroides

d) Duración del efecto anticoagulante en ratón macho

Para la determinación del curso temporal de dedame (VIII), en la coagulación sanguínea se llevaron a cabo una serie de experimentos en los que se evaluó el efecto anticoagulante producido por el compuesto a las 24, 48, 72 y 96 horas después de la administración subcutánea única de 8 mg /100g de peso corporal en ratón macho. En la Figura 5 y Tabla 4, puede observarse que el efecto anticoagulante es máximo a las 24 con aumento de +103 % ($P < 0.001$) con respecto al grupo control, y va disminuyendo paulatinamente; a las 48 horas, la prolongación en el tiempo de coagulación fue de +64 % ($P < 0.001$) y persistió de manera significativa hasta 72 horas con aumento de + 32 % ($P < 0.05$).

3.- Efecto estrogénico

a).- La actividad estrogénica de dedame (VIII), fue evaluado por el método de Allen and Doisy ⁽¹⁰⁵⁾. Se utilizaron ratones CD₁ hembras adultas ooforectomizadas, tres semanas antes al tratamiento. Cuatro grupos de animales (7 a 14) después de comprobar la ausencia de células cornificadas, recibieron por vía s.c. los siguientes compuestos: un grupo recibió estradiol (1.0 μ g/ratón /día/3días), otro recibió pentolame (VI) (1.3

$\mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}/3\text{días}$), el tercer grupo recibió dedame (VIII) ($1.3 \mu\text{g}/\text{ratón}/\text{día}/3\text{días}$) y el cuarto grupo únicamente fue inyectado con el vehículo (aceite de maíz $0.1 \text{ ml}/\text{ratón}/\text{día}/3\text{días}$) fungiendo como control negativo. La presencia de células cornificadas y ausencia de leucocitos en los frotis fue considerada como respuesta positiva.

Todos los animales, tanto los tratados con pentolame (VI), como con dedame (VIII) o estradiol presentan cornificación vaginal en el cuarto día. La respuesta estrogénica desaparece mas rápidamente en los ratones tratados con el compuesto VI, y ligeramente después con el producto VIII. Ambos producen menor efecto estrogénico que el estradiol como puede verse en la Tabla 5 y Figura 6.

b) La determinación del efecto estrogénico por aumento del peso uterino, descrito por Evans ⁽¹⁰⁶⁾, demuestran que el dedame (VIII) presenta un aumento lineal del peso uterino con respecto al logaritmo de la dosis ($b=40.8$ $P=0.02$). El efecto uterotrópico de este compuesto administrado a ratones, fue menor que el producido por estradiol aún con dosis mas o menos 22 veces mayor que la dosis de estradiol. Los resultados obtenidos con la dosis de $0.64 \mu\text{g}/\text{día}/\text{ratón}$ fue de 64 % ($P<0.01$), y el estradiol ($0.03 \mu\text{g}/\text{día}/\text{ratón}$) produce un aumento de 177 % ($p<0.01$). La menor actividad estrogénica de dedame (VIII), con respecto al estradiol puede ser atribuida a la presencia de el grupo amino en la cadena lateral del carbono 17. Estos resultados son semejantes a los obtenidos con otros 17β -aminoestrógenos sintetizados por nosotros ⁽⁹³⁾, y por otros grupos ^(90,110)

c) Con base en los resultados detectados en el experimento anterior se exploró el posible efecto antiuterotrópico de este compuesto. Los ensayos se llevaron a cabo en la misma forma, administrando dosis crecientes de dedame (VIII) (0.01, 0.04, 0.16, y $0.64 \mu\text{g}/\text{ratón}$), y simultáneamente a cada animal, se le inyectó una dosis de $0.03 \mu\text{g}/\text{ratón}$ de

estradiol. En la Tabla 7 se puede apreciar que el compuesto VIII, no inhibe o tiene antagonismo con el efecto del estradiol, ya no existen diferencias estadísticas significativas.

4.- Ritmo biológico estacional

El estudio de las variaciones estacionales que se presentan con la administración del compuesto VIII, demuestran que las dosis mayores comparadas con su grupo control, producen diferencias significativas semejantes, en las diferentes estaciones del año (Figuras: 8, 9, 10, 11). En primavera Tabla 8, 68 % ($P < 0.05$), verano Tabla 9, 70 % ($P < 0.05$), otoño Tabla 10, 77 % ($P < 0.05$) e invierno Tabla 11, 92 % ($P < 0.05$). en las curvas dosis-respuestas de dedame (VIII), Figura 8, los valores de los grupos control varían significativamente entre primavera y otoño produciendo aumentos significativos en el tiempo de coagulación de + 26 % ($P < 0.02$) (Tabla 12). Entre primavera e invierno los grupos tratados con las dosis de 4 y 8 mg/100g de dedame (VIII), produjeron diferencias en los tiempos de coagulación total con las dosis de 4-8 mg/100g de + 54 y 65 % ($P < 0.001$), Tablas 13-14. La comparación de los grupos tratados con aceite de maíz (disolvente) produjeron diferencias entre primavera y otoño de +26% ($P < 0.05$) y entre primavera e invierno de +44 % ($P < 0.05$) Tabla 15. La comparación de la dosis de 4 mg/100g presentaron diferencias en primavera-otoño + 34 % ($P < 0.05$), primavera-invierno +54 % ($P < 0.05$) y en verano-invierno + 31 % ($P < 0.05$) Tabla 16. Con la dosis de 8 mg/100g hubo diferencias en porcentaje en todas las estaciones del año, de (+14 a + 40 %), pero en mayor efecto se produjo entre primavera e invierno con +65 % ($P < 0.05$) Tabla 17. Las diferencias mayores fueron observadas entre primavera e invierno, tanto en los grupos control como en los tratados.

TABLA 1

COMPARACIÓN DEL EFECTO ANTICOAGULANTE DE PENTOLAME (VI) Y DEDAME (VIII) 24 HORAS DESPUÉS DE LA ADMINISTRACIÓN SC EN RATÓN CD₁ MACHO ADULTO

Tratamiento	Dosis/100g	n	Peso Corporal X ± e.e.m. (g)	Tiempo de Coagulación X ± e.e.m. (seg)	Diferencia en %	P
Control	0.1 ml	6	30 ± 1.1	201 ± 2.4	-	-
Pentolame	8 mg	6	31 ± 1.2	325 ± 21	+ 62	< 0.01
Dedame	8 mg	6	30 ± 1.3	386 ± 31	+ 92	< 0.01

Control = Aceite de Malz

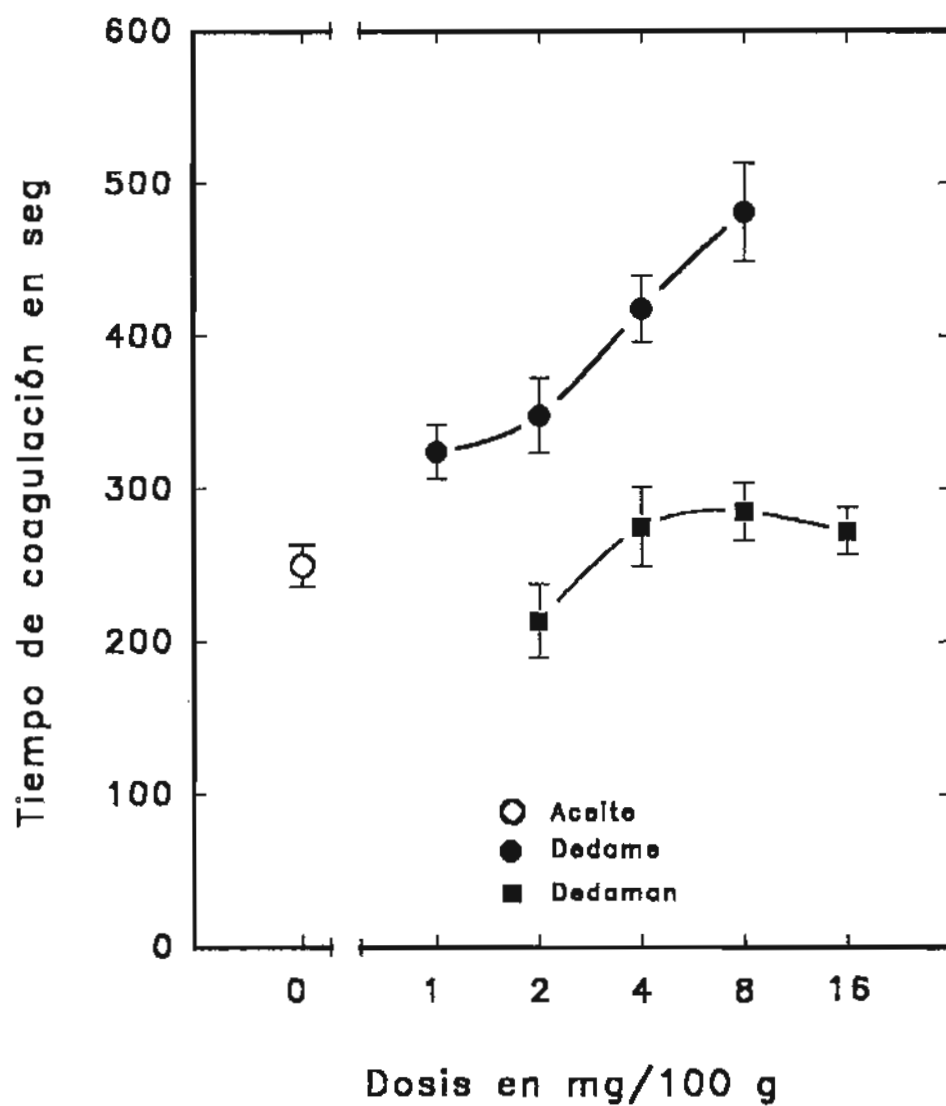


FIGURA 4: Comparación de los efectos sobre la coagulación sanguínea de dedame y su análogo androstan derivado.

TABLA 2

**DOSIS-RESPUESTA DEL EFECTO ANTICOAGULANTE DE DEDAME
(VIII) DESPUES DE UNA SOLA INYECCION.**

Tratamiento	Dosis/100g	n	Peso Corporal $X \pm e.m.$ (g)	Tiempo de Coagulación $X \pm e.m.$ (seg)	Diferencia en %	P
Control	1 ml	11	26 ± 0.8	250 ± 13.7	-	-
Dedame	0.5 mg	10	27 ± 0.7	339 ± 14.2	+ 35	NS
Dedame	1 mg	10	26 ± 0.9	324 ± 17.8	+ 29	NS
Dedame	2 mg	10	25 ± 0.8	348 ± 24.8	+ 39	< 0.05
Dedame	4 mg	10	26 ± 0.8	397 ± 21.0	+ 59	< 0.05
Dedame	8 mg	10	25 ± 0.7	481 ± 32.2	+ 92	< 0.05

Control = Aceite de Maiz

TABLA 3

**DOSIS-RESPUESTA DEL HOMOLOGO DERIVADO DEL ANDROSTANO
DEDAMAN (IX) EN RATÓN CD₁ MACHO**

Tratamiento	Dosis/100g	n	Peso Corporal X ± e.m. (g)	Tiempo de Coagulación X ± e.m. (seg)	Diferencia en %	P
Control	1 ml	12	30 ± 1.0	280 ± 14	-	-
Dedaman	2 mg	12	30 ± 1.1	240 ± 26	-35	NS
Dedaman	4 mg	12	32 ± 1.2	291 ± 24	+ 13	NS
Dedaman	8 mg	12	30 ± 1.1	267 ± 20	+ 3	NS
Dedaman	16 mg	12	31 ± 1.1	265 ± 16	+ 3	NS

Control = Aceite de Matz

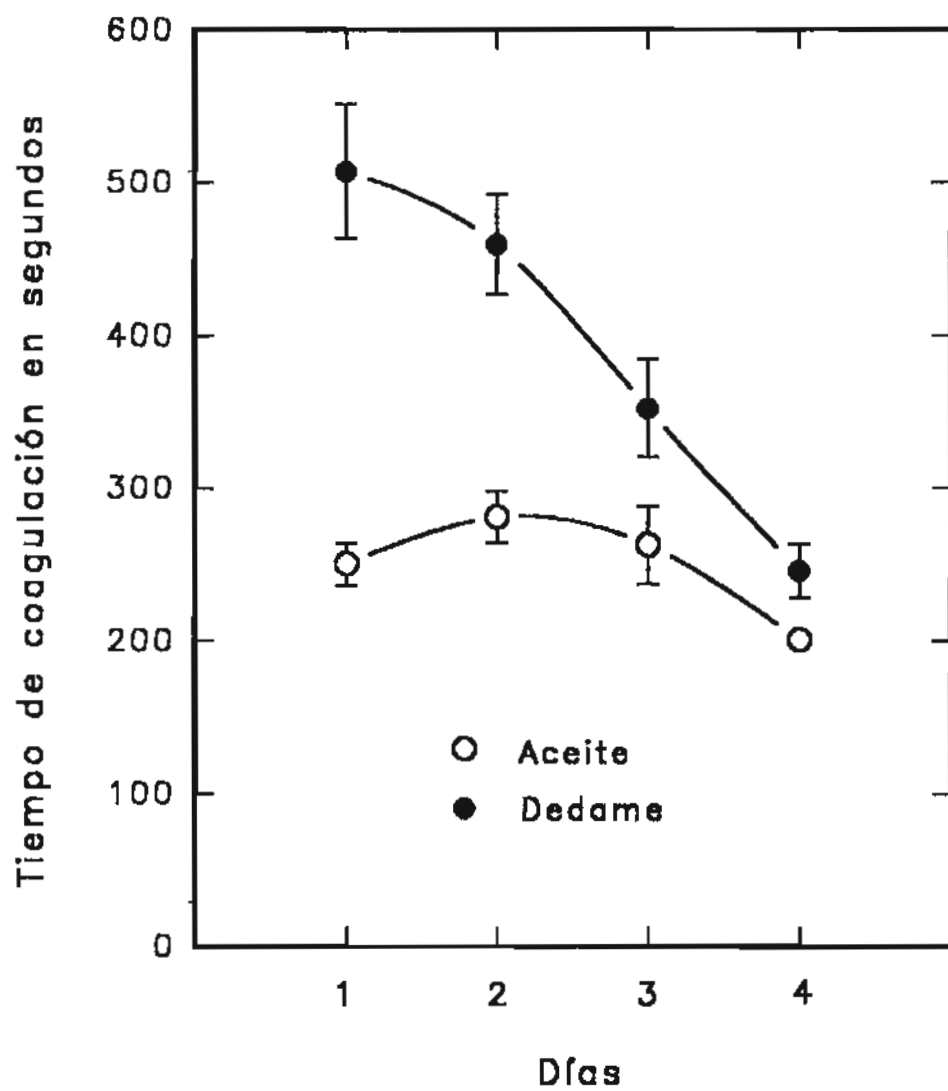


FIGURA 5: Curso temporal de Dedame.

TABLA 4

**CURSO TEMPORAL DEL EFECTO ANTICOAGULANTE DE DEDAME (VIII)
EN RATÓN CD₁ MACHO**

Tratamiento	Dosis/100g	n	Peso Corporal X ± e.e.m. (g)	Tiempo de Coagulación X ± e.e.m. (seg)	Diferencia en %	P
Control	1 ml	12	29 ± 0.9	250 ± 14	-	-
Dedame 24 hs	8 mg	12	30 ± 0.8	507 ± 34	+ 103	< 0.001
Control	1 ml	12	30 ± 0.9	280 ± 17	-	-
Dedame 48 hs	8 mg	12	28 ± 0.9	459 ± 33	+ 64	< 0.001
Control	1 ml	12	31 ± 1.0	262 ± 25	-	-
Dedame 72 hs	8 mg	12	29 ± 0.9	352 ± 32	+ 34	< 0.05
Control	1 ml	12	30 ± 1.0	200 ± 8	-	-
Dedame 96 hs	8 mg	12	30 ± 1.0	245 ± 17	+ 22	> 0.1

Control = Aceite de Maiz

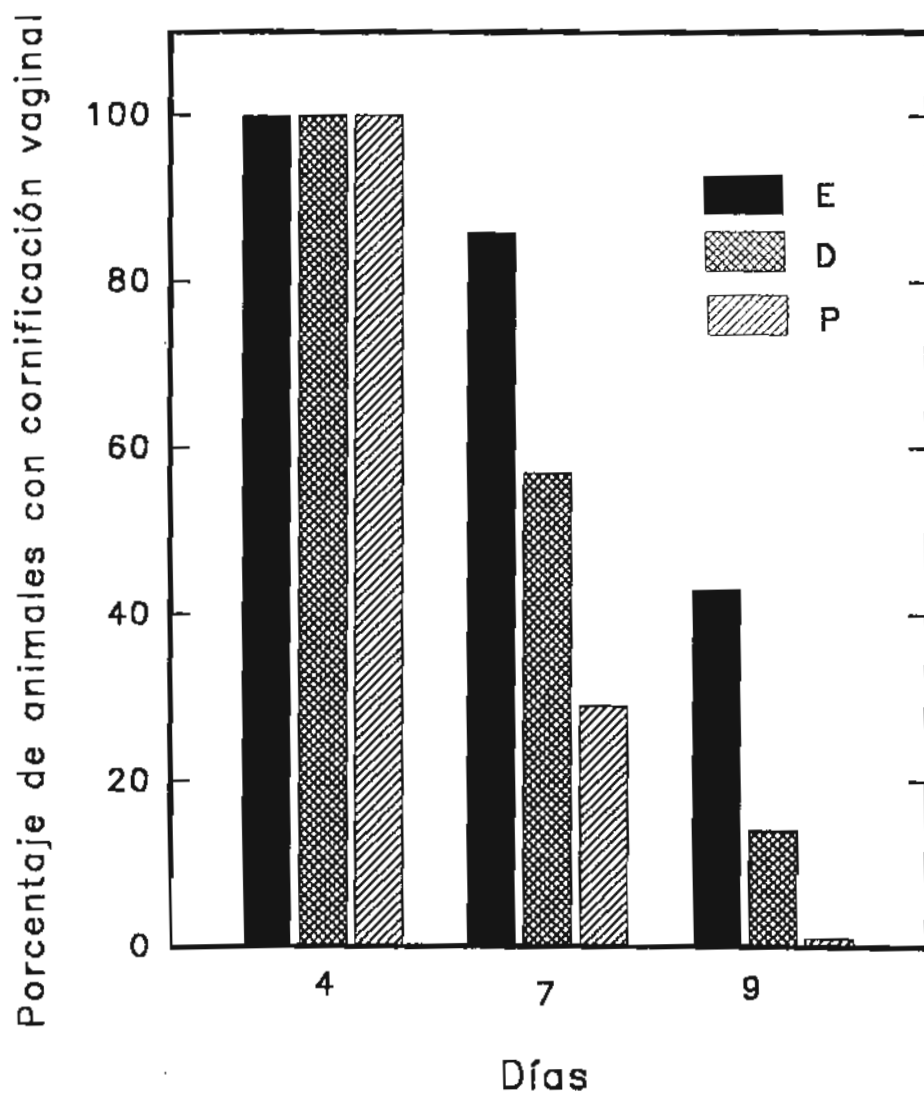


FIGURA 6: Efecto estrogénico de Dedame (D), pentolame (P) y estradiol (E), en ratón CD1 ovariectomizado.

TABLA 5

COMPARACIÓN DEL EFECTO ESTROGÉNICO DE ESTRADIOL (E₂), PENTOLAME (VI)
Y DEDAME (VIII) POR CORNIFICACIÓN VAGINAL

Tratamiento	Dosis/ratón día/3días	n	Peso Corporal X ± e.e.m. (g)	Número de ratones con cornificación vaginal Número de ratones tratados (días)				
Control	0.1 mL	14	32 ± 0.9	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14
Estradiol	1.0 µg	14	32 ± 1.2	0/14	14/14	12/14	6/14	0/14
Dedame	1.3 µg	7	32 ± 1.1	0/7	7/7	4/7	1/7	0/7
Pentolame	1.3 µg	7	32 ± 0.9	0/7	7/7	2/7	0/7	0/7

Control = Aceite de Maiz

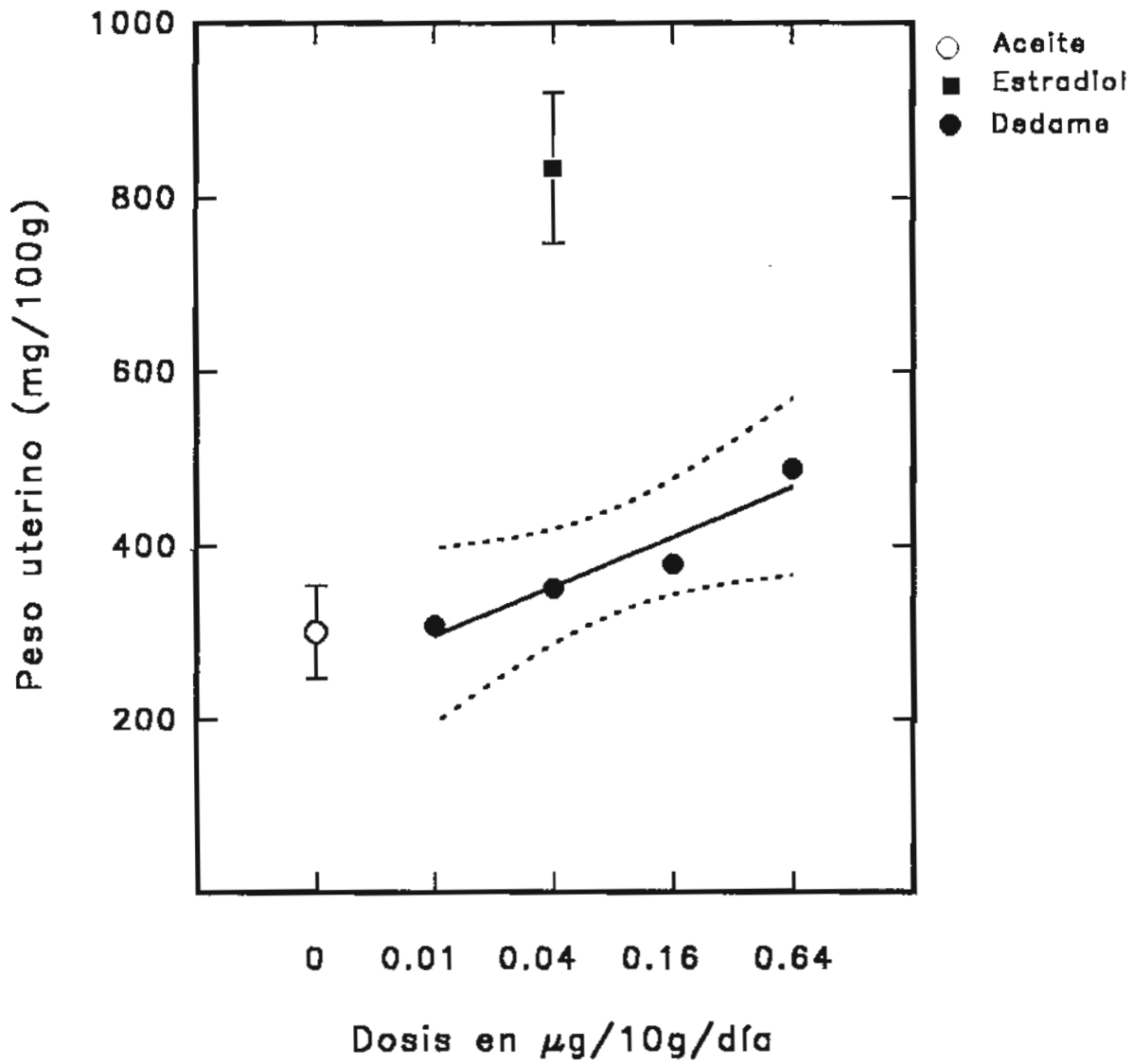


FIGURA 7: Efecto sobre peso uterino de dedame.

TABLA 6

EFFECTO UTEROTRÓPICO DE DEDAME (VIII) EN RATÓN CD₁ HEMBRA
INFANTIL

Tratamiento	Dosis/100g	n	Peso Corporal X ± e.m. (g)	Peso Uterino X en mg/100g ± e.m.	Diferencia en %	P
Control	0.1 ml	5	10.5 ± 0.4	301 ± 53	-	-
Estradiol	0.03 µg	5	10.5 ± 0.4	834 ± 110	+ 177	< 0.01
Dedame	0.01 µg	5	10.4 ± 0.4	309 ± 56	+ 2	NIS
Dedame	0.04 µg	5	10.5 ± 0.4	352 ± 119	+ 16	NIS
Dedame	16 µg	5	10.3 ± 0.4	379 ± 150	+ 25	NIS
Dedame	0.64 µg	5	10.4 ± 0.4	495 ± 159	+ 64	< 0.01

Control = Aceite de Maíz

TABLA 7

EFFECTO ANTITUEROTRÓPICO DE DEDAME (VIII), SOBRE ESTRADIOL (I)
EN RATÓN CD₁ HEMBRA INFANTIL

Tratamiento	Dosis/100g	n	Peso Corporal X ± e.m. (g)	Peso Uterino X en mg/100g ± e.m.	Diferencia en %	P
Control	0.1 ml	6	10.5 ± 0.4	360 ± 28	-	-
Estradiol E ₂	0.03 µg	6	10.5 ± 0.4	831 ± 48	+ 131	< 0.01
Dedame + E ₂	0.01 µg	7	10.4 ± 0.4	840 ± 56	+ 133	< 0.01
Dedame + E ₂	0.04 µg	6	10.5 ± 0.4	982 ± 119	+ 172	< 0.01
Dedame + E ₂	16 µg	6	10.3 ± 0.4	912 ± 84	+ 153	< 0.01
Dedame + E ₂	0.64 µg	7	10.4 ± 0.4	850 ± 95	+ 136	< 0.01

Control = Aceite de Maíz

Estradiol = 0.03 µg

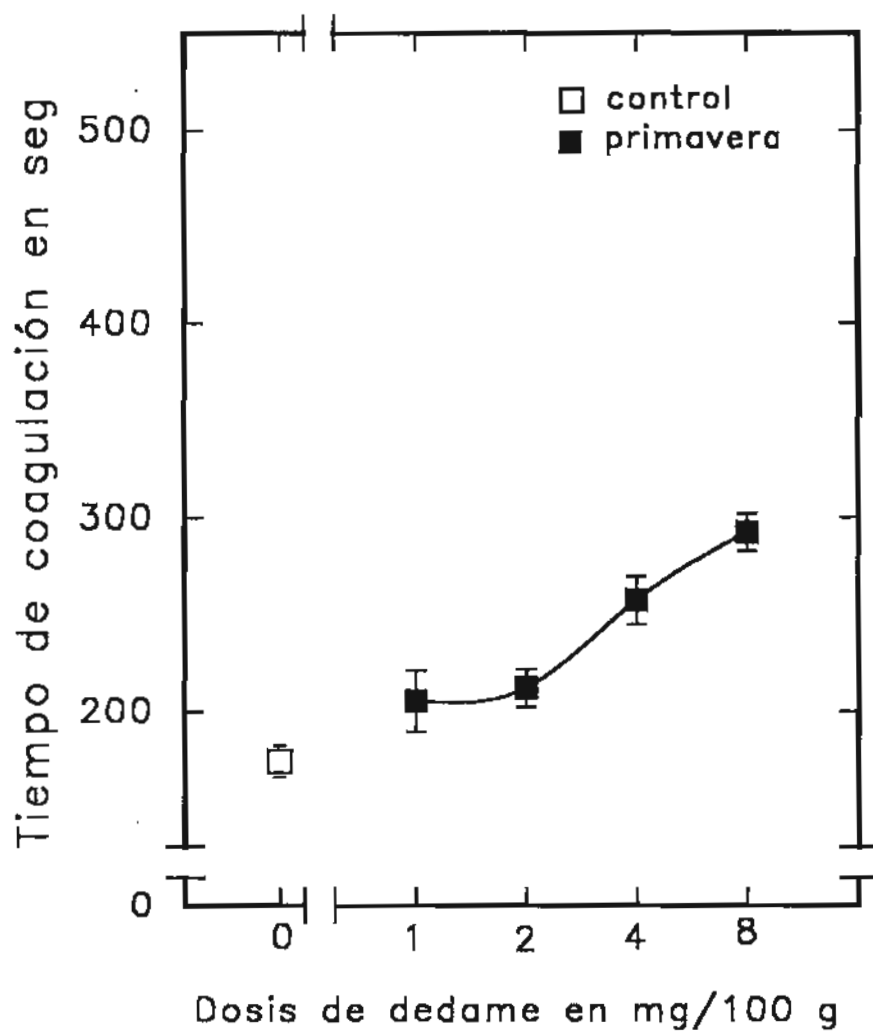


FIGURA 8: Curva dosis.respuesta de dedame (VIII) en primavera.

TABLA 8

**DOSIS-RESPUESTA DEL EFECTO ANTICOAGULANTE DE DEDAME (VID), EN RATÓN CD₁,
24 HORAS DESPUÉS DE UNA SOLA ADMINISTRACIÓN: EFECTUADA EN PRIMAVERA**

Tratamiento	n	Dosis/100g	Peso Corporal $\bar{X} \pm e.s.m.$ (g)	Tiempo de Coagulación $\bar{X} \pm e.s.m.$ (seg)	Diferencia en %	P
Disolvente	19	0.1 ml	25 ± 0.8	174.2 ± 8.3	-	-
Dedame	13	0.5 mg	24 ± 1.1	204.0 ± 11.9	+ 17	N.S.
Dedame	13	1 mg	26 ± 0.9	205.2 ± 15.8	+ 18	N.S.
Dedame	13	2 mg	26 ± 0.8	212.0 ± 9.7	+ 22	N.S.
Dedame	12	4 mg	24 ± 0.7	257.4 ± 12.5	+ 48	< 0.05
Dedame	12	8 mg	26 ± 0.8	292.3 ± 9.7	+ 68	< 0.05

Control = Aceite de Maiz

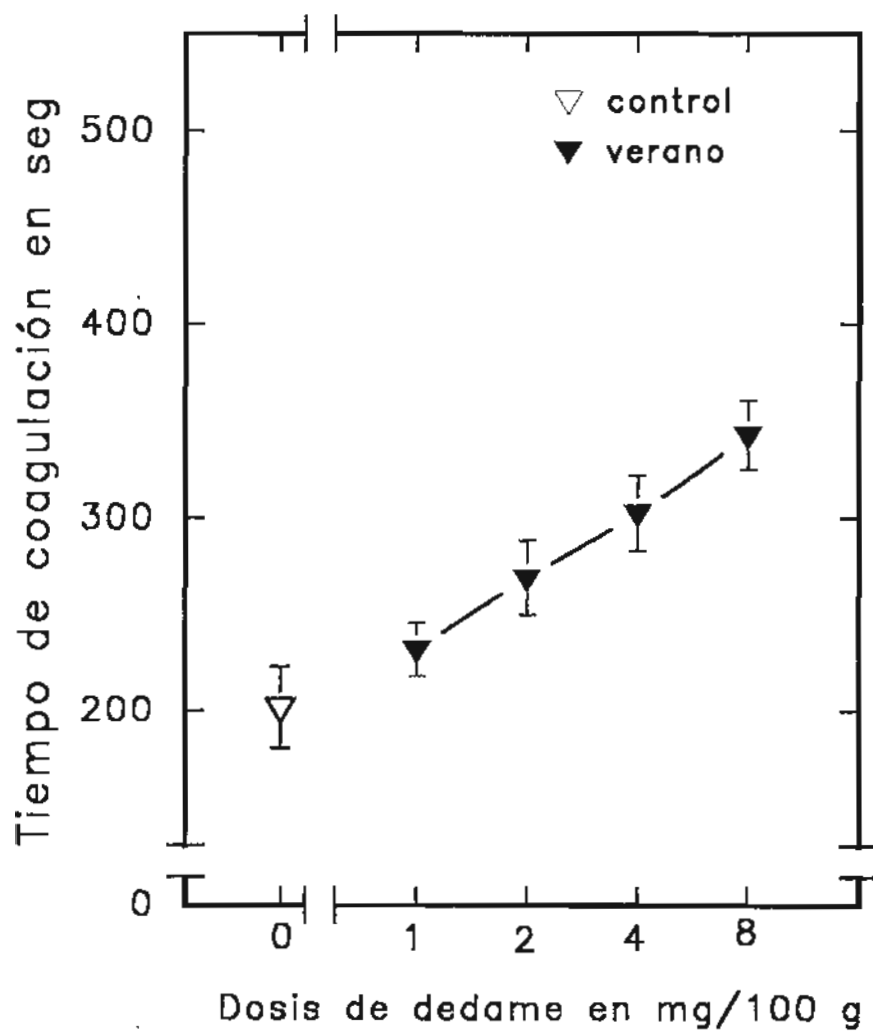


FIGURA 9: Curva dosis—respuesta de dedame en verano.

TABLA 9

DOSIS-RESPUESTA DEL EFECTO ANTICOAGULANTE DE DEDAME (VIII), EN RATÓN CD₁, 24 HORAS DESPUÉS DE UNA SOLA ADMINISTRACIÓN: EFECTUADA EN VERANO

Tratamiento	n	Dosis/100g	Peso Corporal $X \pm e.m.$ (g)	Tiempo de Coagulación $X \pm e.s.m.$ (seg)	Diferencia en %	P
Solvente	6	0.1 ml	23 ± 0.6	201.7 ± 8.7	-	-
Dedame	7	1 mg	24 ± 0.6	231.9 ± 13.9	+ 14	N.S.
Dedame	5	2 mg	24 ± 0.6	269.2 ± 19.2	+ 33	< 0.05
Dedame	8	4 mg	25 ± 0.8	302.5 ± 19.3	+ 50	< 0.05
Dedame	6	8 mg	25 ± 0.8	342.5 ± 18.1	+ 70	< 0.05

Control = Aceite de Maiz

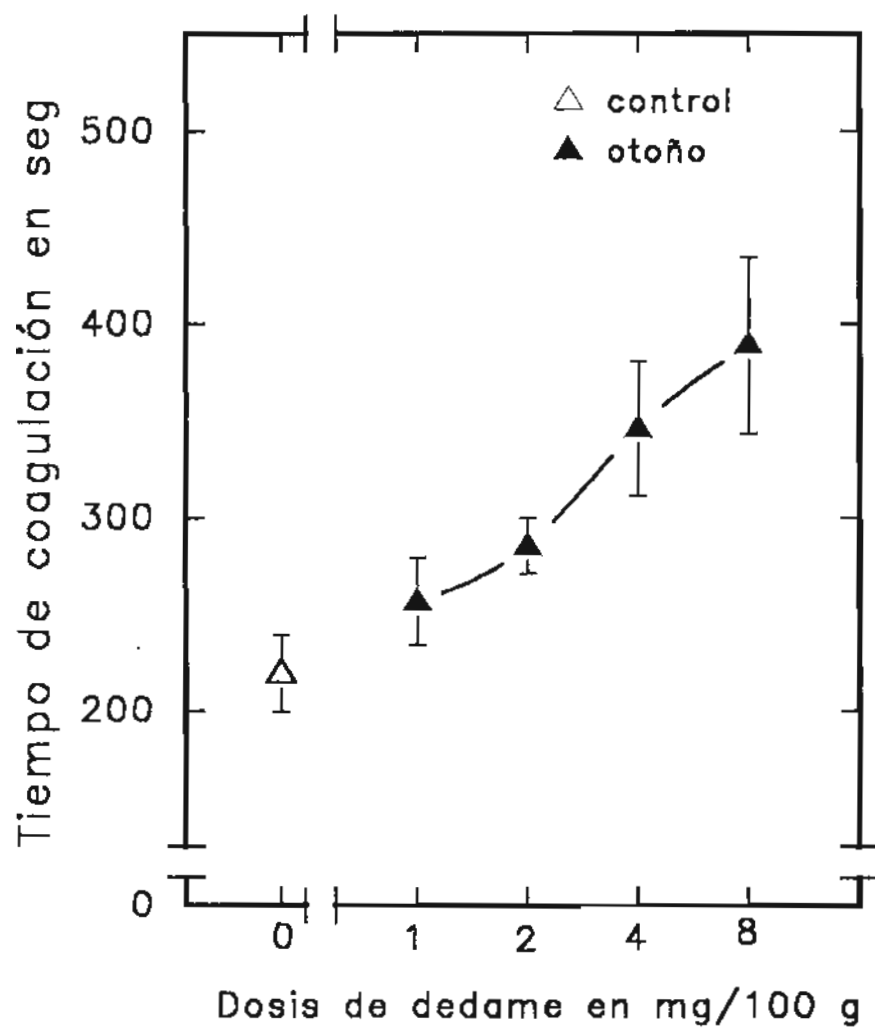


FIGURA 10: Curva dosis-respuesta de dedame (VIII) en otoño.

TABLA 10

**DOSIS-RESPUESTA DEL EFECTO ANTICOAGULANTE DE DEDAME (VIII), EN RATÓN CD₁,
24 HORAS DESPUÉS DE UNA SOLA ADMINISTRACIÓN: EFECTUADA EN OTOÑO**

Tratamiento	n	Dosis/100g	Peso Corporal $X \pm e.e.m.$ (g)	Tiempo de Coagulación $X \pm e.e.m.$ (seg)	Diferencia En %	P
Solvente	6	0.1 ml	25 ± 0.8	219.0 ± 19.7	-	-
Dedame	7	1 mg	26 ± 1.1	256.4 ± 22.6	+ 17	N.S.
Dedame	5	2 mg	27 ± 1.0	285.4 ± 14.7	+ 30	N.S.
Dedame	7	4 mg	26 ± 1.2	346.0 ± 34.8	+ 57	< 0.05
Dedame	5	8 mg	25 ± 0.8	389.0 ± 45.6	+ 77	< 0.05

Control = Aceite de Maíz

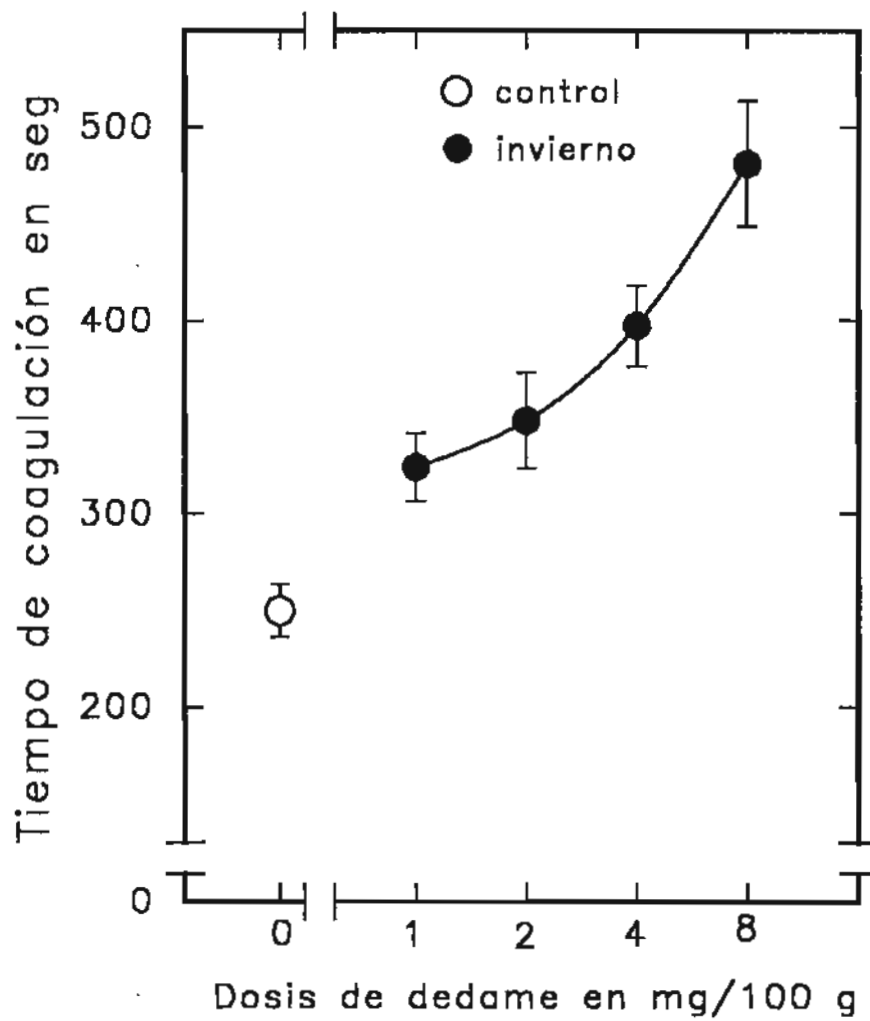


FIGURA 11: Curva dosis-respuesta de dedame (VIII) en invierno.

TABLA 11

**DOSIS-RESPUESTA DEL EFECTO ANTICOAGULANTE DE DEDAME (VIII), EN RATÓN CD₁,
24 HORAS DESPUÉS DE UNA SOLA ADMINISTRACIÓN: EFECTUADA EN INVIERNO**

Tratamiento	n	Dosis/100g	Peso Corporal X ± e.e.m. (g)	Tiempo de Coagulación X ± e.e.m (seg)	Diferencia En %	P
Solvente	11	0.1 ml	26 ± 0.8	250.0 ± 13.7	-	-
Dedame	10	0.5 mg	27 ± 0.7	338.8 ± 14.2	+35	N.S.
Dedame	10	1 mg	26 ± 0.9	324.3 ± 17.8	+29	N.S.
Dedame	10	2 mg	25 ± 0.8	348.3 ± 24.8	+39	< 0.05
Dedame	8	4 mg	26 ± 0.8	397.4 ± 21.0	+59	< 0.05
Dedame	11	8 mg	25 ± 0.7	481.2 ± 32.2	+92	< 0.05

Control = Aceite de Maiz

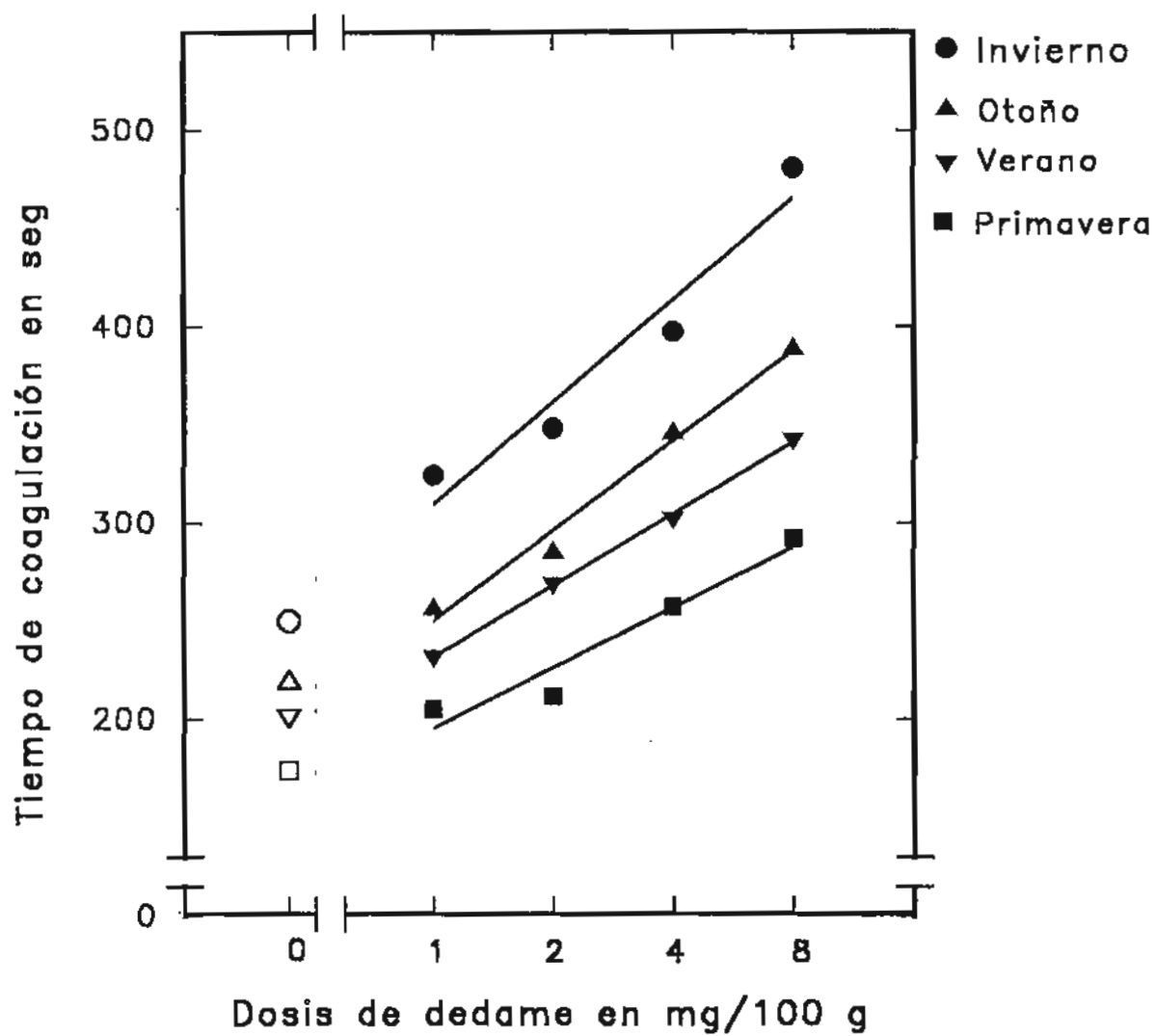


FIGURA 12: Curvas dosis-respuesta de dedame en las estaciones anuales.

TABLA 12

COMPARACION DEL TIEMPO DE COAGULACIÓN EN RATON CD, MACHO, TRATADOS CON EL VEHÍCULO (ACEITE DE MAÍZ) EN LAS DIFERENTES ESTACIONES DEL AÑO

Estaciones	n	Dosis/100g	Peso Corporal $X \pm e.m.$ (g)	Tiempo de coagulación $X \pm e.m.$ (seg)	Diferencia en %	Grupos que se comparan	P (Student)	P Dunn
Primavera	19	0.1 ml	25 ± 0.7	174.2 ± 8.3	-	-	-	-
Verano	6	0.1 ml	23 ± 0.6	202 ± 8.7	+ 16	I-II	0.094	N.S.
Otoño	6	0.1 ml	25 ± 0.8	219 ± 19.7	+ 26	I-III	0.023	< 0.05
Invierno	11	0.1 ml	26 ± 0.7	250 ± 13.7	+ 43	I-IV	0.001	< 0.05

TABLA 13

COMPARACION DEL TIEMPO DE COAGULACION EN RATON MACHO CD1
 TRATADOS EN LAS DIFERENTES ESTACIONES DEL AÑO
 CON DEDAME (VIII) (4 mg/100g)

Estaciones	n	Dosis/100g	Peso Corporal $X \pm e.m.$ (g)	Tiempo de coagulación $X \pm e.m.$ (seg)	Diferencia en %	Grupos que se comparan	P (Student)	P (Dunn)
Primavera	12	4 mg	24 ± 0.8	257.4 ± 12.5	-	-	-	-
Verano	8	4 mg	25 ± 0.8	302.5 ± 19.3	+ 18	I-II	0.054	N.S.
Otoño	7	4 mg	26 ± 1.2	346.0 ± 34.8	+ 34	I-III	0.011	< 0.05
Invierno	8	4 mg	25 ± 0.7	397.4 ± 21.0	+ 54	I-IV	0.001	< 0.05

TABLA 14

**COMPARACION DEL TIEMPO DE COAGULACION EN RATON MACHO CD1
TRATADOS EN LAS DIFERENTES ESTACIONES DEL AÑO
CON DEDAME (VIII) 8mg/100g)**

Estaciones	n	Dosis/100g	Peso Corporal $X \pm e. m.$ (g)	Tiempo de coagulación $X \pm e. m.$ (seg)	Diferencia en %	Grupos que se comparan	P (Student)	P (Dunn)
Primavera	12	8 mg	26 ± 0.6	292.3 ± 12.5	-	-	-	-
Verano	6	8 mg	25 ± 0.8	342.5 ± 18.1	+ 17	I-II	0.054	N.S.
Otoño	5	8 mg	25 ± 0.8	389.0 ± 45.6	+ 33	I-III	0.011	N.S.
Invierno	11	8 mg	27 ± 0.7	481.2 ± 32.2	+ 65	I-IV	0.001	< 0.05

TABLA 15
COMPARACION DEL TIEMPO DE COAGULACION EN RATON MACHO CD1
TRATADOS EN LAS DIFERENTES ESTACIONES DEL AÑO CON ACEITE DE MAIZ

Estaciones del año	n	Dosis/100g	Peso Corporal $\bar{X} \pm e.m.$ (g)	Tiempo de Coagulación $\bar{X} \pm e.m.$ (seg)	Diferencia en %	Grupos que se comparan	P (Dunn)
Primavera	19	0.1 ml	25 ± 0.7	184.2 ± 8.3	-	I-II	-
Verano	6	0.1 ml	23 ± 0.6	202.0 ± 8.7	+ 16	-	N.S.
Primavera	19	0.1 ml	25 ± 0.7	174.2 ± 8.3	-	I-III	-
Otoño	6	0.1 ml	25 ± 0.8	219.0 ± 19.7	+ 26	-	< 0.05
Primavera	19	0.1 ml	25 ± 0.7	174.2 ± 8.3	-	I-IV	-
Invierno	11	0.1 ml	25 ± 0.7	250.0 ± 13.7	+ 44	-	< 0.05
Verano	6	0.1 ml	23 ± 0.6	202.0 ± 8.7	-	II-III	-
Otoño	6	0.1 ml	25 ± 0.8	219.0 ± 19.7	+ 8	-	N.S.
Verano	6	0.1 ml	23 ± 0.6	202.0 ± 8.7	-	II-IV	-
Invierno	11	0.1 ml	26 ± 0.7	250.0 ± 13.7	+ 24	-	N.S.
Otoño	6	0.1 ml	25 ± 0.8	219.0 ± 19.7	-	III-IV	-
Invierno	11	0.1 ml	26 ± 0.7	250.0 ± 13.7	+ 14	-	N.S.

TABLA 16
COMPARACION DEL TIEMPO DE COAGULACION EN RATON MACHO CD1
TRATADOS EN LAS DIFERENTES ESTACIONES DEL AÑO
CON DEDAME (VIII) (4 mg/100g)

Estaciones del año	n	Dosis/100g	Peso Corporal $\bar{X} \pm e.e.m.$ (g)	Tiempo de Coagulación $\bar{X} \pm e.e.m.$ (seg)	Grupos que se comparan	Diferencia en %	P (Dunn)
Primavera	13	4 mg	24 ± 0.8	257.4 ± 12.5	-	-	-
Verano	8	4 mg	25 ± 0.8	302.5 ± 19.3	I-II	+ 17	N.S.
Primavera	12	4 mg	24 ± 0.8	257.4 ± 12.5	-	-	-
Otoño	7	4 mg	26 ± 1.2	346.0 ± 34.8	I-III	+ 34	< 0.05
Primavera	12	4 mg	24 ± 0.8	257.4 ± 12.5	-	-	-
Invierno	8	4 mg	25 ± 0.7	397.4 ± 21.0	I-IV	+ 54	< 0.05
Verano	8	4 mg	25 ± 0.8	302.5 ± 19.3	-	-	-
Otoño	7	4 mg	26 ± 1.2	346.0 ± 34.8	II-III	+ 14	N.S.
Verano	8	4 mg	25 ± 0.8	302.5 ± 19.3	-	-	-
Invierno	8	4 mg	25 ± 0.7	397.4 ± 21.0	II-IV	+ 31	< 0.05
Otoño	7	4 mg	26 ± 1.2	346.0 ± 34.8	-	-	-
Invierno	8	4 mg	25 ± 0.7	397.4 ± 21.0	III-IV	+ 15	N.S.

TABLA 17
COMPARACION DEL TIEMPO DE COAGULACIÓN EN RATON MACHO CD₁
TRATADOS EN LAS DIFERENTES ESTACIONES DEL AÑO CON DEDAME (VIII) (8 mg/100g)

Estaciones Del año	n	Dosis/100g	Peso Corporal X ± e.m. (g)	Tiempo de Coagulación X ± e.m. (seg)	Diferencia en %	P (Student)	P (Dunn)
Primavera	12	8 mg	26 ± 0.6	292.3 ± 9.7	-	-	-
Verano	6	8 mg	25 ± 0.8	342.5 ± 18.1	+ 17	I-II	N.S.
Primavera	12	8 mg	26 ± 0.6	292.3 ± 9.7	-	-	-
Otoño	5	8 mg	25 ± 0.8	389.0 ± 45.6	+ 33	I-III	N.S.
Primavera	12	8 mg	26 ± 0.6	292.3 ± 9.7	-	-	-
Invierno	11	8 mg	27 ± 0.7	481.2 ± 32.2	+ 65	I-IV	< 0.05
Verano	6	8 mg	25 ± 0.8	342.5 ± 18.1	-	-	-
Otoño	5	8 mg	25 ± 0.8	389.0 ± 45.6	+ 14	II-III	N.S.
Verano	6	8 mg	25 ± 0.8	342.5 ± 18.1	-	-	-
Invierno	11	8 mg	27 ± 0.7	481.2 ± 32.2	+ 40	II-IV	N.S.
Otoño	5	8 mg	25 ± 0.8	389.0 ± 45.6	-	-	-
Invierno	11	8 mg	27 ± 0.7	481.2 ± 32.2	+ 24	III-IV	N.S.

V.-CONCLUSIONES:

- 1.- Se obtuvieron por síntesis química en buen rendimiento, se identificaron y caracterizaron los dos siguientes compuestos nuevos:
 - a) Dedame: 17β -(N,N-dietilaminoetilamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol.
 - b) Dedamán 17β -(N, N-dietilaminoetilamino)- 5α -androstan- 3β -ol

- 2.- El dedame y el pentolame producen en ratones un incremento en el tiempo de coagulación total de 92 y 62 % respectivamente. La reducción a dos metilenos no afecta la acción anticoagulante. La magnitud mayor en el efecto anticoagulante del dedame, probablemente se deba al aumento en la liposolubilidad lograda con la adición de dos etilos en el grupo amino terminal.

- 3.- El dedame tiene su máximo efecto anticoagulante a las 24 horas, el cual disminuye paulatinamente, manteniendo su significancia estadística hasta las 72 horas.

- 4.- El dedamán, derivado del androstano, no altera el tiempo de coagulación sanguínea, ni aún a dosis dobles de las empleadas para obtener un efecto de gran magnitud y duración con el aminoestrógeno dedame. Lo anterior indica que el anillo aromático es de gran importancia para producir el efecto anticoagulante.

- 5.- La acción estrogénica del dedame es de menor magnitud en forma significativa que la del estradiol, pero mayor que la del pentolame.

6.- La administración de dedame no inhibe la acción uterotrópica del estradiol.

7.- El efecto anticoagulante del dedame varía con las estaciones del año, incrementándose significativamente en invierno.

8.- El efecto anticoagulante prolongado y la ausencia de una fase procoagulante, sugiere que el dedame puede ser útil en el tratamiento del cáncer prostático y síndrome climatérico, así como componente estrogénico de los anticonceptivos. Pudiendo reducir el riesgo de eventos tromboembólicos y minimizar los efectos feminizantes en pacientes masculinos.

VI.- BIBLIOGRAFIA

1. The coronary Drug Project Research Group: Findings leading to discontinuation of the 2.5/mg/day estrogen group. *J.A.M.A.* 1973, 226:652-657
2. Rosemberg L., Palmer J.R., Lesko S.M., and Shapiro S., Oral contraceptive use and risk of myocardial infarction *Am J Epidemiol.* 1990, 131:1009-1013
3. Stadel B.V., Oral contraceptives and cardiovascular disease. First part. *N Engl J Med* 1981, 305:672-675
4. Paddington N.S.W., The effect of oestrogen on the female cardiovascular system. *Med J Aust (Australia).* 1992, 157:204-208.
5. Mammen E., Oral contraceptives and blood coagulation: A critical review. *Am J Obstet Gynecol.* 1982, 142:781-790.
6. Eisemberg PR. Thrombosis and Fibrinolysis in acute myocardial infarction . *Alcohol Clin Exp Res.* 1994, 18(1):97-104
7. Meade TW. Thrombosis and cardiovascular disease. *Ann Epidemiol.* 1992, 2(4):353-364.
8. Barret-Connor E., and Bush T. Estrogen and coronary heart disease in women. *J.A.M. A.*, 1991, 265:1861.
9. Kalin M.F., and Zumoff B. Sex hormones and coronary disease: a review of clinical studies. *Steroid.* 1990, 55:330-352
10. Beller F K., and Ebert C. Effects of oral contraceptives in blood coagulation. A review. *Obstet Gynecol Surv.* 1985;40(7):425-436.

11. Samuel I. Blood coagulation its alterations in hemorrhagic and thrombotic disorders. *The Western Journal of Medicine*. 1993, 158(2): 153-162.
12. Wren BG. The effect of oestrogen on the female cardiovascular system. *Med J Aust*. 1992, 157(3):204-208.
13. Mustard J. F., and Packham M. A., Thromboembolism. A manifestation of the response of blood to injure. *Circulation* 1970, 42:1-21.
14. Irely NS., Manion WC., and Taylor HB. Vascular lesions in women taking oral contraceptives. *Arch Pathol*. 1970, 89:1-8.
15. De Lingnieres B. Estrogens, progestins and vascular risk. *Rev Prat*. 1993, 43(20):2631-2637.
16. Thomas DP., Merton RE., Wood D., and Hockley DJ. The relationship between vessel wall injury and venus thrombosis: an experimental study. *Br J Haematol*. 1985, 59:449-453.
17. Wessler S., Trombosis and sex hormones: A perplexing liaison . *J Lab Clin Med* 1980;86:757-761.
18. Ashford T P., and Frieman D G., Platelet aggregation at sites of minimal endothelium injury. An electron microscopic study. *Amer J Pathol*. 1968, 53:559-607
19. Goodrich S M., and Wood J E., The effect of estradiol-17 β on peripheral venous distensibility and velocity of venous blood flow. *Am J Obstet Gynecol*. 1966;96:407-412.
20. Maclachin A D., Maclachin J A., Lory T., and Rowling E O., Venous stasis in the lower extremities. *Arch Surg*. 1960;152:678-685.

21. Kjaeldgaard A., and Larson B. Long-term treatment with combined oral contraceptives and cigarettes smoking associated with impaired activity of tissue plasminogen activator. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1986, 65:219-222.
22. Willet W C., Colditz GA., and Stampfer MJ. Relative and absolute excess risks of coronary heart disease among women who smoke cigarettes. *N Engl J Med.* 1987;317:1303-1309.
23. Vessey M P., and Doll R. Oral contraceptives and stroke: Findings in large prospective study *Br Med J.* 1984;289:530-531.
24. Stampfer M J., Willet WC and Colditz GA. Prospective study of moderate alcohol consumption and the risk of coronary disease and stroke women. *N Engl Med.* 1988;319:267-273.
25. Mammen EF. Coagulation defects in liver disease. *Med Clin North Am.* 1994, 78(3):545-554.
26. Vane JR., Anggard EE., Botting RM. Regulatory function of the vascular endothelium. *N Engl J med.* 1990, 32:27-29.
27. Gachet C., Cazenabe JP. Induced blood platelet activation: A review. *Nouv Rev Fr hematol.* 1991, 33:347-352.
28. Wilner GD., Nossel HL., LeRoy EC. Aggregation of platelets by collagen. *J Clin Invest.* 1968, 47:2616-2620.
29. Jaffe R., and Deykin D. Evidence for a structural requirement for the aggregation of platelet by collagen. *J Clin Invest* 1974, 53:875-878.
30. Mais DE., Yoakim C., Guindon Y., et al. Photoaffinity labelling of human platelet thromboxane A₂/prostaglandin H₂ receptor. *Biochim Biophys Acta.* 1989, 1012: 184-187.

31. Mehta J., Mehta P., Krop I., and Lawson D. The primary wave of epinephrine-induced platelet aggregation represent α_2 -adrenoreceptor status. *Thromb Res.* 1988, 49:531-536.
32. Hampon J R., Platelet abnormalities induced by the administration of oestrogens. *J Clin Path.* 1970;3:75-80.
33. Poller L., Priest C M., and Thomson J M., Platelet aggregation during oral contraceptives. *Br Med J.* 1969;iv:273-274.
34. Bevers E M., Comfurius P., and Zwaal R F. Mechanisms involved in platelet procoagulant response *Adv Exp Med Biol.* 1993;344:195-207.
35. Baungartner H R., Turitto V T., Weiss HJ. Et al. Effect of shear rate on platelet interaction with subendothelium in citrated and native blood. II. Relationship among platelet adhesion, thrombus dimensions and fibrin deposition. *J Lab Clin Med.* 1980;95:203-221.
36. Mustard JF., Packham MA., and Kinlough-Rathbone RL. Platelets, blood flow and the vessel wall. *Circulation.* 1990, 8 (Suppl 1):1-24-31.
37. Huch KM., Elam MB., and Chesney CM. Oral contraceptive steroid induced platelet coagulant hyperactivity of in vivo and in vitro effect. *Thromb Res.* 1987, 1:41-50.
38. Simioni P., Zanardi S., and Saracino A. Occurrence of arterial thrombosis in a cohort of patients with hereditary deficiency of clotting inhibitors. *J Med.* 1992, 23:61-65.
39. Gertsman B B, Piper J M., Tomita d K., Ferguson W J., Stadel B V., and Lundin F E., Oral contraceptive estrogen dose and the risk of deep venous thromboembolic disease. *Am J Epidemiol.* 1991;133(1):32-37.

40. Lowe GDO, et al. Increased blood viscosity in young women using oral contraceptives. *Am J Obstet Gynecol.* 1980;137:840-842,
41. Elder MG., Hakim CA., and Hawkins DF. Plasma factor IX levels and oral contraception *J Obstet Gynecol Br Common W.* 1971, 78:277-279.
42. Libro. HEMOSTASIS AND THROMBOSIS. Basic Principles and Clinical Practice. Chapter 2. The Blood Coagulation Factors: Their cDNAs, Genes, and Expression. Third Edition J. B. Lippincott Company Philadelphia. 1994, p 19-54
43. Libro: DISORDERS OF HEMOSTASIS AND THROMBOSIS. A Clinical Guide. William E. Haçthaway., Scott H Goodnight, Jr. Mc.graw-Hill. 1993, Chapter 19, p 171-174.
44. Badimon L., Meyer BJ., and Badimon JJ. Thrombin in arterial thrombosis. *Haemostasis.* 1994, 24(2):69-80.
45. Alperin JB. Estrogens and surgery in women with von Willebrand's disease. *Am J Med.* 1982;73:367-370.
46. Franca Citarella., Silvia Misiti., Angelina Felici., et al. Estrogen induction and contact phase activation of human factor XII. *Steroid.* 1996, 61:270-276.
47. Lobo R A., Cardiovascular implication of estrogens replacement therapy *Obstet Gynecol.* 1990;75(4 suppl):185-256.
48. Werner I., Stoker G., Haeberli A., and Werner S. Effect of low and high dose oral contraceptives on blood coagulation and thrombogenesis induced by vascular suben-dothelium exposed to flowing human blood. *Contraception.* 1991, 43(5):435-446.
49. Creig H B W., and Notelowitz M., Natural estrogens and anti-thrombin III levels *Lancet.* 1975;i:412-413.

50. Peterson R A., Krull E P., Finley P., and Ettinger M G., Changes in anti-thrombin III and plasminogen induced by oral contraceptives *Am J clin Path.* 1970;53:486-473.
51. DeStefano V., and Leone G. Mortality related to thrombosis in congenital antithrombin III deficiency. *Lancet.* 1991, 337:847-851.
52. Demar C., Ginsberg JS., and Hirsh J. Thrombosis in antithrombin III deficient persons. Report of a large kindred and literature review. *Ann Intern Med.* 1992, 116:754-762.
53. Hirsh L., Piovella F., Pini M. Congenital antithrombin III deficiency: Incidence and clinical features. *Am J Med* 1989, 87(Suppl 3B):34s-37s.
54. Brenner B., Fishman A., Goldsher D. Cerebral thrombosis in a new born with a congenital deficiency of antithrombin III. *Am J Hematol.* 1988, 27:209-213.
55. Marciniak D., Farley C H., and Desimone P A., Familial thrombosis due to antithrombin deficiency. *Blood.* 1974;43:219-224.
56. Filip D J., Eckstein J D., and Veltkamp J J., Hereditary antithrombin III deficiency and thromboembolism disease. *Am J Hematol.* 1976;2:343-347.
57. Badimon L., Meyer B J., and Badimon J J., Thrombin in arterial thrombosis. *Haemostasis (Switzerland)* 1994;24(2):69-80.
58. Sagar S., Atamatakis J D., Thomas D P., et al Oral Contraceptives, antithrombin III activity, and postoperative deep-vein thrombosis. *Lancet.* 1976;1:509-513.
59. Conard J., Cazenave B., Horellow MH., et al. Thrombosis and pregnancy in congenital deficiencies in AT-III, protein C, or protein S: Study of 78 women. *Thromb Haemost.* 1992;63:319-322.
60. Kenkes-Metthes B., Acquired protein S deficiency. *Clin Invest* 1992;70:529-534.

61. Grewal R P., and Goldberg M A., Stroke in protein C deficiency. *Am Med J.* 1990;89:538-541.
62. Okajima K., Koga S., Kaji M., et al .Effect of protein C and activated protein C on coagulation and fibrinolysis in normal human subjects. *Throm Haemost.* 1990;63:48.
63. Yates P., Cumber PM., Sanderson S., et al. Mesenteric venous thrombosis due to protein C deficiency. *Clin Lab Haematol.* 1991;13:137-141.
64. Comp PC., Vigano S., D'Angelo A. et al. Acquired protein S deficiency occurs in pregnancy, the nephritic syndrome and acute systemic lupus erythematosus. *Blood.*1985;66 (suppl 1):348-352.
65. Kisiel W. Human plasma protein C: Isolation, characterization and activation by human thrombin. *J Clin Invest.* 1979, 64_761 764.
66. Libro. HEMOSTASIS AND THROMBOSIS. Basic Principles and Clinical Practice. Chapter 13.Biochemistry and Physiology of Protein C, Protein S, and Thrombomodulin. Third Edition J. B. Lippincott Company Philadelphia. 1994, 259-269
67. Walker FJ., Chavin SI., Fay PJ, et al. Inactivation of factor VIII by activated protein C and protin S. *Arch Biochem Biophys.* 1987, 252:322-326.
68. Walker FJ. Regulation of activated protein C by protein S. *J Biol Chem.* 1981, 256:11128-11131.
69. Rick ME. Protein C and protein S. Vitamin K-dependent inhibitors of blood coagulation. *JAMA.* 1990, 263:701-706.
70. Astedt B. Low fibrinolytic activity of veins during treatment with ethynil-oestradiol *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1971;50:279-283.

71. Isacson S., and Nilsson I M., Detective fibrinolysis in blood and vein walls in recurrent idiopathic venous thrombosis. *Acta Chir Scand.* 1972;138: 313-316.
72. Stember B., Bylock a., and Risberg B. Effect of venous stasis on vessel wall fibrinolysis. *Thromb Haemostat.* 1984, 51: 240-244.
73. Prins MH., and Hirsh J. A critical review of the evidence supporting a relationship between fibrinolysis and venous thromboembolism. *Arch Intern Med.* 1991, 151: 1721-1724.
74. Diéval J., Nguyen G., Gross S., Delobel J., Kruithof EKO. A lifelong bleeding disorder associated with a deficiency of plasminogen activator inhibitor type 1. *Blood.* 1991, 77:528-531.
75. Fay WP., Shapiro AD., Shih JL., Schleef RR., Ginsburg D. Brief Report: Complete deficiency of plasminogen-activator inhibitor 1 due to a frame-shift mutation. *New Engl J Med.* 1992, 327:1729-1734.
76. Wilman B., and Collen D. On the mechanism of the reaction between human alpha-2-antiplasmin and plasmin. *J Biol Chem.* 1979, 254:9291-9293.
77. Lobo RA. Effects of hormonal replacement on lipids and lipoproteins in post menopausal women. *J Clin Endocrinol metab* 1991;73:925-930.
78. Carole L. Banka., and Linda K. Curtis, Estrogens as antioxidants: Specific Protection of high density lipoprotein. *Suppl 1. Circulation.* 1996;94(8):152-156.
79. Kevin L. Krasinski, Marcy Silver, et al. Takayuki Asahara, and Douglas W. Losordo. Estrogen replacement therapy accelerates re-endothelialization of balloon injured arteries in ovariectomized rat model. *Suppl 1. Circulation.* 1996;94(8):1-5.
80. Henderson B E., Paganini-Hill A., and Ross RK. Decrease mortality in users of estrogens replacement therapy. *Arch Intern Med.* 1991;151:75-78.

81. Henderson B E., Paganini-Hill A., and Ross RK. Estrogen replacement therapy and protection from acute myocardial infarction . *Am J Obstet Gynecol.* 1988;159:312-317.
82. Notelovitz M. Estrogens replacement therapy: indications, contraindications and agent selection !see comments!. *Am J Obstet Gynecol.* 1989, 161(6pt2):236-243.
83. Diez-Ewald M., Fernández G., Ryder E., and Vizcaino G. Effect of low doses of estrogens in menopausal women. *Invest Clin (Venezuela).* 1993, 34(1):29-39.
84. Psaty BM., Heckbert SR., Atkins D., et al. A review of the association of estrogens and progestins with cardiovascular disease in postmenopausal women. *Arch Intern Med.* 1993, 153(12):1421-1427.
85. Krauss R M. Effects of estrogens dose and smoking on lipid levels and lipoprotein levels in postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol.* 1988;158:1606-1611.
86. Voloterrani M., Rosano G., Coats A., Beale C., and Collin P. Estrogen acutely increases peripheral blood flow in postmenopausal women. *Am J Med.* 1995;99(2):119-122.
87. Werner I., Stocker G., Haeberli A., and Werner S. Effect of low and high dose oral contraceptives on blood coagulation and thrombogenesis induced by vascular subendothelium exposed to flowing human blood. *Contraception.* 1991;43(5):435-446.
88. Mandoki J.J., Zavala E., Silva G., et al The dual effect of estrogens on blood clotting time. *Proc West Pharmacol Soc.* 1983, 26:45-48.
89. Rubio-Póo C., Mandoki J.J., Jayme V., et al. Prodiame: A new estrogen with sustained anticoagulant effect. *Proc West Pharmacol Soc.* 1983, 26:111-113.

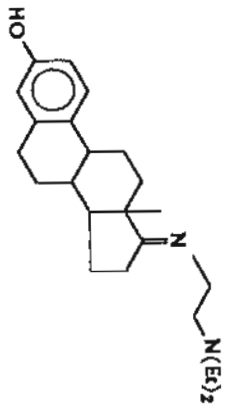
90. Fernández-G JM., Rubio-Arroyo M., Rubio-Póo C., et al. Synthesis and molecular structure of prolame. An amino- estrogen with prolonged anticoagulant effect and brief estrogenic effects. *Steroid*. 1985, 45:151-157.
91. Rubio-Póo C., Mandoki J.J., Mendoza-Patiño N., et al. The anticoagulant effect of prolame, a novel amine-estrogen. *Steroid*. 1985, 45:159-170.
92. Rubio-Póo C., Lemini C., García Mondragón J., et al. The anticoagulant effect of hexolame, another amino-estrogen with prolonged anticoagulant effect. *Steroid*. 1990, 55:83-86.
93. Lemini C., Rubio-Póo C., Silva G. et al. Anticoagulant and estrogenic effects of two new 17 β -aminoestrogens, butolame and pentolame. *Steroid*. 1993, 58:457-461.
94. Rubio-Póo C., Lemini C., Silva G., et al. Comparison of the time course of anticoagulant effects of prolame, butolame, pentolame and hexolame. A homologous series of 17 β -amino estrogens. *Proc West Pharmacol Soc*. 1993, 36:143-147.
95. Mandoki J.J., Rubio-Póo C., Lemini C., et al. The effects of five new 17 β -amino-estrogens, Buame, Endiame, Etolame, Picae, and Proacame on blood clotting time. *Proc West Pharmacol Soc*. 1991, 34:99-106.
96. Kraft M., and Martin RJ. Chronobiology and chronotherapy in medicine. *Dis Mon* 1995, 41(8):501-575.
97. Decousus H., Boissier C., Perpoint B., et al. Circadian dynamics of coagulation and chronopathology of cardio vascular and cerebrovascular events. Future therapeutic implications for the treatment of these disorders?. *Ann N Y Acad Sci*. 1991, 618:159-165.

98. Quyyumi., Arshed A. Circadian rhythms in cardiovascular disease. *American Heart Journal*. 1990, 120 (3):726-734
99. Smolensky MH. Chronobiology and chronotherapeutics. Applications to cardiovascular medicine. *Am J Hypertens*. 1996, 9 (4pt3):11s-21s.
100. Hannah M. Cooke and Agnes Lynch. Biorhythms and chronotherapy in cardiovascular disease. *Am J Hosp Pharm*. 1994, 51:2569-2580.
101. Van der Hoofdakker RH. Chronobiological theories of nonseasonal affective disorders and their implications for treatment. *J Biol Rhythms*. 1994, 9(2):157-183.
102. Lee T. M., and Zucker I., Seasonal variations in circadian rhythms persist gonadectomized golden-mantled ground squirrels. *J Biol Rhythms*. 1995, 10(3):188-195.
103. Sandyk R., Anninos PA., and Tsagas N. Magnetic fields and seasonality of affective illness: implications for therapy. *Int J Neurosci*. 1991, 58(3-4):261-267.
104. Mandoki JJ., and Rubio C. The effects of estrogens on blood clotting time. *The Pharmacologist*. 1966, 8:212.
105. Allen E., and Doisy EA. An ovarian hormone, preliminary report on its localization, extraction and partial purification, and acción in test animals. *JAMA*. 1923, 81:819-821.
106. Evans JS., Varney RF., and Koch FC. The mouse uterine weight method for assay of estrogens. *Endocrinology*. 1941, 28:747-752.
107. Book. Snedecor GW., & Cochran WG. *Statistic Methods* 8th Edition. Iowa State University Press, Ames, 1989, p. 96-98.
108. Book. Zar JH., *Biostatistical analysis*, 2nd Edition Prentice Hall International, Englewood Cliff, New Jersey USA. 1984, p. 194-195.

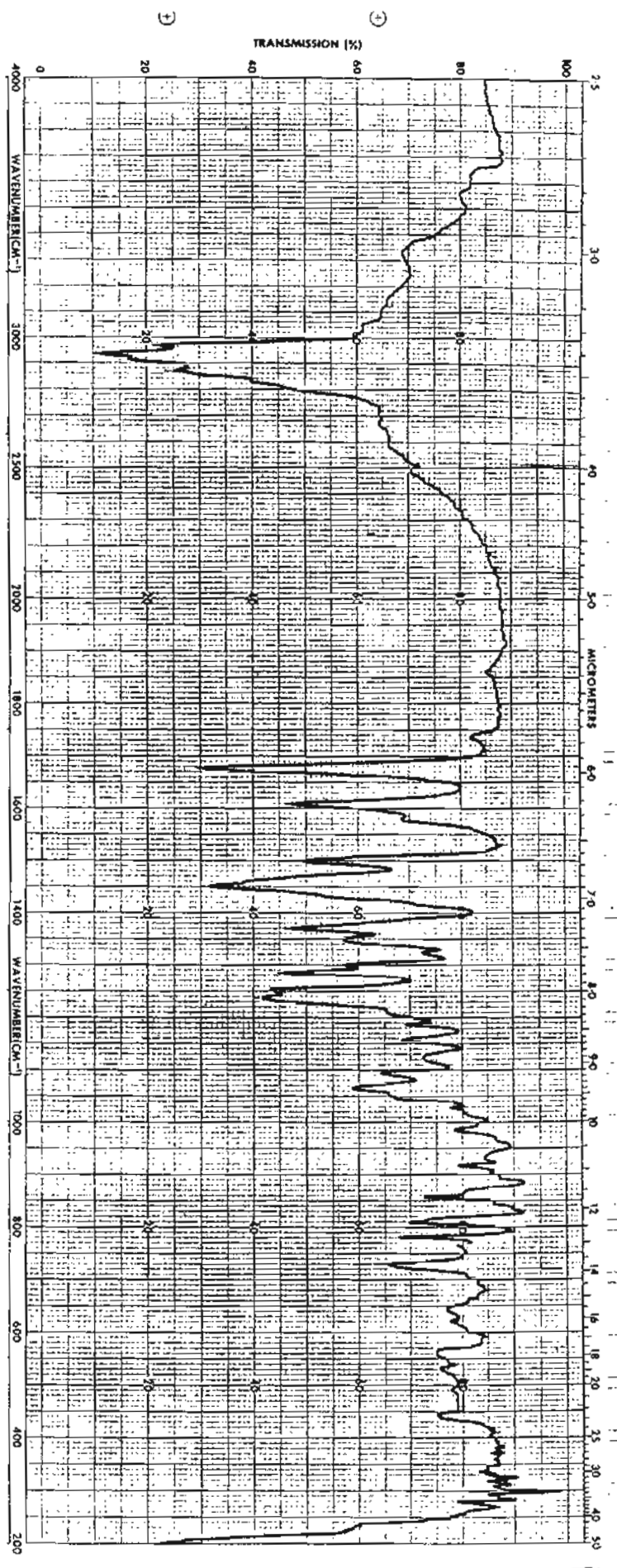
109. Imscher K., Die Umsetzung von Steroidketonen mit Aminoalkoholen. Chem Ber. 1962, 95:907-917.
110. Blinckstaff RT., Foster E., Gerson K and Young P. Synthesis of some analogues of estradiol. Steroid. 1985, 46:889-902.

ESPECTROS

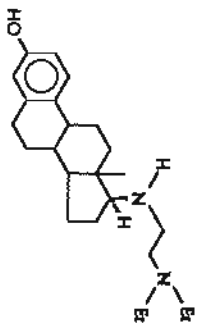
Espetro No. 1. Espetro de IR del 17 β -(N,N-dietilaminoetilimino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol. (XI)



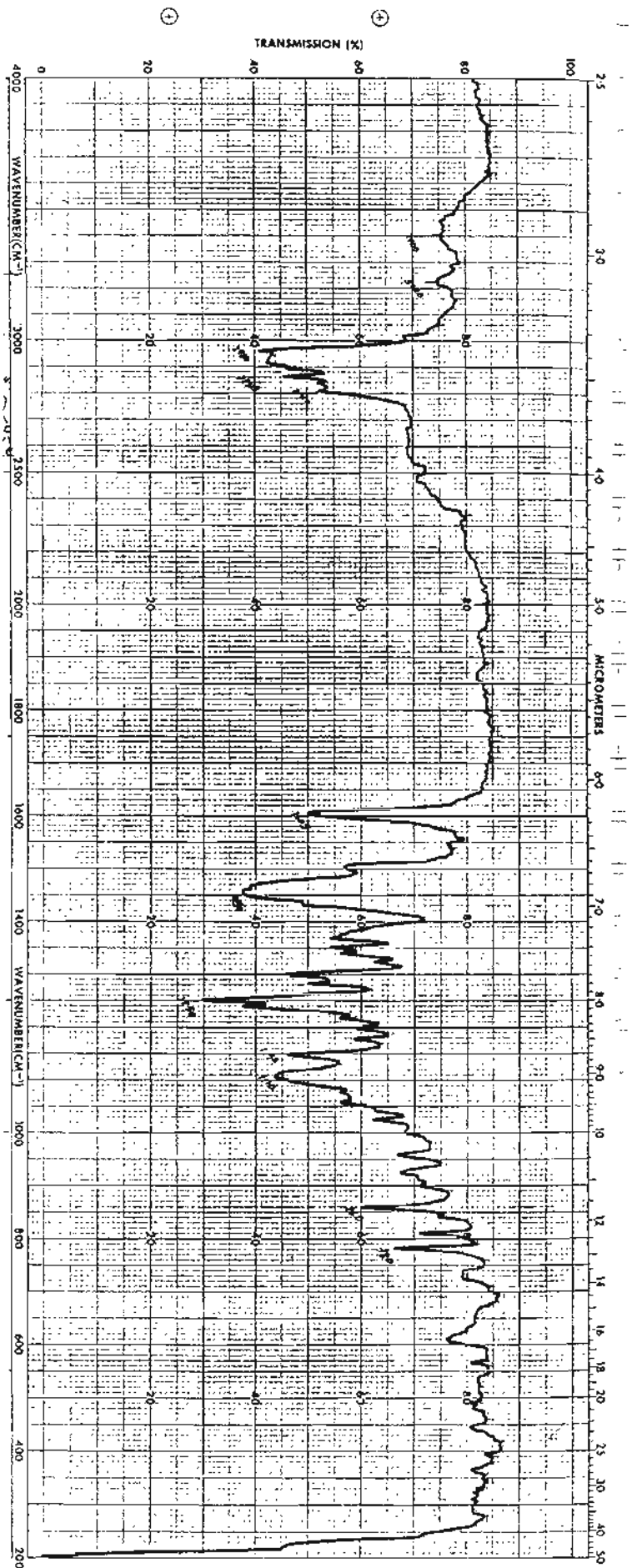
IR (KBr)



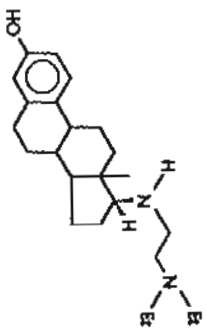
Espectro No. 2. Espectro de IR del 17 β -(N,N'-dietilaminoetilamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol (VIII)



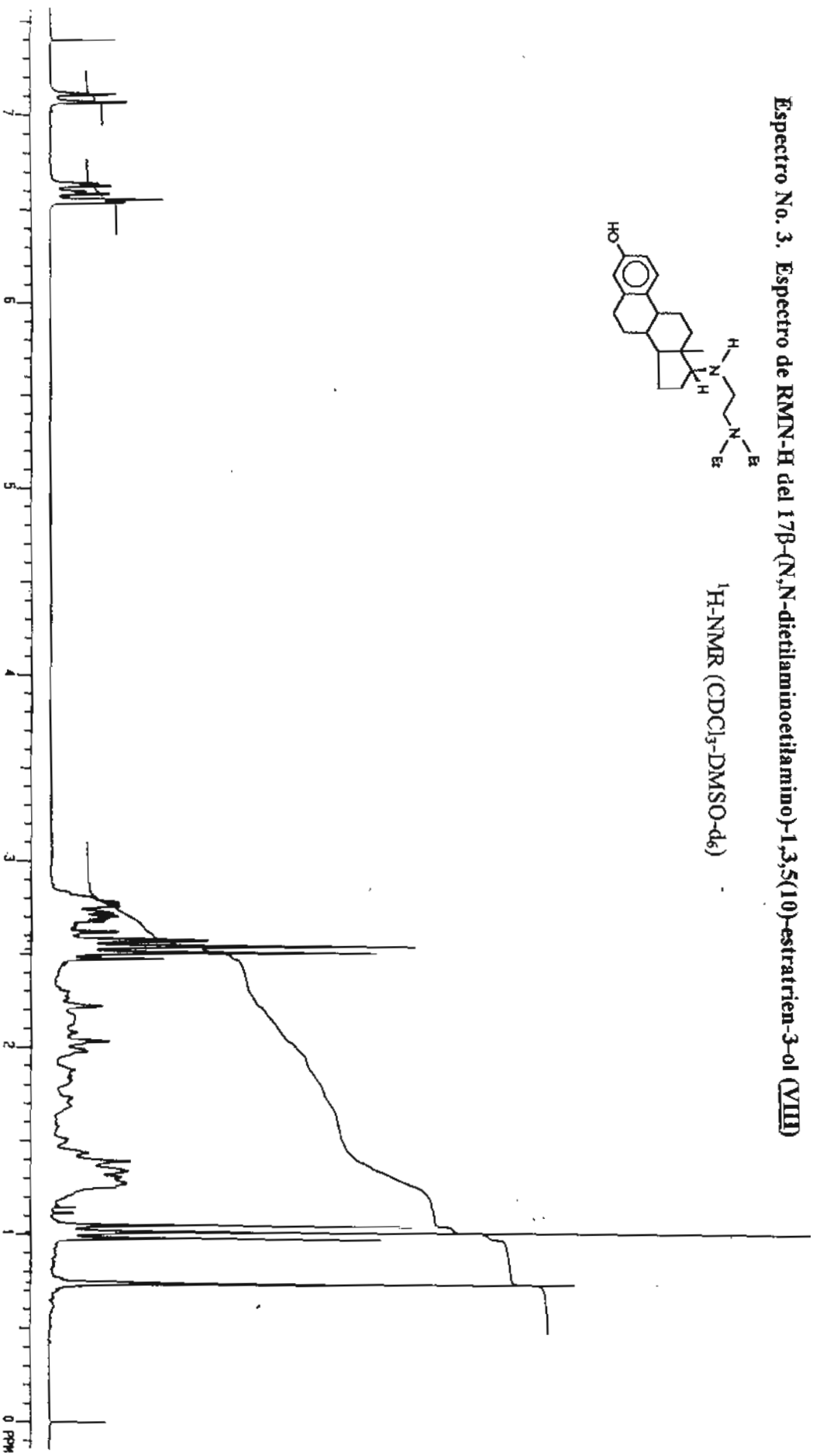
IR (KBr)



Espectro No. 3. Espectro de RMN-H del 17 β -(N,N-dietilaminoetilamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol (VIII)

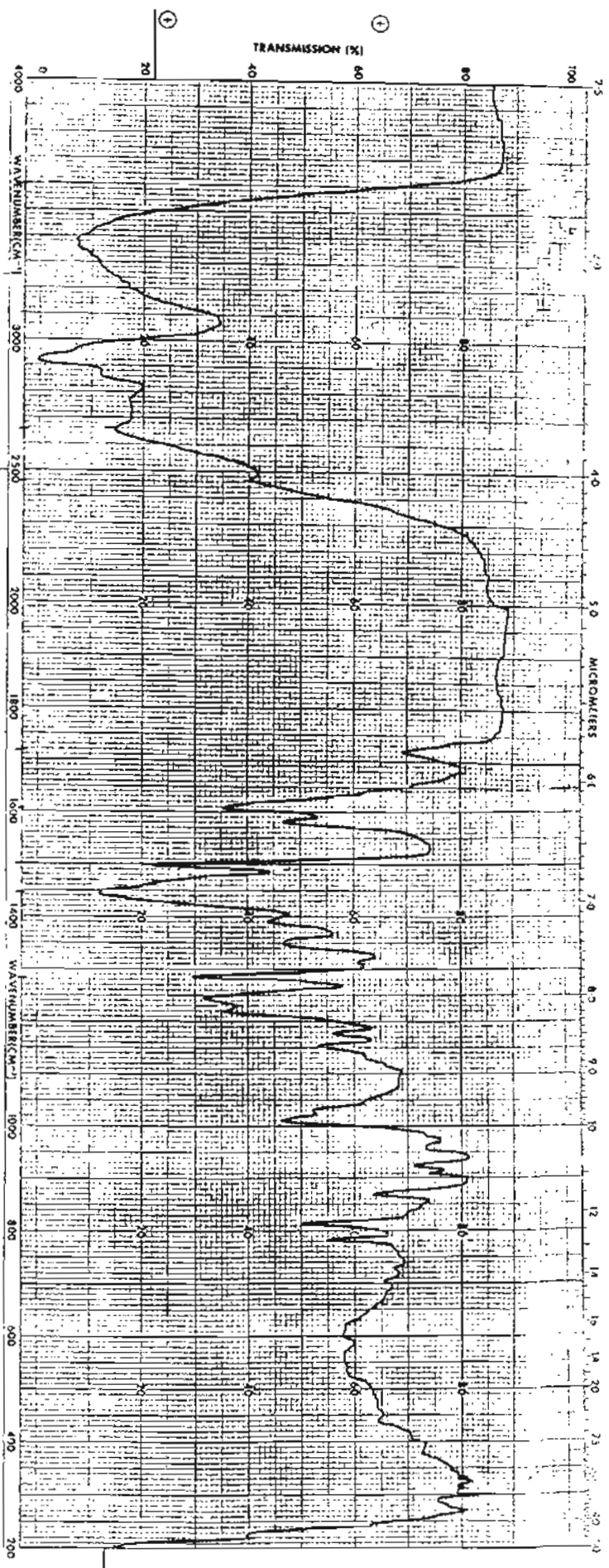
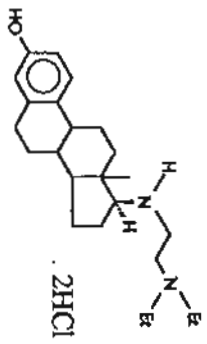


¹H-NMR (CDCl₃-DMSO-d₆)

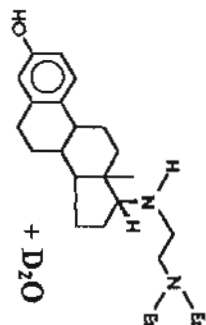


Espectro No. 4 Espectro de IR del 17β-(N,N-dietilaminoetilamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol (VIII). 2HCl

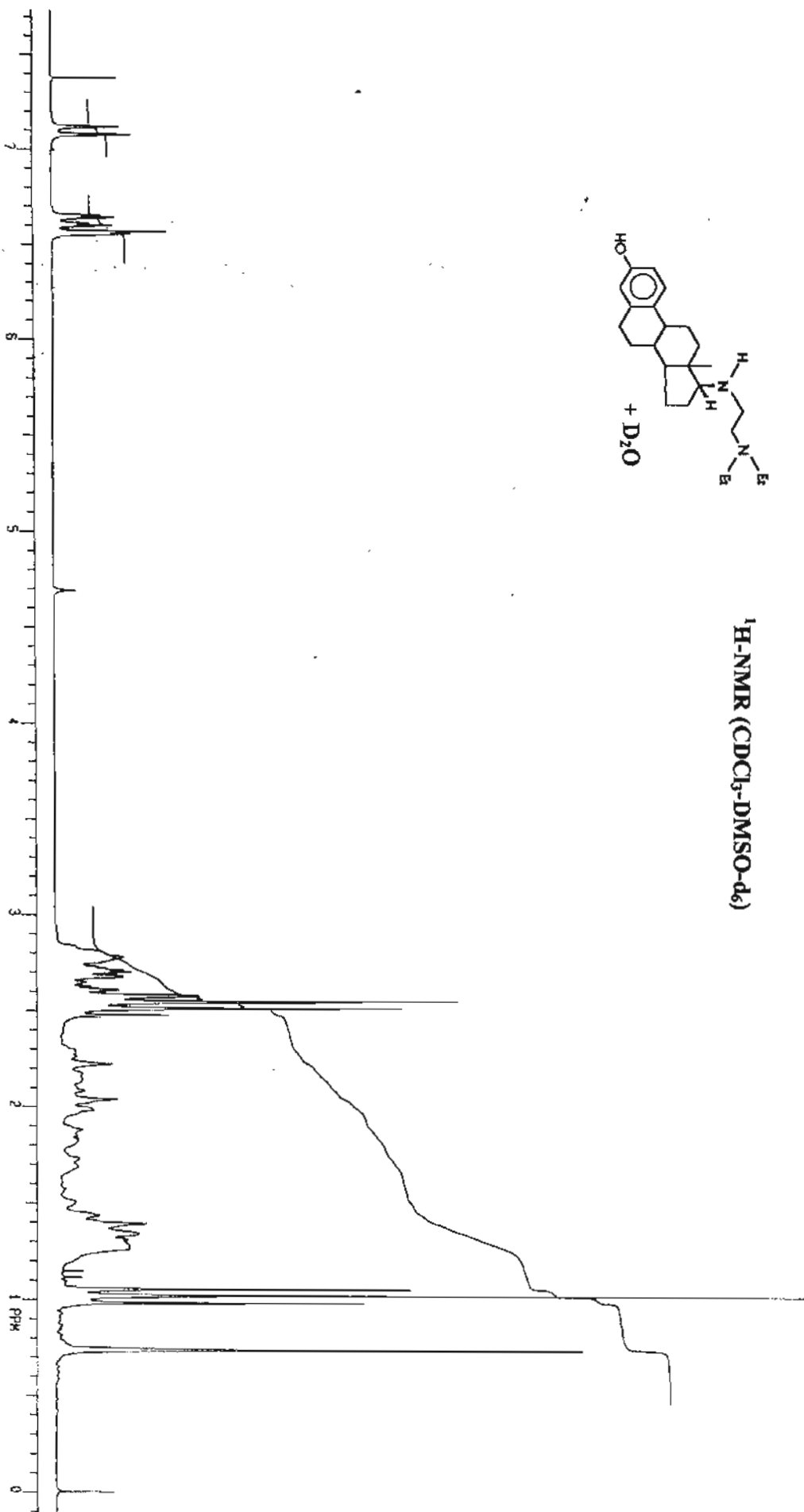
IR(KBr)



Espectro No.5. Espectro de RMN-H del 17 β -(N,N'-diethylaminoetilamino)-1,3,5(10)-
estratrien-3-ol. D₂O (VIII)

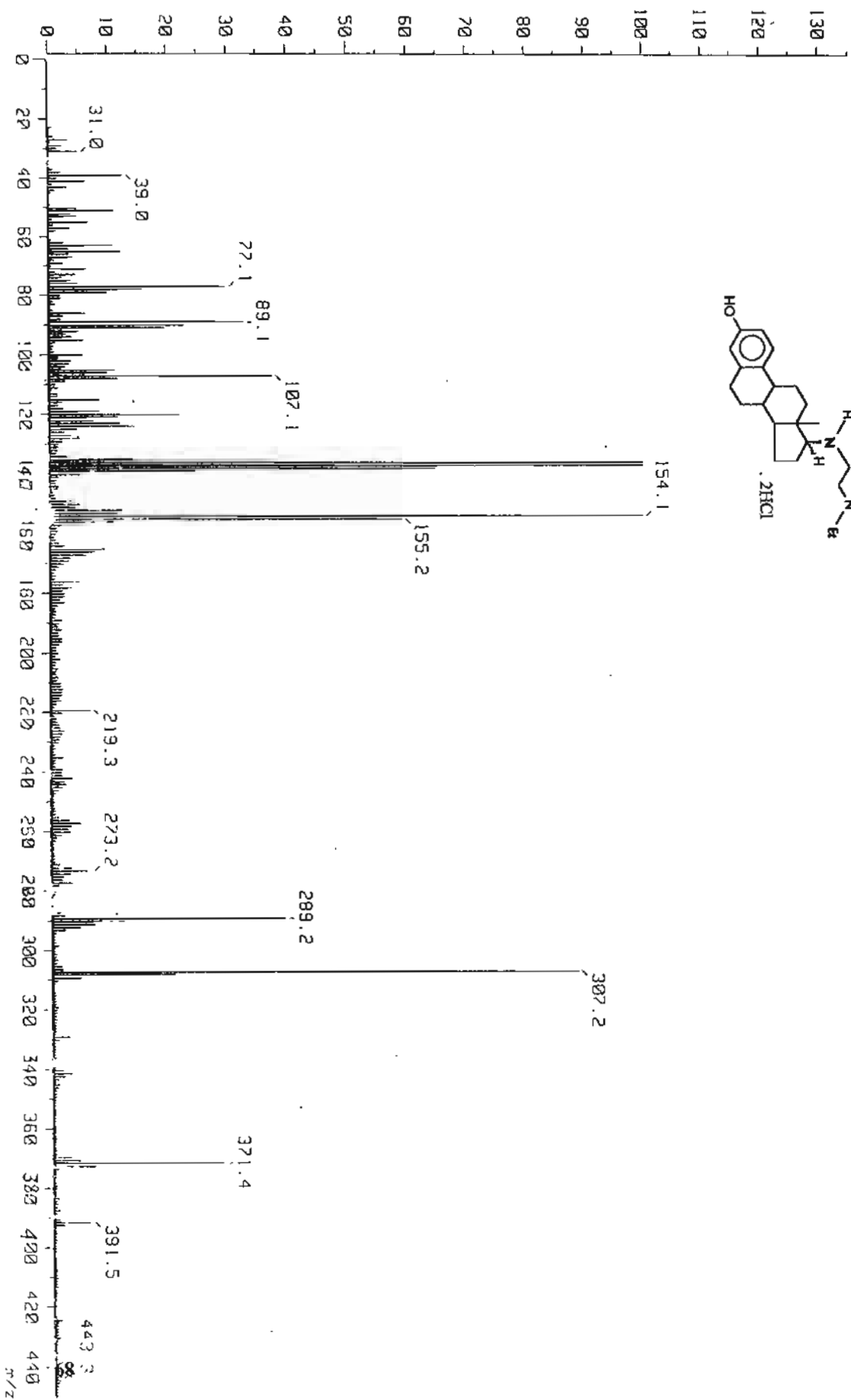
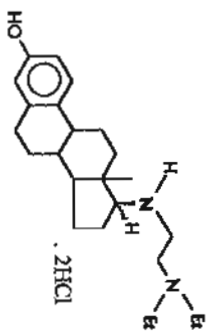


¹H-NMR (CDCl₃-DMSO-d₆)



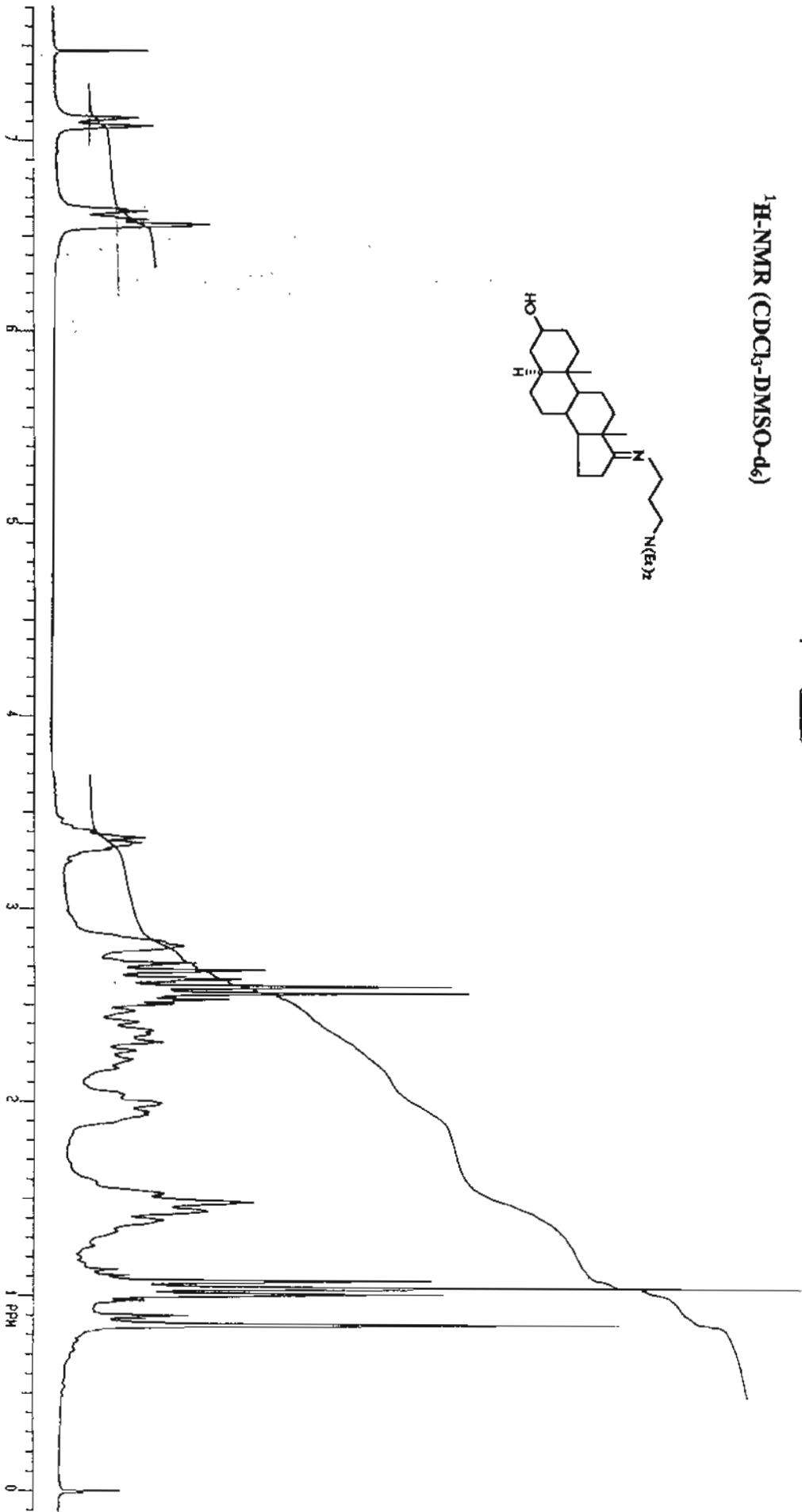
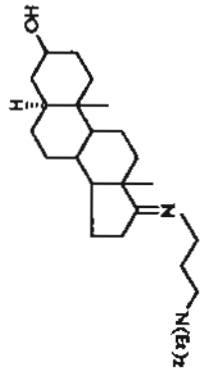
Espectro No. 6 Espectro de Masas del 17 β -(N,N-dietilaminoetilamino)-1,3,5(10)-estratrien-3-ol. (VIII). 2HCl

P. M. 443.4950

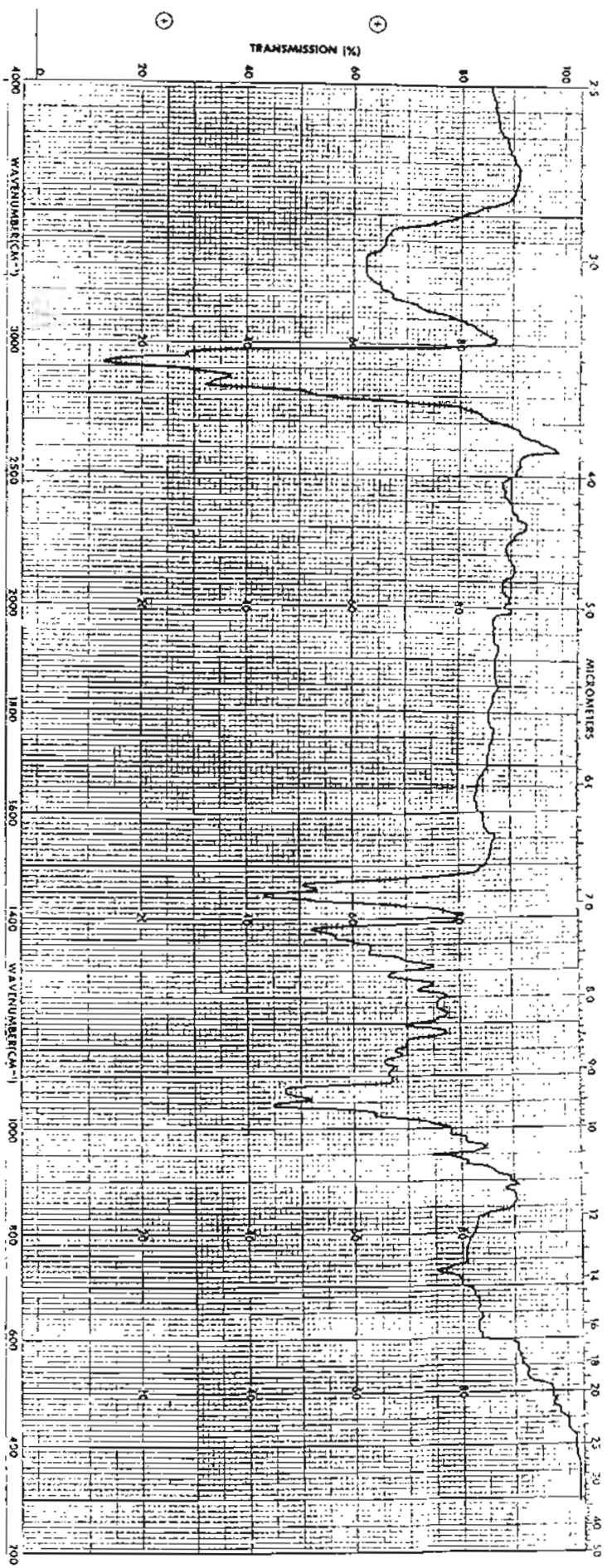
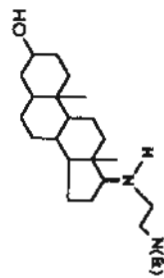


Espectro No. 7 de RMN-H del 17 β -(N,N-dietilaminoetilimino)-
5 α -androstano-3 β -ol (XIII)

¹H-NMR (CDCl₃-DMSO-d₆)

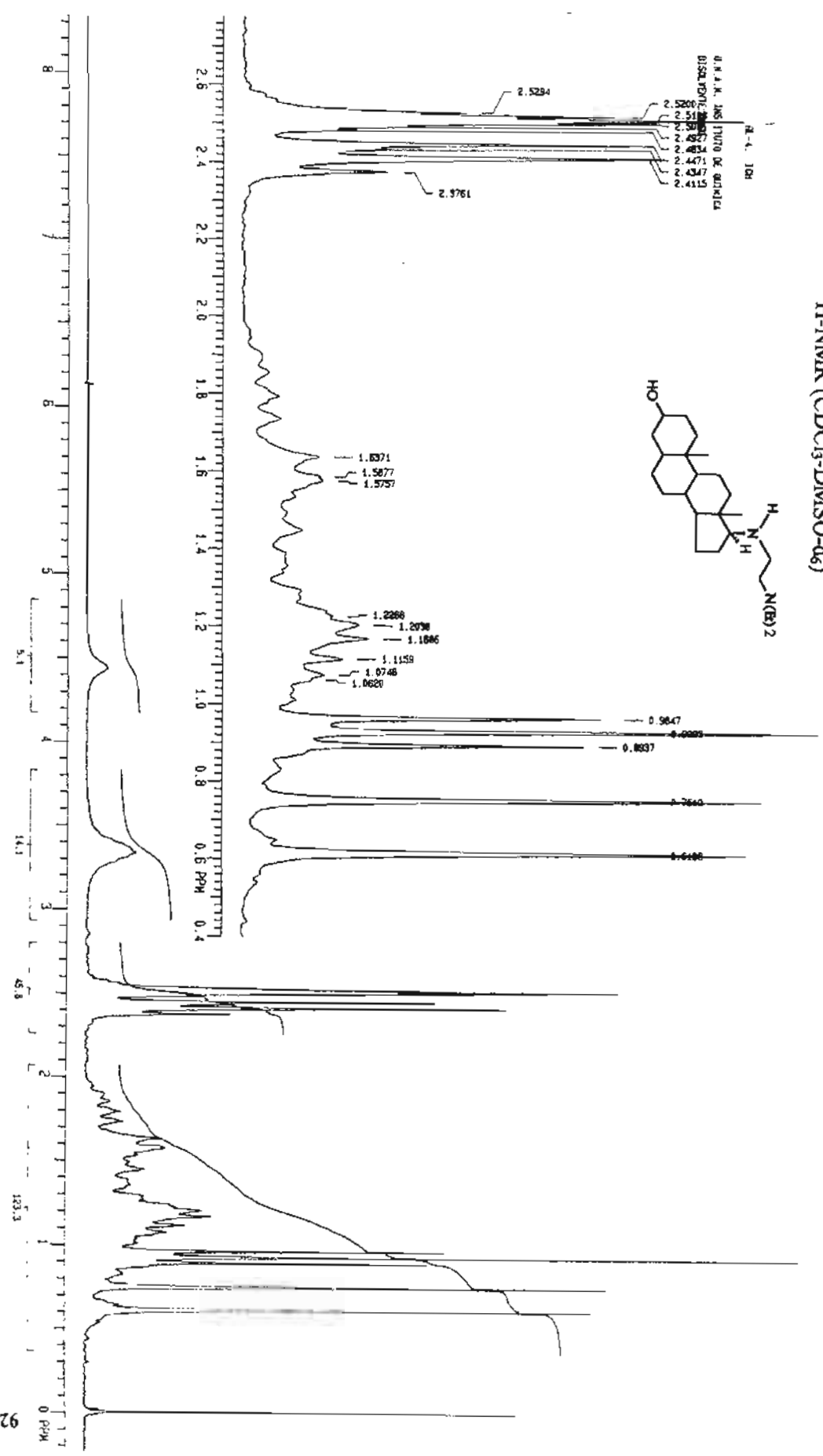
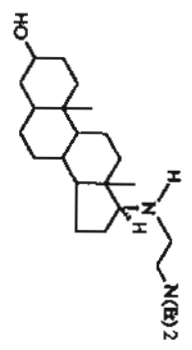


Espectro No.8. Espectro de IR del 17 β -(N,N-dietilaminoetilimino)-5 α -androstano-3 β -ol. (IX)



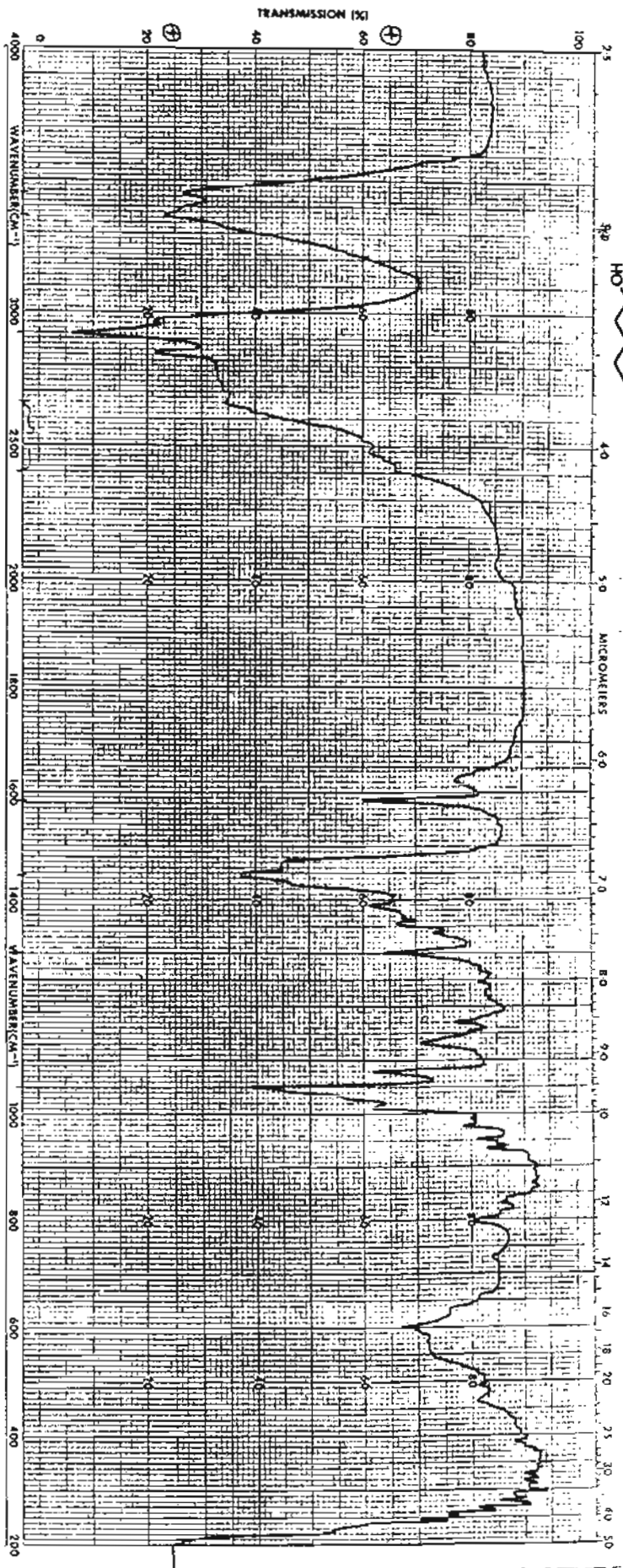
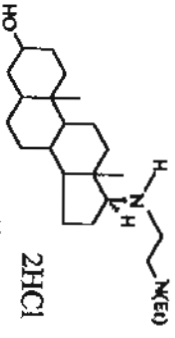
Espectro No. 9 de RMN-H del 17 β -(N,N-dietilamino)- α -androstano-3 β -ol. (IX)

¹H-NMR (CDCl₃-DMSO-d₆)



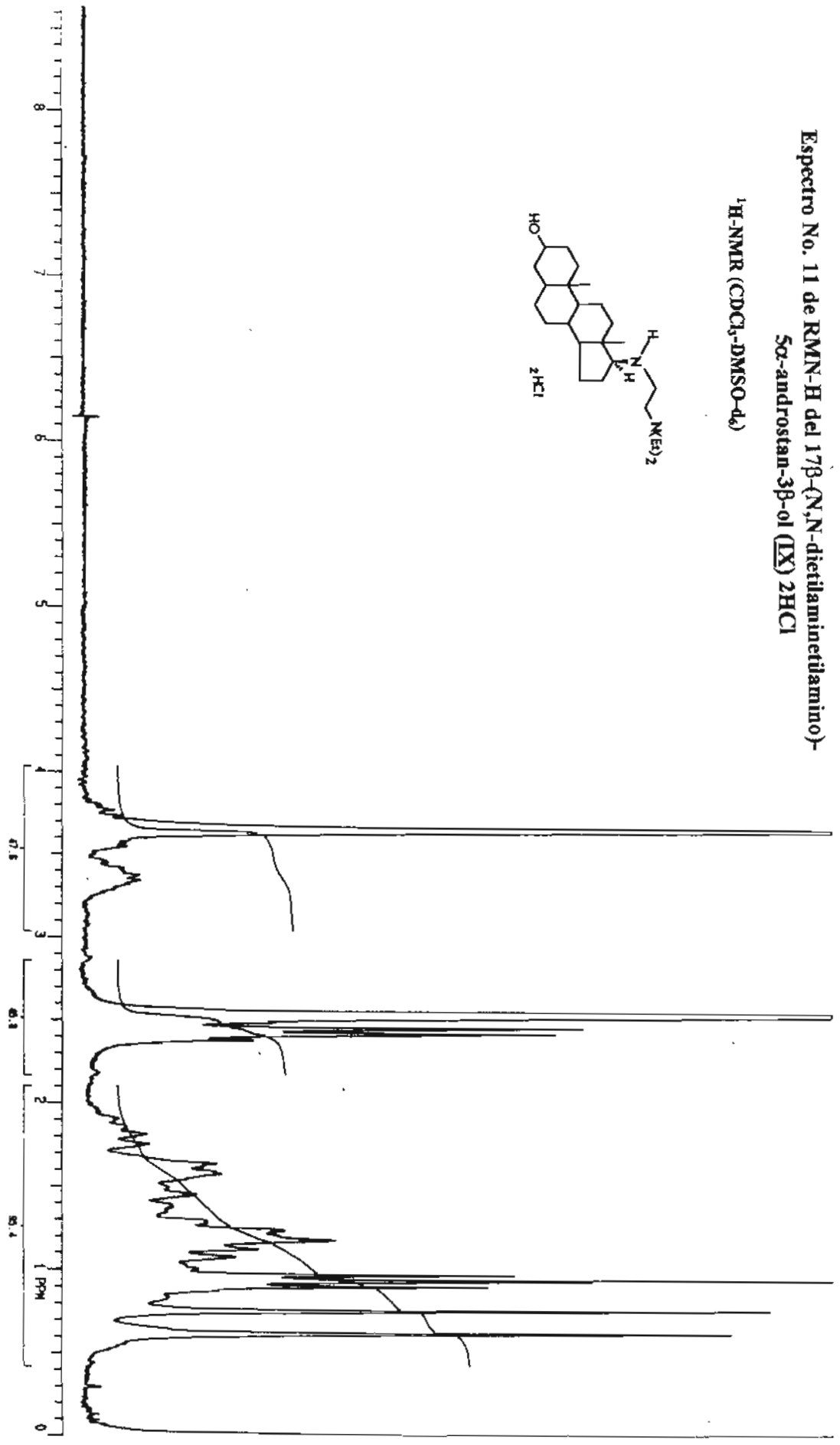
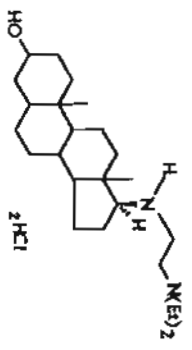
Espectro No. 10 de IR del 17β-(N,N-dietilaminiotilamino)-5α-androstan-3β-ol. (IX) 2KCl

IR (KBr)

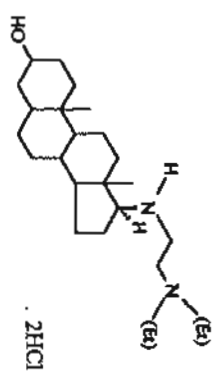
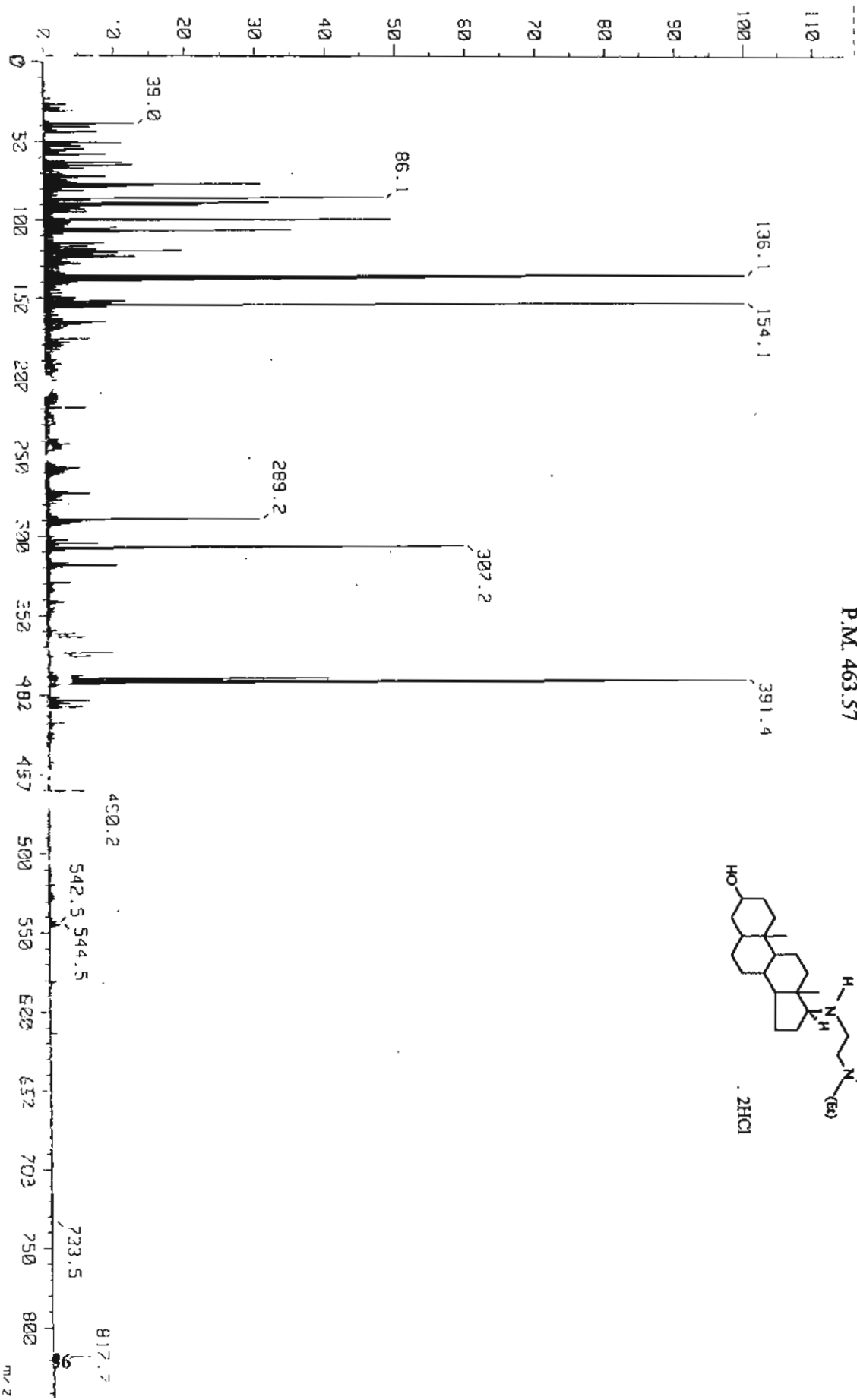


Espectro No. 11 de RMN-H del 17 β -(N,N-dietilamino)-
5 α -androstano-3 β -ol (IX) 2HCl

¹H-NMR (CDCl₃-DMSO-d₆)



Espectro No.12. Espectro de EM del 17 β -(N,N-dietilaminoetilamino)-5 α -androstano-3 β -ol. 2HCl (IX)



**PUBLICACIONES GENERADAS CON ESTE
ESTUDIO**

Medicinal Chemistry Research

*An International Journal for Communication on Design and
Mechanisms of Action of Biologically Active Agents*

Richard A. Glennon, Editor
Alfred Burger, Editor Emeritus

Phone: (804) 828-5256
Fax: (804) 828-7404

Department of Medicinal Chemistry
School of Pharmacy
Box 980540, MCV Station
Medical College of Virginia
Virginia Commonwealth University
Richmond, VA 23298-0540 USA

Dr. Christina Lemini
Ciudad Universitaria CP04510
Apdo. Postal 70-297
Mexico

February 20, 1997

Fax: 011525-6161489

Dear Dr. Lemini,

We are please to inform you that your manuscript MS# 7360 now entitled "Effects of 17β -(N,N-diethylaminoethyl)amino-1,3,5(10)-estratrien-3-ol, and its androstane analog on blood clotting time" has been accepted for publication in Medicinal Chemistry Research. Please complete the enclosed copyright form and mail or fax it directly to Ms. Elizabeth Hyman (617-876-1272) Birkhauser in Cambridge, MA within 10 days upon receipt.

Thank you for considering Medicinal Chemistry Research for the publication for your work.

Sincerely,



Richard A. Glennon, Ph.D.
Editor

RAG/dk

enclosures

EFFECTS OF 17 β -(N,N-DIETHYLAMINOETHYL)AMINO-1,3,5(10)-ESTRATRIEN-3-OL,
AND ITS ANDROSTANE ANALOG ON BLOOD CLOTTING TIME.

Consuelo Rubio-Póo,¹ Cristina Lemini,^{1*} Griselda Silva,¹ Beatríz Chávez Lara,¹ Nicandro Mendoza-Patiño,¹ Rocío Ortiz² and Juan José Mandoki¹.

¹ Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, UNAM, Ciudad Universitaria, C.P. 04510,
Apdo. Postal 70-297. ² UAM, Ixtapalapa, México, D. F.

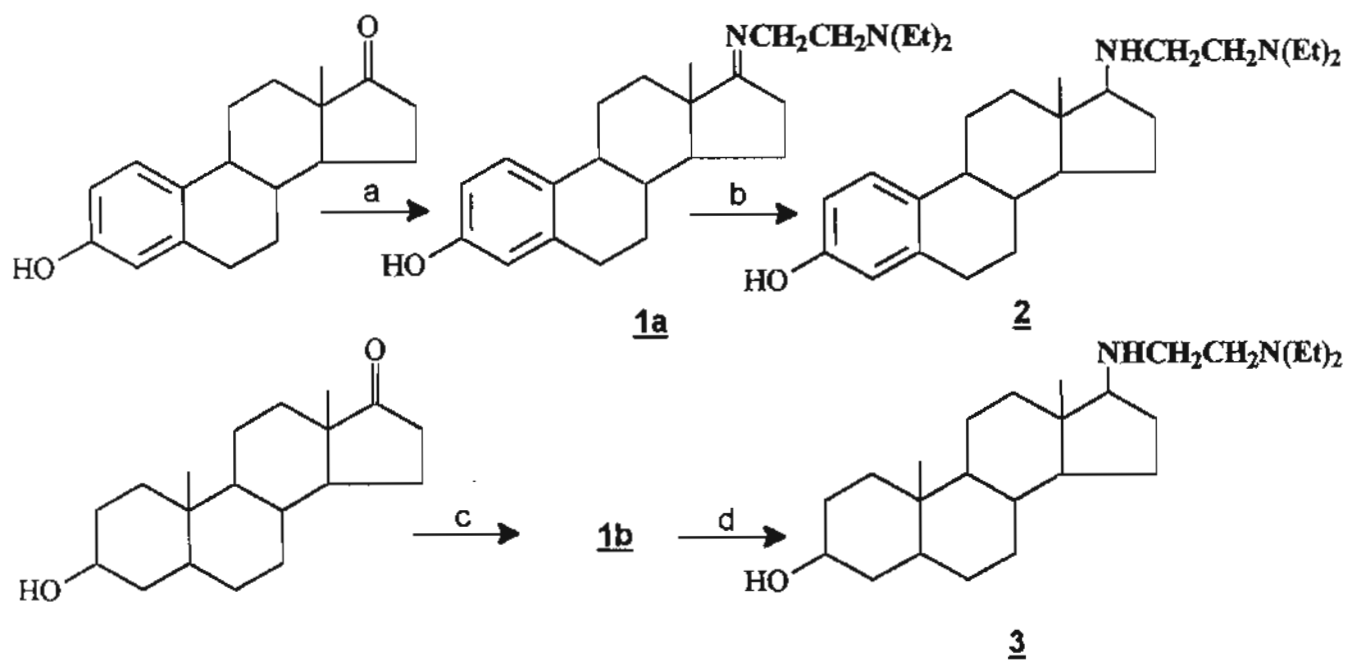
ABSTRACT. The 17 β -diamino-steroids 17 β -(N,N-diethylaminoethyl)-amino-1,3,5,(10)-estratrien-3-ol **2** and its androstane analog 17 β -(N,N-diethylaminoethyl)-amino-5 α -androstane-3 β -ol **3**, were prepared and tested for anticoagulant activity. A single subcutaneous administration of compound **2**, produced in adult male mice, dose-dependent increases in blood clotting times. The androstane analog **3**, had no anticoagulant effect at equivalent and higher doses. Aromaticity of ring A and/or absence of the 19 methyl group may be necessary for anticoagulant effect. The assay of **2** on vaginal cornification and uterine weight showed a moderate estrogenic activity.

Clinical use of estrogens in oral contraception or in prostatic carcinoma, has been associated with an increase in thromboembolic events.^{1,2} Earlier studies from our laboratory in mice and rats, have shown that a single intraperitoneal administration of a large dose of estradiol or diethylstilbestrol, elicits a brief increase in blood clotting time lasting few hours, followed by a more prolonged decrease below the basal value, lasting few days. Subcutaneous administration of the same estrogens, however, only shortens the blood clotting time.³ In contrast, 17 β -amino analogs of estradiol, when administered by a single subcutaneous injection produce dose-dependent anticoagulant effects lasting several days which are not followed by procoagulant effects.⁴⁻⁸ Platelets exposed *in vitro* to 17 β -amino-estrogens show a decrease in platelet aggregation.⁹ These aminoestrogens produce vaginal cornification in mice, increase uterine weight, and decrease *in vitro* uterine contractility. Their estrogenic potency, however, is lower than that of estradiol.¹⁰ 17 β -amino-estrogens may become useful therapeutic agents, particularly in patients with increased risk of thromboembolism, as these compounds lack procoagulant activity.

To learn whether the structure of the steroid attached to the amino side-chain is important for the anticoagulant effect, and as a part of our studies of structure-activity relationships, we have prepared two compounds with the same side-chain, one estrogen analog (17 β -N,N-diethylaminoethyl-amino-1,3,5(10)-estratrien-3-ol 2), and the corresponding androgen analog (17 β -N,N-diethylaminoethyl-amino-5 α -androstan-3-ol 3). Compound 3 is a 5 α -dihydro-testosterone derivative, 5 α -dihydro-testosterone cannot be converted *in vivo* into estradiol, a ring A aromatic derivative.¹¹⁻¹³ Thus, compound 3 is not likely to be aromatized *in vivo*. This study would therefore provide information regarding the influence of aromaticity of ring A on the anticoagulant activity of 17 β -aminoestrogens. Compound 2 produced in mice sustained dose-dependent increases in blood clotting time. Compound 3 had no anticoagulant activity at equivalent or higher doses. Thus, aromaticity of ring A appears to be important for anticoagulant activity. Compound 2 produced vaginal cornification in mice and moderate increases in uterine weight.

CHEMISTRY

The synthesis of compound 2 and its analog 3 is outlined in Scheme 1 and was carried out using a modification of procedures previously reported.⁸ Addition of N,N'-diethylethylenediamine to estrone or isoandrosterone gave the corresponding intermediate imino derivatives 1a and 1b. The imino derivative of the estrone 1a was isolated in 89% yield. Reduction of the imino derivative 1a with sodium borohydride in ethanolic solution afforded 2 in 82% yield.



Scheme 1. Conditions: (a, c) $\text{NH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}(\text{Et})_2/\Delta$ 80-85°C, 24 h; (b, d) $\text{NaBH}_4/\text{EtOH}$

The isoandrosterone imino derivative **1b** was unstable and the compound was reduced directly under the same conditions of **2** to afford **3** in an overall yield of 57%. The structures of the intermediate **1a** and compounds **2** and **3** were characterized by spectroscopic and analytical methods. The data are given in the experimental part. The stereochemistry of the 17 amino derivatives has been reported to be β .¹⁴⁻¹⁶

RESULTS AND DISCUSSION

Compound **2**, administered at 1, 2, 4, and 8 mg/100 g to male mice, produced linear increases in blood clotting times with respect to log doses, the regression coefficients showed no statistically significant deviation from linearity ($b=77.9$ $P=0.017$). With the larger dose, blood clotting times increased by 101% ($P<0.01$) with respect to the control group. The effect on blood coagulation produced by compound **2** was similar to those observed with other 17- β -aminoestrogens.⁴⁻⁸

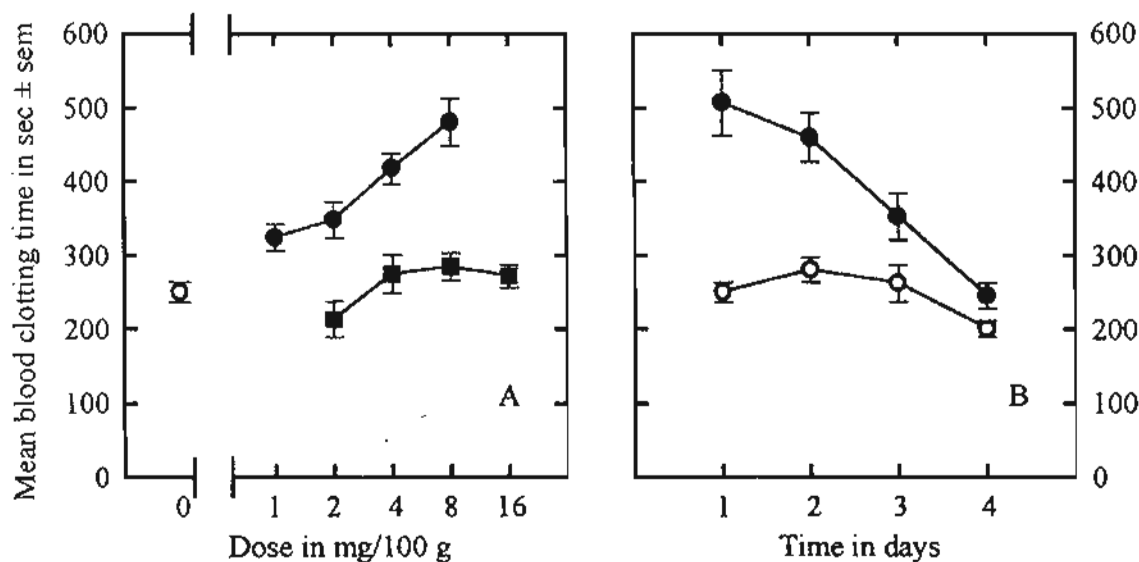


Figure 1: A. Dose-response relationships of **2**, and **3** on blood clotting time 24 hours after a single sc injection. Compounds **2** (●), **3** (■) and solvent (O). B. Disappearance of the anticoagulant effect after a single subcutaneous injection of 8 mg/100g of **2**. $n \geq 7$

The androstane analog **3** at any of the doses tested, (2, 4, 8 and 16 mg/100g) did not affect blood clotting time (see Figure 1 A). The lack of anticoagulant activity of the androstane derivative **3**, indicates that aromaticity of ring A is important for anticoagulant activity of 17 β -aminosteroids.

The rate of decrease of the anticoagulant effect of compound **2**, following a single s.c. injection of 8 mg/100g is shown in Fig. 1B. Blood clotting times were measured at daily intervals for four days both in the aminoestrogen-treated and solvent-treated groups. One day after the administration, of compound **2**, mean blood clotting time was 103 % larger than that of the control group ($P<0.01$). The effect diminished over the following three days and 72 hours after the injection, the blood clotting time was still increased by 32 %, ($P<0.05$). On the fourth day the effect was no longer significant.

Estrogenic effects of compound **2** were evaluated by the Allen and Doisy test,¹⁷ based on the production of vaginal cornification in ovariectomized mice and by increase in uterine weight as described by Evans.¹⁸ Table 1 shows the proportions of mice exhibiting vaginal cornification after receiving for three days equimolar doses of estradiol and compound **2**.

Table 1: Duration of vaginal cornification in mice treated with either estradiol or compound **2**.

Treatment	Dose/mouse /day/3 days	N	Body weight (g \pm sem)	Vaginal cornification* on day				
				0	4	7	9	11
Corn oil	0.1 ml	14	32 \pm 0.9	0/14	0/14	0/14	0/14	0/14
Estradiol	1.0 μ g	14	32 \pm 1.2	0/14	14/14	12/14	6/14	0/14
Compound 2	1.3 μ g	7	32 \pm 1.1	0/7	7/7	4/7	1/7	0/7

* Number of mice having vaginal cornification/number of treated mice.

All animals treated with compound **2** or estradiol exhibited vaginal cornification on the fourth day. The response subsided more rapidly in mice treated with compound **2**.

The uterotrophic effect of compound **2** is shown in table 2. Compound **2** increased linearly uterine weight with respect to log doses ($b= 40.8$ $P=0.02$).

Table 2: Effect of compound **2** and estradiol on uterine weight of immature mice.

Treatment	Dose/mouse/ day for 3 days	n	Body weight in g \pm sem	Uterine weight in mg/100 g \pm sem	% difference
Corn oil	0.1 ml	5	10.5 \pm 0.4	301 \pm 53	--
Estradiol	0.03 μ g	5	10.5 \pm 0.4	834 \pm 110	177*
Compound 2	0.04 μ g	5	10.5 \pm 0.4	352 \pm 119	16
	0.16 μ g	5	10.3 \pm 0.4	379 \pm 150	25
	0.64 μ g	5	10.4 \pm 0.4	495 \pm 159	64*

* P < 0.01 compared with the control group by Dunnett's test.

The uterotrophic effect of compound **2** treated mice was smaller than that produced with estradiol; even the largest dose of **2** (0.64 μ g/day/mouse) increased uterine weight by only 64% (P<0.01) whereas estradiol at the dose of 0.03 μ g /day/mouse produced a 177% increase (P<0.01).

The smaller estrogenic activity of compound **2** than that of estradiol may be attributed to the presence of the amino side-chain in C17. These results agree with those obtained with other 17 β -amino-estrogens evaluated earlier by us⁴⁻⁸ and by others groups.^{15, 16}

Our results show the importance of ring A aromaticity for the anticoagulant effect in 17 β -aminosteroids. The androstane **3** does not affect in blood coagulation, in contrast to the anticoagulant effect of the estrogen derivative **2**. Further work is in progress to assess whether aromaticity is required for anticoagulant effects of other 17 β -aminosteroids.

EXPERIMENTAL

All solvents and reagents were analytical reagent grade, and were used without further purification. Estrone (3-hydroxyestra-1,3,5(10)-trien-17-one) estradiol (estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol) and isoandrosterone (3 β -hydroxy-5 α -androstane-17-one) were obtained from Syntex (Mexico City, Mexico). N,N'-diethylethylenediamine and sodium borohydride were purchased from Aldrich (Milwaukee, WI, USA). Proof of chemical purity was established by spectroscopy (IR, NMR, MS), analytical techniques (TLC and chemical analysis). Melting points were assessed on an Electrothermal capillary melting point

apparatus, and are uncorrected. IR spectra were obtained using a Nicolet FT-55X spectrophotometer. $^1\text{H-NMR}$ spectra were recorded on a Varian-Gemini spectrometer 200 MHz, and are reported in ppm downfield from the internal standard tetramethylsilane. MS were obtained on a Hewlett Packard 5985B quadrupole mass spectrometer at 70 eV.

17N-(N,N'-diethylaminoethyl)imino-1,3,5(10)-estratrien-3-ol (1a)

A mixture of 2 g (7.4 mmol) of estrone and 2 ml (14.2 mmol) of N,N'-diethylethylenediamine was heated for 24 hours at 80-85°C. The reaction mixture, a brown oil, was cooled to room temperature, and was treated with isopropyl ether (10 ml x 2). The white solid obtained was crystallized from methanol-isopropyl ether, filtered, and vacuum dried to give 2.45 g (6.6 mmol, 89 % yield) of product **1a**, mp 158-160°C. IR (KBr): 3320 (OH), 1675 (C=N), 1610 (aromatic ring), cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 - DMSO-d_6): δ 0.85 (s, 3H, 18- CH_3), 1.04 (t, 6H, $J = 7$ Hz, CH_3CH_2), 1.22-2.53 (m), 2.56 (q, 4H, $J = 7$ Hz CH_2CH_3), 2.68 (t, 2H, $J = 8$ Hz, $\text{CH}_2\text{-N}$), 2.80 (m, 2H, 16- CH_2), 3.34 (m, 2H, $\text{CH}_2\text{-N=}$), 6.56 (d, $J = 2.4$ Hz, 1H, H-4), 6.61 (dd, $J = 8.4$ Hz and 2.4 Hz, 1H, H-2), 7.09 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-1).

17 β -(N,N-diethylaminoethyl)-amino-1,3,5,(10)-estratrien-3-ol (2)

To a solution of **1a**, (1.2g, 3.3 mmol) in ethanol (20 ml), sodium borohydride (1.0 g, 26.4 mmol) was added portionwise over 30 min. The reaction mixture was heated at reflux for 30 min and stirred at room temperature overnight. Water was added (100 ml) to the reaction mixture, and was cooled on an ice bath. The precipitate was filtered, washed thoroughly with water, and dried. The product was recrystallized from methanol-isopropyl ether to afford **2** as a white solid (0.98 g, 82%) with mp 162-164°C. IR (KBr): 3400 (OH), 3220 (NH), 1605 (aromatic ring) cm^{-1} . $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3 - DMSO-d_6): δ 0.74 (s, 3H, 18 CH_3), 1.01 (t, 6H, $J = 7$ Hz CH_3CH_2), 1.18-2.32 (m), 2.52 (q, 4H, $J = 7$ Hz CH_2CH_3), 2.57-2.86 (m, 4H, -NH- CH_2 and $\text{CH}_2\text{-N}$), 6.54 (d, $J = 2.7$ Hz, 1H, H-4), 6.61 (dd, $J = 8.4$ Hz and 2.7 Hz, 1H, H-2), 7.09 (d, $J = 8.4$ Hz, 1H, H-1). MS: m/z 370 (M^+ , 0.1%), 284 (M^+-86 , 3%), 86 (100%). Anal. ($\text{C}_{24}\text{H}_{38}\text{N}_2\text{O}$), C, H, N. The corresponding dihydrochloride was obtained by dissolving **2** (0.74 g, 2 mmol) in 10 ml of ethyl acetate, and adding 0.5 ml of concentrated HCl. The solid formed was filtered and recrystallized from methanol-ethyl acetate, to afford the hydrochloride in almost quantitative yield, with the following characteristics: mp 268-270°C. IR (KBr): 3580-3120 (OH and NH), 2650, 2460 (NH^+), 1615 (aromatic ring) cm^{-1} . MS: m/z 154, 136, 137 (100 %), 289 (41%), 307 (89%), 371 (29%), 391 (6%), M^+ 443 (2%).

17 β -(N,N-diethylaminoethyl)-amino-5 α -androstan-3 β -ol (3)

This product was obtained in 57% overall yield from 3 β -hydroxy-5 α -androstan-17-one (isoandrosterone) following the same procedure described above. Recrystallization from methanol-isopropyl ether produced a white solid with mp 84-85°C. IR (KBr): 3520-3110 (OH and NH), cm⁻¹. ¹H-NMR (CDCl₃-DMSO-d₆). δ 0.61 (s, 3H, 18 CH₃), 0.75 (s, 3H, 10 CH₃), 0.93 (t, 6H, J = 7.5 Hz CH₃CH₂), 1.06-1.98 (m), 2.43 (q, 4H, J = 7.5 Hz CH₂CH₃), 3.35 (m, 4H, -NH-CH₂ and CH₂-N), 4.42 (bs, 1H, 3 OH exchangeable with D₂O). MS: m/z 304 (M⁺-86, 1.4 %), 86 (100%). Anal. (C₂₅H₄₆N₂O), C, H, N. Dihydrochloride mp 300-302°C. IR (KBr): 3580-3330 (OH and NH), 2495 (NH⁺) cm⁻¹. MS: m/z 136, 154, 391 (100 %), 307 (58%), 100 (50%), 86 (40%), 289 (30%), 460 (7%).

Pharmacological methods.

Mice of CD1 origin, were used and kept at constant temperature (20-22°C) with a 12h-12h light-dark cycle, with food and water *ad libitum*. The animals were distributed according to a balanced design with 5-8 animals per group. The steroids, dissolved in corn oil, were administered subcutaneously (s.c.); control animals received the solvent only. Effects on blood coagulability were studied in blind experiments as described earlier.³⁻⁸

Estrogenic effects were assessed by the vaginal cornification test^{3-8,17} and the increase in uterine weight.¹⁸ For the vaginal cornification test, adult female mice were ovariectomized three weeks before each test. Four groups of seven ovariectomized mice received daily for three days, compound 2 (1.3 μ g/mouse/day, s.c.), 17 β estradiol at an equivalent dose (1 μ g/mouse/day, s.c.), or the solvent (corn oil, 0.1 ml/mouse/day). Vaginal smears obtained on days 4, 7, 9, and 11 were stained with Giemsa. The presence of cornified cells in the absence of leukocytes, was considered a positive response.

The uterotrophic effect of 2 was evaluated in immature CD1 21 days old female mice (10-14 g weight). The mice were injected (s.c.) for three days, with doses of 0.04, 0.16 and 0.64 μ g/day of 2. Estradiol-treated controls received 0.03 μ g/day. The daily dose of estrogen was dissolved in 0.1 ml of corn oil. On the fourth day, the animals were sacrificed by cervical dislocation. The uteri were carefully dissected out, blotted and weighed and expressed in mg/100 g body weight.

Statistical significance of the difference between means of control and treated groups was estimated either by Dunnett's test or by Student's t test. Least square linear regressions of blood clotting times on log

dose, and their 95 % confidence limits were obtained. Significance and linearity were estimated by analysis of variance.¹⁹

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by grant 2400P-M from CONACYT, México. We are indebted to R. Patiño, L. Velasco, J. Pérez-Flores and R. Gaviño from the Instituto de Química UNAM, for obtaining the IR, NMR and MS spectra.

REFERENCES

1. Samsioe, G. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **1994**, 170, 1523-1527.
2. Stamler, J.; Pick, R.; Katz, L.N.; Pick, A.; Kaplan, B.M.; Berkson, D.M.; Century, D.; **1963**, J. Am. Med. Assoc. 183, 632-637.
3. Mandoki, J.J.; Zavala, E.; Silva, G.; Mendoza-Patiño, N.; Rubio-Póo, C.; Medina-Martínez, S., Domínguez-Escoto, P. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **1983**, 26, 45-48.
4. Rubio-Póo, C.; Mandoki, J.J.; Jayme, V.; Mendoza-Patiño, N.; Alvarado, C.; Silva, G.; Zavala, E.; Fernández-González, J.M.; Rubio-Arroyo, M. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **1983**, 26, 111-113.
5. Rubio-Póo, C.; Mandoki, J.J.; Mendoza-Patiño, N.; Lemini, C.; de la Peña, A.; Cruz, F.; Zavala, E.; Silva, G.; García-Mondragón, J.; Fernández-G, J.M.; Soriano-García, M.; Toscano, A.R. *Steroids* **1985**, 45, 159-170.
6. 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. *Steroids* **1990**, 55, 83-86.
7. Mandoki, J.J.; Rubio-Póo, C.; Lemini, C.; De la Peña, A.; Fernández-G, J.M.; García-Mondragón, J.; Zavala, E.; Silva, G.; Mendoza-Patiño, N. *Proc West Pharmacol Soc* **1991**, 34, 99-106.
8. Lemini, C.; Rubio-Poó, C.; Silva, G.; García-Mondragón, J.; Zavala, E.; Mendoza-Patiño, N.; Castro, D.; Cruz-Almanza, R.; Mandoki, J.J. *Steroids* **1993**, 58:457-461.
9. De la Peña, A.; Baños, G.; Izaguirre, R.; Mandoki, J.J.; Fernández-G, J.M. *Steroids* **1993**, 407-409.
10. Rubio-Póo, C.; Lemini, C.; Silva, G.; García-Mondragón, J.; Zavala, E.; Castro D.; Mendoza-Patiño, N.; Mandoki, J.J. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* **1993**, 3, 143-147
11. Brown-Grant, K.; Munck, A.; Naftolin, F.; and Sherwood, M.R. *Horm. Behav.* **1971**, 2:173-182.
12. McDonald, P.G.; and Doughty, C. **1972** *J. Reprod. Fertil.* **1972**, 30, 55-62.
13. Luttge, W. G.; and Whalen, R. E. *Horm. Behav.* **1970**; 1, 265-281.

- 14 Fernandez-G, J.M., Rubio-Arroyo, M.F., Soriano-García, M.; Toscano, R.A.; Pérez-César, C. Rubio-Póo, C.; Mandoki, J.J.; De la Peña, A.; Lemini, C.; Mendoza-Patiño, N.; Cruz, F. *Steroids* **1985**, 45, 151-170.
15. Blickenstaff, R.T.; Foster, E.; Gerzon, K.; Young, P. *Steroids* **1985**, 46, 889-902.
16. Qian, X; Abul-Hajj, Y.J. *J. Steroid Biochem.* **1988**, 29, 657-664.
- 17 Allen, E.; Doisy, E.A. *J. Am. Med. Assoc.* **1923**, 81, 819-821.
- 18 Evans, J.S.; Varney, R.F.; Koch, F.C. *Endocrinology*, **1941**, 28, 747-752.
- 19 Zar, J.H. *Biostatistical analysis*, 2nd Ed., Prentice Hall International, Englewood Cliffs, New Jersey. **1984**.

Keywords: steroids, 17 β -diamino-estrogens, 17 β -amino-estrogens, 17 β -diamino-androgens, estrogenic effects, vaginal cornification, uterotrophic effect, anticoagulant effects.

Running title: Anticoagulant effects of a 17 β -amino-estrogens

American Journal of Obstetrics and Gynecology

EDITOR IN CHIEF Edward J. Quilligan, M.D.

ASSOCIATE EDITORS Thomas J. Garite, M.D. and Alberto Manetta, M.D.

University of California, Irvine
Room 160, Irvine Hall
Irvine, California 92697-3215

March 26, 1997

Q 8311

Consuelo Rubio-Poo, Ph.D.
Dept de Farmacologia
Ciudad Universitaria
Facultad de Medicina
C.P. 04510
Mexico, 70-297 MEXICO

Re: Effect of estrogens on blood coagulation:
A review

Dear Dr. Rubio-Poo:

Receipt of your manuscript is acknowledged. It has been submitted to our consultant(s) for peer review. We will report to you as promptly as possible.

All authors, when initially submitting a manuscript, must comply with our requirements of previous publication which is published in the Information for Authors. If you should have done this but did not do so, please send the necessary information and material to me promptly.

Thank you for your submission to the AMERICAN JOURNAL OF OBSTETRICS AND GYNECOLOGY. Please refer to the manuscript identification number above in any communication regarding this manuscript.

Sincerely,


Edward J. Quilligan, M.D.
Editor-in-Chief

EJQ:scp

714-824-1696 • FAX 714-824-1697

PUBLISHED BY MOSBY-YEAR BOOK, INC.

**EFFECT OF ESTROGENS ON BLOOD COAGULATION:
A REVIEW**

Consuelo Rubio-Póo. ^a
David Skromne K. ^b
Cristina Lemini ^a
Gricelda Silva. ^a
Beatriz Chávez-Lara. ^a
Rocío Ortiz. ^c
Rubén Román R. ^c
Manuel Salmón. ^a

^aDepartment of Pharmacology, School of Medicine, School of Graduate Studies, Institute of Chemistry, Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), C.P. 04510

^bCardiology Hospital, Centro Médico Siglo XXI, Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS)

^cUniversidad Autónoma Metropolitana Iztapalapa (UAM), Mexico City.

Correspondence: Dra. Consuelo Rubio-Poo. Departamento de Farmacología, Facultad de Medicina, Ciudad Universitaria, C.P. 04510 Apdo Postal 70-297
Phon: (011525) 623-2369 / Fax: (011525) 616-1489.

CONDENSATION

This review was undertaken because of our interest in the mechanisms through which estrogens participate in cardiovascular disturbances, particularly thrombogenesis.

Rubio-Póo et al. Effect of Estrogens on blood coagulation

ABSTRACT

This review was undertaken because of our interest in the mechanisms through which estrogens participate in cardiovascular disturbances, particularly thrombogenesis. These have been described in women during ovulation, pregnancy and contraceptive use, and in men in treatment for prostatic cancer. Information existing about the topic from books⁽¹⁻³⁾ and articles published in scientific journals⁽⁴⁻¹⁰⁰⁾ is analyzed.

Key words: *Coagulation, estrogens, hipercoagulability, menopause, aminoestrogens.*

Estrogens are known to have an effect on cardiovascular hemodynamics as well as on the composition of blood. Most specialists agree that a woman during reproductive years has a lower probability of presenting coronary thrombosis, and that this advantage is lost with menopause. The apparent protective activity provided by estrogens motivated this review.

The evidence cited in the literature provides arguments for two contrasting schools of thought. The first is related to the observation that administration of estrogens increases blood coagulability and risk of thrombosis. This concept has been recognized since the third decade of the century but was reaffirmed with large scale use of contraceptives in sixties and publications that described thromboembolic complications related to their use⁽⁴⁻¹⁶⁾. This finding greatly increased the number of researchers pursuing this line of investigation. The majority of studies indicate an association between estrogens and a state of hypercoagulability. However, a second series of observations show that these hormones provide a preventive effect against cardiovascular disease, particularly when they are administered as substitutes after menopause⁽¹⁷⁾. A large number of published series demonstrate increases in cardiovascular diseases when high doses of these substances are used in the preparation of contraceptives. Epidemiological studies suggest that the risk of thromboembolic events is small and does not increase in nonsmokers⁽¹⁸⁾, that half of the myocardial infarctions in young or middle-aged women can be attributed to smoking ⁽¹⁹⁾ and theoretically could be avoided if the aggravating factors are eliminated. Other factors like age, systemic hypertension, diabetes mellitus, alcohol consumption, obesity and hyperlipidemia exert less of an influence on thrombosis than the association of contraceptives and cigarettes. The relative risk of fatal events is usually the result of vascular obstruction⁽⁴⁾ but to a lesser degree can also be explained by subarachnoid hemorrhages⁽¹⁹⁻²¹⁾.

For some authors, the administration of natural or synthetic estrogens could diminish risk.

In the seventies Estamler⁽²²⁾ observed that high doses of conjugated equine estrogens administered for treatment of prostate cancer diminished the incidence of thrombosis in 50% of cases. In 1966, Mandoki and Rubio⁽²³⁾ described the anticoagulant effect achieved by administering high doses of conjugated equine estrogens to male Wistar rats. In a later study in humans, Marmorston⁽²⁴⁾ observed that small quantities of these products shortened coagulation time. In fact, low doses have a clinically proven hemostatic effect and have been used to detain small hemorrhages in obstetrics and dentistry. A number of studies have demonstrated the protective effect against cardiovascular diseases of postmenopausal estrogen replacement^(25,26) because these hormones increase the serum concentrations of high density lipoproteins (HDL), considered to be cardioprotectors. The administration of low concentrations of estradiol (E₂)⁽²⁷⁾ increases plasma levels of HDL by a selective effect and prevents its oxidation. In contrast, pharmacological doses inhibit the incorporation of oxygen into LDL cholesterol *in vitro*. No androgen or progestin has this action. As respects the specific interaction between E₂ and HDL, it is attributed to the antioxidant protection that preserves HDL function and increases its levels. In recent studies Kevin⁽²⁸⁾ demonstrated that postmenopausal replacement of estrogens diminished the incidence of atherosclerosis by inhibiting damage to the carotid intima in rat and mouse models treated with E₂ and posited that estrogens accelerate endothelial repair *in vivo* in experimental animals and probably also have this beneficial function in humans. Other desirable effects of estrogen therapy involve its vasodilator effect and inhibition of platelet aggregation. It appears to act directly on vessel walls and indirectly through chemical mediators, increasing the production of prostacycline, a substance with vasodilating

action that inhibits platelet aggregation. It decreases the formation of thromboxane A₂, a substance with opposite effects that causes vasoconstriction and platelet aggregation⁽²⁹⁻³¹⁾. The administration of 17-beta-estradiol has also been reported to increase peripheral blood flow in postmenopausal women. Although the mechanism has not been clearly defined, these variations could explain some its desirable effects on the vascular system. Volterrani and Werner examined the effects of high or low dose estrogens in oral contraceptives (20 µg ethinyl estradiol and 150 µg desogesterel a day or 50 µg ethinyl estradiol and 125 µg desogestrel a day respectively) on coagulation evaluated on the 17th and 21st day of the menstrual cycle⁽³²⁻³³⁾. They found increases in the fibrin deposits in the vascular endothelium when high doses were used and no significant changes with low doses. This is consistent with the fact that high doses of ethinyl estradiol in contraceptives causes increases in the interactions between fibrin and subendothelium with greater risk of thromboembolism. In 1983 Mandoki and Rubio⁽³⁴⁾ reported that intraperitoneal administration of 17-beta-estradiol, estrone or equine estrogens conjugated to male CD₁ strain mice produced a biphasic result after a variable period of latency. First, for a period of hours, coagulation time was prolonged, after which a procoagulation effect occurred and persisted for days. The magnitude of the action depended on each particular hormone as well as its concentration. For example, the conjugated equine estrogens used daily for three days at low doses of 2 mg/kg, produced shortened coagulation time. On the other hand, its effects in concentrations of 100 mg/kg were the opposite. In both cases the findings were statistically significant. That is, the magnitude of the dose could be a determining factor in the risk-benefit balance.

Blood is in constant equilibrium with procoagulant factors, anticoagulants and fibrinolytic activity. Whether blood coagulates or not depends on how this equilibrium is maintained. Table I shows the thrombogenic factors and protective mechanisms.

To facilitate this review we will divide the analysis of the relationship between estrogens and coagulation into damage to vessel walls, platelet aggregation, blood coagulation, protective mechanisms and the fibrinolytic system.

DAMAGE TO VESSEL WALLS

This can occur through physical, enzymatic, infectious and immunological mechanisms or by inorganic or organic substances (epinephrine, vitamin D, cholesterol, other lipids, estrogens, etc.).

Wessler ⁽³⁶⁾ , Ashford and Frieman ⁽³⁷⁾ and others argue that the estrogenic component is the most important factor affecting blood vessel walls, producing vasodilatation, reduction of flow and stasis as well as loss of smooth muscle tone in the media, diminished elasticity and hyperplasia of the intima. Stasis is potentially thrombogenic because it impedes the dilution of coagulation factors that when mixed with inhibitors favor local acidosis. Wessler ⁽³⁶⁾ showed that coagulation cannot occur when the endothelium is intact. Ashford and Freiman ⁽³⁷⁾ produced damage without detachment of the basement membrane in endothelial cells of rat femoral vein and observed the deposit of thrombin ⁽³⁸⁻⁴⁴⁾. Other authors ⁽⁴⁵⁻⁴⁶⁾ agree that the use of contraceptives produces venous dilatation. Maclachin ⁽⁴⁵⁾ demonstrated that the tendency of blood to coagulate was increased if it was associated with local acidosis. The integrity of the endothelium can be modified by estrogens that directly or indirectly exert effects on prostaglandins, tone and the vessel wall ⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾.

Receptors for estrogens and progestins with capacity to interact have been described both in myocardium and coronary arteries ⁽⁴⁹⁾. For example, estrogen deficiency in menopause plays an important role in formation of aneurysms and the risk of subarachnoid hemorrhage. The antioxidant properties of estrogens may aid in the prevention of vascular diseases ⁽⁵⁰⁻⁵¹⁾.

PLATELET AGGREGATION

This can be precipitated by various stimuli, including ADP, collagen, thrombin, thromboxane A₂ and epinephrine. Platelet activating factor (PAF) liberated by leukocytes and macrophages can also induce aggregation, although its relationship in the formation of a clot is not well understood. Practically all the agonists mentioned participate in platelet aggregation by common mechanisms that involve elevations in the concentration of ionized calcium. When the platelets are exposed to one of these stimuli, they participate in interactions that are fundamental for thrombogenesis.

In the balance of these elements (Table II) the outcomes of increases (thrombocytosis, thrombocytomia) or decreases (thrombocytopenia) can be observed.

Hampton found that patients who were taking only progesterones like clomadinone acetate presented no platelet abnormalities, while with synthetic estrogens there was an increase in their mobility, and the low density proteins were detected in the plasma lecithin fraction. All of this was probably the cause of abnormal electrophoretic platelet conduction ⁽⁵²⁾. In independent but similar studies Poller ⁽⁵³⁾, Bevers, Baungartner and Huch ⁽⁵⁴⁻⁵⁶⁾ published the same results: increase in adhesion after surgery, trauma and in women in estrogen therapy. The administration of estrogens to postmenopausal women diminished the formation of platelet thrombi or damage to arterial walls. The progestins with which they are frequently associated counteract

this antithrombotic effect. Consequently the use of estrogens without the addition of other hormones would seem to be more advantageous ⁽⁶⁷⁾.

BLOOD COAGULATION

After a series of enzymatic reactions of coagulation factors beginning with the activation of Factor XII through the intrinsic system and of tissular/VII from the extrinsic system, thrombin is formed (Figure 1).

Most of the investigators in this field agree that the estrogenic component in contraceptives is the causal factor that increases the concentration of various components of both intrinsic and extrinsic systems ⁽⁶⁸⁻⁶¹⁾. The hematocrit and fibrinogen levels increase with a consequent elevation of blood viscosity ⁽⁶²⁾. Damage to vessel walls favors platelet aggregation and coagulation from interaction with the endothelium.

Increases in factors VII (proconvertin) and X (Stuart or Power) have likewise been detected in women in hormone treatment for more than six months. The time factor seems to be important, since if hormones are not administered chronically, these elevations, which are also observed in pregnant women, cannot be demonstrated. Poller and Thomson ⁽⁶³⁾ reported that factor levels returned to normal when therapeutic doses were diminished or contraceptive management was continued with compounds that only contained progestins. In studies by Daniel and Elder ⁽⁶⁴⁻⁶⁵⁾ increases in the plasma levels of Factor IX (Christmas) were found during pregnancy and when high doses of diethylstilbestrol (DEB) or hexastrol were administered to suppress lactation. In 1991 Werner ⁽⁶⁶⁾ reported an increase in the concentrations of fibrinogen and fibrin as well as a decrease in the levels of antithrombin III during treatment with oral contraceptives. Normally there is an increase in fibrinogen levels during pregnancy; the plasma concentration gradually increases from the third month from 350 to

650 mg/dl. A similar increase occurs with the administration of contraceptive treatment. Hyperfibrinogenemia is a risk factor in obstructive events. The Hageman factor (XII), antihemophilic factor (VIII) and others dependent on vitamin K also increase ⁽⁶⁶⁾. Similar changes have been described with the use of estrogens not in combination or included in contraceptives. Because of these effects, their administration has been suggested for Von Willebrand's disease (type I). Alperin ⁽⁶⁷⁾ treated women with this disease using conjugated estrogens (1.25 mg/day) or with oral contraceptives, and noted that the levels of factors VIII and Von Willebrand's reached normal levels, and if the dose was increased to 5 mg/day during 10 to 14 days bleeding was prevented without need for transfusion of plasma or cryoprecipitates.

The effect of oral contraceptives on hemostasis is related to the concentration of the estrogenic component (ethinyl estradiol) in oral contraceptives. The increase in coagulation factors XII (Hageman), II (prothrombin), VII (proconvertin), VIII (antihemophilic), X (Prower, Stuart) and I (fibrinogen) responds to a dose-dependent effect ⁽⁶⁸⁾.

PROTECTIVE MECHANISMS

Greig and Notelowitz ⁽⁶⁹⁾ demonstrated that contraceptives containing ethinyl estradiol or mestranol at a concentration of 50 µg reduced concentrations of antithrombin III, which was not modified by conjugated equine preparations. Antithrombin III is without a doubt the most important anticoagulation factor. It protects against thrombosis ⁽⁷⁰⁻⁷²⁾, and its reduction may be one of the precipitating factors of hypercoagulability. Women from families with histories of low levels of antithrombin III and proteins C and S are known to have a high frequency of obstructive thromboembolic events during pregnancy, postpartum and after abortion and to require strict control these components ⁽⁷³⁻⁷⁶⁾.

Protein C is a serine protease dependent on vitamin K that is synthesized in the liver. The plasma concentration is 4 μ g/ml in both sexes and increases slightly with age (4% per decade). It circulates in an inactive state and is activated in endothelial cells by thrombin-thrombomodulin. Without this final activation the effects of protein C are very slow ⁽⁷⁶⁻⁷⁸⁾. It is an anticoagulant that together with its cofactor protein S actively breaks down coagulation factors V and VIII. The half life of activated protein C in plasma is 20-30 minutes ⁽⁷⁹⁾. A deficiency of protein C can lead to cerebral or mesenteric thrombosis. It occurs in patients with disseminated intravascular coagulation (DIC), adult respiratory distress syndrome, liver disease, vitamin K deficiency, during pregnancy and neonatal periods, coumarin administration, estrogen therapy, in blood donors and in fulminating neonatal purpura ^(79,80). Various clinical conditions affect free protein S levels: systemic lupus erythematosus (SLE), nephrotic syndrome, bacterial disease associated with fulminating purpura, pregnancy, oral contraceptive treatment, liver disease, vitamin K deficiency, coumarin administration and extensive thrombosis. Protein S is a glycoprotein chain that circulates in plasma at a concentration of 320 nM (22 mg/l). It is only found in endothelial cells, platelets and probably alpha granules. It is synthesized in the liver, in the endothelium and possibly in megakaryocytes ^(81,82). The incidence of venous thrombosis is higher in patients with antithrombin III deficiency (At-III) than with protein C or S deficiency. Alterations of the three seem to be equally represented in postpartum thrombosis ⁽⁸⁰⁾.

FIBRINOLYTIC SYSTEM

Plasminogen is stimulated by its activator (t-PA) and urokinase (u-PA), both of which are strictly regulated by their inhibitors (PAI) and that of plasmin, α_2 -antiplasmin. The stimulation occurs at the receptors for plasminogen in the endothe-

lial cells and possibly in monocytes and other cellular elements of the blood that make major contributions to the regulation of thrombosis.

The activation of coagulation systems depends on the balance between these and normal fibrinolytic function with protective capacity for prevention of thrombosis. There is ample clinical evidence supporting the concept that the defects in fibrinolysis are definitive for the formation of clots. For example, the fact that the lytic activity of fibrin in the veins of the lower extremities is less than in the arms increases the incidence of thrombosis in the lower extremities. The decrease of this function may be related to a reduction in the levels of plasminogen activator (t-PA), but also to an increase in antiplasmin concentration, which has been detected in a variety of circumstances. Astedt ^(82,83) studied the coagulation factors and fibrinolytic activity in biopsies of the veins of women who had presented venous thrombosis while in contraceptive therapy for a period of six months. Although he found no abnormalities in the coagulation components, there was a reduction in fibrinolytic activity related to the ethinyl estradiol administered. Evidence exists ⁽⁸⁴⁻⁸⁶⁾ that increases in antiplasmin concentration occur under circumstances which increase risk, such as contraceptive treatment, pregnancy, postoperative period and obesity. These entities were commented on by Isaacson ⁽⁸⁶⁾, who was also able to demonstrate deficiencies in the fibrinolytic activity of patients receiving estrogenic medications by using very accurate histochemical techniques. The inhibition of this is related to diminished t-PA, a finding observed in women from 35 to 50 years of age who were smokers in contraceptive treatment for five or more years when they were compared to a control group ⁽⁸⁷⁾.

Rubio, Mandoki and Lemini ⁽⁸⁸⁻⁹⁴⁾ have observed that structural changes in the 17 carbon of estradiol by amino groups produce a prolonged anticoagulant effect of great magnitude when these are administered to rodents by subcutaneous route. On

the other hand as respects the chemical structure and biological activity of these new compounds, we have found that when the lateral chain of products with three methylenes, for example N-(3-hydroxy-1,3,5(10)estratriene-17- β 1)-3-hydroxypropylamine, is increased to four (17 β -(4-hydroxy-1-butylamino)-1-3-5(10)-estratriene-3-ol), five (17 β -(5-hydroxy-1-pentylamino)-1,3,5(10)-estratriene-3-ol) or six (17 β (6-hydroxy-1-hexylamino)-1-3-5(10)-estratriene-3-ol), a single dose produces a very similar anticoagulant effect but of much greater magnitude (>60%) with a duration that varies between 72 and 96 hours. As far as we know, these substances are the only ones that consistently demonstrate this anticoagulant modification without procoagulant activity irrespective of the dose. The estrogenic action of these compounds is less than that of estradiol when equimolar concentrations are compared and evaluated by the classical techniques of vaginal cornification and uterine weight ^(95,96).

CONCLUSIONS

The discrepancies in effects of estrogens on circulation and blood coagulation reported in the literature in terms of magnitude of changes and whether they really occur, can probably be explained by the methods used to estimate plasmatic activity of factors, experience and hability to perform adequate evaluations, the extraordinary variations in means of obtaining results and the differences among laboratories. Undoubtedly it is easier to demonstrate changes when large quantities of a hormone are administered instead of low doses.

On the basis of reports from the literature we can conclude that estrogens associated with other compounds and administered as contraceptives or alone for treatment of prostatic cancer produce alterations in blood flow. These changes include stasis and local acidity, pooling and decrease in adequate circulation of coagulation fac-

tors as well as anticoagulants, damage to vessel walls and interactions with vascular endothelium. There is an increase in the number and sensitivity of platelets and in the concentration of various integrants (I, II, VII, VIII, IX, X and XII) as well as a decrease in anticoagulants, antithrombin III (At-III), protein C and its cofactor protein S. In addition alterations occur in the activity of the fibrinolytic system, diminishing its action. This collection of changes creates an imbalance in the blood with a state of hypercoagulability and thrombogenesis.

Most investigators agree that cardiovascular morbidity and mortality increase in women who receive contraceptive therapy. Their risk of myocardial infarction augments 2 to 5 times and of obstructive cerebrovascular events between 2 and 10 times ^(26,97,98). The mortality is more apparent in women more than 35 years old and particularly in those who smoke or have other risk factors. Mortality can increase 15 to 18 times in female smokers over 45 years old ^(66,97). Other cardiovascular complications like thrombophlebitis are higher during pregnancy and postpartum, periods in which there is an increase in the concentration of circulating estrogens. An analogous situation exists with men with prostate cancer who receive daily treatment with diethylstilbestrol or other estrogens: these treatments are associated with a higher incidence of myocardial infarction and cerebrovascular obstructive events ⁽⁹⁹⁾.

Another aspect of great importance in the genesis of thrombosis may be related to dosage, inasmuch as risk increases when greater quantities of hormone are administered; that is, it is a dose-dependent effect ⁽²³⁾. Other studies have shown that small quantities of hormones, considered physiological, exerted a cardioprotective effect when administered during menopause. For example, there is a clear indication for the use of low dose estrogens in thrombophilia, an entity in which a deficiency of antithrombin III causes a tendency to thrombosis ⁽¹⁰⁰⁾. However, the mechanism or me-

chanisms that confer this protection against some cardiovascular diseases are not completely understood. They include metabolic effects with variations in HDL-cholesterol, that contribute in the formation of atheromas and direct endothelium and calcium-dependent effects on blood vessels, all of which improve arterial function.

Recently the administration of these substances by percutaneous or transdermal implants have demonstrated the same effect on blood lipids as oral contraceptives taken for more than 6 months. However, more studies are necessary to clarify the precise mechanism by which these hormones used as therapy in menopause reduce the risk of cardiovascular diseases. The optimal dose that will minimize adverse effects while permitting a beneficial influence has also not been determined. Ideally, infarction would be avoided during the administration of these products, and their effects would disappear when they were discontinued. Alterations of lipids, carbohydrates and hemostatic variables are aspects of great importance. Their levels can be influenced by natural and synthetic sex hormones.

The pharmacological response depends not only on the hormone itself but also on the dose and individual pharmacokinetic variation. This has importance when discrepancies exist in the metabolic changes that have been observed in different studies, or when the effects of a given preparation are evaluated individually. The discovery of an important, prolonged anticoagulant effect in aminoestrogens makes them attractive for substitution therapy instead of natural or synthetic estrogens. We wish to emphasize that the effects of these aminoestrogens have not been reported with any other compound ^(88,94).

REFERENCES

- 1.- Robert W. Colman, Jack Hirsh., Victor J. Marder and Edwin W. Salzman. Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical Practice. Third Edition. J.B. Lippincott Company. U. S. A. 1994
- 2.- William E. Harthaway, Scott H. Goodnight, Jr., Disorders of Hemostasis and Thrombosis. A Clinical Guide. McGraw-Hill, Inc. 1993
- 3.- Drug Evaluation Annual 1993. American Medical Association. 1993
- 4.- The coronary Drug Project Research Group.: Findings leading to discontinuation of the 2.5/mg/day estrogen group. J.A.M.A. 1973;226:652-657
- 5.- Rosenberg, L., Palmer, J.R., Lesko, S.M., and Shapiro, S., Oral contraceptive use and risk of myocardial infarction. Am. J. Epidemiol. 1990;131:1009.
- 6.- Meade, T.W., Brozovic, M., and Chakrabarti, R., An epidemiological study of the haemostatic and other effect of oral contraceptives. Br. J. Haematol. 1976;34:353
- 7.- Kontturi, M., "Metabolic side-effects of estrogen therapy for prostatic cancer" Scan J Urol Nephrol Suppl. 1991;138:127-130.
- 8.- Aro, J. Haapiainen, R., Rasi, V., Rannokko, S., and Alfthan O., " The effect of parenteral-estrogen versus orchiectomy on blood coagulation and fibrinolysis in prostatic cancer patients" Eur Urol 1990;17(2):161-165.
- 9.- Stadel, B.V., Oral contraceptives and cardiovascular disease. First part. N. Engl. J. Med. 1981;305:672.
- 10.- Paddington, N.S.W., The effect of oestrogen on the female cardiovascular system. Med. J. Aust. (Australia), 1992;157:204-208.
- 11.- Mammen, E.F. Oral contraceptives and blood coagulation: A critical review. Am. J. Obstet. Gynecol. 1982;142:781-790.
- 12.- Barret-Connor, E., and Bush, T., Estrogen and coronary heart disease in women. J.A.M.A. 1991;265:1861.
- 13.- Kalin, M.F., and Zumoff, B. Sex hormones and coronary disease: a review of clinical studies. Steroids, 1990;55:330-352.
- 14.- Beller F K., and Ebert C. Effects of oral contraceptives in blood coagulation. A review. Obstet Gynecol Surv. 1985;40(7):425-436.
- 15.- Goodrich, E.M., and Wood., J.E., Periferical venous distensibility and velocity of venous blood flow during pregnancy or during oral contraceptive therapy. Am J. Obstet. Gynecol. 1964;90:740.
- 16.- Vessey M P., Doll R. Investigation of relation between use of oral contraceptives and thromboembolic disease. Br Med J 1968;2:199-205
- 17.- Fahraeus L., Effect of estradiol on blood lipids and lipoproteins in postmenopausal women Obst Gynecol. 1988;72(Suppl): 18S-22S..
- 18.- Willet W C. et al Relative and absolute excess risks of coronary heart disease among women who smoke cigarettes. N Engl J Med. 1987;317:1303-1309.
- 19.- Vessey M P., et al Oral contraceptives and stroke: Findings in large prospective study. Br Med J. 1984;289:530-531.
- 20.- Longstreth W T., and Swason P D. Oral contraceptive and stroke. Stroke. 1984;15: 747-750.

- 21.- Stampfer M J., et al. Prospective study of moderate alcohol consumption and the risk of coronary disease and stroke women. *N Engl Med.* 1988;319:267-273.
- 22.- Stamler J., Pick R., Katz L N., Pick A., Kaplan B M., Berkson D M., and Century J. Effectiveness of estrogen for therapy of myocardial infarction in middle-age men *J Am Med Assoc.* 1963;183:632-638.
- 23.- Mandoki J.J. and Rubio C., The effects of estrogen on the blood clotting time. *The Pharmacologist.* 1966;232.
- 24.- Marmorston J., Moore F J., Hopkins C E., Kuzma O T., and Worner J., *Proc Soc Exp Biol Med.* 1962;110:400.
- 25.- Bush T L., Barrett-Connor E., Cowan LD. et al Cardiovascular mortality and non contraceptive use of estrogen in women: Results from lipid research Clinics Program Follow-up Study. *Circulation* 1987;75:1102-1109.
- 26.- Lobo RA. Effects of hormonal replacement on lipids and lipoproteins in post menopausal women. *J Clin Endocrinol metab* 1991;73:925-930.
- 27.- Carole L. Banka, Linda K. Curtis, Estrogens as antioxidants: Specific Protection of high density lipoprotein. *Suppl 1. Circulation.* 1996;94(8):152.
- 28.- Kevin L. Krasinski, Marcy Silver, Takayuki Asahara, and Douglas W. Losordo. Estrogen replacement therapy accelerates re-endothelialization of balloon injured arteries in ovariectomized rat model. *Suppl 1. Circulation.* 1996;94(8):1-5.
- 29.- Henderson B E., et al Decrease mortality in users of estrogens replacement therapy. *Arch Intern Med.* 1991;151:75-78.
- 30.- Henderson B E., et al Estrogen replacement therapy and protection from acute myocardial infarction . *Am J Obstet Gynecol.* 1988;159:312-317.
- 31.- Krauss R M., et al Effects of estrogens dose and smoking on lipid levels and lipoprotein levels in postmenopausal women. *Am J Obstet Gynecol.* 1988;158: 1606-1611.
- 32.- Voloterrani M., Rosano G., Coats A., Beale C., and Collin P. Estrogen acutely increases peripheral blood flow in postmenopausal women. *Am J Med.* 1995;99 (2):119-122.
- 33.- Werner I., Stocker G., Haeberli A., and Werner S. Effect of low and high dose oral contraceptives on blood coagulation and thrombogenesis induced by vascular subendothelium exposed to flowing human blood. *Contraception.* 1991;43(5): 435-446.
- 34.- Mandoki J J., et al The dual effect of estrogens on blood clotting time. *Proc West Pharmacol Soc.* 1983;26:45-48.
- 35.- Book: Jack Hirsh., Edwin W. Salzman., et al. Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical. 3rd ed. Section A. Pathogenesis of Thrombosis. 1994; Chapter 57:1152,
- 36.- Wessler S. Trombosis and sex hormones: A perplexing liaison . *J Lab Clin Med* 1980;86:757.
- 37.- Ashford T P., and Frieman D G., Platelet aggregation at sites of minimal endothelium injury. An electron microscopic study. *Amer J Pathol.* 1968;53: 599-607.
- 38.- Irey N S., Manion W C., and Taylor H B. Vascular lesions in women taking oral contraceptives *Arch Pathol.* 1970;89:1-8.

- 39.- Goodrich S M., and Wood J E., The effect of estradiol-17 β on peripheral venous distensibility and velocity of venous blood flow. *Am J Obstet Gynecol.* 1966;96:407-412.
- 40.- Gertman B B., Piper J M., Tomita D K., Ferguson W J., Stadel B V., and Lundin F Oral contraceptive estrogen dose and risk of deep venous thromboembolic disease *Am J Epidemiol.* 1991;133(1):32.
- 41.- De Ligniers B., Estrogen, progestins and vascular risk. *Rev. Prat (France).* 1993; 43 (20):2631-2637.
- 42.- Bayot D., and Vokaet R., Effect of the venous system and blood coagulation of oral combined estro-progesterone contraceptives an 3er generation contraceptives. *Phlebologie (France).* 1991;44(2):343-352.
- 43.- Vessey M P. Female hormones and vascular disease an epidemiologic overview. *B J Fam Plann.* 1980;6 Suppl:1-12.
- 44.- Irey N S., and Norris H J. Intimal vascular lesions associated with female reproductive steroids. *Arch Pathol.* 1978;96:227.
- 45.- Maclachin A D., Maclachin J A., Lory T., and Rowling E O., Venous stasis in the lower extremities. *Arch Surg.* 1960;152:678-685.
- 46.- Schorer A E., Gerrard J M., White J G., et al. Oral contraceptive use alters balance of platelet prostaglandin and thromboxane synthesis, *Prostaglandins. Med.* 1978;1:5.
- 47.- Nordoy A., Svensson B., Haycraest D., et al. The influence of age, sex, and the use of oral contraceptives on the inhibitory effects of endothelial cells and PGI₂ (prostacyclin) on platelet function. *Scand J Haematol.* 1978;21:177
- 48.- Makila U M., Walhberg L., Viinikka L., Yikorkala O. Regulation of prostacyclin and thromboxane production by human umbilical vassals: the effect of estradiol and progesterone in a superfusion model. *Prostaglandin Leukot Med.* 1993;8:115-124.
- 49.- McGill H C. Jr. Sex steroid hormone receptors in the cardiovascular system. *Posgrad Med.* 1989;64-68.
- 50.- Sugioka K., Shimosegawa Y., Nakano M. Estrogen as natural anti-oxidants of membrane phospholipid peroxidation *FEBS Lett.* 1987;210:210-237.
- 51.- Niki E., & Lakano M. Estrogen as antioxidants. *Methods Enzymol.* 1990; 186:330-333.
- 52.- Hampon J R., Platelet abnormalities induced by the administration of oestrogens *J Clin Path.* 1970;3:75-80.
- 53.- Poller L., Priest C M., and Thomson J M., Platelet aggregation during oral contraceptives *Br Med J.* 1969;iv:273-274.
- 54.- Bevers E M., Comfurius P., and Zwaal R F. Mechanisms involved in platelet response *Adv Exp Med Biol.* 1993;344:195-207.
- 55.- Baungartner H R., Turitto V T., Weiss HJ. Effect of shear rate on platelet interaction with subendothelium in citrated and native blood. II. Relationship among platelet adhesion, thrombus dimensions and fibrin deposition. *J Lab Clin Med.* 1980;95:203-221.
- 56.- 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.* 1987;1:41-50.

- 57.- Jainxin Xiang, Jules Y. T. Lam Proggestins reverse the platelet inhibitory effect of estrogens in postmenopausal women *Suppl 1, Circulation*, 1996;94(8):1-18.
- 58.- Meade T W. Risks and mechanisms of cardiovascular events in users oral contraceptives. *Am J Obstet Gynecol*. 1988;158: 1646-1652.
- 59.- Pettitti D B., Wingerd J Pellegrin f., and Ramcharan S., Risk of vascular disease in women smoking oral contraceptives, non-contraceptives estrogen and other factors. *J.A.M.A.* 1979;242:1150.
- 60.- Thomas D P., Merton R e., wood D and Hockley D J., The relationship between vessel wall injury and venous thrombosis: an experimental study. *Br J Haematol*. 1985;59:449.
- 61.- Gertsman B B, Piper J M., Tomita d K., Ferguson W J., Stadel B V., and Lundin F E., Oral contraceptive estrogen dose and the risk of deep venous thromboembolic disease. *Am J. Epidemiol*. 1991;133(1):32.
- 62.- Lowe GDO, et al. Increased blood viscosity in young women using oral contraceptives. *Am J Obstet Gynecol*. 1980;137:840-842,
- 63.- Poller L., Tabiario A., and Thomson J M., Effects of low-dose oral contraceptives on blood coagulation *Br Med J*. 1968;ii p 218-219.
- 64.- Daniel D G., Bloom A., L.,Gidding J C., Campell H., and Turnbull A C., Increase IX levels in puerperium during administration of diethylstilbestrol *Br Med J*. 1968;i:801-803.
- 65.- Elder M G., Hakim C A., and Hawkins D F., Plasma factor IX levels and oral contraception *J Obstet Gynecol Br Common W*. 1971;78:277-279.
- 66.- Gluek HI., Flessa HC. Control of hemorrhage in von Willebrand's disease and a hemophilic carrier with norethyndrel-mestranol. *Throm Res*. 1972;1:253.
- 67.- Alperin JB. Estrogens and surgery in women with von Willebrand's disease. *Am J Med*. 1982;73:367.
- 68.- Lobo R A., Cardiovascular implication of estrogens replacement therapy *Obstet Gynecol*. 1990;75(4 suppl):185-256.
- 69.- Creig H B W., and Notelowitz M., Natural estrogens and anti-thrombin III levels *Lancet*. 1975;i:412-413,.
- 70.- Peterson R A., Krull E P., Finley P., and Ettinger M G., Changes in anti-thrombin III and plasminogen induced by oral contraceptives *Am J clin Path*. 1970;53:486-473.
- 71.- Marciniak D., Farley C H., and Desimone P A., Familial thrombosis due to antithrombin deficiency. *Blood*. 1974;43:219.
- 72.- Filip D J., Eckstein J D., and Veltkamp J J., Hereditary antithrombin III deficiency and thromboembolism disease. *Am J Hematol*. 1976;2:343.
- 73.- Badimon L., Meyer B J., and Badimon J J., Thrombin in arterial thrombosis. *Haemostasis (Switzerland)* 1994;24(2):69-80.
- 74.- Sagar S., Atamatakis J D., Thomas D P., et al Oral Contraceptives, antithrombin III activity, and postoperative deep-vein thrombosis. *Lancet*. 1976;1:509,
- 75.- Conard J et al. Thrombosis and pregnancy in congenital deficiencies in AT-III, protein C, or protein S: Study of 78 women. *Thromb Haemost*. 1992;63:319.
- 76.- Kenkes-Metthes B., Acquired protein S deficiency. *Clin Invest* 1992;70:529-534,.
- 77.- Grewal R P., Goldberg M A., Stroke in protein C deficiency. *Am Med J*. 1990; 89:538.

- 78.- Okajima K., Koga S., Kaji M., et al. Effect of protein C and activated protein C on coagulation and fibrinolysis in normal human subjects. *Throm Haemost.* 1990;63:48.
- 79.- Yates P., Cumber PM., Sanderson S., et al. Mesenteric venous thrombosis due to protein C deficiency. *Clin Lab Haematol.* 1991;13:137.
- 80.- Comp PC., Vigano S., D'Angelo A. et al. Acquired protein S deficiency occurs in pregnancy, the nephritic syndrome and acute systemic lupus erythematosus. *Blood.* 1985;66 (suppl 1):348.
- 81.- Book: Victor J. Marder, Jack Hirsh and William R. Bell. Hemostasis and Thrombosis. Basic Principles and Clinical. 3rd. ed. Rationale and Practical Basis of Thrombolytic Therapy. 1994; Chapter 79. p 1514.
- 82.- Astedt B. Low fibrinolytic activity of veins during treatment with ethynil-oestradiol *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1971;50:279-283.
- 83.- Stember B., Bylock A., and Risberg B., Effect of venous stasis on vessel wall fibrinolysis. *Throm Haemostat.* 1984;51:240.
- 84.- El-Sayed M C., Exercise intensity-related responses of fibrinolysis activity and vasopressin in man *Med. Sci, sport Exerc.* 1990;22:494.
- 85.- Prins M H., and Hirsh J., A critical review of the evidence supporting a relationship between fibrinolysis and venous thromboembolism. *Arch Intern Med.* 1991;151:1721.
- 86.- Isacson S., and Nilsson I M., Detective fibrinolysis in blood and vein walls in recurrent idiopathic venous thrombosis. *Acta Chir Scand.* 1972;138: 313.
- 87, Kjaeldgaard A., Larsson B., Long-term treatment with combined oral contraceptives and cigarettes smoking associated with impaired activity of tissue plasminogen activator. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1986;65:219-222.
- 88.- Rubio-Póo, C., et al. Prodiame: A new estrogen with sustained anticoagulant effect. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 1983;26:111-113.
- 89.- Fernández-G. J.M., et al. Synthesis and molecular structure of prolame. An amino-estrogen with prolonged anticoagulant and brief estrogenic effects. *Steroids.* 1985; 45:151-157.
- 90.- Rubio-Póo, C., et al. The anticoagulant effect of prolame, a novel amine-estrogen *Steroids.* 1985;45:159-170.
- 91.- Rubio-Póo, C., et al. The anticoagulant effect of hexolame, another amino-estrogen with prolonged anticoagulant effect. *Steroids* 1990;55:83-86.
- 92.- Mandoki, J.J., Rubio-Póo, C., at al. The effect of five new 17 β amino-estrogen, Endiame, Etolame, Buame, Proacame and Picae, on blood clotting time. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 1991;34:99-109.
- 93.- Lemini, C., Rubio-Póo, C., Silva, G., et al. Anticoagulant and estrogenic effects of two new 17 β -aminoestrogens, butolame and pentolame. *Steroids.* 1993;58:457-461.
- 94.- Rubio-Póo, C., Lemini, C., et al. Comparison of the time course of anticoagulant effects of prolame, butolame, pentolame and hexolame. A homologous series of 17 β -amino estrogens. *Proc. West. Pharmacol. Soc.* 1993;36:143-147.
95. Allen E., Doisy E.A. :An ovarian hormone, preliminary report on its localization, extraction and partial purification, and action in test animals. *JAMA.* 1923;81:819-821.

96. Evans, J.S., Varney, R.F., and Koch, F.C., The mouse uterine weight method for assay of estrogens. *Endocrinology*. 1941;28:747-752.
- 97, Wood J W. Oral contraceptives and hypertension. *Hypertension*. 1988;II Suppl. 11:11-15.
98. - Porter J.B., Jick H., and Walker A.M. Mortality among oral contraceptives user *Obstet Gynecol* 1987;70:29-32.
- 99.- Veterans Administration. The veterans Administration co-operative urological research group: treatment and survival of patients with cancer of prostate. *Surg Gynecol Obstet*. 1967;124:1011-1017.
- 100.- Robert W Colman., Jack Hirsh., Victor J. Marder and Edwin W. Salzman. *Hemostasis and Thrombosis Basic Principles and Clinical*. 3rd. ed. Section A. Pathogenesis of Thrombosis. 1994;Chapter 80:1556

TABLE I
PATHOGENESIS OF THROMBOSIS⁽³⁵⁾

THROMBOGENIC FACTORS	PROTECTIVE MECHANISMS
1. Endothelial damage.	1. Intact endothelium.
2. Loss of endothelial cells and exposure of subendothelium.	2. Neutralization of activation of coagulation factors by compounds like heparin or thrombomodulin.
3. Activation of platelets by interaction with subendothelial collagen.	3. Neutralization of coagulation factors by protease inhibitors.
4. Activation of blood coagulation.	4. Decrease in coagulation factor activity and platelet aggregation by blood flow.
5. Inhibition of fibrinolytic system.	5. Clearance of coagulation factors by the liver.
6. Stasis.	6. Dissolution of fibrin thrombi by the fibrinolytic system.

TABLE II

THROMBOCYTOSIS	THROMBOCYTEMIA	THROMBOCYTOPENIA
Postoperative	Polycythemia vera	Immune
Postpartum	Myelofibrosis	Autoimmune
Posttraumatic	Chronic myelocytic leukemia	Lymphoma
Malignant disease		Hodgkin's disease
Autoimmune		Carcinomatosis
Fe ⁺⁺ deficiency		Medications
After thrombocytopenia		Infectious
Infectious		Aplastic anemia
Exercise		Hemolytic anemia
Acute blood loss		

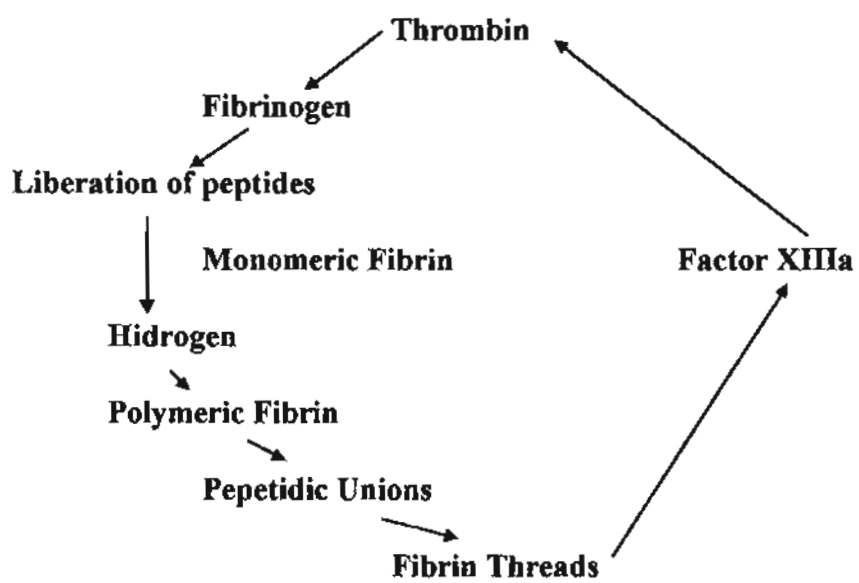


Figure 1. Sequence in blood coagulation for the formation of fibrin treads.

PHYSIOLOGIC CONTROL OF THROMBOLYSIS.

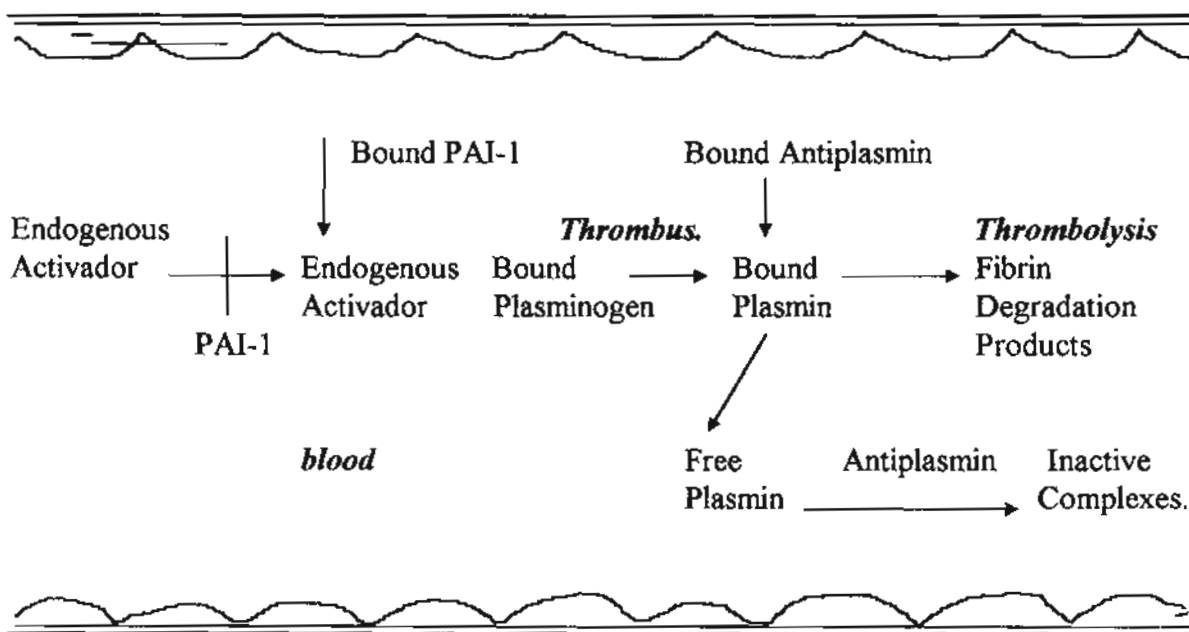


Figure 2. Schematic representation of physiologic fibrinolysis. In response to the formation of an intravascular thrombus, endothelial cells release t-PA and initiate slow thrombolysis that is efficient for small thrombi or hemostatic plugs in small vessels with large surface areas of endothelial cells (81)