

2ef



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

“SINTESIS DE DERIVADOS DEL PREGNANO CON ACTIVIDAD ANTIANDROGENICA POTENCIAL; 17 α -BENZOILOXI-4-HALO-PREGNEN-3,20-DIONA”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

MARIA EUGENIA MURILLO CONTRERAS



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FAC. DE QUIMICA

1999

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

270613



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE : Dr. CASTILLO BOCANEGRA RAFAEL

VOCAL : Dr. BRATOEFF TITEFF EUGENE ATHANAS

SECRETARIO : M. en C. CAPELLA VIZCAINO SANTIAGO

1er SUPLENTE : Dra. AGUILAR LAURENTS MARIA ISABEL

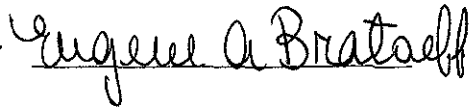
2do SUPLENTE : M. en C. PEREZ SEVERIANO FRANCISCA

SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:

Departamento de Farmacia. Edificio E. Lab-125
División de Estudios de Posgrado
Facultad de Química, U.N.A.M.

ASESOR:

Dr. Eugene Athanas Bratoeff Titeff



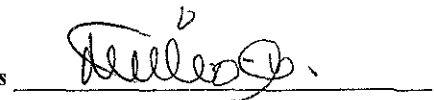
SUPERVISOR TECNICO:

Q. Gregoria Flores Rodríguez



SUSTENTANTE:

María Eugenia Murillo Contreras



AGRADECIMIENTOS

A la *Universidad Nacional Autónoma de México* por haberme abierto sus puertas y haberme dado la oportunidad de formar parte de ella.

Al *USAI* por contribuir a la investigación y por su gran ayuda en la realización de toda la espectroscopía.

Al *Dr. Eugene A. Bratoeff* con gran respeto y admiración, por haber depositado su confianza en mí desde el primer momento, quien con sus conocimientos, dedicación y exigencia llevó a cabo la dirección de esta tesis.

A la *Dra. Marisa Cabeza* por su invaluable ayuda en la realización del estudio farmacológico que fue de gran apoyo en mi trabajo.

Al *Dr. Rafael Castillo Bocanegra* quien con sus conocimientos y paciencia colaboró en mi formación profesional y por haber sido para mí no solo un gran maestro sino también un ejemplo a seguir.

Al *M.en C. Santiago Capella V.* por el tiempo invertido en la revisión de este trabajo y por sus valiosas recomendaciones.

A mis compañeros y amigos del Laboratorio 125, en especial a las maestras Gregoria F. y Elena R. por brindarme su ayuda en todo momento, por sus consejos y palabras de aliento en los momentos difíciles, donde la culminación de este trabajo parecía una tarea imposible. Gracias.

DEDICATORIAS

A *mis padres*, sabiendo que con nada podré pagarles todo su trabajo y esfuerzo por sacarnos adelante, su confianza, su cariño, su apoyo incondicional. A ustedes les doy las gracias... por mi educación, por todos estos años de felicidad, por ser los mejores padres del mundo.

Los quiero mucho.

A *mis hermanos* que a pesar de ser tan diferentes logramos pasar buenos momentos juntos.... gracias.

A *mis niños Jessica, Penelope, Luis D., Jimena, Edgar y Carlitos* por llenar de alegría mi vida.

A todos mis tíos y primos por su apoyo e interés.

A mis amigas *Norma y Olga* por los momentos que hemos compartido, por escucharme, por aceptarme como su amiga, las quiero mucho.

A mi siempre amiga *Italivi*, por escucharme, por su cariño y comprensión, te quiero mucho.

A *Hugo Herrera* por brindarme su amistad y ayuda incondicional que jamás olvidare.....mil gracias.

A mis amigos *Gabriel y Juan* por haberse cruzado en mi camino, por permitirme formar parte de ellos y por compartir una de las mejores etapas de mi vida. Gracias.

A mis grandes amigos *Cynthia, Claudia y Juan Carlos*, porque en tan poco tiempo supieron ganarse mi confianza y cariño.

A todos los que de una forma u otra han hecho posible la realización de este trabajo.

De todo corazón muchas Gracias.

A *ti Manuel* por haber formado parte de mi vida durante tantos años, por estar en el momento justo, por haber compartido tantas cosas buenas conmigo y porque sin ti no habría llegado hasta donde estoy **TE AMO.**

ÍNDICE GENERAL

CAPÍTULO 1.	
RESUMEN.....	1
CAPÍTULO 2.	
INTRODUCCIÓN.....	5
2.1. Requerimientos estructurales de un antiandrógeno potencial.....	12
OBJETIVOS.....	17
CAPÍTULO 3.	
ANTECEDENTES.....	19
3.1. GENERALIDADES DE LOS ESTEROIDES.	
Esquema A. Clasificación general de los esteroides.....	20
3.2. ANDRÓGENOS.	22
3.3. ANTIANDRÓGENOS.	28
3.3.1. Mecanismo de acción de los fármacos esteroidales inhibidores de la enzima 5 α -reductasa.....	34
CAPÍTULO 4.	
DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	37
4.1. METODOLOGÍA Y RESULTADOS DE LA PARTE QUÍMICA.	39
Tabla 1. Datos espectroscópicos para el compuesto XVII.	40
4.1.1. Síntesis de 17 α -Acetoxi-4 α ,5 α -epoxi-pregnan-3,20-diona XVIII.....	41
Tabla 2. Datos espectroscópicos para el compuesto XVIII.....	42
4.1.2. Síntesis de 4-Bromo-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona XIX.....	44
Tabla 3. Datos espectroscópicos para el compuesto XIX.....	45
4.1.3. Síntesis de 4-Cloro-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona XX.....	46
Tabla 4. Datos espectroscópicos para el compuesto XX.....	47
4.1.4. Síntesis de 4-Bromo-17 α -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona XXI.....	49
Tabla 5. Datos espectroscópicos para el compuesto XXI.....	50
4.1.5. Síntesis de 4-Cloro-17 α -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona XXII.....	52
Tabla 6. Datos espectroscópicos para el compuesto XXI.....	53
4.1.6. Síntesis de 4-Bromo-17 α -benzoiloxi-4-pregnen-3,20-diona	

XXIII.....	54
Tabla 7. Datos espectroscópicos para el compuesto XXIII.	55
4.1.7. Síntesis de 4-Cloro-17 α -benzoiloxi-4-pregnen-3,20-diona XXIV.....	57
Tabla 8. Datos espectroscópicos para el compuesto XXIV...	58
4.2. METODOLOGÍA Y RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA.....	60
4.2.1. CONDICIONES DE EVALUACIÓN.....	62
4.2.2. PRUEBA DE LOS FLANK ORGANS (FO).....	62
4.2.2.1. Tratamiento hormonal sobre los Flank Organs. Tabla 9. Tratamiento hormonal sobre los Flank Organs.....	63
4.2.2.2. Resultados de la prueba de los Flank Organs Tabla 10. Diámetro de los Flank Organs.....	64
4.2.3. PRUEBA DE LAS VESÍCULAS SEMINALES (vs).....	65
4.2.3.1. Tratamiento hormonal de las vesículas seminales. Tabla 11. Tratamiento hormonal de las vesículas seminales.	
4.2.3.2. Resultados de la prueba de las vesículas seminales.....	66
Tabla 12. Peso de las vesículas seminales.	
CAPÍTULO 5.	
DISCUSIÓN DE RESULTADOS.....	68
5.1. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA PARTE QUÍMICA.	
5.1.1. Caracterización de la materia prima 17 α -Acetoxi Progesterona XVII.....	68
5.1.2. Caracterización de 17 α -Acetoxi-4 α ,5 α -epoxi-pregnan- 3,20-diona XVIII.....	70
5.1.3. Caracterización de los compuestos 4-Bromo-17 α - acetoxi-4-pregnen-3,20-diona XIX y de 4-Cloro-17 α - acetoxi-4-pregnen-3,20-diona XX.....	72
5.1.4. Caracterización de los compuestos 4-Bromo-17 α - hidroxi-4-pregnen-3,20-diona XXI y de 4-Cloro-17 α - hidroxi-4-pregnen-3,20-diona XXII.....	75
5.1.5. Caracterización de los compuestos 4-Bromo-17 α - benzoiloxi-4-pregnen-3,20-diona XXIII y de 4-Cloro- 17 α -benzoiloxi-4-pregnen-3,20-diona XXIV.....	79
5.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA PARTE FARMACOLÓGICA.....	82
5.2.1. Análisis del ensayo de inhibición sobre la isoenzima Tipo I. Flank Organs (FO).....	85

5.2.2. Análisis del ensayo de inhibición sobre la isoenzima Tipo II. Vesículas Seminales (VS).....	86
CAPÍTULO 6.	
CONCLUSIONES	90
CAPÍTULO 7.	
ANEXO DE ESPECTROSCOPIA	92
BIBLIOGRAFÍA	133

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 2.1. Antiandrógenos comerciales utilizados comúnmente en la terapéutica.	9
Figura 2.2. Reducción de la Testosterona a DHT, por la enzima 5 α - reductasa.	10
Figura 2.3. Estructuras de las Hormonas Testosterona y Progesterona.	13
Figura 2.4. Metabolismo de la cadena lateral de la Progesterona	15
Figura 3.1. Esteroides de origen natural.....	21
Figura 3.2. Metabolismo de los Andrógenos.....	24
Figura 3.3. Síntesis y liberación de Testosterona en el organismo.....	25
Figura 3.4. Mecanismo de acción de los inhibidores de la enzima 5 α - reductasa.....	36
Figura 4.1. Ruta General de Síntesis.....	38
Figura 4.2. Gráfica de la evaluación farmacológica de la isoenzima 5 α - reductasa Tipo I.....	64
Figura 4.3. Gráfica de la evaluación farmacológica de la isoenzima 5 α - reductasa Tipo II.....	67
Figura 7.1. Espectro de UV de 17 α -Acetoxiprogesterona XVII.....	93
Figura 7.2. Espectro de IR de 17 α -Acetoxiprogesterona XVII.....	49
Figura 7.3. Espectro de RMN ¹ H de 17 α -Acetoxiprogesterona XVII.....	95
Figura 7.4. Espectro de RMN ¹³ C de 17 α -Acetoxiprogesterona XVII.....	96
Figura 7.5. Espectro de EMIE de 17 α -Acetoxiprogesterona XVII.....	97
Figura 7.6. Espectro de UV de 17 α -Acetoxi-4 α ,5 α -epoxi-pregnan-3,20- diona XVIII.....	98
Figura 7.7. Espectro de IR de 17 α -Acetoxi-4 α ,5 α -epoxi-pregnan-3,20- diona XVIII.....	99
Figura 7.8. Espectro de RMN ¹ H de 17 α -Acetoxi-4 α ,5 α -epoxi-pregnan- 3,20-diona XVIII.....	100

Figura 7.9. Espectro de RMN ¹³ C de 17 α -Acetoxi-4 α ,5 α -epoxi-pregnan-3,20-diona XVIII	101
Figura 7.10. Espectro de EMIE de 17 α -Acetoxi-4 α ,5 α -epoxi-pregnan-3,20-diona XVIII	102
Figura 7.11. Espectro de UV de 4-Bromo-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona XIX	103
Figura 7.12. Espectro de IR de 4-Bromo-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona XIX	104
Figura 7.13. Espectro de RMN ¹ H de 4-Bromo-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona XIX	105
Figura 7.14. Espectro de RMN ¹³ C de 4-Bromo-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona XIX	106
Figura 7.15. Espectro de EMIE de 4-Bromo-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona XIX	107
Figura 7.16. Espectro de UV de 4-Cloro-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona XX	108
Figura 7.17. Espectro de IR de 4-Cloro-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona XX	109
Figura 7.18. Espectro de RMN ¹ H de 4-Cloro-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona XX	110
Figura 7.19. Espectro de RMN ¹³ C de 4-Cloro-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona XX	111
Figura 7.20. Espectro de EMIE de 4-Cloro-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona XX	112
Figura 7.21. Espectro de UV de 4-Bromo-17 α -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona XXI	113
Figura 7.22. Espectro de IR de 4-Bromo-17 α -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona XXI	114
Figura 7.23. Espectro de RMN ¹ H de 4-Bromo-17 α -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona XXI	115
Figura 7.24. Espectro de RMN ¹³ C de 4-Bromo-17 α -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona XXI	116
Figura 7.25. Espectro de EMIE de 4-Bromo-17 α -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona XXI	117
Figura 7.26. Espectro de UV de 4-Cloro-17 α -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona XXII	118
Figura 7.27. Espectro de IR de 4-Cloro-17 α -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona XXII	119

Figura 7.28. Espectro de RMN ¹ H de 4-Cloro-17 α -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona XXII	120
Figura 7.29. Espectro de RMN ¹³ C de 4-Cloro-17 α -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona XXII	121
Figura 7.30. Espectro de EMIE de 4-Cloro-17 α -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona XXII	122
Figura 7.31. Espectro de UV de 4-Bromo-17 α -benzoiloxi-4-pregnen-3,20-diona XXIII	123
Figura 7.32. Espectro de IR de 4-Bromo-17 α -benzoiloxi-4-pregnen-3,20-diona XXIII.....	124
Figura 7.33. Espectro de RMN ¹ H de 4-Bromo-17 α -benzoiloxi-4-pregnen-3,20-diona XXIII.....	125
Figura 7.34. Espectro de RMN ¹³ C de 4-Bromo-17 α -benzoiloxi-4-pregnen-3,20-diona XXIII	126
Figura 7.35. Espectro de EMIE de 4-Bromo-17 α -benzoiloxi-4-pregnen-3,20-diona XXIII	127
Figura 7.36. Espectro de UV de 4-Cloro-17 α -benzoiloxi-4-pregnen-3,20-diona XXIV.....	128
Figura 7.37. Espectro de IR de 4-Cloro-17 α -benzoiloxi-4-pregnen-3,20-diona XXIV.....	129
Figura 7.38. Espectro de RMN ¹ H de 4-Cloro-17 α -benzoiloxi-4-pregnen-3,20-diona XXIV.....	130
Figura 7.39. Espectro de RMN ¹³ C de 4-Cloro-17 α -benzoiloxi-4-pregnen-3,20-diona XXIV	131
Figura 7.40. Espectro de EMIE de 4-Cloro-17 α -benzoiloxi-4-pregnen-3,20-diona XXIV	132

1

Resumen .

Los esteroides son compuestos orgánicos derivados del esqueleto base llamado ciclopentanoperhidrofenantreno I (ver página 19), hidrocarburo polinuclear alicíclico. Debido a su gran tendencia fisiológica y farmacológica que abarca desde la prevención del aborto hasta la detención de cánceres hormono dependientes, tal es el caso de cánceres de la próstata, los esteroides han sido protagonistas de una extensa investigación química, por lo que su importancia dentro del campo de la medicina es de consideración.¹

En la actualidad se han tratado de obtener por vía sintética esteroides nuevos que constituyen adelantos importantes con respecto a los ya existentes, produciendo fármacos esteroidales con una acción antiandrogénica más eficaz, menos toxicidad y con menos efectos gestacionales. Actualmente el uso de antiandrógenos en la terapéutica médica para el tratamiento de diversas patologías humanas, principalmente para el cáncer de próstata, presenta diversos inconvenientes debido a los efectos colaterales y a la baja actividad antiandrogénica que éstos presentan.² Es por esta razón que se ha optado por el desarrollo de una

variada gama de fármacos de origen esteroidal y no esteroidal, que permitan el control de estas enfermedades, manteniendo el mínimo de efectos colaterales. Hoy en día el cáncer de próstata constituye la neoplasia más frecuente de las diagnosticadas y es la segunda causa de mortalidad asociada al cáncer, ya que de los 90 000 casos diagnosticados cada año, aproximadamente 26 000 pacientes mueren a causa de esta enfermedad. La lucha del hombre contra las enfermedades ha sido una batalla de todos los tiempos, enfermedades que hasta hace algunos años parecían incurables, son en la actualidad gracias al desarrollo vertiginoso de la ciencia y al diseño de nuevos fármacos de origen sintético y semisintético, controladas y en muchos casos erradicadas. Sin embargo a pesar de que la medicina ha prestado mucha atención para una detección temprana del cáncer, la mayoría de los pacientes presentan una metástasis dispersa, que conduce a la muerte inevitable al término de su diagnóstico.^{3,4}

En la actualidad se sabe que la enzima 5α - reductasa,⁶ en presencia de **NADPH**, lleva a cabo la reducción de la Testosterona a su metabolito reducido 5α - Dihidrotestosterona (**DHT**),^{7,8} andrógeno más potente asociado con manifestaciones patológicas como el cáncer de próstata, Hiperplasia Prostática Benigna (**HPB**) y otras enfermedades mediadas por el mismo andrógeno.^{9,10} Por tanto un sitio lógico de intervención terapéutica para estas enfermedades se encuentra en la inhibición de esta enzima, a través del empleo de agentes antian-drogénicos, es decir, abatir la función androgénica es la base de la terapia inicial para el cáncer prostático.¹¹

Estudios previos llevados a cabo por Bratoeff y cols.,^{34,35} de la Relación Estructura – Actividad de fármacos esteroideos antiandrogénicos y con los antecedentes hasta ahora conocidos, sugerimos la síntesis de derivados de la Progesterona. El planteamiento de esta Tesis propone la síntesis de derivados esteroideos (Derivados del Pregnano), que presenten actividad como antiandrógenos en el tratamiento del cáncer de la próstata con un mínimo de efectos progestacionales y por otro lado, que se puedan emplear como antagonistas del Cortisol, para retardar el proceso de envejecimiento.⁵

Dicha síntesis se basa en la modificación sobre una molécula base, el Acetato de Progesterona, produciendo derivados esteroideos, mediante la agregación o modificación de grupos funcionales al compuesto prototipo.

Considerando las sustituciones químicas que confieren actividad antiandrogénica como inhibidores de la enzima 5α -reductasa, se ha determinado que la actividad está dada por una estructura casi plana de la molécula, así como la entidad 4-en-3-ona (necesaria para incrementar la densidad electrónica en tales posiciones), además de la presencia de grupos voluminosos en C-17, tales como oxhidrilos o como ésteres y por último un halógeno, en este caso en la posición C-4 del esteroide, ya que se ha observado que la presencia de un halógeno incrementa la actividad.¹² Teniendo en consideración que las sustituciones químicas anteriores permitirían obtener un efecto antiandrogénico mayor y progestacional mínimo, así como una alta especificidad por el receptor androgénico; en este trabajo se describe la síntesis de dos nuevos compuestos, posibles inhibidores de la enzima 5α -reductasa, y que son

derivados de la Progesterona. 17α -Benzoiloxi-4-bromo-pregnen-3,20-diona **XXIII**, y 17α -Benzoiloxi-4-cloro-pregnen-3,20-diona **XXIV**, así como sus intermediarios hidroxilados: 17α -Hidroxi-4-bromo-pregnen-3,20-diona **XXI** y por último 17α -Hidroxi-4-cloro-pregnen-3,20-diona **XXII** (ver **Figura 4.1.**, pag.38), como fármacos potenciales para el tratamiento de enfermedades de la próstata mediadas por el andrógeno **DHT**.

Para llegar a la síntesis de cada uno de éstos compuestos se usó como materia prima un derivado de la Progesterona (17α -Acetoxi Progesterona **XVII**), disponible comercialmente. Por último los derivados sintetizados y todos sus intermediarios fueron evaluados farmacológicamente mediante un ensayo preliminar *in vivo*, llevado a cabo en Hamsters machos gonadectomizados de la especie *Syrian Golden*; En dicho ensayo se observó el efecto que tienen los andrógenos y anti-andrógenos sobre los Flank Organs y también sobre el peso de las Vesículas Seminales y se comprobó con esto que dichos compuestos sintetizados presentaron mayor actividad antiandrogénica estableciéndose con esto una relación entre la estructura química y la actividad farmacológica.

Debido a que dichos compuestos son nuevos antiandrógenos que no se encuentran reportados en la literatura fue necesario la caracterización mediante sus propiedades físicas y mediante datos espectroscópicos (UV, IR, RMN ^1H , RMN ^{13}C y EMIE).

2

Introducción.

La próstata constituye el órgano en el cual se presenta el mayor número de enfermedades benignas en el hombre cuya incidencia aumenta con la edad, ya que es un órgano susceptible de infección e inflamación. El cáncer de próstata constituye la neoplasia más frecuente de las diagnosticadas entre los varones estadounidenses y es la principal causa de mortalidad asociada al cáncer.¹⁴ Este cáncer suele diagnosticarse en varones de alrededor de 55 años, mediante la detección de la inflamación de la glándula prostática y cuyos síntomas se caracterizan por molestias súbitas al orinar o impotencia, éstos síntomas se presentan cuando el crecimiento celular canceroso presiona sobre la vejiga urinaria o la uretra provocando que el paciente orine con una frecuencia anormal, lo que ocasiona dificultad para iniciar la micción y para mantener normal el flujo de la orina.¹⁵

Sin embargo, a pesar de que los investigadores han encaminado sus estudios hacia una detección temprana del cáncer de próstata, esto

resulta difícil, ya que éste en etapas tempranas no presenta síntomas, es por esta razón que la mayoría de los pacientes al momento de la diagnosis presentan una metástasis dispersa, que se caracteriza por un dolor intenso de huesos, hacia donde se haya diseminado la enfermedad lo que conduce a la muerte inevitable del paciente al término de su diagnóstico; éste diagnóstico consiste en el tacto rectal en el que se detecta un abultamiento de la glándula prostática, en caso de presentarse la enfermedad, otra vía importante de detección del cáncer de la próstata lo constituye también el análisis de sangre, mediante el cual se mide el nivel de Antígeno Especifico de la Próstata (**AEP**), que es una glucoproteína segregada por la glándula, teniendo en consideración que un valor elevado de **AEP** no constituye una prueba definitiva de cáncer, ya que la concentración de dicho antígeno puede ser incrementada mediante otros factores, tales como el desarrollo de una Hiperplasia Prostática Benigna (**HPB**), por inflamación de la próstata (Prostatitis) o por aplicación de una presión mecánica sobre dicha glándula.¹⁶

Existen tratamientos potencialmente curativos para las etapas tempranas del Cáncer de Próstata; sin embargo, los intentos para erradicar la metástasis no han sido exitosos. La cirugía (Orquiectomía o Prostatectomía), la Criología y la Radiología son métodos comunes de tratamiento que pueden afectar la calidad de vida del enfermo, al producir efectos secundarios tales como lesión intestinal, incontinencia e impotencia sexual,¹⁷ además de los daños citotóxicos propios de la radiación. Aunque la cirugía representa actualmente el tratamiento más aceptado para el cáncer de próstata (400 000 prostatectomías ejecutadas cada año en los Estados Unidos), se han buscado otras alternativas

terapéuticas que en la actualidad han adquirido importancia, basadas en el hecho de que el cáncer de próstata es una enfermedad dependiente de andrógenos, al acelerar estos el crecimiento celular.¹⁸

Resulta interesante aclarar que en estas enfermedades el tratamiento de elección está determinado por diversos factores, tales como el estadio o grado de avance de la enfermedad, la edad del paciente, el estado de salud general del mismo; y en el caso de la utilización de fármacos, la vía de administración, las contraindicaciones de su utilización y los efectos colaterales de cada fármaco.

Sin embargo existen nuevas alternativas que consisten en la administración de fármacos antiandrogénicos, los cuales actúan en los sitios donde se originan los andrógenos, inhibiendo su producción o impidiendo la unión al receptor androgénico.¹⁹

Actualmente el uso de antiandrógenos ofrece un tratamiento útil para un gran número de enfermedades mediadas por andrógenos tales como: Cáncer de próstata, hirsutismo, acné, seborrea, alopecia androgénica, pubertad precoz e **HPB**.²⁰ Sin embargo la aplicación terapéutica más importante de los antiandrógenos es en el tratamiento del cáncer de próstata y en la Hiperplasia Prostática Benigna (**HPB**), la cual se caracteriza por el agrandamiento anormal de la próstata; ambas enfermedades constituyen los principales problemas médicos en el varón de edad avanzada. Sin embargo el uso de antiandrógenos presenta ciertos inconvenientes, debido a los diversos efectos colaterales y a la baja actividad, dentro de estos efectos se encuentran: la diarrea, ceguera nocturna, intolerancia al alcohol, daño hepático, disminución de la libido,²¹ entre otros, particularmente son los diversos efectos colaterales, la razón

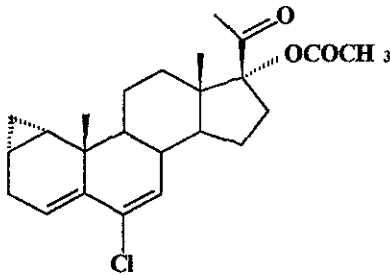
fundamental que estimula el esfuerzo por la búsqueda de nuevos fármacos con una elevada potencia antiandrogénica y que al mismo tiempo presenten el mínimo de efectos colaterales posibles. Por esta razón se ha optado por el desarrollo de nuevos antiandrógenos sintéticos.

Desafortunadamente los compuestos que existen en la actualidad como el Acetato de Ciproterona I,²² la Flutamida II,²³ el Proscar (Finasterida) III²⁴ y el ketoconazol IV, el cual es un inhibidor de la biosíntesis de andrógenos,²⁵ son los fármacos más eficaces para el tratamiento del cáncer de próstata y de la HPB²⁶ (ver Figura 2.1, pag. 9); sin embargo son agentes que presentan efectos colaterales adversos, reduciendo con esto su uso terapéutico.

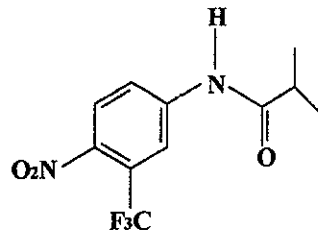
Si bien algunos compuestos no esteroideos actúan como inhibidores de la enzima 5 α -reductasa, mostrando actividad antiandrogénica, los antiandrógenos de mayor interés terapéutico pertenecen a la serie esteroidal,^{27,28} en especial a los derivados de la Progesterona, debido principalmente a que son homólogos de esteroides de origen natural, actuando específicamente con el receptor androgénico, disminuyendo con esto la toxicidad de los mismos.

Teniendo en cuenta los posibles puntos de acción de los andrógenos, son numerosos los fármacos de origen esteroidal y no esteroidal que muestran una variada gama de efectos antiandrogénicos y efectos colaterales de acuerdo al punto donde actúan y al mecanismo de acción del cual se sirven para antagonizar a los andrógenos.

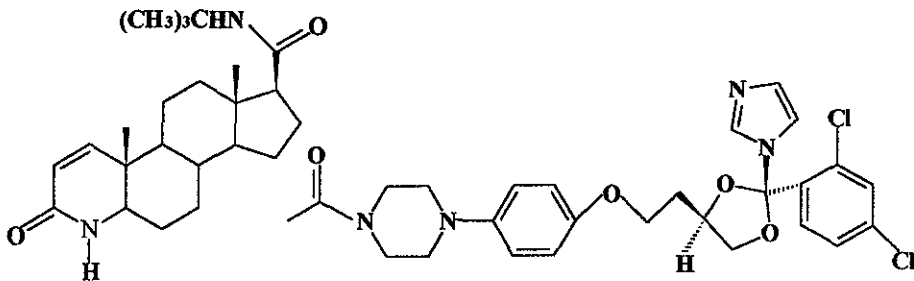
Figura 2.1. Antiandrógenos comerciales utilizados comúnmente en la terapéutica.



Acetato de Ciproterona (I)



Flutamida (II)



Finasterida (III)

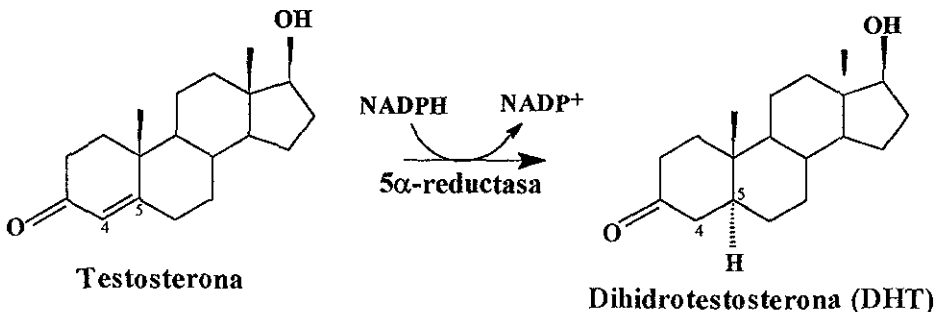
Ketoconazol (IV)

Como se mencionó anteriormente, el cáncer de próstata es una enfermedad dependiente de andrógenos, principalmente del metabolito de la Testosterona conocido como 5α -Dihidrotestosterona (**DHT**), andrógeno que tiene un papel inductivo en dicha neoplasia, debido a que interactúa más eficazmente con el receptor androgénico,²⁹ ocasionando la formación del metabolito androgénico más activo, al presentar mayor eficiencia y

afinidad por el receptor androgénico, esta interacción del metabolito esteroide con su receptor provoca una alteración en el estado físico de la proteína, que se manifiesta en un incremento de la afinidad del complejo esteroide-receptor por el **DNA** (Ac. Desoxirribonucleico) y por analogía con otras interacciones de ligando-proteína, por tanto el metabolito actúa como un modificador alostérico de la estructura del receptor.^{30,31}

Considerando que se lleva a cabo la reducción irreversible de la Testosterona a Dihidrotestosterona (DHT)³² por acción de la enzima 5 α -reductasa, localizada en la membrana celular dependiente de **NADPH** (ver **Figura 2.2**), se ha sugerido que si la producción de cáncer de la próstata depende preferentemente de este último metabolito, entonces el tratamiento mediante el empleo de inhibidores de la enzima 5 α -reductasa disminuirán los niveles de éste, sin afectar los de su precursor, la Testosterona llevando a un decremento en el tamaño de la próstata, evitando con esto consecuencias indeseables que se producirían si se llevara a cabo una disminución simultanea de los niveles de Testosterona, hecho que sucede cuando se somete el paciente a cirugía.³³

Figura 2.2. Reducción de la Testosterona a DHT, por la enzima 5 α -reductasa.



Partiendo de la hipótesis de que el cáncer de próstata depende preferentemente del metabolito reducido **DHT**, el tratamiento mediante la administración de fármacos inhibidores de la enzima 5α -reductasa disminuirán los niveles de éste, sin afectar los de su precursor, de ahí que los esfuerzos para la prevención del cáncer de próstata se encaminen al desarrollo y empleo de inhibidores de dicha enzima.

Sin embargo en la actualidad los antiandrógenos disponibles tienen una afinidad relativamente baja por el receptor androgénico, lo cual permite que existan concentraciones significativas de **DHT** intracelular en forma libre.

A pesar de que la función de la Testosterona en los testículos puede eliminarse fácilmente mediante Orquiectomía (extirpación testicular) o mediante Castración Farmacológica, utilizando agonistas de la Hormona Liberadora de la Hormona Luteinizante (**HLHL**), el tratamiento de elección es el uso de fármacos antiandrogénicos, considerando que la disminución en la concentración de **DHT** es esencial para el desarrollo de nuevas estrategias terapéuticas, encaminadas a la búsqueda de nuevos compuestos sintéticos capaces de interactuar con el receptor androgénico.

Con el fin de aumentar la actividad de los compuestos antiandrogénicos y reducir sus efectos colaterales potenciales, se efectúa la investigación considerable en la síntesis de antiandrógenos de origen esteroidal, donde el objetivo fundamental del presente trabajo fue diseñar y sintetizar dos fármacos nuevos de naturaleza esteroidal con actividad antiandrogénica potencial como inhibidores de la enzima 5α -reductasa.

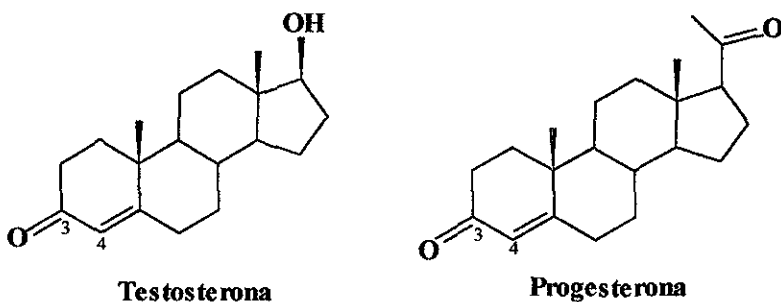
Para el diseño de dichos fármacos se tomaron como base estudios previos de relación estructura-actividad de antiandrógenos esteroidales, el mecanismo bioquímico de la acción de los andrógenos y antiandrógenos y la actividad antiandrogénica de los fármacos esteroidales diseñados y sintetizados anteriormente por el grupo de investigación de Bratoeff y cols.^{34,35}

2.1 Requerimientos estructurales de un antiandrógeno potencial.

Al realizar un análisis acerca de los requerimientos estructurales que una molécula esteroidal debe cumplir para mostrar actividad antiandrogénica potencial, como primera aproximación podría realizarse una clasificación superficial en derivados de la Testosterona (androstanos) y por otro lado en derivados de la Progesterona (pregnanos), existiendo básicamente dos formas de sintetizar un esteroide antiandrogénico, uno es produciendo cambios en la molécula de Testosterona, de manera que se obtenga un efecto antagónico, es decir, que el compuesto sintetizado interactúe con el receptor sin producir un efecto androgénico, bloqueando la formación del complejo andrógeno-receptor y otro es modificando la molécula de Progesterona con el fin de producir una separación de los efectos progestacionales y antiandrogénicos, pues si bien la Progesterona tiene cierto carácter antiandrogénico, sus efectos progestacionales no pueden ser ignorados. En este trabajo en particular la estrategia a seguir fue la obtención de derivados de la Progesterona que puedan antagonizar su efecto, al competir por su receptor androgénico, aumentando así la actividad antiandrogénica y por otro lado disminuyendo al máximo la actividad progestacional. Esta dualidad

aparente de la Progesterona puede ser el resultado de una falta de especificidad hacia el receptor de la Progesterona y el androgénico, debido probablemente a la homología del sistema 4-en-3-ona en ambas hormonas. Además siendo la Progesterona el precursor inicial de la biosíntesis de otros esteroides que también presentan actividad biológica tales como: andrógenos, estrógenos y corticoides, parece razonable pensar en efectos combinados como resultado de su metabolismo.

Figura 2.3 Estructuras de las Hormonas Testosterona y Progesterona.



Estudios previos indican que la entidad 4-en-3-ona, presente en las moléculas de la Testosterona y Progesterona, se piensa que es un factor determinante para que la Progesterona presente actividad antiandrogénica, como resultado de la falta de especificidad hacia el receptor androgénico, así mismo, la presencia de esta entidad ha resultado esencial para que los compuestos sintetizados lleven a cabo la inhibición de la 5 α -reductasa, enzima que cataliza la reducción de T a **DHT**, al competir

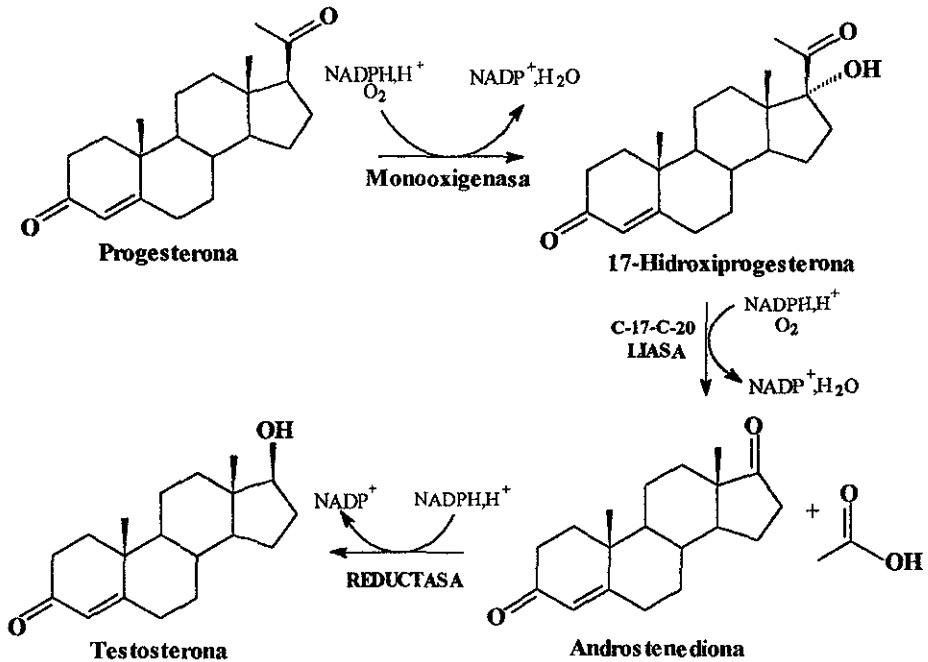
por el receptor androgénico de modo similar como lo hace la Progesterona.

Por otro lado, estudios previos llevados a cabo por Bratoeff y cols.,^{34,35} han demostrado que la introducción de un átomo de halógeno dentro de la molécula de Progesterona incrementa potencialmente la actividad antiandrogénica como resultado de la interferencia del halógeno en la resonancia de la cetona α,β insaturada.³⁶ Otro punto importante a considerar es el metabolismo que sufren la Progesterona y análogos de ésta, ocasionando su inactivación en el organismo. Como ejemplo del metabolismo que sufren podemos mencionar la reducción enzimática del grupo carbonilo en C-20,³⁷ disminuyendo la actividad antiandrogénica de la Progesterona; y por otro lado, la degradación de la cadena lateral que conduce a la síntesis eventual de Testosterona,^{38,39} catalizada por la enzima C-17- C-20 liasa acoplada al citocromo P-450, la cual, a partir de la Progesterona, produce androstenediona, previa hidroxilación y reducción del carbonilo en C-20, para la posterior ruptura del enlace C-17-C-20, produciendo finalmente testosterona.⁴⁰ (ver **Figura 2.4.**, pag. 15).

En vista de que la Progesterona y análogos de ésta son inactivados rápidamente en el plasma por el metabolismo antes descrito, la protección de la cadena lateral es un requisito esencial para el diseño de fármacos con estructura similar a ésta, tomando como base que los derivados 17α -alquil o 17α -aciloxi de la Progesterona han demostrado un incremento notable tanto en la actividad antiandrogénica,^{41,42} así como en su biodisponibilidad oral y por otro lado se ha observado que la presencia de grupos voluminosos en C-16 y C-17 impiden el

acercamiento de la enzima al grupo carbonilo en C-20, inhibiendo así dicha reducción mediante degradación enzimática.

Figura 2.4. Metabolismo de la cadena lateral de la Progesterona



Resulta interesante destacar la influencia del tamaño del sustituyente éster en C-17 para las series con cloro y bromo, donde la actividad antiandrogénica es mayor conforme el éster es más grande, observación que se podría explicar por el impedimento estérico que resulta del éster para la reducción del carbonilo en C-20.

Tomando como base las consideraciones anteriores para el diseño y síntesis de nuevos fármacos derivados del pregnano con actividad antiandrogénica potencial, en este trabajo se describe la síntesis de dos compuestos nuevos derivados de la Progesterona: 17α -Benzoiloxi-4-bromo-pregnen-3,20-diona **XXIII**, y 17α -Benzoiloxi-4-cloro-pregnen-3,20-diona **XXIV** y sus intermediarios hidroxilados: 17α -Hidroxi-4-bromo-pregnen-3,20-diona **XXI** y por último 17α -Hidroxi-4-cloro-pregnen-3,20-diona **XXII** (ver Figura 4.1., pag.38), cuya actividad antiandrogénica se probó mediante un ensayo preliminar *in vivo*, por el efecto mostrado sobre el diámetro pigmentado de los Flank Organs y sobre el peso de las Vesículas Seminales, midiendo así su capacidad de inhibición de estos compuestos sobre la enzima 5α -reductasa en sus dos isoformas tipo **I** y **II** (véase parte farmacológica de la sección de Resultados).

OBJETIVOS

Considerando los antecedentes acerca de la relación estructura-actividad biológica de los fármacos esteroidales antiandrogénicos ya existentes en la terapéutica y en base en la investigación del proyecto de Tesis planteado, en donde resulta sumamente importante considerar las sustituciones químicas esenciales para conferir una actividad antiandrogénica a los derivados del pregnano, los objetivos planteados para el presente trabajo son:

OBJETIVOS GENERALES

- Desarrollar y estandarizar un método sintético para introducir un átomo de halógeno en la posición C-4, además de un hidroxilo en C-17 α orientado para su posterior esterificación con un éster voluminoso en la misma posición, dentro de la molécula de Progesterona con la finalidad de sintetizar nuevos compuestos con posible actividad antiandrogénica.
- Optimizar los métodos sintéticos para la obtención de los compuestos intermediarios en la secuencia sintética propuesta.
- Llevar a cabo la caracterización mediante sus propiedades físicas y datos espectroscópicos de los compuestos finales así como sus intermediarios.

OBJETIVOS PARTICULARES

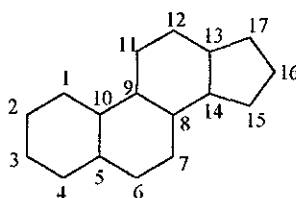
- Evaluar la actividad antiandrogénica de los compuestos sintetizados mediante un ensayo preliminar *in vivo*, a través de su efecto que causan sobre el diámetro de los Flanks Organs.
- Sintetizar un fármaco nuevo con actividad antiandrogénica potencial y que presente un mínimo de efectos colaterales, que los fármacos disponibles comercialmente.

3

Antecedentes

3.1 GENERALIDADES DE LOS ESTEROIDES.

Los esteroides son compuestos derivados del ciclopentano-perhidrofenantreno (1), hidrocarburo polinuclear alicíclico; estos constituyen un grupo ampliamente distribuido en la naturaleza tanto en el reino animal como en el vegetal.⁴⁴

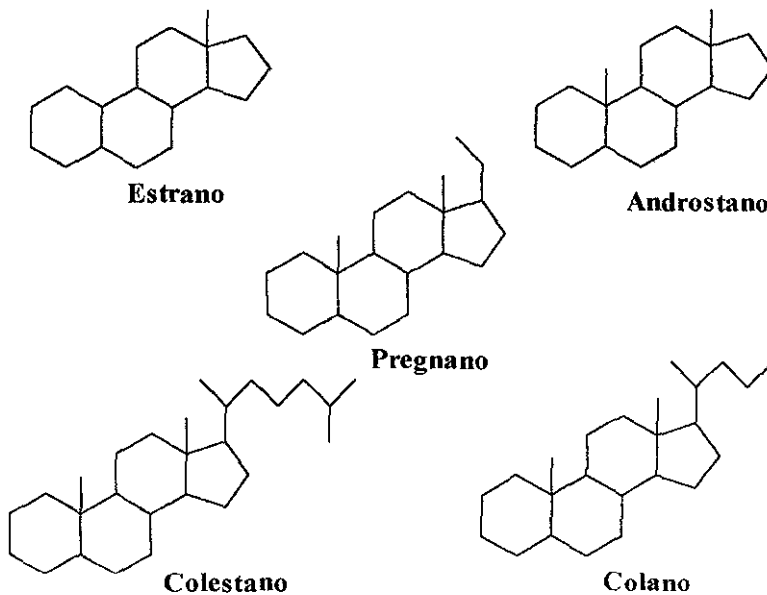


1

De acuerdo con la naturaleza de las cadenas alifáticas en las posiciones diez, trece y diecisiete, los esteroides se clasifican en cinco grupos fundamentalmente: *Estrano*, con un metilo en la posición trece;

Androstano, con metilos en las posiciones diez y trece; *Pregnano* con grupos metilos en las posiciones diez y trece, además de un grupo etilo en la posición diecisiete; *Colano* con metilos en las posiciones diez y trece, además de una cadena de cinco átomos de carbono en la posición diecisiete y por último el *Colestano* con grupos metilos en las posiciones diez y trece, además de una cadena alifática de ocho átomos de carbono en la posición diecisiete.⁴⁵(ver **Esquema A**).

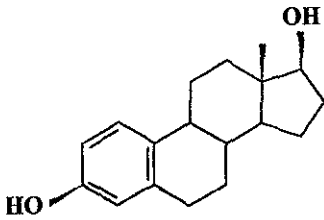
Esquema A. Clasificación general de los esteroides.



Estos grupos incluyen una gran variedad de compuestos de origen natural como se muestra en la **Figura 3.1**. Los esteroides adquieren cada vez mayor importancia en la medicina moderna, debido a su gran

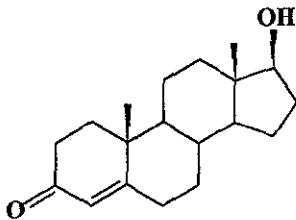
trascendencia fisiológica y farmacológica, abarcando desde la corrección de ciertas anomalías hormonales hasta el tratamiento de la dermatitis como el acné, la calvicie prematura, síndromes virilizantes en la mujer, pubertad precoz en niños y más importantemente para el tratamiento de Hiperplasia Prostática Benigna y el Carcinoma de la próstata.

Figura 3. 1. Esteroides de origen natural.



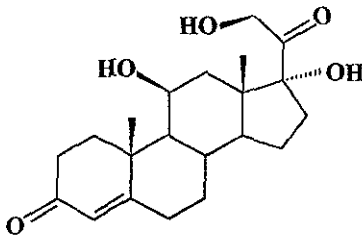
II

Estradiol: Hormona sexual femenina estrogénica, que se deriva del grupo esteroidal estrano, con 18 átomos de Carbono.



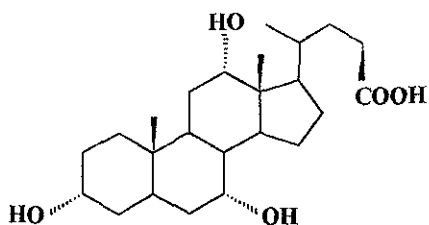
III

Testosterona: Hormona sexual masculina, perteneciente a los andrógenos que se deriva del grupo esteroidal androstano con 19 átomos de Carbono.



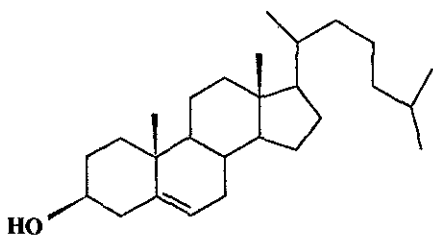
IV

Cortisol: Hormona de la corteza suprarrenal que retarda el proceso de envejecimiento, además se deriva del pregnano, esteroide de 21 átomos de Carbono.



V

Acido Cólico: Acido biliar secretado por el hígado, esteroide que se deriva del grupo fundamental colano con 23 átomos de Carbono.



VI

Colesterol: Esterol que se deriva del grupo fundamental colestano, es componente importante de las membranas celulares, compuesto natural con 27 átomos de Carbono.

Los esteroides han sido protagonistas de una extensa investigación química, que colaborando con la investigación médica tratan de desarrollar nuevos derivados esteroideos sintéticos, que tengan acción fisiológica y farmacológica más eficaz que los usados hoy en día, tratando de disminuir al mínimo la toxicidad y los efectos progestacionales.⁴⁶

3.2 ANDRÓGENOS

Los andrógenos son hormonas esteroideas que se derivan del ciclopentanoperhidrofenantreno 1 y que pertenecen al grupo hidrocarburo androstano. Estos son responsables de los caracteres sexuales primarios y secundarios de los varones, controlando la masculinización, es por ello

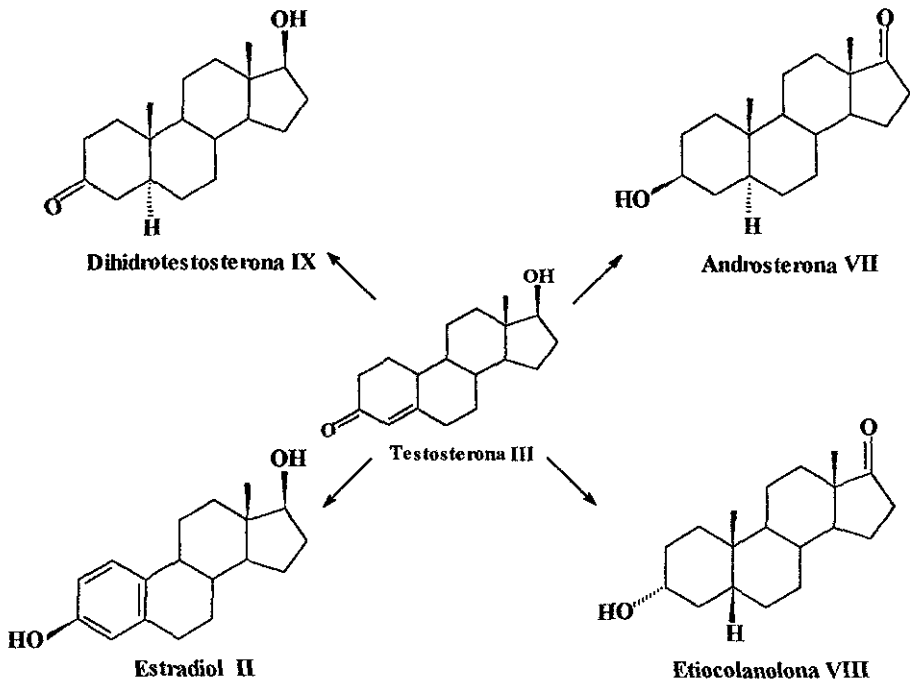
que son llamadas hormonas masculinas y son las responsables de regular la fisiología y comportamiento sexual en el varón.⁴⁷

Los principales andrógenos producidos por el organismo son la Testosterona **III** y su metabolito reducido Dihidrotestosterona **IX**. La Testosterona es la hormona secretada por los testículos principalmente y es el principal andrógeno en el plasma de los varones. En mujeres, tanto los ovarios como las glándulas suprarrenales sintetizan pequeñas cantidades de este andrógeno, el cual se metaboliza hasta generar otros esteroides con actividad hormonal.⁴⁸ Los principales metabolitos de los andrógenos son débiles o inactivos desde el punto de vista fisiológico, como ejemplo de éstos tenemos a la Androsterona **VII**, un metabolito de la Dihidrotestosterona **IX** y a la Etiocolanolona **VIII**, un metabolito 5 β -reducido (ver **Figura 3.2**, pag.24). La Testosterona **III** también se puede metabolizar hacia Estradiol **II**, vía que explica la mayor parte de la síntesis de estrógenos en varones y posmenopáusicas, esto resulta un problema ya que el exceso relativo o absoluto de estrógenos causa feminización en varones.

Los principales andrógenos producidos por el organismo son la Testosterona y la Dihidrotestosterona, siendo la primera hormona el andrógeno más conocido. Su síntesis y liberación (ver **Figura 3.3**, pag.25) de las gónadas se encuentra controlada por la Hormona Liberadora de la Hormona Luteinizante (**HLHL**),⁴⁹ la cual es secretada por el hipotálamo. Esta hormona, estimula al lóbulo anterior de la glándula hipófisis y se lleva a cabo la producción de la Hormona Luteinizante (**HL**), la cual es muy importante porque estimula a las

Células de Leydig (también llamadas intersticiales) del testículo, así como a la corteza de las glándulas suprarrenales para realizar la producción de Testosterona.

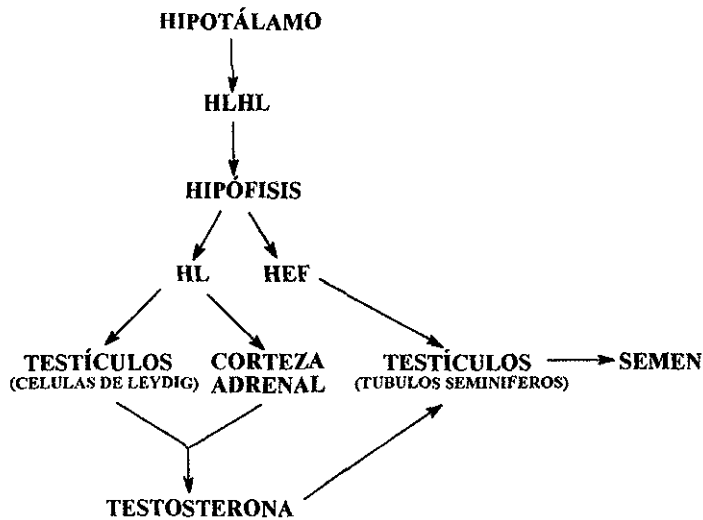
Figura 3.2. Metabolismo de los Andrógenos.



Por otro lado, la glándula hipófisis también produce la Hormona Estimulante del Folículo (**HEF**), la cual en conjunto con la Testosterona lleva a cabo la producción y maduración de las espermatogonias en los túbulos seminíferos que posteriormente darán origen al semen.

Después de su secreción la Testosterona es metabolizada en hígado, piel y glándula prostática, por las enzimas aromatasas y 5α -reductasa produciendo Estradiol II y Dihidrotestosterona IX, respectivamente.

Figura 3.3. Síntesis y liberación de Testosterona en el organismo.



Por otra parte, la función de la Testosterona III en los testículos puede eliminarse fácilmente por orquiectomía (extirpación de los testículos), o mediante castración farmacológica, utilizando agonistas de LHLH.⁵⁰

Los andrógenos poseen importantes efectos fisiológicos durante el periodo embrionario ya que virilizan el tracto urogenital del embrión masculino y su acción es capital para el desarrollo de su fenotipo.⁵¹ Son responsables del desarrollo de la próstata y de los genitales externos, así como de los caracteres sexuales secundarios masculinos, como es el engrosamiento de la voz, crecimiento de vello en zonas determinadas, desarrollo de la masa muscular, incremento de las secreciones de las glándulas sebáceas, crecimiento del pene y escroto, estimulación de la libido y potencia de erección.

Durante el desarrollo masculino, los testículos fetales secretan Testosterona **III** a la circulación fetal en niveles suficientes como para estimular la diferenciación y crecimiento de una porción del tejido urogenital que da origen a la glándula prostática definitiva. Si la cantidad de Testosterona **III** presente en el suero fetal no es suficiente durante el desarrollo uterino, la próstata no se desarrollará.⁵¹

El tejido prostático requiere de un soporte normal adecuado para la diferenciación, desarrollo normal de la glándula y para mantener su integridad estructural y funcional.

La Testosterona **III** es reducida en la posición 5 a su metabolito 5α -Dihidrotestosterona (**DHT**), en las células urogenitales, mediante la acción de una enzima localizada en la membrana celular dependiente del NADPH llamada 5α -reductasa (ver **Figura 2.2**, pag.10). Una vez formada la **DHT** se une al receptor androgénico intracelular,⁵² el complejo **DHT**-receptor funciona como un factor nuclear de transcripción

para regular la expresión de una serie de genes que forman el complejo de diferenciación y crecimiento del tejido dentro de la próstata

La importancia clínica de la **DHT** en el proceso de desarrollo de la próstata; se ha demostrado por el hecho de que ésta no tiene un tamaño normal en individuos que presentan mutación en el gene que codifica para la enzima 5α -reductasa, lo cual impide que se forme la **DHT** a pesar de que los niveles séricos de Testosterona son normales.⁵³

Una serie de observaciones proponen que en la próstata, la **DHT** es el andrógeno más activo intracelularmente, que regula la proliferación y muerte celular prostática. Además se ha observado que el receptor androgénico presenta mayor afinidad por ésta, en contraste a la Testosterona,⁵⁴ y su concentración intracelular y particularmente nuclear excede a la de cualquier otro andrógeno encontrado en la próstata. De acuerdo a esto, se concluye que el principal andrógeno retenido en el núcleo de las células prostáticas es la **DHT**.⁵⁵

El hecho de que la **DHT** juegue un papel decisivo en el desarrollo de la Hiperplasia Prostática Benigna (**HPB**) y el Cáncer de Próstata no es del todo conocido, sin embargo estudios previos han demostrado que una vez que la **HPB** se ha desarrollado, la supresión del andrógeno por diversos medios, conduce a la disminución del tamaño de la próstata⁵⁶ y de aquí se ha concluido que se requiere de niveles críticos de **DHT** prostáticos para el desarrollo de la **HPB**.

3.3 ANTIANDRÓGENOS

Los antiandrógenos son compuestos que bloquean la síntesis de los andrógenos o sus funciones, la mayoría de estos compuestos disminuyen la concentración de **DHT** sin tener un efecto directo sobre la concentración de **T**. Actualmente el uso de antiandrógenos en la terapéutica médica ofrecen un tratamiento útil para un gran número de enfermedades mediadas por andrógenos tales como el hirsutismo, acné, seborrea, alopecia androgénica, pubertad precoz, entre otras. Sin embargo la aplicación terapéutica más importante de los antiandrógenos, lo constituyen el cáncer de próstata y la **HPB**, ya que constituyen los principales problemas médicos en el varón de edad avanzada, por su alta frecuencia de aparición.⁵⁷

Por otro lado el uso de los antiandrógenos presenta diversos inconvenientes debido a los diversos efectos colaterales y a la baja actividad que presentan. Por esta razón se ha optado por el uso de nuevos antiandrógenos sintéticos o semisintéticos, los cuales pueden ser de dos tipos: de tipo esteroidal y no esteroidal.

Existen diversos tipos de antiandrógenos entre los que se encuentran: Los agonistas de la **HLHL**,⁵⁸ los antagonistas competitivos del receptor androgénico,⁵⁹ los antagonistas de los receptores antiadrenérgicos,⁶⁰ los inhibidores de la enzima aromatasa que impiden la conversión de los andrógenos a estrógenos y los inhibidores de la enzima 5α -reductasa,⁶¹ entre otros.

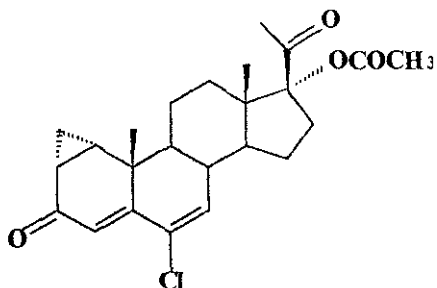
Por otro lado el uso de antiandrógenos se ve limitado debido a los diversos efectos colaterales y baja actividad que estos presentan, por esta razón se lleva a cabo el diseño de nuevos antiandrógenos sintéticos o semisintéticos, los cuales pueden ser de dos tipos: esteroidales y no esteroidales. Si bien algunos compuestos no esteroidales interactúan con el receptor androgénico mostrando actividad antiandrogénica, los antiandrógenos de mayor interés pertenecen a la serie esteroidal, debido principalmente a que son homólogos de esteroides de origen natural, en especial derivados de la Progesterona (antiandrógeno natural). Sin embargo éstos presentan algunas desventajas al reducir la concentración de Testosterona y como consecuencia la actividad enzimática de la enzima 5α -reductasa, impidiendo la formación de **DHT**, que en concentraciones adecuadas resulta esencial para llevar a cabo las funciones propias de los andrógenos, además de reducir el tamaño de los órganos sexuales.⁶²

Dentro del grupo más estudiado de antiandrógenos esteroidales, se encuentran los siguientes:

ACETATO DE CIPROTERONA (*Androcur*).

El Acetato de Ciproterona es un antiandrógeno esteroidal que mantiene una actividad progestacional parcial, al bloquear la acción de la Testosterona y la **DHT**, inhibiendo competitivamente la unión al receptor androgénico.⁶³ En tratamientos prolongados puede provocar atrofia celular, disminución de la libido, impotencia sexual, al afectar la capacidad fertilizante del espermatozoide y regresión de las

características sexuales secundarias Este fármaco está indicado en el tratamiento paliativo del cáncer de próstata avanzado.

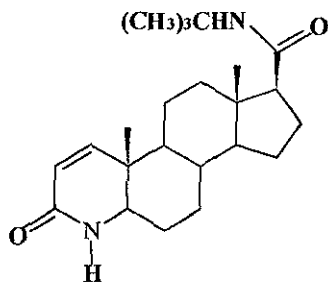


Acetato de Ciproterona X

FINASTERIDA (Proscar).

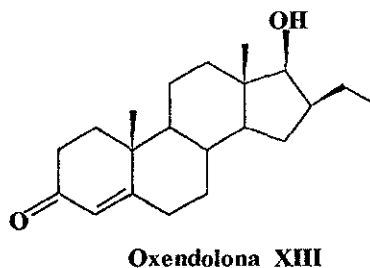
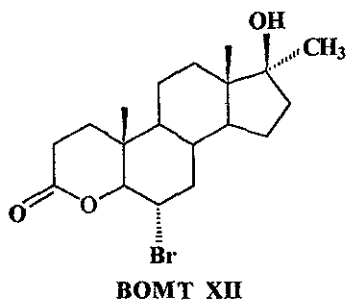
Este fármaco antiandrogénico se conoce con el nombre comercial de Proscar y es el prototipo de los fármacos que actúan inhibiendo la acción de la enzima 5α -reductasa, por lo que reduce significativamente los niveles de DHT y por el contrario hay un incremento de la Testosterona III y Androsterona VII (ver Figura 3.2, pag.24).

Es importante mencionar que este fármaco inhibe la proliferación de las células prostáticas por lo que está indicado en el tratamiento de HPB, en comparación con el acetato de ciproterona X presenta menos efectos secundarios.



Finasterida XI

Otros fármacos antiandrogénicos esteroidales menos estudiados pero que presentan actividad antiandrogénica son BOMT (XII)⁶⁴ y Oxendolona (XIII).⁶⁵



La mayor parte de estos compuestos tienen diferentes mecanismos de acción y algunos muestran efectos secundarios severos que reducen su utilidad clínica. Dentro de estos efectos colaterales, se han evaluado los que se puedan presentar a corto y largo plazo y a todos los niveles fisiológicos que van desde el comportamiento sexual, hasta anomalías hormonales, como son pérdida de la libido, impotencia, anomalías en el semen y atrofia celular.⁶⁶

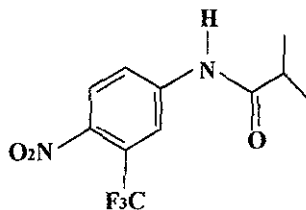
En contraste a los antiandrógenos esteroidales, el número de antiandrógenos no esteroidales, que carece de actividad hormonal está creciendo día con día y aunque se prefieran los fármacos de origen esteroide, por las razones antes mencionadas, los fármacos antiandrogénicos de origen no esteroide presentan también ciertas ventajas, tales como su afinidad por el receptor androgénico, debido a su estructura química con geometría semejante a los fármacos esteroidales

y además de reducir en un 25 a 30% el tamaño de la próstata Dentro del grupo de antiandrógenos no esteroideos, los fármacos más estudiados son los siguientes:

FLUTAMIDA (Eulexin).

La flutamida es un antiandrógeno no esterooidal con una fórmula química completamente diferente a la de los fármacos esteroideos, careciendo de los requerimientos estructurales para competir con la DHT por el sitio de unión al receptor androgénico,⁶⁷ sin embargo se sugiere que ambos compuestos tienen una estructura geométrica similar. Este fármaco bloquea la retroalimentación negativa de la Testosterona en el eje hipotálamo-pituitaria sin presentar efectos progestacionales como la ginecomastia.

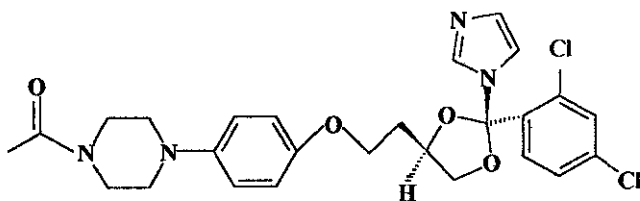
Sin embargo estudios previos han demostrado que la flutamida altera la función secretora del epidídimo y la fertilidad.⁶⁸ La flutamida está indicada como tratamiento paliativo del cáncer de próstata metastásico en combinación con agonistas de HLHL.



Flutamida XIV

KETOCONAZOL (Conazole).

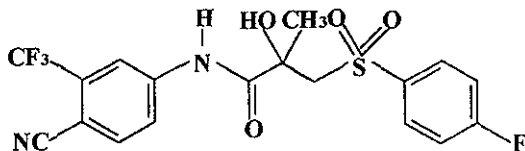
Este fármaco es el primer compuesto no esterooidal que compete con los receptores hormonales, demostrando con esto que algunos sitios de unión a ligandos de esas proteínas tienen características en común.⁶⁹ Este ha demostrado mejores resultados en comparación a la Flutamida XIV, al presentar el comportamiento característico de los antiandrógenos esteroidales, posiblemente porque la presencia de abundantes anillos aromáticos y su tamaño faciliten su interacción con el receptor.



Ketoconazol XV

BICALUTAMIDA (Casodex).

Es un antiandrógeno no esterooidal, usado en la clínica para el tratamiento de cáncer de próstata avanzado en combinación con un agonista de HLHL, este fármaco presenta menos efectos colaterales en comparación con la Flutamida XVI, sin embargo está asociado con efectos hepatotóxicos cuando se usa por periodos prolongados.



Bicalutamida XVI

3.3.1 Mecanismo de acción de los fármacos esteroideos inhibidores de la enzima 5α -reductasa.

La Testosterona (**T**) y la Dihidrotestosterona (**DHT**) son las principales hormonas androgénicas que rigen la función de la próstata, como ya se mencionó anteriormente, una de las funciones biológicas llevadas a cabo por los fármacos antiandrogénicos es la de inhibir la enzima 5α -reductasa, enzima localizada en la membrana nuclear, encargada de convertir la **T** en **DHT** (ver **Figura 3.2.**, pag.23).

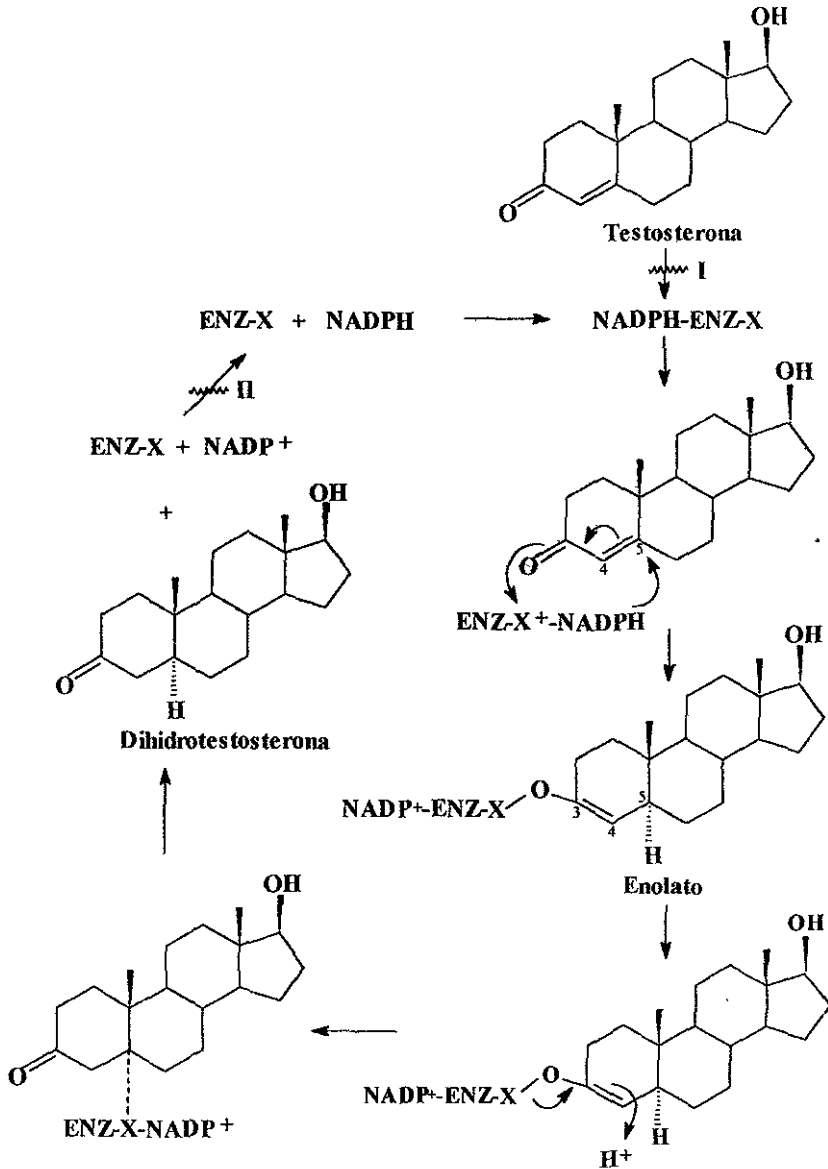
El andrógeno Dihidrotestosterona **DHT** ha sido implicado como un factor de causa en la progresión del Cáncer de próstata, debido a que éste tiene una gran afinidad por el receptor androgénico, es decir el complejo receptor-**DHT**, tiene una mayor afinidad por el sitio activo de la cromatina nuclear que el complejo receptor-**T**. Los inhibidores de esta enzima inducen solamente a un decremento en la concentración de **DHT** sin afectar los niveles de **T** directamente,⁷³ con ello se produce únicamente una disminución en el tamaño de la próstata sin presentarse efectos secundarios no deseables entre los que se incluyen la pérdida de la libido, además de una disminución en la masa muscular y en la potencia sexual, mejorando así la calidad de vida del enfermo, en contraste a la castración química o quirúrgica.

Diversos estudios bioquímicos, han demostrado que la conversión irreversible de la **T** a **DHT**, mediada por la enzima 5α -reductasa, involucra una complicada serie secuencial de etapas (ver **Figura 3.4** , pag36), en donde inicialmente el cofactor NADPH se une a la enzima 5α -

reductasa formando un complejo 5α -reductasa-NADPH, al cual se une la T, realizándose la transferencia estereoespecífica de un hidruro del NADPH a la posición 5 de la T, reduciendo el doble enlace en C4-C5 y produciendo el enolato en C3-C4, este presumiblemente puede estabilizarse mediante algún residuo electrofílico (E^+), en el sitio activo para llevarse a cabo la formación del complejo 5α -reductasa-NADP⁺- 5α -DHT posteriormente la liberación de DHT del complejo se produce por el tautomerismo mediado por la enzima y por último, la regeneración de dicha enzima se logra mediante la generación de otro ciclo catalítico con la subsecuente liberación de NADP⁺.⁷⁴

Con base en este mecanismo de acción enzimática se piensa que hay dos diferentes tipos de inhibidores reversibles de la enzima 5α -reductasa. En primer lugar tenemos a los inhibidores tipo I, dentro de los que se encuentran sustratos análogos a la T, los cuales compiten con ella inhibiendo su unión al complejo 5α -reductasa-NADPH, el prototipo de este tipo de sustrato lo constituye Proscar. El grupo de fármacos inhibidores tipo II lo constituyen fármacos análogos a DHT, los cuales se unen al complejo 5α -reductasa-NADP⁺, después de que la DHT ha sido liberada, bloqueando así la liberación del complejo, lo cual ocasiona que la enzima no pueda entrar a otro ciclo catalítico.

Figura 3.4. Mecanismo de acción de los inhibidores de la enzima 5 α -reductasa.



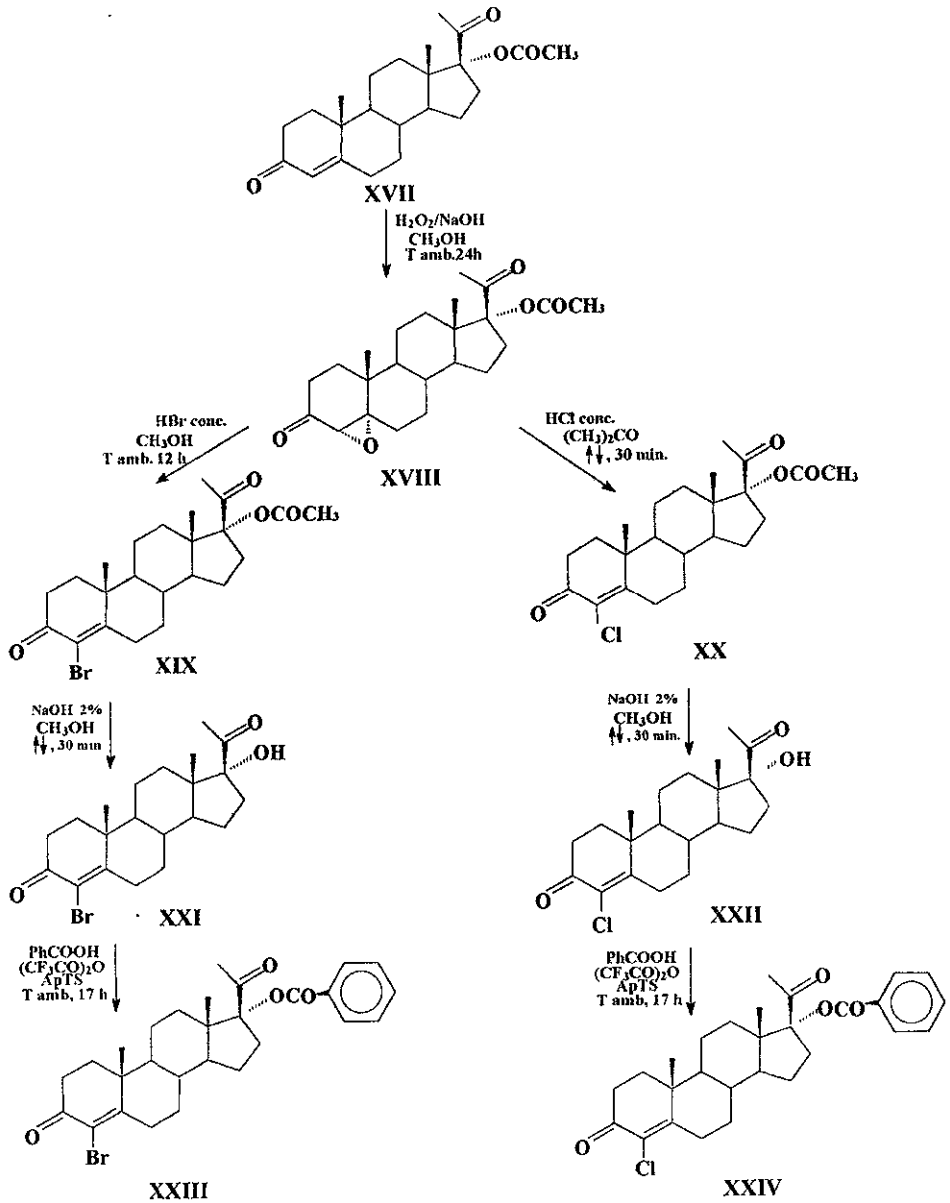
Desarrollo Experimental

4

La parte experimental del presente trabajo se desarrolló en dos fases, una es la parte química, en donde se llevó a cabo la secuencia sintética hasta los compuestos de interés, además de la caracterización física y espectroscópica tanto de los intermediarios así como de los compuestos finales (ver **Figura 4.1**, pag.38). Por otro lado la segunda parte del trabajo fue la evaluación farmacológica, en donde se realizó el estudio de la actividad antiandrogénica de los compuestos de interés así como de sus intermediarios, tomando como parámetro de evaluación la capacidad de provocar un efecto sobre el diámetro de pigmentación de los Flank Organs y sobre el peso de las Vesículas Seminales, determinando así indirectamente la actividad de inhibición de la enzima 5 α -reductasa, en sus dos isoformas I y II.

Los puntos de fusión de los compuestos obtenidos se determinaron en un aparato Fisher-Jones y no están corregidos. La pureza de los productos y el curso de las reacciones se siguió por Cromatografía en Capa Fina (CCF), utilizando como soporte o fase adsorbente: gel de sílice 60 F254, Merck y utilizando como revelador una solución de CoCl₂

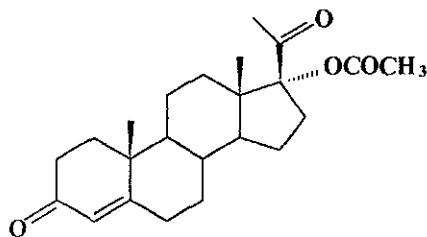
Figura 4.1. Ruta General de Síntesis



al 1% en H₂SO₄ 2N y/o lámpara de UV ($\lambda = 254\text{nm}$). Los productos finales se purificaron por Cromatografía en Columna (CC), utilizando como fase adsorbente gel de sílice 60, Merck y una mezcla de elución adecuada para cada caso.

Los equipos empleados en los diversos estudios fueron los siguientes: Para la técnica de Espectrofotometría de Absorción al Ultravioleta (UV) se empleó un equipo Perkin Elmer 200s. En cuanto a la Espectrofotometría de Absorción Infrarrojo (IR) se utilizó un equipo Perkin Elmer 549B, utilizando la técnica de película. Para la técnica Espectroscópica de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN ¹H) y de Carbono (RMN ¹³C) se utilizaron equipos Varian, Gemini 200 y VRX-300s, utilizando CDCl₃ como disolvente; los desplazamientos químicos están dados en ppm y están referidos al TMS o DMSO como estándar interno. Finalmente en la espectroscopía de Masas (EM) se empleó un espectrómetro de masas HP 5985-B CG/MS, utilizando la técnica de ionización (Impacto Electrónico, IE).

4.1. METODOLOGÍA Y RESULTADOS DE LA PARTE QUÍMICA.



XVII

17 α -Acetoxi-4-pregnen-3,20-diona XVII.
Punto de fusión: 246-248°C

Fórmula Molecular: C₂₃H₃₂O₄
Peso Molecular: 372 uma

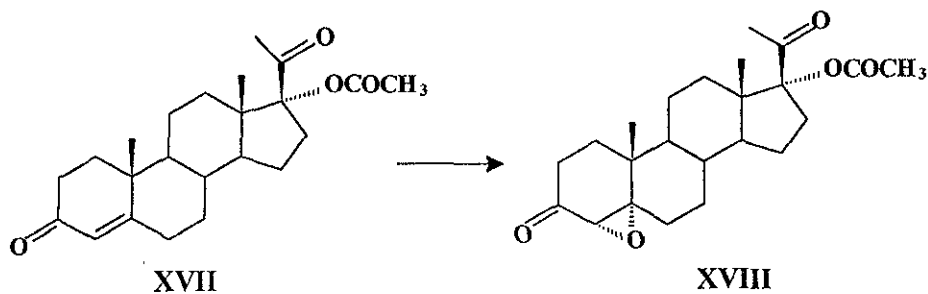
Tabla 1. Datos espectroscópicos para el compuesto XVII.

VALOR ESPECTROSCÓPICO	ASIGNACIÓN
UV λ max = 239 nm	<u>CO</u> α,β insaturado en C-3
IR (cm ⁻¹)	
1657.92 (s)	<u>CO</u> α,β insaturado en C-3
1718.34 (s)	<u>CO</u> éster en C-17
1732.34 (s)	<u>CO</u> β ceto - éster
1257.26 (m) y 1230.74 (m)	<u>COC</u> de CH ₃ COO- en C-17
1615.65 (m)	<u>CC</u> sp ² conjugado en C-4
2948.14 (s)	<u>-CH</u> sp ³
1372.00 (w)	<u>-CH₃</u>
1439.73 (m)	<u>-CH₃-CO</u>
RMN ¹ H (ppm)	
0.681 (3H)	<u>-CH₃</u> en C-18
1.197 (3H)	<u>-CH₃</u> en C-19
2.048 (3H)	<u>-CH₃-CO</u> en C-21
2.116 (3H)	<u>CH₃COO-</u> en C-17
5.760 (1H)	C= <u>CH</u> en C-4

RMN ¹³ C (ppm)	
14.345	-CH ₃ en 18
17.352	-CH ₃ en 19
21.201	-CH ₃ -CO en 21
170.661	CH ₃ COO- en C-17
123.938	C=CH en C-4
203.980	CO en C-3
199.343	CO en C-20
EMIE (m/z)	FRAGMENTACIÓN
372	M
354	M-H ₂ O
330	M-CH ₂ =C=O
312	M-HOCOCH ₃ ó 330-H ₂ O
287	330-CH ₃ C=O
269	287-H ₂ O (100% AR)
251	269-H ₂ O
251	279-C=O

4.1.1. Síntesis de 17 α -Acetoxi-4 α ,5 α -epoxi-pregnan-3,20-diona

XVIII.^{75,76}



En un matraz de bola de 100mL se disolvió 1g (2.57 mmoles) de **XVII** en 30 mL de metanol caliente, después se agregó hidróxido de sodio al 10% (0.7 mL, 1.75 mmoles) y peróxido de hidrógeno al 30% (1.4 mL, 14.6 mmoles). La mezcla de reacción resultante se mantuvo en agitación constante y a temperatura ambiente durante 24 h, siguiendo el avance de la reacción por CCF y una vez terminada la reacción, se eliminó el exceso de la mezcla de reacción dando lugar al compuesto **XVIII** el cual precipitó en forma de cristales blancos, los cuales se lavaron con suficiente agua destilada hasta un pH neutro. Finalmente el producto se dejó secar al vacío, obteniendo 0.9987g (98%) de **XVIII**, con un punto de fusión de 192-194°C.

17 α -Acetoxi-4 α ,5 α -epoxi-pregnan-3,20-diona XVIII.




Punto de Fusión: 192-194°C

Fórmula Molecular: C₂₃H₃₂O₅

Peso Molecular: 388 uma.

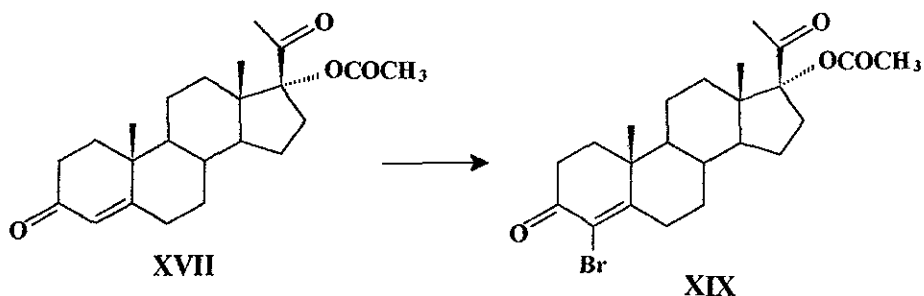
Tabla 2. Datos espectroscópicos para el compuesto XVIII.

VALOR ESPECTROSCÓPICO	ASIGNACIÓN
UV λ max = No absorbe	
IR (cm ⁻¹)	
1722.51 (s)	<u>CO</u> en C-3
1712.06 (s)	<u>CO</u> éster en C-17

1730.07 (s)	<u>CO</u> β ceto – éster
1252.86 (m)	<u>COC</u> de CH ₃ COO- en C-17
2948.17 (m)	- <u>CH</u> base de epóxido
1263.62 (m) y 863.01 (w)	 En C-4α-C5α
1372.00 (w)	- <u>CH₃</u>
1446.88 (w)	- <u>CH₃</u> -CO
863.01 (w)	- <u>CH₂</u> -
RMN ¹H (ppm)	
0.654 (3H)	- <u>CH₃</u> en C-18
1.160 (3H)	- <u>CH₃</u> en C-19
2.042 (3H)	- <u>CH₃</u> -CO en C-21
2.142 (3H)	<u>CH₃</u> COO- en C-17
3.016 (1H)	 En <u>CH</u> -4α
RMN ¹³C (ppm)	
14.417	- <u>CH₃</u> en 18
16.453	- <u>CH₃</u> en 19
18.869	- <u>CH₃</u> -CO en 21
170.721	CH ₃ <u>COO</u> - en C-17
60.302 y 45.505	 de C-4α y C5α
203.982	<u>CO</u> en C-3
206.941	<u>CO</u> en C-20
EMIE (m/z)	
388	M
370	M-H ₂ O
328	M-HOCOCH ₃ ó 370- CH ₂ =C=O

345	M-CH ₃ C=O
313	328-CH ₃
285	313-C=O (100% AR)
267	285-H ₂ O
257	285-C=O

4.1.2 Síntesis de 4-Bromo-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona XIX.⁷⁷



En un matraz de bola de 100mL, se disolvió 1g (2.6 mmoles) de XVIII en 30mL de metanol caliente, posteriormente se agregó 15mL de ácido bromhídrico concentrado manteniendo la mezcla de reacción en agitación constante durante 12h a temperatura ambiente, siguiendo el curso de la reacción por CCF, transcurrido el tiempo de reacción, la mezcla se vertió en un vaso de precipitados de 250mL que contenía 100mL de H₂O y hielo, para favorecer la precipitación del compuesto bromado en forma de un sólido amarillo, posteriormente se neutralizó la reacción con NaHCO₃, filtrándose al vacío a través de papel filtro, se lavó dicho filtrado con agua destilada y por último se dejó secar al vacío obteniéndose 0.9800g (98%) de XIX. El producto crudo se

recristalizó en metanol obteniéndose un rendimiento del 70% en forma de cristales blancos, con un punto de fusión de 195-196°C.

4-Bromo-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona XIX

Punto de Fusión: 195-196°C

Fórmula Molecular: C₂₃H₃₁O₄Br

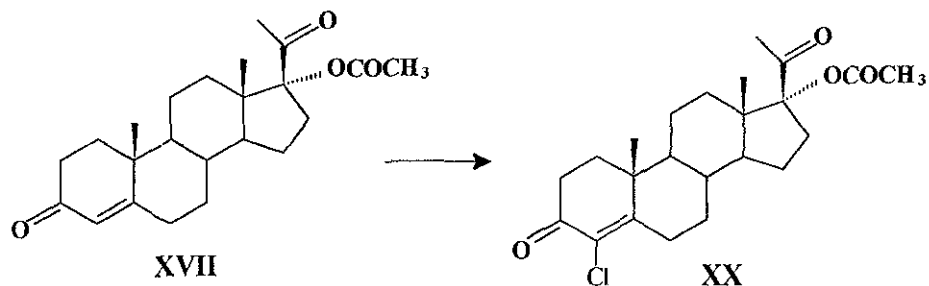
Peso Molecular: 452 uma.

Tabla 3. Datos espectroscópicos para el compuesto XIX.

VALOR ESPECTROSCÓPICO	ASIGNACIÓN
UV λ max = 260 nm	<u>CO</u> α,β insaturado en C-3
IR (cm ⁻¹)	
1671.04 (s)	<u>CO</u> en C-3
1710.30 (s)	<u>CO</u> éster en C-17
1736.00 (s)	<u>CO</u> β ceto - éster en C-20
1249.79 (s)	<u>COC</u> de CH ₃ COO- en C-17
1574.33 (w)	<u>CC</u> sp ² conjugado en C-4
2932.48 (m)	<u>-CH</u> sp ³
1367.26 (m)	<u>-CH₃</u>
1456.37 (w)	<u>-CH₃-CO</u>
614.78 (w)	<u>-C-Br</u>
RMN ¹ H (ppm)	
0.684 (3H)	<u>-CH₃</u> en C-18
1.247 (3H)	<u>-CH₃</u> en C-19
2.050 (3H)	<u>-CH₃-CO</u> en C-21

2.114 (3H)	CH ₃ COO- en C-17
/	C=CBr en C-4
RMN ¹³C (ppm)	
14.363	-CH ₃ en 18
17.837	-CH ₃ en 19
21.198	-CH ₃ -CO en 21
170.633	CH ₃ COO- en C-17
121.962	C=CBr en C-4
203.936	CO en C-3
190.562	CO en C-20
EMIE (m/z)	FRAGMENTACIÓN
450	M
452	M+2
407/409	M-CH ₃ C=O
390/392	407-OH
375/377	390-CH ₃
347/349	390-CH ₃ C=O (100% AR)
267	347-HBr
291/293	365-CH ₂ COOCH ₃

4.1.3 Síntesis de 4-Cloro-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona XX.⁷⁷



En un matraz de bola de 100mL, se disolvió 1g (2.6 mmoles) de XVIII en 50mL de acetona, posteriormente se agregó 1mL de ácido clorhídrico concentrado, la mezcla resultante se calentó a reflujo durante 30min, manteniendo una agitación constante, el curso de la reacción fue seguido por CCF, transcurrido el tiempo de reacción, se evaporó el disolvente y la mezcla resultante se vertió en un vaso de precipitados de 250mL que contenía 100mL de H₂O y hielo, para favorecer la precipitación del compuesto clorado en forma de un sólido blanco, posteriormente se neutralizó la reacción con NaHCO₃, filtrándose al vacío a través de papel filtro, se lavó dicho filtrado con agua destilada y por último se dejó secar al vacío obteniéndose 0.9900g (99%) de XX. El producto crudo se recristalizó en metanol obteniéndose un rendimiento del 78% en forma de cristales blancos, con un punto de fusión de 180-182°C.

4-Cloro-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona XX

Punto de Fusión: 180-182°C

Fórmula Molecular: C₂₃H₃₁O₄Cl

Peso Molecular: 406 uma.

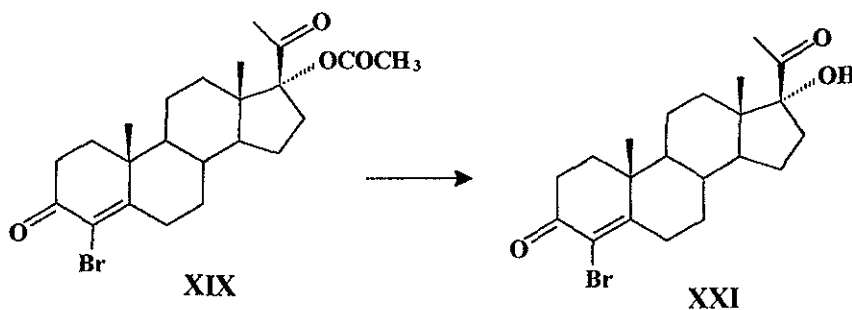
Tabla 4. Datos espectroscópicos para el compuesto XX.

VALOR ESPECTROSCÓPICO	ASIGNACIÓN
UV λ max = 253 nm	<u>CO</u> α,β insaturado en C-3

IR (cm⁻¹)	
1689.70 (s)	<u>CO</u> en C-3
1714.65 (s)	<u>CO</u> éster en C-17
1732.12 (s)	<u>CO</u> β ceto – éster en C-20
1250.99 (s)	<u>COC</u> de CH ₃ COO- en C-17
1582.02 (m)	<u>CC</u> sp ² conjugado en C-4
2950.24 (m)	<u>-CH</u> sp ³
1369.73 (m)	<u>-CH₃</u>
1438.23 (w)	<u>-CH₃-CO</u>
615.37 (w)	<u>-C-Cl</u>
RMN ¹H (ppm)	
0.684 (3H)	<u>-CH₃</u> en C-18
1.245 (3H)	<u>-CH₃</u> en C-19
2.050 (3H)	<u>-CH₃-CO</u> en C-21
2.114 (3H)	<u>CH₃COO-</u> en C-17
/	<u>C=CCl</u> en C-4
RMN ¹³C (ppm)	
14.344	<u>-CH₃</u> en 18
17.727	<u>-CH₃</u> en 19
21.183	<u>-CH₃-CO</u> en 21
170.633	<u>CH₃COO-</u> en C-17
127.368	<u>C=CCl</u> en C-4
203.968	<u>CO</u> en C-3
211.510	<u>CO</u> en C-20
EMIE (m/z)	FRAGMENTACIÓN
406	M

364	M-CH ₂ =C=O
346	364-H ₂ O ó M-HOCOCH ₃
331	346-CH ₃
303	331-C=O (100% AR)
285	303-H ₂ O
267	303-HCl

4.1.4 Síntesis de 4-Bromo-17 α -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona XXI.⁷⁸



En un matraz de bola de 250mL, se disolvió 1g (2.2 mmoles) de **XIX** en 100mL de metanol, posteriormente se agregó 25mL de hidróxido de sodio al 2% (12.5 mmoles), la mezcla resultante se calentó a reflujo durante 30min, manteniendo una agitación constante, el curso de la reacción fue seguido por CCF, transcurrido el tiempo de reacción, se evaporó el disolvente y la mezcla resultante se vertió en un embudo de separación que contenía agua destilada y hielo. Posteriormente la fase acuosa se extrajo 3 veces con cloroformo y las fases orgánicas resultantes se juntaron y lavaron con agua hasta tener un pH neutro. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro (Na₂SO₄ anh) y

posteriormente se evaporó el disolvente a presión reducida, dejando un producto semi-oleoso, el cual fue purificado por CC obteniéndose el producto deseado 0.7123g, (71%) XXI, en forma de un sólido blanco, con un punto de fusión de 204-206°C.

4-Bromo-17 α -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona XXI

Punto de Fusión: 204-206°C

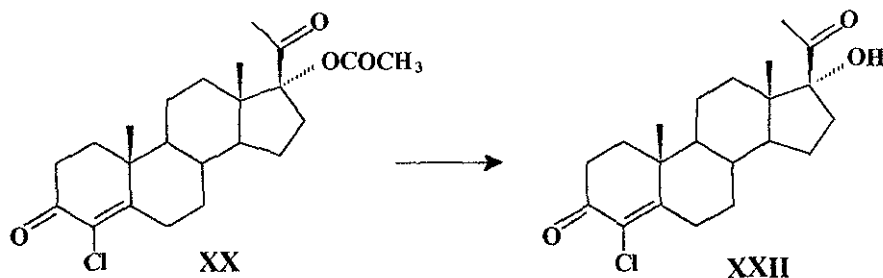
Fórmula Molecular: C₂₁H₂₉O₃Br

Peso Molecular: 408 uma.

Tabla 5. Datos espectroscópicos para el compuesto XXI.

VALOR ESPECTROSCÓPICO	ASIGNACIÓN
UV λ max = 259 nm	<u>CO</u> α,β insaturado en C-3
IR (cm ⁻¹)	
1657.97 (s)	<u>CO</u> α,β insaturado en C-3
1709.53 (s)	<u>CO</u> en C-20
3400.07 (m)	- <u>OH</u> α (3°) en C-17
1202.76 (m)	- <u>OH</u> α (3°) en C-17
1118.58 (m)	<u>C-O</u> del alcohol en C-17
1601.51 (w)	<u>CC</u> sp ² conjugado en C-4
2967.61 (m)	- <u>CH</u> sp ³
1385.31 (m)	- <u>CH₃</u>
1436.33 (w)	- <u>CH₃-CO</u>
597.64 (w)	- <u>C-Br</u>

RMN ¹H (ppm)	
0.745 (3H)	-CH ₃ en C-18
1.173 (3H)	-CH ₃ en C-19
2.231 (3H)	-CH ₃ -CO en C-21
3.573 (1H)	HO- en C-17
/	C=CBr en C-4
RMN ¹³C (ppm)	
15.440	-CH ₃ en 18
17.488	-CH ₃ en 19
20.439	-CH ₃ -CO en 21
89.760	HO- en C-17
123.957	C=CBr en C-4
211.650	CO en C-3
199.536	CO en C-20
EMIE (m/z)	FRAGMENTACIÓN
408	M
360	388-C=O (100 % AR)
342	360-H ₂ O
327	342-CH ₃
317	360-CH ₃ C=O
299	317-H ₂ O
285	317-CH ₂ OH ó -OCH ₃
267	285-H ₂ O
249	267-H ₂ O

4.1.5 Síntesis de 4-Cloro-17 α -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona XXII.⁷⁸

En un matraz de bola de 250mL, se disolvió 1g (2.4 mmoles) de XX en 100mL de metanol, posteriormente se agregó 50mL de hidróxido de sodio al 2% (25 mmoles), la mezcla resultante se calentó a reflujo durante 30min, manteniendo una agitación constante, el curso de la reacción fue seguido por CCF, transcurrido el tiempo de reacción, se evaporó el disolvente y la mezcla resultante se vertió en un embudo de separación que contenía agua destilada y hielo. Posteriormente la fase acuosa se extrajo 3 veces con cloroformo y las fases orgánicas resultantes se juntaron y lavaron con agua hasta tener un pH neutro. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro (Na_2SO_4 anh) y posteriormente se evaporó el disolvente a presión reducida, dejando un producto semi-oleoso, el cual se purificó por CC obteniéndose 0.6823g (68%) de XXII, en forma de un sólido blanco, con un punto de fusión de 203-204°C.

4-Cloro-17 α -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona XXII

Punto de Fusión: 203-204°C

Fórmula Molecular: C₂₁H₂₉O₃Cl

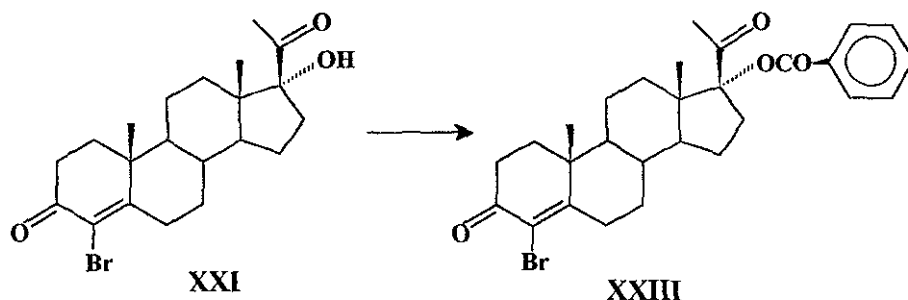
Peso Molecular: 364 uma.

Tabla 6. Datos espectroscópicos para el compuesto XXI.

VALOR ESPECTROSCÓPICO	ASIGNACIÓN
UV λ max = 253 nm	<u>CO</u> α,β insaturado en C-3
IR (cm ⁻¹)	
1658.80 (s)	<u>CO</u> α,β insaturado en C-3
1709.28 (s)	<u>CO</u> en C-20
3402.76 (m)	- <u>OH</u> α (3°) en C-17
1203.41 (m)	- <u>OH</u> α (3°) en C-17
1154.52 (m)	<u>C-O</u> del alcohol en C-17
1602.14 (m)	<u>CC</u> sp ² conjugado en C-4
2967.14 (s)	- <u>CH</u> sp ³
1383.68 (m)	- <u>CH₃</u>
1437.30 (m)	- <u>CH₃</u> -CO en C-21
599.51 (w)	- <u>C-Cl</u>
RMN ¹ H (ppm)	
0.738 (3H)	- <u>CH₃</u> en C-18
1.166 (3H)	- <u>CH₃</u> en C-19
2.256 (3H)	- <u>CH₃</u> -CO en C-21
3.566 (1H)	<u>HO</u> - en C-17
/	<u>C=CCl</u> en C-4

RMN ^{13}C (ppm)	
15.448	- <u>CH₃</u> en 18
17.488	- <u>CH₃</u> en 19
20.439	- <u>CH₃</u> -CO en 21
89.760	<u>HO</u> - en C-17
123.957 CCC	C= <u>CCl</u> en C-4
211.650	<u>CO</u> en C-3
194.097	<u>CO</u> en C-20

4.1.6 Síntesis de 4-Bromo-17 α -benzoiloxi-4-pregnen-3,20-diona XXIII.⁷⁹



En un matraz de bola de 15mL se disolvieron 50mg (2.5 mmoles) de **XXI**, en 5mL de cloroformo en condiciones anhidras y con agitación constante, posteriormente se adicionó 0.6g (4.9 mmoles) de ácido benzoico seco, dicha mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 5 min, transcurrido el tiempo de agitación se adicionó 10mg (0.0057 mmoles) de ácido p-toluensulfónico seco, agitándose hasta la disolución completa del mismo y por último se adicionó 0.2mL (2.7 mmoles) de ácido trifluoroacético, formándose el anhídrido mixto *in situ*. Dicha mezcla se agitó a temperatura ambiente durante 17h manteniendo condiciones

anhidras, con una trampa de humedad. El curso de la reacción se siguió por CCF. Una vez consumida toda la materia prima, la mezcla de reacción se vertió a un vaso de precipitados que contenía hielo, disolviendo el residuo de la reacción en CHCl₃ (25mL) y manteniendo en agitación constante se neutralizó con NaHCO₃ hasta que el pH de la fase acuosa fue neutro. Se separó por decantación la fase orgánica, secándola posteriormente con Na₂SO₄ anh y evaporando el disolvente a presión reducida, obteniéndose un producto oleoso el cual se purificó por CC produciendo 30.0mg (60%) de XXIII puro, en forma de cristales amorfos de color amarillo con un punto de fusión de 225-228°C.

4-Bromo-17 α -benzoiloxi-4-pregnen-3,20-diona XXIII

Punto de Fusión: 225-228°C

Fórmula Molecular: C₂₈H₃₃O₄Br

Peso Molecular: 511 uma.

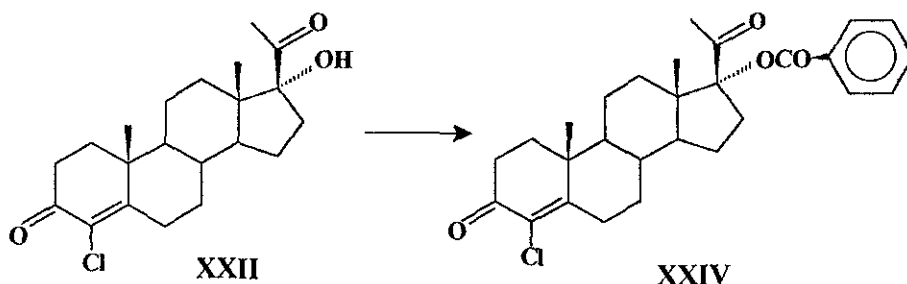
Tabla 7. Datos espectroscópicos para el compuesto XXIII.

VALOR ESPECTROSCÓPICO	ASIGNACIÓN
UV λ max = 253 nm	<u>CO</u> α,β insaturado en C-3
IR (cm ⁻¹)	
1669.91 (m)	<u>CO</u> α,β insaturado en C-3
1702.36 (s)	<u>CO</u> en C-20
1718.47 (s)	C ₆ H ₅ - <u>CO</u> éster en C-17

1250.13 (m)	<u>-COC</u> en C-17
1171.00 (s)	<u>C-O</u> en C-17
1778.41 (w)	<u>COO-</u> del éster en C-17
1615.65 (m)	<u>CC</u> sp ² conjugado en C-4
2932.94 (m)	<u>-CH</u> sp ³
1374.00 (m)	<u>-CH₃</u>
1451.28 (m)	<u>-CH₃-CO</u>
613.31 (w)	<u>-C-Br</u>
755.81 (m)	Monosustitución en aromático
708.36 (m)	"
RMN ¹H (ppm)	
0.776 (3H)	<u>-CH₃</u> en C-18
1.247 (3H)	<u>-CH₃</u> en C-19
2.150 (3H)	<u>-CH₃-CO</u> en C-21
8.063 (2H) y 7.499 (3H)	<u>C₆H₅COO-</u> en C-17
/	<u>C=CBr</u> en C-4
RMN ¹³C (ppm)	
14.519	<u>-CH₃</u> en 18
17.668	<u>-CH₃</u> en 19
20.729	<u>-CH₃-CO</u> en 21
170.735	<u>C₆H₅COO-</u> en C-17
128.496	<u>C=CBr</u> en C-4
203.909	<u>CO</u> en C-3
190.523	<u>CO</u> en C-20
EMIE (m/z)	FRAGMENTACIÓN
511	M

464	-C ₆ H ₅ -CH ₃
449	464-CH ₃
299	391-C ₆ H ₅ -CH ₂
105	C ₆ H ₅ C=O (100% AR)
77	105-C=O
51	77-CHCH
511	554-CH ₃ -C=O

4.1.7 Síntesis de 4-Cloro-17 α -benzoiloxi-4-pregnen-3,20-diona XXIV.⁷⁹



En un matraz de bola de 15mL se disolvieron 50mg (2.7 mmoles) de XXII, en 5mL de cloroformo en condiciones anhidras y agitación constante, posteriormente se adicionó 0.6g (4.9 mmoles) de ácido benzoico seco, dicha mezcla de reacción se mantuvo en agitación durante 5 min, transcurrido el tiempo de agitación se adicionó 10mg (0.0057 mmoles) de ácido p-toluensulfónico seco, agitándose hasta la disolución completa y por último se adicionó 0.2mL (2.7 mmoles) de ácido trifluoroacético, formándose el anhídrido mixto *in situ*. Dicha mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 17h manteniendo condiciones anhidras, con una trampa de humedad. El curso de la reacción se siguió

por CCF. Una vez consumida toda la materia prima, la mezcla de reacción se vertió a un vaso de precipitados que contenía hielo, disolviendo el residuo de la reacción en CHCl_3 (25mL) y manteniendo en agitación constante se neutralizó con NaHCO_3 hasta que el pH de la fase acuosa fue neutro. Se separó la fase orgánica, secándola posteriormente con Na_2SO_4 anh. y evaporando el disolvente a presión reducida, obteniéndose un producto oleoso el cual se purificó por CC produciendo 26.0mg (52%) de XXIV puro, en forma de cristales amorfos de color amarillo con un punto de fusión de 223-226°C.

4-Cloro-17 α -benzoiloxi-4-pregnen-3,20-diona XXIV

Punto de Fusión: 223-226°C

Fórmula Molecular: $\text{C}_{28}\text{H}_{33}\text{O}_4\text{Cl}$

Peso Molecular: 464 uma.

Tabla 8. Datos espectroscópicos para el compuesto XXIV.

VALOR ESPECTROSCÓPICO	ASIGNACIÓN
UV λ max = 251 nm	<u>CO</u> α,β insaturado en C-3
IR (cm^{-1})	
1671.00 (m)	<u>CO</u> α,β insaturado en C-3
1709.53 (s)	<u>CO</u> en C-20
1714.83 (s)	C_6H_5 - <u>CO</u> éster en C-17
1250.23 (m)	- <u>COC</u> en C-17

1171.00 (s)	<u>C-O</u> en C-17
1783.91 (w)	<u>COO-</u> del éster en C-17
1600.38 (m)	<u>CC</u> sp ² conjugado en C-4
2947.22 (m)	- <u>CH</u> sp ³
1372.48 (m)	- <u>CH₃</u>
1451.59 (m)	- <u>CH₃-CO</u>
615.20 (w)	- <u>C-Cl</u>
777.64 (w)	Monosustitución en aromático
707.86 (m)	"
RMN ¹H (ppm)	
0.817 (3H)	- <u>CH₃</u> en C-18
1.393 (3H)	- <u>CH₃</u> en C-19
2.230 (3H)	- <u>CH₃-CO</u> en C-21
8.170 (2H) y 7.533 (3H)	<u>C₆H₅COO-</u> en C-17
/	<u>C=CCl</u> en C-4
RMN ¹³C (ppm)	
14.490	- <u>CH₃</u> en 18
17.654	- <u>CH₃</u> en 19
20.700	- <u>CH₃-CO</u> en 21
170.867	<u>C₆H₅COO-</u> en C-17
128.291	<u>C=CCl</u> en C-4
203.909	<u>CO</u> en C-3
190.449	<u>CO</u> en C-20
EMIE (m/z)	
FRAGMENTACIÓN	
464	M
421	464-CH ₃ -C=O

385	421-HCl
105	C ₆ H ₅ -C=O (100% AR)
77	105-C=O
51	77-CHCH

4.2 METODOLOGÍA Y RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA.

La evaluación farmacológica consistió en determinar la actividad antiandrogénica mediante un ensayo preliminar *in vivo*, de dos nuevos compuestos, posibles inhibidores de la enzima 5 α -reductasa, y que son derivados de la Progesterona: 4-Bromo-17 α -benzoiloxi-4-pregnen-3,20-diona **XXIII** y 4-Bromo-17 α -benzoiloxi-4-pregnen-3,20-diona **XXIV**, así como sus intermediarios incluyendo la materia prima **XVII** (ver **Figura 4.1**, pag.38), estudiados como fármacos potenciales para el tratamiento de enfermedades de la próstata mediadas por el andrógeno **DHT**.

En dichos estudios llevados a cabo en la Universidad Autónoma Metropolitana de Xochimilco (Departamento de Sistemas Biológicos), por la Dra. Marisa Cabeza y cols., expertos en ensayos biológicos relacionados con nuevas moléculas inhibidoras de la enzima 5 α -reductasa, se investiga la actividad antiandrogénica, utilizando como modelos biológicos Hámsters machos adultos de la cepa Syrian Golden. En el ensayo se analizaron dos tejidos: los Flank Organs (**FO**), en los que se investigó el efecto que tienen dichos compuestos sobre el diámetro pigmentado de los mismos y por otro lado las vesículas seminales (**VS**), en las que se

observó el efecto que tienen dichos compuestos sobre el peso de las mismas. Se escogieron estos tejidos para llevar a cabo el estudio, por la capacidad que tienen de metabolizar el andrógeno Testosterona **III** a Dihidrotestosterona **IX** en animales castrados e intactos.⁸⁰

Recientes investigaciones en biología molecular indicaron que la enzima 5α -reductasa se encuentra en dos isoformas denominadas Tipo **I** y Tipo **II**, las cuales difieren en sus propiedades bioquímicas, tejido de localización y su función; es decir la isoenzima Tipo **I** se encuentra predominantemente en la piel facial y en el hígado, tiene un pH óptimo alcalino (pH=6-8.5), requiere de concentraciones elevadas de Testosterona para saturarse ($K_m=3\mu M$), además de que funciona de un modo catabólico en la remoción de los andrógenos por el hígado y la piel no genital, mientras que la isoenzima Tipo **II**, tiene un pH óptimo ácido (pH=5) y requiere de concentraciones bajas de Testosterona para saturarse ($K_m=0.5\mu M$), se encuentra presente predominantemente en la próstata y testículos, además de estar directamente relacionada al Cáncer de Próstata y a la **HPB**, esta isoenzima funciona de manera anabólica en la expresión de los andrógenos por la conversión efectiva de la Testosterona a su metabolito reducido Dihidrotestosterona.

Por las características antes mencionadas de cada isoforma y por estudios previos llevados a cabo por Bratoeff. E. y cols.⁸¹ que indican que hay una relación inversa en la actividad de las dos isoenzimas frente a un mismo tipo de inhibidor, en donde mientras un compuesto resulta ser poco activo sobre la isoenzima Tipo **I**, frente a la isoenzima Tipo **II** resulta ser extremadamente activo. De acuerdo a lo anterior

resulta indispensable llevar a cabo el ensayo de actividad farmacológica sobre los dos tipos de isoformas que existen de esta enzima denominados Tipo I y Tipo II.

4.2.1. CONDICIONES DE EVALUACIÓN

Para el estudio se utilizaron Hámsters machos adultos (150-200g) de la cepa Syrian Golden, fueron proporcionados por la Universidad Metropolitana de Xochimilco. Los animales se mantuvieron a una temperatura controlada de 22°C y a periodos luz-oscuridad durante 12h.

Las gonadectomías fueron realizadas bajo una anestesia ligera con éter y sacrificados por anestesia con éter. Los Flank Organs y la vesículas seminales fueron inmediatamente extraídas, secadas y pesadas para su posterior uso durante el experimento.

4.2.2. PRUEBA DE LOS FLANK ORGANS (FO).^{82,83}

4.2.2.1 Tratamiento hormonal sobre los Flank Organs (FO).

Los animales previamente gonadectomizados, ocho días antes del estudio, se trataron de la siguiente manera: ambos FO de cada animal fueron rasurados; y se les fue administrado diariamente (FO derecho), mediante la vía tópica, 200µg de cada esteroide disuelto en 40µL de acetato de etilo utilizado como vehículo. Las aplicaciones se hicieron con micropipetas (modelo E2 100, distribuidas por Rainin Inst.).

Después de 15 días de tratamiento esteroideal, se determinó el tamaño del diámetro de cada órgano pigmentado (FO). Cada FO

izquierdo de los animales se utilizó como control, por lo que únicamente recibieron el vehículo (40µL acetato de etilo).

Tabla 9. Tratamiento Hormonal sobre los Flank Organs (FO).

GRUPO	N	ADMÓN.	COMPUESTO
1	4	/	Acetato de Etilo
2	4	T	Testosterona
3	4	T + XVII	17α-Acetoxi-4-pregnen-3,20-diona
4	4	T + XVIII	17α-Acetoxi-4α,5α-epoxi-pregnan-3,20-diona
5	4	T + XIX	4-Bromo-17α-acetoxi-4-pregnen-3,20-diona
6	4	T + XX	4-Cloro-17α-acetoxi-4-pregnen-3,20-diona
7	4	T + XXI	4-Bromo-17α-hidroxi-4-pregnen-3,20-diona
8	4	T + XXII	4-Cloro-17α-hidroxi-4-pregnen-3,20-diona
9	4	T + XXIII	4-Bromo-17α-benzoiloxi-4-pregnen-3,20-diona
10	4	T + XXIV	4-Cloro-17α-benzoiloxi-4-pregnen-3,20-diona

4.2.2.2. Resultados de la Prueba de los Flank Organs.

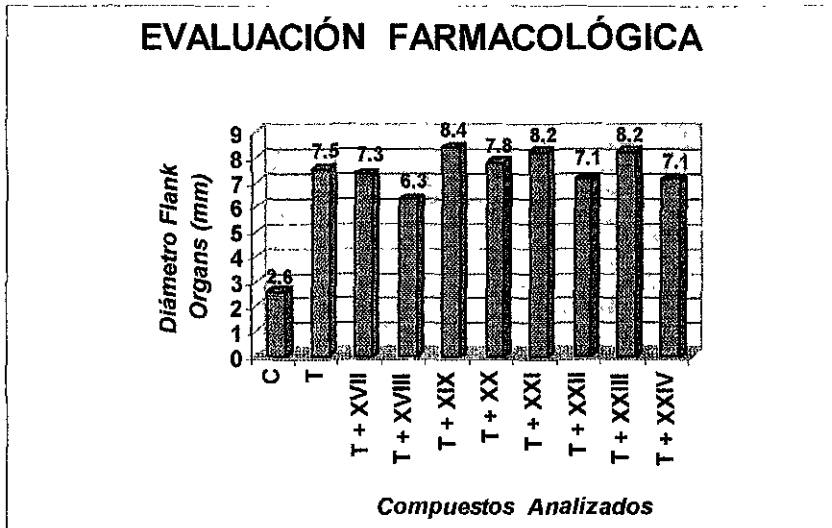
Dos experimentos independientes fueron llevados a cabo para cada grupo de animales tratados con cada uno de los compuestos sintetizados incluyendo la materia prima. Los resultados fueron analizados usando el análisis de varianza mediante software EPISTAT.

Tabla 10. Diámetro de los Flank Organs.

GRUPO	N	ADMINISTRACION	DIAMETRO (mm)
1	4	C*	2.6 ± 0.70
2	4	T	7.5 ± 1.18
3	4	T + XVII	7.3 ± 1.49
4	4	T + XVIII	6.3 ± 1.16
5	4	T + XIX	8.4 ± 1.95
6	4	T + XX	7.8 ± 1.75
7	4	T + XXI	8.2 ± 2.20
8	4	T + XXII	7.1 ± 1.10
9	4	T + XXIII	8.2 ± 0.92
10	4	T + XXIV	7.1 ± 1.28

C* Flank Organ izquierdo usado como control.

Figura 4.2. Gráfica de la evaluación farmacológica de la isoenzima 5 α -reductasa Tipo I.



4.2.3. PRUEBA DE LAS VESÍCULAS SEMINALES (VS).⁸⁴

El efecto de los esteroides sobre las vesículas seminales de los hámsters machos gonadectomizados (castrados), ocho días antes del experimento fue determinado en 4 grupos de cuatro animales por experimento, seleccionados al azar. Los animales se mantuvieron a una temperatura controlada de 22°C y a periodos de luz-oscuridad, durante 12h.

4.2.3.1. Tratamiento hormonal de las Vesículas Seminales (VS).

A cada animal se le fue aplicado mediante la administración subcutánea durante tres días consecutivos, cada uno de los compuestos sintetizados, así como la materia prima, a una dosis determinada de 200µg, aplicadas disueltas en 0.5mL de aceite de castor utilizado como vehículo.

Después del tratamiento hormonal los animales fueron sacrificados mediante la anestesia con éter, posteriormente se realizó la disección de las vesículas seminales (VS) y por último estas fueron pesadas.

Tabla 11. Tratamiento Hormonal de las Vesículas Seminales (VS).

GRUPO	N	ADMON.	COMPUESTO
1	4	T	Acetato de Etilo
2	4	T + F	Finasterida
3	4	T + XVII	17α-Acetoxi-4-pregnen-3,20-diona
4	4	T + XVIII	17α-Acetoxi-4α,5α-epoxi-pregnan-3,20-diona
5	4	T + XIX	4-Bromo-17α-acetoxi-4-pregnen-3,20-diona
6	4	T + XX	4-Cloro-17α-acetoxi-4-pregnen-3,20-diona

7	4	T + XXI	4-Bromo-17 α -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona
8	4	T + XXII	4-Cloro-17 α -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona
9	4	T + XXIII	4-Bromo-17 α -benzoiloxi-4-pregnen-3,20-diona
10	4	T + XXIV	4-Cloro-17 α -benzoiloxi-4-pregnen-3,20-diona

4.2.3.2. Resultados de la prueba de las Vesículas Seminales.

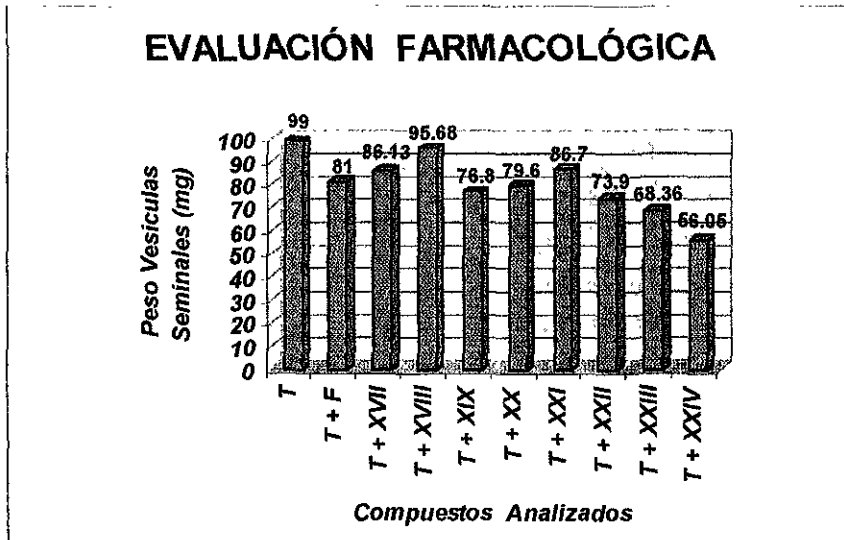
Se realizaron dos experimentos independientes para cada grupo de animales tratados con cada uno de los esteroides, incluyendo la materia prima. Se eligió un grupo como control, al que le fue aplicado mediante la administración subcutánea, el antiandrógeno más potente que se encuentra actualmente en el mercado Finasterida (Proscar) y como estándar interno se utilizó el andrógeno Testosterona (T).

Tabla 12. Peso de las Vesículas Seminales (VS).

GRUPO	N	ADMINISTRACION	PESO VESICULAS S. (mg)
1	4	T	99.00
2	4	T + F*	81.00
3	4	T + XVII	86.13
4	4	T + XVIII	95.68
5	4	T + XIX	76.80
6	4	T + XX	79.60
7	4	T + XXI	86.70
8	4	T + XXII	73.90
9	4	T + XXIII	68.36
10	4	T + XXIV	56.05

F* Finasterida usado como control.

Figura 4.2. Gráfica de la evaluación farmacológica de la isoenzima 5 α -reductasa Tipo II



Discusión de Resultados

5

5.1. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA PARTE QUÍMICA.

5.1.1. Caracterización de la materia prima 17α -Acetoxi progesterona XVII.

La preparación de los derivados esteroidales se planteó en base a la ruta de síntesis que se presenta en la **Figura 4.1.** (Cap.4, pag.38). En primer lugar se caracterizó al 17α -Acetoxi-progesterona XVII, que constituye la materia prima empleada para dicha síntesis, mediante sus propiedades físicas y espectroscópicas. Este compuesto se encuentra disponible comercialmente y está considerado como punto de partida para la síntesis parcial de la mayoría de los esteroides debido a que presenta los grupos funcionales necesarios para transformarse hasta los productos finales.

Antes de comenzar la secuencia sintética propuesta, se caracterizó la materia prima mediante la correlación de sus propiedades físicas y espectroscópicas (**Tabla 1**, pag.40), con las reportadas en la literatura.

Como puede observarse el espectro de absorción al UV (**Figura 7.1.**, pag.93) refleja la existencia de un cromóforo con una $\lambda_{max}=239\text{nm}$ correspondiente a la cetona α - β insaturada 4-en-3-ona, valor que corresponde con el esperado para este tipo de sistema $\lambda_{max\text{teo}}=240\text{ nm}$.

El espectro de IR (**Figura 7.2.**, pag 94), por su parte registra la existencia de tres señales intensas en la zona carbonílica, en 1657.92 cm^{-1} correspondiente a la cetona α - β insaturada en C-3, en 1718.34 cm^{-1} correspondiente al carbonilo del éster acetoxi en C-17 y en 1732.34cm^{-1} correspondiente al carbonilo β -ceto éster en C-20 y en la zona dactiloscóptica del espectro comprobamos la presencia del éster, debido a la presencia de dos bandas en 1257.26 cm^{-1} y 1230.74 cm^{-1} correspondientes a COC del acetoxi en C-17.

En cuanto a la RMN ^1H (**Figura 7.3.**, pag.95), se aprecian singuletes intensos en 0.681ppm y 1.197ppm que integran para tres hidrógenos cada uno, correspondientes a los metilos angulares en C-18 y C-19 respectivamente, así como dos señales en 2.048ppm y 2.116ppm que también integran para tres protones cada una, pertenecientes al metilo en C-21 y al metilo alfa al carbonilo del éster sobre C-17 respectivamente. Así como una señal simple que integra para un protón en 5.760ppm correspondiente al protón vinílico en C-4.

El análisis del espectro de RMN ^{13}C normal (**Figura 7.4.**, pag 96), muestra tres señales en la zona de los metilos en 14.345 ppm del C-18, 17.352ppm del C-19 y última señal en 21.201ppm correspondiente al

metilo alfa al carbonilo, otra señal importante en 170.661ppm correspondiente al carbonilo del éster en C-17, una señal en 123.938ppm correspondiente al carbono vinílico en C-4 y por último otras dos señales en la zona de los carbonilos en 203.980ppm y la otra en 199.343ppm correspondientes a los carbonilos cetónicos en C-3 y C-20 respectivamente.

Por último en la espectroscopía de masas, mediante el método de ionización de Impacto Electrónico EMIE (Figura 7.5., pag. 97) comprobamos que efectivamente se tiene el compuesto deseado al presentar la masa atómica de 372 una esperada además de presentar pérdidas lógicas, como se muestra en la Tabla 1.

5.1.2. Caracterización de 17 α -Acetoxi-4 α ,5 α -epoxi-pregnan-3,20-diona XVIII.

El primer paso de la ruta sintética consiste en la oxidación de la insaturación en C-4 de la materia prima, seleccionándose en este caso la epoxidación selectiva con peróxido de hidrógeno en medio básico, tal como se plantea para cetoesteroides donde se presenten dobles enlaces α - β insaturados conjugados con una cetona, reacción que se ve favorecida en nuestro caso por la conjugación con el carbonilo en C-3. La reacción transcurre cuantitativamente hacia el epóxido deseado 17 α -Acetoxi-4 α ,5 α -epoxi-pregnan-3,20-diona XVIII, se inicia con la adición nucleofílica del anión hidropéroxido sobre la doble ligadura de la cetona α - β insaturada; mediante un mecanismo tipo Michael, obteniéndose un rendimiento del 98%, resultado que se espera salvo en casos particulares donde la cara inferior se encuentra impedida estéricamente, por lo que se obtiene de manera predominante el producto

alfa, ya que la presencia de sustituyentes axiales sobre C-19 dificulta marcadamente la aproximación por la cara superior. El compuesto deseado se identificó como tal mediante la correlación de sus datos físicos y espectroscópicos (Tabla 2, pag.42). El espectro de UV (Figura 7.6., pag.98) del compuesto en cuestión no presenta absorción debido a la desaparición del cromóforo de la cetona α - β insaturada.

El espectro de IR (Figura 7.7., pag.99), presenta tres bandas de intensidad fuerte correspondiente a los tres carbonilos presentes en la molécula, en 1730.07cm^{-1} correspondiente al CO β ceto éster en C-20, en 1722.51cm^{-1} y 1712.06cm^{-1} correspondientes a las frecuencias de absorción de los carbonilos en C-3 y el carbonilo del éster en C-17 respectivamente, la presencia del epóxido queda comprobada por la presencia de las bandas de absorción siguientes, una de intensidad media en 1263.62cm^{-1} y en 863.01cm^{-1} de intensidad débil, además del CH base del epóxido en 2948.17cm^{-1} .

El análisis del espectro de RMN¹H (Figura 7.8., pag.100), indica la desaparición de la señal en 5.76ppm correspondiente al protón vinílico en C-4 y la aparición de una señal simple en 3.016ppm que integra para un protón, base del epóxido en ese mismo carbono. Las señales simples en 0.654 y 1.16 ppm que integran para tres protones cada una, correspondientes a los metilos angulares en C-18 y C-19, además de una señal simple en 2.042ppm, que integra para tres protones, correspondiente al metilo alfa al carbonilo en C-21 y por último una señal simple que integra para tres protones en 2.142 ppm que corresponde al metilo del éster en C-17.

Referente al análisis de RMN¹³C (Figura 7.9., pag.101) indica señales en 14.417 y 16.453 ppm, correspondientes a los carbonos en C-18

y C-19 respectivamente, además de una señal en 18.869 ppm referente al metilo alfa al carbonilo en C-21, otra señal importante en 170.721 ppm correspondiente al carbonilo del éster en C-17, otros dos carbonilos en 203.982 y 206.941 ppm correspondientes a los carbonilos en C-20 y C-3 y por último dos señales en 60.302 y 45.505 ppm correspondiente a los carbonos base del epóxido.

Respecto a la EMIE (Figura 7.10., pag.102), se observa un ión molecular de 388 que coincide con el peso molecular del compuesto en cuestión.

5.1.3. Caracterización de los compuestos 4-Bromo-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona XIX y de 4-Cloro-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona XX.

En vista de que uno de los objetivos de la secuencia sintética propuesta consistió en la inserción de los halógenos, bromo y cloro en la posición C-4 sobre el compuesto XVIII y aprovechando el hecho de que este compuesto presenta una doble ligadura conjugada con una cetona, la cual se epoxidó para su posterior halogenación fue posible la obtención de ambos derivados halogenados. Dicha halogenación se llevó a cabo, mediante la apertura del epóxido catalizada por ácidos, y la posterior adición nucleofílica anti de los halógenos Br⁻ y Cl⁻, formando así los intermediarios bromhidrina y clorhidrina correspondientes, que en medio ácido sufren deshidratación para formar los derivados halogenados. Los derivados halogenados XIX y XX fueron identificados por sus propiedades físicas y espectroscópicas, presentados en las Tablas 3 y 4 de las páginas 45 y 47, respectivamente.

El espectro de UV (Figura 7.11., pag.103) del compuesto **4-Bromo-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona XIX**, presentó la regeneración del cromóforo de la cetona α, β insaturada con un máximo de absorbancia en 260nm.

El espectro de IR (Figura 7.12., pag.104), indica la presencia de tres carbonilos al presentar tres bandas de absorción intensas, una en 1736.00cm^{-1} que se asignó al carbonilo en C-20 (β ceto éster), en 1710.30cm^{-1} correspondiente al carbonilo del éster en C-17 y por último en 1671.04cm^{-1} que se asignó al carbonilo en C-3, en vista de que se llevó a cabo la apertura del epóxido para la formación del derivado bromado en C-4, queda confirmada por la ausencia de la señal de intensidad media en 1263.62cm^{-1} perteneciente al epóxido y por otro lado la aparición de una señal en 614.78cm^{-1} que corresponde a la unión C-Br en C-4.

El análisis del espectro de RMN^1H (Figura 7.13., pag.105), indica la desaparición de la señal simple en 3.016ppm correspondiente al protón base del epóxido en C-4, además indica la presencia de señales simples que integran para tres protones cada una en 0.684ppm y en 1.247ppm correspondientes a los metilos angulares en C-18 y C-19 respectivamente, una señal en 2.050ppm que se asignó al metilo alfa al carbonilo en C-20 así como una señal en 2.114ppm correspondiente al metilo alfa al carbonilo del éster en C-17.

El análisis de RMN^{13}C (Figura 7.14., pag.106), indica la desaparición de los carbonos base del epóxido en 60.302 y 45.505 ppm, la presencia del metilo alfa al carbonilo de C-20 en 21.198ppm, en 190.562 ppm el mismo, en 170.633ppm la presencia del carbonilo del éster en C-17, en 203.936 ppm la presencia del carbonilo en C-3 y muy

importantemente la presencia del carbono sp^2 en 121.962ppm correspondiente al carbono en 4 que soporta al bromo.

Por último en el análisis de la espectroscopía de masas EMIE (Figura 7.15., pag.107) se pudo confirmar la estructura del compuesto deseado ya que se obtuvo una masa molecular de 450 uma, además de presentar el ión molecular una contribución isotópica al M+2 en 452 uma con una abundancia relativa de casi el 100%, lo cual confirma la presencia de un átomo de bromo en la molécula.

El espectro de UV (Figura 7.16., pag.108) del compuesto **4-Cloro-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona XX**, indica la aparición del cromóforo de la cetona α, β insaturada con una absorción máxima en 253nm.

En cuanto al análisis de IR (Figura 7.17., pag.109), se puede apreciar en la zona de los carbonilos, tres bandas de absorción intensas, una en 1732.12 cm^{-1} que se asignó al carbonilo en C-20 (β ceto éster), en 1714.65 cm^{-1} correspondiente al carbonilo del éster en C-17 y por último en 1689.70 cm^{-1} que se asignó al carbonilo en C-3 α, β insaturado, se confirmó la reacción de halogenación por la ausencia de la señal de intensidad media en 1263.62 cm^{-1} perteneciente al epóxido y por otro lado la aparición de una señal en 615.37 cm^{-1} correspondiente al enlace C-Cl en C-4

El análisis del espectro de RMN^1H (Figura 7.18., pag.110), indica la desaparición de la señal simple en 3.016 ppm correspondiente al protón base del epóxido en C-4; además de las señales simples que integran para tres protones cada una en 0.684 ppm y en 1.245 ppm correspondientes a los metilos angulares en C-18 y C-19 respectivamente, una señal simple en 2.050 ppm que se asignó al metilo alfa al

carbonilo en C-20 así como una señal en 2.114 ppm correspondiente al metilo alfa al carbonilo del éster en C-17.

El análisis de RMN¹³C (Figura 7.19., pag.111), indica la desaparición de los carbonos base del epóxido en 60.302 y 45.505 ppm, la presencia del metilo alfa al carbonilo de C-20 en 21.183 ppm, en 203.968 ppm correspondiente al mismo carbonilo, en 170.633 ppm la presencia del carbonilo del éster en C-17, en 211.510 ppm el carbonilo en C-3 y muy importante la presencia del carbono sp² en 127.368 ppm correspondiente al carbono en la posición 4 unido al átomo de cloro.

Por último en el análisis de la espectroscopía de masas EMIE (Figura 7.20., pag.112) se confirmó la estructura del compuesto deseado ya que se obtuvo una masa molecular de 406 uma, además de presentar el ión molecular una contribución isotópica al M+2 y una relación en abundancia relativa de 70:30 % aproximadamente, lo cual confirma la presencia de un átomo de cloro en la molécula.

5.1.4. Caracterización de los compuestos 4-Bromo-17 α -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona XXI y de 4-Cloro-17 α -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona XXII.

El siguiente paso de la ruta sintética propuesta consistió en la hidrólisis alcalina del éster acetoxi en la posición C-17, para su posterior esterificación con ácido benzoico. Dicha hidrólisis se llevó a cabo mediante el ataque fuertemente nucleofílico del grupo hidroxilo sobre el carbonilo, desplazando al ión alcóxido y formando así los intermediarios hidroxilados correspondientes.

Dichos compuestos hidróxilados **XXI** y **XXII** fueron caracterizados por sus propiedades físicas y espectroscópicas y cuyos resultados fueron presentados en las Tablas 5 y 6 de las páginas 50 y 53 respectivamente.

El espectro de UV (Figura 7.21., pag. 113) del compuesto **4-Bromo-17 α -hidroxi -4-pregnen-3,20-diona XXI**, presentó el cromóforo de la cetona α , β insaturada con un máximo de absorbancia en 259nm, lo cual resulta lógico ya que se mantiene el mismo cromóforo.

El espectro de IR (Figura 7.22., pag.114), indica la desaparición del carbonilo del éster en 1736.00 cm^{-1} , además de la desaparición de la banda de intensidad fuerte en 1249.00 cm^{-1} que indica la unión C-O del éster y por otro lado aparece una banda ancha en la zona de stretching en 3400.07 cm^{-1} , que indica la presencia de un alcohol asociado y una banda de intensidad media en 1118.58 cm^{-1} que confirma la presencia de un alcohol terciario, por otro lado indica la presencia de dos carbonilos al presentar dos bandas de absorción de intensidad fuerte, una en 1709.53 cm^{-1} que se asignó al carbonilo en C-20 (β al alcohol) y en 1657.97 cm^{-1} correspondiente al carbonilo en C-3 de la cetona α , β insaturada y por último una señal en 597.64 cm^{-1} que corresponde a la unión C-Br en C-4.

El análisis del espectro de RMN^1H (Figura 7.23., pag.115), indica la desaparición de la señal simple en 2.114 ppm correspondiente al metilo del éster en C-17 y por otro lado la aparición de una señal simple en 3.573 ppm, que integra para un protón y que desaparece con agua deuterada, correspondiente al alcohol en la misma posición, además de las señales simples que integran para tres protones cada una en 0.745 ppm y en 1.173 ppm correspondientes a los metilos angulares en

C-18 y C-19 respectivamente y por último una señal en 2.231 ppm que se asignó al metilo alfa al carbonilo en C-20.

El análisis de RMN¹³C (Figura 7.24., pag.116), indica la desaparición del éster en 170.633 ppm y la aparición del carbono base del alcohol en 89.760 ppm en la posición C-17, la presencia del metilo alfa al carbonilo de C-20 en 20.439 ppm, en 194.097 ppm el mismo carbonilo, en 211.650 ppm la presencia del carbonilo en C-3 y muy importantemente la presencia del carbono sp² en 123.957 ppm correspondiente al carbono en la posición 4 unido al átomo de bromo.

Por último en el análisis de la espectroscopía de masas EMIE (Figura 7.25., pag.117) se pudo confirmar la estructura del compuesto deseado ya que se obtuvo una masa molecular de 408 uma, además de presentar el ión molecular una contribución isotópica al M+2 en 410 uma con una abundancia relativa de casi el 100%, lo cual confirma la presencia de un átomo de bromo en la molécula.

El espectro de UV (Figura 7.26., pag.118) del compuesto **4-Cloro-17 α -hidroxi -4-pregnen-3,20-diona XXII**, presentó el cromóforo de la cetona α , β insaturada con un máximo de absorbancia en 253nm, al mantener el mismo cromóforo, de su materia prima.

El espectro de IR (Figura 7.27., pag.119), indica la desaparición del carbonilo del éster en 1732.12 cm⁻¹, además de la desaparición de la banda de intensidad fuerte en 1250.99 cm⁻¹ que indica la unión C-O del éster y por otro lado aparece una banda ancha en la zona de stretching en 3402.76 cm⁻¹, que indica la presencia de alcohol y una banda de intensidad media en 1154.52 cm⁻¹ que confirma la presencia de un alcohol terciario, por otro lado indica la presencia de dos

carbonilos al dar dos bandas de absorción de intensidad fuerte, una en 1709.28 cm^{-1} que se asignó al carbonilo en C-20 (β al alcohol) y en 1658.80 cm^{-1} correspondiente al carbonilo en C-3 de la cetona α,β insaturada y por último una señal en 599.51 cm^{-1} que corresponde a la unión C-Cl en la posición C-4.

El análisis del espectro de RMN^1H (Figura 7.28., pag.120), indica la desaparición de una señal simple que integra para tres protones en 2.114 ppm correspondiente al metilo del éster en C-17 y por otro lado la aparición de una señal simple en 3.566 ppm, que integra para un protón y que desaparece con agua deuterada, correspondiente al alcohol en la misma posición, además de las señales simples que integran para tres protones cada una en 0.738 ppm y en 1.166 ppm correspondientes a los metilos angulares en C-18 y C-19 respectivamente y por último una señal en 2.256 ppm que se asignó al metilo alfa al carbonilo en C-20.

El análisis de RMN^{13}C (Figura 7.29., pag.121), indica la desaparición del éster en 170.633 ppm y la aparición del carbono base del alcohol en 85.160 ppm en la posición C-17, la presencia del metilo alfa al carbonilo de C-20 en 20.439 ppm, en 194.097 ppm el mismo carbonilo, en 211.650 ppm la presencia del carbonilo en C-3 y por último la presencia del carbono sp^2 en 154.756 ppm correspondiente al carbono en la posición 4 unido al átomo de cloro.

Por último en el análisis de la espectroscopía de masas EMIE (Figura 7.30., pag.122) se confirmó la estructura del compuesto deseado ya que se obtuvo una masa molecular de 364 una, además de presentar algunos fragmentos catiónicos con una contribución isotópica al M+2 en una relación de abundancia relativa de 70:30 %

aproximadamente, lo cual confirma la presencia de un átomo de cloro en la molécula.

5.1.5. Caracterización de los compuestos 4-Bromo-17 α -benzoiloxi-4-pregnen-3,20-diona XXIII y de 4-Cloro-17 α -benzoiloxi-4-pregnen-3,20-diona XXIV.

Por último se llevó a cabo la esterificación del grupo oxhidrilo en la posición C-17 de los compuestos XXI y XXII, teniendo en cuenta que la protección de la cadena lateral es un requisito estructural para la actividad antiandrogénica como ya se había mencionado anteriormente. Dicha esterificación se llevó a cabo mediante una catálisis ácida con ácido benzoico y anhídrido trifluoroacético, mediante la formación *in situ* del anhídrido mixto benzoil trifluoroacético, el cual aciló al oxhidrilo, originando los ésteres correspondientes XXIII y XXIV, los cuales son compuestos nuevos no reportados en la literatura y cuyas estructuras se elucidaron por sus propiedades físicas y espectroscópicas mostradas en las Tablas 7 y 8 de las páginas 55 y 58 respectivamente.

El espectro de UV (Figura 7.31., pag.123) del compuesto **4-Bromo-17 α -benzoiloxi-4-pregnen-3,20-diona XXIII**, presentó un grupo cromóforo de la cetona α, β insaturada 4-en-3-ona con un máximo de absorbancia en 253nm.

El espectro de IR (Figura 7.32., pag.124), corrobora la esterificación del oxhidrilo en C-17 mediante la desaparición de la banda ancha del alcohol en 3400.07 cm^{-1} , apreciándose una señal nueva en la región de carbonilos en 1718.47 cm^{-1} asignada al carbonilo del éster benzoato formado y una señal débil en 1778.41 cm^{-1} que corresponde a COO- del éster, además de la banda de intensidad fuerte en 1250.13 cm^{-1} que

indica la unión C-O del éster y por otro lado aparecen otras dos señales de intensidad fuerte en la zona de los carbonilos una en 1702.36 cm^{-1} asignable al carbonilo de la cetona en C-20 y la otra en 1669.91 cm^{-1} correspondiente a la cetona α,β insaturada en C-3

El análisis del espectro de RMN^1H (Figura 7.33., pag.125), indica la desaparición de la señal simple en 3.573 ppm correspondiente al protón del alcohol en C-17 y por otro lado la aparición de dos señales múltiples en 7.851 ppm, en donde se pudo observar que la señal múltiple que se encuentra a campo bajo en 8.500 ppm integra para dos protones y corresponde a los dos protones aromáticos alfa al carbonilo, mientras que el otro multiplete a campo alto en 7.550 ppm integra para tres protones los cuales corresponden a los tres protones aromáticos restantes, además de las señales simples que integran para tres protones cada una en 0.776 ppm y en 1.247 ppm correspondientes a los metilos angulares en C-18 y C-19 respectivamente y una señal en 2.150 ppm que se asignó al metilo alfa al carbonilo en C-20.

El análisis de RMN^{13}C (Figura 7.34., pag.126), indica la desaparición del carbono base del alcohol en 89.760 ppm y la aparición del éster benzoato en 170.735 ppm en la posición C-17, la presencia del metilo alfa al carbonilo de C-20 en 20.729 ppm, en 190.523 ppm el carbonilo en C-20, en 203.909 ppm la presencia del carbonilo en C-3 y por último una señal muy importante que indica la presencia del carbono sp^2 en 126.345 ppm correspondiente al carbono en la posición 4 unido al átomo de bromo.

Por último en el análisis de la espectroscopía de masas **EMIE** (Figura 7.35., pag.127) se pudo confirmar que se trata del compuesto deseado, ya que se obtuvo una masa molecular de 511 una que

corresponde con lo esperado, además de presentar el ión molecular y algunos otros fragmentos una contribución isotópica al M+2 con una abundancia relativa de casi el 100%, lo cual confirma la presencia de un átomo de bromo en la molécula.

El espectro de UV (Figura 7.36., pag.128) del compuesto **4-Cloro-17 α -benzoiloxi -4-pregnen-3,20-diona XXIV**, presentó el cromóforo de la cetona α, β insaturada con un máximo de absorbancia en 251nm, al mantener el mismo cromóforo, de su materia prima.

El espectro de IR (Figura 7.37., pag.129), corrobora la esterificación del oxhidrilo en C-17 mediante la desaparición de la banda del alcohol en 3402.76 cm^{-1} , apreciándose una señal nueva en la región de carbonilos en 1714.83 cm^{-1} asignada al carbonilo del éster benzoato formado y una señal débil en 1783.91 cm^{-1} que corresponde a COO- del éster, además de una banda de intensidad fuerte en 1250.23 cm^{-1} que indica la unión C-O del éster y por otro lado aparecen otras dos señales de intensidad fuerte en la zona de los carbonilos una en 1709.53 cm^{-1} asignable al carbonilo de la cetona en C-20 y la otra en 1671.96 cm^{-1} correspondiente a la cetona α, β insaturada en C-3.

El análisis del espectro de RMN¹H (Figura 7.38., pag.130), indica la desaparición de la señal simple en 3.600 ppm correspondiente al protón del alcohol en C-17 y por otro lado la aparición de dos señales múltiples en 7.850 ppm, en donde se pudo observar que la señal múltiple que se encuentra a campo bajo en 8.493 ppm integra para dos protones y corresponde a los dos protones alfa al carbonilo, mientras que el otro multiplete a campo alto en 7.600 ppm integra para tres protones, los cuales corresponden a los tres protones aromáticos restantes, además de las señales simples que integran para tres protones cada una en 0.817

ppm y en 1.393 ppm correspondientes a los metilos angulares en C-18 y C-19 respectivamente y una señal en 2.230 ppm asignable al metilo alfa al carbonilo en C-20.

El análisis de RMN^{13}C (Figura 7.39., pag.131), indica la desaparición del carbono base del alcohol en 89.760 ppm y la aparición del éster benzoato en 170.867 ppm en la posición C-17, la presencia del metilo alfa al carbonilo de C-20 en 20.700 ppm, en 190.449 ppm el carbonilo en C-20, en 203.909 ppm la presencia del carbonilo en C-3 y por último una señal muy importante que indica la presencia del carbono sp^2 en 133.950 ppm correspondiente al carbono en la posición 4 unido al átomo de cloro.

Por último en el análisis de la espectroscopía de masas EMIE (Figura 7.40., pag.132) se confirmó que se trata del compuesto deseado, ya que se obtuvo una masa molecular de 464 una que corresponde con lo esperado, además de presentar el ión molecular junto con algunos otros fragmentos una contribución isotópica al $\text{M}+2$ y en una relación de abundancia relativa de 70:30 % aproximadamente, lo cual confirma la presencia de un átomo de cloro en la molécula.

5.2. DISCUSIÓN DE LOS RESULTADOS DE LA PARTE FARMACOLÓGICA.

Uno de los objetivos que se trata de alcanzar en el desarrollo de nuevas moléculas con actividad biológica, es lograr la especificidad de la actividad del fármaco sobre su sitio de acción. Es por ello que en el desarrollo de inhibidores de la enzima 5α -reductasa, resulta indispensable

llevar a cabo el estudio de la actividad biológica sobre ambos tipos de isoformas que existen de esta enzima denominados Tipo I y Tipo II.

El conocimiento de la especificidad de los compuestos diseñados sobre la inhibición de cada tipo de isoenzima es muy importante, ya que cada isoenzima se encuentra relacionada con diferentes padecimientos y es deseable que los compuestos sintetizados **XXIII** y **XXIV** inhiban potentemente un tipo de isoenzima determinado sin afectar considerablemente a la otra. Por lo anterior, en éste trabajo se sugirió la evaluación de los compuestos **XXIII** y **XXIV** como inhibidores de la enzima 5α -reductasa, utilizando ambas isoenzimas, para establecer el potencial de acción de los compuestos sintetizados como inhibidores selectivos (ver **Figura 4.1.**, pag.38).

Se sabe que la isoenzima Tipo I se expresa desde el nacimiento en la piel no genital y en el hígado y que se encuentra presente predominantemente en estos dos sitios y en niveles mucho más bajos en la glándula prostática. Debido a que el hígado constituye el sitio principal de biotransformación de los compuestos endógenos (hormonas esteroidales) y exógenos (fármacos o xenobióticos) del organismo, además de que representa uno de los principales sitios de excreción, resulta de gran importancia que los compuestos antiandrogénicos desarrollados no inhiban a esta isoenzima o la inhibición sea mínima ya que de otro modo, convertirían al compuesto en un fármaco hepatotóxico, imposible de emplearse terapéuticamente por el grave efecto colateral provocado. Sin embargo estos compuestos que inhiban a la isoenzima Tipo I, se sugieren que sean posibles fármacos para afecciones dependientes de andrógenos como el acné, afección relacionada con la isoenzima tipo I principalmente.

Por otro lado debido a la relación de las enfermedades de la próstata (*Cáncer de Próstata e HPB*) con la isoenzima Tipo II, se buscó que los compuestos diseñados para el tratamiento de esas enfermedades, presentaran actividad inhibitoria casi exclusiva sobre esta isoenzima, que se encuentra predominantemente en la próstata y testículos y que es muy sensible *in vivo* a la inhibición por fármacos antiandrogénicos. Es importante mencionar que estudios previos realizados sobre antiandrógenos, mostraron que existe una relación inversa en la actividad inhibitoria de ambas isoenzimas, es decir, que un compuesto que presentase las características estructurales adecuadas para ser un antiandrógeno, resulta ser muy activo sobre la enzima 5α -reductasa Tipo II y resulta en la mayoría de los casos ser poco activo sobre la isoenzima Tipo I. Como ejemplo de esto tenemos el medicamento Proscar (Finasterida), el cual es el compuesto comercial de elección para el tratamiento del Cáncer de Próstata y de la **HPB**, por ser el fármaco más activo actualmente y que fue usado como control en estos estudios. Este fármaco como se mencionó anteriormente es un inhibidor selectivo de la enzima 5α -reductasa Tipo II al tener un efecto más profundo sobre los tejidos que expresan esta isoenzima, como son la próstata y los testículos y por otro lado, muestra una actividad casi nula frente a la isoenzima Tipo I.

En este trabajo, se llevó a cabo el estudio preliminar *in vivo* de la actividad farmacológica de dos nuevos compuestos sintetizados, derivados de la Progesterona: 4-Bromo- 17α -benzoiloxi-4-pregnen-3,20-diona **XXIII** y 4-Cloro- 17α -benzoiloxi-4-pregnen-3,20-diona **XXIV**, así como sus intermedios (**XVIII-XXII**), incluyendo a la materia prima **XVII**.

Se valoró la capacidad de inhibición de éstos sobre la enzima 5α -reductasa en sus dos isoformas Tipo I y II, eligiéndose como modelo de experimentación al Hamster macho gonadectomizado de la cepa Syrian Golden, ya que este presenta tejidos androgénicos que pueden experimentar la reducción de la Testosterona (T) a su andrógeno más activo Dihidrotestosterona (DHT) a través de la enzima 5α -reductasa, dichos tejidos son las Vesículas Seminales (VS) en las que se encuentra predominantemente la isoenzima Tipo II y por otro lado los Flank Organs (FO) en los que predomina la isoenzima Tipo I.

5.2.1. Análisis del ensayo de inhibición sobre la isoenzima Tipo I Flank Organs(FO).

Al analizar los resultados se encontró que después de la castración el FO de cada animal decremento significativamente su tamaño normal de 8 mm hasta 2.6 mm aproximadamente (tamaño similar al de los hamsters hembras), y esto se debió fundamentalmente a que al realizar la castración se está inhibiendo la producción significativa de andrógenos en los testículos, provocando la disminución de tamaño de los FO.

La glándula izquierda de cada animal se utilizó como control, por lo que únicamente le fue aplicado tópicamente el vehículo, Acetato de Etilo y no se observó alguna diferencia significativa en el tamaño de la glándula. Sin embargo la aplicación tópica del andrógeno Testosterona en la glándula derecha de cada animal incrementó el diámetro del FO, como resultado de la conversión de T a DHT. Por otra parte cada uno de los compuestos que se administraron simultáneamente con la T, XVII-XXIV, exceptuando el XVIII, no mostraron una disminución del tamaño de los FO, por lo que se deduce que no tienen una actividad inhibitoria

significativa frente a la isoenzima 5α -reductasa Tipo I. Únicamente se pudo observar que el intermediario XVIII fue el único compuesto esteroidal con una ligera actividad inhibitoria frente a esta isoenzima, por lo que se esperaba que frente a la isoenzima Tipo II no presentara actividad inhibitoria alguna, lo cual efectivamente se comprobó. Esto se debe posiblemente a que se pierde el sistema α, β insaturado con la cetona en la posición C-3, necesario para presentar actividad antiandrogénica

Otro aspecto importante fue la diferencia en la electronegatividad de ambos halógenos presentes en los compuestos XX-XXIV. Se observó que los átomos de cloro y bromo imparten diferentes propiedades biológicas a las moléculas ya que mientras los esteroides con el átomo de bromo (XIX, XXI y XXIII) se comportaron como esteroides androgénicos al presentar un ligero aumento en el diámetro de cada FO, los esteroides con el átomo de cloro (XX, XXII y XXIV) simplemente no tuvieron ningún efecto frente a la isoenzima 5α -reductasa Tipo I, por lo que se pensó que los compuestos con un átomo de cloro tendrían un efecto inhibitorio mayor frente a la isoenzima tipo II.

Gracias a que los compuestos sintetizados y todos sus intermediarios presentaron una actividad inhibitoria casi nula frente a la isoenzima 5α -reductasa Tipo I, se pensó que estos compuestos podrían tener una actividad antiandrogénica potencial, por lo que se procedió a realizar el ensayo sobre la isoenzima Tipo II.

5.2.2. Análisis del ensayo de inhibición sobre la isoenzima Tipo II Vesículas Seminales (VS).

Debido a que en las vesículas seminales, predomina la isoenzima 5α -reductasa Tipo II y a que son órganos capaces de reducir la T a DHT aún después de la castración, se eligió este tejido como órgano de experimentación.

Por otro lado al analizar los resultados obtenidos y considerando los grupos funcionales de la molécula que confieren actividad antiandrogénica a los derivados del pregnano como inhibidores de la enzima 5α -reductasa Tipo II, se observó que la materia prima XVII y los intermediarios (XVIII-XXII) no presentaron una actividad inhibitoria apreciable, debido posiblemente a que se está llevando a cabo el metabolismo de los compuestos, ocasionando su inactivación en el organismo. Este metabolismo se puede deber a la reducción enzimática del grupo carbonilo en C-20 y por otro lado la degradación de la cadena lateral en C-17 que conduce a la síntesis eventual de Testosterona, catalizada por la enzima *C-17-C-20-liasa* acoplada al citocromo P-450.

Otro aspecto importante fue la introducción de un átomo de halógeno sobre el esqueleto de la Progesterona, ya que estudios previos habían demostrado que la presencia de un átomo de halógeno en C-6 incrementa potencialmente la actividad antiandrogénica como resultado de la interferencia del halógeno en la resonancia de la cetona α,β insaturada, desestabilizando la molécula y disminuyendo la energía de activación necesaria para la transferencia del hidruro.

En éste trabajo se observó una apreciable diferencia en la actividad debida fundamentalmente a la electronegatividad de ambos halógenos, en los que se observó que imparten diferentes propiedades biológicas a las moléculas. En general los derivados **XIX**, **XXI** y **XXIII** que tienen un átomo de bromo en su estructura se comportaron como esteroides androgénicos, al producir un ligero aumento del diámetro de cada FO, comportándose como compuestos agonistas del receptor androgénico. Por otro lado, los compuestos con un átomo de cloro (**XX**, **XXII** y **XXIV**) simplemente no causaron efecto alguno frente a la isoenzima 5 α -reductasa Tipo I, por lo que se consideró que tendrían un efecto inhibitorio mayor frente a la isoenzima tipo II.

Al analizar los resultados obtenidos, se puede observar que en general la materia prima **XVII** y los intermediarios (**XVIII- XXII**) no presentan un efecto inhibitorio muy marcado como inhibidores de la enzima 5 α -reductasa Tipo II, sin embargo los dos compuestos nuevos sintetizados **XXIII** y **XXIV** resultaron ser más activos (16 y 31 % respectivamente) en comparación con el Proscar (Finasterida), fármaco que tiene la actividad antiandrogénica más potente en la actualidad. Estos resultados se pueden explicar porque al parecer la presencia de un átomo de halógeno en la posición C-4 incrementa notablemente la actividad, como ya fue mencionado anteriormente, además de la entidad 4-en-3-ona, que es un factor determinante para que presenten cierta actividad antiandrogénica, pero otro factor involucrado y que posiblemente sea el más importante es la presencia de grupos voluminosos en C-17 (éster benzoato), que impiden el acercamiento de la enzima C-17-C-20 liasa al grupo carbonilo, inhibiendo así la reducción mediante la degradación enzimática.

Como se puede observar en la **Tabla 12** (Cap.4, pag.66), los compuestos sintetizados como posibles fármacos antiandrogénicos **XXIII** y **XXIV** decrementaron el peso de las vesículas seminales de manera significativa ($p < 0.05$) comparado con los animales tratados con Testosterona. Por tanto se deduce que estos compuestos inhiben la conversión de Testosterona a DHT en las vesículas seminales de los hamsters machos castrados a una dosis de 200 μg . Estos resultados confirman el hecho de que los compuestos **XXIII** y **XXIV** inhiben la isoenzima 5α -reductasa Tipo II, por lo que se infiere que los andrógenos Testosterona y Dihidrotestosterona son los responsables del incremento del peso de las vesículas seminales como se había sugerido con anterioridad.

Resulta lógico pensar que el efecto antiandrogénico real observado, puede ser atribuido a una interacción molecular con el receptor androgénico lo cual convierte los compuestos **XXIII** y **XXIV** en compuestos antagonistas del Receptor Androgénico.

Es importante tener en consideración, la importancia de la realización de más estudios en los que se compruebe el efecto que tienen cada uno de los compuestos recién sintetizados a diferentes dosis, para observar el efecto que producen *in vivo*, además de la realización de estudios, que involucren su unión a receptor, para determinar el mecanismo de acción exacto que tienen cada uno de los compuestos con actividad antiandrogénica potencial.

Conclusiones

6

Del presente trabajo se puede concluir en forma general que se logró la síntesis y la evaluación farmacológica de dos compuestos esteroideos nuevos que se derivan del esqueleto del pregnano: 4-Bromo-17 α -benzoiloxi-4-pregnen-3,20-diona (XXIII) y de 4-Cloro-17 α -benzoiloxi-4-pregnen-3,20-diona (XXIV). Además se llevó a cabo la caracterización de dichos compuestos mediante sus características físicas (color, apariencia, p.f.) y espectroscópicas (UV, IR, RMN¹H, RMN¹³C y EMIE).

El compuesto bromado XXIII presentó mayor actividad antiandrogénica en comparación con el Proscar (*Finasterida*), que es el fármaco de elección para la inhibición de la isoenzima 5 α -reductasa Tipo II. Sin embargo XXIII, presentó menor actividad que su homólogo clorado XXIV. Por lo que se concluye que la electronegatividad del átomo de halógeno en la posición C-4 es de suma importancia, ya que al parecer la electronegatividad del halógeno está directamente relacionada con la actividad farmacológica.

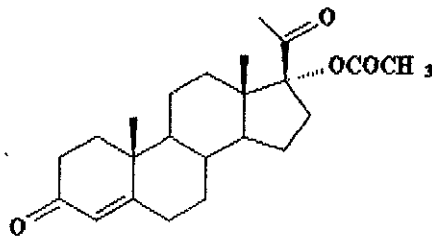
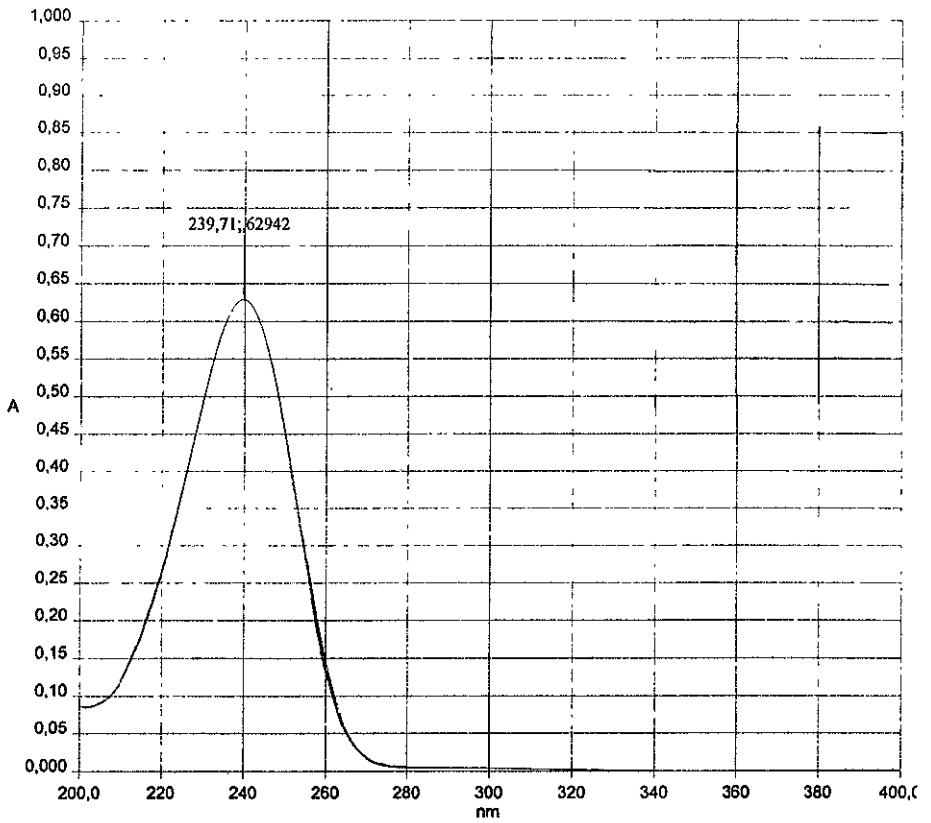
Dichos compuestos presentaron una actividad inhibitoria casi nula frente a la isoenzima 5α -reductasa Tipo I y fueron potencialmente activos frente a la isoenzima 5α -reductasa Tipo II, por lo cual, prometen ser inhibidores específicos o selectivos a dicha isoenzima, convirtiéndolos en compuestos antiandrogénicos potenciales para el tratamiento del cáncer de próstata y de la hiperplasia prostática benigna.

Los resultados de la evaluación farmacológica *in vivo* realizada confirmaron que la capacidad de inhibición de la isoenzima Tipo II aumenta, si la molécula conserva la entidad 4-en-3-ona, un átomo de halógeno en C-4 (beta orientado) y un grupo voluminoso en C-17.

Anexo de Espectroscopía

7

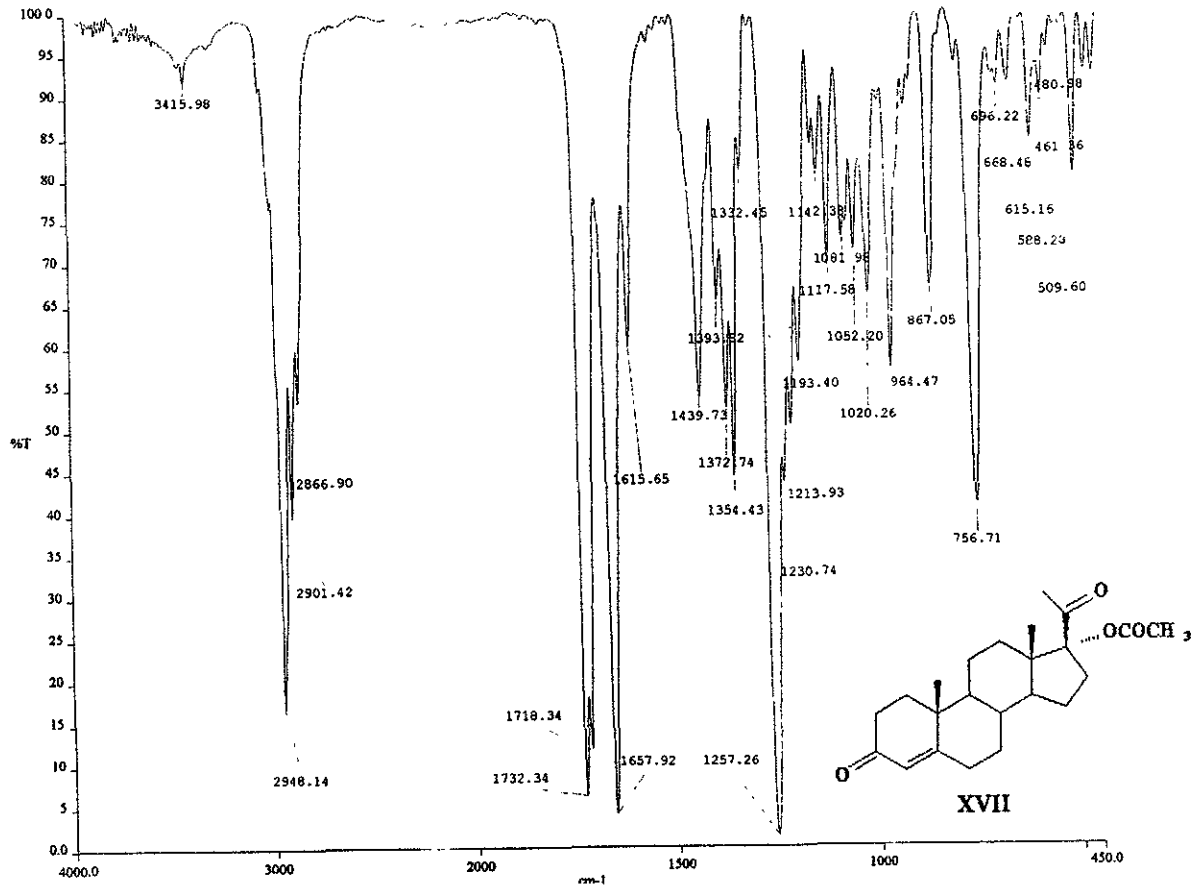
- **Espectroscopía de Ultravioleta (UV).**
- **Espectroscopía de Infrarrojo (IR).**
- **Espectroscopía de Resonancia Magnética Protónica (RMN¹H).**
- **Espectroscopía de Resonancia Magnética Carbónica (RMN¹³C).**
- **Espectroscopía de Masas mediante Impacto Electrónico (EMIE).**



XVII

Figura 7.1. Espectro de UV de 17 α -Acetoxiprogesterona XVII

Figura 7.2. Espectro de IR de 17 α -Acetoxiprogesterona XVII



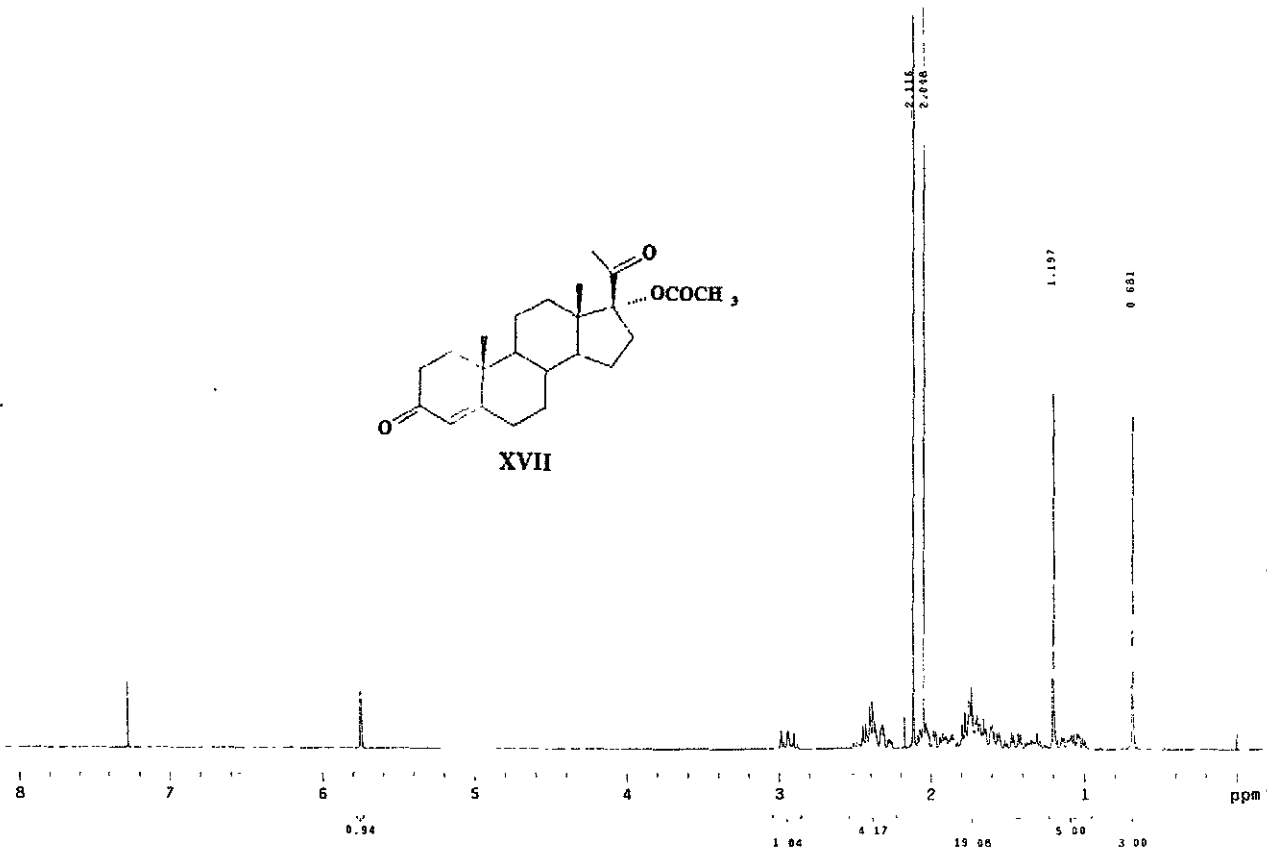


Figura 7.3. Espectro de RMN¹H de 17α-Acetoxiprogesterona XVII

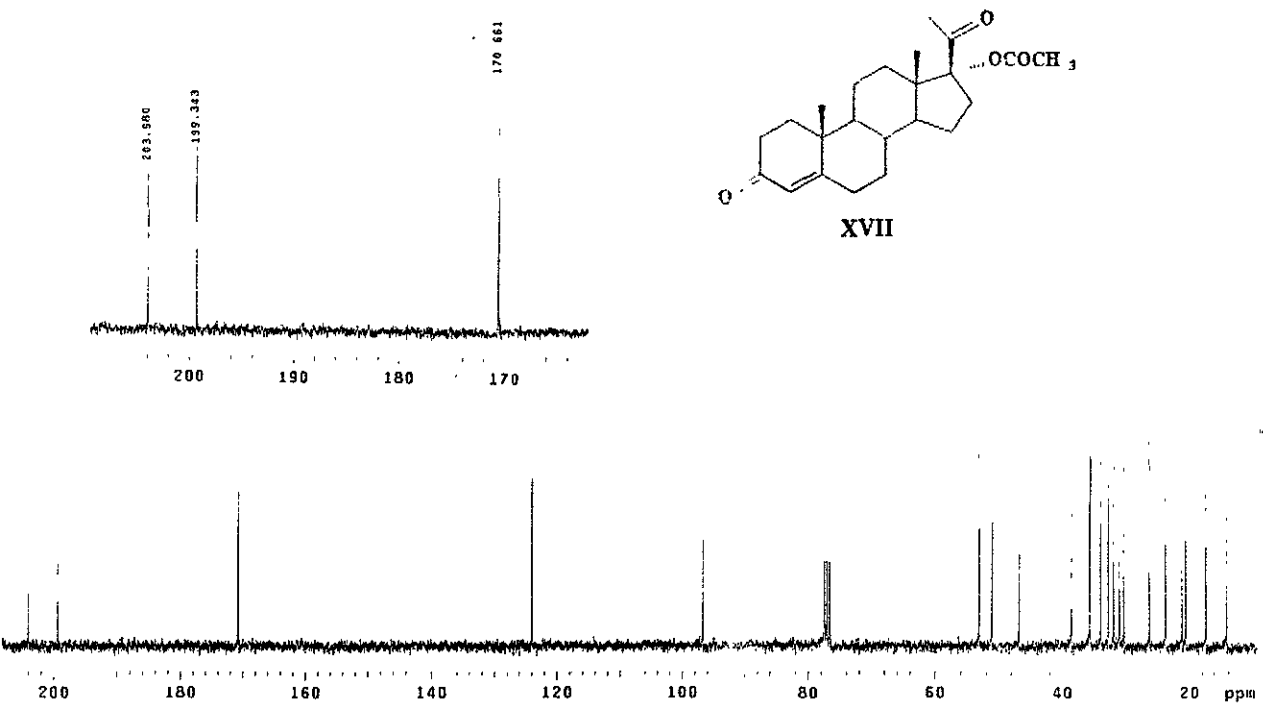


Figura 7.4. Espectro de RMN ^{13}C de 17 α -Acetoxiprogesterona XVII

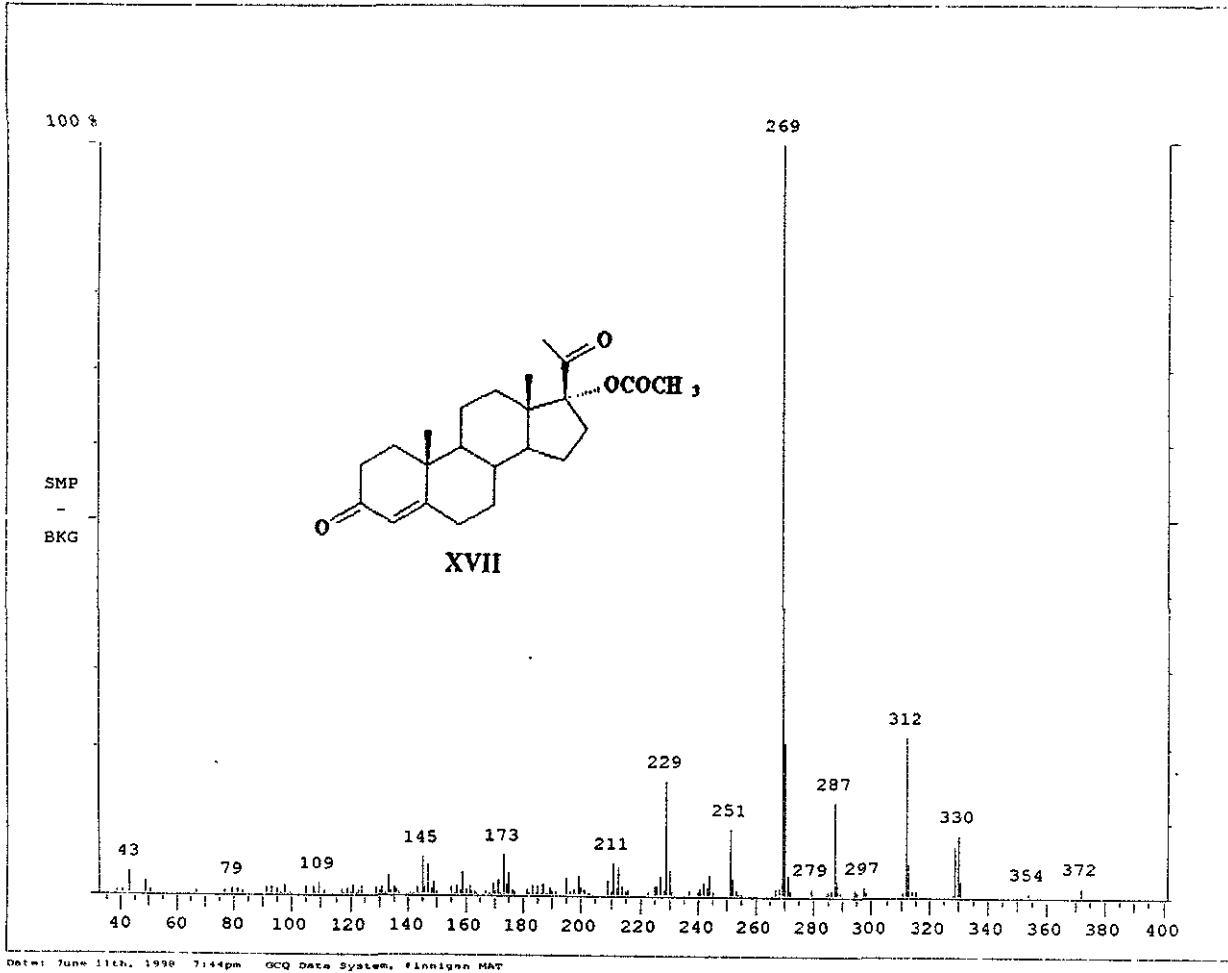
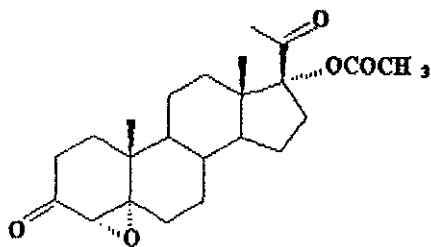
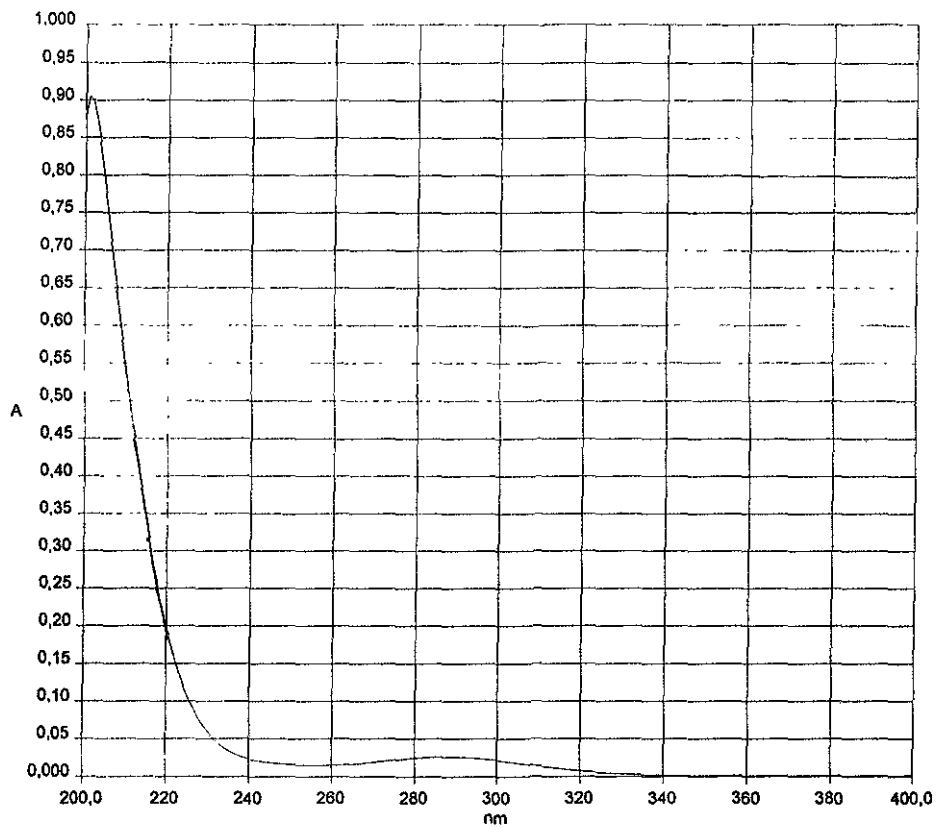


Figura 7.5, Espectro de EMIB de 17 α -Acetoxiprogesterona XVII



XVIII

Figura 7.6. Espectro de UV de 17 α -Acetoxy-4 α ,5 α -epoxi-pregnan-3,20-diona XVIII

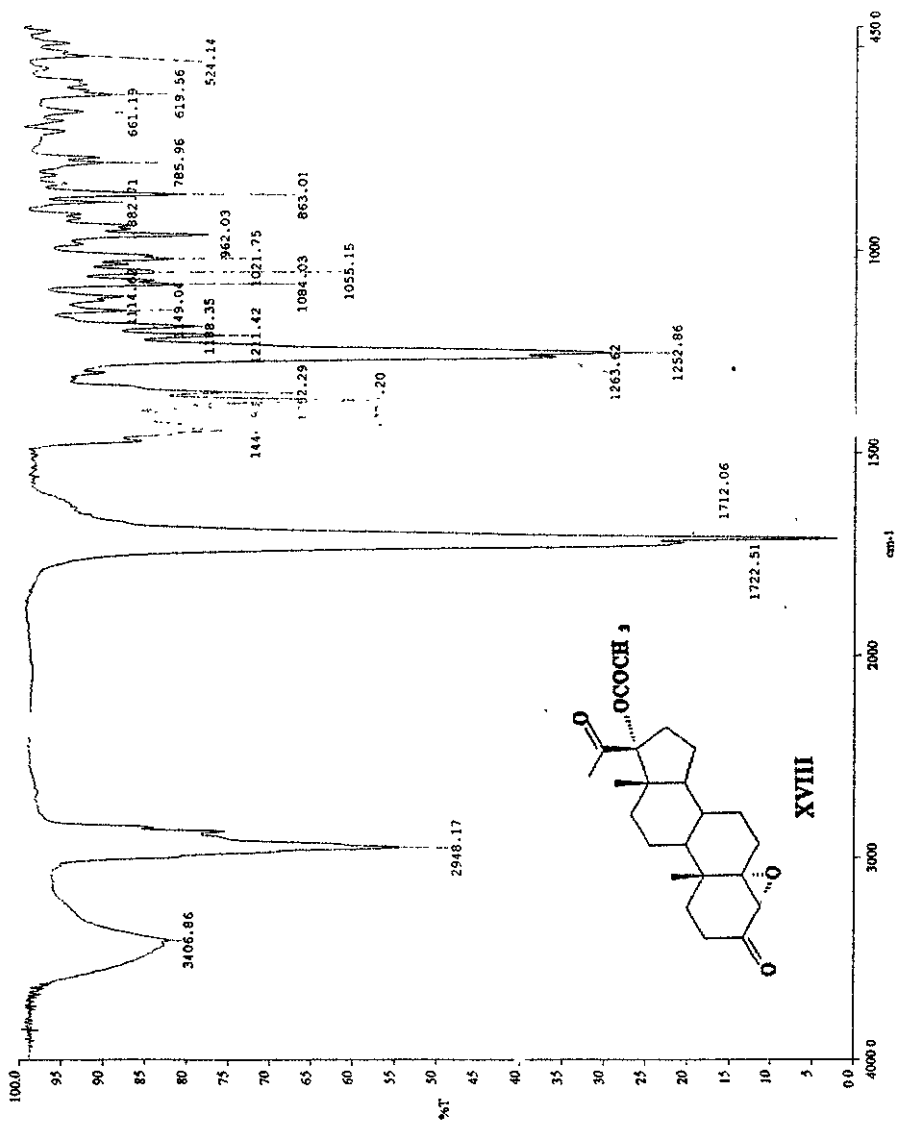


Figura 7.7. Espectro de IR de 17 α -Acetoxy-4 α ,5 α -epoxy-pregnan-3,20-diona XVIII

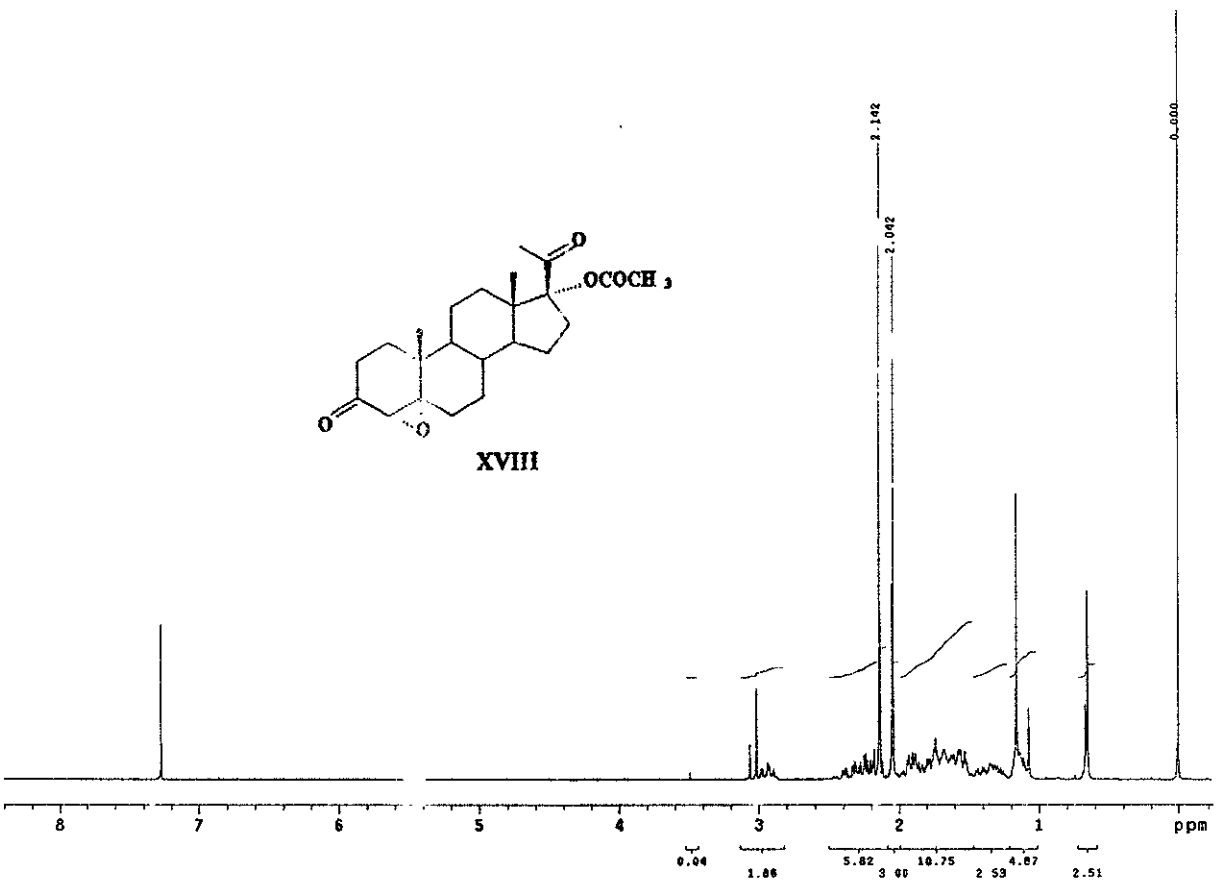


Figura 7.8. Espectro de RMN^1H de 17 α -Acetoxi-4 α ,5 α -epoxi-pregnan-3,20-diona XVIII

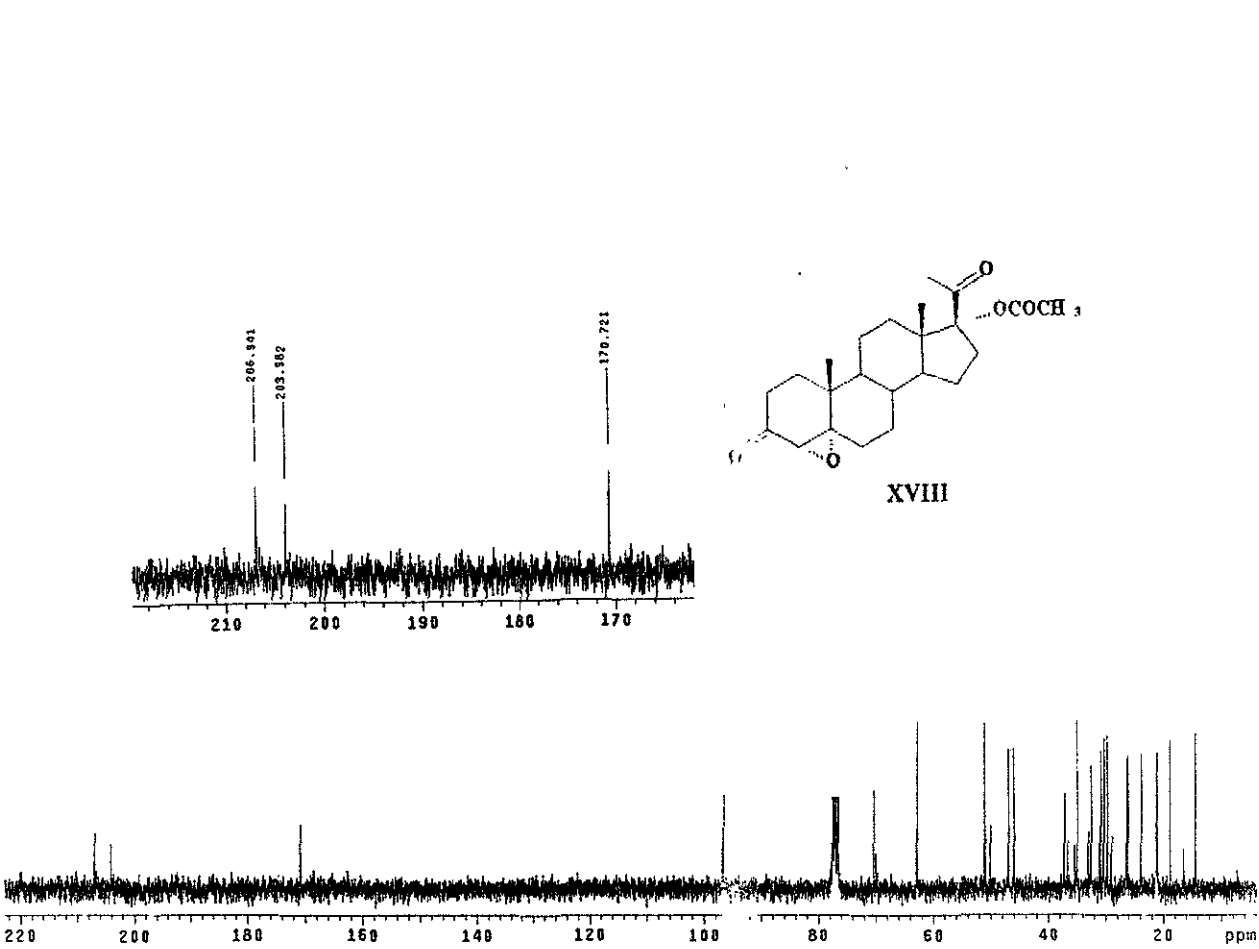
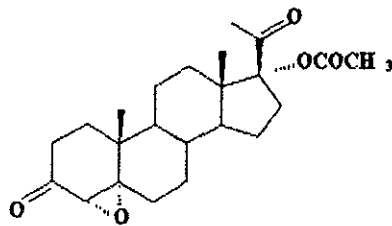
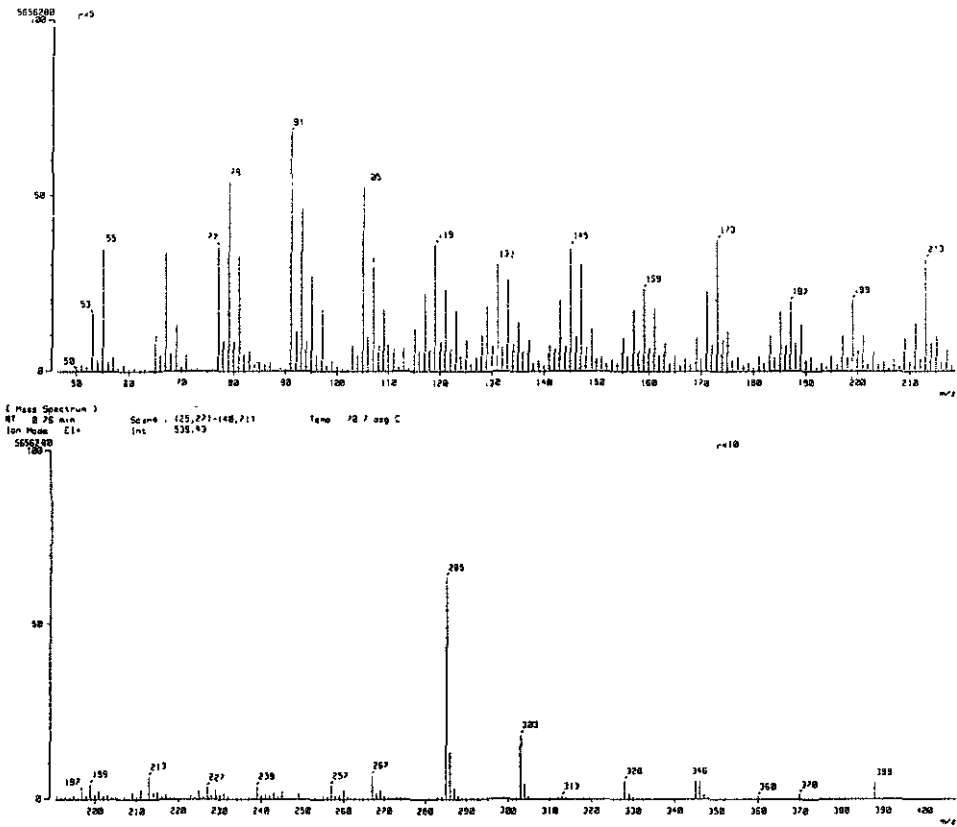


Figura 7.9. Espectro de RMN^{13}C de 17α -Acetoxi- $4\alpha,5\alpha$ -epoxi-pregnan- $3,20$ -diona XVIII



XVIII

Figura 7.10. Espectro de EMIE de 17 α -Acetoxi-4 α ,5 α -epoxi-pregnan-3,20-diona XVIII

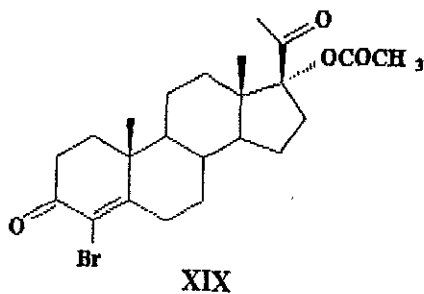
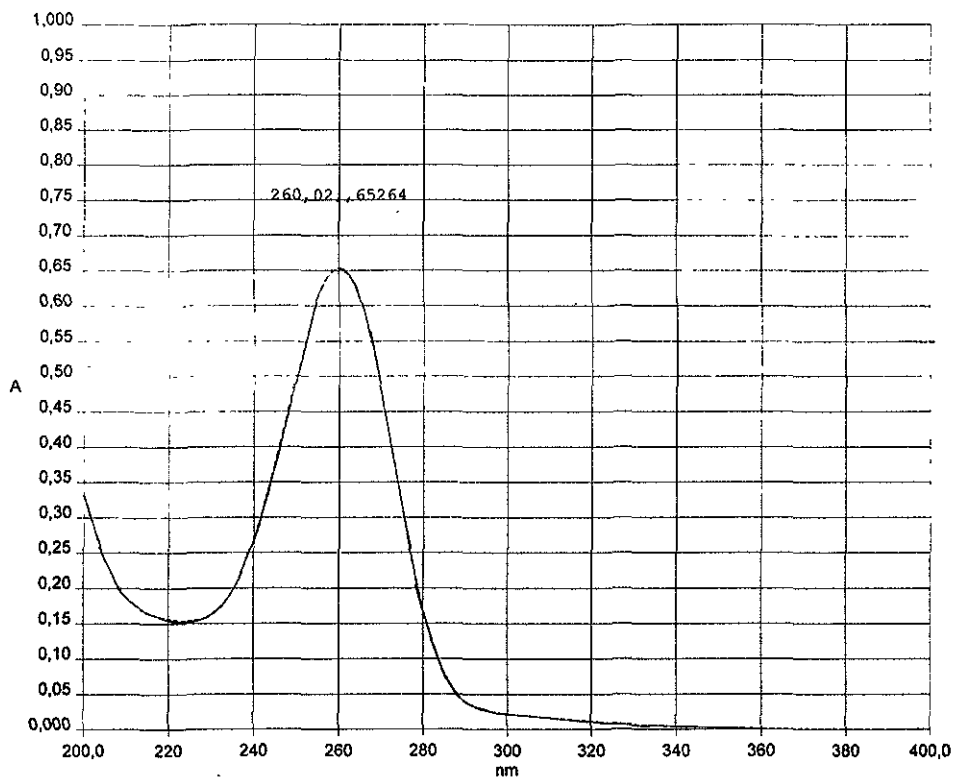


Figura 7.11. Espectro de UV de 4-Bromo-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona XIX

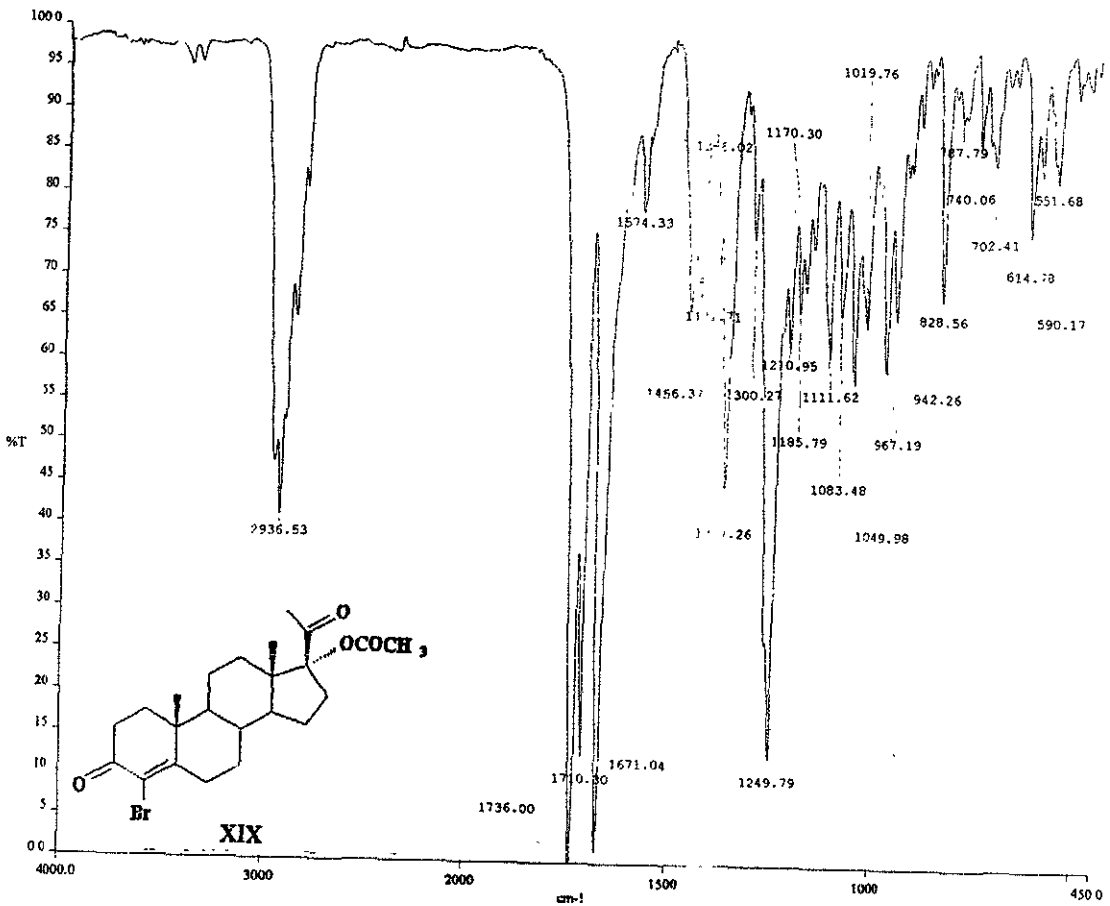


Figura 7.12. Espectro de IR de 4-Bromo-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona XIX

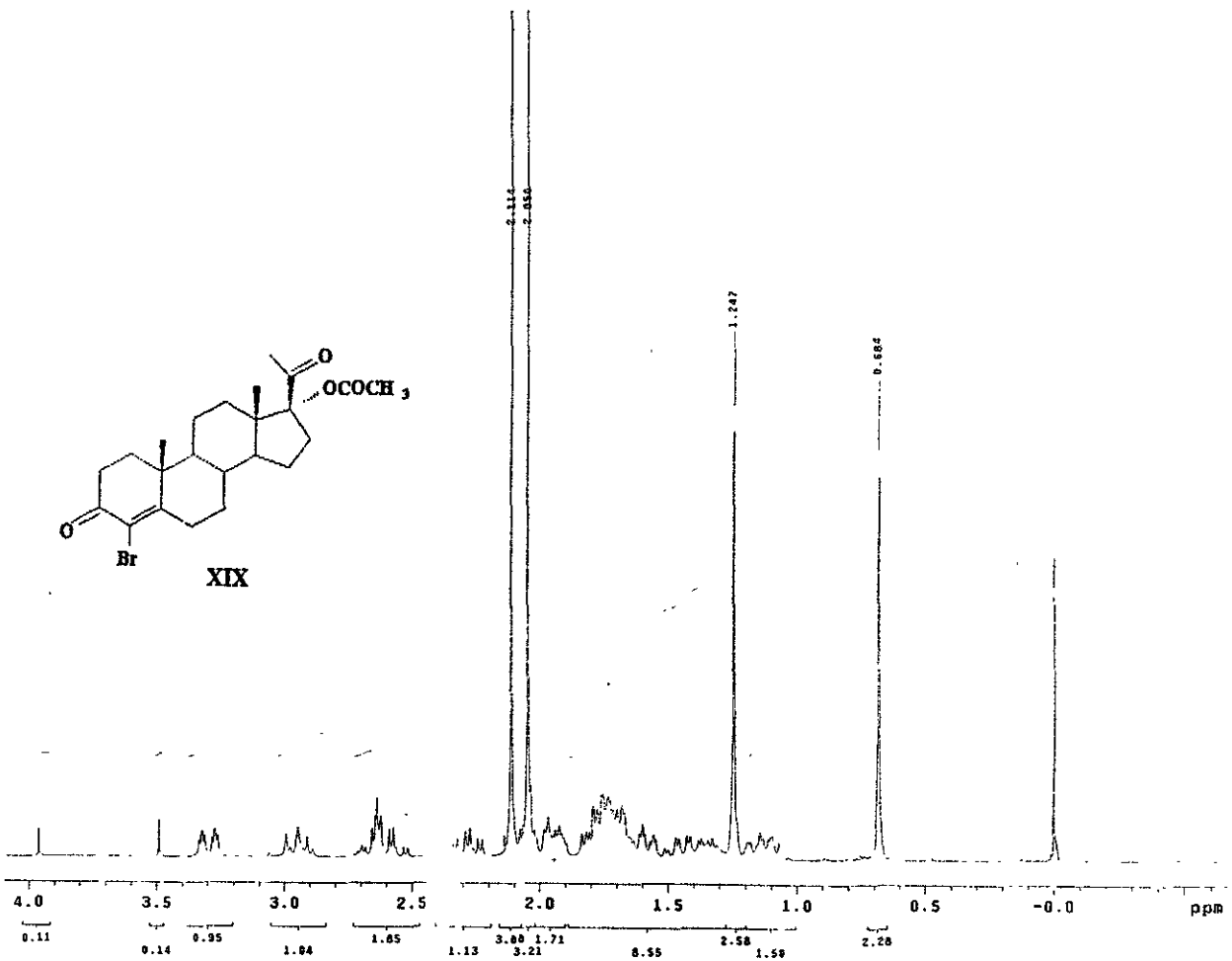


Figura 7.13. Espectro de RMN ^1H de 4-Bromo-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona XIX

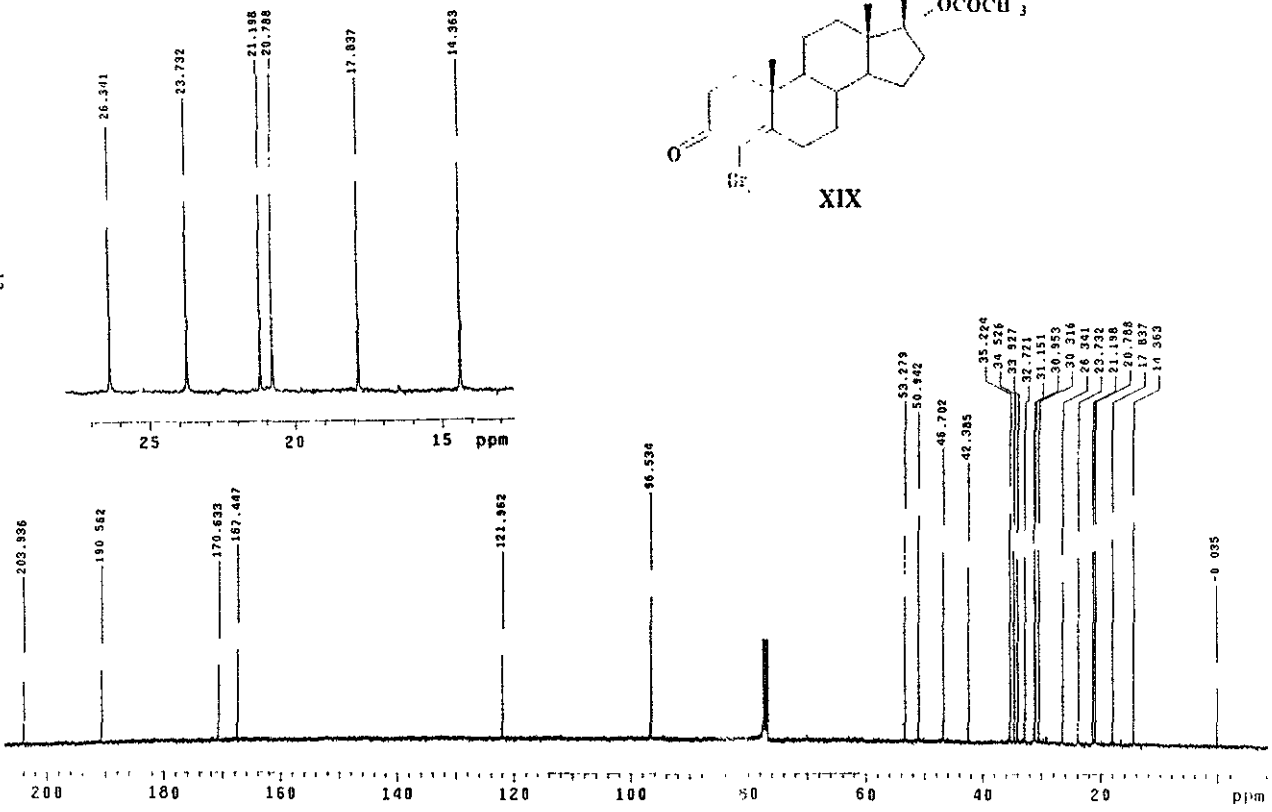
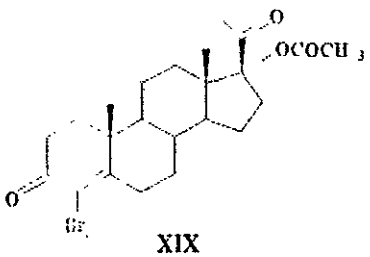
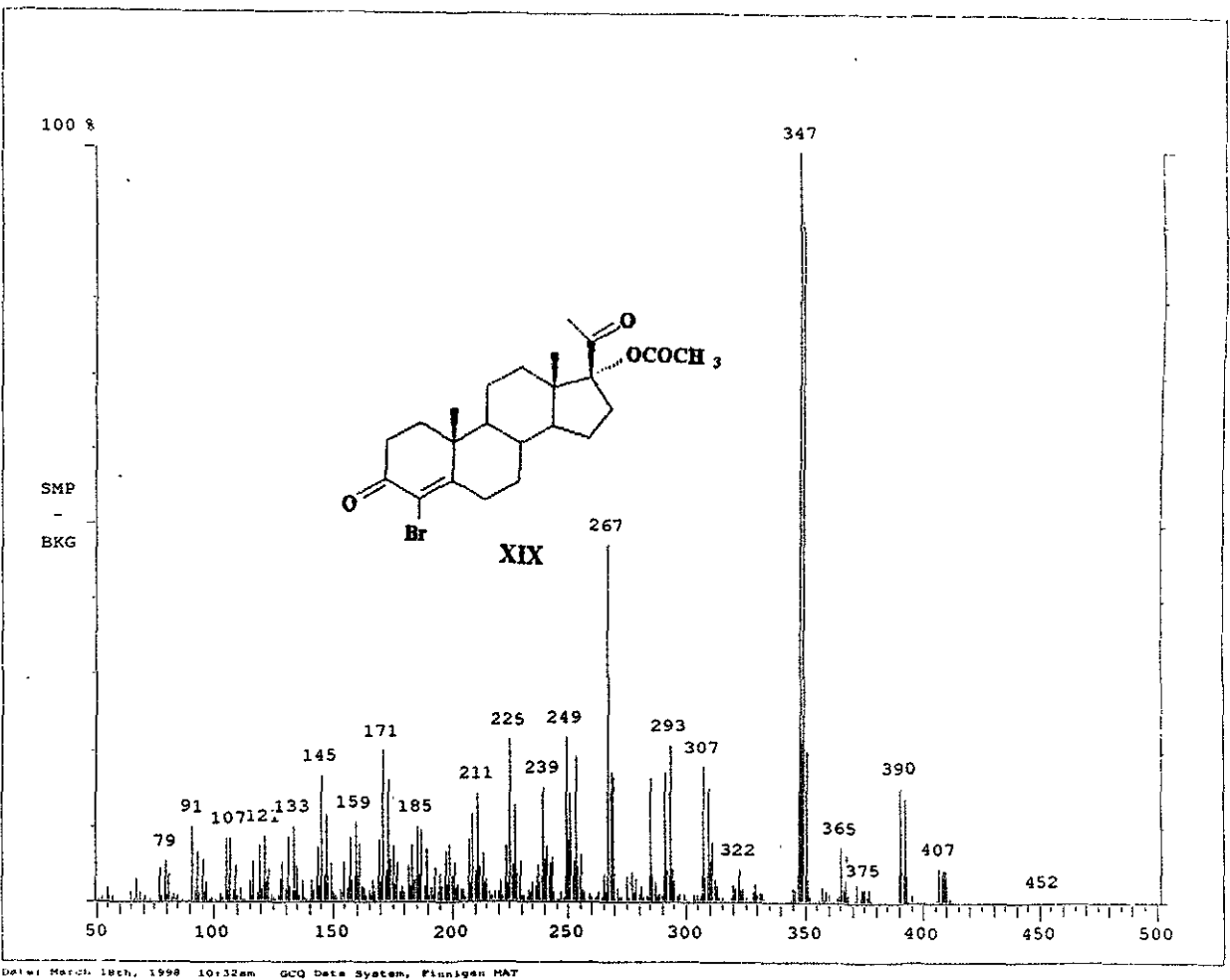


Figura 7.14. Espectro de RMN¹³C de 4-Bromo-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona XIX

**ESTA TESIS NO DEBE
 SALIR DE LA BIBLIOTECA**



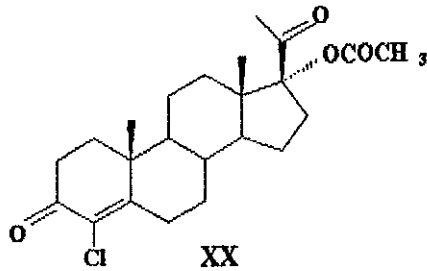
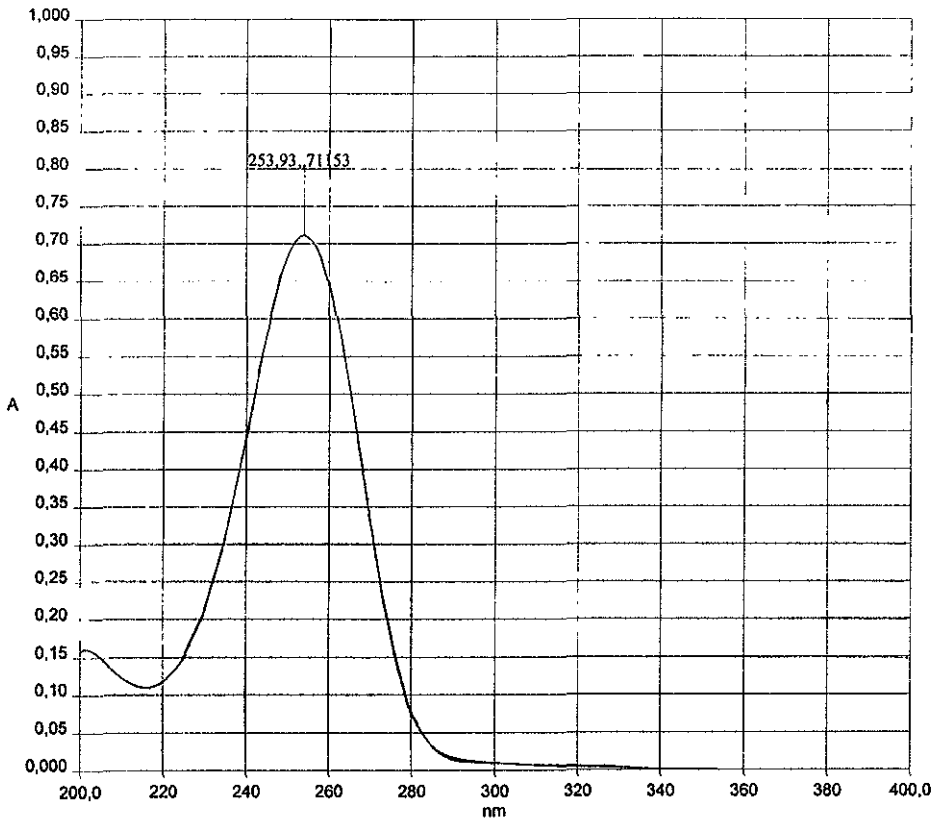


Figura 7.16. Espectro de UV de 4-Cloro-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona
XX

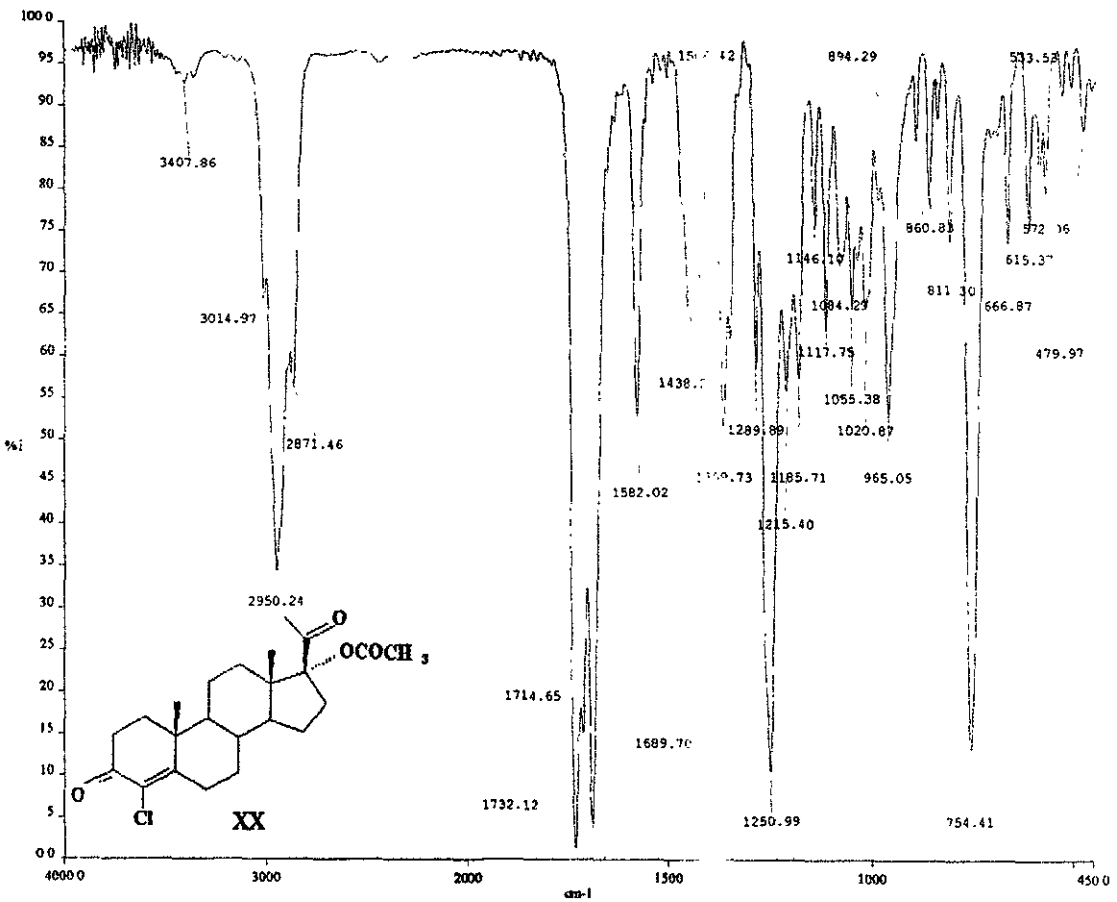


Figura 7.17. Espectro de IR de 4-Cloro-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona XX

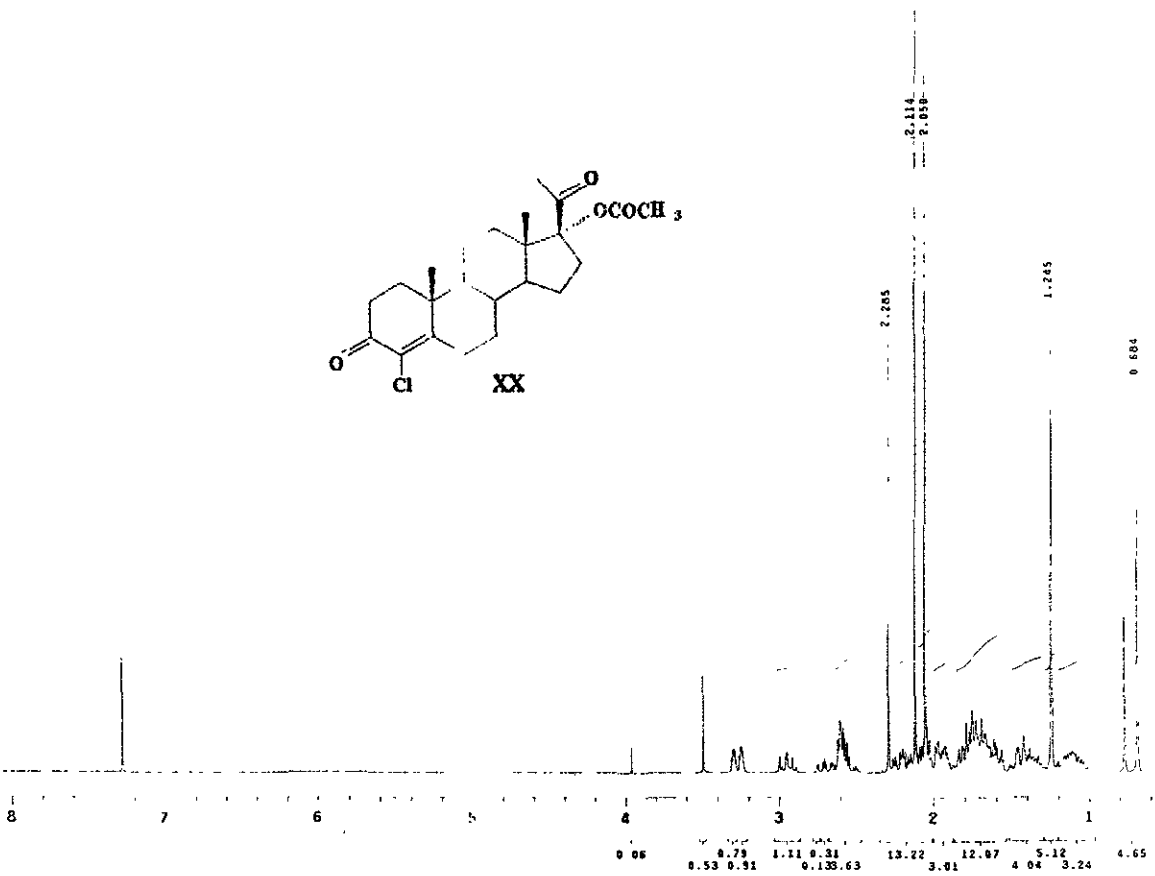


Figura 7.18. Espectro de RMN¹H de 4-Cloro-17α-acetoxi-4-pregnen-3,20-diona XX

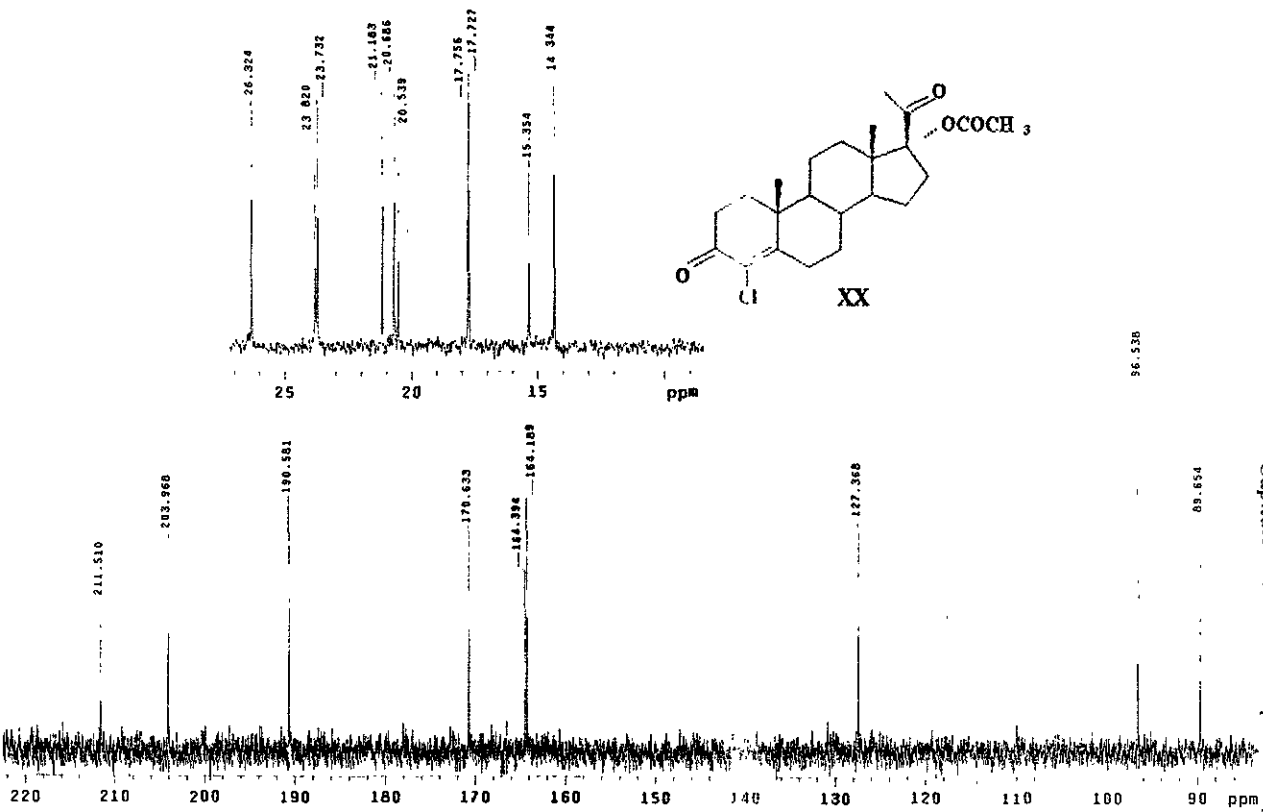


Figura 7.19. Espectro de RMN^{13}C de 4-Cloro-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona XX

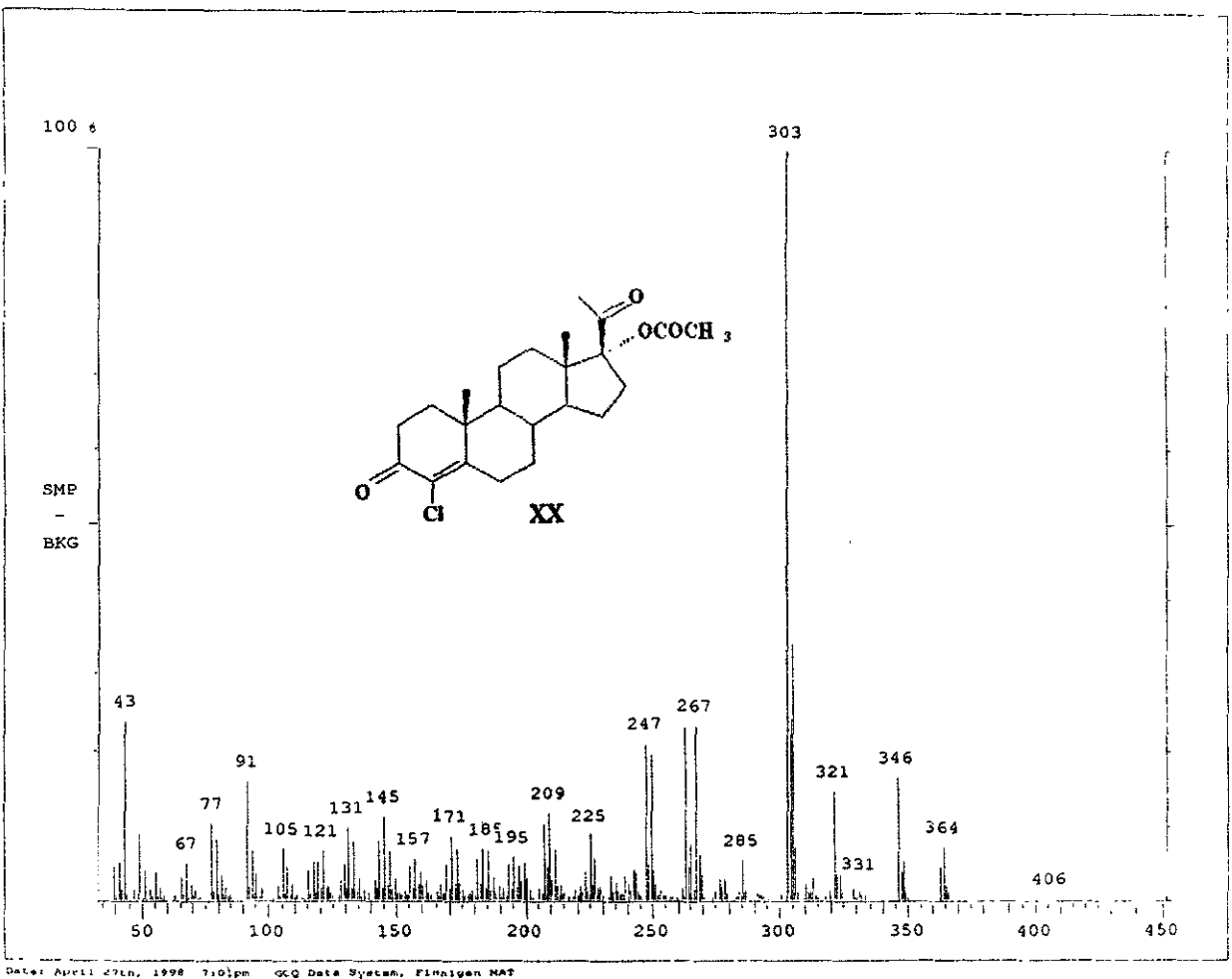


Figura 7.20. Espectro de EMIE de 4-Cloro-17 α -acetoxi-4-pregnen-3,20-diona XX

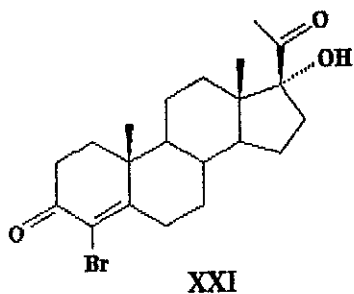
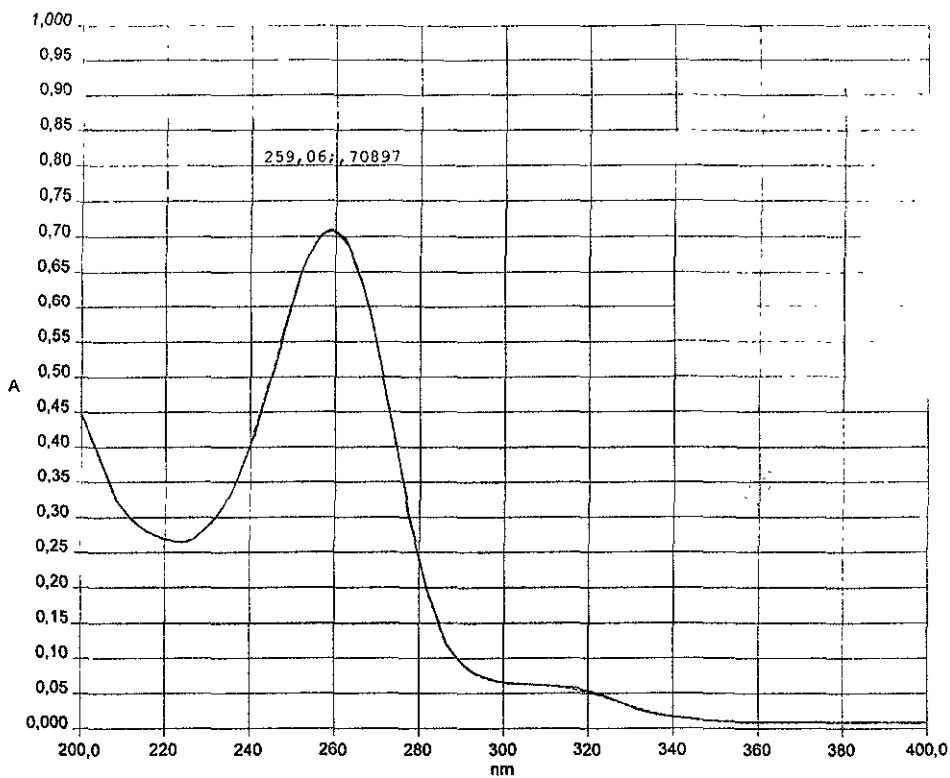


Figura 7.21. Espectro de UV de 4-Bromo-17 α -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona
XXI

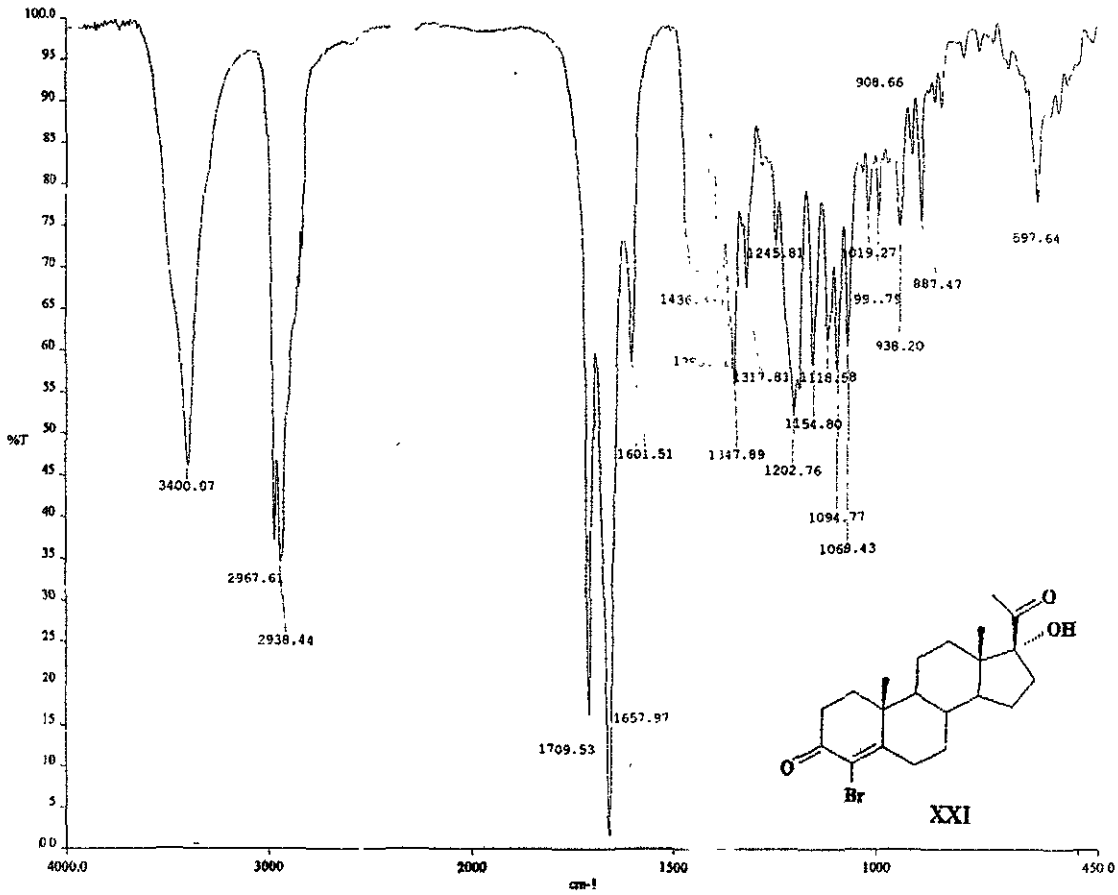


Figura 7.22. Espectro de IR de 4-Bromo-17 α -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona XXI

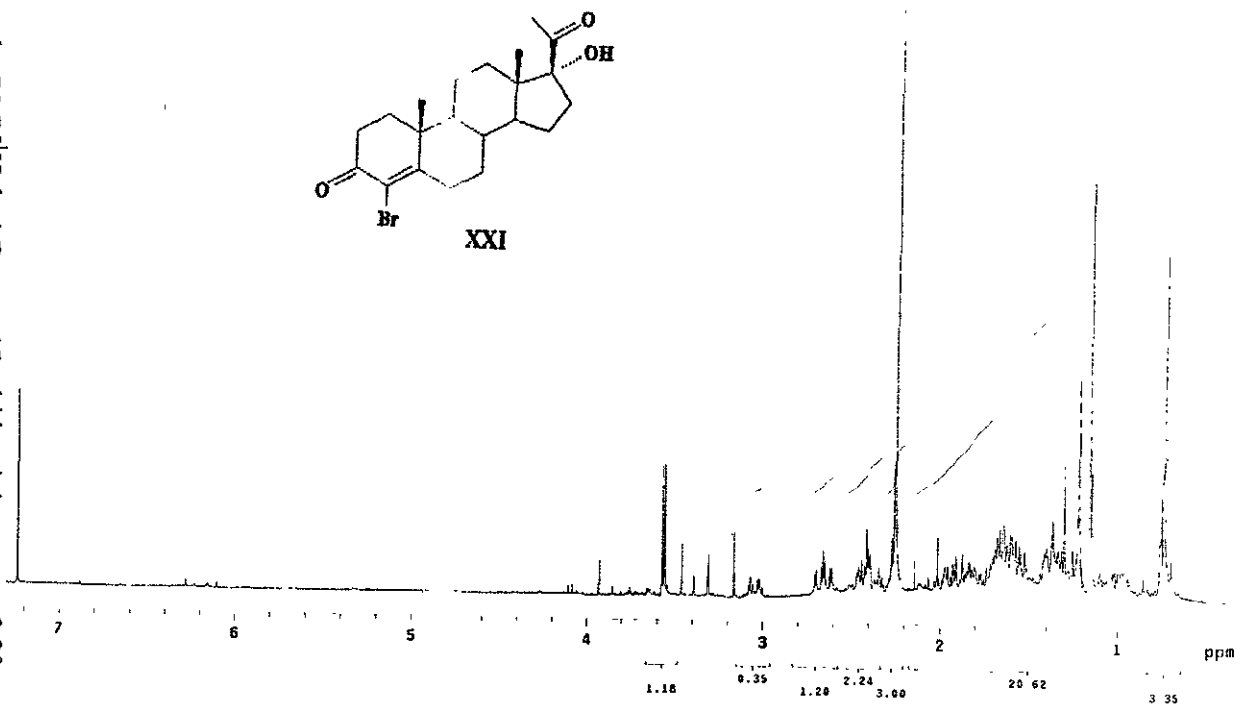


Figura 7.23. Espectro de RMN^1H de 4-Bromo-17 α -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona XXI

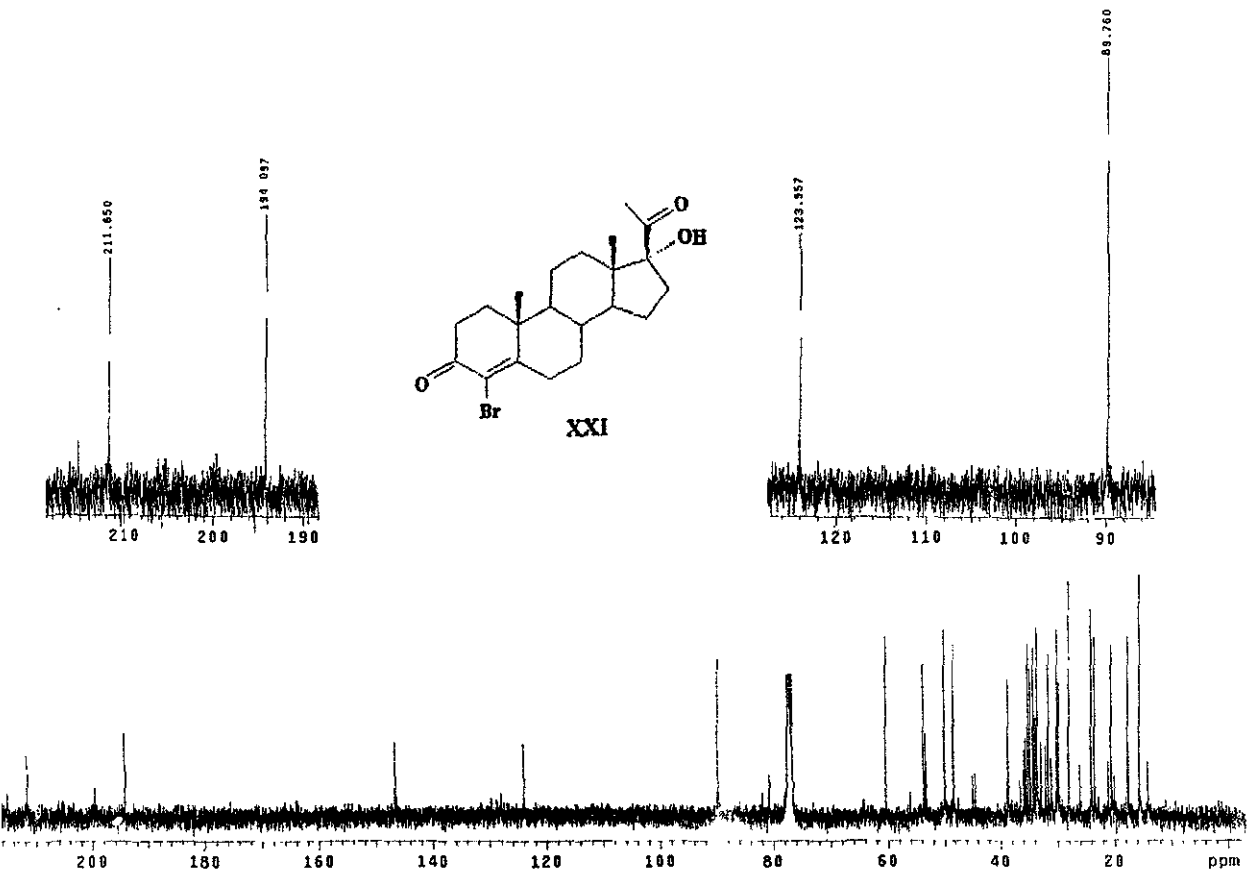


Figura 7.24. Espectro de RMN^{13}C de 4-Bromo-17 α -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona XXI

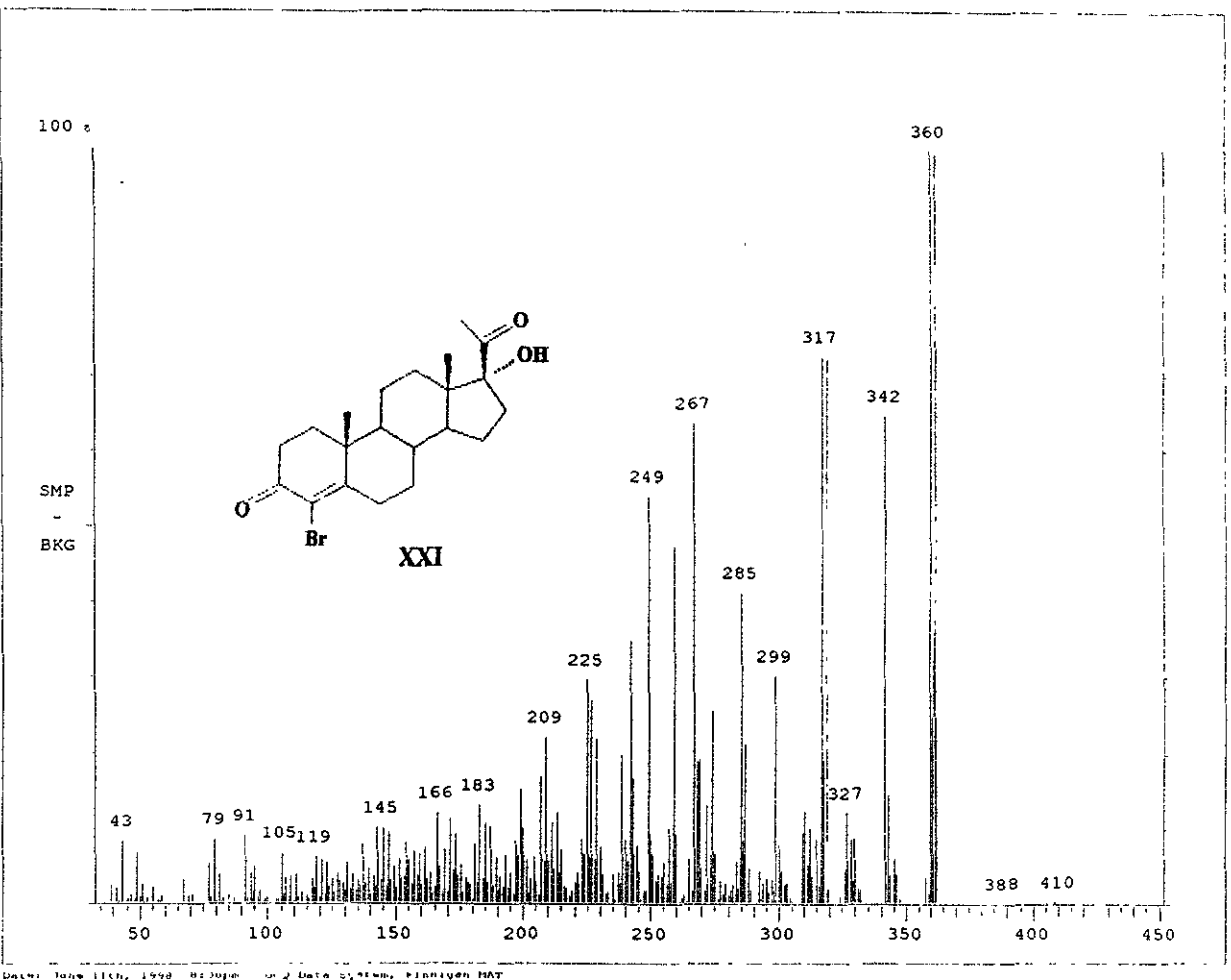


Figura 7.25. Espectro de EMIE de 4-Bromo-17 α -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona XXI

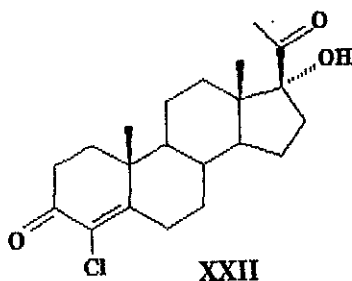
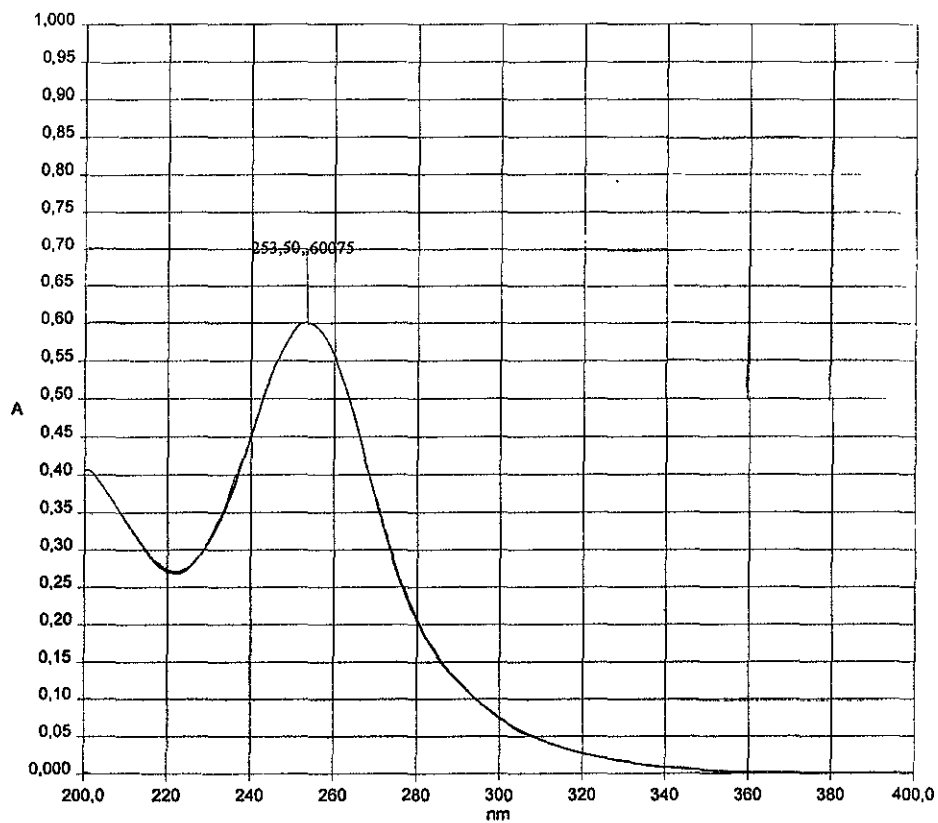


Figura 7.26. Espectro de UV de 4-Cloro-17 α -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona
XXII

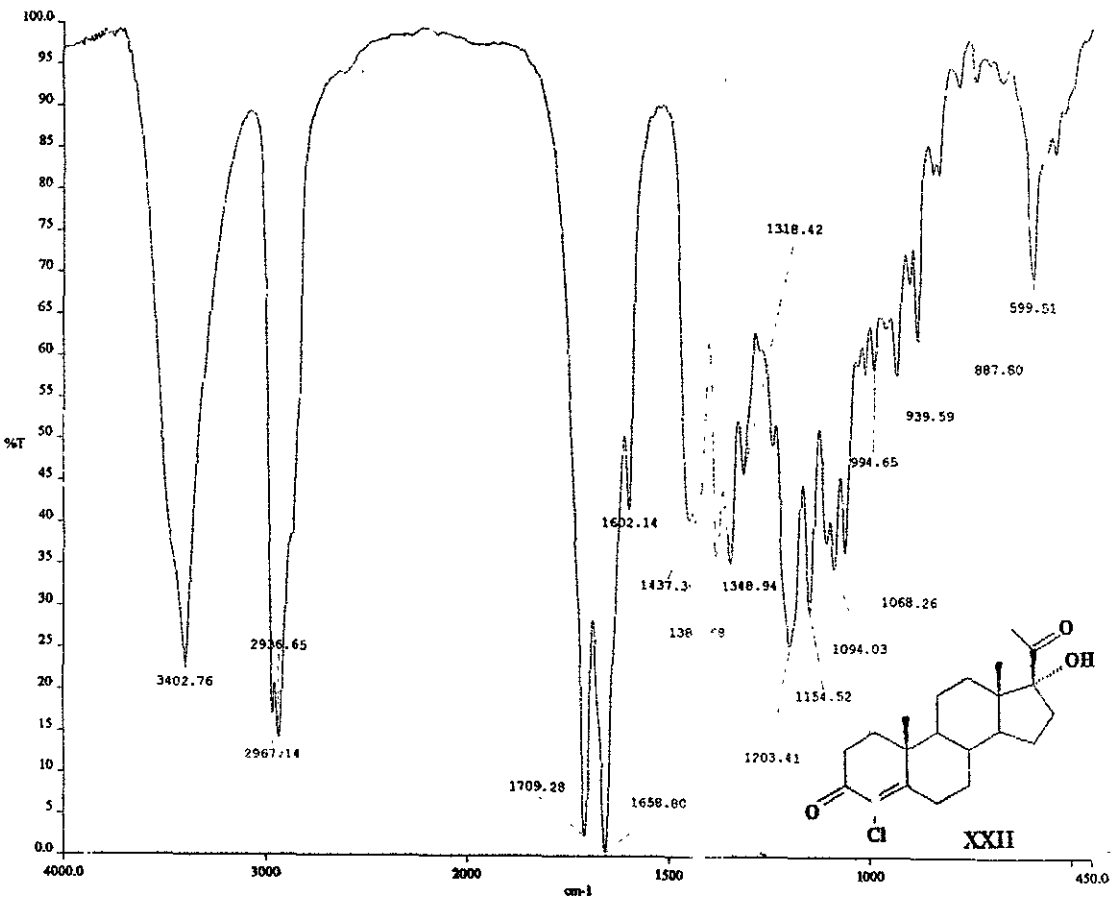


Figura 7.27. Espectro de IR de 4-Cloro-17 α -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona
XXII

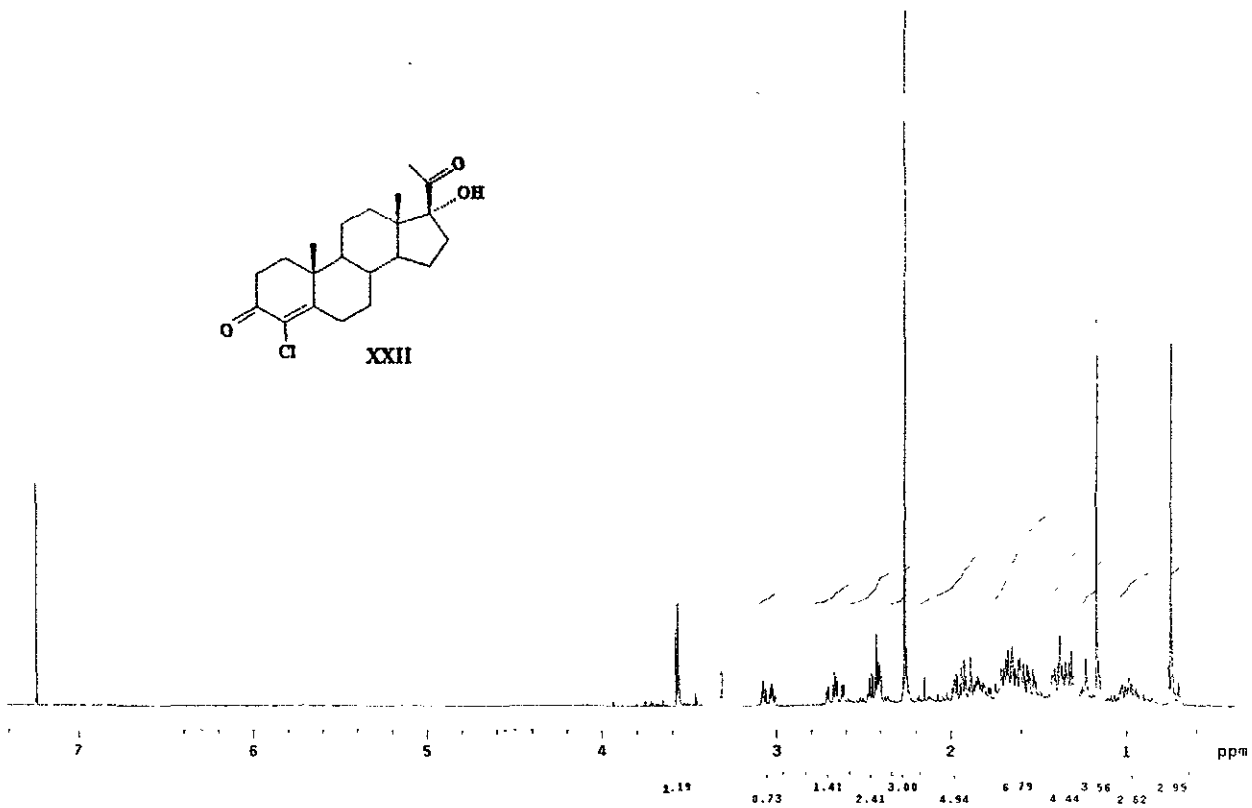


Figura 7.28. Espectro de RMN¹H de 4-Cloro-17 α -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona XXII

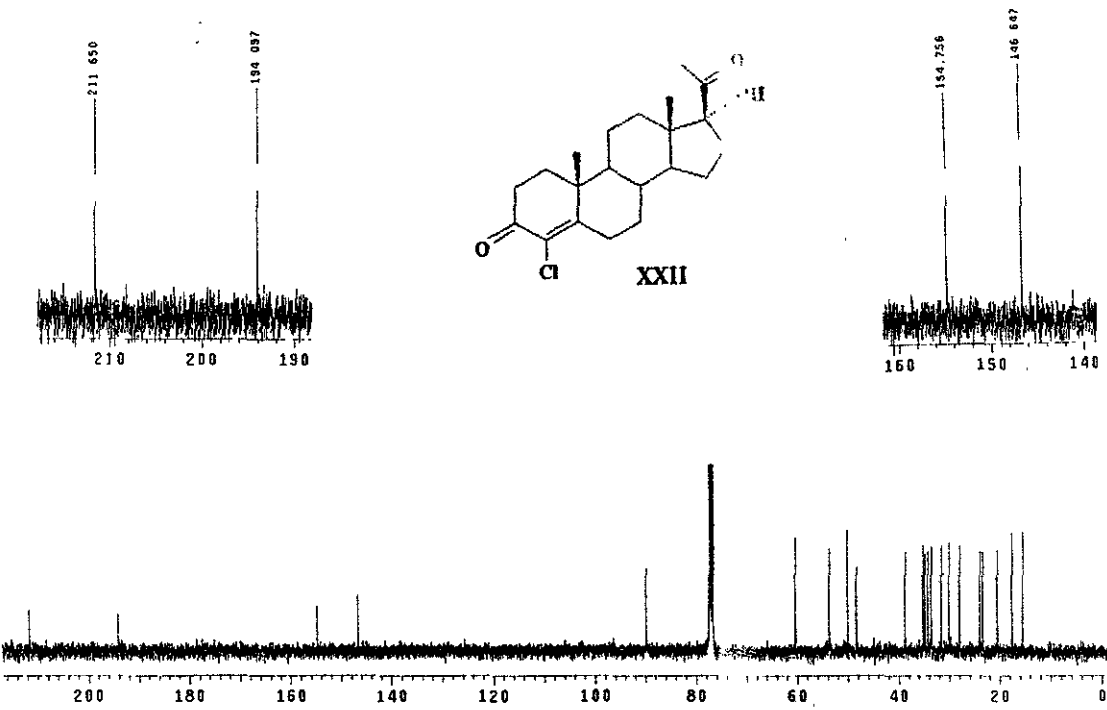


Figura 7.29. Espectro de RMN ^{13}C de 4-Cloro-17 α -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona XXII

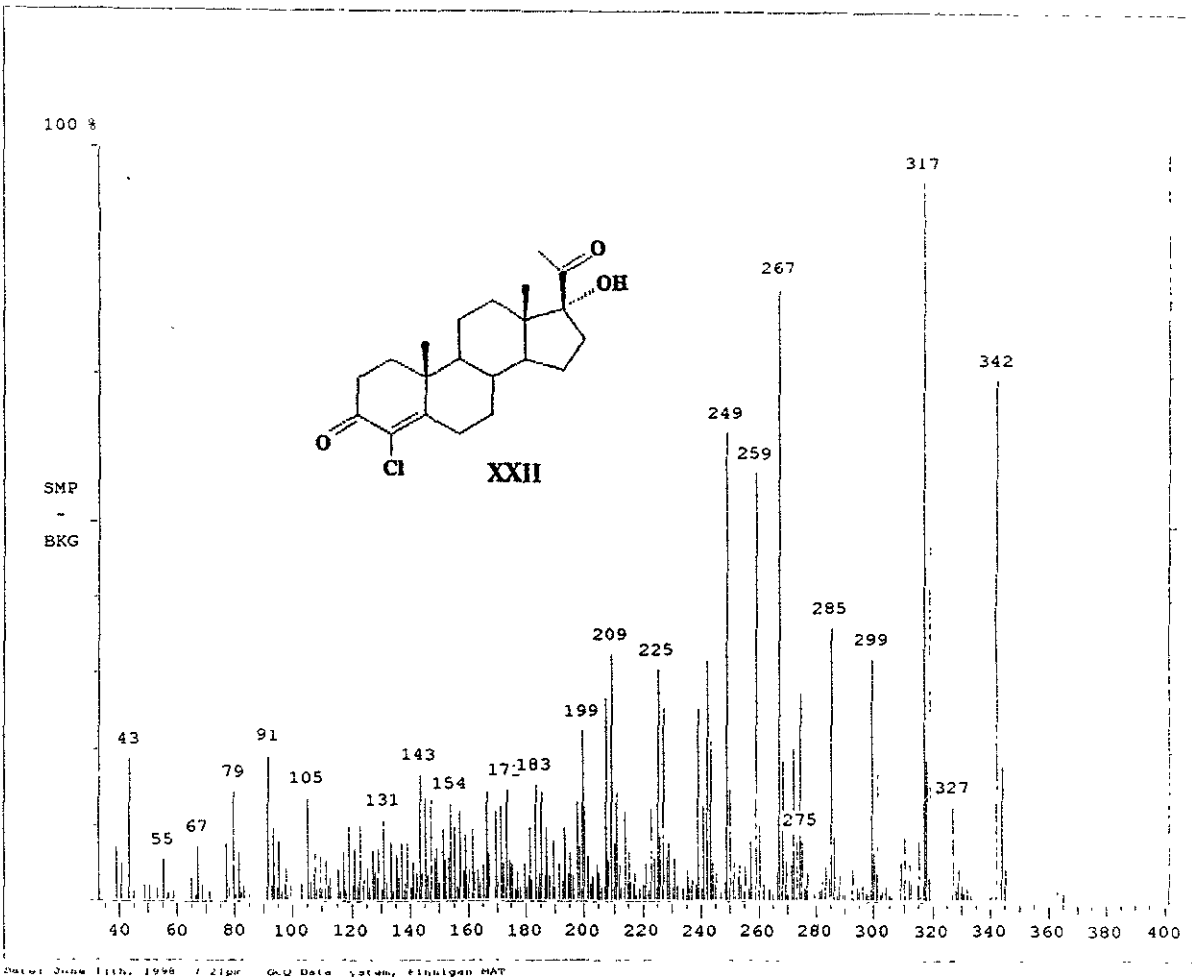


Figura 7.30. Espectro de EMIE de 4-Cloro-17 α -hidroxi-4-pregnen-3,20-diona XXII

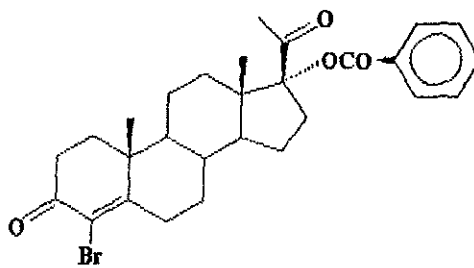
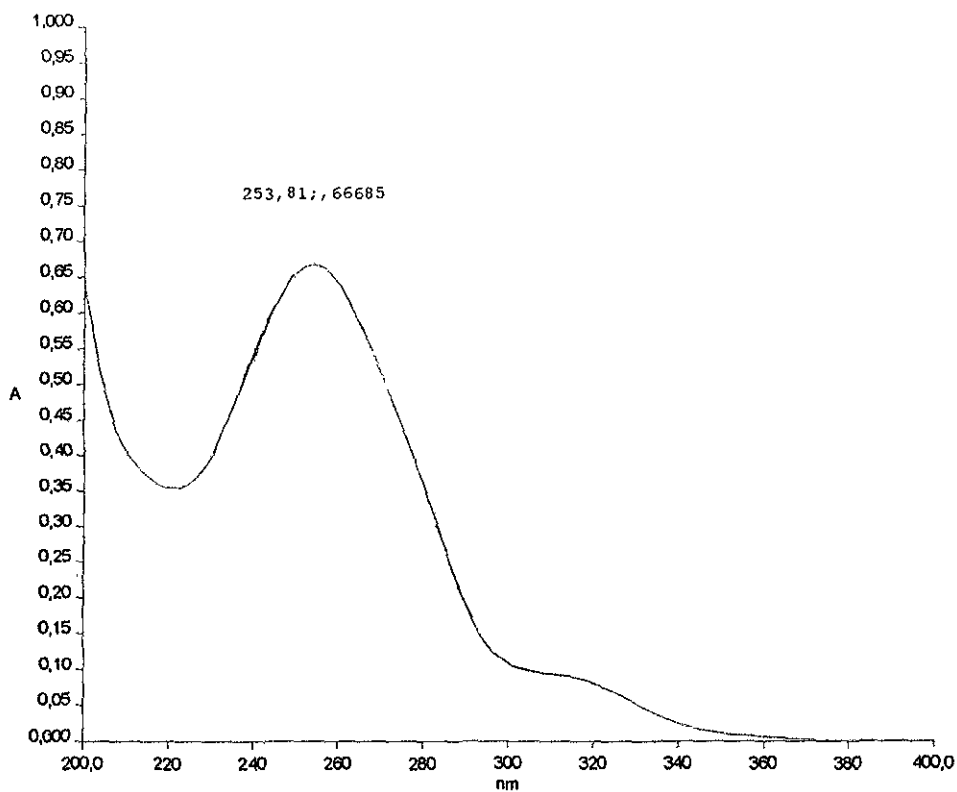


Figura 7.31. Espectro de UV de 4-Bromo-17 α -benzoiloxi-4-pregnen-3,20-diona XXIII

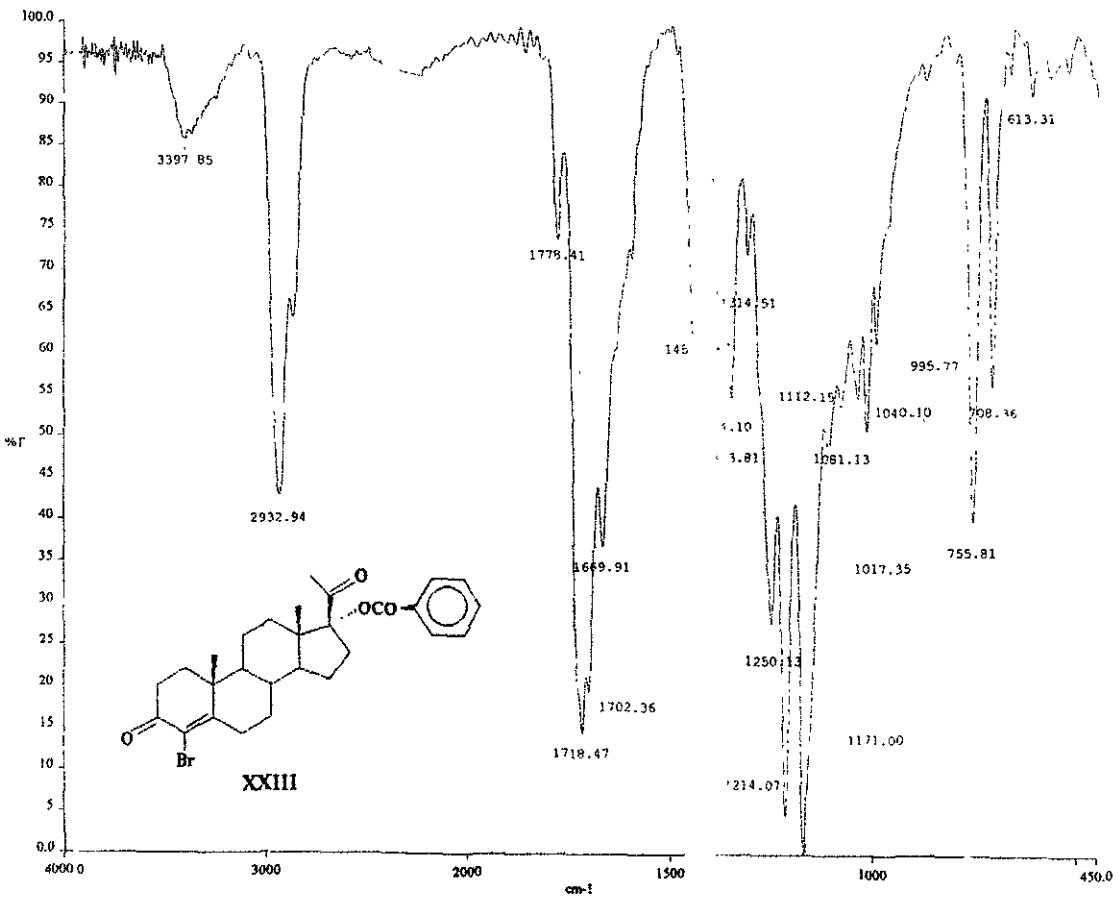


Figura 7.32. Espectro de IR de 4-Bromo-17 α -benzoiloxi-4-pregnen-3,20-diona XXIII

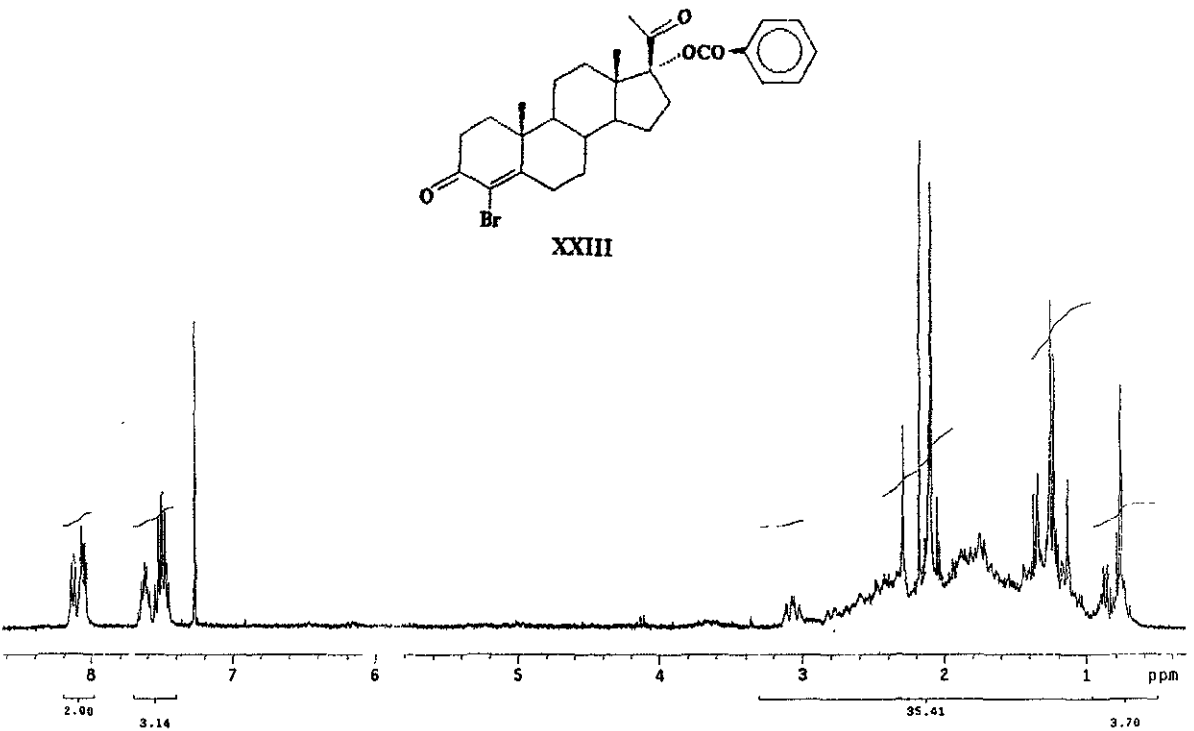


Figura 7.33. Espectro de RMN¹H de 4-Bromo-17 α -benzoihoxi-4-pregnen-3,20-diona **XXIII**

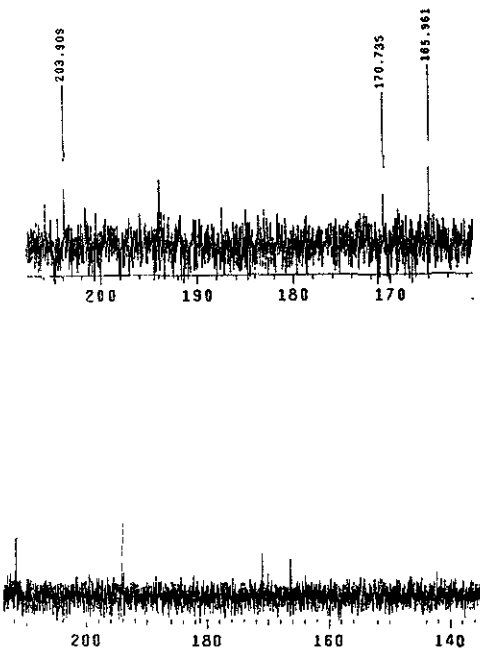
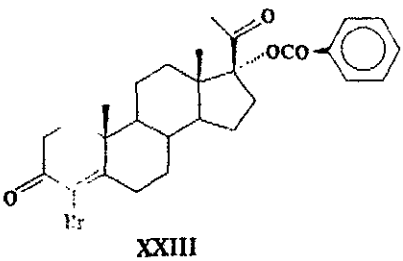


Figura 7.34. Espectro de RMN¹³C de 4-Bromo-17 α -benzoihoxi-4-pregnen-3,20-diona **XXIII**

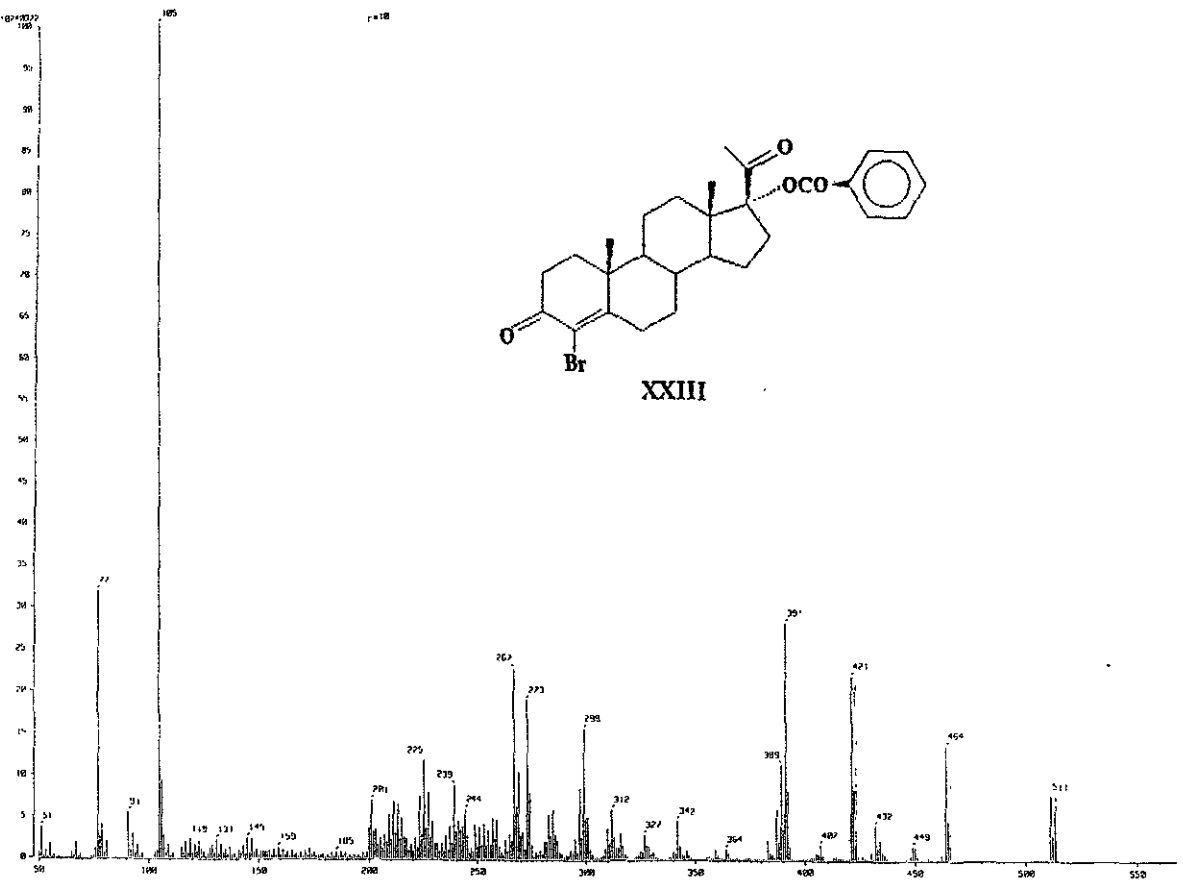
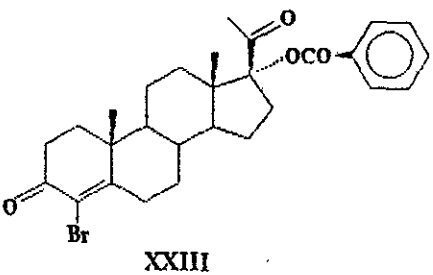


Figura 7.35. Espectro de EMIE de 4-Bromo-17 α -benzoihoxi-4-pregnen-3,20-diona **XXIII**

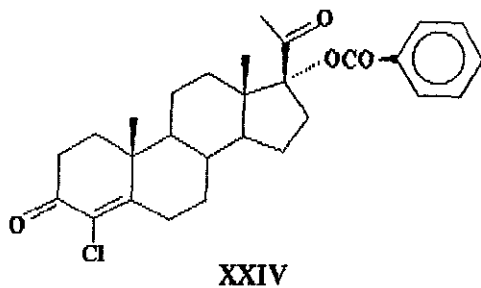
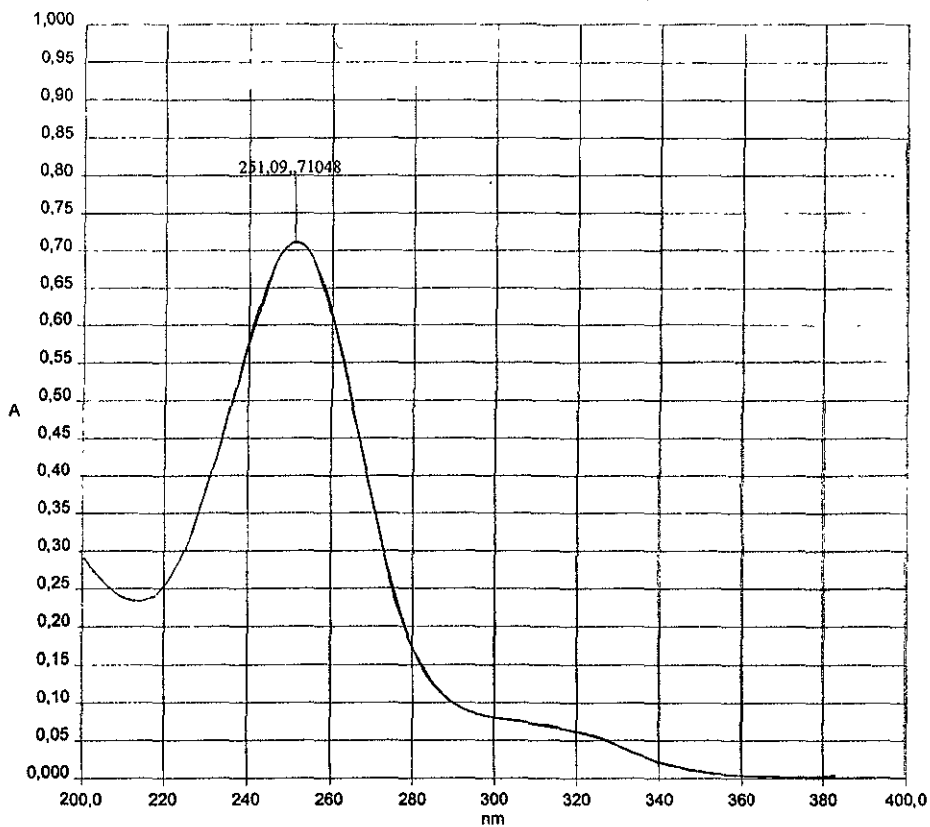


Figura 7.36. Espectro de UV de 4-Cloro-17 α -benzoiloxi-4-pregnen-3,20-diona XXIV

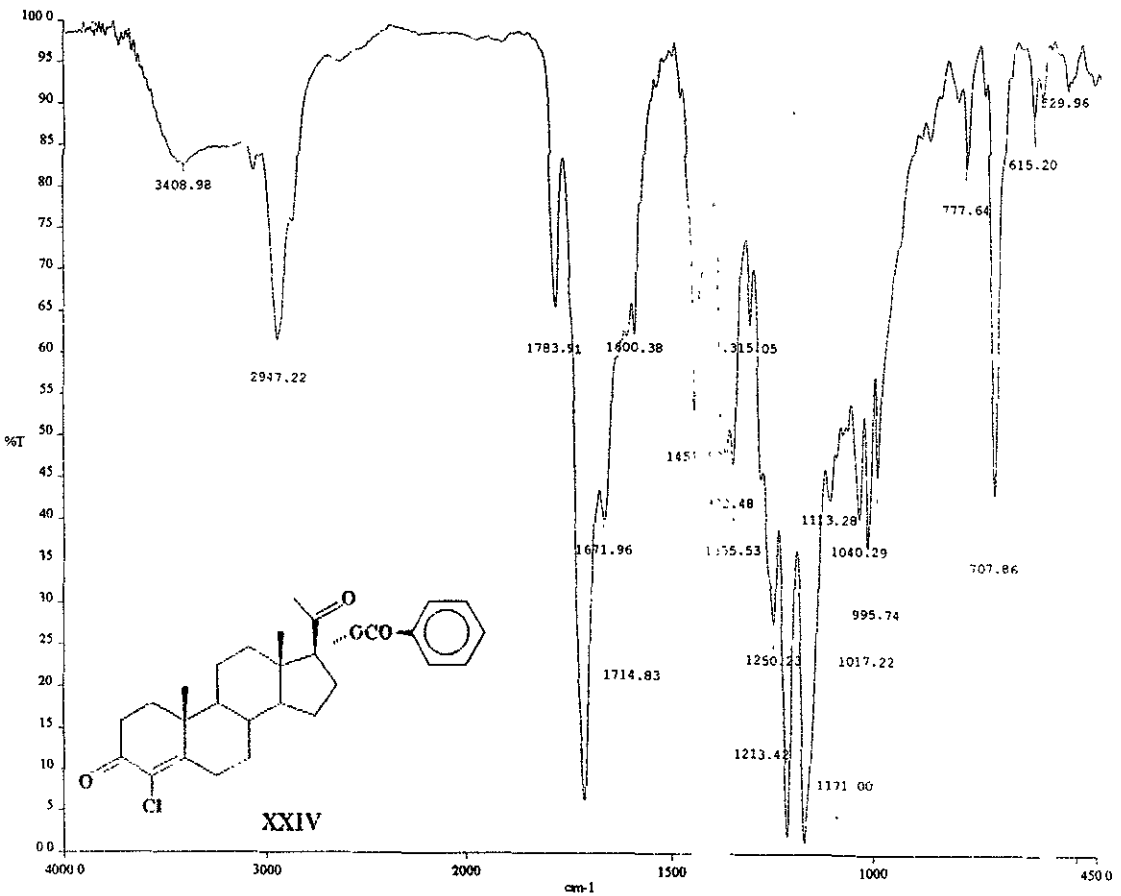


Figura 7.37. Espectro de IR de 4-Cloro-17 α -benzoióxi-4-pregnen-3,20-diona XXIV

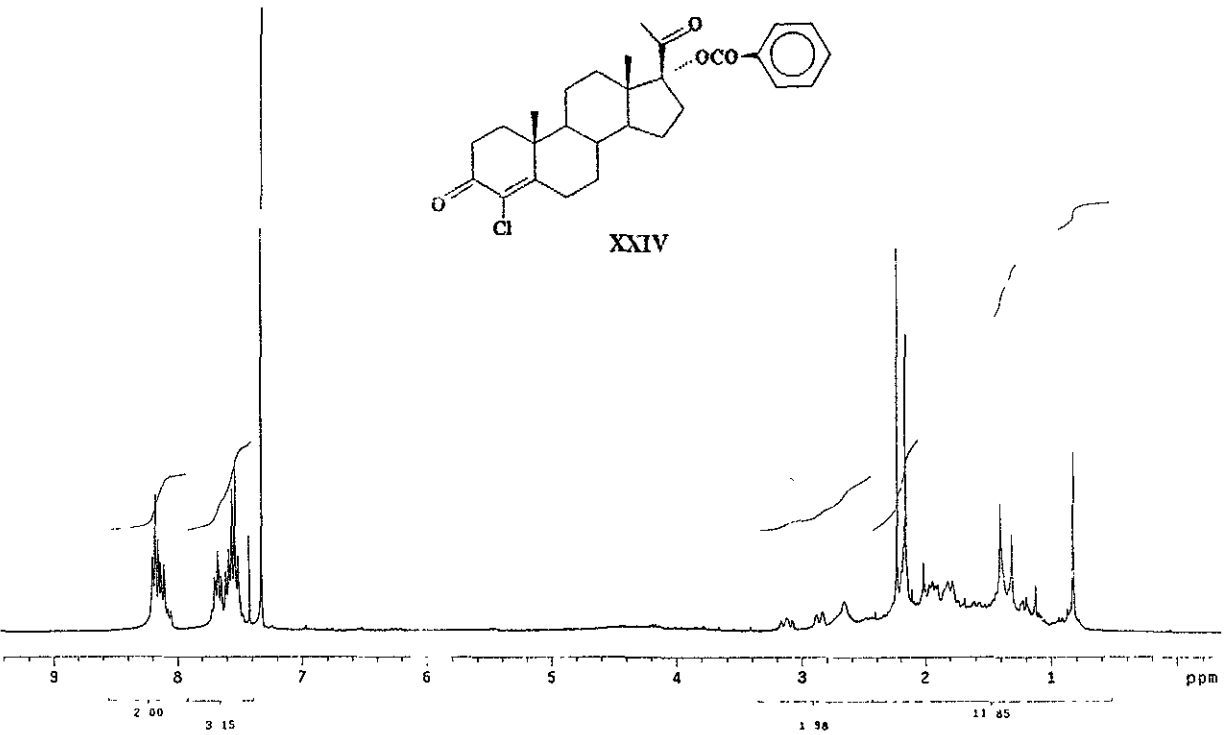


Figura 7.38. Espectro de RMN¹H de 4-Cloro-17 α -benzoiloxi-4-pregnen-3,20-diona XXIV

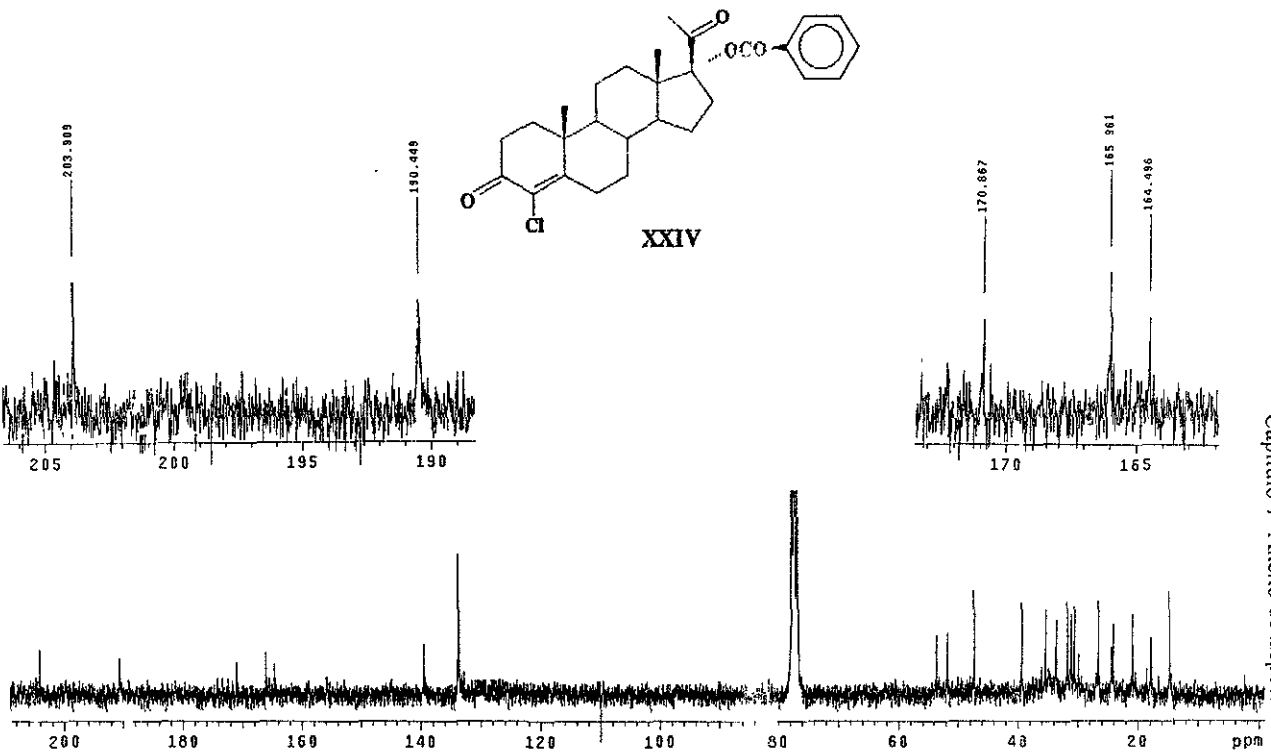


Figura 7.39. Espectro de RMN^{13}C de 4-Cloro-17 α -benzoihoxi-4-pregnen-3,20-diona XXIV

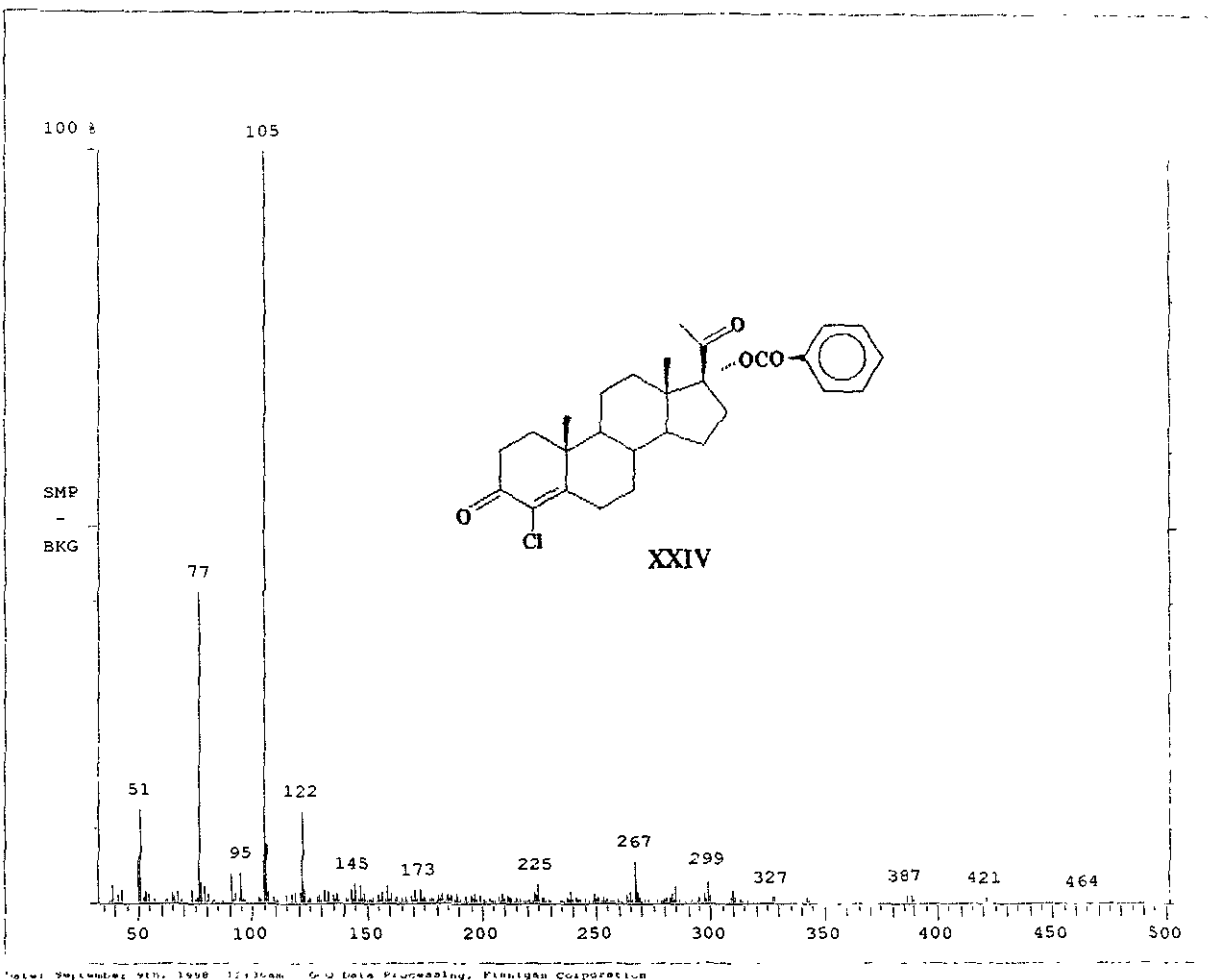


Figura 7.40. Espectro de EMIE de 4-Cloro-17 α -benzoihoxi-4-pregnen-3,20-diona XXIV

BIBLIOGRAFIA

1. Wilson J.D.:The pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *Am. J. Med.* 1988. Vol.68. 745-748.
2. Walsh, P.C., Benig prostatic hyperplasia. In: Cambell's urology, Vol1. Walsh, P.C., Retik,A.B., Stamey, T.A., Vaughan, E.D (Eds) W.B. Saunders Philadelphia 1992, 1007-1028.
3. Catalona, W.J. and Scott, W.W. Carcinoma of the prostate. In Walsh, P.C., et.al.(eds). Campbell's Urology. Fifth edition. Philadelphia, W.B. Saunders Co., 1463-1486.
4. Boring. C.C. Squires, T.S. Tong, T., Cancer statistics, *Cancer.J.Clin:* 1995, 45:8-30.
5. Hoocker, C.W. Reproduction in the male. In: Ruch, T.C. and Patton, H.D. Physiology and Biophysics, 19th Ed.W.B.Saunders Co., Philadelphia. 1205-1207. 1965.
6. Isaccs, T., 5 α -reductase inhibitors and the treatment of binign prostatic hyperplasia. *Drug. Fut.* 1993,29 (5):335-342.
7. Bratoeff E., Flores G., Ramirez E. And Valencia N. The pharmacology of the antiandrogens. *Chimica. OGGI.*1997. 67-69.
8. Hugins,C. and Hodges, C.V. Studies of prostatic cancer. The effect of castration, of estrogen and of androgen injections on serum phosphatase in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer Res.*,1941 Vol1:203-205.
9. Ramsi S. Cotran, Vinay Kumar y Stanley: Patología Estructural y funcional. Cuarta edición,1990, VolII., Madrid. 1173-1176.
- 10.Litter M. Farmacología Experimental y Clínica. Sexta edición, 1980. 1218-1233.
- 11.Wilson, J.D.The endocrine control of sexual differentiation. *Harvey lecture* 1984,79:145-172.
- 12.Calderon D., Bratoeff E y Ramirez E. Antiandrógenos más usuales, reflexiones sobre la síntesis orgánica. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* 28.No.1, 1997. 24-29.
- 13.Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9^o. Ed.Cap. Andrógenos y Antiandrógenos.
- 14.Meares, E.M. Prostatitis and related disorders. In: Cambell's urology, Vol1. Walsh, P.C., Retik,A.B., Stamey, T.A., Vaughan, E.D. (Eds) W.B. Saunders Philadelphia 1992, 807-822.
- 15.Marc B. Garnic. Investigación y Ciencia. Junio 1994 "Cáncer de próstata". 45-53.

16. Bratoeff E., Flores G., Ramírez E., Flores C., Calderón D., et al. Síntesis de Nuevos inhibidores de 5α -reductasa. *Rev. Mex. Cienc Farm.* Vol 28 No.6 Mex. 1997. 13-19.
17. Garnic, M.B. Prostate Cancer. Screening, diagnosis and management. *Ann. Intern. Med.* 1993, 118:804-818.
18. Brooks, R., Berman, C., Nguyen, H., et al. Effect of castration, DES, flutamide and the 5α -reductase inhibitor, MK-906, on the growth of the Dunning rat prostatic carcinoma, R-3327. *Prostate* 1991, 18: 215-17.
19. Isaacs, T. J.T., 5α -reductase inhibitors and the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Drug. Fut.* 1993, 29(5): 335-342.
20. Brian W. Metcalf, Mark A. Levy and Dennis A. Holt. *Trends Pharmacolo. Science.* 1989, (10), 491-95.
21. Bull H., García M., Anderson S., *J. Am. Chem. Soc.*, (1996), Vol. 18, 2359.
22. Traish A., Muller R., Wotiz H., 1985 "Interaction of cyproterone acetate with rat prostatic androgen receptors". *Steroids*, (45) 247-262.
23. Morris J., Hughes L., Glen A., Taylor P., 1991 "Non-steroidal antiandrogens. Design of novel compounds based on infrared study of the dominant conformation and hydrogen-bonding properties of a series of anilide antiandrogens". *J. Med. Chem.*, 34: 447-452.
24. Labrie C., Trudel C., Shengmin L., 1991 "Combination of an antiandrogen and 5α -reductase inhibitor: a further step toward total androgen blockage". *Endocrinology*, 128:1163-1167.
25. Eil C., 1992 "Ketoconazole binds to the human androgen receptor". *Horm. Metab. Res.*, 24:367-370.
26. McConnel, J.D. Androgen ablation and blockade in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Urol. Clin. N. Amer.* 1990, 17:661-70.
27. Isaacs, T., 5α -reductase inhibitors and the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Drug. Fut.* 1993, 29(5):335-342.
28. McGinley, J., Guerrero, L., Gautier, T., Peterson, R.E., *Steroid 5α -reductase deficiency in 65 year old male pseudohermaphrodite: The natural history ultrastructure of testes and evidence for inherited enzyme heterogeneity.* *Science* 1974, 186:1213-15.
29. Wilson J.D. The endocrine control of sexual differentiation. Harvey lecture 1984, (79) 145-72.
30. Petrow V., Wang Y., and Lack L., Prostatic cancer as an irreversible inhibitor of rat prostatic Ketoosteroids 5α -reductase. *Steroids* 1981, 38:121-39.

31. Petrow V., Padilla G., and Mukherji S., Endocrine dependence of prostatic cancer upon dihydrotestosterone and not upon testosterone. *J. Pharm. Pharmacol.* 1984, 36:352-353.
32. Bratoeff, E., Flores, G., Ramírez, E. and Calderón, D., *J. Pharm. Sci.* 1997 in press.
33. Kochakian C.D., Arimasa N., The metabolism in vitro of Anabolic-Androgenic Steroids by Mammalian Tissues. *Handb. Exp. Pharmacol.* 1976, 43, 287-359.
34. Bratoeff, E., Flores, G., Ramírez, E., Valencia, N., and Calderón, D., *Rev. Mex. Cienc. Farm.* 1997 in press.
35. Vladimir, P., Wang, Y., and Lack, L. 1981 "prostatic cancer" *Steroids*, 38(2):121-140.
36. Yoshioka, K. And Goto, G. 1975. "Studies on antiandrogenic agents.-Synthesis of 16-ethyl-19-nortestosterone". *Chem. Pharm. Bull.*, 23(12): 3203-3207.
37. Deghenghi, R., Revesz, C., New synthesis and structure activity relationships in the 17-alkylated progesterone series, *J. Med. Chem.* 1963, 6:301-304.
38. Cooke, B., Vallance, D., Metabolism of megestrol acetate and related progesterone analogues by liver preparations in vitro, *Biochem. J.* 1965, 97:672-677.
39. Shapiro, E., L., Weber, L. Y Harris, H. 1972. "Synthesis and biological activity of 17-esters of 6-dehydro-16-methylene-17 α -hydroxyprogesterones" *J. Med. Chem.*, 15:716-720.
40. Glatz, B. y Helmchen, G. 1979. "A total synthesis and structural aspects of racemic 8- Oxigenated tetracyclines". *J. Am. Chem. Soc.*, 101:2171-2176.
41. Fieser L., F. y Goto, T. 1960. "Oxido alcohols and ketoxidos" *J. Am. Chem. Soc.*, 82:1693-1698.
42. Loken, B., Kaufman, B., Rosenkranz, S. Y Sondheimer, G. 1956. "Steroids LXXVII: Synthesis and reactions of 16-oxigenated *pregna-20-ona* derivatives" *J. Am. Chem. Soc.*, 78:1738-1744.
43. Hertz, J., E., Cruz, S. Y Torres, V. 1977. "Esters of 17 α -ethinyl-19-nortestosterone and hindered acids". *Synth. Comm.*, 7:383-387.
44. Shering, A. 1963. "6-chloro-16 α -ol-3,20-dioneacetate". *Chem. Abs.*, 59:101.
45. Akagi, S. Y Tsuda, K. 1961. " bromoderivatives of chlolesterol". *Chem. Pharm. Bull.*, 9: 464-468.
46. Harmesh R., Naik, M.D., Nopporn Choeypunt M.D. and Kenneth J. Chemoprevention of prostate cancer, *Drugs of Today* Vol.31(7), 1995, 537-544.

47. Newsholme E., and Leech A., *Biochemistry for the medical sciences*. John Wiley & Sons 1983, USA, 720-25, 765.
48. Murray R., Granner D., Mayes P., and Rodwell V., *Bioquímica de Harper* 11ª. Ed. El Manual Moderno. México D.F. 1998:533-35.
49. Shapiro E., Legatt T., 16-Alkylated progesterones. *J. Med. Pharm. Chem.* 1962, 5:975-988.
50. Calderon D., Valencia N., Bratoeff E. y Ramirez E., Evaluación Farmacológica de dos nuevos fármacos esteroideos sintéticos, con posible actividad antiandrogénica, *Rev. Mex. Cienc. Farmac.* 28 No.2 1997, 13-16.
51. Petrow V., Padilla G., and Mukherji S., Endocrine dependence of prostatic cancer upon dihydrotestosterone and not upon testosterone. *J. Pharm. Pharmacol.* 1984, 36:352-353.
52. Liao S., Leong T., Tymocenko J.L. Structural recognition in interactions of androgens and receptor proteins and their association with nuclear components, *J. Steroid. Biochem.* 1972, 3:401-407.
53. Imperato-McGinley, J. Peterson R., Leshin, M. et al Steroid 5 α -reductase deficiency in a 65 year old male pseudohermaphrodite: The natural history ultrastructure of testes and evidence for inherited enzyme heterogeneity. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1980, 50: 15-21.
54. Krieg M., Bartsch W., Janssen W., A comparative study of binding, metabolism and endogenous levels of androgens in normal, Hyperplastic and carcinomatous human prostate. *J. Steroid. Biochem.* 1979, 11:615-24.
55. Bruchofsky N., comparison of the metabolites formed in rat prostate following the in vivo administration of seven natural androgens. *Endocrinology* 1971, 89: 1212-18.
56. Isaccs J., Brendler C., Walsh P., Changes in the metabolism of dihydrotestosterone in the hyperplastic human prostate, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1983, 56: 139-46.
57. McConnell J., Androgen ablation and blockade in the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Urol. Clin. N. Amer.* 1990, 17: 661-70.
58. Mallamo J., Pilling G., Wetzel J., et al. Antiandrogenic steroidal sulfonylheterocycles. Utility of electrostatic complementary in defining biospecific sulfonyl heterocycles, *J. Med. Chem.* 1992, 35:1663-70.
59. Labre C., Trudel L. And Shengmin L., Combination of antiandrogen and a 5 α -reductase inhibitor: a further step towards total androgen blockade, *Endocrinol.* 1991, 128, 1673.
60. Rabasseda, X. And Fitzpatrick, J. Mamsulosin. The first prostate-selective α -adrenoceptor antagonist for the treatment of symptomatic benign prostatic hyperplasia *Drugs of Today* 1996, 32 (suppl C).

61. Santen R., Hormonal therapy of prostate cancer: Choosing among several available options *Intl. J. Of Andrology* 1989,12:165-70.
62. Traish A., Muller R., Wotiz H., 1985 "Interaction of cyproterone acetate with rats prostatic androgen receptors". *Steroids*,(45) 247-262.
63. Shibata K., Takegawa S., Antiandrogen 1,2-oxapregnane sterids. *Cham. Pharm. Bull.* 1992,40(4):935-41.
64. Clark C., and Nowell N., BOMT is not an androgen antagonist within the central nervous system. *Steroids* 1979, 34:139-49.
65. Midgley A., and Fowkes G., The metabolic fate of the anti-androgenic agent oxendolone in man, *Steroids* 1983,41: 521-36.
66. Biffignandi P., Molinatti G., antiandrogens and hirsutism, *Hormone Res.* 1987,28: 242-49.
67. Jagarinec N., and Givner M., 1981,"Effect of Medrogestosterone on conversions of pregnenolone in rat testis". *Archives of Andrology*,7:35-37.
68. Rasmusson G., Chen A., 1972. "Androgens. *J. Med. Chem.* 15 (11) 1165-1168.
69. Eil C., 1992. "Ketoconazole Binds to the human androgen receptor" *Hormone Metab. Res.*, 34:367-370.
70. Hirosumi J., Nakayama O., and Inami M., "FK143, a novel nonsteroidal inhibitor of steroid 5 α -reductase. *J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.*, 52(4):365-73.
71. Angelova P., Davidoff, M., 1991. "Substance P-induced inhibition of Leydig cell steroidogenesis in primary culture". *Andrology*.23:325-27.
72. Bosh R., Griffiths D., Blom J., Schroeder F., Treatment of benign prostatic hyperplasia by androgen deprivation: Effects on prostate size and urodynamic parameters. *J. Urol.* 1989,141:68-72.
73. Grino P., Griffin J., and Wilson J., Testosterone at high concentrations interacts with the androgen human similarly to DHT, *Endocrin.* 1990,126:1165-72.
74. Marker R., Tsukamoto T., Sterols C. Diosgenin. *J. Am. Chem. Soc.* 1940 62:2525-300.
75. Griffin C., and Kundu S., Preparation and Ring-Opening Reactions of α,β - and β,γ - Epoxyalkylphosphonates. *J. Of Organic Chemistry*. 1956. Vol.78. 1532-34.
76. Payne G., Deming P., and Williams P., Reactions of hydrogen peroxide. Alkali-Catalyzed Epoxidation and Oxidation using a nitrile as Co-reactant. 1961. Vol.26. 659-662.
77. Ringold H., Batres J., Mancera O., and Rosenkranz. Synthesis of 4-halo hormone analogs 1956,21:1432-1435.

78. Bjarte L., Kaufmann S., and Sondheimer F., Synthesis and Reactions of 16-Oxygenated Pregnan-20-one Derivatives. 1955 J. Of Organic Chemistry Vol.78,1738-1742.
79. Shapiro E., Weber L., Harris H., Synthesis and biological activity of 17-esters of 6-dehydro-16-methylen-17^a- hidroxy-progesterones. J.Med.Chem. 1972,15.716-20.
80. Wilson J.D. The endocrine control of sexual differentiation. Harvey lecture 1984,(79) 145-72.
81. Bratoeff E., Flores G., Ramirez E., Valencia N., *Chimica Oggi/Chemistry Today*,(1997), 67.15-19.
82. Voigt W, Hsia LS (1972). The antiandrogenic action of 4-androsten-3-one, 17-beta-carboxylic acid and its methyl ester on hamster flank organs. *Endocrinology* 90: 73-80.
83. Vermorken AJM, Goos CMAA, Wirtz P. (1982). Evaluation of the hamster flank organ test for the screening of antiandrogens. *Br. J. Dermatol.*106: 99-101.
84. Weinberger MJ and Venezia Cm (1980). Nuclear acceptor sites for androgen-receptors in seminal vesicles complexes epithelium. *J. Biochem.* 192:41-47.