



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

2
2Ej

FACULTAD DE QUIMICA

"SINTESIS Y EVALUACION ANTIANDROGENICA DE
NUEVOS DERIVADOS DEL D-HOMO PREGNANO:

17 α -BENZOILOXI-16 β -FENIL-6-HALO-
17 β -METIL-D-HOMO-4,6-PREGNADIEN-3,
17 α -DIONA"

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRIA EN CIENCIAS QUIMICAS
(QUIMICA FARMACEUTICA)
P R E S E N T A :
Q.F.B. HUGO ERASTO HERRERA HIDALGO



MEXICO, D. F. 1999

27-3361

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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. Alfonso Romo de Vivar Romo.
VOCAL: Dr. Rafael Castillo Bocanegra.
SECRETARIO M. en C. José Manuel Méndez Stivalet.
1er. SUPLENTE Dra. María Isabel Aguilar Laurents.
2do. SUPLENTE M en C. Baldomero Esquivel Rdríguez.

Sitios donde se desarrolló el presente trabajo:

Parte Química: Laboratorio 125 del conjunto "E", Departamento de Farmacia, División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química, UNAM.

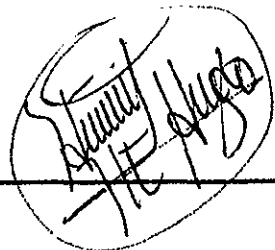
Parte Biológica: Laboratorio de Hormonas, Departamento de Sistemas Biológicos, Universidad Autónoma Metropolitana-Xochimilco, por parte de la Dra. Marisa Cabeza.

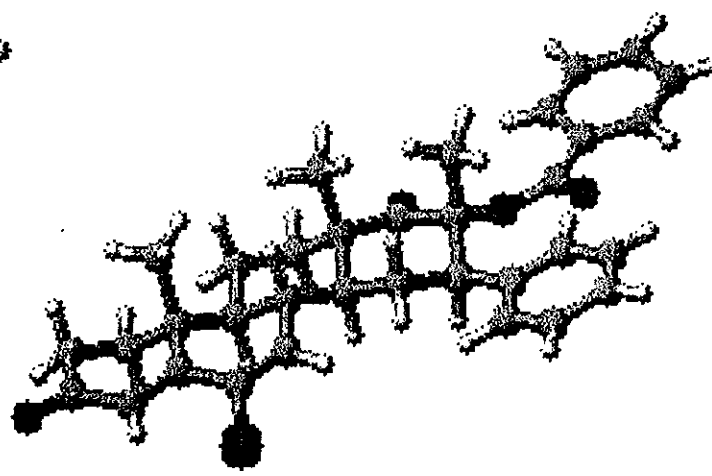
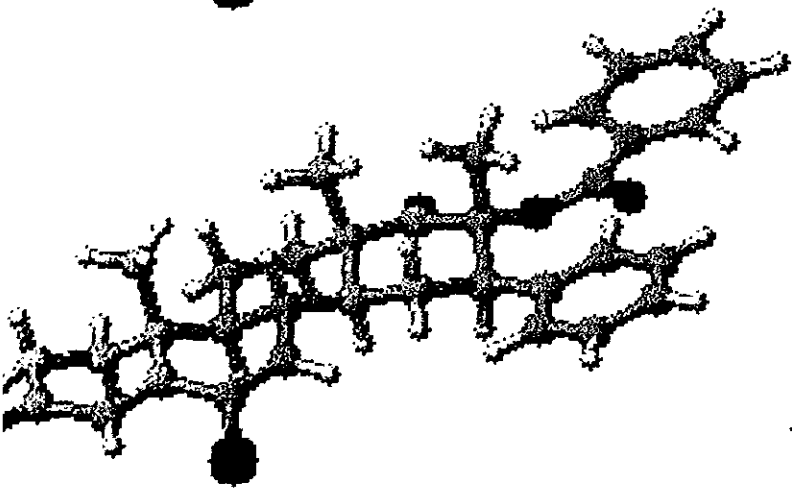
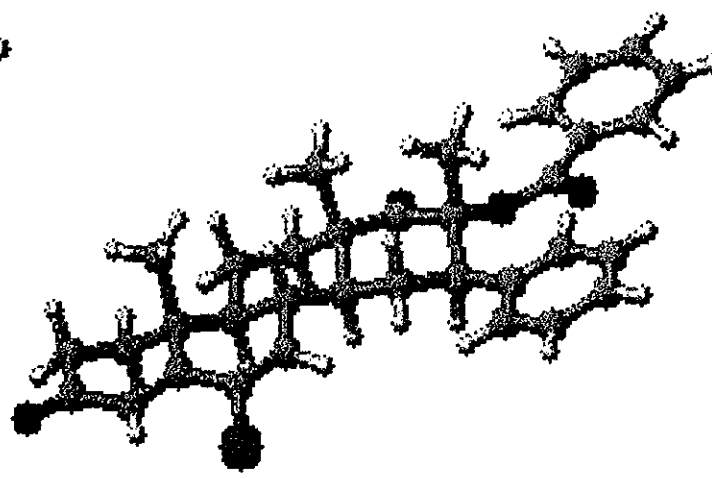
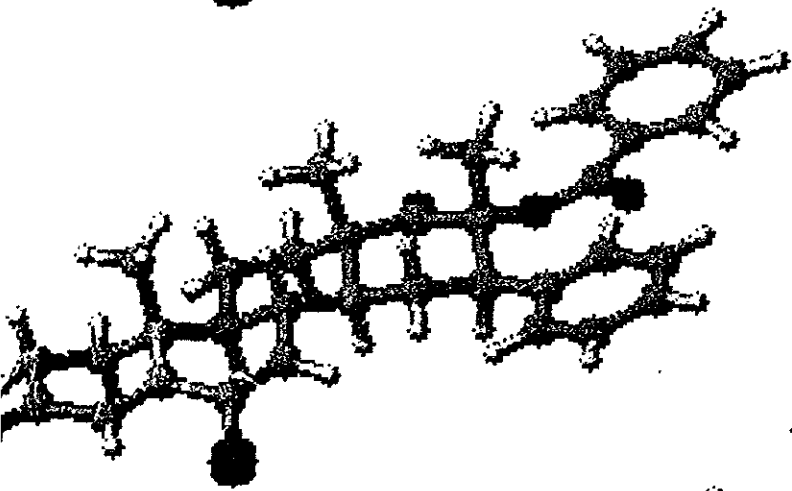
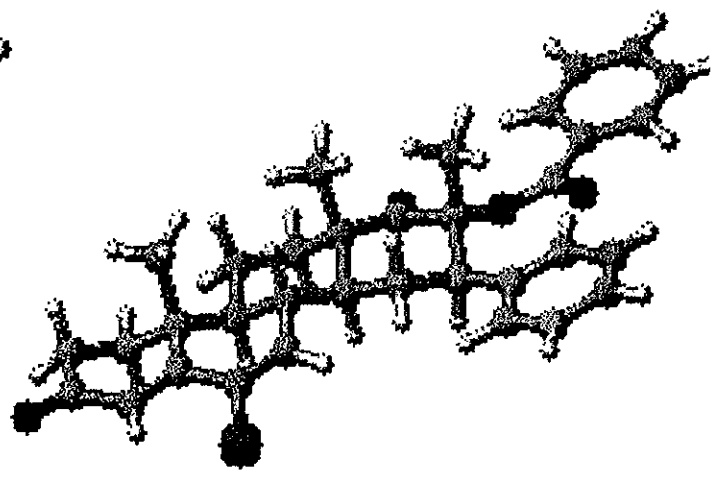
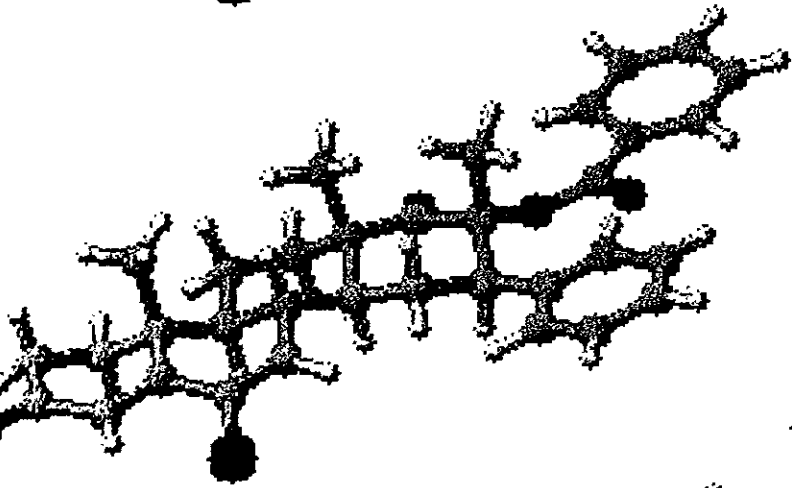
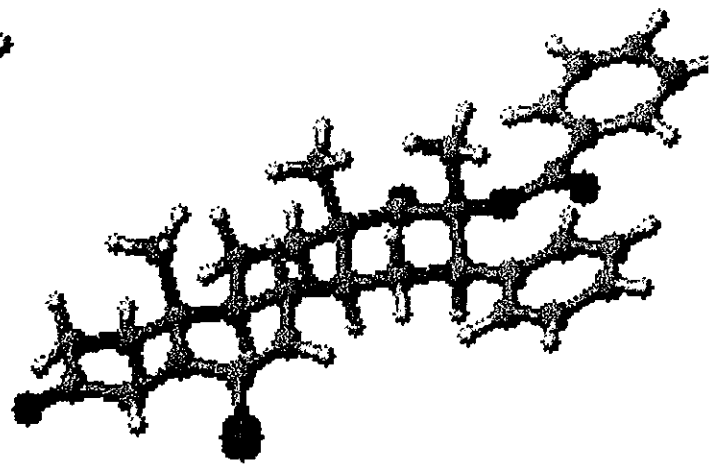
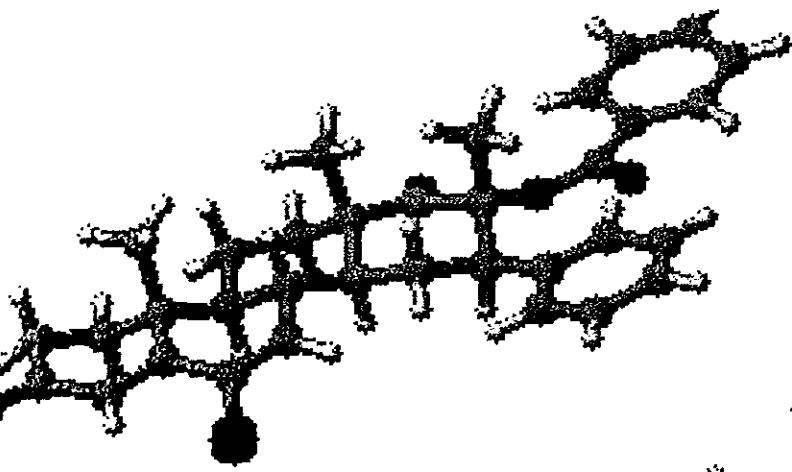
TUTOR:

DR. Eugene A. Bratoeff Titeff Eugene A Bratoeff

SUSTENTANTE:

Q.F.B. Hugo Erasto Herrera Hidalgo





AGRADECIMIENTOS:

A mis padres *Enriqueta Hidalgo M.* y *Erasto Herrera M.*, porque siempre me han apoyado y me han dejado ser; porque han sembrado en mí los deseos de superación, y han confiado en mi; y porque los amo... Mil Gracias!

A la **UNAM**, por brindarme nuevamente la oportunidad de superarme cultural e intelectualmente.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) que a través del proyecto IN 204198 otorgó el soporte financiero para la realización de este proyecto de investigación.

A la Dirección General de Estudios de Posgrado (DGEP) que a través del programa de becas nacionales para estudios de posgrado me proporcionó apoyo económico para la realización de los mismos.

A la USAI por el registro de los espectros de UV, IR, RMN¹H, RMN¹³C y EMIE. En especial a las maestras *Graciela Chávez* y *Marisela Gutiérrez*; a la Q. *Georgina Duarte* y el Q.F.B. *Óscar Yáñez*.

A la *Dra. Marisa Cabeza* y *Alexandra Quiroz* por su invaluable apoyo en la determinación de la actividad biológica de los compuestos sintetizados.

Con gran admiración y respeto al Dr. Eugene Bratoeff, que con sus sólidos conocimientos, paciencia, dedicación y calidez humana, llevó a cabo la dirección del presente trabajo, y contribuyó a mi formación académica, científica y humana...Gracias.

A la vida...

DEDICATORIAS:

A mis maravillosos padres **Enriqueta Hidalgo M.** y **Erasto Herrera M.** por darme lo mas preciado que tengo: La vida... Siempre estarán en mi corazón.

A todos mis hermanos, que a pesar de nuestras diferencias ideológicas hemos alcanzado la felicidad...

A todos mis sobrinos, como un posible ejemplo a seguir... : La vida esta llena de maravillas!

Con especial cariño y respeto a **Misael Martínez** que durante todos estos años hemos alcanzado nuevas metas y objetivos, y **LA MEJOR DE LAS AMISTADES...**
Mil gracias por ser una fuerza motriz en mi vida...

A **Octavio Dublán** por ser un amigo extraordinario que me ha ayudado a comprender, entre miles de cosas, el significado de la vida... te aprecio mucho.

Con mucho cariño para **Norma Márquez** por permitirme compartir sentimientos que nunca había experimentado.

A **Vanessa G., Dulce M., Alejandra S., Georgina H. y Fernando L.** que de alguna u otra manera alentaron la culminación de este trabajo...
Gracias por escucharme.

A **Paty M.** que con sus críticas constructivas hacia mi persona y trabajo lograron de alguna manera que este trabajo llegara a su culminación.

A **Katia S.**, porque en muy poco tiempo llegamos a entablar una buena y divertida amistad.

A las maestras **Gregoria F. y Elena R.** por sus sabios consejos y tips para la realización de este trabajo.

A toda la **Escuelita**, porque a pesar de nuestro distanciamiento objetivo, nuestra unión subjetiva permanece... Nunca los olvidaré.

ÍNDICE

	PÁGINA
RESUMEN	I
ABSTRACT	II
ABREVIATURAS	III
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO 2: ANTECEDENTES	
2.1 Andrógenos.....	3
2.2 Acción molecular de los andrógenos.....	6
2.3 Papel de los andrógenos en el crecimiento de la próstata.....	7
2.4 El Receptor Androgénico (RA).....	8
2.5 La enzima 5 α -Reductasa.....	10
2.6 Cáncer de próstata e Hiperplasia Prostática Benigna (HPB)	
2.6.1 Generalidades.....	12
2.6.2 Métodos de diagnóstico.....	14
2.6.3 Tratamiento.....	15
2.7 Antiandrógenos.....	17
2.8 Inhibidores de la enzima 5 α -reductasa.....	20
2.9 Desarrollo de antiandrógenos esteroidales.....	22
CAPÍTULO 3: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	23
CAPÍTULO 4: OBJETIVOS.....	26
CAPÍTULO 5: DESARROLLO EXPERIMENTAL.....	27
CAPÍTULO 6: METODOLOGÍA Y RESULTADOS	
6.1 Parte Química	
Tabla 1. Propiedades físicas y espectroscópicas para la materia prima.	29
6.1.1. Síntesis de 16 α ,17 α -Epoxi-3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona (II).....	29
Tabla 2. Propiedades físicas y espectroscópicas para el compuesto II...	30
6.1.2. Síntesis de 3 β -Acetoxi-16 α ,17 α -epoxi-5-pregnen-20-ona (III).....	30
Tabla 3. Propiedades físicas y espectroscópicas del compuesto III.....	31
6.1.3. Síntesis de 3 β -Acetoxi-16 α ,17 α -epoxi-20-etilendioxi-5-pregнено (IV).....	31
Tabla 4. Propiedades físicas y espectroscópicas del compuesto IV.....	32
6.1.4. Síntesis de 3 β ,17 α -Dihidroxi-20-etilendioxi-16 β -fenil-5-pregнено (V).....	32
Tabla 5. Propiedades físicas y espectroscópicas de V.....	33
6.1.5. Síntesis de 3 β ,17 α -Dihidroxi-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-5-pregnen-17a-ona (VI).....	34
Tabla 6. Propiedades físicas y espectroscópicas de VI.....	34

6.1.6. Síntesis de 16β-fenil-17α-hidroxi-17β-metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VII).....	36
Tabla 7. Propiedades físicas y espectroscópicas de VII.....	36
6.1.7. Síntesis de 17α-Benzoiloxi-16β-fenil-17β-metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VIII).....	38
Tabla 8: Propiedades físicas y espectroscópicas de VIII.....	38
6.1.8. Síntesis de 17α-Benzoiloxi-6α,7α-epoxi-16β-fenil-17β-metil-D-homo-4-pregnen-3,17a-diona (IX).....	40
Tabla 9. Propiedades físicas y espectroscópicas de IX.....	41
6.1.9A. Síntesis de 17α-Benzoiloxi-6-bromo-16β-fenil-17β-metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (Xa).....	43
Tabla 10. Propiedades físicas y espectroscópicas de Xa.....	43
6.1.9B. Síntesis de 17α-Benzoiloxi-6-cloro-16β-fenil-17β-metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (Xb).....	45
Tabla 11. Propiedades físicas y espectroscópicas de Xb.....	46
6.2 Parte Biológica	
6.2.1 Ensayo <i>in vivo</i> : Prueba en las vesículas seminales.....	48
Tabla 12. Efecto de los compuestos en el peso de las vesículas seminales.....	48
6.2.2 Ensayo <i>in vitro</i> : Efecto en la transformación microbiana de [³ H]Testosterona a [³ H]DHT en <i>Penicillium crustosum</i>	50
Tabla 13. Efecto en la conversión de [³ H]T a [³ H]DHT en cultivos de <i>Penicillium crustosum</i>	50
CAPÍTULO 7: ANÁLISIS DE RESULTADOS	
7.1 Parte Química.....	52
7.2 Parte Biológica.....	71
Ensayo <i>in vivo</i>	73
Ensayo <i>in vitro</i>	74
CAPÍTULO 8: CONCLUSIONES	77
CAPÍTULO 9: BIBLIOGRAFÍA	78
ANEXO DE ESPECTROSCOPIA	83

ÍNDICE DE FIGURAS

	PÁGINA
Figura 2.1. Acción de las gonadotropinas en los testículos.....	4
Figura 2.2 Eventos celulares en la biogénesis de la Testosterona (A) y Biosíntesis de la testosterona (B).....	5
Figura 2.3. Acción de la DHT.....	7
Figura 2.4 Representación esquemática del receptor androgénico.....	9
Figura 2.5. Representación de los dedos de zinc.....	9
Figura 2.6. Mecanismo de acción de la enzima 5α-Reductasa.....	10

Figura 2.7. Esquema representativo de la enzima 5 α -reductasa II.....	12
Figura 2.8. Relación del consumo de grasas con el cáncer de próstata.....	14
CUADRO 1. Índice de algunos efectos colaterales.....	16
Figura 2.9. Combinación de terapias.....	17
Figura 2.10. Principales Antiandrógenos esteroidales.....	18
Figura 2.11. Ejemplos de antiandrógenos no esteroidales.....	19
Figura 2.12. Mecanismo de inhibición propuesto para la finasterida.....	20
Figura 2.13. Estructura de la Epristerida.....	21
Figura 5.1. Ruta general de síntesis.....	28
Figura 6.2.1. Efecto antiandrogénico de los intermediarios y productos finales sobre el peso de las vesículas seminales.....	49
Figura 6.2.2. Efecto inhibitorio de los compuestos sintetizados sobre la conversión de [³ H]T a [³ H]DHT en cultivos de <i>Penicillium crustosum</i>	51
Figura 7.1.1. Generación del anillo D-homo.....	57
Figura 7.1.2. Estructuras resonantes de VII.....	62
Figura 7.1.3. Diagrama de fragmentación del compuesto Xa en EMIE.....	70
Figura 9.1. Espectro de UV de la materia prima: Acetato de 16-Dehidropregnenolona (I).....	83
Figura 9.2. Espectro de IR de la materia prima: Acetato de 16-Dehidropregnenolona (I).....	83
Figura 9.3. Espectro de RMN ¹ H de la materia prima: Acetato de 16-Dehidropregnenolona (I).....	84
Figura 9.4. Espectro de IR del compuesto 16 α ,17 α -Epoxi-3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona (II).....	84
Figura 9.5. Espectro de RMN ¹ H del compuesto 16 α ,17 α -Epoxi-3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona (II).....	85
Figura 9.6. Espectro de IR del compuesto 3 β -Acetoxi-16 α ,17 α -epoxi-5-pregnen-20-ona (III).....	85
Figura 9.7. Espectro de RMN ¹ H del compuesto 3 β -Acetoxi-16 α ,17 α -epoxi-5-pregnen-20-ona (III).....	86
Figura 9.8. Espectro de IR del compuesto 3 β -Acetoxi-16 α ,17 α -epoxi-20-etilendioxi-5-pregнено (IV).....	86
Figura 9.9. Espectro de RMN ¹ H del compuesto 3 β -Acetoxi-16 α ,17 α -epoxi-20-etilendioxi-5-pregнено (IV).....	87
Figura 9.10. Espectro de IR del compuesto 3 β ,17 α -Dihidroxi-20-etilendioxi-16 β -fenil-5-pregнено (V).....	87
Figura 9.11. Espectro de RMN ¹ H del compuesto 3 β ,17 α -Dihidroxi-20-etilendioxi-16 β -fenil-5-pregнено (V).....	88
Figura 9.12. Espectro de RMN ¹³ C del compuesto 3 β ,17 α -Dihidroxi-20-etilendioxi-16 β -fenil-5-pregнено (V).....	88
Figura 9.13. Espectro DEPT del compuesto 3 β ,17 α -Dihidroxi-20-etilendioxi-16 β -fenil-5-pregнено (V).....	89
Figura 9.14. Espectro de EMIE del compuesto 3 β ,17 α -Dihidroxi-20-etilendioxi-16 β -fenil-5-pregнено (V).....	89
Figura 9.15. Espectro de IR del compuesto: 3 β ,17 α -Dihidroxi-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-5-pregnen-17a-ona (VI).....	90

Figura 9.16. Espectro de RMN ¹ H del compuesto : 3β,17α-Dihidroxi-16β-fenil-17β-metil-D-homo-5-pregnen-17a-ona (VI).....	90
Figura 9.17. Espectro COSY H-H del compuesto: 3β,17α-Dihidroxi-16β-fenil-17β-metil-D-homo-5-pregnen-17a-ona (VI).....	91
Figura 9.18. Espectro de RMN ¹³ C del compuesto: 3β,17α-Dihidroxi-16β-fenil-17β-metil-D-homo-5-pregnen-17a-ona (VI).....	92
Figura 9.19. Espectro DEPT del compuesto: 3β,17α-Dihidroxi-16β-fenil-17β-metil-D-homo-5-pregnen-17a-ona (VI).....	92
Figura 9.20. Espectro de EMIE del compuesto: 3β,17α-Dihidroxi-16β-fenil-17β-metil-D-homo-5-pregnen-17a-ona (VI).....	93
Figura 9.21. Espectro de UV del compuesto 16β-fenil-17α-hidroxi-17β-metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VII).....	93
Figura 9.22. Espectro de IR del compuesto 16β-fenil-17α-hidroxi-17β-metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VII).....	94
Figura 9.23. Espectro de RMN ¹ H del compuesto 16β-fenil-17α-hidroxi-17β-metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VII).....	94
Figura 9.24. Espectro de RMN ¹³ C del compuesto 16β-fenil-17α-hidroxi-17β-metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VII).....	95
Figura 9.25. Espectro DEPT del compuesto 16β-fenil-17α-hidroxi-17β-metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VII).....	95
Figura 9.26. Espectro de EMIE del compuesto 16β-fenil-17α-hidroxi-17β-metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VII).....	96
Figura 9.27. Espectro UV del compuesto 17α-Benzoiloxi-16β-fenil-17β-metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VIII).....	96
Figura 9.28. Espectro IR del compuesto 17α-Benzoiloxi-16β-fenil-17β-metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VIII).....	97
Figura 9.29. Espectro RMN ¹ H del compuesto 17α-Benzoiloxi-16β-fenil-17β-metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VIII).....	97
Figura 9.30. Espectro RMN ¹³ C del compuesto 17α-Benzoiloxi-16β-fenil-17β-metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VIII).....	98
Figura 9.31. Espectro DEPT del compuesto 17α-Benzoiloxi-16β-fenil-17β-metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VIII).....	99
Figura 9.32. Espectro de EMIE del compuesto 17α-Benzoiloxi-16β-fenil-17β-metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VIII).....	99
Figura 9.33. Espectro de UV del compuesto 17α-Benzoiloxi-6α,7α-epoxi-16β-fenil-17β-metil-D-homo-4-pregnen-3,17a-diona (IX).....	100
Figura 9.34. Espectro de IR del compuesto 17α-Benzoiloxi-6α,7α-epoxi-16β-fenil-17β-metil-D-homo-4-pregnen-3,17a-diona (IX).....	100
Figura 9.35. Espectro de RMN ¹ H del compuesto 17α-Benzoiloxi-6α,7α-epoxi-16β-fenil-17β-metil-D-homo-4-pregnen-3,17a-diona (IX).....	101
Figura 9.36. Espectro de RMN ¹³ C del compuesto 17α-Benzoiloxi-6α,7α-epoxi-16β-fenil-17β-metil-D-homo-4-pregnen-3,17a-diona (IX).....	102
Figura 9.37. Espectro DEPT del compuesto 17α-Benzoiloxi-6α,7α-epoxi-16β-fenil-17β-metil-D-homo-4-pregnen-3,17a-diona (IX).....	102

Figura 9.38. Espectro de EMIE del compuesto 17 α -Benzoiloxi-6 α ,7 α -epoxi-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4-pregnen-3,17a-diona (IX).....	103
Figura 9.39. Espectro de UV del compuesto 17 α -Benzoiloxi-6-bromo-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona Xa.....	103
Figura 9.40. Espectro de IR del compuesto 17 α -Benzoiloxi-6-bromo-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona Xa.....	104
Figura 9.41. Espectro de RMN ¹ H del compuesto 17 α -Benzoiloxi-6-bromo-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona Xa.....	104
Figura 9.42. Espectro de COSY H-H del compuesto 17 α -Benzoiloxi-6-bromo-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona Xa.....	105
Figura 9.43. Espectro de COSY H-H (ZONA AROMÁTICA) del compuesto 17 α -Benzoiloxi-6-bromo-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona Xa.....	106
Figura 9.44. Espectro de RMN ¹³ C del compuesto 17 α -Benzoiloxi-6-bromo-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona Xa.....	106
Figura 9.45. Espectro DEPT del compuesto 17 α -Benzoiloxi-6-bromo-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona Xa.....	107
Figura 9.46. Espectro HETCOR del compuesto 17 α -Benzoiloxi-6-bromo-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona Xa.....	107
Figura 9.47. Espectro HETCOR (ZONA AROMÁTICA) del compuesto 17 α -Benzoiloxi-6-bromo-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona Xa.....	108
Figura 9.48. Espectro de EMIE del compuesto 17 α -Benzoiloxi-6-bromo-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona Xa.....	108
Figura 9.49. Espectro de UV del compuesto 17 α -Benzoiloxi-6-cloro-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (Xb).....	109
Figura 9.50. Espectro de IR del compuesto 17 α -Benzoiloxi-6-cloro-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (Xb).....	110
Figura 9.51. Espectro de IR del compuesto 17 α -Benzoiloxi-6-cloro-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (Xb).....	110
Figura 9.52. Espectro de RMN ¹³ C del compuesto 17 α -Benzoiloxi-6-cloro-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (Xb).....	111
Figura 9.52. (continuación) Espectro de RMN ¹³ C del compuesto 17 α -Benzoiloxi-6-cloro-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (Xb).....	112
Figura 9.53. Espectro DEPT del compuesto 17 α -Benzoiloxi-6-cloro-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (Xb).....	112
Figura 9.54. Espectro COSY H-H del compuesto 17 α -Benzoiloxi-6-cloro-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (Xb).....	113
Figura 9.54. (continuación) Espectro COSY H-H del compuesto 17 α -Benzoiloxi-6-cloro-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (Xb).....	114
Figura 9.55. Espectro DEPT del compuesto 17 α -Benzoiloxi-6-cloro-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (Xb).....	115

RESUMEN

Hoy en día, el cáncer de próstata y la Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) constituyen dos de los padecimientos que afectan a la población masculina de edad avanzada, constituyendo problemas de salud pública. Ambos desórdenes se encuentran caracterizados por el exceso de andrógenos en el organismo. La Testosterona (T)(3, Fig. 2.6-página 10) es convertida al andrógeno endógeno más potente 5α -Dihidrotestosterona (DHT, 4) por la acción de la enzima 5α -reductasa, proceso involucrado directamente con la presencia y el desarrollo del cáncer de próstata e HPB. La inhibición de este proceso es considerado como un sitio muy atractivo de intervención terapéutica a través del empleo de antiandrógenos.

En vista de que no existen reportes sobre la síntesis y actividad antiandrogénica de los derivados del D-homo pregnano y con el propósito de desarrollar nuevos agentes como posibles inhibidores de la enzima 5α -reductasa, conservando las sustituciones químicas que confieren actividad, este trabajo describe la síntesis de cuatro nuevos derivados del D-homo pregnano: 17α -Benzoiloxi- 16β -fenil- 17β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VIII, Fig. 5.1-página 28), 17α -Benzoiloxi- $6\alpha,7\alpha$ -epoxi- 16β -fenil- 17β -metil-D-homo-4-pregnen-3,17a-diona (IX), 17α -Benzoiloxi-6-bromo- 16β -fenil- 17β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (Xa) y 17α -Benzoiloxi-6-cloro- 16β -fenil- 17β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (Xb), así como su caracterización y bioevaluación *in vivo* e *in vitro*.

Para la síntesis de éstos compuestos se empleó Acetato de 16 -dehidropregnenolona (DPA)(I, Fig. 5.1) como materia prima, la cual se sometió a transformaciones químicas necesarias, a través de una síntesis lineal de nueve pasos, para obtener los compuestos de interés. En los estudios *in vivo* (sobre la capacidad de disminuir el peso de las vesículas seminales), los compuestos sintetizados mostraron baja o igual actividad antiandrogénica que el estándar Finasterida (6, Fig. 2.10-página 18), siendo el compuesto VII el más activo (Fig. 6.2.1-página 49) mientras que en los estudios *in vitro* (sobre la capacidad de inhibir la transformación de [3 H]T a [3 H]DHT en el hongo *P. crustosum*) los compuestos sintetizados (VIII-Xb) mostraron mayor actividad que la finasterida, siendo el compuesto Xb el más activo (Fig. 6.2.2-página 51). Lo anterior sugiere que la acción de dichos compuestos, posiblemente se centra en la inhibición de la enzima 5α -reductasa Tipo I.

ABSTRACT

Nowadays, prostate cancer and Benign Prostatic Hyperplasia (BPH) are common diseases in the aging male population, involving a serious public health problem. Both disorders show an increasing incidence with excess androgen in the organism. Testosterone (T)(3, Fig. 2.6-page 10) is transformed to the most potent endogen androgen 5α -dihydrotestosterone (DHT, 4) by the enzyme 5α -reductase. This process is directly related with the origin and development of prostate cancer and BPH. Therefore, the inhibition of this process by antiandrogens is an attractive method of therapeutic intervention.

Because there are not reports about synthesis and biological activity of D-homo pregnane derivatives, and the need to develop new agents as possible 5α -reductase inhibitors, this work describes the synthesis of four new D-homo pregnane derivatives: 17α -Benzoyloxi- 16β -phenyl- 17β -methyl-D-homo-4,6-pregnadiene-3,17a-dione (VIII, Fig. 5.1-page 28), 17α -Benzoyloxi- $6\alpha,7\alpha$ -epoxi- 16β -phenyl- 17β -methyl-D-homo-4-pregnene-3,17a-dione (IX), 17α -Benzoyloxi-6-bromo- 16β -phenyl- 17β -methyl-D-homo-4,6-pregnadiene-3,17a-dione (Xa) and 17α -Benzoyloxi-6-chloro- 16β -phenyl- 17β -methyl-D-homo-4,6-pregnadiene-3,17a-dione (Xb), as well as their structure elucidation and their bioevaluation *in vivo* and *in vitro*.

For the synthesis of all compounds 16-dehydropregnenolone acetate (DPA)(I, Fig. 5.1) was used as starting material, which underwent a lineal synthesis of nine steps. The synthesized compounds (VIII-Xb) showed low or equal activity than the standard Finasteride (6, Fig. 2.10-page 18) in the *in vivo* evaluation (through inhibition of the weight of seminal vesicles). In this series, compound VII showed the highest antiandrogenic activity (Fig. 6.2.1-página 49). On the other hand, in the *in vitro* evaluation (through inhibition of microbial conversion of [3 H]T to [3 H]DHT by *P. crustosum*) compounds VIII-Xb showed a much higher activity as 5α -reductase inhibitors than the standard Finasteride. Compound Xb showed the highest activity (Fig. 6.2.2-page 51). This fact suggests that probably their mechanism is based on 5α -reductase Type I inhibition.

ABREVIATURAS

Ab. Rel.	Abundancia Relativa
AcOEt	Acetato de Etilo
AMCPBz	Ácido m-cloroperbenzóico
AMPc	Adenosil MonoPhosphate cyclic.
arom	aromático
as	asimétrico
ax	axial
Bz	Benceno
CCF	Cromatografía en Capa Fina
(CF ₃ CO) ₂ O	Anhídrido Trifluoroacético
(CH ₃)SCuI	Complejo de yoduro de dimetil sulfuro-cobre
(CH ₃ CO) ₂ O	Anhídrido Acético
CoCl ₂	cloruro de cobalto
COSY	COrelated SpectroscopY
d	señal doble en RMN ¹ H
dd	señal doble de doble en RMN ¹ H
D ₂ O	Agua Deuterada
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DHT	5 α -Dihidrotosterona
DMF	Dimetilformamida
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPA	Acetato de 16-Dehidropregnenolona
EMIE	Espectrometría de Masas por Impacto Electrónico
eq	ecuatorial
fmol	femtomol
GC/MS	Gas Chromatography/Mass Spectrometry
[³ H]	Tritio
HETCOR	HETeronuclear chemical shift CORrelation
HPB	Hiperplasia Prostática Benigna
LH	Hormona Luteinizante
IR	Espectrofotometría de Infrarrojo
J	Constante de acoplamiento
m	Señal múltiple en RMN ¹ H
m/z	relación masa carga en EMIE
M	Banda de Mediana intensidad en IR
M ⁺	ión molecular ^{cación radical}
MHz	MegaHertz
N	Normalidad
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (forma reducida)
NADP ⁺	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate (forma oxidada)
nm	nanómetro
nM	nano molar
oop	out of plane (vibración fuera del plano en IR)
pb	pico base

PhCOOH	Ácido benzóico
pf	punto de fusión
PM	peso molecular
ppm	partes por millón
PTS	Ácido p-Toluensulfónico
Py	Piridina
RMN ¹³ C	Resonancia Magnética Nuclear de ¹³ C
RMN ¹ H	Resonancia Magnética Nuclear protónica
s	señal simple en RMN ¹ H
S	banda de fuerte intensidad en IR
si	simétrico
st	stretching (vibración de tensión en IR)
t	señal triple en RMN ¹ H
T	Testosterona
T amb	Temperatura ambiente
THF	Tetrahidrofurano
TMS	Tetrametilsilano
uma	unidad de masa atómica
UV	Ultravioleta
W	Banda de intensidad débil en IR
δ	vibración de deformación (IR) ó desplazamiento químico (RMN)
λ _{max}	Longitud de onda de máxima absorción
μCi	microCurie

1.- INTRODUCCIÓN

El cáncer de próstata constituye la segunda neoplasia más frecuentemente diagnosticada (después del cáncer de la piel) y es la segunda causa de muerte por cáncer (después del cáncer de pulmón) en la población masculina. Se ha estimado que su incremento en la incidencia anual es de aproximadamente del 2 al 3%.^{1,2} En cuanto a la Hiperplasia Prostática Benigna (HPB), que es otra de las enfermedades que afectan a la población masculina de edad avanzada, se caracteriza por el incremento anormal de la glándula prostática, con la formación de nódulos voluminosos bien delimitados. Aunque existen controversias de la posible relación que existe entre la HPB y el cáncer de próstata, ambos desórdenes muestran factores etiológicos en común, tales como la edad, la raza, factores ambientales, la dieta y quizás el mas importante es que ambos están relacionados con un exceso de andrógenos en el organismo.³

Aunque la cirugía actualmente representa el tratamiento mas aceptado para el cáncer de próstata (aprox. 400 000 prostatectomías son ejecutadas cada año en los Estados Unidos), existen otras modalidades disponibles para el tratamiento de esta enfermedad, tales como los agonistas de la hormona luteinizante (LH) o bien los antagonistas androgénicos.⁴ Hoy en día, los antiandrógenos ofrecen un tratamiento útil para un gran número de enfermedades mediadas por andrógenos, tales como hirsutismo, acné, seborrea, alopecia androgénica, pubertad precoz y desde luego el cáncer de prostata y la HPB.⁴⁻⁶ Desafortunadamente, los antiandrógenos que se encuentran en el mercado como el Acetato de Ciproterona (CPA) (5, Fig. 2.10-página 18), la Finasterida (6), la Flutamida (9, Fig. 2.11-página 19) y el ketoconazol (11), son los fármacos mas eficaces para el tratamiesto del cáncer de próstata y la HPB, que muestran severos efectos colaterales, tales como diarrea, vómitos, disminución de la libido, daño hepático, entre otros, con lo cual se reduce su uso terapéutico.⁷

Debido a que la Testosterona (3, Fig. 2.6-página 10) por acción de la enzima 5 α -reductasa, se convierte en 5 α -dihidrotestosterona (DHT, 4), la cual es el andrógeno endógeno más potente involucrado directamente con el cáncer de próstata y la HPB, es

indicativo que este proceso constituye un sitio lógico de intervención terapéutica.⁸ De esta manera, diversos inhibidores de la enzima 5 α -reductasa bloquean efectivamente la conversión de Testosterona a DHT, realizando un bloqueo completo androgénico, lo cual ha demostrado ser una de las mejores opciones para el tratamiento del cáncer de próstata y de la HPB, que la misma cirugía. Aunque algunos compuestos no esteroideos actúan como inhibidores de la enzima 5 α -reductasa, la mayoría de los antiandrogénicos de interés terapéutico pertenecen a la serie esteroidea, específicamente a los derivados de la progesterona (2, Fig. 2.2B-página 5), debido a que son homólogos de los esteroides de origen natural.^{7,9}

Estudios previos de estructura-actividad en derivados de la progesterona llevados cabo por el grupo de Bratoeff y cols., han encontrado diversos requerimientos estructurales necesarios para que una molécula presente actividad antiandrogénica, dentro de los cuales resaltan la presencia del sistema 4,6-dien-3-ona, un átomo de halógeno insertado en C-6, un grupo voluminoso en C-16 β y un éster en C-17 α . Por otro lado, en nuestro laboratorio se han logrado obtener derivados D-homo del pregnano, donde el anillo D presenta seis miembros. Sin embargo, no existen reportes en la literatura acerca de la síntesis ó de la actividad antiandrogénica de estos derivados. Aprovechando este hecho y la necesidad de desarrollar nuevos agentes potenciales contra el cáncer de próstata y la HPB, este trabajo plantea la síntesis de cuatro nuevos derivados del D-homo pregnano que conserven los motivos estructurales antes descritos: 17 α -Benzoiloxi-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VIII, Fig. 5.1-página 28), 17 α -Benzoiloxi-6 α ,7 α -epoxi-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4-pregnen-3,17a-diona (IX), 17 α -Benzoiloxi-6-bromo-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3-17a-diona (Xa) y 17 α -Benzoiloxi-6-cloro-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3-17a-diona (Xb), así como su bioevaluación antiandrogénica *in vivo*, sobre el efecto en el peso de las vesículas seminales de hámsters gonadectomizados, e *in vitro*, sobre la capacidad de inhibir la conversión de Testosterona a DHT en el hongo *P. crustosum*.

2. ANTECEDENTES

2.1 ANDRÓGENOS

Los andrógenos son hormonas esteroidales que regulan la fisiología y el comportamiento sexual en el varón, así como también controlan la masculinización, es decir, promueven el desarrollo y mantenimiento de los caracteres sexuales primarios y secundarios en el hombre. Además, promueven el crecimiento esquelético y la masa muscular, por un aumento en el anabolismo proteínico, y disminuyen la grasa subcutánea. En general, la estructura química de los andrógenos esta basada en el esqueleto androstano.^{10,11} La testosterona (3, Fig. 2.3) es la hormona sexual masculina predominante en circulación y es producida principalmente en los testículos. Sin embargo, su metabolito reducido 5α -dihidrotestosterona (DHT)(4, Fig 2.6), es el andrógeno endógeno más potente y es producido solo en ciertos órganos blanco. Se ha descubierto que ambos andrógenos, además de promover los procesos antes descritos, también afectan a otros tejidos diferentes, tales como el riñón, hígado y cerebro.^{12,13}

La producción de testosterona (T) en los testículos, se encuentra regulada por la hormona luteinizante (LH) que es liberada de la glándula pituitaria por acción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), secretada por el hipotálamo. La unión de LH por sus receptores ($K_D = 10^{-10}$ M) ocurre en la membrana de las células de Leydig, localizadas en el tejido intersticial de los testículos. Es bien sabido que ocurre un subsecuente incremento de la concentración intracelular de AMP cíclico (cAMP), lo que origina la estimulación de la síntesis y liberación de andrógenos (Fig. 2.1). En contraste con la estimulación de la androgénesis por LH, la hormona folículo estimulante (FSH), que también es liberada por la glándula pituitaria, estimula la síntesis proteica en las células de Sertoli. La principal proteína secretada por dichas células, es la proteína de unión androgénica (ABP) cuya afinidad alta ($K_D = 10^{-8}$ M) permite aumentar la cantidad de T y DHT en los túbulos seminíferos, promoviendo así la espermatogénesis.^{14,15,16}

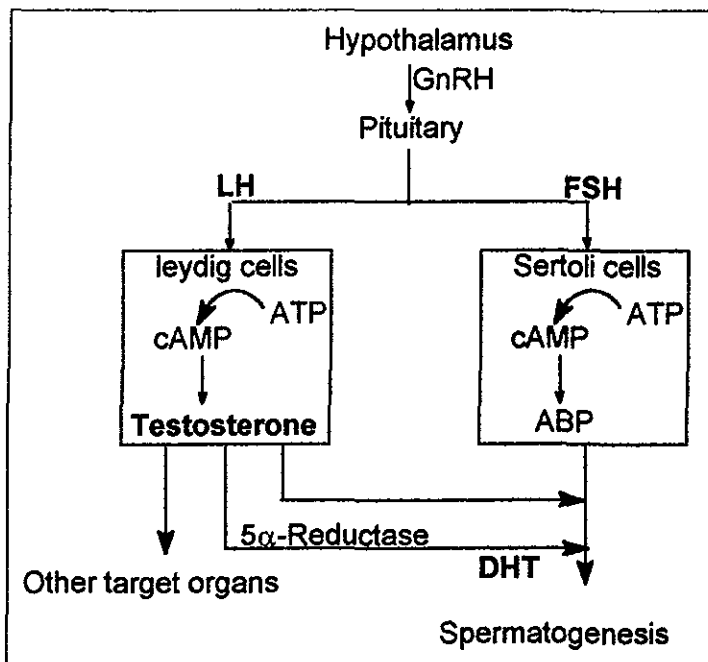


Figura 2.1. Acción de las gonadotropinas en los testículos. Regulación de la síntesis y liberación de testosterona en el organismo (tomado de Schulster et. al.).

Los procesos involucrados en la biogénesis de la testosterona en las células de Leydig han sido ampliamente estudiados. Se sabe que LH se une a su receptor localizado en la superficie de las células de Leydig y vía un proceso mediado por proteínas G, activa la adenilato ciclasa para así aumentar la concentración intracelular de AMP cíclico (cAMP). El cAMP activa a una cinasa dependiente de cAMP, lo cual resulta en la fosforilación y activación de diversas enzimas involucradas en la génesis de los esteroides. De esta manera, los ésteres de colesterol son convertidos a colesterol libre por la colesterol esterasa y éste es translocado a la mitocondria donde un sistema oxidativo P-450 de función mixta lleva a cabo la ruptura de la cadena lateral, convirtiendo así el colesterol a pregnenolona (1)(Fig. 2.2). Diversas transformaciones llevadas a cabo por enzimas no mitocondriales convierten la pregnenolona en progesterona (2), la cual es posteriormente convertida a testosterona (3) que es secretada al torrente sanguíneo (Fig. 2.2B).¹⁷⁻¹⁹

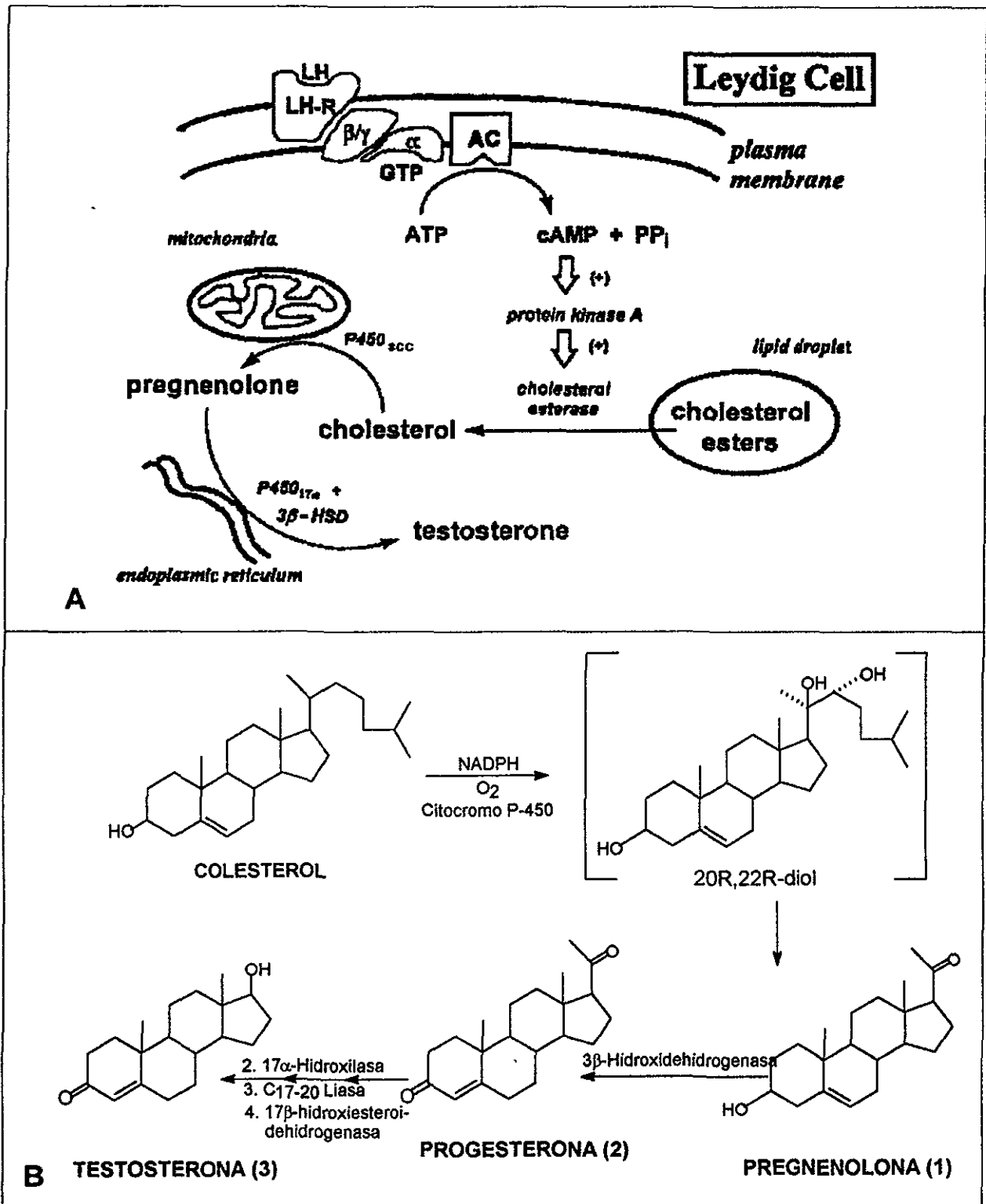


Figura 2.2 Eventos celulares en la biogénesis de la Testosterona (A). Compartimientos celulares donde se lleva a cabo la secuencia para la génesis de testosterona. Biosíntesis de la testosterona (B). Reacciones enzimáticas de degradación de la cadena lateral del colesterol que dan origen a la pregnenolona y testosterona, entre otros (tomado de Schulster et. al. y de Brueggemeir R. W.).

Los andrógenos se encuentran en el torrente sanguíneo ya sea en su forma libre o unidos a proteínas plasmáticas. Aunque se sabe que sólo la forma libre es la que atraviesa membranas, la forma asociada a proteínas contribuye en aumentar los niveles intracelulares de andrógenos. En general, el grado en que los esteroides se unen a las proteínas plasmáticas puede determinar su papel biológico, ya que un aumento discreto de la concentración de ellos genera cambios sustanciales en varios niveles fisiológicos. Por lo tanto, existe una fina regulación de la producción, liberación y disponibilidad de andrógenos en el cuerpo humano.¹⁵

2.2 ACCIÓN MOLECULAR DE LOS ANDRÓGENOS

En contraste con las hormonas proteicas cuyos receptores se encuentran en la membrana plasmática, todos los receptores para las hormonas esteroidales son intracelulares. La naturaleza lipídica de los esteroides les permite atravesar fácilmente las membranas celulares mediante un mecanismo de difusión simple (no hay evidencia de un proceso facilitado o que requiera energía). De esta manera, una vez que la testosterona se encuentra en el citoplasma de una célula blanco, es tomada por la enzima 5α -reductasa que se encuentra en la membrana nuclear y es transformada, en presencia de NADPH, a su metabolito más activo DHT. Esta última forma un complejo con el receptor androgénico (RA), el cual se localiza dentro del núcleo. La unión de DHT al RA (DHT-RA) genera un cambio conformacional, el cual permite que el RA exponga el dominio de unión para los elementos de respuesta hormonal (HRE) situados en el DNA. Existen evidencias que esta exposición se encuentra asociada a la liberación de una chaperonina hsp90 (proteína de choque térmico 90) con una subsecuente dimerización del complejo DHT-RA (Fig. 2.3). Los homodímeros DHT-RA activados se unen a los HRE, iniciando la transcripción de los genes de respuesta a andrógenos. Finalmente, los niveles elevados de RNA mensajero (mRNA) promueven el incremento de la síntesis proteica en el retículo endoplásmico, tales como enzimas, receptores y/o factores de secreción (por ejemplo PSA), que subsecuentemente resulta en la respuesta esteroidea, regulando así la función, el crecimiento y la diferenciación celulares.^{20,21}

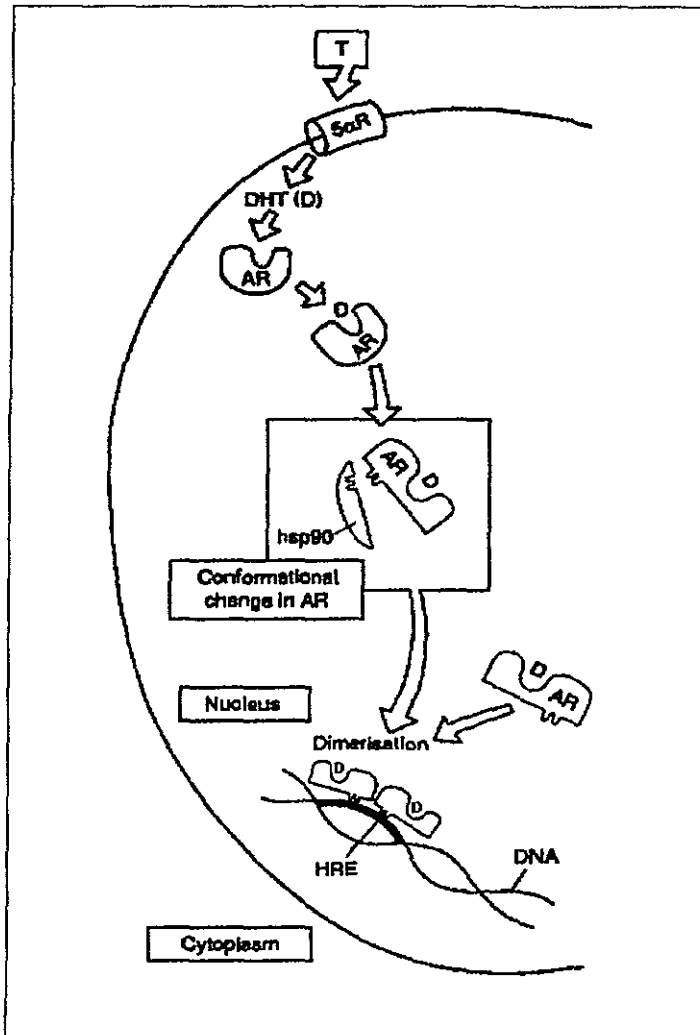


Figura 2.3. Acción de la DHT. Representación del proceso por el cuál la DHT es formada a partir de testosterona, se une al receptor androgénico (AR) y se asocia con los elementos de respuesta hormonal (HRE) en forma de complejos DHT-AR dimerizados (tomado de Cadepond F. et. al.).

2.3 PAPEL DE LOS ANDRÓGENOS EN EL CRECIMIENTO DE LA PRÓSTATA

Durante el desarrollo fetal masculino, los testículos comienzan a secretar testosterona a la circulación en niveles suficientes como para estimular la diferenciación de los ductos de Wolff a las vías deferentes, vesículas seminales, epidídimo y la próstata. Si la cantidad de T es insuficiente dentro del suero fetal, la próstata no se desarrollará. Durante los últimos años se ha demostrado la participación de diversos

factores que regulan el crecimiento de la próstata, se han identificado oncogenes y algunos supresores génicos, así como también se han clonado genes que codifican para receptores esteroidales. A pesar de ello, se ha demostrado que la característica esencial de la próstata es su dependencia y continua presencia de andrógenos para mantener su estructura y funcionalidad, a pesar de que la glándula prostática adulta es sometida a un ambiente multihumoral y tiene la capacidad de responder a una amplia variedad de factores de crecimiento.²²⁻²⁵ Los estudios muestran que la glándula no crece en hombres con pseudohermafroditismo de la República Dominicana, causado por una deficiencia de la enzima 5α -reductasa II. Dichos hombres desarrollan musculatura razonable en la pubertad, manifiestan genitales relativamente normales, libido y erecciones, presumiblemente a los efectos biológicos de la testosterona, pero la próstata permanece ausente debido a la carencia de DHT.²⁶ Sumándose a lo anterior, diversas observaciones muestran que la DHT es el andrógeno más activo dentro de la próstata, que el receptor androgénico presenta mayor afinidad por ésta, en contraste a la T y además que su concentración intranuclear excede a la de cualquier otro andrógeno encontrado en las células prostáticas.²⁷⁻²⁸

2.4 EL RECEPTOR ANDROGÉNICO (RA).

La estructura del Receptor Androgénico se ha deducido del RA clonado a partir del DNA complementario (cDNA) de rata y humano, cuya estructura y funcionalidad es muy parecida a la de otros receptores esteroidales ya conocidos.²⁹ El RA humano es una proteína de 110 kDa (919 aminoácidos) codificada por un gen ubicado en el cromosoma X cuya extensión abarca más de 90 kb y se divide en 8 exones.³⁰⁻³² Dentro de estos últimos cabe resaltar dos exones pequeños, que codifican para dos dedos de zinc involucrados en la unión al DNA, y cuatro exones que codifican para el dominio relacionado con la unión a DHT (Fig. 2.4).^{33,34}

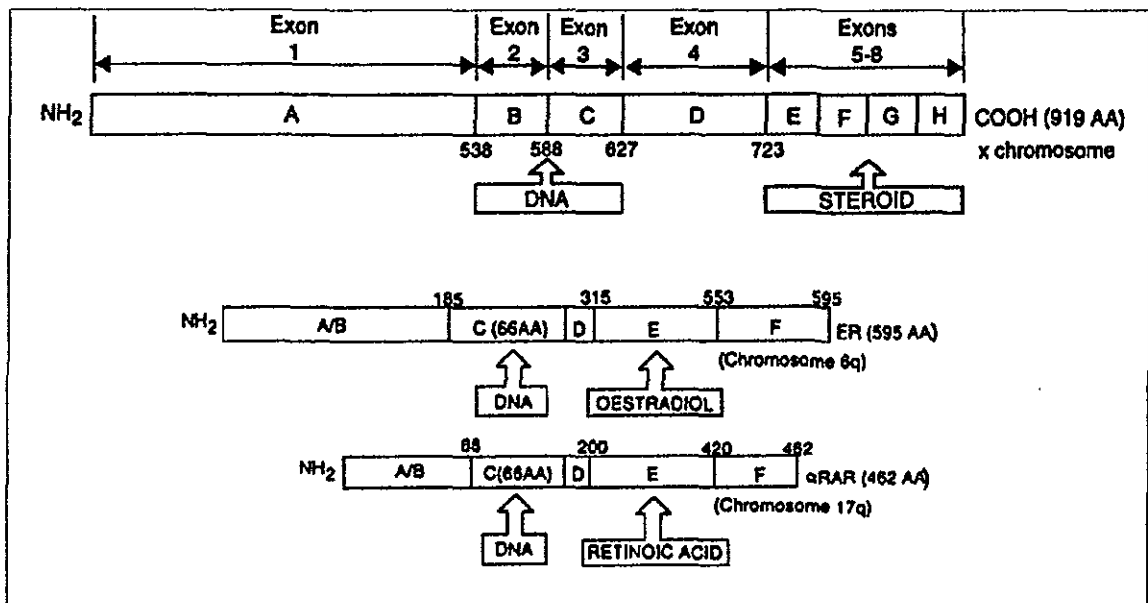


Figura 2.4 Representación esquemática del receptor androgénico comparado con otros receptores nucleares (tomado de Faber P. et. al.).

La función del RA como factor de transcripción es directamente dependiente de la asociación de DHT. Se ha demostrado que la unión de DHT al RA en su dominio de unión, localizado en la región carboxi-terminal, dispara la activación del RA. Dicha activación se debe al cambio conformacional inducido en el complejo RA-DHT, exponiendo el dominio de unión al DNA y la subsecuente dimerización del complejo DHT-RA activado. El dominio de unión para el DNA del homodímero DHT-RA, se caracteriza por secuencias ricas en cisteínas que forman un par de dedos de zinc (Fig. 2.5), los cuales se introducen en las surcos mayores de los HRE, confiriendo así estabilidad a la RNA polimerasa, al DNA y varios factores involucrados en la transcripción.^{34,35}

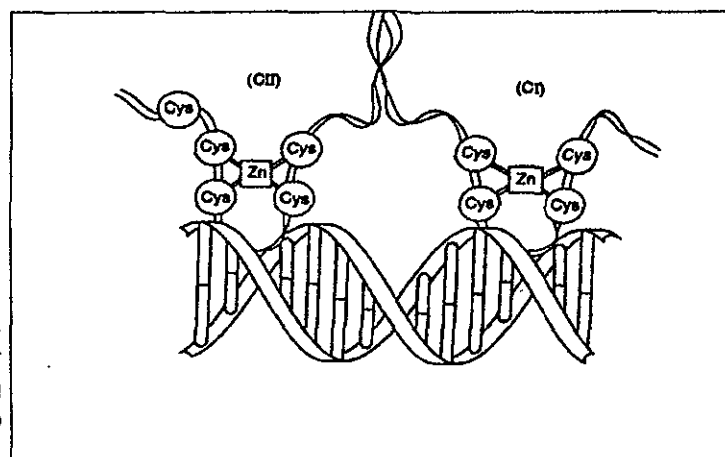


Figura 2.5. Representación de los dedos de zinc en el receptor androgénico, los cuales se "anclan" a los surcos mayores del DNA (tomado de Evans R y Hollenberg S.).

2.5 LA ENZIMA 5 α -REDUCTASA.

La testosterona actúa como una prohormona para la formación de metabolitos activos que median muchos procesos de acción que involucran andrógenos. La testosterona (3) es convertida irreversiblemente a DHT a través de la acción de una enzima que se localiza en la membrana nuclear dependiente de NADPH llamada 5 α -reductasa.^{13,36} El mecanismo de acción para esta transformación consiste primeramente en la formación del complejo 5 α -reductasa-NADPH; posteriormente la testosterona se une a este complejo y se realiza la transferencia regio y estereoespecífica de un hidruro del NADPH a la posición 5 de la testosterona. El enolato resultante en C3-C4 se estabiliza por un residuo electrofílico (E⁺) de la enzima. La liberación de DHT del complejo se produce por el tautomerismo mediado por la enzima, y por último, la regeneración de la misma se logra a través de otro ciclo catalítico (Fig. 2.6).^{36,37}

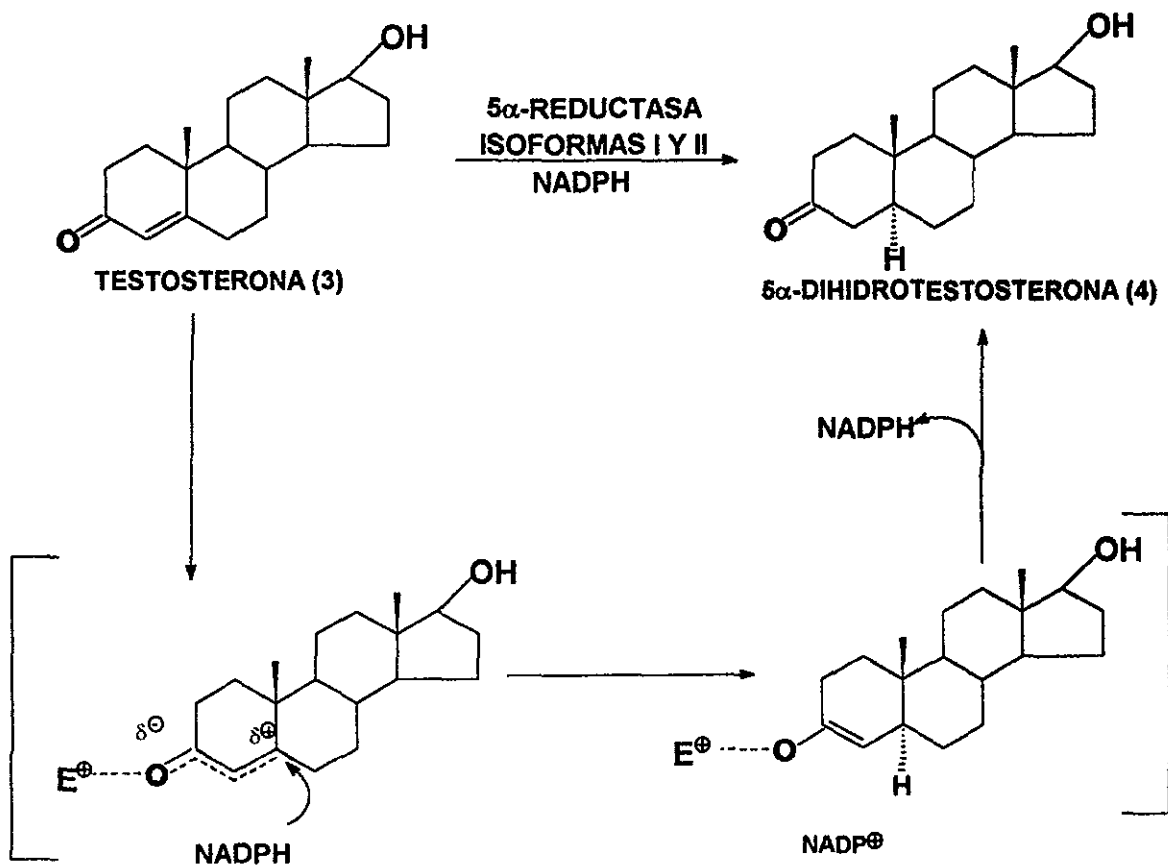


Figura 2.6. Mecanismo de acción de la enzima 5 α -Reductasa.

Existen dos isoformas de la enzima 5α -reductasa denominadas Tipo I y Tipo II, las cuales difieren en sus propiedades bioquímicas, tejido de localización y su función.³⁸ La isoenzima 5α -reductasa Tipo I se encuentra predominantemente en piel no genital y en el hígado, tiene un pH óptimo ligeramente alcalino (pH=6-8.5), requiere de concentraciones elevadas de T para saturarse ($K_m = 3\mu M$) y su función catabólica permite la remoción de andrógenos en el hígado y piel. La isoenzima 5α -reductasa Tipo II tiene un pH óptimo ligeramente ácido (pH=5) y requiere de concentraciones bajas de T para saturarse ($K_m = 0.5 \mu M$). Se encuentra presente predominantemente en los tejidos blancos de andrógenos, incluyendo próstata y testículos, y se relaciona directamente al cáncer de próstata e hiperplasia prostática benigna (HPB). Su función anabólica permite la amplificación de la androgenicidad de testosterona por su conversión a DHT en los tejidos blanco.³⁹⁻⁴¹

Se ha demostrado que la actividad de la enzima 5α -reductasa no se restringe sólo a la testosterona, sino que también actúa sobre una variedad de substratos esteroidales que presentan el sistema 4-en-3-ona, tales como 20α -hidroxi-4-pregnen-3-ona, 17α -hidroxiprogesterona, epitestosterona, progesterona y androstenediona.^{36,42}

Apartir de cDNA de rata y humano, se han obtenido las estructuras primarias de las dos isoenzimas de la 5α -reductasa (Tipo I y II). Ambas son proteínas compuestas de 254-260 aminoácidos que en su mayoría son de carácter hidrofóbico, y debido a que son extremadamente insolubles, no se tienen estructuras tridimensionales en la actualidad. Tienen un peso molecular aproximado de 28,000 a 29,000 Da; la similitud de secuencias entre rata y humano es del 60% para la isoenzima tipo I, mientras que para la isoenzima tipo II es del 77%. En el hombre, el gen que codifica para la isoenzima tipo I se localiza en el cromosoma 5 (banda p15), mientras que en el cromosoma 2 (banda p23) se localiza el gen que codifica para la isoenzima tipo II, conteniendo 5 exones cada uno.^{36,43,44} A pesar de no contar con una estructura espacial de la enzima 5α -reductasa tipo II, diversos estudios de mutagénesis puntual dirigida han revelado dominios funcionales. Con el análisis de dichos experimentos se han encontrado mutaciones que afectan la habilidad de la enzima para unir testosterona y aquellas que

disminuyen la afinidad por el NADPH, proponiendo que los dominios de unión para la testosterona se encuentran en los extremos amino y carboxi terminal de la enzima (Fig. 2.7), mientras que aquellos involucrados en la unión del NADPH se localizan en la segunda parte de la proteína.⁴⁵

La expresión de la enzima 5α -reductasa está regulada por los andrógenos, principalmente por la dihidrotestosterona, a través de una retroalimentación positiva.³⁶

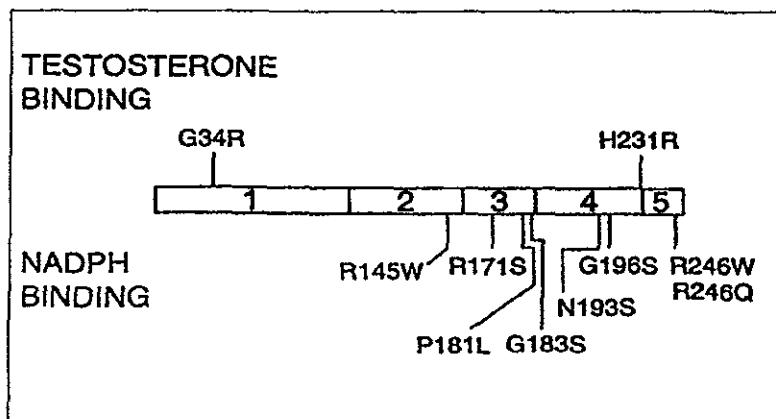


Figura 2.7. Esquema representativo de la enzima 5α -reductasa II obtenido a partir de estudios de mutagénesis puntual dirigida. Se indican los nombres de las mutaciones realizadas (tomado de Thigpen A. y Rusell D.).

2.6 CÁNCER DE PRÓSTATA E HIPERPLASIA PROSTÁTICA BENIGNA (HPB)

2.6.1. Generalidades.

Todas las células que conforman el cuerpo de un organismo saludable, viven en ambientes complejos e interdependientes, regulando entre ellas su proliferación. La reproducción celular de un tejido en estado normal, ocurre sólo cuando es direccionada por otras células en su vecindad, asegurando de esta manera, que cada tejido u órgano mantenga su tamaño y forma apropiadas para las necesidades del cuerpo. Contrariamente, las células cancerosas violan este esquema y comienzan a seguir sus propias señales de proliferación. Además, poseen la habilidad de migrar apartir de los sitios donde se originaron, invadiendo tejidos a los alrededores y formando masas distantes (metástasis). Los tumores formados por esta clase de células malignas se

tornan cada vez más agresivos, volviéndose letales cuando interfieren con la funcionalidad de órganos y tejidos necesarios para la supervivencia de un organismo.⁴⁶ En el cáncer de próstata, los eventos que controlan el ciclo celular se encuentran desregulados por diversos factores, tal como sucede en la mayoría de los diversos tipos de cáncer, promoviendo un crecimiento inadecuado de la glándula. A pesar de ello, el cáncer prostático progresa muy lentamente en comparación a los demás, caracterizándose como una enfermedad de alta incidencia en hombres de edad avanzada.⁴⁷

La Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) es otro de los padecimientos que afectan a varones adultos, caracterizada por el agrandamiento anormal de la próstata y la formación de nódulos.⁴⁸ Aunque varios reportes afirman que la HPB no se encuentra relacionada al cáncer de próstata, recientes re-evaluaciones indican lo contrario, sugiriendo una fuerte relación entre sus orígenes dentro de la glándula prostática.^{49,50} Lo que es muy claro es que ambas patologías tienen diversas características en común: tienen una alta incidencia con la vejez, historias clínicas muy relacionadas y ambas se encuentran directamente ligadas a concentraciones altas de andrógenos, respondiendo a terapias que remueven o disminuyen la concentración de estos últimos.^{47,51} Cabe mencionar que recientes investigaciones han demostrado la participación de diversos factores de crecimiento que actúan de manera sinergista con los andrógenos, promoviendo el cáncer de próstata e HPB. Dentro de ellos se encuentran los factores que promueven el crecimiento de la células epiteliales, como EGF (Epidermal Growth Factor), IGF I y II (Insuline-like Growth Factor I y II), y KGF (Keratinocyte Growth Factor), todos ellos actuando como mitógenos.^{52,53}

Ambas enfermedades comparten diversos factores de patogénesis en común, de los que se pueden mencionar, la raza, la variación geográfica y posiblemente la dieta rica en grasas. De esta manera, la incidencia en hombres negros es 37% más alta que en hombres blancos, y el índice de mortalidad es dos veces más elevado; ambas enfermedades son muy raras en varones asiáticos (Tailandia, China y Japón), mientras que en países donde el consumo de grasas es superior a los 120 g por día (Suecia, Noruega, Estados Unidos, etc.), el índice de mortalidad es muy alto (Fig. 2.8).^{51,54}

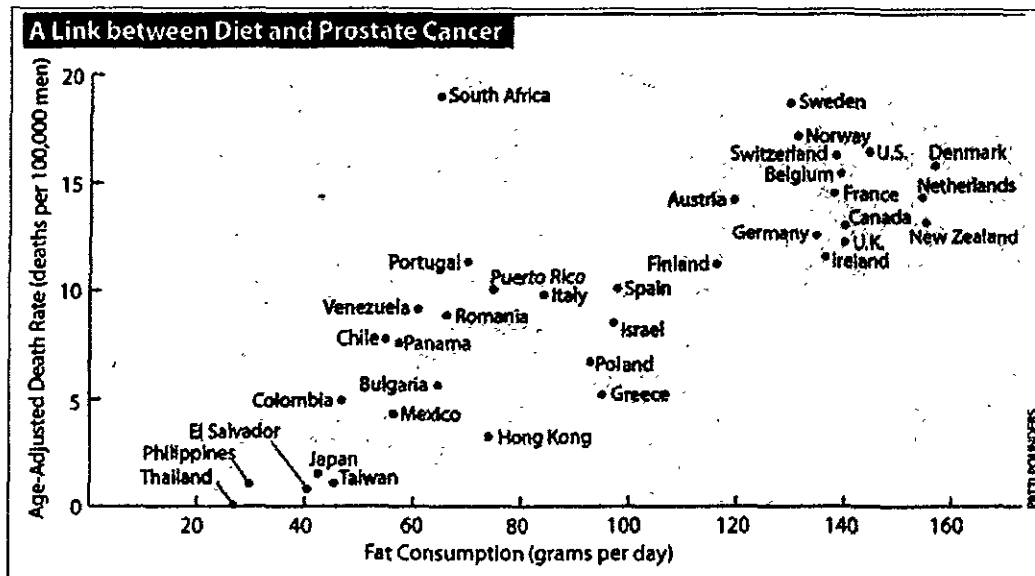


Figura 2.8. Relación del consumo de grasas con el cáncer de próstata. La tasa de mortalidad del cáncer de próstata tiende a ser muy alta en países con alto consumo en grasas (tomado de Marc B. Garnick, et. al.; 1998).

Dentro de los signos y síntomas de alerta para ambas patologías se encuentran: flujo de orina lento, interrumpido o con control difícil; frecuente necesidad para orinar; dolor al orinar; dolor pélvico o en la espalda. Obviamente, estos síntomas se deben al agrandamiento de la próstata, obstruyendo los ductos urinarios y los tejidos que se encuentran alrededor de ella.^{49,55}

2.6.2. Métodos de diagnóstico.

Dentro de los métodos de diagnóstico más utilizados se encuentran la prueba del Antígeno Prostático Específico (PSA) y el examen por tacto rectal. El PSA es una glucoproteína que secretan las células epiteliales de la próstata tanto en estado normal como maligno, pero cuando el cáncer está presente, los niveles en circulación frecuentemente se elevan (mayores a 4 ng/ mL). Desafortunadamente, esta prueba es particularmente inespecífica, ya que el 25% de los hombres con cáncer tienen niveles normales de PSA, y al mismo tiempo, más de la mitad de los hombres diagnosticados con altos niveles de PSA, se encuentran sanos.^{47,58} En el examen por tacto rectal, se detectan mecánicamente tumores por la dureza o nódulos en la glándula. Sin embargo, por este procedimiento sólo se pueden identificar tumores no microscópicos y la mayoría de la población masculina renuncia a ellos. Se ha observado que los cánceres

detectados por la prueba del PSA son casi siempre más grandes y agresivos que los que se han encontrado accidentalmente en autopsias de hombres que mueren por otras causas y que la prueba frecuentemente detecta el cáncer de próstata en estados tempranos. Es por ello que la Sociedad Americana del Cáncer y la Asociación Americana de Urología han recomendado, que los hombres sanos mayores de 50 años se sometan periódicamente tanto al exámen de PSA y al de tacto rectal. Actualmente, se ha implementado el método de ultrasonografía transrectal, que permite confirmar resultados dudosos de otras pruebas así como también las biopsias que examinan la cantidad de DNA anormal, indicando la agresividad del cáncer. Otros de los métodos, tanto de diagnóstico como de propensabilidad que se estan investigando, es el que mide la cantidad de IGF-1 y los métodos genéticos que detectan mutantes de los genes BRCA1 (el cuál está ligado al cáncer de mama) y HPC1 (Human Prostate Cancer 1) que contribuyen a algunas formas de carcinoma prostático.^{51,56,57}

2.6.3 Tratamiento

Dentro de los métodos disponibles para el tratamiento del cáncer de próstata e HPB, se encuentran: la prostatectomía, la orquiectomía bilateral (extirpación de los testículos donde se produce el 95% de T), criocirugía, braquiterapia, radiación y las terapias hormonales. La prostatectomía incluye la extirpación parcial o total de la glándula prostática. Dicho procedimiento ha sido empleado desde 1903 y su mayor ventaja es que si la malignidad se encuentra localizada (en el 70% de los casos), las células cancerosas pueden ser removidas completamente. La criocirugía consiste en la inserción de una sonda con nitrógeno líquido o argón en la glándula prostática, con el subsecuente congelamiento de la glándula. La braquiterapia involucra la implatación de pellets radioactivos directamente en la próstata, donde ellos emiten radiaciones dentro de la glándula. La implantación es relativamente sencilla y requiere de mínima hospitalización. Desgraciadamente, se ha observado que los pellets a veces se distribuyen en sitios diferentes a la próstata, causando daños a otros órganos. La radiación externa puede eliminar las células cancerosas, evitando los tediosos procedimientos operativos y postoperativos, sin embargo, involucra los propios riesgos de la radiación en los órganos alrededor de la glándula. Afortunadamente con las

últimas técnicas innovadoras de radiación en tercera dimensión, tal como 3D CRT (three-Dimensional Conformal Radiation Therapy), es posible dirigir la radiación localizadamente sin dañar órganos vecinos. El precio que los pacientes pagan por someterse a alguno de los procedimientos mencionados anteriormente, incluyen en diferente grado: un periodo de recuperación largo; efectos colaterales de largo plazo que pueden incluir varios meses de incontinencia urinaria e impotencia eréctil corta o permanente. El índice en que una de estas funciones se restablecen (si es que sucede) depende de la edad del paciente, estado previo de actividad sexual y la efectividad del método para remover el cáncer (Cuadro 1).^{47,51,56}

	% QUE MUEREN DE LA TERAPIA	% QUE SE CONVIERTEN IMPOTENTES	% QUE SUFREN INCONTINENCIA SEVERA
RADIACIÓN	<0.1	30-70	1-2
BRADUITERAPIA	<0.1	30-50	2
PROSTATECTOMIA	0.6	30-70	2-15
CRIOQUIRUGIA	0.1	30-50	35

CUADRO 1. Índice de algunos efectos colaterales calculados en hombres sometidos a algunas de las terapias mostradas. Datos de pacientes menores de 60 años, que mostraron tumores en estados no avanzados y que fueron tratados con facilidad, resultando exitoso el procedimiento empleado (tomado de Marc B. Garnick, et. al.; 1998).

Por otro lado, la terapia hormonal está basada en el hecho que los andrógenos promueven el crecimiento de los tumores prostáticos. Al evitar que el cuerpo produzca andrógenos y/o que se bloquee su acción, las células malignas frecuentemente mueren. La terapia hormonal consiste primordialmente de dos clases de fármacos: una clase consiste de los superagonistas de GnRH (Gonadotropin Releasing Hormone), que actúan inicialmente al elevar la secreción de testosterona, pero que después de pocas semanas, se inhibe totalmente la producción de T y causa la muerte tumoral; la otra clase de fármacos la constituyen los antiandrógenos, que actúan al reducir o modificar la acción de los andrógenos en el tejido prostático. Lo más sorprendente de esta terapia radica en que se puede combinar con la radiación, alargando el tiempo de vida de los pacientes que se someten a ella, en comparación a los que se someten únicamente a la radiación (Fig. 2.9).⁵¹

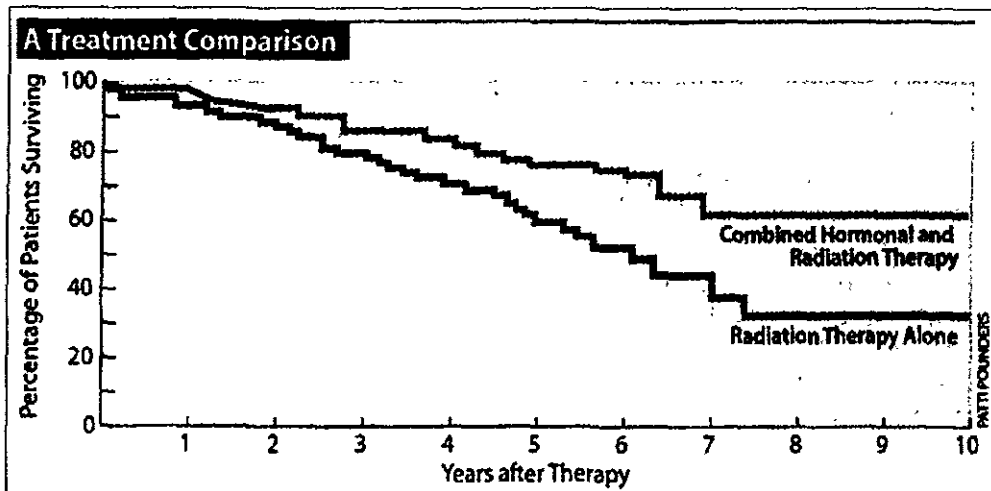


Figura 2.9. Combinación de terapias. Se observa que cuando se combina la terapia hormonal con la radiación, se obtiene un mayor índice de sobrevida en los pacientes sometidos (tomado de Marc B. Garnick, et. al.; 1998).

Finalmente, la elección de la terapia adecuada es influenciada por la etapa de la enfermedad en que se encuentra el individuo, así como la edad, condición física y respuesta al tratamiento.

2.7 ANTIANDRÓGENOS

Un antiandrógeno es aquella molécula que antagoniza los efectos de la testosterona en los órganos o tejidos sensibles a los andrógenos y, cuando son administrados junto con los andrógenos, bloquean o disminuyen la efectividad androgénica. Los antiandrógenos pueden actuar de diferentes maneras: pueden interferir en la entrada de los andrógenos a la célula blanco, pueden bloquear la conversión de la testosterona a su metabolito más activo DHT, o bien, pueden competir por el receptor androgénico. Estos agentes tienen potencial terapéutico en el tratamiento del acné, virilización en la mujer, hipersexualidad en hombre, alopecia androgénica y desde luego en el cáncer de próstata e HPB. Además, se ha encontrado que estos agentes tienen potencial como anticonceptivos masculinos.^{10,58}

Los antiandrógenos pueden ser de origen natural, como la progesterona, o bien de origen sintético (esteroidales y no esteroidales). Los antiandrógenos esteroidales son los de mayor interés terapéutico, en especial los derivados de la progesterona, debido a

que son homólogos de los esteroides de origen natural. Dentro de los antiandrógenos esteroidales más conocidos se encuentran el Acetato de Ciproterona (CPA) (5), Finasterida (Proscar)(6), Oxendolona (7) y BOMT(8) (Fig. 2.10).

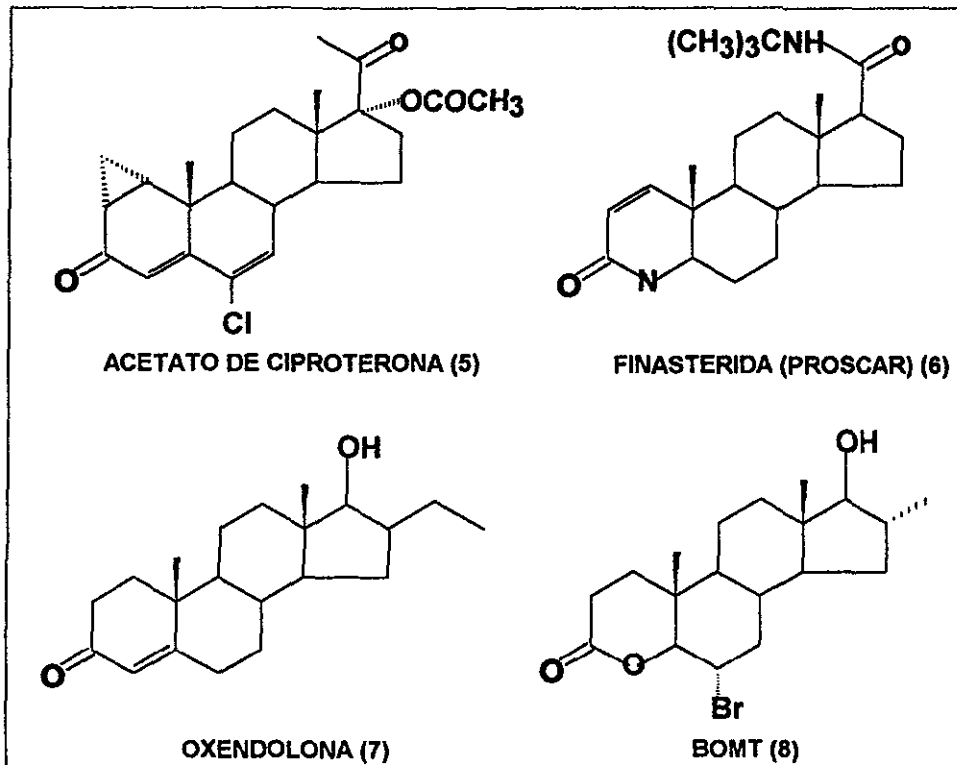


Figura 2.10. Principales Antiandrógenos esteroidales utilizados en la terapéutica.

La mayoría de estos agentes tienen diferentes mecanismos de acción y algunos muestran efectos secundarios severos que reducen su utilidad clínica. Así, CPA es quizás el antiandrógeno esteroide más conocido y ampliamente caracterizado, es el prototipo de los compuestos que compiten con la DHT por el sitio de unión en el RA.^{59,60} La finasterida, conocida comercialmente como Proscar, es el prototipo de los fármacos que actúan inhibiendo la enzima 5 α -reductasa II, reduciendo drásticamente los niveles de DHT y aumentando los de T.⁶¹ La oxendolona y BOMT son otros fármacos menos estudiados, pero que presentan actividad antiandrogénica al competir con el RA.^{62,63} Dentro de los efectos colaterales, se pueden presentar anomalías a todos los niveles fisiológicos, que van desde los progestacionales y conducta sexual, hasta anomalías hormonales, como son pérdida de la libido, ginecomastia, impotencia, anomalías en el espermatozoides y corazón, y atrofia celular.⁶⁴

Por otra parte, los antiandrógenos no esteroideos presentan diferencias en su estructura y mecanismos de acción. Entre los más utilizados se encuentran la flutamida, bicalutamida y ketoconazol (Fig. 2.11).

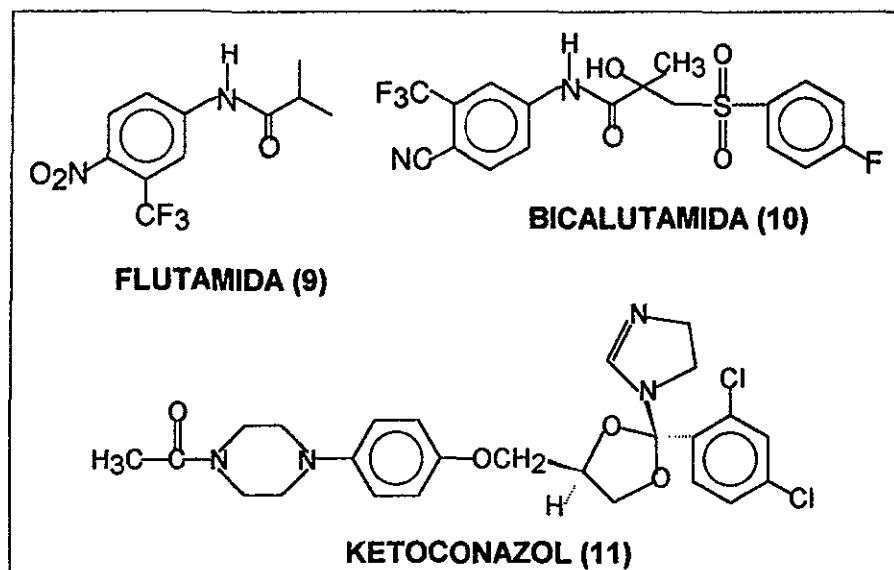


Figura 2.11. Ejemplos de antiandrógenos no esteroideos.

El requerimiento molecular esteroideo absoluto para que una molécula presentara actividad antiandrogénica, interactuando con el RA, fue invalidado cuando se introdujo la flutamida. Este agente no esteroideo compite con los dominios de unión para DHT en el RA, cuya cadena lateral le permite adquirir la suficiente flexibilidad que asume un andrógeno.⁶⁵ La bicalutamida es un antiandrógeno no esteroideo periféricamente selectivo, careciendo de acción sobre la glándula pituitaria o sobre el hipotálamo. Se ha demostrado que el mecanismo de acción de este agente radica en su afinidad con el AR, compitiendo con la DHT en los dominios de unión.⁶⁶ El ketoconazol es un agente que disminuye drásticamente la producción de testosterona, debido a que interactúa con el receptor androgénico e inhibe la enzima citocromo P-450, involucrada en su biogénesis.^{67,68} Aunque esta clase de antiandrógenos no presentan efectos agonistas hormonales, han mostrado severos efectos colaterales, incluyendo hepatotoxicidad, diarreas, náuseas y vómitos. Por otro lado, la desventaja más grande que presentan estos agentes es la vida media muy corta y como resultado mayores dosis en tiempos cortos que se asocian a efectos secundarios inaceptables.^{69,70}

2.8 INHIBIDORES DE LA ENZIMA 5 α -REDUCTASA

Con base en el mecanismo de transformación enzimática de la testosterona a DHT (Fig. 2.6), se han diseñado dos tipos de inhibidores de la enzima 5 α -reductasa. El primer tipo de inhibidores lo constituyen los substratos análogos a la testosterona, los cuales compiten con ella inhibiendo su unión al complejo 5 α -reductasa-NADPH. El prototipo de esta clase de inhibidores reversibles es la finasterida (Proscar). Se ha propuesto que el mecanismo de acción de este agente, involucra la unión reversible a la enzima por la formación de un aducto dihidrofinasterida-NADP⁺, el cual imposibilita la transferencia de un último protón que completa la reducción (Fig. 2.12).⁷¹

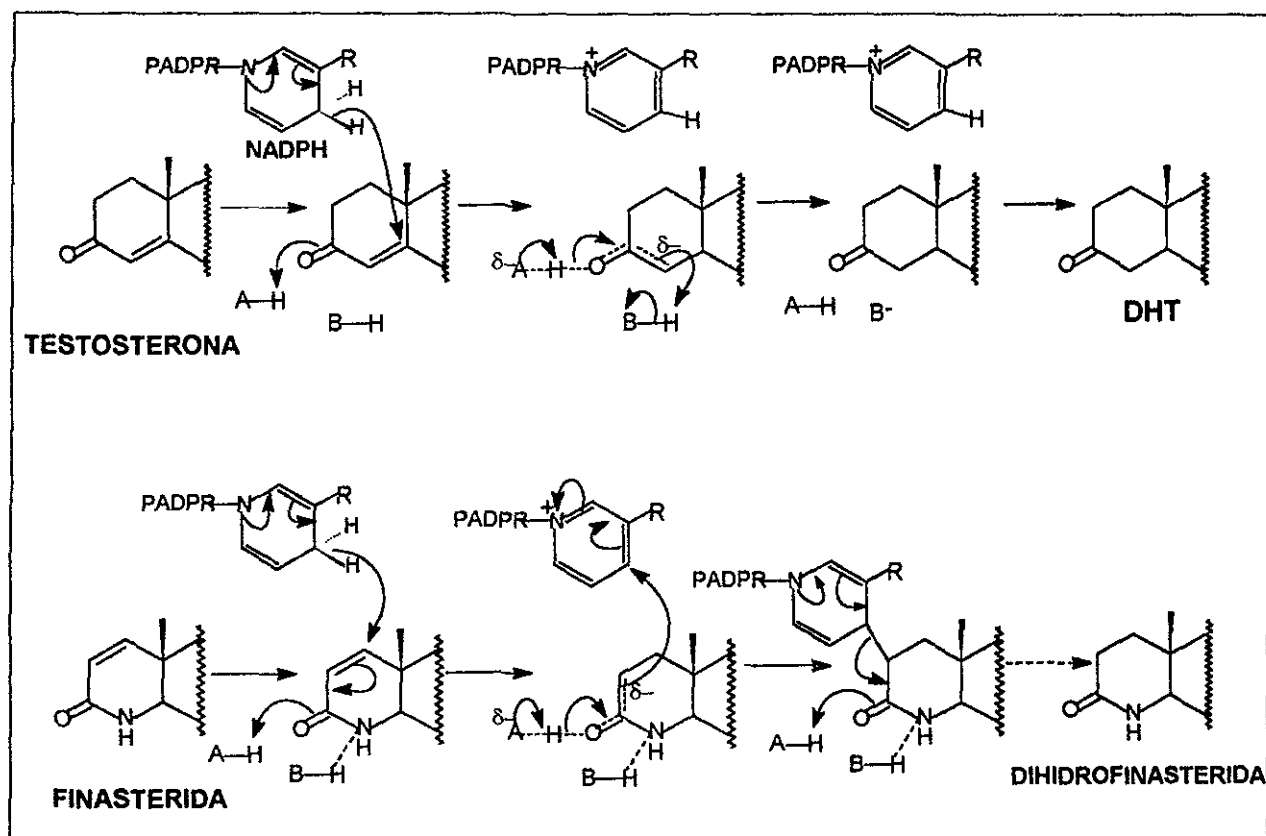


Figura 2.12. Mecanismo de inhibición propuesto para la finasterida. Se ilustra el mecanismo de reducción de la testosterona y el de la finasterida, los cuales proceden a través de enolatos como intermediarios, pero el de la finasterida diverge en la posición del carbanión, donde escapa de la transferencia del protón que normalmente completa la reducción. La descomposición del aducto NADP⁺-dihidrofinasterida ($t_{1/2}$ = 30 días a 37°C), indicado con la flecha discontinua, puede ser un proceso enzimático ó no enzimático (tomado de Herbert G. Bull, et. al.).

El segundo tipo de inhibidores lo constituyen compuestos que mimetizan al intermediario enolato que se forma durante la reducción enzimática de la testosterona. Estos inhibidores se unen al complejo 5α -reductasa-NADP⁺, después que la DHT ha sido liberada, lo cual ocasiona que dicho complejo no pueda entrar a otro ciclo catalítico. El prototipo de esta clase de inhibidores es la Epristerida (Fig. 2.13).⁷²

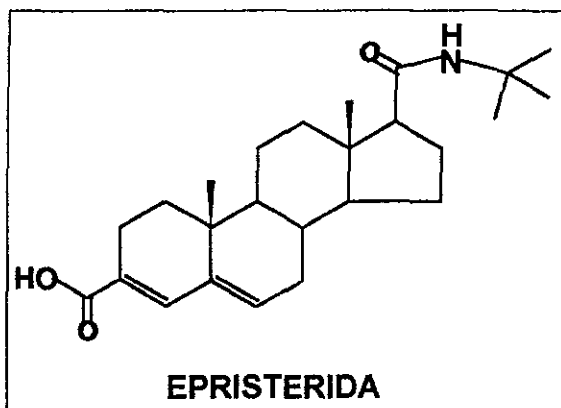


Figura 2.13. Estructura de la Epristerida.
Mimetiza el intermediario enolato propuesto en la reducción de la testosterona.

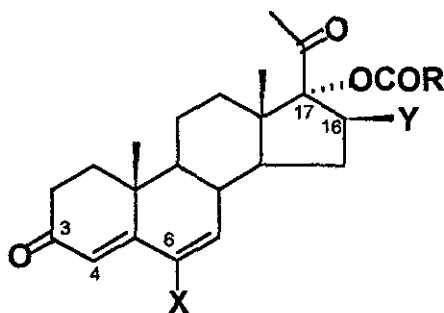
Los inhibidores de la enzima 5α -reductasa inducen el decremento en la concentración de DHT, aumentando los niveles de T, con ello se produce una disminución marcada del tamaño de la próstata, sin presentar efectos secundarios no deseables, entre los que incluyen la pérdida de la libido, de la masa muscular y la potencia, mejorando la calidad de vida del enfermo, en contraste con las demás terapias descritas previamente.

2.9 DESARROLLO DE ANTIANDRÓGENOS ESTEROIDALES

Debido a los serios inconvenientes de las terapias disponibles en la actualidad y a los severos efectos colaterales de los fármacos disponibles en el mercado, continúan realizándose los esfuerzos por desarrollar nuevos agentes esteroidales con mayor actividad antiandrogénica y menores efectos secundarios no deseables. De manera general, existen dos caminos para la síntesis de nuevos antiandrógenos esteroidales: uno es a través de la modificación química de la molécula de testosterona para obtener compuestos con actividad antagónica, presentando menores efectos androgénicos y anabólicos, y el otro es a través de la modificación molecular de la progesterona, que permite obtener compuestos con mayor actividad antiandrogénica (ya que la progesterona es un antiandrógeno *per sé*) disminuyendo los efectos progestacionales. La modificación de la molécula de progesterona es de particular interés, debido a que se pueden obtener compuestos esteroidales con actividad antiandrogénica presentando baja actividad hormonal, baja toxicidad y sin disminución de la libido. Como ejemplos de antiandrógenos derivados de la progesterona se encuentran el acetato de ciproterona (5) y la finasterida (6, Proscar)(ver Fig. 2.10).^{10,55,73}

3.- PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En base a los estudios de relación estructura-actividad de una serie de derivados del pregnano sintetizados en nuestro laboratorio, se han encontrado los siguientes requerimientos estructurales necesarios para que una molécula presente actividad antiandrogénica.⁷⁴⁻⁷⁷



1.- *Presencia de un sistema conjugado 4,6-dien-3-ona.* Parece ser que este sistema le permite a la molécula competir con la testosterona por la enzima 5α -reductasa, ya que presenta dos sitios de posible reducción. También se ha observado que la planaridad que genera este sistema en la molécula juega un papel crucial.

2.- *Presencia de un átomo de halógeno en C-6.* Estudios recientes llevados a cabo por Bratoeff y cols.,⁷⁸ han indicado que la presencia de un átomo de halógeno en la posición C-6 permite que la molécula sea un sustrato muy propenso a la reducción enzimática por la 5α -reductasa. Se ha observado que el halógeno en C-6 interfiere con la resonancia usual de la cetona $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ insaturada, desestabilizando la molécula y disminuyendo la energía de activación necesaria para la transferencia del hidruro. Aunque la adición del hidruro se da por los mecanismos 1-4 (adición del hidruro en C-4) y 1-6 (adición del hidruro en C-6), se favorece este último por tener asociada la menor energía de activación. También se ha observado que la actividad antiandrogénica de los derivados, depende de la naturaleza del halógeno insertado en C-6.

3.- *Introducción de un grupo electronegativo y voluminoso en C-17 (éster).* En vista que la progesterona y sus análogos se inactivan rápidamente en el plasma a través de la reducción enzimática del carbonilo en C-20, la presencia de un grupo voluminoso protege a la molécula de este proceso.

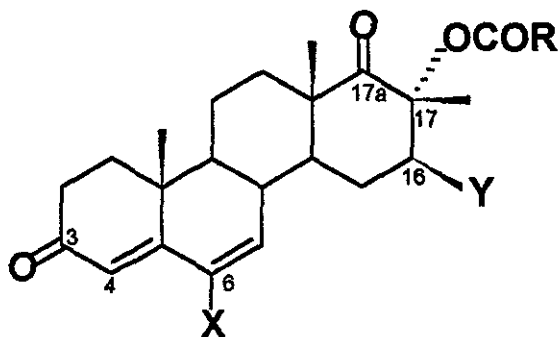
4.- *Presencia de un grupo voluminoso en C-16 β .* Se ha observado que la presencia de un grupo voluminoso en C-16 beta orientado, protege al éster en C-17 de su hidrólisis enzimática.

A pesar de todas las observaciones antes descritas en los derivados del pregnano, aún no se han establecido patrones estructurales esteroideos para que una molécula presente actividad antiandrogénica. No obstante, se han estudiado diversos esteroideos con modificaciones en los anillos A y B, de los que se ha demostrado que los requerimientos estructurales, tanto para la unión con el receptor androgénico como para la interacción con la 5 α -reductasa, pueden variar un poco en el grado de flexibilidad y tamaño de estos anillos.⁷⁹⁻⁸¹ Sin embargo, no se conocen modificaciones en el anillo D, respecto a tamaño y flexibilidad, que afecten la actividad antiandrogénica de un esteroide.

Por otro lado, existen observaciones estructurales de los anillos del androstano en una serie de derivados androgénicos. En la literatura se ha descrito la síntesis de diversos derivados del homoandrostano (aquellos que tienen un metileno adicional en su sistema tetracíclico), donde sólo los B-homo y D-homo presentan actividad androgénica apreciable.^{10,82}

En nuestro laboratorio se ha observado que el anillo D del esqueleto pregnano se expande a un anillo de seis miembros (formando un D-homo derivado del pregnano) únicamente cuando presenta ciertos sustituyentes y es sometido en condiciones adecuadas.⁸³ Aunque esta transformación sólo ha sido descrita por Bratoeff y cols., se sabe que diversos rearrreglos de metabolitos secundarios sometidos a complejos ambientes enzimáticos, ocurren en la naturaleza.⁷³

Tomando en cuenta todos los requerimientos estructurales mencionados anteriormente, para que un derivado del pregnano muestre actividad antiandrogénica a través de la inhibición de la enzima 5α -reductasa, considerando que no existen estudios sobre la actividad biológica de los derivados D-homo del pregnano y dada la importante necesidad de desarrollar nuevos agentes potenciales contra el cáncer de próstata e HPB, este trabajo de investigación plantea la síntesis de derivados del D-homo pregnano que presenten los siguientes motivos estructurales:



Presencia de la entidad 4,6-dien-3-ona

Presencia de un átomo de halógeno (cloro ó bromo) en C-6 (X)

Introducción de un ester benzoato en C-17 α (R= fenilo)

Introducción de un grupo fenilo en C-16 β (Y= fenilo)

También se plantea la bioevaluación de algunos de los intermediarios y compuestos finales sobre su capacidad de inhibir a la enzima 5α -reductasa a través de ensayos *in vivo* e *in vitro*.

4.- OBJETIVOS

Sintetizar los derivados D-homo del pregnano 17 α -Benzoiloxi-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VIII), 17 α -Benzoiloxi-6 α ,7 α -epoxi-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4-pregnen-3,17a-diona (IX), 17 α -Benzoiloxi-6-bromo-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3-17a-diona (Xa) y 17 α -Benzoiloxi-6-cloro-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3-17a-diona (Xb).

Determinar la actividad antiandrogénica de los compuestos finales (Xa y Xb) e intermediarios mediante ensayos *in vivo* e *in vitro*.

OBJETIVOS PARTICULARES

Desarrollar, estandarizar y optimizar métodos sintéticos para introducir un átomo de halógeno en C-6, un grupo fenilo en C-16 β y un ester benzoato en C-17 α , para obtener las sustituciones químicas requeridas en el esqueleto del D-homo pregnano.

Purificar y caracterizar los compuestos finales e intermediarios mediante métodos químicos, cromatográficos y espectroscópicos.

Evaluar *in vivo* la actividad antiandrogénica de los compuestos finales e intermediarios a través del ensayo de las vesículas seminales en hamsters.

Determinar *in vitro* la actividad inhibitoria de los compuestos finales e intermediarios sobre la enzima 5 α -reductasa presente en el hongo *P. crustosum*.

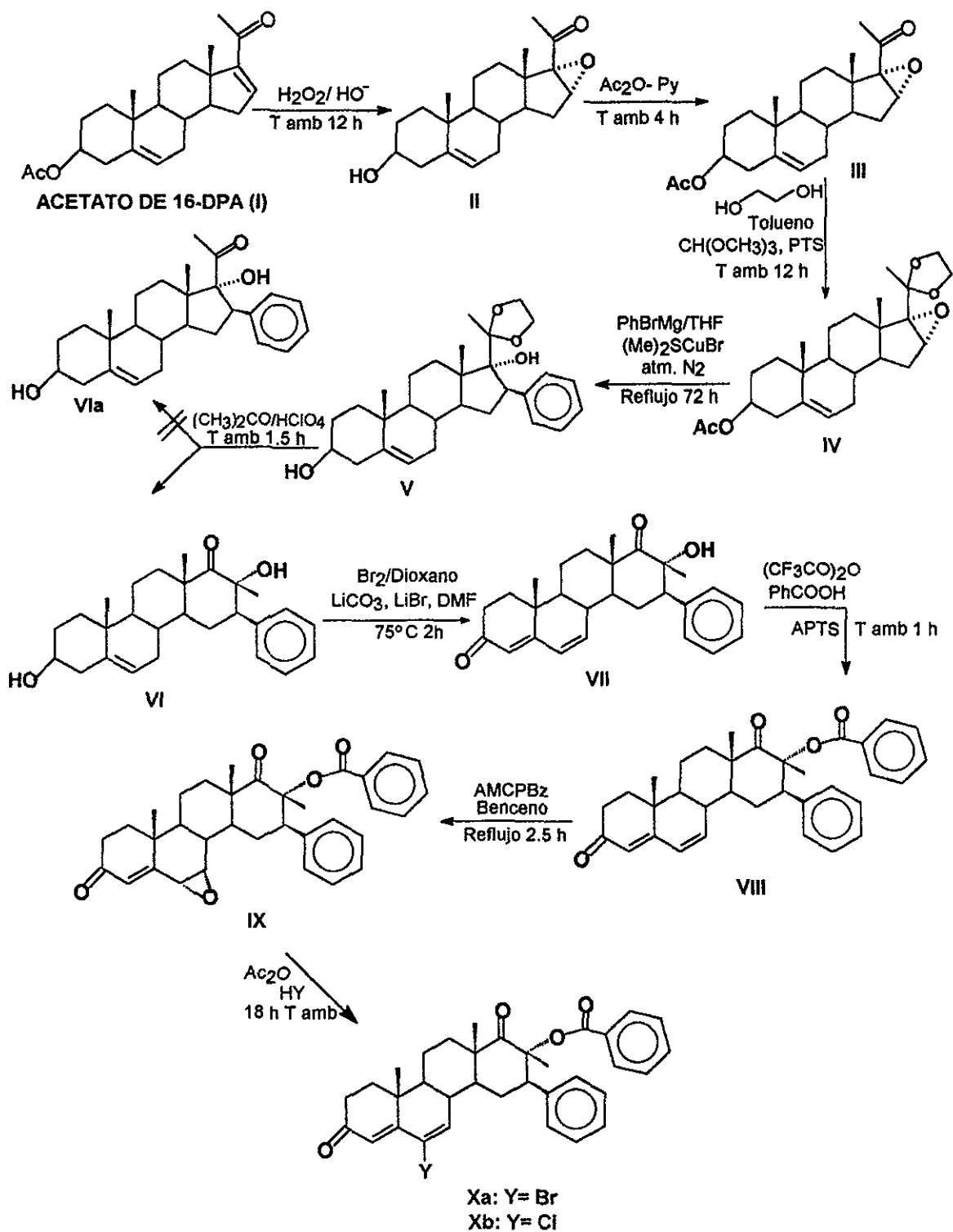
Comparar las actividades biológicas evaluadas de los compuestos finales e intermediarios con el antiandrógeno de elección en el mercado Finasterida (Proscar).

Analizar la influencia del anillo D en la actividad antiandrogénica así como la naturaleza del halógeno insertado en C-6.

5.- DESARROLLO EXPERIMENTAL

El desarrollo experimental del presente trabajo se dividió en dos partes. En la primera parte, la parte química, se realizó la síntesis química y la caracterización física y espectroscópica de los intermediarios y compuestos finales. En la **figura 5.1** se muestra la secuencia sintética que permitió obtener los compuestos finales con las características estructurales requeridas. Los puntos de fusión de los compuestos se determinaron en un aparato Fisher-Johnes y no están corregidos. La pureza de los productos y el avance de las reacciones se siguió por cromatografía en capa delgada (CCD), utilizando cromatoplasmas de gel de sílice (60F 254, Merck), un sistema de elución n-hexano-acetato de etilo 7:3 y empleando como revelador una solución de CoCl_2 al 1% en H_2SO_4 2N y/o lámpara de luz 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 utilizados en los diversos estudios fueron los siguientes: para la técnica de Espectrofotometría de Absorción al Ultravioleta (UV) se empleó un equipo Perkin Elmer 200s, para la Espectrofotometría de Absorción al Infrarrojo (IR) un equipo Perkin Emer 549B, utilizando la técnica de pastilla de KBr, y para la Espectroscopía de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN^1H) y de Carbono (RMN^{13}C) se utilizaron los equipos Varian, Gemini 200 y VRX-300s, utilizando CDCl_3 como disolvente; los desplazamientos químicos (δ) están dados en ppm referidos al tetrametilsilano (TMS). Por último en la Espectrometría de Masas (EM) se empleó un espectrómetro de masas HP 5985-B GC/MS mediante la técnica de impacto electrónico (IE).

En la segunda parte, la parte biológica, se llevó a cabo la evaluación de la actividad antiandrogénica de los intermediarios y compuestos finales, utilizando sistemas *in vivo* e *in vitro*. Se tomaron como parámetros de actividad, la capacidad de inhibir el crecimiento de vesículas seminales en hamsters gonadectomizados, y a la enzima 5 α - reductasa, presente en el hongo *Penicillium crustosum*.



$\text{Ac}_2\text{O-Py}$: anhídrido acético-piridina, DMF: dimetilformamida, PTS ácido p-toluensulfónico, AMCPBz: ácido m-cloro perbenzoico.

Figura 5.1. Ruta general de síntesis.

6.- METODOLOGÍA Y RESULTADOS

6.1 PARTE QUÍMICA

Tabla 1. Propiedades físicas y espectroscópicas de la materia prima 3 β -Acetoxi-5,16-pregnadien-20-ona (I).⁸⁴

Propiedad	Valor
Punto de fusión (°C)	170-172
Fórmula molecular	C ₂₃ H ₃₂ O ₃
Peso molecular (uma)	356.51
Valor espectroscópico	Asignación
UV (nm)	
λ_{max} 238	<u>CO</u> α,β insaturado en C-20
IR (cm⁻¹)	
2945 (M)	C-H (st) de -CH ₃ y -CH ₂
1729 (S)	<u>C=O</u> de éster en C-3
1661 (S)	<u>C=O</u> α,β insaturado en C-20
1583 (W)	<u>C=C</u> conjugado en C-16
1451 (W)	-CH ₂ (δ)
1440 (W)	<u>CH₃-CO</u> (δ) en C-20
1372 (S)	-CH ₃ (δ)
1247 (S)	<u>C-O</u> (st as) de CH ₃ CO- en C-3
1037 (S)	<u>C-O</u> (st si) de CH ₃ CO- en C-3
RMN ¹H (ppm)	
0.92 (s, 3H)	- <u>CH₃</u> en C-18
1.05 (s, 3H)	- <u>CH₃</u> en C-19
2.03 (s, 3H)	- <u>CH₃</u> en C-21
2.26 (s, 3H)	- <u>CH₃COO-</u> en C-3
4.5 (m, 1H)	- <u>CH</u> base de CH ₃ COO- en C-3
5.4 (dd, 1H; J ₁ =4Hz y J ₂ =2Hz)	<u>C=CH</u> en C-6
6.7 (t, 1H; J= 3Hz)	<u>C=CH</u> en C-16

6.1.1. Síntesis de 16 α ,17 α -Epoxi-3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona (II).^{85,86}

En un matraz bola se disolvió 1.0 g (2.8×10^{-3} mol) de 16-DPA en metanol caliente (66 mL), se agregó hidróxido de sodio 4 N (2 mL, 8×10^{-3} mol) y peróxido de hidrógeno al 30% (4 mL, 0.135 mol). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 4 h siguiendo su avance por CCD; concluida ésta, se agregó suficiente hielo y se concentró en rotavapor para eliminar todo el metanol posible,

lo cual produjo que II precipitara en forma de cristales blancos. Posteriormente el producto fué lavado con H₂O destilada (aprox. 250 mL) con la finalidad de eliminar el exceso de hidróxido de sodio; finalmente se dejó secar al vacío obteniendo 0.908 g (98 %) de II como cristales blancos con p.f.: 180-182 °C (180-181 °C reportado en la literatura).⁸⁷

Tabla 2. Propiedades físicas y espectroscópicas para el compuesto 16 α , 17 α -Epoxi-3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona (II).

Propiedad	Valor
Punto de fusión (°C)	180-182
Fórmula molecular	C ₂₁ H ₃₀ O ₃
Peso molecular (uma)	330.47
Valor espectroscópico	Aasignación
IR (cm⁻¹)	
3370 (M)	-OH (st) en C-3
2937 (S)	C-H (st) de -CH ₃ y -CH ₂
1692 (S)	C=O en C-20
1452 (W)	-CH ₂ (δ)
1375 (M)	-CH ₃ (δ)
1056 (M)	C-O (st) de -OH secundario en C-3
857 (W)	C-O-C (st) de epóxido en C-16-C-17
RMN ¹H (ppm)	
1.02 (s, 3H)	-CH ₃ en C-18
1.05 (s, 3H)	-CH ₃ en C-19
2.03 (s, 3H)	-CH ₃ en C-21
3.20 (s, 1H)	-CH base del epóxido en C-16
3.52(m, 1H)	-CH base en C-3
3.68 (s, 1H)	-OH en C-3
5.3 (dd, 1H; J1=4 Hz, J2=2Hz)	C=CH en C-6

6.1.2. Síntesis de 3 β -Acetoxi-16 α ,17 α -epoxi-5-pregnen-20-ona (III). En un matraz bola, 1 g (3.03×10^{-3} mol) de II se disolvió en 10 mL (0.105 mol) de Ac₂O y 2.5 mL (0.03 mol) de piridina y se agitó a temperatura ambiente durante 4h siguiendo el desarrollo de la reacción por CCD; transcurrido el tiempo, la mezcla se vertió en un vaso de precipitados que contenía aprox. 100 mL de agua y suficiente hielo, lo cual hizo precipitar a III en forma de un sólido blanco. Este se filtró al vacío y se lavó con agua hasta pH neutro para eliminar el exceso de

piridina y AC_2O ; finalmente se dejó secar al vacío obteniéndose 1.09 g (96%) de III como agujas de color blanco con p.f.: 157-159°C (160-162°C reportado en la literatura).⁸⁷

Tabla 3. Propiedades Físicas y espectroscópicas del compuesto 3 β -Acetoxi-16 α ,17 α -epoxi-5-pregnen-20-ona (III).

Propiedad	Valor
Punto de fusión (°C)	157-159
Fórmula molecular	$C_{23}H_{32}O_4$
Peso molecular (uma)	372.5
Valor espectroscópico	Aasignación
IR (cm⁻¹)	
2942 (M)	C-H (st) de -CH ₃ y -CH ₂
1731 (S)	C=O de CH ₃ COO- en C-3
1697 (S)	C=O en C-20
1376 (M)	-CH ₃ (δ)
1245 (S)	C-O (st as) de CH ₃ COO- en C-3
1032(M)	C-O (st si) de CH ₃ COO- en C-3
852(W)	C-O-C de epóxido en C-16 y C-17
RMN ¹H (ppm)	
0.96 (s, 3H)	-CH ₃ en C-18
0.97 (s, 3H)	-CH ₃ en C-19
1.962 (s, 6H)	-CH ₃ en C-21 y CH ₃ -COO- en C-3
3.41 (s, 1H)	H base del epóxido en C-16
4.58 (m, 1H)	H base de CH ₃ -COO- en C-3
5.3 (dd, 1H; J ₁ =4Hz y J ₂ =2Hz)	C=CH en C-6

6.1.3. Síntesis de 3 β -Acetoxi-16 α ,17 α -epoxi-20-etilendioxi-5-pregнено (IV).^{88,83} En un matraz bola se disolvió 1.0 g (2.6×10^{-3} mol) de III en 6 mL de tolueno seco, se agregó eilenglicol (3 mL, 0.053 mol), ortoformiato de trimetilo (5 mL, 0.045 mol) y ácido p-toluensulfónico seco (0.03 g, 1.7×10^{-3} mol) como catalizador. La mezcla resultante se agitó durante toda la noche a temperatura ambiente y bajo condiciones anhidras, siguiendo el avance de la reacción por CCD. Concluído el tiempo, la mezcla de reacción se neutralizó con 0.035 g (4.26×10^{-4} mol) de acetato de sodio anhidro y se vertió a un embudo de separación con aprox. 30 mL de $CHCl_3$; se lavó con H_2O destilada (3 x 50 mL) y la fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro. Se evaporó el disolvente produciendo un sólido

amarillento que al recristalizarse de metanol produjo 0.83 g (74%) de IV puro como cristales blancos de p.f.: 194-196 °C (192-194 °C reportado en la literatura).

Tabla 4. Propiedades físicas y espectroscópicas de 3 β -Acetoxi-16 α ,17 α -epoxi-20-etilendioxi-5-pregneno (IV).

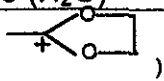
Propiedad	Valor
Punto de fusión (°C)	192-194
Fórmula molecular	C ₂₅ H ₃₆ O ₅
Peso molecular (uma)	416.56
Valor espectroscópico	Aasignación
IR (cm⁻¹)	
2941 (M)	C-H (st) de -CH ₃ y -CH ₂
1719 (S)	C=O de CH ₃ COO- en C-3
1465 (W)	-CH ₂ δ
1440 (W)	CH ₃ -CO (δ) en C-20
1371 (W)	-CH ₃ δ
1248 (S)	C-O (st as) de CH ₃ COO- en C-3
1333 (M)	C-O (st si) de CH ₃ COO- en C-3
RMN ¹H (ppm)	
0.99 (s, 3H)	-CH ₃ en C-18
1.04 (s, 3H)	-CH ₃ en C-19
1.44 (s, 3H)	-CH ₃ en C-21
2.04 (s, 1H)	CH ₃ -COO- en C-3
3.39 (s, 1H)	H base del epóxido en C-16
3.95 (m, 4H)	-O-CH ₂ -CH ₂ -O- en C-20
4.6 (m, 1H)	H base de CH ₃ -COO- en C-3
5.38 (dd, 1H; J ₁ =4Hz y J ₂ =2Hz)	C=CH en C-6

6.1.4. Síntesis de 3 β ,17 α -Dihidroxi-20-etilendioxi-16 β -fenil-5-pregneno (V).^{74,76,99} A 1.0 g (2.4×10^{-3} mol) de IV y 300 mg (1.44×10^{-3} mol) de complejo de bromuro de dimetilsulfuro-cobre, colocados en un matraz de dos bocas equipado con un refrigerante en posición de reflujo, se agregaron 14 mL (0.014 mol) de una solución de bromuro de fenilmagnesio 1M. La mezcla resultante se calentó durante 4 días bajo atmósfera de nitrógeno. Transcurrido dicho tiempo, la mezcla se transfirió lentamente a un embudo de separación que contenía una solución saturada de cloruro de amonio (15 mL) H₂O destilada (aprox. 30 mL) y hielo. La fase acuosa se extrajo 3 veces con CHCl₃; las fases orgánicas se juntaron y lavaron con agua (5 x 30 mL) hasta eliminar las sales de magnesio precipitadas.

La fase orgánica se secó (Na_2SO_4 anh.) y evaporó el disolvente, obteniéndose un producto aceitoso que cuando se recristalizó de metanol produjo 0.71 g (65%) de V puro como agujas finas blancas con p.f.: 220-222°C (reportado: 221-222°C).

Tabla 5. Propiedades físicas y espectroscópicas de 3 β ,17 α -Dihidroxi-20-etilendioxi-16 β -fenil-5-pregneno (V).

Propiedad	Valor
Punto de fusión (°C)	221-222
Fórmula molecular	$\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{O}_4$
Peso molecular (uma)	452.63
Valor espectroscópico	Asignación
IR (cm^{-1})	
3571 (M) y 3420 (M)	-O-H (st) en C-17 y C-3
2933 (S)	C-H (st) de - CH_3 y - CH_2
2887 (S)	-O- CH_2 - (st) de etilendioxi en C-20
1599 (W)	C=C aromático en C-16
1450 (W)	- CH_2 δ
1493 (W)	C=C aromático en C-16
1372 (W)	- CH_3 δ
1048 (S)	C-OH (st) en C-3 y C-17
900, 766 y 698	C=C-H arom (oop) (patrón de monosustitución del grupo β -fenilo en C-16)
RMN ^1H (ppm)	
1.06 (s, 3H)	- CH_3 en C-18
1.10 (s, 3H)	- CH_3 en C-19
1.21 (s, 3H)	- CH_3 en C-21
3.1 (m, 1H)	C-H bencílico en C-16
3.3 (m, 2H)	-O- CH_2 - CH_2 -O- en C-20
3.52 (m, 2H)	-O- CH_2 - CH_2 -O- en C-20
5.39 (dd, 1H; $J_1=4\text{Hz}$ y $J_2=2\text{Hz}$)	C=CH en C-6
7.26 (m, 5H)	H aromáticos del grupo β -fenilo en C-16
RMN^{13}C (ppm)	
14.50	C-18
19.44	C-19
21.21	C-21
60.68	C-16 base del grupo β -fenilo
61.41 y 64.45	-O- CH_2 - CH_2 -O-
71.72	C-17 base de -OH
71.73	C-3 base de -OH
90.06	C-20 base del grupo etilendioxi
121.58	C-6 vinílico
125.20-128.73	CH's aro del grupo β -fenilo en C-16

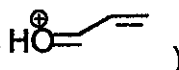
140.67	C ipso del grupo β -fenilo en C-16
143.55	C-5 vinílico
EMIE (m/z)	
452	M ⁺
424	M - 28 (C ₂ H ₂)
409	424 - 15 (CH ₃)
390	424 - 34 (OH + OH)
364	390 - 26 (C ₂ H ₂)
347	364 - 17 (OH)
329	347 - 18 (H ₂ O)
87 (100% Ab. Rel.) (pb)	C ₄ H ₇ O ₂ ⁺ ()

6.1.5. Síntesis de 3 β ,17 α -Dihidroxi-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-5-pregnen-17a-ona (VI).^{76,83,90} A una solución de 1.0g (2.2 x 10⁻³ mol) de V en acetona (80 mL) se agregó gota a gota y con agitación 1.0 mL (0.11 mol) de HClO₄. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 3 h siguiendo el curso de la reacción por CCD. Posteriormente se evaporó el disolvente hasta un volumen mínimo, el cual se vertió a un vaso de precipitados que contenía 150 mL de solución saturada de NaHCO₃ y hielo. De esta manera el compuesto VI precipitó como sólido blanco amorfo el cual se filtró y lavó con H₂O destilada. Finalmente se dejó secar toda la noche al vacío obteniéndose 0.87g (96%) de VI crudo. El p.f. de los cristales transparentes de metanol fué de 210-211°C (reportado 209-211°C).

Tabla 6. Propiedades físicas y espectroscópicas de 3 β ,17 α -Dihidroxi-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-5-pregnen-17a-ona (VI).

Propiedad	Valor
Punto de fusión (°C)	209-211
Fórmula molecular	C ₂₇ H ₃₆ O ₃
Peso molecular (uma)	408.58
Valor espectroscópico	Asignación
IR (cm⁻¹)	
3482 (M)	-O-H (st) en C-17
3426 (M)	-O-H (st) en C-3
3028 (W)	C=C-H (st) arom
2930 (S)	C-H (st) de -CH ₃ y -CH ₂

1692 (S)	CO de cetona en C-17a
1602 (W)	C=C arom en C-16
1456 (M)	-CH ₂ (δ)
1378 (S)	-CH ₃ (δ)
1056 (M)	C-OH (st) en C-17
1002 (M)	C-OH (st) en C-3
RMN ¹H (ppm)	
1.038 (s, 3H)	-CH ₃ en C-18
1.106 (s, 3H)	-CH ₃ en C-19
1.216 (s, 3H)	-CH ₃ β en C-17
1.53 (m, 1H)	-CH en C-14
1.7 (m, 1H)	-CH en C-8
1.99 (m, 2H)	-CH ₂ en C-15
2.23 (m, 2H)	-CH ₂ en C-7
2.33 (m, 1 H)	-CH ₂ en C4
2.9 (m, 1H)	-CH bencílico en C-16
3.52 (m, 1H)	-CH base de -OH en C-3
5.39 (dd, 1H; J ₁ =4Hz y J ₂ =2Hz)	C=CH vinílico en C-6
7.3 (m, 5H)	H's del grupo β-ferilo en C-16
RMN13C (ppm)	
15.97	C-18 (-CH ₃)
19.34	C-19 (-CH ₃)
19.43	C11 (-CH ₂ -)
23.94	CH ₃ β en C-17
26.46	C-15 (-CH ₂ -)
30.97	C-8 (-CH-)
31.46	C-2 (-CH ₂ -)
31.69	C-1 (-CH ₂ -)
33.03	C-7 (-CH ₂ -)
36.74	C-10 (C cuaternario)
36.78	C-12 (-CH ₂ -)
41.89	C-4 (-CH ₂ -)
47.03	C-13 (C cuaternario)
49.00	C-9 (-CH-)
50.96	C-14 (-CH-)
54.46	C-16 base del grupo β-ferilo
71.48	C-3 base de -OH
78.21	C-17 base de -CH ₃ y -OH
120.86	C-6 vinílico
126.82	CH para del grupo β-ferilo en C-16
127.86	CH orto del grupo β-ferilo en C-16
129.09	CH meta del grupo β-ferilo en C-16
139.72	C ipso del grupo β-ferilo en C-16
140.56	C-5 vinílico

218.15	C=O en C-17a
EMIE (m/z)	
408	M ⁺
390	M-H ₂ O
380	M-28 (CO)
375	390- 15 (CH ₃)
365	380- 15 (CH ₃)
347	365 - 18 (H ₂ O) ó 375 - 28 (CO)
91 (100% Ab. Rel.) (pb)	ión tropilio
57	ión oxonio ()

6.1.6. Síntesis de 16β-fenil-17α-hidroxi-17β-metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VII).^{74,85,90} A una suspensión de 1.0 g (2.4×10^{-3} mol) de VI, 3.0g (0.04 mol) de carbonato de litio y 2.0 g (0.022 mol) de bromuro de litio, en dimetilformamida (14 mL) se le agregó gota a gota y con agitación una solución de 0.3 mL (5.82×10^{-3} mol) de bromo disuelto en 8.5 mL de dioxano. La mezcla de reacción resultante se calentó a reflujo ($75^{\circ}\text{C} \pm 5^{\circ}\text{C}$) durante 2 h monitoreando su desarrollo por CCD. Posteriormente se dejó enfriar a temperatura ambiente y filtró. Al filtrado se le agregaron 180 mL de una solución acuosa de NaHCO₃/NaHSO₃ (0.3g/0.3g) para eliminar el exceso de bromo. El producto crudo VII precipitó como un sólido esponjoso amarillo pálido que se purificó por recristalización de acetona dando 0.59 g (60%) en forma de cristales amorfos blancos con p.f.: 278-280 °C (reportado 276-280°C).

Tabla 7. Propiedades físicas y espectroscópicas de 16β-fenil-17α-hidroxi-17β-metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VII).

Propiedad	Valor
Punto de fusión (°C)	278-280
Fórmula molecular	C ₂₇ H ₃₂ O ₃
Peso molecular (uma)	404.55
Valor espectroscópico	Asignación
UV (nm)	
282.79	CO α,β,γ,δ insaturado en C-3
IR (cm⁻¹)	
3446 (M)	-O-H (st) en C-17
3028 (W)	C=C-H (st)

2944 (M)	-C-H (st) de -CH ₃ y -CH ₂
1694(M)	CO de cetona en C-17a
1656 (S)	CO $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ insaturada en C-3
1616(M)	C=C aro en C-16 y C=C dieno conjugado en C-5 y C-6
1452 (M)	-CH ₂ (δ)
1356 (W)	-CH ₃ (δ)
1126 (S)	C-OH terciario en C-17
878, 758 y 701 (W)	C=C-H (oop) arom (patrón de monosustitución del grupo β -fenilo en C-16)
RMN ¹H (ppm)	
1.170 (s, 3H)	-CH ₃ en C-18
1.176 (s, 3H)	-CH ₃ en C-19
1.329 (s, 3H)	-CH ₃ β en C-17
3.00 (dd, 1H; J= 3 Hz)	-CH bencílico en C-16
5.73 (s, 1 H)	C=CH en C-4
6.20 (dd, 1H; J ₁ =10 Hz, J ₂ =2 Hz)	C=CH en C-6
6.33 (dd, 1H; J ₁ =10 Hz, J ₂ = 2 Hz)	C=CH en C-7
7.3 (m, 5H)	H's aro del grupo β -fenilo en C-16
RMN ¹³C (ppm)	
16.19	C-18 (-CH ₃)
16.25	C-19 (-CH ₃)
19.25	C-11 (-CH ₂ -)
23.98	CH ₃ β en C-17
26.16	C-15 (-CH ₂ -)
33.02	C-2 (-CH ₂ -)
33.53	C-1 (-CH ₂ -)
33.81	C-12 (-CH ₂ -)
36.11	C-10 (C cuaternario)
36.34	C-8 (-CH-)
47.42	C-13 (C cuaternario)
48.05	C-9 (-CH-)
49.56	C-14 (-CH-)
54.18	C-16 base del grupo β -fenilo
78.16	C-17 base de -OH y -CH ₃
124.01	C-4 vinílico
127.06	CH para del grupo β -fenilo en C-16
128.00	CH orto del grupo β -fenilo en C-16
129.08	CH meta del grupo β -fenilo en C-16
129.17	C-6 vinílico
137.71	C-7 vinílico
139.30	C ipso del grupo β -fenilo en C-16
162.29	C-5 vinílico
199.30	C=O en C-3

217.21	C=O en C-17a
EMIE (m/z)	
404 (100 % Ab. rel)(pb)	M ⁺
387	M ⁺ - 17 (HO)
386	M ⁺ - 18 (H ₂ O)
376	M ⁺ - 28 (CO)
361	376 - 15(CH ₃)
343	361 - 18 (H ₂ O)
91	ión tropilio

6.1.7. Síntesis de 17 α -Benzoiloxi-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VIII). En un matraz bola se mezclaron 3g (2.47×10^{-2} mol) de ácido benzoico, 3.48 mL (5.18g, 2.47×10^{-2} mol) de anhídrido trifluoroacético y 0.3g (1.74×10^{-3} mol) de ácido p-toluensulfónico como catalizador. La mezcla se agitó por una hora a temperatura ambiente en condiciones anhidras, seguido de la adición de 1g (2.475×10^{-3} mol) de VII. La mezcla de reacción se agitó durante una hora a temperatura ambiente siguiendo su transcurso por CCD. Posteriormente la mezcla se diluyó con CHCl₃ (20 mL) y vertió a un vaso de precipitados que contenía NaOH (30 ml) al 10% en agitación (esta operación se repitió tres veces). La fase orgánica se lavó con H₂O destilada (40 mL x 5) hasta pH neutro y se secó con Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se evaporó al vacío obteniéndose un residuo oleoso el cual después de recristalizarlo de AcOEt/n-hexano dió 0.95g (75%) de VIII en forma de agujas ligeramente verdosas con p.f.: 270-273°C (no existe p.f. reportado por ser un producto nuevo).

Tabla 8: Propiedades físicas y espectroscópicas de 17 α -Benzoiloxi-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VIII).

Propiedad	Valor
Punto de fusión (°C)	270-273
Fórmula molecular	C ₃₄ H ₃₆ O ₄
Peso molecular (uma)	508
Valor espectroscópico	Asignación
UV (nm)	
231.02	Ester BzCOO- α en C-17
281.43	<u>CO</u> $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ insaturado en C-3

IR (cm⁻¹)	
3060 (W)	C=C-H (st) aromático
3028 (W)	C=C-H (st) alqueno
2946 (M)	C-H (st) de -CH ₃ y -CH ₂
1719 (M)	Bz-CO-O- α en C-17
1702 (S)	CO de cetona en C-17a
1658 (S)	CO α,β,γ,δ insaturada en C-3
1616 (M)	C=C dieno conjugado en C-5 y C-6
1581.93 (W)	C=C aro en C-16 y C-17
1450 (M)	-CH ₂ (δ)
1379 (W)	-CH ₃ (δ)
1282 (S)	C-O (st as) de ester en C-17
1114 (M)	C-O (st si) de ester en C-17
875, 766, 748, 716 y 705(W)	C=C-H (oop) arom (patrón de monosustitución de los grupos β-fenilo en C-16 y α-benzoílo en C-17)
RMN ¹H (ppm)	
1.148 (s, 3H)	-CH ₃ en C-18
1.126 (s, 3H)	-CH ₃ en C-19
1.276 (s, 3H)	-CH ₃ β en C-17
3.988 (m, 1H)	-CH bencílico en C-16
5.705 (s, 1 H)	C=CH en C-4
6.18 (dd, 1H; J ₁ =10 Hz, J ₂ = 2 Hz)	C=CH en C-6
6.34 (dd, 1H; J ₁ =10 Hz, J ₂ = 2 Hz)	C=CH en C-7
7.15 (m, 2H)	H's orto del grupo β-fenilo en C-16
7.29 (m, 3H)	H's meta y para del grupo β-fenilo en C-16
7.44 (m, 2H)	H's meta del grupo α-benzoílo en C-17
7.59 (m, 1H)	H para del grupo α-benzoílo en C-17
8.01 (m, 2H)	H's orto del grupo α-benzoílo en C-17
RMN ¹³C (ppm)	
16.26	C-18 (-CH ₃)
17.86	C-19 (-CH ₃)
19.32	C-11 (-CH ₂ -)
22.91	CH ₃ β en C-17
25.78	C-15 (-CH ₂ -)
33.18	C-2 (-CH ₂ -)
33.57	C-1 (-CH ₂ -)
33.85	C-12 (-CH ₂ -)
36.16	C-10 (C cuaternario)
36.22	C-8 (-CH-)
44.54	C-9 (-CH-)
48.64	C-14 (-CH-)
49.55	C-16 base del grupo β-fenilo
84.11	C-17 base de -OCOBz y -CH ₃

123.85	C-4 vinílico
127.19	CH para del grupo β -fenilo en C-16
128.186	CH orto del grupo β -fenilo en C-16
128.40	CH meta del grupo α -benzoilo en C17
128.87	CH meta del grupo β -fenilo en C-16
128.99	C-6 vinílico
129.84	CH orto del grupo α -benzoilo en C17
129.95	C ipso del grupo α -benzoilo en C17
133.26	CH para del grupo α -benzoilo en C17
138.26	C-7 vinílico
139.59	C ipso del grupo β -fenilo en C-16
162.66	C-5 vinílico
165.66	C=O de ester benzoato en C-17
199.42	C=O en C-3
211.38	C=O en C-17a
EMIE (m/z)	
508	M ⁺
386	M ⁺ - 122 (BzCOOH)
371	386-15 (CH ₃ [·])
358	386-28 (CO)
343	371-28 (CO) ó 358-15 (CH ₃ [·])
253	343 - 90 (C ₇ H ₆)
105 (100% Ab. Rel.) (pb)	ión benzoilo (C ₇ H ₅ O ⁺)
91	ión tropilio (C ₇ H ₇ ⁺)
77	105-28 (CO)
51	77-26 (CH \equiv CH)

6.1.8. Síntesis de 17 α -Benzoiloxi-6 α ,7 α -epoxi-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4-pregnen-3,17a-diona (IX). En un matraz bola equipado con un refrigerante en posición de reflujo se disolvió 1g (1.96×10^{-3} mol) de VIII en 2.5 mL de benceno anhidro; por otro lado, se disolvieron 0.625 g (3.62×10^{-3} mol) de ácido *m*-cloroperbenzoico en 7.5 mL de benceno anhidro caliente y se vertió al matraz bola. La mezcla de reacción resultante se calentó durante 3 h siguiendo su desarrollo por CCD. Una vez transformada la materia prima, la mezcla se enfrió a temperatura ambiente y transfirió a un embudo de separación diluyendo con AcOEt (10 mL). La fase orgánica se extrajo con NaOH al 2% (15 mL x 3). La fase acuosa se lavó con AcOEt (15 mL x 2) y la fase orgánica resultante se lavó con H₂O destilada (20 mL x 5) hasta pH neutro y se secó con Na₂SO₄ anhidro. El disolvente se evaporó, obteniéndose de esta manera un producto amarillento

semisólido que se purificó por recristalización de AcOEt/n-hexano, dando 0.67g (65%) de IX en forma de cristales blancos amorfos (pellets) con p.f.:263-266°C (no existe p.f. reportado por ser un producto nuevo).

Tabla 9. Propiedades físicas y espectroscópicas de 17 α -Benzoiloxi-6 α ,7 α -epoxi-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4-pregnen-3,17a-diona (IX).

Propiedad	Valor
Punto de fusión (°C)	263-266
Fórmula molecular	C ₃₄ H ₃₆ O ₅
Peso molecular (uma)	524
Valor espectroscópico	Asignación
UV (nm)	
232.52	Ester BzCOO- α en C-17
IR (cm⁻¹)	
3028 (W)	C=C-H
2948 (M)	C-H (st) de -CH ₃ y -CH ₂
1719 (M)	Bz-CO-O- α en C-17
1697 (S)	CO de cetona en C-17a
1675 (S)	CO $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ insaturada en C-3
1600 (w)	C=C aro en C-16 y C-17
1451 (M)	-CH ₂ (δ)
1381 (W)	-CH ₃ (δ)
1282 (S)	C-O (st as) de ester en C-17
1116 (M)	C-O (st si) de ester en C-17
870, 768, 741,715 y 705(W)	C=C-H (oop) arom (patrón de monosustitución de los grupos β -fenilo en C-16 y α -benzoiloxi en C-17)
RMN ¹H (ppm)	
1.129(s, 3H)	-CH ₃ en C-18
1.250(s, 3H)	-CH ₃ en C-19
1.278 (s, 3H)	-CH ₃ β en C-17
3.497 (d, 1H; J= 4 Hz)	-CH base del epóxido en C-7
3.550 (dd, 1H; J ₁ = 4 Hz, J ₂ = 2 Hz)	-CH base del epóxido en C-6
4.060 (m, 1H)	-CH bencílico en C-16
6.153 (s, 1 H)	-C=CH en C-4
7.146 (m, 2H)	H's orto del grupo β -fenilo en C-16
7.281 (m, 3H)	H's meta y para del grupo β -fenilo en C-16
7.442 (m, 2H)	H's meta del grupo α -benzoilo en C-17
7.584 (m, 1H)	H para del grupo α -benzoilo en C-17
8.01 (m, 2H)	H's orto del grupo α -benzoilo en C-17

RMN¹³C (ppm)	
17.092	C-18 (-CH ₃)
17.82	C-19 (-CH ₃)
18.72	C-11(-CH ₂ -)
22.72	CH ₃ β en C-17
25.96	C-15 (-CH ₂ -)
32.95	C-2 (-CH ₂ -)
33.53	C-1 (-CH ₂ -)
33.96	C-8 (-CH-)
33.96	C-12 (-CH ₂ -)
35.89	C-10 (C cuaternario)
40.28	C-9 (-CH-)
43.28	C-14 (-CH-)
48.18	C-16 (-CH- base del grupo fenilo)
48.55	C-13 (C cuaternario)
52.76	C-7 (-CH-) base del epóxido
53.09	C-6 (-CH-) base del epóxido
84.03	C-17 base de -OCOPh y -CH ₃
127.12	C-4 vinílico
128.12	CH para del grupo β-fenilo en C-16
128.37	CH orto del grupo β-fenilo en C-16
128.92	CH meta del grupo α-benzoilo en C17
129.84	CH meta del grupo β-fenilo en C-16
129.99	CH orto del grupo α-benzoilo en C17
131.18	C ipso del grupo α-benzoilo en C17
133.19	CH para del grupo α-benzoilo en C17
139.53	C ipso del grupo β-fenilo en C-16
161.56	C-5 vinílico
165.47	C=O de ester benzoato en C-17
198.10	C=O en C-3
211.32	C=O en C-17a
EMIE (m/z)	
524	M ⁺
509	M ⁺ -15 (CH ₃)
506	M ⁺ -18 (H ₂ O)
496	M ⁺ -28 (CO)
478	496-18 (H ₂ O)
419	496-77 (C ₆ H ₅)
402	M ⁺ -122 (BzCOOH)
384	402-18 (H ₂ O)
105 (100% Ab. Rel.) (pb)	ión benzoilo (C ₇ H ₅ O ⁺)
91	ión tropilio (C ₇ H ₇ ⁺)
77	105-28 (CO)

6.1.9A. Síntesis de 17 α -Benzoiloxi-6-bromo-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (Xa). En un matraz bola se colocaron 1g (1.9×10^{-3} mol) de IX y 9.11 mL de una mezcla de ácido bromhídrico (3.5 mL, 3.08×10^{-2} mol) en anhídrido acético (5.6 mL), previamente preparada. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente y en condiciones anhidras durante 18 h. Una vez que IX fue transformado, la mezcla de reacción se vertió en un vaso de precipitados que contenía 50 mL de H₂O destilada y suficiente hielo. De esta manera precipitó un sólido amorfo color rosa pálido, el cual se filtró y lavó con H₂O destilada hasta pH neutro. Finalmente el producto se secó al vacío durante toda la noche y recristalizó de AcOEt/n-hexano, dando 0.89 g (82 %) de Xa impuro como cristales amorfos blancos. Dichos cristales fueron re-purificados por CC (silica gel 60; n-hexano:AcOEt 85:15) obteniéndose 0.65 g (58%) de Xa puros en forma de cristales blancos simétricos con p.f.: 240-242°C (no existe p.f. reportado por ser un producto nuevo).

Tabla 10. Propiedades físicas y espectroscópicas de 17 α -Benzoiloxi-6-bromo-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (Xa).

Propiedad	Valor
Punto de fusión (°C)	240-242
Fórmula molecular	C ₃₄ H ₃₅ O ₄ Br
Peso molecular (uma)	586
Valor espectroscópico	Asignación
UV (nm)	
231.03	Ester BzCOO- α en C-17
282.92	CO $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ insaturada en C-3
IR (cm⁻¹)	
3030 (W)	C=C-H (st)
2926 (M)	C-H (st) de CH ₃ y CH ₂
1707 (S)	CO de cetona en C-17a
1662(M)	CO $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ insaturada en C-3
1599(W)	C=C aromático en C-16 y C-17 y C=C dieno conjugado en C-5 y C-6
1451 (M)	-CH ₂ (δ)
1375 (W)	-CH ₃ (δ)
1283 (S)	C-O (st as) de ester en C-17
1111 (M)	C-O (st si) de ester en C-17
878, 767, 712 (W)	C=C-H (oop) arom (patrón de monosustitución)

	de los grupos β -fenilo en C-16 y α -benzoílo en C-17
RMN ^1H (ppm)	
1.180(s, 3H)	-CH ₃ en C-18
1.250(s, 3H)	-CH ₃ en C-19
1.266 (s, 3H)	-CH ₃ β en C-17
3.995 (dd, 1H; $J_1=J_2= 4$ Hz)	-CH bencílico en C-16
6.315 (s, 1 H)	-C=CH en C-4
6.800 (d, 1H; $J= 2$ Hz)	BrC=CH en C-7
7.145 (m, 2H)	H's orto del grupo β -fenilo en C-16
7.305 (m, 3H)	H's meta y para del grupo β -fenilo en C-16
7.448 (m, 2H)	H's meta del grupo α -benzoílo en C-17
7.594 (m, 1H)	H para del grupo α -benzoílo en C-17
8.01 (m, 2H)	H's orto del grupo α -benzoílo en C-17
RMN ^{13}C (ppm)	
16.325	C-18 (-CH ₃)
17.779	C-19 (-CH ₃)
19.255	C-11(-CH ₂ -)
22.900	CH ₃ β en C-17
25.830	C-15 (-CH ₂ -)
33.004	C-2 (-CH ₂ -)
33.688	C-1 (-CH ₂ -)
33.891	C-12 (-CH ₂ -)
38.446	C-8 (-CH-)
38.852	C-10 (C cuaternario)
44.284	C-9 (-CH-)
48.539	C-13 (C cuaternario)
48.582	C-16 (-CH- base del grupo β -fenilo)
48.967	C-14 (-CH-)
83.896	C-17 base de -OCOPh y -CH ₃
122.50	C-5 (C-cuaternario)
126.63	C-4 vinílico
127.304	CH para del grupo β -fenilo en C-16
128.277	CH meta del grupo β -fenilo en C-16
128.427	CH meta del grupo α -benzoílo en C17
128.833	CH orto del grupo β -fenilo en C-16
129.838	CH orto del grupo α -benzoílo en C17
133.345	CH para del grupo α -benzoílo en C17
139.36	C ipso del grupo β -fenilo en C-16
140.92	BrC=CH en C-7
159.00	C-6 (base del bromo)
165.67	C=O de ester benzoato en C-17
199.17	C=O en C-3

211.09	C=O en C-17a
EMIE (m/z)	
588	M+2
586	M ⁺
560	M+2 - 28 (CO)
558	M ⁺ - 28 (CO)
507	M ⁺ - 79 (Br) ó M+2 - 81 (⁸¹ Br)
466	M+2 - 122 (BzCOOH)
464	M ⁺ -122 (BzCOOH)
455	560 - 105 (BzCO)
453	558 - 105 (BzCO)
438	455 - 17 (OH)
436	453 - 17 (OH)
385	466 - 81 (⁸¹ Br), 464 - 79 (Br) ó 507 - 122 (BzCOOH)
384	466 - 82 (H ⁸¹ Br) ó 464 - 80 (HBr)
357	438 - 81 (⁸¹ Br) , 436 - 79 (Br) ó 385 - 28 (CO)
356	438 - 82 (H ⁸¹ Br) , 436 - 80 (HBr) ó 384 - 28 (CO)
308	385 - 77 (C ₆ H ₅)
307	384 - 77 (C ₆ H ₅)
105 (100% Ab. Rel.) (pb)	ión benzoilo (C ₇ H ₅ O ⁺)
91	ión tropilio (C ₇ H ₇ ⁺)
77	105-28 (CO)
51	77-26 (CH≡CH)

6.1.9B. Síntesis de 17 α -Benzoiloxi-6-cloro-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (Xb). En un matraz bola se colocó 1g (1.9×10^{-3} mol) de IX y 135 mL de una mezcla de ácido clorhídrico (29.7 mL, 0.594 mol) en anhídrido acético (105 mL), previamente preparada. La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente y en condiciones anhidras durante 18 h. Una vez que IX fue transformado, la mezcla de reacción se vertió en un vaso de precipitados que contenía 50 mL de H₂O destilada y suficiente hielo. De esta manera precipitó un sólido amorfo color beige pálido, el cual se filtró y lavó con H₂O destilada hasta pH neutro. Finalmente el producto se secó al vacío durante toda la noche y recristalizó de AcOEt/n-hexano, dando 0.95 g (98 %) de Xb impuro como cristales amorfos blancos. Dichos cristales fueron re-purificados por CC, obteniéndose 0.65 g (67%) de Xb puros como cristales blancos en forma de

agujas finas con p.f.: 257-258°C (no existe p.f. reportado por ser un producto nuevo).

Tabla 11. Propiedades físicas y espectroscópicas de 17 α -Benzoiloxi-6-cloro-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (Xb).

Propiedad	Valor
Punto de fusión (°C)	267-269
Fórmula molecular	C ₃₄ H ₃₅ O ₄ Cl
Peso molecular (uma)	542
Valor espectroscópico	Asignación
UV (nm)	
230.95	Ester BzCOO- α en C-17
280.96	<u>CO</u> $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ insaturada en C-3
IR (cm⁻¹)	
3026 (W)	-CH sp ₂
2942 (M)	-CH sp ₃
1704 (S)	<u>CO</u> de cetona en C-17a y Bz- <u>CO</u> -O- α en C-17
1657(M)	<u>CO</u> $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ insaturada en C-3
1597(W)	<u>C=C</u> aro en C-16 y C-17 y <u>C=C</u> dieno conjugado en C-5 y C-6
1450 (M)	Lo mismo
1281 (S)	<u>C-O</u> (st as) de ester en C-17 β
1112 (M)	<u>C-O</u> (st si)de ester en C-17 β
880, 770, 713(W)	Patrón de monosustitución de los grupos β -fenilo en C-16 y α -benzoiloxi en C-17
RMN ¹H (ppm)	
1.180(s, 3H)	-CH ₃ en C-18
1.268(s, 3H)	-CH ₃ en C-19 y -CH ₃ β en C-17
2.254 (m, 1H)	-CH ₂ - en C-15
3.995 (dd, 1H; J ₁ =J ₂ = 4 Hz)	-CH bencílico en C-16
6.327 (s, 1 H)	-C=CH en C-4
6.55 (d, 1H; J= 2 Hz)	ClC=CH en C-7
7.152 (m, 2H)	H's orto del grupo β -fenilo en C-16
7.304 (m, 3H)	H's meta y para del grupo β -fenilo en C-16
7.447 (m, 2H)	H's meta del grupo α -benzoilo en C-17
7.592 (m, 1H)	H para del grupo α -benzoilo en C-17
8.01 (m, 2H)	H's orto del grupo α -benzoilo en C-17
RMN ¹³C (ppm)	
16.356	C-18 (-CH ₃)
17.817	C-19 (-CH ₃)
19.256	C-11(-CH ₂ -)
22.902	<u>CH</u> ₃ β en C-17

25.846	C-15 (-CH ₂ -)
33.041	C-2 (-CH ₂ -)
33.634	C-1 (-CH ₂ -)
33.788	C-12 (-CH ₂ -)
37.391	C-8 (-CH-)
37.951	C-10 (C cuaternario)
44.421	C-9 (-CH-)
48.540	C-13 (C cuaternario)
48.595	C-16 (-CH- base del grupo β-fenilo)
49.111	C-14 (-CH-)
83.920	C-17 base de -OCOBz y -CH ₃
123.793	C-4 vinílico (-CH-)
127.286	CH para del grupo β-fenilo en C-16
128.253	CH meta del grupo β-fenilo en C-16
128.417	CH meta del grupo α-benzoilo en C17
128.824	CH orto del grupo β-fenilo en C-16
129.834	CH orto del grupo α-benzoilo en C17
131.164	C ipso del grupo α-benzoilo en C17
133.316	CH para del grupo α-benzoilo en C17
136.620	C=C-CH en C-7
139.369	C ipso del grupo β-fenilo en C-16
158.273	C-6 (base del cloro)
165.665	C=O de ester benzoato en C-17
198.991	C=O en C-3
211.063	C=O en C-17a

6.2 PARTE BIOLÓGICA

6.2.1 ENSAYO *in vivo* : PRUEBA DE LAS VESÍCULAS SEMINALES.⁹¹

El efecto antiandrogénico de los esteroides sobre las vesículas seminales de hamsters machos (150-200 g) castrados, de la cepa Syrian Golden, fué determinado en 8 grupos de cuatro animales por experimento. Los animales fueron seleccionados al azar y gonadectomizados quince días antes del experimento, manteniéndolos a una temperatura controlada de 22°C y en periodos de luz-oscuridad de 12 h. A cada animal de los diferentes grupos, se le administró subcutáneamente (s.c.) 200 µg de testosterona (T) y cada uno de los esteroides evaluados (200 µg) disueltos en 0.5 mL de aceite de castor (vehículo), por periodos de 24 h durante 3 días. Se utilizaron como controles a un grupo que se le administró finasterida (F) mas testosterona, y otro al que se le administró únicamente testosterona disuelta en el vehículo. Después del tratamiento, los hámsters fueron sacrificados mediante la anestesia con éter y posteriormente se realizó la disección de las vesículas seminales para ser pesadas.

Tabla 12. Efecto de los compuestos en el peso de las vesículas seminales (v.s.)

GRUPO	TRATAMIENTO	PESO V.S. (mg)
1	T+vehículo	282.4 ± 0.108
2	T+Finasterida	226.2 ± 0.03
3	T+3β,17α-Dihidroxi-16β-fenil-17β-metil-D-homo-5-pregnen-17a-ona (VI)	173.4 ± 0.026
4	T + 16β-fenil-17α-hidroxi-17β-metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VII)	127.6 ± 0.014
5	T + 17α-Benzoiloxi-16β-fenil-17β-metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VIII)	214.82 ± 0.12
6	T + 17α-Benzoiloxi-6α,7α-epoxi-16β-fenil-17β-metil-D-homo-4-pregnen-3,17a-diona (IX)	246.64 ± 0.23
7	T + 17α-Benzoiloxi-6-bromo-16β-fenil-17β-metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (Xa)	224.7 ± 0.44
8	T + 17α-Benzoiloxi-6-cloro-16β-fenil-17β-metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (Xb)	237.25 ± 0.32

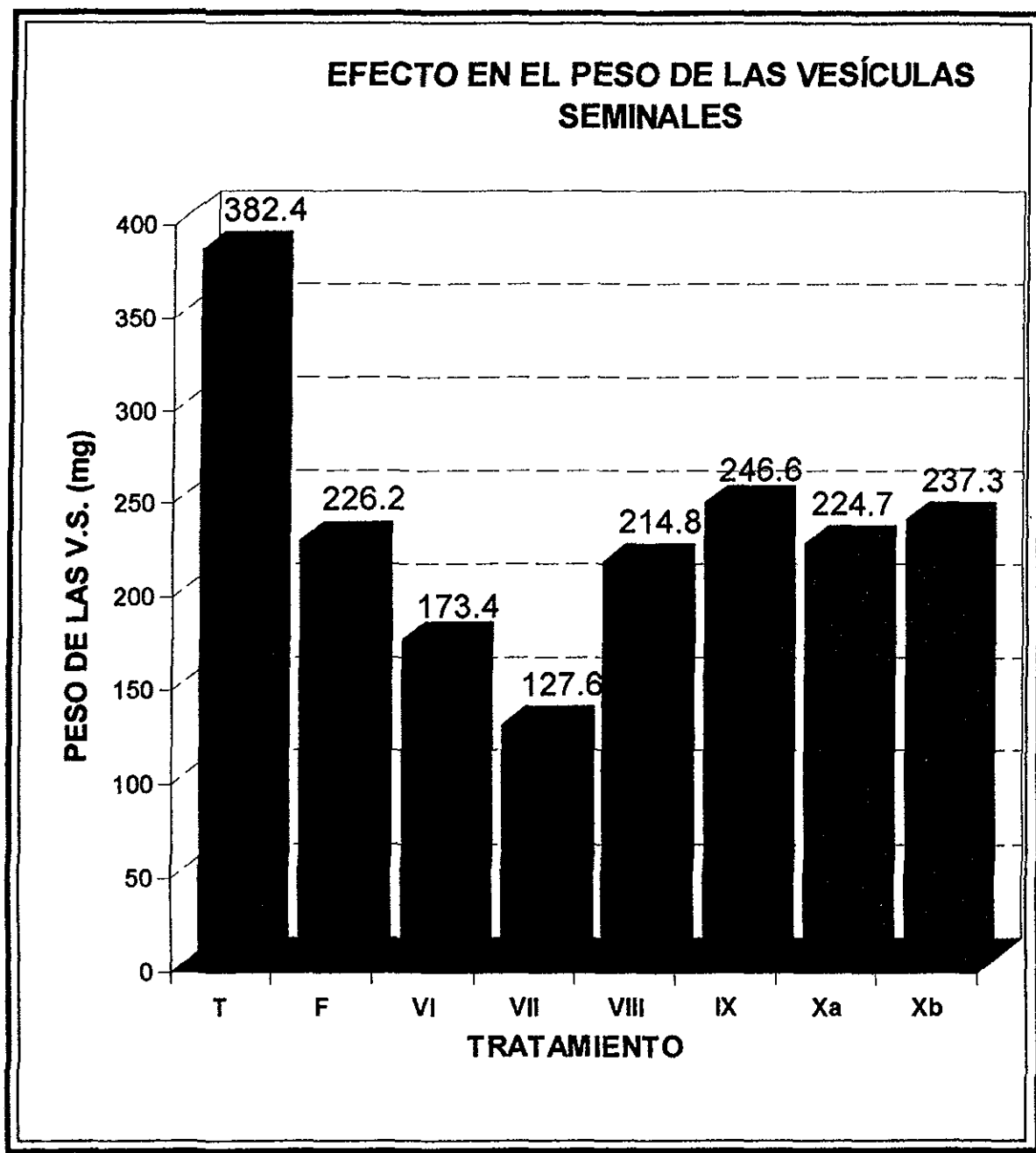


Figura 6.2.1. Efecto antiandrogénico de los intermediarios y productos finales sobre el peso de las vesículas seminales (T: testosterona, F: finasterida)(Ver estructuras en la página 28).

6.2.2 Ensayo *in vitro*: Efecto en la transformación microbiana de [³H]Testosterona a [³H]DHT en *Penicillium crustosum*.⁹³

En un matraz Erlenmeyer se colocaron 16 mL de medio papa-dextrosa pH 6, [³H]Testosterona 47μM (~1.82 μCi), NADPH 1 mM y 125 μg del compuesto a evaluar ó Finasterida, en condiciones de esterilidad. En cada matraz se inocularon 3 asadas de un cultivo de *Penicillium crustosum*, y se incubaron a 25°C durante 10 días con agitación constante. Posteriormente, el micelio se filtró de los cultivos y se secó para determinar su peso. El filtrado se extrajo con una mezcla diclorometano:acetato de etilo 1:1 (3 x 10 mL) y se secó al vacío en un rotavapor. De una alícuota (1:100) del extracto, se purificó la [³H]DHT utilizando CCD preparativa (sistema de elución CHCl₃:acetona, 9:1; testosterona y DHT como estándares; reveladores: ácido fosfomolibdico, luz U.V-240 nm- y autoradiografía). La [³H]DHT se extrajo de la sílica con metanol, se evaporó a sequedad y se determinó la radioactividad, utilizando un espectrómetro de centelleo líquido (Beckman LS 6000TA). La eficiencia del conteo de [³H] fué del 67.09 % y los datos fueron analizados con el programa EPISTAT.

Tabla 13. Efecto en la conversión de [³H]T a [³H]DHT en cultivos de *Penicillium crustosum*.

TRATAMIENTO DE LOS CULTIVOS	fmol[³ H]DHT/mg de micelio
T	2.6 ± 0.70
T+F	2.20 ± 0.31
T+16α, 17α-Epoxi-3β-hidroxi-5-pregnen-20-ona (II)	2.06 ± 0.280
T+3β-Acetoxi-16α, 17α-epoxi-5-pregnen-20-ona (III)	2.10 ± 0.301
T+17α-Benzoiloxi-16β-fenil-17β-metil-D-homo-4,6-pregnadien-3, 17a-diona (VIII)	1.32 ± 0.10
T+17α-Benzoiloxi-6α, 7α-epoxi-16β-fenil-17β-metil-D-homo-4-pregnen-3, 17a-diona (IX)	1.38 ± 0.004
T+17α-Benzoiloxi-6-bromo-16β-fenil-17β-metil-D-homo-4,6-pregnadien-3, 17a-diona (Xa)	1.77 ± 0.076
T+17α-Benzoiloxi-6-cloro-16β-fenil-17β-metil-D-homo-4,6-pregnadien-3, 17a-diona (Xb)	1.01 ± 0.124

Nota: los intermediarios restantes no se probaron por cuestiones técnicas.

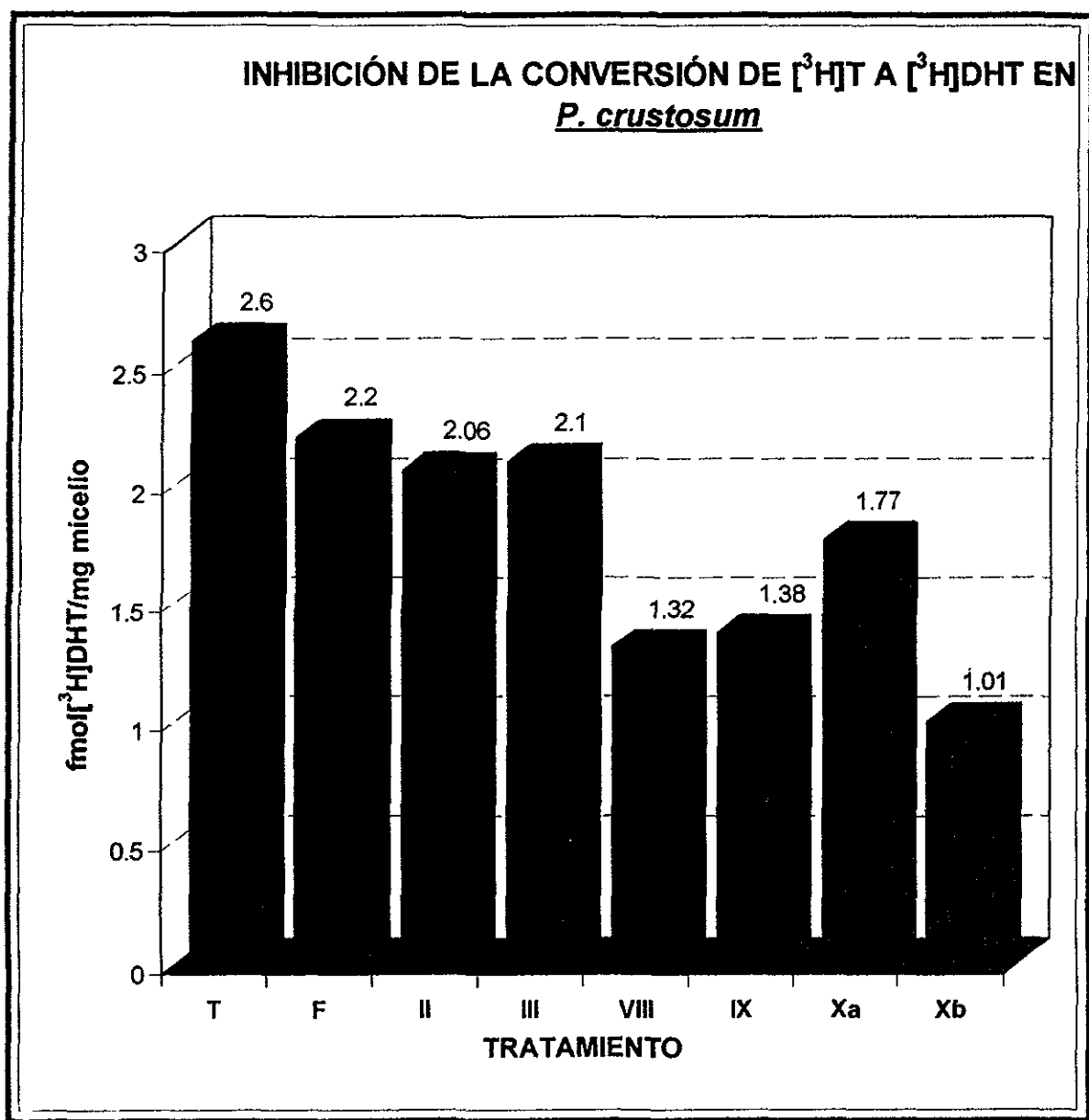


Figura 6.2.2. Efecto inhibitorio de los compuestos sintetizados sobre la conversión de [³H]T a [³H]DHT en cultivos de *Penicillium crustosum* (T: testosterona, F: finasterida) (Ver estructuras en la página 28)..

7.- ANÁLISIS DE RESULTADOS

7.1. PARTE QUÍMICA

La ruta de síntesis que se planteó en este trabajo (Fig. 5.1, página 28), utiliza como materia prima **3 β -Acetoxi-5,16-pregnadien-20-ona (I)** (Acetato de 16-dehidropregnenolona (**16-DPA**) ó neosterol) dado que es un compuesto disponible comercialmente, con un costo accesible y es considerado como el punto de partida en diversos fármacos esteroidales, debido a que presenta las estructuras químicas necesarias para ser transformado a compuestos de interés.^{84,94} Como paso previo a la síntesis, se caracterizó a la materia prima por sus propiedades físicas y espectroscópicas (Tabla 1), correlacionando con las reportadas en la literatura.⁸⁴ En espectrofotometría de ultravioleta (Fig. 9.1-página 83) presentó una λ máxima de absorción a 238 nm correspondiente a la cetona α,β insaturada en C-16-en-20-ona. En IR (Fig. 9.2) se presentaron las bandas de alargamiento C-H de metilos y metilenos alrededor de 2945 cm^{-1} y las correspondientes a carbonilos en 1729 cm^{-1} y 1661 cm^{-1} , indicativos del grupo acetoxi en C-3 y la cetona α,β insaturada en C-20 respectivamente. En cuanto a la RMN¹H (Fig. 9.3), se observaron cuatro señales simples en 0.92, 1.05, 2.03 y 2.26 ppm, integrando para tres protones cada una, que fueron asignadas a los metilos C-18, C-19, C-21 y el metilo del grupo acetoxi respectivamente. Cabe notar que el metilo C-18 se encuentra a campos ligeramente mas altos (desplazamientos mas bajos) debido a su posición dentro del cono de protección que genera el carbonilo en C-20, mientras que C-21 y el metilo del grupo acetoxi, se encuentran en la zona de desprotección de sus carbonilos correspondientes, desplazándolos a campos menores (desplazamientos mayores). También se observó una señal múltiple que integra para un protón en 4.5 ppm, correspondiente al protón base del acetoxi en C-3. La señal doble de doble que integra para un protón en 5.4 ppm corresponde al protón en C-6, la cual se encuentra acoplada a dos protones vecinos en C-7 ($J= 4$ Hz) y también muestra un acoplamiento alílico con los protones en C-4 ($J= 2$ Hz). Por último, la señal triple que integra para un protón en 6.7 se asignó al protón vinílico en C-16 que se encuentra acoplado a dos protones vecinos en C-15 ($J= 3$ Hz).

Uno de los objetivos de la secuencia sintética planteada consistió en introducir un grupo β -fenilo en C-16 y un grupo α -hidroxilo en C-17 (para esterificarlo posteriormente) con el fin de aumentar el volumen estérico en esta parte del esteroide. Para tal propósito se aprovechó el hecho de que **16-DPA** presenta una entidad 16-en-20-ona, la cual al epoxidarse permitiera posteriormente, la introducción del grupo fenilo en C-16 con la orientación deseada. Así, el primer paso de la síntesis implicó la formación de **16 α ,17 α -Epoxi-3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona (II)** con peróxido de hidrógeno en medio básico, produciéndose la adición nucleofílica (tipo Michael) del anión hidroperóxido sobre la doble ligadura de la cetona α,β insaturada. El compuesto deseado se obtuvo con un rendimiento del 98% y se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas (**Tabla 2**), correlacionando con las reportadas.^{85,86}

En espectroscopía de UV no presentó absorción debido a la desaparición del sistema 16-en-20-ona. El espectro de IR (**Fig. 9.4**-página 84) para este compuesto presentó, a diferencia del de **16-DPA**, una banda intensa en 1692 cm^{-1} asignada a la cetona no conjugada en C-20 y una banda de intensidad media en 857 cm^{-1} correspondiente al alargamiento C-O-C del epóxido en C16-C-17. Se observó la desaparición de la banda intensa del éster acetoxi en C-3, y en lugar a ello, la aparición de las bandas intensas en 3370 cm^{-1} y 1056 cm^{-1} para el alcohol en C-3 (alargamiento de O-H y C-O, respectivamente), el cual se formó por la hidrólisis básica del grupo acetoxi en C-3.

En el espectro de RMN¹H (**Fig. 9.5**) se observa, a diferencia del de **16-DPA**, la desaparición de la señal triple en 6.7 ppm del protón vinílico en C-16 y la aparición de una señal simple en 3.2 ppm que integra para un protón base del epóxido en ese mismo carbono. La señal múltiple en 3.52 ppm que integra para un protón se asignó al protón base del alcohol en C-3; Las señales simples de los protones de metilos en C-18, C-19 y C-21 (1.02, 1.05 y 2.03 ppm, respectivamente) permanecen, mientras que desaparece la señal del metilo del grupo acetoxi en C-3, y en lugar a ello aparece una señal simple en 3.68 ppm (después del intercambio con D₂O) del grupo hidroxilo en C-3.

En vista de que la introducción del grupo fenilo en C-16 implicaba la apertura del epóxido en C16-C17 a través de un reactivo de Grignard, fue necesario acetilar nuevamente al alcohol en C-3 para evitar la descomposición del reactivo organometálico.⁹⁵ Para llevar a cabo dicha acetilación, se utilizó el método convencional que emplea anhídrido acético-piridina dando lugar al electrófilo acetilpiridinio que es la especie acetilante.⁹⁶ De esta manera se obtuvo **3 β -Acetoxi-16 α ,17 α -epoxi-5-pregnen-20-ona (III)**, con un rendimiento del 96% y se identificó por sus constantes físicas y espectroscópicas (**Tabla 3**) comparándolas con los reportados.⁸⁷

En el espectro de IR (**Fig. 9.6**), a diferencia de II, no se observó la banda intensa en 3370 cm⁻¹ del alcohol en C-3, sino que aparecieron tres bandas intensas en 1735, 1245 y 1032 cm⁻¹ correspondientes al alargamiento C=O, C-O simétrico y C-O asimétrico respectivamente características de éster, confirmando con ello la presencia del grupo acetoxi en C-3. En RMN¹H (**Fig. 9.7**), a diferencia de II, se observa una señal simple que integra para 6 protones en 1.96 ppm, asignada a los metilos del grupo acetoxi y a la metil cetona en C-21. La señal múltiple que se observa en el espectro de RMN¹H de II en 3.52 ppm (correspondiente al protón base del alcohol en C-3), se desplazó a campos mas bajos (4.58 ppm) para este derivado, debido a la presencia del grupo acetoxi en C-3.

El siguiente paso consistió en la protección del carbonilo en C-20 por la formación de su cetal, debido a que es un centro susceptible de ataque del reactivo de Grignard utilizado en la síntesis. Esta protección se llevó a cabo empleando etilenglicol, ortoformiato de trimetilo y ácido p-toluensulfónico como catalizador,^{74,84} produciendo el derivado etiléndioxi **3 β -Acetoxi-16 α ,17 α -epoxi-20-etilendioxi-5-pregneno (IV)** con un rendimiento del 74% y se identificó por sus propiedades físicas y espectroscópicas (**Tabla 4**) comparándolas con las reportadas.^{88,89}

En espectrofotometría de IR (**Fig. 9.8**) no se observó la banda en 1697 cm⁻¹ correspondiente al carbonilo en C-20 presente en III y se aprecia solamente la banda en 1719 cm⁻¹ correspondiente al carbonilo del grupo acetoxi en C-3. En espectroscopía de

RMN¹H (Fig. 9.9), a diferencia del de III, se observa que la señal de los protones de la metil cetona en C-21, se ha desplazado a campo mas alto (1.44 ppm), mientras que la señal de los protones del metilo en C-18 se desplazó a campo ligeramente mas bajo. Lo anterior se debe a la ausencia de los conos de protección y de desprotección que generaba el carbonilo en C-20. La señal múltiple en 3.95 ppm que integra para cuatro protones confirma la formación del dioxolano en C-20. En las demás señales no se observan cambios sustanciales.


Con la finalidad de introducir un grupo β -fenilo en C-16, así como la generación simultánea del hidroxilo α en C-17, el siguiente paso involucró la apertura del epóxido de IV a través de un mecanismo de sustitución nucleofílica utilizando bromuro de fenil magnesio (un reactivo de Grignard) en THF y complejo de bromuro de dimetil sulfuro de cobre ((CH₃)₂S·CuBr) como catalizador. Debido a que los reactivos de Grignard se descomponen con el oxígeno vía radicales libres para formar peróxidos y alcoholes, fue necesario llevar a cabo la reacción bajo atmósfera de Nitrógeno.⁹⁷ Una vez terminada la reacción, se neutralizó con NH₄Cl para regenerar los grupos oxhidrilo en C-3 y C-17, obteniéndose así, **3 β ,17 α -Dihidroxi-20-etilendioxi-16 β -fenil-5-pregneno V** con un rendimiento del 65%, el cual se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas (Tabla 5) correlacionándolas con las reportadas.^{74,76,90}

El espectro de IR (Fig. 9.10) presenta una banda ancha en 3420 cm⁻¹ correspondiente al alargamiento O-H del oxhidrilo en C-3, producto de la hidrólisis del grupo acetoxi por el reactivo de Grignard. También se observa otra banda aguda en 3571 cm⁻¹ correspondiente al alargamiento O-H del alcohol en C-17, generado por la introducción del grupo fenilo sobre el epóxido, además se aprecia la banda en 1048 cm⁻¹ característica del alargamiento C-O. Se observan las bandas de intensidad débil en 1599 y 1493 cm⁻¹ indicativo del alargamiento C=C para el grupo β -fenilo en C-16. Las bandas en 900, 766 y 698 cm⁻¹ indican el patrón de monosustitución para el núcleo aromático, confirmando con lo anterior su presencia.

En RMN¹H (Fig. 9.11) se corrobora la presencia del grupo fenilo por la presencia de la señal múltiple en 7.26 ppm que integra para 5 protones en la zona de los aromáticos. Para este derivado la señal del grupo etiléndioxi en C-20 se vió alterada, apareciendo como dos señales múltiples en 3.3 y 3.52 ppm que integran para 2 protones cada una, indicando de esta forma, que los protones del dioxolano no son equivalentes. Lo anterior se puede explicar por el cono de protección que posiblemente genera el grupo β -fenilo en C-16 sobre el grupo etiléndioxi haciendo que la señal se desplace a campo mas alto. Se observa una señal múltiple que aparece en 3.1 ppm que integra para un protón, asignada al protón del metino en C-16, cuya multiplicidad se debe en parte al acoplamiento bencílico con los protones del grupo β -fenilo insertado en ese mismo carbono.

En RMN¹³C normal (Fig. 9.12), las señales en 14.5, 19.4 y 21.2 ppm que aparecieron en el espectro DEPT (Fig. 9.13) como metilos, fueron asignadas a los carbonos C-18, C-19 y C-21 respectivamente. Las señales en 61.41 y 64.45 ppm que aparecieron como metilenos, se asignaron a los carbonos del grupo etiléndioxi con el que se protegió el carbonilo en C-20. Se observaron dos señales desplazadas a campo bajo en 71.72 y 71.73 ppm, características de carbonos base de alcohol, las cuales se diferenciaron en el espectro DEPT, siendo la primera señal para C-17 (carbono cuaternario) y la segunda para C-3 (carbono metínico). Se puede apreciar una señal en 90.06 ppm, que no aparece en el espectro DEPT y se asignó al carbono en C-20 que soporta al grupo etiléndioxi. En la zona de carbonos vinílicos se aprecia una señal en 121.58 ppm (metino) correspondiente a C-6. En la zona de los carbonos aromáticos resalta un conjunto de señales de carbonos metínicos, entre 125 y 128.7 ppm asignadas a los carbonos del grupo fenilo en C-16 y otra en 140.67 ppm correspondiente a su carbono ipso. Por último la señal en 143.55 ppm correspondiente a un carbono cuaternario se atribuyó a C-5.

En EMIE (Fig. 9.14) presentó un ión molecular de 452 m/z que coincide con el peso molecular de este derivado. Se observan pérdidas lógicas en el espectro, tales como el pico de relación m/z de 424 originado por la pérdida de 28 unidades,

correspondientes probablemente a C_2H_4 , debido a la ruptura del anillo dioxolano en C-20; la siguiente pérdida de 15 unidades (CH_3) genera el pico en 409 y las dos pérdidas subsecuentes de 17 unidades (OH) generan el pico en 390 m/z. El pico base del espectro en 87 unidades de m/z corresponde al fragmento: $C_4H_7O_2^+$: .

El siguiente paso consistió en regenerar el carbonilo que se protegió en C-20 utilizando una hidrólisis ácida. Sin embargo, como se mencionó al principio de este trabajo, en nuestro laboratorio se ha observado que cuando un derivado del pregnano presentando un grupo fenilo en C-16 beta orientado, un oxhidrilo en C-17 alfa orientado y un anillo dioxolano en C-20, se somete a condiciones ácidas, el anillo D se expande a un anillo de seis miembros.

Dicha transformación se lleva a cabo en acetona agregando lentamente $HClO_4$, con lo cual se promueve la transacetilación de V a la acetona, quedando regenerado el carbonilo en C-20. Dada las condiciones ácidas del medio, se ha reportado que inmediatamente que se regenera el carbonilo en C-20 ocurre una expansión del anillo D del esteroide, formándose el D-homo derivado: **3 β ,17 α -Dihidroxi-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-5-pregnen-17a-ona (VI)**. Esta expansión se explica por la protonación del carbonilo en C-20 para formar un ión carbonio (Fig. 7.1.1), que después de una transposición de tipo Wagner Meerwein del enlace 16-17 genera el anillo D-homo.⁸³

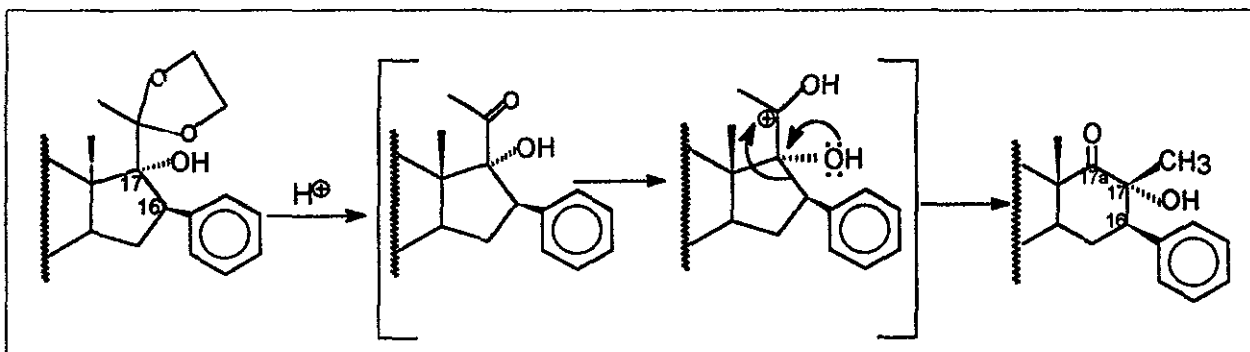


Figura 7.1.1. Generación del anillo D-homo en medio ácido, debido a una transposición de tipo Wagner Meerwein del enlace 16-17 (tomado de Soriano, Bratoeff, et.al.⁸³).

Cabe mencionar que aunque este derivado ya ha sido sintetizado anteriormente, no se tenía la certeza de las asignaciones espectroscópicas para la estructura

planteada, además tampoco ha sido probado en sistemas *in vitro* ó *in vivo* sobre la enzima 5 α -reductasa tipo II. Afortunadamente, con la estructura tridimensional (difracción de rayos X) obtenida de un derivado de VI (Bratoeff, et. al.), se pudo apreciar la expansión del anillo D y con ello algunas de las asignaciones espectroscópicas para VI (Tabla 6) difieren de las reportadas con anterioridad.⁹⁰

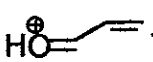
En el espectro de IR (Fig. 9.15-página 90) se presentaron dos bandas de alargamiento O-H en 3482 y 3426 cm⁻¹ indicativas de los oxhidrilos en C-3 y C-17. Se aprecian también dos bandas de alargamiento C-H en 3028 y 2930 cm⁻¹ indicativas de insaturaciones y carbonos saturados, respectivamente. Las bandas en 1602 y 1452 cm⁻¹ manifiestan el alargamiento C=C, y con las localizadas en 900, 768 y 698 cm⁻¹ se confirma la presencia del grupo fenilo. La banda intensa en 1692 cm⁻¹, característica del alargamiento C=O de cetonas, fue asignada al carbonilo regenerado en C-17a de VI.

En el análisis de RMN¹H normal y COSY H-H (Figs. 9.16 y 9.17-páginas 90 y 91) también se corrobora la regeneración del carbonilo, ya que la señal múltiple de los protones del grupo etiléndioxi alrededor de 3.5 ppm ha desaparecido. Se aprecian dos señales simples en 1.038 y 1.106 ppm que integran para tres protones cada una, las cuales se asignaron a los protones de los metilos angulares C-18 y C-19 respectivamente. La señal simple en 1.216 ppm que integra también para tres protones fue asignada para el metilo β en C-17, confirmando con ello el cambio de posición del metilo C-21, debido a que la señal de los protones de una metil cetona aparece normalmente alrededor de 2.1 ppm.⁹⁸ Sin embargo, se esperaría que dicha señal apareciera en aproximadamente 1.4 ppm dado que el metilo dista en dos enlaces de un oxhidrilo. La discrepancia a lo anterior se debe a que el metilo en cuestión probablemente se localiza dentro del cono de protección que genera el grupo β fenilo en C-16, desplazando la señal a campo alto. En 2.9 ppm se ubica la señal múltiple que integra para un protón, correspondiente al protón bencílico y que muestra correlación en el espectro COSY con una señal múltiple en 1.99 ppm, indicando con ello, la interacción del protón bencílico en C-16 con los dos protones en C-15; estos a su vez, correlacionan con una señal múltiple en 1.53 ppm, asignada al protón en C-14. En 3.52

ppm se aprecia un multiplete que se asignó al protón base del alcohol en C-3, el cual muestra interacción en el espectro COSY con la señal múltiple ~2.3 ppm asignada a los protones en C-2 y C-4. En la zona de los protones vinílicos se localiza una señal doble de doble en 5.39 ppm asignada al protón vinílico en C-6 y que correlaciona en el espectro COSY con una señal múltiple en 2.23 ppm asignada a los protones en C-7. Cabe notar que esta última señal y la del protón en C-14 (1.53 ppm) correlacionan con una señal múltiple alrededor de 1.6 ppm, asignada al protón en C-8, confirmando con todo lo anterior la estructura de VI. Nuevamente aparece la señal múltiple en 7.3 ppm que integra para 5 protones, asignados a los protones del núcleo aromático en C-16. Por último, la señal en 4.8 ppm corresponde a HDO debido al intercambio de deuterio de los grupos oxhidrilos en C-3 y C-17.

En espectroscopía de RMN¹³C normal y DEPT (Figs. 9.18 y 9.19-página 92) para VI se confirma también la hidrólisis del cetal ya que desaparecieron las señales de los metilenos del grupo etiléndioxi (61.41 y 64.45 ppm) y en su lugar se observa una señal nueva en 218.15 ppm indicativo del carbonilo regenerado en C-17a. Por otro lado cabe mencionar que en las demás señales del esteroide no se observaron grandes cambios, mientras que resaltan las afectadas por la expansión del anillo D. Así, la señal en 23.94 ppm que aparece en el espectro DEPT como metilo, se asignó como tal al que se encuentra en C-17, difiriendo de la señal para una metil cetona que aparece normalmente en 30 ppm; también se aprecia que el carbono C-17 base de un metilo y un grupo oxhidrilo, se desplazó a campo menor (78.16 ppm) debido a su vecindad con el carbonilo en C-17a.

En EMIE (Fig. 9.20-página 93) se nota un ión molecular en 408 unidades de m/z concordante con el peso molecular de VI. Se observa que las fragmentaciones del esteroide son lógicas y se registra el pico base del espectro en 91 unidades de m/z debido a la formación del ión tropilio que es una especie estable. La pérdida de 18 unidades del ión molecular, dada por la deshidratación (-H₂O) de cualquiera de los alcoholes en C-3 o C-17, genera el pico en 390. Se aprecia que el ión molecular también puede perder 28 unidades dada por la descarboxilación (-CO) en C-17a para

formar el pico en 380. La pérdida de 15 unidades ($-\text{CH}_3$) de los picos de 390 y 380 genera los picos en 375 y 365 respectivamente, y la pérdida de otra molécula de agua del pico de 365 o la pérdida de 28 unidades ($-\text{CO}$) del de 375, generan el pico de 347 que es el segundo de mayor abundancia relativa del espectro. Un pico diagnóstico para derivados de ciclohexanol se observó en 57 unidades de m/z , correspondiente al ión oxonio: .^{99,100} Cabe resaltar que el pico característico de metil cetonas en 43 unidades de m/z no se observó, lo cual confirma nuevamente la expansión del anillo D del esteroide.

El siguiente paso consistió en la generación del sistema 4,6-dién-3-ona, el cual se llevó en un solo paso utilizando el método de Shapiro que implica una bromación-dehidrobromación.⁸⁶ Dicho método ya ha sido empleado en la síntesis de antiandrógenos anteriores por el grupo de Bratoeff y cols.^{74,78} La ventaja de utilizar este método radica en la disminución de un paso de la síntesis, ya que de otra manera hubiera sido necesario oxidar primero el sistema 5-en-3-ol a través de una oxidación de Oppenauer para obtener la 4-en-3-ona y posteriormente introducir la doble ligadura en C-6 a través de una deshidrogenación con cloranilo.^{101,102} En dicha reacción se empleó bromo como agente oxidante y carbonato de litio como base para sustraer el protón en C-4, con lo cual se obtuvo el derivado **16 β -fenil-17 α -hidroxi-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VII)** con un rendimiento del 60%, cuya estructura se elucidó por sus propiedades físicas y espectroscópicas (Tabla 7).

En UV (Fig. 9.21) se observó un máximo de absorción a 282.79 nm correspondiente al sistema 4,6-dién-3-ona (285 nm teórico¹⁰⁰), confirmando con ello la oxidación de VI.

En espectroscopía de IR (Fig. 9.22) se aprecia la banda ancha del alargamiento O-H en 3446 cm^{-1} y la de 1126 cm^{-1} del alargamiento C-O, confirmando con ello la presencia de un alcohol terciario en C-17. Las bandas del alargamiento C-H sp_3 y sp_2 se observan en 2944 y 3028 cm^{-1} respectivamente, y con las bandas de deformación de metilenos y metilos en 1452 y 1356 cm^{-1} respectivamente, se confirma su presencia. La

banda en 1616 cm^{-1} manifiesta el alargamiento C=C, la cual es indicativa de insaturaciones conjugadas y un núcleo aromático. Las bandas en 878 , 758 y 701 cm^{-1} correspondientes a la vibración fuera del plano de =C-H, confirman la monosustitución del grupo β -fenilo en C-16. Por otra parte en la zona de los carbonilos, en 1694 cm^{-1} se aprecia una banda de intensidad fuerte correspondiente al carbonilo en C-17a y resalta la aparición de una señal nueva de alargamiento C=O en 1656 cm^{-1} también de intensidad fuerte, la cual se asignó al carbonilo $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ insaturado en C-3.

En RMN¹H (Fig. 9.23-página 94) las señales de los protones de los metilos permanecen constantes, así como la de los protones aromáticos alrededor de 7.3 ppm. Cabe resaltar que en el espectro se aprecia la generación de la entidad 4,6-dien-3-ona ya que la señal múltiple en 3.52 ppm asignada al protón base del oxhidrilo en C-3 desapareció, y en su lugar se observa en la zona de los protones vinílicos, tres señales: una simple que integra para un protón en 5.73 ppm asignada al protón vinílico en C-4 α al carbonilo generado y otras dos doble de doble en 6.20 y 6.33 ppm que forman parte de un sistema AB. La primera señal de dicho sistema que integra para un protón, se asignó al protón vinílico en C-6 y la segunda que también integra para un protón fue asignada al protón en C-7. Este último protón oleofínico y al carbonilo en C-3 se encuentra desprotegido en consecuencia al carácter electropositivo del carbono C-7 inducido por la resonancia que ejerce el carbonilo en el sistema 4-6-dien-3-ona (Fig. 7.1.2). En vista del patrón de acoplamiento observado en el espectro, se deduce que ambas señales muestran acoplamiento vinílico entre sí a través de una J de 10 Hz, indicando con ello la disposición cisoide de los protones sobre la doble ligadura en C6-C7 que forma parte de un anillo de seis miembros.⁹⁸ Por último, también se puede observar que ambas señales se desdoblan, indicando con esto el acoplamiento alílico con el protón en C-8 a través de una constante característica de pequeña magnitud (J= 2 Hz).

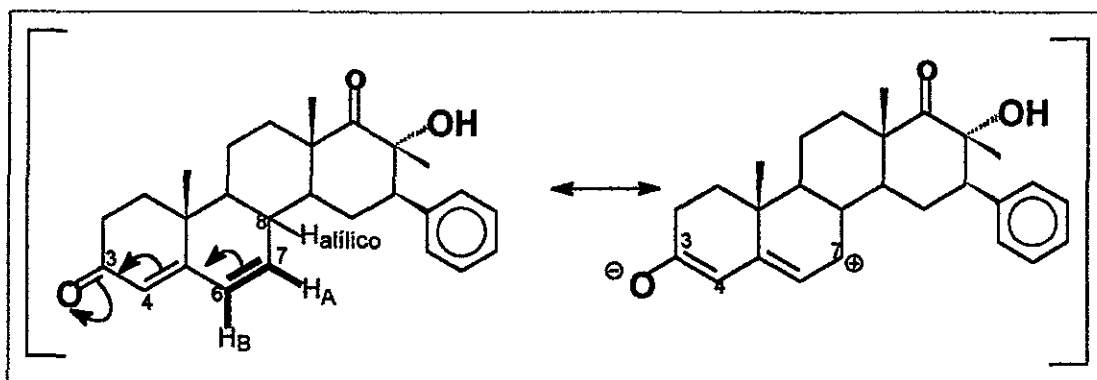


Figura 7.1.2. Estructuras resonantes de VII

En RMN¹³C normal y DEPT (Figs. 9.24 y 9.25) también se puede apreciar la presencia de la entidad 4,6-dien-3-ona, ya que en la zona de los carbonilos además de la señal en 217 ppm asignada al carbonilo en C-17a, se aprecia otra en 199.30 ppm indicativa del grupo carbonilo generado por la oxidación del oxhidrilo en C-3, mientras que desaparece la señal en 71.48 ppm asignada al mismo carbono base de un alcohol para VI. En la zona de los protones vinílicos se puede apreciar el sistema de carbonos diénicos generados, así la señal para C-4 se encuentra en 124.01 ppm, para el C-6 en 129.17 ppm, para el C-7 en 137.71 ppm y para el carbono vinílico cuaternario C-5 en 162.29 ppm. Nuevamente se aprecia el efecto resonante del carbonilo en C-3 a lo largo del sistema conjugado, promoviendo que la señal para C-7 se desplace a campo bajo. En vista de que se tiene una monosustitución en el anillo aromático, los cinco carbonos metínicos del grupo β-fenilo en C-16 aparecen como tres señales de diferente intensidad en el espectro DEPT. De lo anterior se deduce que la señal en 127.06 ppm corresponde al metino en para y la señal en 128.00 ppm indica los metinos en orto, ya que son los carbonos que resienten la protección del sustituyente electrodonador (grupo alquilo), mientras que la señal en 129.08 ppm corresponde a los metinos en meta que no son afectados por el sustituyente. El carbono ipso del grupo β-fenilo aparece a campo bajo (139.30 ppm), nuevamente por el efecto del sustituyente alquilo. Las señales restantes del núcleo esteroidal no manifiestan cambios considerables.

En EMIE (Fig. 9.26) se observó un ión molecular en 404 unidades de masa carga correspondiente al pico base del espectro y al peso molecular de VII. Se puede apreciar la deshidratación del ión molecular en 386 unidades (-H₂O) y la pérdida de 17

unidades (-HO) en 387 unidades m/z. El pico en 376 unidades es generado por la contracción del anillo D a través de una descarboxilación (-CO), y tras una pérdida de 15 unidades (CH₃) se genera el pico en 361. Con la deshidratación de este último fragmento (-H₂O) se forma el pico en 343; Por último, se observa la presencia del ión tropilio (91 unidades m/z), indicativo del grupo β-fenilo.

Como se mencionó al principio de este trabajo, dentro de los objetivos que se plantean con la síntesis propuesta, se encuentra el aumento del volumen estérico sobre los carbonos C-16 y C-17, debido a que se ha demostrado en nuestro laboratorio que la actividad biológica de los antiandrógenos inhibidores de la enzima 5α-reductasa se encuentra relacionada con el tamaño de los sustituyentes sobre estos carbonos.⁷⁶⁻⁷⁷ A pesar de que dichos estudios se refieren a derivados del pregnano donde el anillo D consta de cinco miembros, es de gran interés determinar la influencia del anillo D-homo conservando los sustituyentes voluminosos para la actividad antiandrogénica.

De esta manera, el siguiente paso de la ruta sintética involucró la esterificación del alcohol terciario α en C-17 con ácido benzoico. La formación de un derivado que contenga un ester benzoato es de particular interés, no sólo por proporcionar mayor volumen estérico y biodisponibilidad oral, sino también al hecho de que diversos derivados de la progesterona conteniendo este grupo, presentan actividad antiandrogénica.^{85,103} En dicha reacción se formó primeramente el anhídrido mixto benzoil trifluoroacético con ácido benzoico, anhídrido trifluoroacético y ácido p-toluensulfónico como catalizador, el cual se consideró como la especie acilante del oxhidrilo en C-17,^{104,105} para así obtener un compuesto nuevo: **17α-Benzoiloxi-16β-fenil-17β-metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VIII)** con un rendimiento del 75% cuya estructura se elucidó por sus propiedades físicas y espectroscópicas (Tabla 8).

En el espectro de UV (Fig. 9.27) se aprecia la permanencia del cromóforo 4,6-dien-3-ona en un máximo de absorción a 281.43 nm. Además se aprecia otro máximo de absorción a 231.02 nm, el cual confirma la presencia del éster benzoato introducido

en C-17 α , ya que se considera como un cromóforo carbonílico aromático introducido en C-17 α (230 nm teórico¹⁰⁰).

En IR (Fig. 9.28) se corrobora la acilación del oxhidrilo en C-17 α , debido a la desaparición de la banda del alargamiento O-H en 3446 cm^{-1} , y en su lugar se aprecia una banda nueva en la zona de los carbonilos en 1719 cm^{-1} , correspondiente al carbonilo del éster benzoato y las correspondientes al alargamiento C-O en 1282 cm^{-1} y 1114 cm^{-1} del mismo éster formado. Se aprecian también las bandas características del alargamiento C-H de tipo sp_2 aromático y de alqueno en 3060 y 3028 cm^{-1} ; con las bandas en 1616 y 1581 cm^{-1} de tensión C=C se confirma la presencia del dieno conjugado y los núcleos aromáticos. Las demás bandas de los grupos funcionales presentes en el esteroide permanecen constantes.

En RMN¹H (Fig. 9.29) también se corrobora la formación del éster benzoato al aparecer un grupo de señales muy peculiares en la zona de los protones aromáticos y que se diferencian de las señales del grupo fenilo en C-16, debido a que se tienen dos anillos aromáticos monosustituídos por un grupo de diferente carácter. En vista de que el anillo aromático en C-17 presenta como sustituyente un grupo electro atractor (grupo carbonilo), los protones en las posiciones orto y para están más desprotegidos que los que se encuentran en meta. Así, claramente se deduce que las primeras tres señales múltiples en 8.01, 7.59 y 7.44 ppm que integran para 2, 1 y 2 protones respectivamente, corresponden en el mismo orden a los protones orto, para y meta del éster benzoato, mientras que las señales múltiples para el grupo fenilo en 7.29 y 7.15 ppm que integran para 3 (meta y para) y 2 (orto) protones respectivamente, se conservan como para VII. En la zona de los protones vinílicos, permanecen las señales para los protones en C-7 (6.34 ppm), C-6 (6.18 ppm) y C-4 (5.70 ppm); de la misma manera se conservan las demás señales del esteroide. Sin embargo, resalta el desplazamiento químico que sufrió la señal múltiple en 3.98 ppm asignada al protón bencílico en C-16 (aparece para VII alrededor de 3 ppm), debido probablemente a que se encuentra en la zona de desprotección generada por el grupo benzóilo que se ha introducido en C-17.

En RMN¹³C normal y DEPT (Figs. 9.30 y 9.31) para VIII también confirmamos la esterificación del oxhidrilo en C-17, puesto que en la zona de los carbonilos además de las señales en 211.38 y 199.42 ppm correspondientes a los carbonilos en C-17a y C-3, se observa otra en 165.66 ppm referente al carbonilo del éster benzoato. Sumándose a lo anterior, aparecen cuatro señales nuevas en la zona de los carbonos aromáticos: tres de ellas aparecen como metinos en el espectro DEPT en 133.26, 129.84 y 128.40 ppm asignadas a los carbonos en posiciones para, orto y meta del ester benzoato, mientras que la señal en 129.95 ppm indica su carbono ipso. Otra de las señales afectadas es el carbono C-17, ya que sostiene al grupo benzoíloxi y a un metilo, por lo que es desplazado a campo bajo (84.11 ppm). El sistema de carbonos diénicos se sigue apreciando en la zona de los carbonos vinílicos así como también la de los carbonos del grupo fenilo en C-16. Las demás señales que conforman al núcleo esteroideal permanecen inalteradas.

En EMIE (Fig. 9.32) se observa un ión molecular en 508 unidades de m/z que conforma el peso molecular de VIII. Se aprecia la pérdida de ácido benzoico (-122 unidades) por la formación del pico en 386. La subsecuente pérdida de 15 unidades (-CH₃) ó de 28 unidades (-CO) origina los picos en 371 ó 358 respectivamente. La pérdida de 28 unidades (-CO) del pico de 371 ó la pérdida de 15 unidades (-CH₃) del de 358 origina el pico en 343. La pérdida de 90 unidades (-C₇H₆) del pico de 343 unidades de m/z, genera el pico en 253, que es el segundo pico de mayor abundancia relativa después del pico base del espectro, el cuál corresponde al ión benzoílo. En el espectro también se puede apreciar la descarboxilación del ión benzoílo para formar el pico en 77, así como también la presencia del ión tropilio y su contracción a 51 unidades por la pérdida de acetileno.

En vista que la presencia de un átomo voluminoso y electronegativo (halógeno) en el carbono C-6 confiere mayor actividad a los antiandrógenos inhibidores de la enzima 5 α -reductasa,^{75,78} el siguiente paso implicó la formación de un epóxido alfa orientado sobre los carbonos C6-C7, para que posteriormente fuera abierto con un halógeno. Dicho paso involucró una reacción estereoespecífica de adición electrofílica

utilizando ácido m-cloroperbenzoico,^{74,101} obteniéndose un epoxi derivado nuevo: **17 α -Benzoiloxi-6 α ,7 α -epoxi-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4-pregnen-3,17a-diona (IX)** con un rendimiento del 65% y cuya estructura se elucidó por sus propiedades espectroscópicas (Tabla 9).

En espectroscopía de UV (Fig. 9.33) se aprecia la desaparición del máximo de absorbancia en 282 nm, correspondiente al sistema 4,6-dien-3-ona, mientras que se conserva el cromóforo ester benzoato en 232.52 nm.

En espectroscopía de IR (Fig. 9.34) se puede observar la desaparición de la banda en 1616 cm^{-1} que indicaba la presencia del dieno conjugado. Las tres bandas correspondientes a los carbonilos en C-3, C-17a y del éster permanecen, así como las de vibración de tensión C-O del éster en 1282 y 1116 cm^{-1} . En general, no se observan cambios sustanciales en el espectro.

En RMN¹H (Fig. 9.35) se corrobora la formación del epóxido, ya que en la zona de los protones vinílicos permanece solo una señal simple que integra para un protón en 6.153 ppm, indicativa del protón en C-4, mientras que aparecen dos señales alrededor de 3.524 ppm que integran para un protón cada una y forman un sistema AB. La primera señal de dicho sistema con multiplicidad doble de doble se encuentra en 3.550 ppm y se asignó al protón base del epóxido en C-6, mientras que la señal doble en 3.497 ppm se asignó al protón en C-7. Ambas señales se encuentran acopladas entre sí a través de una J de 4 Hz, característica de un acoplamiento vecinal de dos protones cis base de un anillo oxirano.⁹⁸ Además, la primer señal doble de doble muestra otra J de pequeña magnitud ($J_2 = 2$ Hz), lo cual indica el acoplamiento alílico entre los protones en C-6 y C-4. Por otro lado, se siguen observando las cinco señales correspondientes a los diez protones de los dos grupos aromáticos como para VIII.

En espectroscopía de RMN¹³C normal y DEPT (Figs. 9.36 y 9.37) también se aprecia la formación del epóxido, ya que sólo permanece una señal en la zona de los carbonos vinílicos en 127.12 ppm, correspondiente al carbono C-4, y a la par aparecen

dos señales nuevas en 53.09 y 52.76 ppm , que en el espectro DEPT se observan como metinos y se asignaron a los carbonos base del epóxido C-6 y C-7, respectivamente. La región de los carbonos de metilos y metilenos no presentó cambios sustanciales en los desplazamientos con respecto al compuesto VIII, así como también permanecen las señales del carbono cuaternario vinílico C-5 (161.56 ppm) y los carbonilos en C-3 (198.10 ppm), C-17a (211.32 ppm) y el carbonilo del éster (165.47 ppm).

En EMIE (Fig. 9.38) se observa un ión molecular en 524 unidades de m/z que corresponde al peso molecular de IX. Dicho ión puede perder 15 (-CH₃), 18 (-H₂O), 28 (-CO) ó 122 (-BzCOOH) unidades para formar los picos en 509, 506, 496 ó 402 respectivamente, representando este último un 50% de abundancia relativa. El pico base del espectro nuevamente en 105 corresponde al ión benzoílo, cuya descarboxilación genera el pico en 77 unidades, y por último, también se observa la presencia del ión tropilio en 91 unidades.

El último paso de la secuencia sintética permitió la inserción del átomo de halógeno (bromo ó cloro) en el carbono C-6 y con ello generar los compuestos finales con las características estructurales requeridas. Se utilizó una mezcla del ácido correspondiente (HBr ó HCl) en anhídrido acético, lo que llevó primeramente a la apertura del epóxido para formar la halohidrina correspondiente, que con su posterior deshidratación,^{78,101} formó los derivados halogenados **17 α -Benzoiloxi-6-bromo-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona Xa** y **17 α -Benzoiloxi-6-cloro-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona Xb** los cuales son compuestos nuevos no reportados en la literatura y cuyas estructuras se elucidaron por sus propiedades físicas y espectroscópicas (Tablas 10 y 11).

En el espectro de UV (Fig. 9.39-página 103) de Xa se observa la regeneración del cromóforo 4,6-dien-3-ona, al aparecer un máximo de absorción a 282.92 nm. Se aprecia también la permanencia del máximo de absorción en 231 nm, correspondiente al ester benzoato en C-17 α .

En IR (Fig. 9.40) se aprecian las bandas de vibración C-H de tipo sp_2 y sp_3 en 3030 y 2926 cm^{-1} , así como las de vibración de deformación para metilos (1375 cm^{-1}) y metilenos (1451 cm^{-1}). La banda en 1599 cm^{-1} denota la presencia de vibraciones de alargamiento C=C, presentes en los dos anillos aromáticos y el dieno conjugado. En la zona de los carbonilos, se aprecian dos bandas intensas en 1707 y 1662 cm^{-1} , indicando con la primera los carbonilos en C-17a y el del éster benzoato, mientras que la segunda corresponde al carbonilo conjugado en C-3. Con las bandas de alargamiento C-O en 1283 y 1111 cm^{-1} confirmamos la presencia del éster benzoato en C-17 α .

En RMN¹H (Fig. 9.41) se corrobora la inserción del átomo de bromo en C-6, al distinguirse sólo dos señales en la zona de los protones vinílicos: una dobleteada en 6.80 ppm y otra simple en 6.315 ppm, integrando para un protón cada una y asignadas a los protones en C-7 y C-4 respectivamente. Los desplazamientos de dichas señales se vieron influenciados por la presencia del bromo, siendo el protón en C-7 quién resiente más la desprotección. Además, este último se encuentra acoplado con los protones en C-8 a través de una J de 2.1 Hz. Nuevamente se aprecia el conjunto de cinco señales múltiples en la zona de los protones aromáticos, asignadas de la misma forma que para IX a los diez protones de los grupos β -fenilo en C-16 y α -benzoilo en C-17. También se siguen observando los protones de los metilos angulares C-18 (1.180 ppm), C-19 (1.250 ppm) y los del metilo en C-17 β (1.266 ppm). El protón bencílico permanece como un doble de doble en 3.995 ppm, cuya J de 4 Hz indica el acoplamiento con los protones en C-15 y con los del grupo fenilo.

Con lo referente al análisis bidimensional COSY H-H (Fig. 9.42), se observa la correlación de la señal en 6.8 ppm con una señal múltiple alrededor de 2.42 ppm, indicando con ello la interacción del protón vinílico en C-7 con el protón en C-8. Esta última correlaciona con dos señales múltiples: una alrededor de 2.27 y otra alrededor de 1.53 ppm, asignadas a los protones metínicos en C-9 y C-14 respectivamente. La señal doble de doble para el protón bencílico en C-16 (3.995 ppm) correlaciona con la misma señal múltiple en 2.27 ppm, correspondiente también a los protones del metileno en C-

15 y esta a su vez correlaciona con la señal asignada al protón metínico en C-14, indicando con todo lo anterior, la conectividad entre los anillos A B, C y D, de BROM. Por otro lado, se observa la correlación de las cinco señales de los diez protones aromáticos, donde se aprecia claramente la presencia de dos núcleos aromáticos diferentes, ya que los cinco protones a campo bajo correspondientes al ester benzoato en C-17 α correlacionan únicamente entre sí, mientras que los otros cinco a campo mas alto asignados al grupo β -fenilo en C-16 lo hacen aisladamente entre ellos (Fig. 9.43).

En RMN¹³C normal y DEPT (Figs. 9.44 y 9.45) se aprecia también la inserción del átomo de bromo en C-6, ya que permanecen sólo dos señales en la zona de los carbonos vinílicos en 126.63 y 140.92 ppm (vistas como metinos en el espectro DEPT) asignadas a los carbonos C-4 y C-7 y la consecuente aparición de una señal en 159 ppm, correspondiente al carbono vinílico cuaternario C-6. Los desplazamientos químicos de dichas señales son influenciados por la presencia del átomo de bromo. Otra de las señales influenciadas por la presencia del bromo en C-6, es la señal en 122.50 ppm asignada al carbono cuaternario vinílico C-5, que se ha desplazado a campo alto. Las señales en 211.09, 199.17 y 165.67 ppm, asignadas a los carbonilos en C-3, C-17a y el carbonilo del éster en C-17 α respectivamente, así como la del carbono cuaternario C-17 base del ester y un metilo (83.896 ppm) permanecen constantes en el espectro. De la misma manera, las señales de los metilos angulares C-19 (17.779 ppm), C-18 (16.325 ppm), el metilo β en C-17 (22.9 ppm) y el conjunto de señales para los metinos de los dos núcleos aromáticos (alrededor de 128 ppm), continúan observándose.

Con el espectro HETCOR (Fig. 9.46) para Xa, corroboramos las señales asignadas a los carbonos vinílicos C-7 y C-4, ya que las señales doble de doble en 6.8 y la simple en 6.315 ppm de la resonancia protónica correlacionan con las señales en 140.92 y 126.63 ppm de la resonancia de carbono respectivamente. Se observa también la correlación del protón bencílico (3.995 ppm) con el carbono metínico C-16 (48.58 ppm). Las señales de los protones metílicos en 1.180, 1.250, 1.266 pmm correlacionan con sus respectivos metilos en 16.325 (C-18), 17.779 (C-19) y 22.900

(metilo β en C-17) ppm. Por último, se observa claramente la correlación de los carbonos metínicos aromáticos con sus correspondientes protones, así las señales de los protones orto (8.01 ppm), para (7.594 ppm) y meta (7.448 ppm) del grupo α benzoilo en C-17 correlacionan con los carbonos en 129.838, 133.345 y 128.427 ppm, mientras que los protones meta-para (7.305 ppm) y orto (7.145 ppm) del grupo β -fenilo en C-16 correlacionan con los carbonos en 128.277-127.304 y 128.833 ppm, respectivamente (Fig. 9.47).

En EMIE (Fig. 9.48) se confirma la estructura del compuesto deseado, ya que se obtuvo un ión molecular en 586 unidades m/z correspondientes al peso molecular de **Xa**, además de presentar una contribución isotópica de casi el 100% al $M+2$ en 588 m/z y algunos fragmentos, lo cual corrobora la presencia de un átomo de bromo en la molécula. El pico base del espectro corresponde al ión benzoilo en 105 unidades, generado por la ruptura inductiva alfa al carbonilo del éster. En el diagrama de fragmentación (Fig. 7.1.3) se aprecian pérdidas lógicas, con las que se deduce la estructura de **Xa**. Dentro de los fragmentos diagnóstico, se aprecian las pérdidas de ácido benzoico, bromo y bromuro de hidrógeno. De las descarboxilaciones se puede inferir la presencia de una cetona cíclica y de la presencia del ión tropilio, un núcleo aromático sustituido.

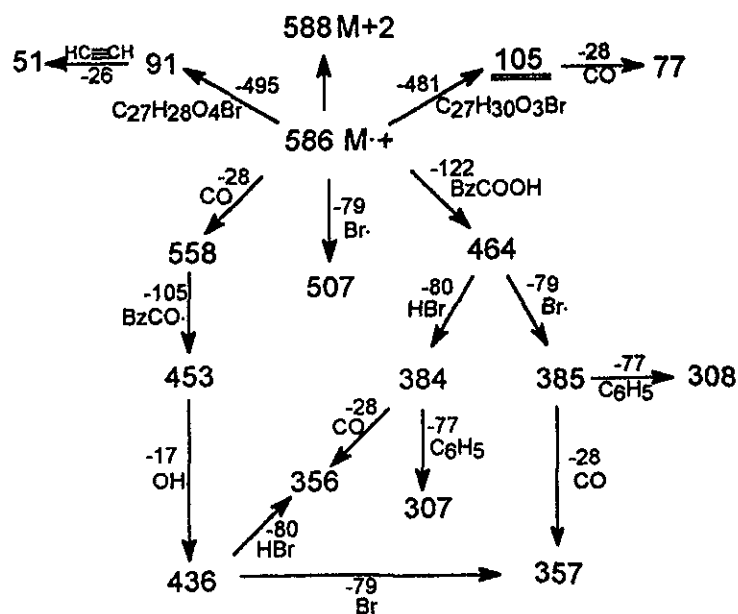


Figura 7.1.3. Diagrama de fragmentación del compuesto **Xa** observado en EMIE.

Con respecto al compuesto **17 α -Benzoiloxi-6-cloro-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (Xb)**, en el espectro de ultravioleta (Fig. 9.49) se aprecia la regeneración del sistema 4,6-dien-3-ona al aparecer un máximo de absorción en 280 nm, conservándose el correspondiente al del éster benzoato en 230 nm. En el espectro de IR (Fig. 9.50), al igual que el de Xa, se aprecian las bandas intensas en 1704 y 1657 cm^{-1} , la primera correspondiente a los carbonilos en C-17a y del éster y la segunda al carbonilo $\alpha, \beta, \gamma, \delta$ insaturado en C-3. Las bandas de vibración de la tensión C-O en 1281 y 1112 cm^{-1} confirman la presencia del éster en C-17 α y la banda en 1597 cm^{-1} denota la presencia de insaturaciones aromáticas y conjugadas.

En el análisis por RMN¹H normal (Fig. 9.51), al igual que en el compuesto Xa, se observa claramente la presencia de sólo dos señales en la zona de los protones vinílicos: una doble de doble en 6.55 ppm y otra simple en 6.327 ppm. Ambas señales integran para un protón y se asignaron a los protones en C-7 y C-4, respectivamente. La constante J de 2.1 Hz para la señal en 6.55 ppm indica el acoplamiento del protón vinílico en C-7 con el protón metínico en C-8. Cabe notar que los desplazamientos para dichas señales se vieron menos influenciadas que las señales homólogas para el compuesto Xa, debido a la diferencia de tamaño y electronegatividad de los halógenos insertados en C-6. Los diez protones de los dos núcleos aromáticos en C-17 α y C-16 β aparecen de la misma forma que para Xa. La señal para el protón bencílico en C-16 se conserva como un doble de doble, cuyas J de 4 Hz indican el acoplamiento con los protones en C-15 y los del grupo fenilo. La señal simple que integra para seis protones en 1.268 ppm corresponde a los protones de los metilos C-19 y el metilo β en C-17, mientras que la señal simple que integra para tres en 1.180 ppm indica los protones metílicos de C-18.

En el análisis de RMN¹³C normal y DEPT (Figs. 9.52 y 9.53) se aprecian las señales diagnóstico confirmativas de la estructura planteada. Aparecen dos metinos en la zona de los carbonos vinílicos: una a campo bajo en 136.6 ppm correspondiente a C-7 y otra a campo alto en 123.79 ppm asignada a C-4, además aparece una señal de carbono cuaternario en 158.27 ppm indicativo del carbono C-6 base del cloro. Las

señales de los carbonilos en C-17a (211 ppm), C-3 (198.9 ppm) y el carbonilo del éster (165.6 ppm), así como los metilos angulares C-18 (16.3 ppm), C-19 (17.8 ppm) y el metilo β en C-17 (22.9 ppm), permanecen constantes. En la zona de los carbonos aromáticos permanecen las seis señales de metinos y los dos carbonos ipso, asignados como para Xa, a los diferentes tipos de carbonos presentes en los dos grupos aromáticos. Las demás señales del espectro no sufren cambios sustanciales.

Al igual que para el compuesto Xa, las asignaciones para el conjunto de señales múltiples que aparecen en el intervalo de 1.4 a 2.5 ppm del espectro de RMN¹H normal, se esclarecen con el análisis bidimensional (Figs. 9.54 y 9.55). Así, en COSY H-H la señal múltiple que se observa en 2.435 ppm y que correlaciona con el protón vinílico en C-7 (6.55 ppm), se asignó al protón metínico en C-8. Dicha asignación se confirma por la correlación que existe en el espectro HETCOR, entre las señales en 2.435 ppm (resonancia protónica) y 37.391 ppm (vista como metino en RMN¹³C-DEPT). A su vez, el protón metínico en C-8 correlaciona con los protones metínicos en C-9 y C-14, cuyas señales aparecen alrededor de 2.25 y 1.5 ppm, respectivamente. Estas últimas señales correlacionan respectivamente en HETCOR, con las señales de los carbonos metínicos en 44.42 (C-9) y 49.1 (C-14) ppm, confirmando con ello su asignación. Cabe notar que la señal múltiple alrededor de 2.25 ppm en RMN¹H normal integra para tres protones y en HETCOR le corresponde, aparte del metino C-9, un metileno en 25.84 ppm. Con lo anteriormente expuesto y debido a la correlación que muestra dicha señal con el protón bencílico en C-16 (3.99 ppm) y con el protón en C-14 (1.5 ppm) en el espectro COSY, se asume que esa misma señal corresponde también a los protones en C-15. Se puede apreciar la correlación de los protones en C-1 (~2.54 ppm) con los de C-2 (~1.78 ppm), donde esta última señal se sobrelapa con los protones en C-11 (~1.66 ppm) que muestran correlación con los protones en C-12 (~2.1 ppm). Finalmente, en el espectro HETCOR se puede apreciar la correlación de la señal ~1.66 ppm con la del metileno en 19.25 ppm (C-11), la de ~1.78 ppm con la de 33.04 ppm (C-2), la de 2.1 ppm con la de 33.78 ppm (C-12) y la correlación de los protones aromáticos con los 6 diferentes carbonos metínicos de los dos grupos aromáticos, confirmando con todo lo anterior, las asignaciones de RMN¹H y RMN¹³C para Xb.

7.2. PARTE BIOLÓGICA.

Actualmente, uno de los principales objetivos que se plantean en el diseño de nuevos antiandrógenos, es la capacidad de inhibir la enzima 5α -reductasa ya que su actividad se encuentra directamente relacionada con el cáncer de próstata e HPB. Debido a que la enzima 5α -reductasa presenta dos isoformas (I y II), en este trabajo de investigación las moléculas sintetizadas fueron evaluadas en sistemas biológicos donde los parámetros de actividad radican en la enzima 5α -reductasa Tipo II. Cabe mencionar que se ha demostrado una relación inversa que presenta la actividad de las dos isoenzimas frente a un mismo tipo de inhibidor, es decir que si mientras un compuesto es muy activo sobre la isoenzima Tipo II, en la mayoría de los casos es poco activo sobre la isoenzima Tipo I. Así, la Finasterida (Proscar), que es el fármaco de elección para el tratamiento del cáncer de próstata e HPB y que fue utilizado como control en los bioensayos, es un inhibidor selectivo de la enzima 5α -reductasa Tipo II, mostrando una actividad casi nula frente a la isoenzima Tipo I.

Ensayo *in vivo*.

Con la finalidad de determinar el efecto antiandrogénico *in vivo* de los intermediarios y productos finales, se empleó el ensayo de las vesículas seminales. Este método parte del hecho que la enzima 5α -reductasa Tipo II tiene un efecto más profundo sobre los tejidos que expresan esta isoenzima, tales como la próstata, los testículos y las vesículas seminales. De esta manera, los compuestos que tienen la capacidad de inhibir a dicha isoenzima, reducen el peso de las vesículas seminales. Así, en la Fig. 6.2.1 (página 49) se observa claramente que cuando los hámster previamente castrados son sometidos con testosterona, ésta ejerce su acción androgénica al aumentar el peso de las vesículas seminales, y cuando además de testosterona se les administra Finasterida (que es el antiandrógeno más potente en el mercado), se observa un efecto antiandrogénico y el peso de las vesículas seminales disminuye. Evaluaciones anteriores han demostrado que los intermediarios I-V no presentan actividad antiandrogénica,^{74-76,90} por lo que la evaluación se realizó a partir del compuesto VI. Se puede apreciar una tendencia antiandrogénica de los

intermediarios VI y VII, donde el primero representa al primer D-homo derivado del pregnano de la serie con un grupo β -fenilo en C-16, y el segundo además presenta el sistema 4,6-dien-3-ona. Sin embargo, cuando se esterifica el alcohol terciario de VII con ácido benzoico para obtener el compuesto VIII, sorprendentemente se genera un cambio en la tendencia antiandrogénica, llegando prácticamente a la misma actividad que la Finasterida. El epoxi-derivado (IX) y los productos finales (Xa y Xb) muestran ligeramente menor ó igual actividad antiandrogénica que la Finasterida, comportándose igual que el compuesto VIII.

Con lo anterior se puede deducir que la presencia del anillo D-homo, con un grupo β -fenilo en C-16, no representa restricción para ejercer actividad antiandrogénica *in vivo*, y que si además presenta el sistema 4,6-dien-3-ona, se genera un aumento en la actividad antiandrogénica. Sin embargo, si aumentamos aún más el volumen estérico en el anillo D, a través de la formación de un ester benzoato en C-17 α (VIII), la actividad antiandrogénica disminuye. Por otro lado, se ha demostrado que la presencia un átomo de halógeno en C-6 confiere mayor actividad antiandrogénica, debido a que desestabilizan la resonancia del sistema 4,6-dien-3-ona, disminuyendo la energía de activación necesaria para la transferencia del hidruro. A pesar de ello, la presencia del átomo de halógeno en C-6, bromo (Xa) ó cloro (Xb), no afectó en la actividad antiandrogénica del derivado VIII, siendo el motivo estructural 4,6-dien-3-ona el de mayor importancia para ejercer la actividad antiandrogénica de los D-homo derivados del pregnano en esta serie.

Ensayo *in vitro*.

Con el propósito de utilizar un sistema de bioevaluación que implicara la inhibición específica de la enzima 5 α -reductasa, se utilizó el ensayo microbiano de la conversión de [3 H]T a [3 H]DHT por el hongo *Penicillium crustosum* *in vitro*.⁹³ Dicho hongo ya ha sido caracterizado, demostrándose que es capaz de convertir la testosterona a DHT (y diversos sustratos) a través de la enzima 5 α -reductasa, cuya expresión es regulada por la presencia de andrógenos en el medio de cultivo. Aunque aún no se sabe el tipo de isoenzima que predomina (I ó II) ó su localización (intra ó extracelular), se ha

demostrado que la conversión de T a DHT ocurre en dos máximos de actividad: uno a pH=6 y otro en pH=8, y que los metabolitos predominan en el medio de cultivo. En vista que la isoenzima Tipo II tiene un pH óptimo de actividad ligeramente ácido, los ensayos se realizaron a pH=6, y la [³H]DHT fue extraída del medio de cultivo.

Como podrá observarse en la Fig. 6.2.2 (página 51), cuando en los cultivos se encuentra presente únicamente la [³H]T, la conversión a [³H]DHT es máxima, no siendo disminuída significativamente cuando se encuentra la Finasterida presente. Los intermediarios II y III, de igual manera presentaron prácticamente la misma actividad que la Finasterida. Contrariamente, cuando tenemos el anillo D-homo, un ester benzoato en C-17 α y el sistema 4,6-dien-3-ona (compuesto VIII), la conversión de [³H]T a [³H]DHT es disminuída significativamente, hasta aproximadamente un 40%. El epoxy derivado IX sigue conservando esta misma actividad al igual que VIII. Cuando introducimos el átomo de bromo en C-6 (Xa), se observa una ligera disminución en la actividad. Sin embargo, cuando introducimos un átomo de cloro en C-6 (Xb) se observa un efecto inhibitorio mucho mayor que el del compuesto VIII (hasta casi un 60% de inhibición en la conversión).

Con la presencia de un ester benzoato en C-17 α , un grupo β -fenilo en C-16 y el sistema 4,6-dien-3-ona en los derivados del D-homo pregnano, se obtiene un derivado (VIII) capaz de inhibir la conversión microbiana de [³H]T a [³H]DHT llevada a cabo por el hongo *Penicillium crustosum*. Si además de los motivos anteriores, introducimos un átomo de cloro en C-6, aumentamos aún mas la actividad. Por otro lado, si introducimos un átomo de bromo en C-6, no se logra un aumento en la actividad, sugiriendo que el tamaño y la electronegatividad del halógeno insertado en C-6 juega un papel muy importante para presentar actividad inhibitoria en esta conversión microbiana. Sin embargo, cabe resaltar que la Finasterida (Proscar), siendo el prototipo de los antiandrógenos que actúan selectivamente a través de la inhibición de la enzima 5 α -reductasa Tipo II, no mostró actividad inhibitoria en esta conversión, sugiriendo que la actividad se encuentra centrada en la isoenzima Tipo I, apesar de trabajar a un pH óptimo para la isoenzima Tipo II (pH=6).

Lo anterior es soportado por el ensayo de las vesículas seminales, debido a que los compuestos VIII, IX, Xa y Xb en esa evaluación no presentaron una actividad antiandrogénica mayor que la Finasterida, donde el parámetro de actividad se encuentra centrado en la inhibición de la enzima 5 α -reductasa Tipo II. No obstante, siguieron comportándose como antiandrógenos, ya que disminuyeron el peso de las vesículas seminales.

Finalmente, con el propósito de determinar la isoenzima predominante en los cultivos de *P. crustosum* y poder dictaminar la especificidad de los compuestos evaluados, el grupo de Cabeza M. y cols., se encuentran caracterizándola actualmente. Además, los compuestos se están evaluando en estudios donde se determina la capacidad de inhibir la conversión de [3 H]T a [3 H]DHT en homogenados de vesículas seminales, donde se encuentra predominantemente la isoenzima Tipo II.

8.- CONCLUSIONES

Con el presente trabajo de investigación podemos concluir lo siguiente:

- Se logró la síntesis de cuatro nuevos derivados del D-homo pregnano: 17 α -Benzoiloxi-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VIII), 17 α -Benzoiloxi-6 α ,7 α -epoxi-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4-pregnen-3,17a-diona (IX), 17 α -Benzoiloxi-6-bromo-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (Xa) y 17 α -Benzoiloxi-6-cloro-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (Xb).

- Debido a que la síntesis de dichos compuestos no ha sido antes reportada, se caracterizaron mediante sus propiedades físicas (p.f., color, apariencia) y datos espectroscópicos (UV, IR, RMN¹H, RMN¹³C (1-D y 2-D) y EMIE).

- Se realizó la evaluación biológica (*in vivo* e *in vitro*) de los compuestos sintetizados, de la que se pueden mencionar los siguientes puntos:

- La presencia del anillo D-homo, con un grupo fenilo en C-16 β y el sistema 4,6-dién-3-ona en el esqueleto del pregnano (VII), no representa restricciones para ejercer una actividad antiandrogénica, siendo este derivado aún más activo que la Finasterida.

- Cuando además aumentamos el volumen estérico en el anillo D, a través de la introducción de un ester benzoato en C-17 α (VIII), o bien introducimos un átomo de bromo (Xa) ó cloro (Xb) en C-6, la actividad antiandrogénica permanece, pero se ve disminuída.

- De los resultados de la evaluación *in vitro* en los cultivos de *P. crustosum* se infiere, que la actividad inhibitoria de los compuestos sintetizados (derivados VIII-Xb) se centra sobre la enzima 5 α -reductasa Tipo I, donde el derivado clorado (Xb) presentó mayor actividad respecto al bromado (Xa) y a la Finasterida.

9.- BIBLIOGRAFÍA

- 1.- World Health Organisation: Trends in prostate cancer 1980-1988. WHO Weekly Epidemiological Record. 1992, **67**: 281-288.
- 2.- Boyle P.: "The evolution of an epidemic of unknown origin" in : L. Denis (ed.) Prostate Cancer 2000. European School of Oncology Monographs. Springer-Verlag, New York 1994, pp 5-11.
- 3.- Garnick M. and Fair W.: "Prostate Cancer: Emerging Concepts" in : Ann. Intern. Med. 1996, **125**: 118-125.
- 4.- Naik H. R., Choeypunt N. and Pienta K. J., Chemoprevention of prostate cancer. Dugs of Today 1995, **31**: 537-544.
- 5.- Garnick M., Prostate cancer. Screening, diagnosis and management. Ann. Intern. Med. 1993, **118**: 804-814.
- 6.- Gittes R. F., carcinoma of the prostate. New Engl. J. Med. 1991, **324**: 236-245.
- 7.- Santen R., Hormonal Therapy of prostate cancer: Choosing among several available options. Int. J. of Androl. 1989, **12**: 165-173.
- 8.- Anderson K. and Liao S., Selective retention of dihydrotestosterone by prostatic nuclei. Nature 1986, **219**: 277-278.
- 9.- Wakeling A.: "Antihormones and other steroid analogues" in: Green B. and Leake R. (eds.), Steroid hormones, a Practical Approach. IRL Press, Washington 1987, pp.219-236.
- 10.- Brueggemeier R. W., "Male sex hormones, analogs and antagonists" in: Burguer's Medicinal Chemistry and Drug Discovery, John Wiley Inc., 5ª ed. USA 1996. Cap. 42.
- 11.- Fieser L. F. and Fieser M., Steroids. Reinhold Publishing Corporation, New York 1959.
- 12.- Newsholme E. and Leech A., Biochemistry for the medical sciences. John Wiley and Sons, USA 1983.
- 13.- Kovacs W. E., Griffin J. E. and Wilson J. D. Endocrinology 1983, **113**: 1574-1581.
- 14.- Frairia R., Bradlow H. L. and Gaidano G., Steroid-protein interactions: basic aspects. Ann. NY Acad. Sci. 1988, **xx**:538.
- 15.- Clark J. H., Shrader W. T. and O'Malley B. W., "Mechanisms of steroid hormone action" in: Wilson J. D., Foster D. W., Williams Textbook of Endocrinology, 7ª ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 1985, pp 33-75.
- 16.- Schulster D., Burstein S. and Cooke B. A., Molecular Endocrinology of Steroid Hormones, Wiley, London 1976.
- 17.- Miller W. L., Endocrine Rev. 1988, **9**: 295.
- 18.- Lieberman S. and Prasad V.V. K. Endocrine Rev. 1990, **11**: 469.
- 19.- Burstein S., Kimball H. L. and Gut M., Steroids 1970: **15**: 808.
- 20.- Cadepond F., Schweizer-Groyer G., Segard-Maurel I., et. al., Heat shock protein 90 as a critical factor in monitoring glucocorticoid receptor in a nonfunctional state. J. Biol. Chem. 1991, **266**: 5834-5641.
- 21.- Picard D., Khursheed B., Garabedian M. J., Fortin M. G., Lindquist S., Yamamoto K. R., Reduced levels of hsp90 compromise steroid receptor action in vivo. Nature 1990, **348**: 166-168.
- 22.- Evans R. M., The steroid and tyroid hormone receptor superfamily. Science 1988, **240**: 889-895.

- 23.- Bishop J. M., The molecular genetics of cancer. *Science* 1987, **235**: 305-311.
- 24.- Sager R., Tumor supressor genes, The puzzle and the promise. *Science* 1989, **246**: 1406-1412.
- 25.- Eric R. Fearon, Human cancer syndromes: clues to the origin and Nature of cancer. *Science* 1997, **279**: 1043-1050.
- 26.- Imperato-McGinley J., Guerrero L., Gautier T., Peterson R. E., Steroid 5 α -reductase deficiency in man: An inherited form of male pseudohermaphroditism. *Science* 1974, **186**: 1213-1215.
- 27: Krieg M., Bartsch W., Janssen W., A comparative study of binding metabolism and endogenous leves of androgens in normal, hyperplasic and carcinomatous human prostate. *J. Steroid Biochem.* 1979, **11**: 615-624.
- 28: Klein H., Bressel M., Kastendieck H., Voigt K. D., Quantitative assesment of endogenous testicular and adrenal sex steroids and steroid metabolizing enzymes in untreated human prostatic cancerous tissue. *J. Steroid Biochem.* 1988, **30**: 119-130.
- 29.- Chang C., Kokontis J., Liao S., Molecular cloning of human and rat complementary DNA encoding androgen receptors. *Science* 1988, **240**: 324-326.
- 30.- Lubahn D. B., Joseph D. R., Quarmby V. E., et. al., The human androgen receptor: Complemetary deoxyribonucleic acid cloning, sequence analysis and gene expression in prostate. *Mol. Endocrinol.* 1988 **2**: 1265-1275.
- 31.- Lubahn D. B., Joseph D. R., Sullivan P. M., Willard H. F., French F. S., Wilson E. M., Cloning of human androgen receptor complementary DNA and localization to the X chromosome. *Science* 1988, **240**: 327-330.
- 32.- van Laar J. H., Bolt-de-Vries J., Voorhorst-Ogink M. M., Brinkmann A. O., The human androgen receptor is a 110 kDa protein. *Mol. Cell Endocrinol.* 1989, **63**: 39-44.
- 33.- Faber P. W., Kuiper GGJM., van Rooji HCJ, van der Korput JAGM, Brinkmann A. O, Trapman J., The N-terminal domain of the human androgen receptor is encoded by one large exon. *Mol. Cell Endocrinol.* 1989, **61**: 257-262.
- 34.- Evans R. M. and Hollenberg S. M., Zinc fingers: Gilt by association. *Cell* 1988, **52**: 1-3.
- 35.- Hollenberg S. M. and Evans R. M., Multiple and cooperatives trans activation domains of the human glucocorticoid receptor. *Cell* 1988, **55**: 899-906.
- 36.- Rusell D. W. and Wilson J. D., Steroid 5 α -reductase: Two genes/two enzymes, *Annu. Rev. Biochem.* 1994, **63**: 25-61.
- 37.- Metcalf B. W., Levy M. A. and Holt D. A., Inhibitors of steroid 5 α -reductase in benign prostatic hyperplasia, male pattern bladness and acne. *Trens. Pharmacol. Science* 1989, **10**: 491-495.
- 38.- Jenkins E. P., Andersson S., Imperato-Mc Ginley J., Wilson J. D., Rusell D. W., Genetic and pharmacological evidence for more than one human steroid 5 α -reductase. *J. Clin. Invest.* 1992, **89**: 293-300.
- 39.- Labrie F., Sugimoto Y., Luu-The, et al., Structure of human type II 5 α -reductase gene. *Endocrinology* 1992, **131**: 1571-1573.
- 40.- Isaacs J. T., 5 α -reductase inhibitors and the treatment of benign prostatic hyperplasia. *Drugs of Today* 1993, **29**: 335-342.
- 41.- Thigpen A. E., Silver R. I., Guileyardo J. M., McConell J. D., Rusell D. W., Tissue Distribution and ontogeny of steroid 5 α -reductase isozyme expression. *J. Clin. Invest.* 1993, **92**: 903-910.

**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

- 42.- Andersson S. and Rusell D. W., Structural and biochemical properties of cloned and expressed human and rat steroid 5 α -reductases. Proc. Natl. Acad. Sci. 1990, 87: 3640-3644.
- 43.- Andersson S., Bidhop R. W., Rusell D. W., J. biol. Chem. 1989, 264: 16249-16255.
- 44.- Andersson S., Berman D. M., Jenkins E. P., Rusell D. W., Nature 1991, 354: 159-161.
- 45.- Thigpen A. E., Rusell D. W., J. Biol. Chem. 1992, 267: 8577-8583.
- 46.- Weinberg R. A., How cancer arises. Scientific American 1996, 275: 32-40.
- 47.- Garnick M. B., The dilemmas of prostate cancer. Scientific American 1994, 270: 52-59
- 48.- Berry S. J., et al., The development of human benign prostatic hyperplasia with age, J. Urol. 1984, 132: 474
- 49.- Armenian H. K., Lilienfeld A. M., Diamond E. L., Bross I. D. J., Relation between benign prostatic hyperplasia and cancer of the prostate: A prospective and retrospective study. Lancet 1974, ii: 115-117.
- 50.- Bostwick D. G., Balcells F. S., Cooner W. H., et al, Benign prostatic hiperplasia (BPH) and cancer of the prostate in: Cockett A. T. K., Aso Y., Chatelain C., Denis L. Griffiths K., Khoury S., Murphy G, Proceedings of the first International Consultation on Benign Prostatic Hyperplasia (BPH), 1991, Publ. SCI Pris, 1992 pp: 139-159.
- 51.- Garnick M. B. and Fair W. R., Combating prostate cancer. Scientific American 1998, 279: 44-53.
- 52.-Barinaga M., Study suggest new way to cauge prostate cancer risk. Science 1998, 279: 475.
- 53.- Chan J. M., Stampfer M. J., Giovannucci E., Gann P. H., Jing Ma., Wilkinson P., Hennekens C. H., Pollak M., Plasma Insuline-Like Growth Factor-I and Prostate Cancer Risk: A prospective study. Science 1998, 279: 563-565.
- 54.- Zaridze D. G. and Boyle P., Cancer of the prostate: Epidemiology and aetiology. Br. J. Urol. 1987, 59: 493-502.
- 55.- Cesorsimo R., Carr D., Therapy update. Am. J. Health-syst Pharm. 1996, 53: 381.
- 56.- Hanks G. E. and Scardino P. T., Does screening for prostate cancer make sense?. Scientific American 1996, 275: 80-81.
- 57.- Brower V., Prostate-cancer link sours IGF-1. Nature Biotechnology 1998, 16: 223.
- 58.-Rasmusson G. H. and Torrey J. H., Ann. Rep. Med. Chem. 1994, 29:225
- 59.- Neumann F. and Töpert M., Pharmacology of antiandrogens. J. Steroid Biochem 1986, (25 5B): 885-895.
- 60.- Neumann F., The antiandrogen cyproterone acetate: Discovery, chemistry, basic pharmacology, clinical use and tool in basic research. Clin. Exp. Endocrinol. 1994, 102: 1-32
- 61.- Harris G., Azzolina B., Baginsky W., et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1992, 89: 10787
- 62.- Mangan F. R. and Mainwaring I. P., Steroids 1972, 20:331.
- 63.-Wakeling A. E., Furr B. J. A., Glen A. T. and Hughes L. R., J. Steroid Biochem. 1981, 15:355.
- 64.- Neumann F. and Berswordt-Wallrabe R. V., J. Endocrinol. 1966, 35: 363.
- 65.- Peets E. A., Henson M. F. and Neri R., Endocrinol. 1974, 94:1205.
- 66.- Eri L. M. and Tveter K. J., J. Urol. 1993, 150: 90.

- 67.- Eli C., Ketoconazole binds to the human androgen receptor. *Hormone Metab. Res.* 1992, **34**: 367-370.
- 68.- Espada M. y Avendaño C., "inhibidores enzimáticos como farmacodinámicos" en: Avendaño C., *Introducción a la química farmacéutica*, Interamericana McGraw-Hill Madrid, España 1996, cap. 10. pp:292-295.
- 69.- Brodgen R. N. and Chrisp P., Flutamide: A review of its pharmacokinetic properties, and therapeutic use in advanced prostatic cancer. *Drugs & Aging* 1991, **1**: 104-115.
- 70.- Kaisary A. V., Current clinical studies with a new nonsteroidal antiandrogen, Casodex. *The prostate* 1994, **5**: 27-33
- 71.- Bull G. Herbert, García-Calvo M., et al, Mechanism-based inhibition of human steroid 5α -reductase by finasteride: Enzyme-catalyzed formation of NADP-Dihydrofinasteride, a potent bisubstrate analog inhibitor. *J. Am. Chem. Soc.* 1996, **118**: 2359-2365.
- 72.- Levy M. A., Brandt M., Greway A. T., *Biochemistry* 1990, **29**: 2808-2815.
- 73.- Tayler V., *Pharmacognosy*, Lea & Feiberg, 8ª Ed., Philadelphia USA 1981, cap 7.
- 74.- Bratoeff E., Flores G., Ramírez E., Flores C., Calderón D., Hernández E., Valencia N., Martínez A., Cabeza M. y Miranda R., Síntesis de nuevos antiandrógenos inhibidores de 5α -reductasa. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* 1997, **28** (6): 13-19.
- 75.- Bratoeff E., Flores G., Ramírez E. and Valencia N., The pharmacology of the antiandrogens. *Chimica OGGI* 1997 vol. 8: 67-69.
- 76.- Bratoeff E., Trejo A., Hernández J. y Sánchez P., Síntesis de derivados del pregnano con un grupo metilo en posición C-16. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* 1992, **22**: 14.
- 77.- Calderon D., Bratoeff E. y Ramirez E., Antiandrógenos mas usuales, reflexiones sobre la síntesis orgánica. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* 1997, **28** (1): 24-29.
- 78.- Ramírez E., Síntesis de 6-halo-16 β -metil-17 α -valeriloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona como antiandrógenos. Tesis de maestría en la Facultad de Química, UNAM 1998.
- 79.- Straka L., Sulcova J., Broulik P. D., Joska J., Fajkos J. and Dosckocil M., *J. steroid Biochem.* 1977, **8**: 939.
- 80.- Starka L., Hanapl R., Bicikova M., Cerny V., Fajkos J., et al, *J. Steroid Biochem.* 1980, **13**: 455.
- 81.- Cooke G. M. and Robaire B., *J. Steroid Biochem.* 1986, **24**: 877.
- 82.- Ringold H. J., *J. Am. Chem. Soc.*, 1960, **82**: 961.
- 83.- Soriano M., Hernández S., Bratoeff E., Valencia N., Ramírez E. and Flores G., 17 α -Acetoxy-17 β -methyl-16 β -phenyl-D-homo-4,6-pregnadiene-3,17a-dione: Synthesis and crystal structure determination of a new rearranged pregnane derivative. *J. Chem. Cryst.* 1998, **28** (6):487-491.
- 84.- Marker R., Tsukamoto T. and Turner L., Sterols C. Diosgenin. *J. Am. Chem. Soc.* 1940, **62**: 2525-2530.
- 85.- Shapiro E. L., Weber L., Harris H., Synthesis and biological activity of 17-esters of 6-dehydro-16-methylene-17 α -hydroxyprogesterones. *J. Med. Chem.* 1972, **15**: 716-720.
- 86.- Löken B., Kaufman B., Rosenkraz S., Sondheimer G., Steroids LXXVII: Synthesis and reactions of 16 β -oxygenated pregna-20-one derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* 1956, **78**: 1738-1744.
- 87.- Julian P., Meyer E., Ryden I., Sterols 17 α -hydroxyprogesterone. *J. Am. Chem. Soc.* 1950, **72**: 367-370.

- 88.- Glatz B., Helmchen G., A total synthesis and structural aspects of racemic 8-oxigenated tetracyclines. *J. Am. Chem. Soc.* 1979, 101: 2171-2176.
- 89.- Dauben H., Löken B., Ringold B., Preparation of ethylendioxy derivatives of improved synthesis of testosterone from Δ^4 -androstene-3,17-dione. *J. Am. Chem. Soc.* 1954, **76**: 1359-1369.
- 90.- Valencia N., Síntesis de derivados del pregnano con un grupo fenilo en configuración beta en C-16 como antiandrógenos potenciales para el tratamiento del cáncer de próstata. Tesis de maestría en la Facultad de Química, UNAM 1997.
- 91.- Cabeza M., Gutierrez E., Miranda R., Heuze I., Bratoeff E., Flores G., Ramirez E., Androgenic and anti-androgenic effects of progesterone derivatives with different halogens as substituents at the C-6 position. *Steroids* 1999, (in press).
- 92.- Bradford M. M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* 1986, **72**: 248-254.
- 93.- Cabeza M., Gutiérrez B., García A. G., Avalos H. A., Hernández H., Microbial transformations of testosterone to 5α -dihydrotestosterone by two species of *Penicillium*: *P. Chrysogenum* and *P. Crustosum*. *Steroids* 1999, (in press).
- 94.- Raviña E., Obtención de fármacos por semisíntesis. Síntesis de esteroides en: Avendaño C., Introducción a la química farmacéutica, Interamericana McGraw-Hill Madrid, España 1996, cap. 25. pp:769-805.
- 95.- March J., *Advanced Organic Chemistry*, John Wiley & Sons 4^a Ed. USA 1992.
- 96.- Butler; Gold, *J. Chem. Soc.* 1961, 4362; Fersht; Jenks, *J. Am. Chem. Soc.* 1970, **92**: 5432, 5442.
- 97.- Lamb; Ayers; toney; Garst, *J. Am. Chem. Soc.* 1966, **88**: 4261.
- 98.- Rahman Atta ur, *Nuclear Magnetic Resonance*, Springer-Verlag New York 1986.
- 99.- Budzikiewicz H., Djerassi C. and Williams D. H., *Mass Spectrometry for Organic Compounds*, Holden-Day Inc. San Francisco 1967.
- 100.- Pretsch E., Clerc T., Seibl J. and Simon W, *Tables of Spectral Data for Structure Determination of Organic Compounds*, Springer-Verlag 2^a Ed., USA 1989.
- 101.- Djerassi C., *Steroids Reactions. An outline for organic chemist*, Holden-Day Inc. San Francisco Ca., 1963.
- 102.- Li X., Singh M., Côté J., Laplante S., Veilleux R., Labrie F., Synthesis and *in vitro* evaluation of 4-sustituted N-(1,1-Dimethylethyl)-3-oxo-4-androstene-17b-carboxamides as 5α -reductase inhibitors and antiandrogens. *J. Med. Chem.* 1995, **38**: 1456-1461.
- 103.- Murillo C., Síntesis de derivados del pregnano con actividad antiandrogénica potencial; 17α -Benzoiloxi-4-halo-pregnen-3,20-diona. Tesis de licenciatura en la Facultad de Química, UNAM 1999.
- 104.- Fieser L. F. and Goto T., Oxido alcohols and ketoxidos. *J. Am. Chem. Soc.* 1960, **82**: 1693-1698.
- 105.- Loken B., Kaufman B., Roserkrantz S. and Sondheimer G., *Steroids LXXVII: Synthesis and reactions of 16-oxigenated pregna-20-ona derivatives*, *J. Am. Chem. Soc.* 1956, **78**: 1738-1744.

ANEXO DE ESPECTROSCOPIA

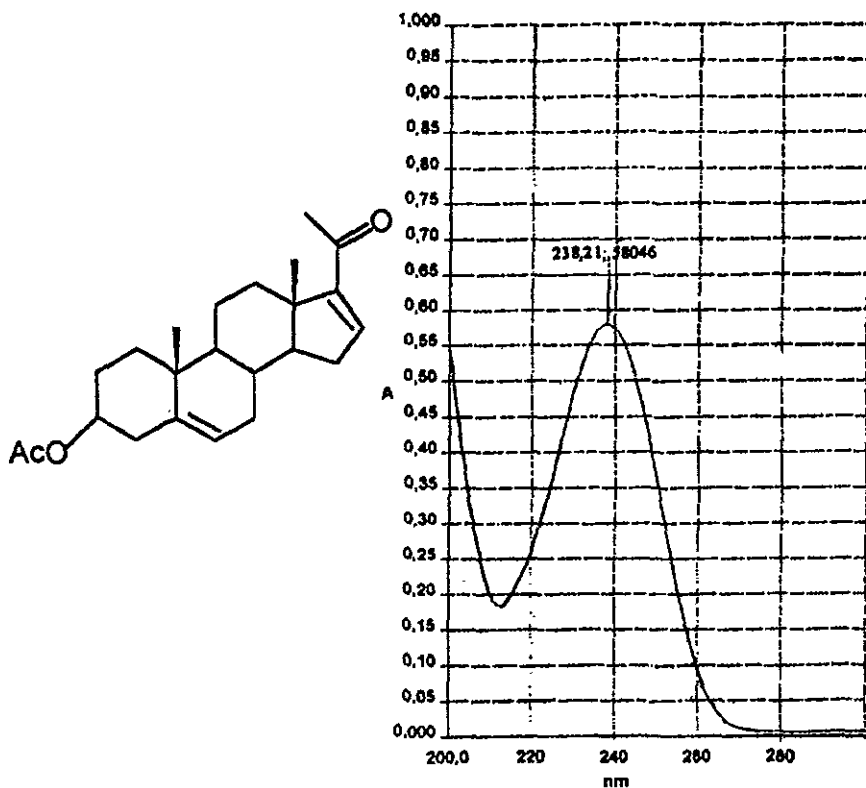


Figura 9.1. Espectro de UV de la materia prima: Acetato de 16-Dehidropregnenolona (I).

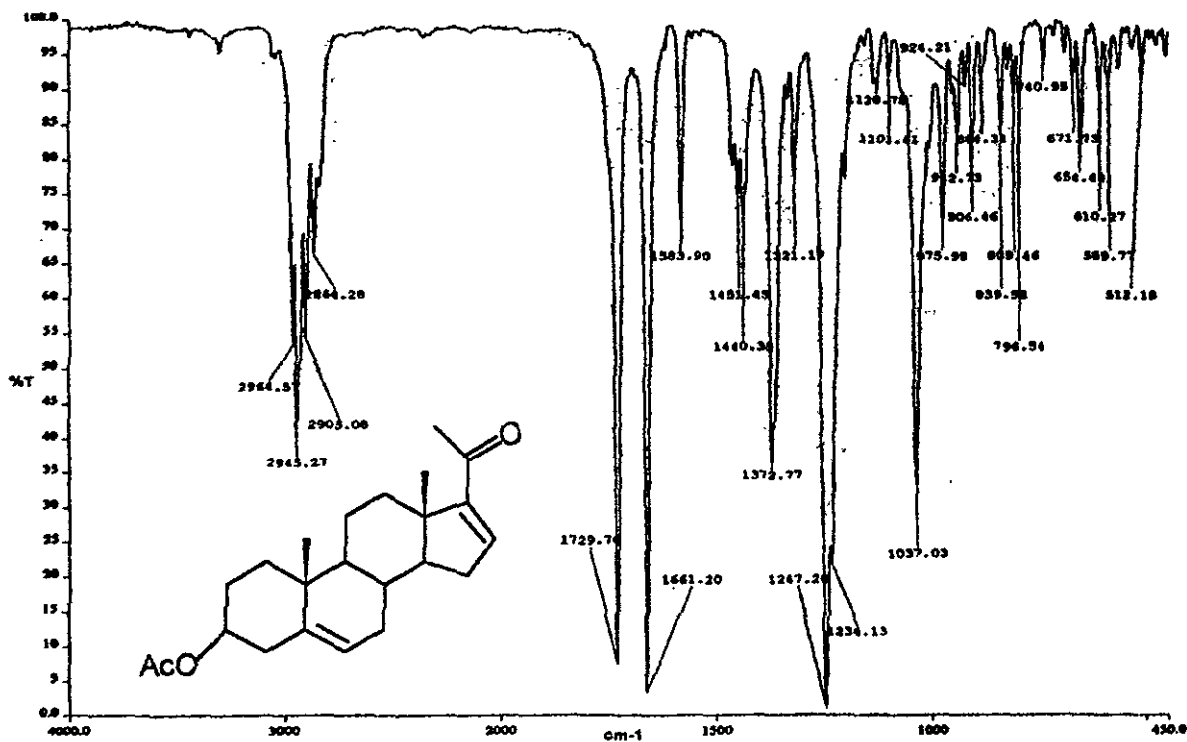


Figura 9.2. Espectro de IR de la materia prima: Acetato de 16-Dehidropregnenolona (I).

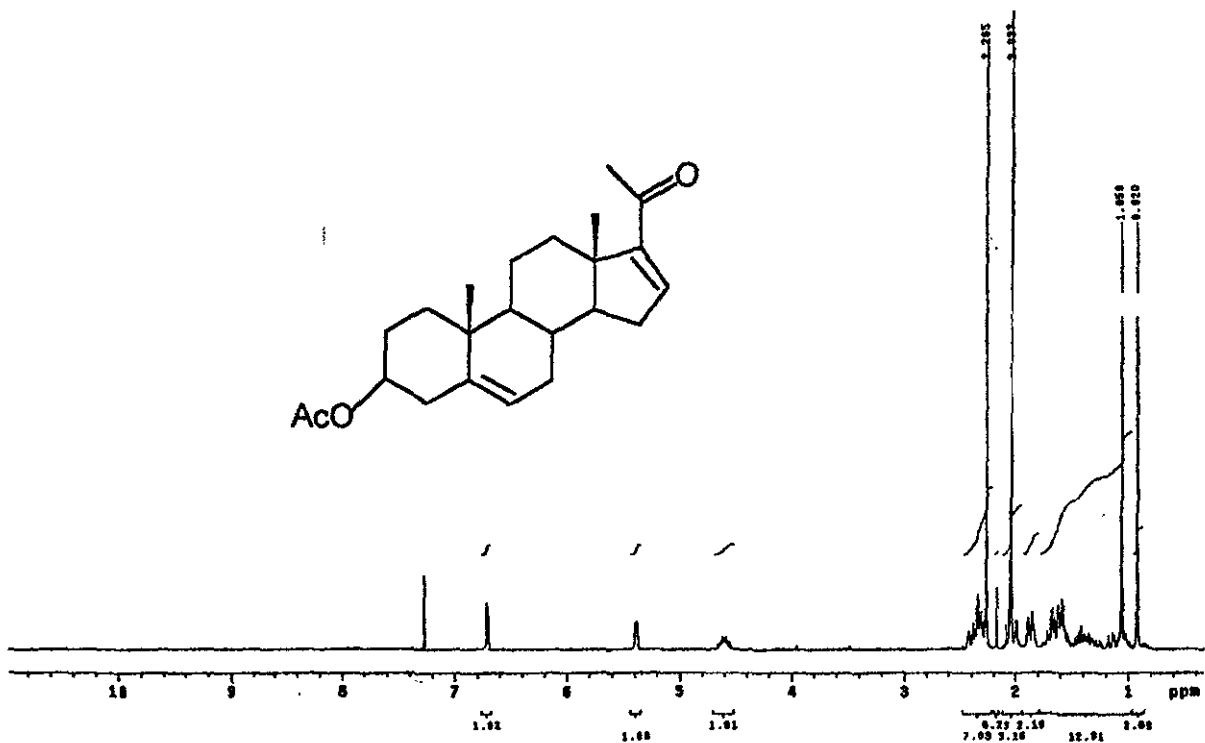


Figura 9.3. Espectro de RMN¹H de la materia prima: Acetato de 16-Dehidropregnenolona (I).

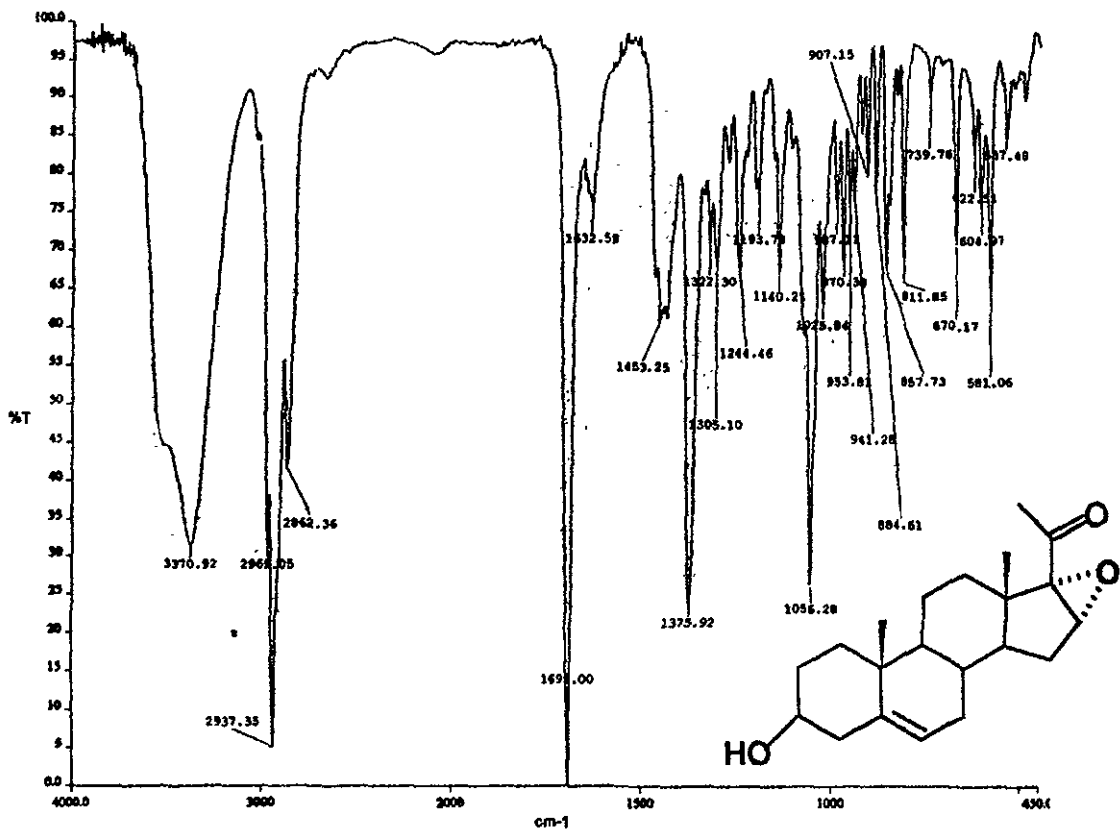


Figura 9.4. Espectro de IR del compuesto 16 α ,17 α -Epoxi-3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona (II).

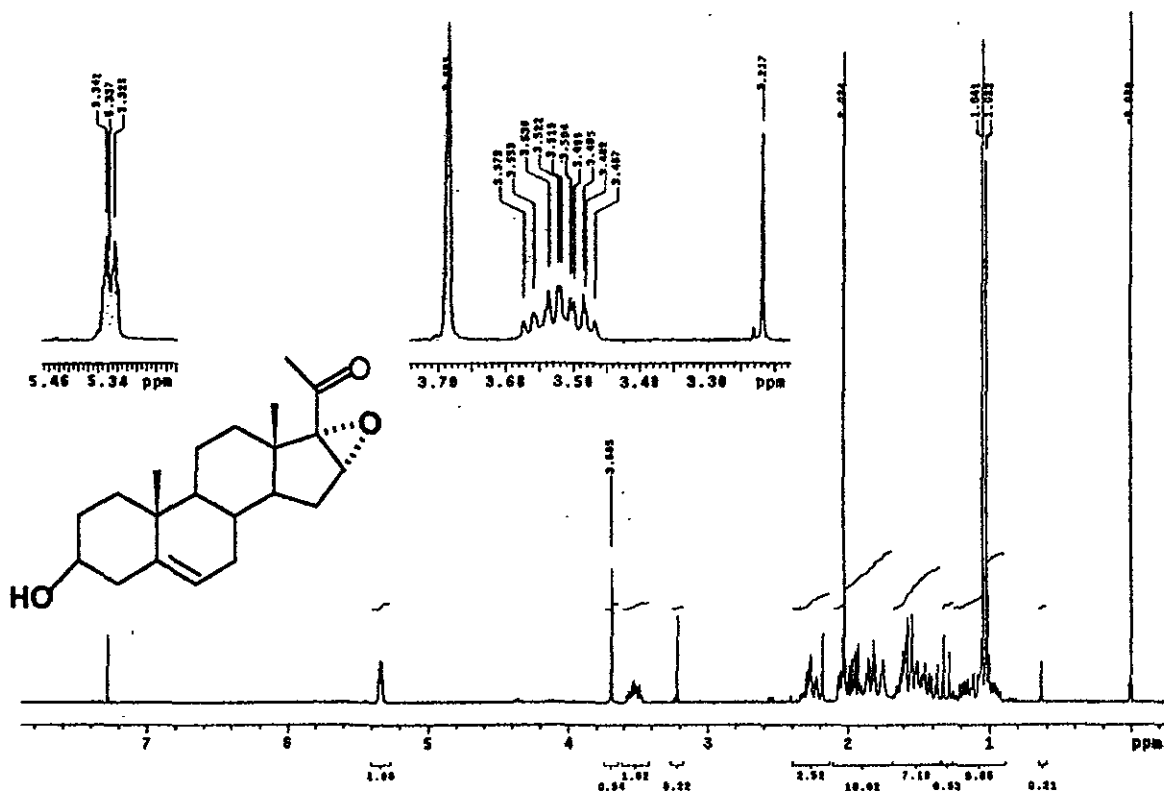


Figura 9.5. Espectro de RMN1H del compuesto 16 α ,17 α -Epoxi-3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona (II).

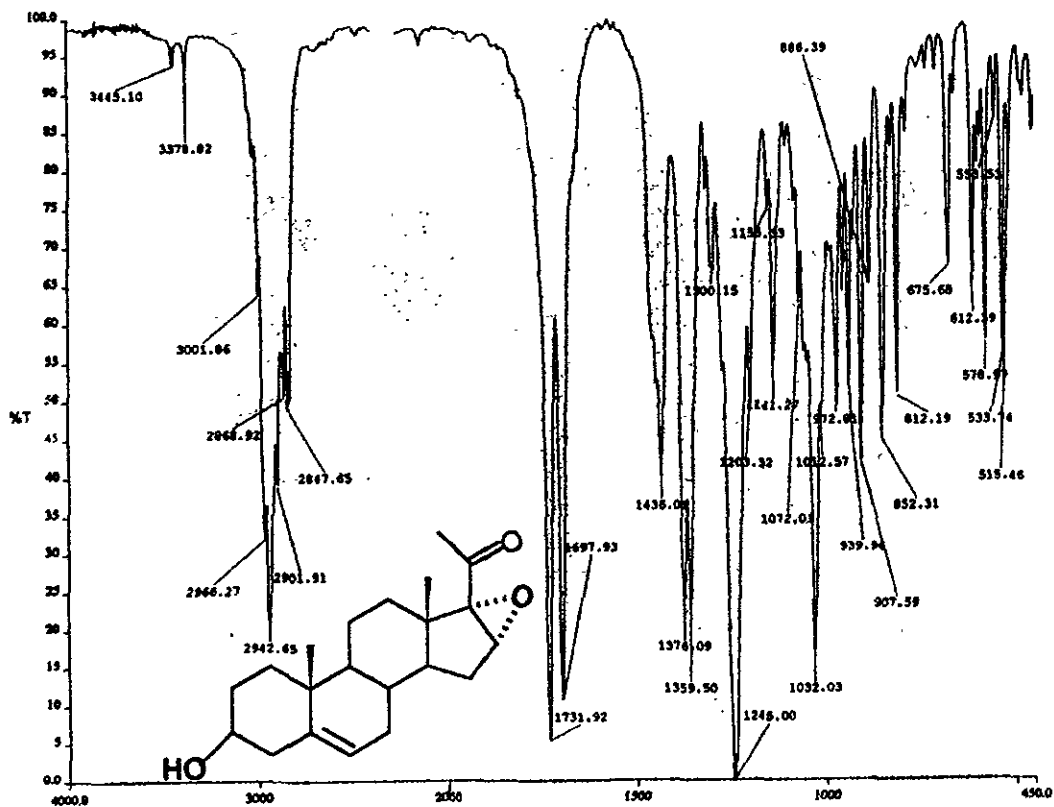


Figura 9.6. Espectro de IR del compuesto 3 β -Acetoxy-16 α ,17 α -epoxy-5-pregnen-20-ona (III)

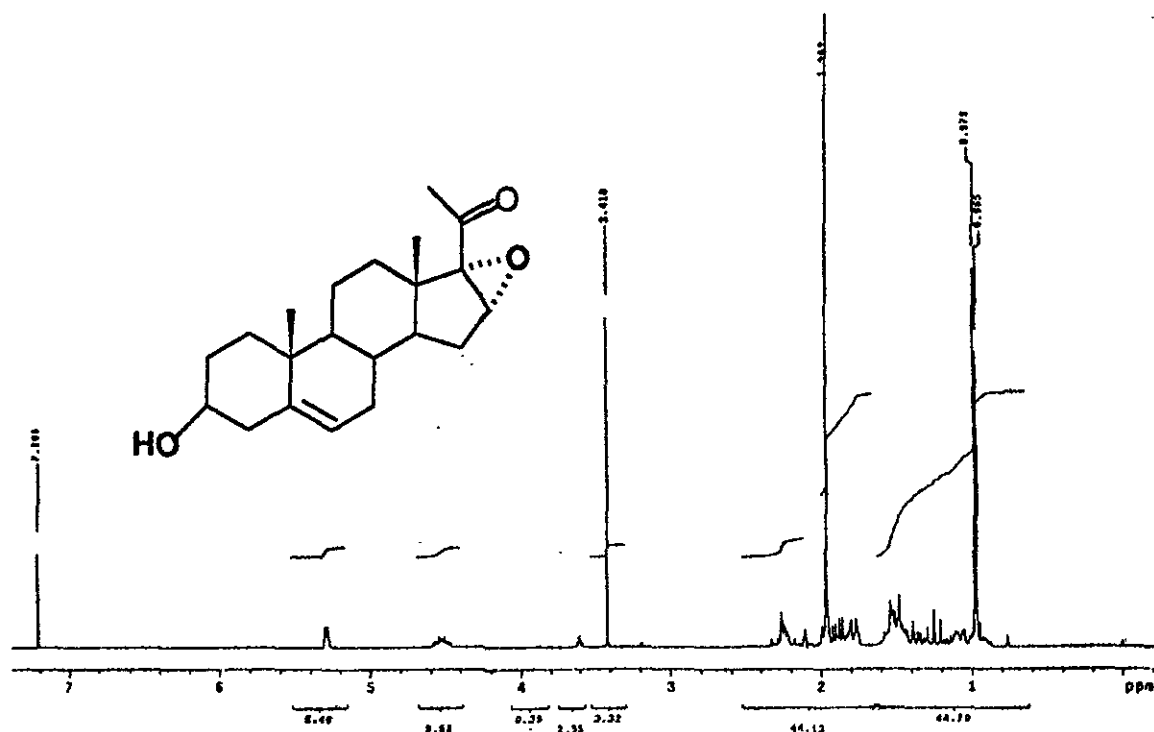


Figura 9.7. Espectro de RMN¹H del compuesto 3β-Acetoxy-16α,17α-epoxi-5-pregnen-20-ona (III)

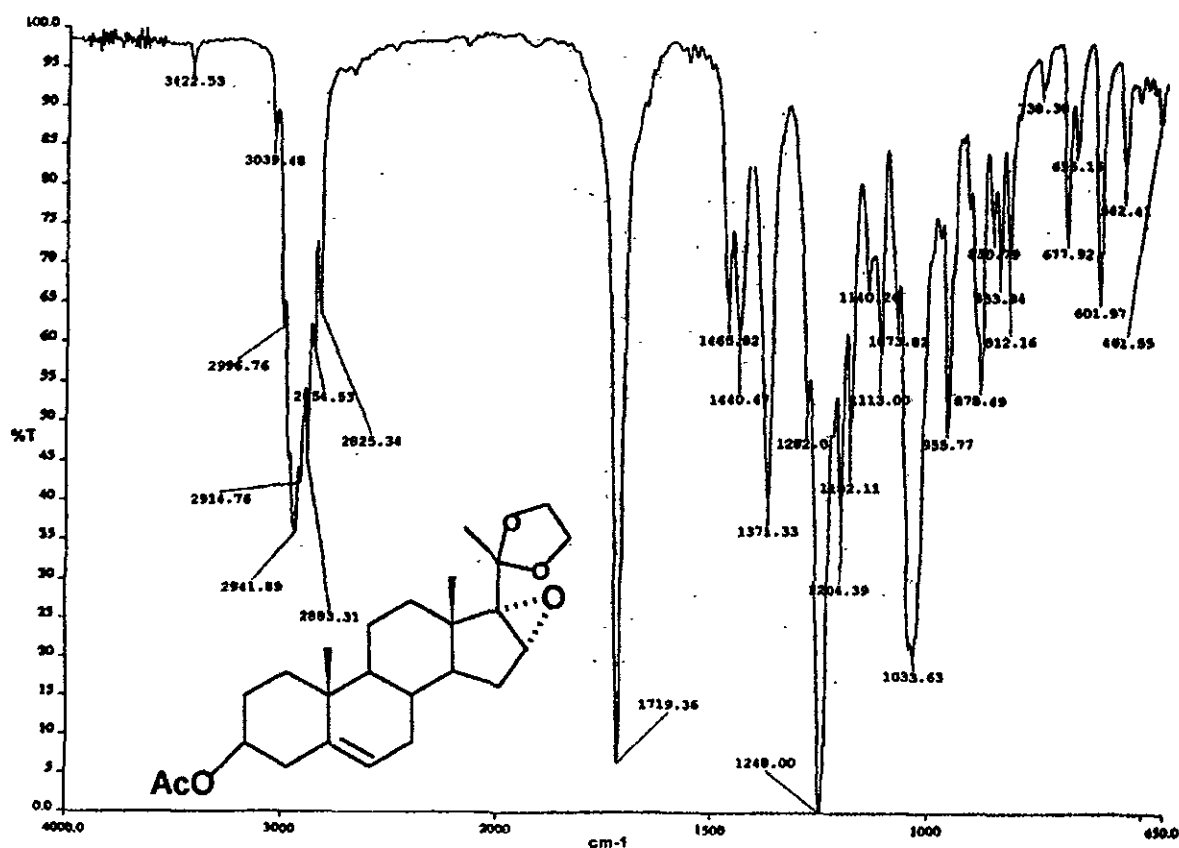


Figura 9.8. Espectro de IR del compuesto 3β-Acetoxy-16α,17α-epoxi-20-etilendioxi-5-pregnenone (IV).

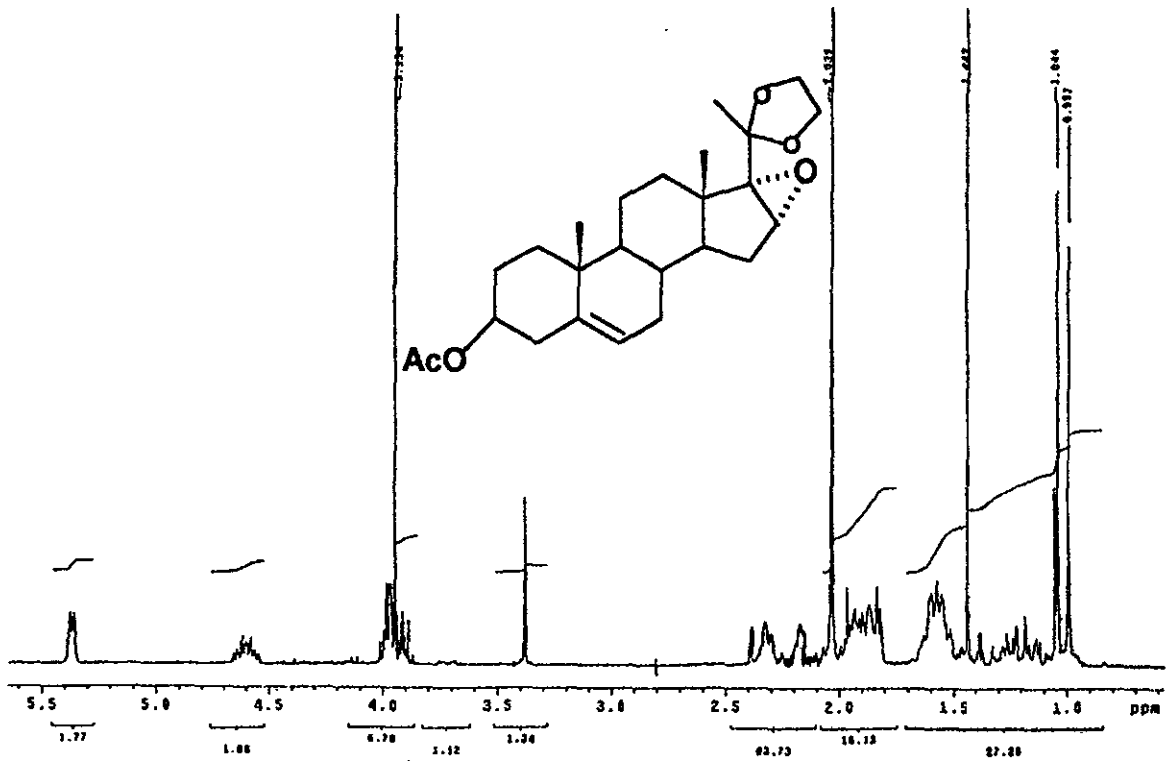


Figura 9.9. Espectro de RMN¹H del compuesto 3β-Acetoxy-16α,17α-epoxy-20-ethylidioxi-5-pregнено (IV).

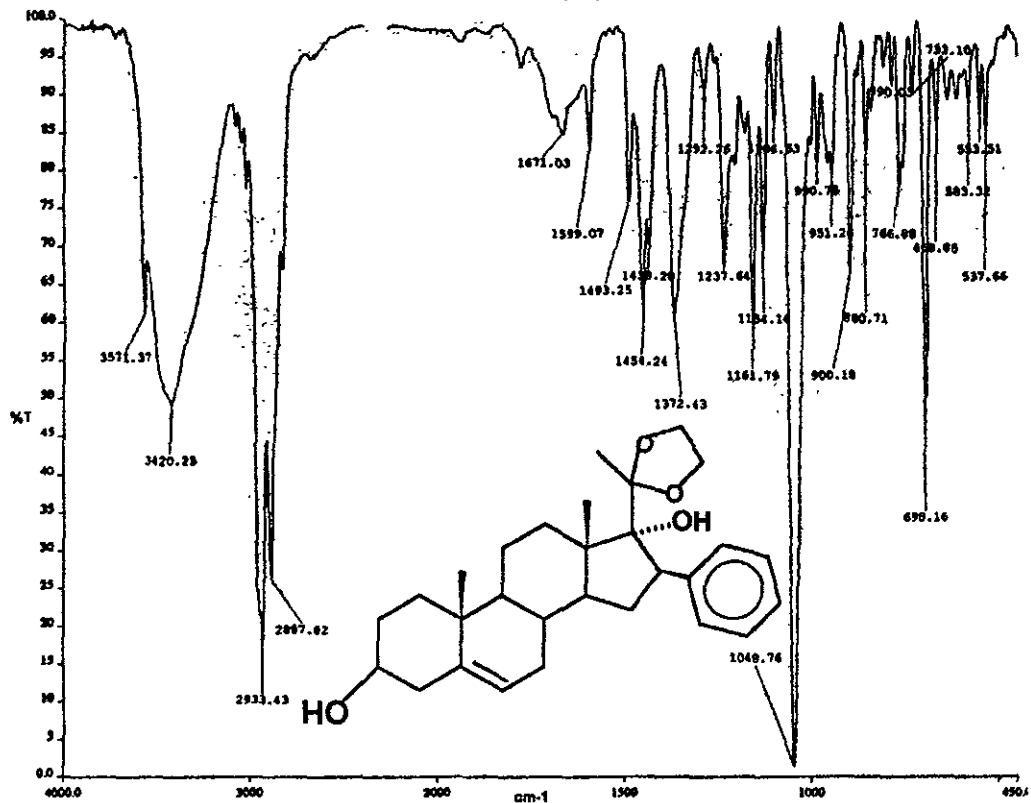


Figura 9.10. Espectro de IR del compuesto 3β,17α-Dihydroxy-20-ethylidioxi-16β-fenil-5-pregнено (V).

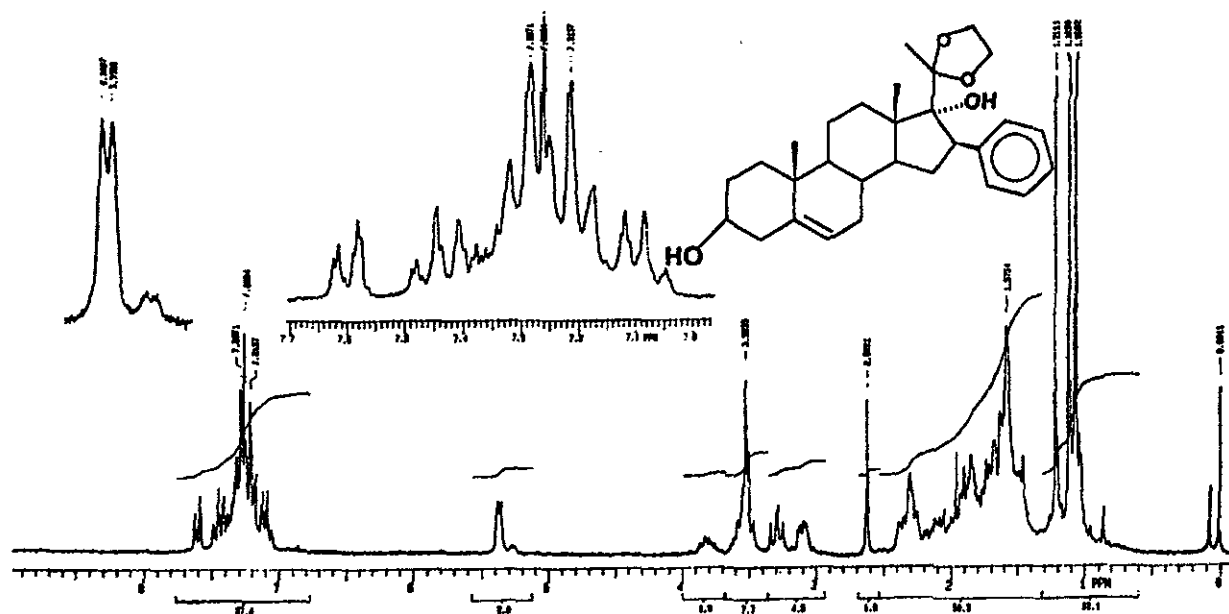


Figura 9.11. Espectro de RMN^1H del compuesto $3\beta,17\alpha$ -Dihidroxi-20-etilendloxi-16 β -fenil-5-pregno (V).

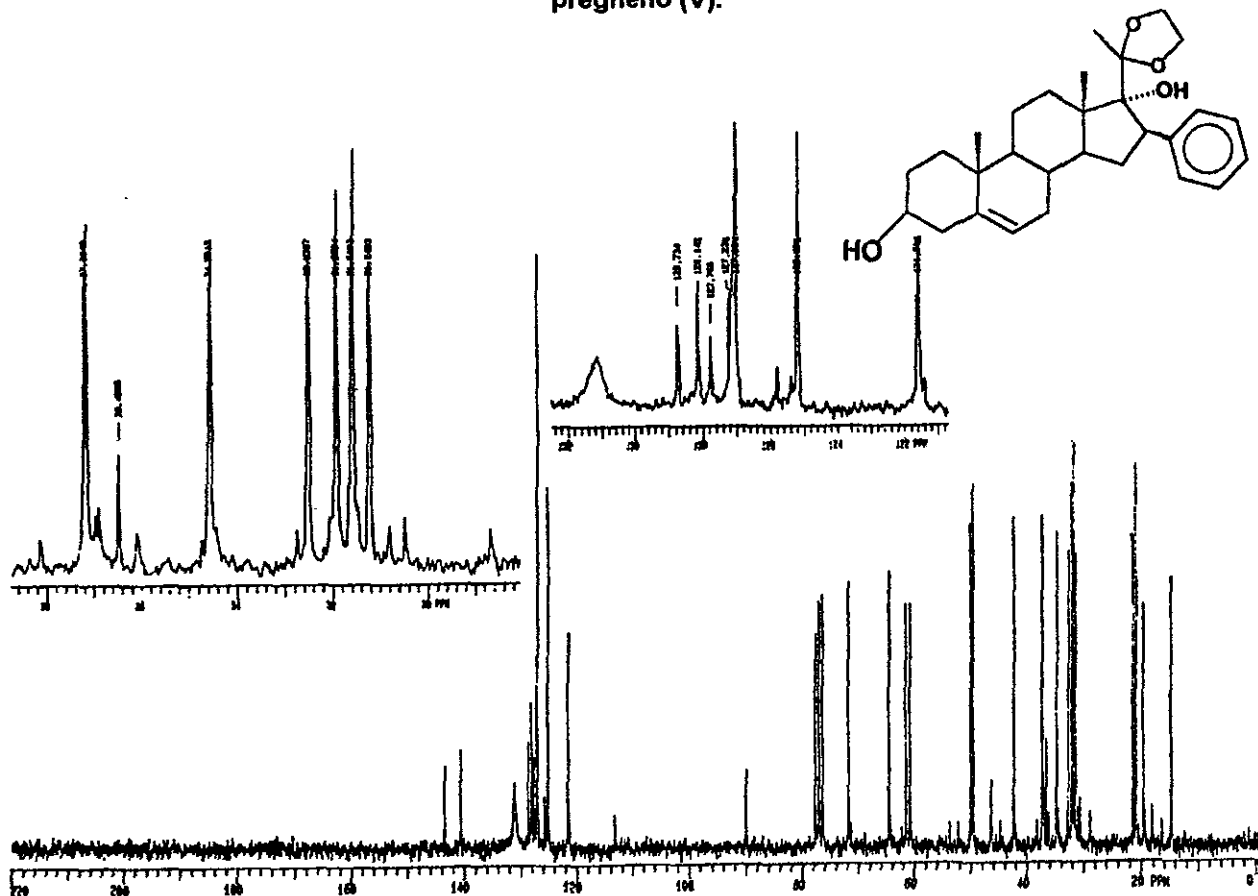


Figura 9.12. Espectro de RMN^{13}C del compuesto $3\beta,17\alpha$ -Dihidroxi-20-etilendloxi-16 β -fenil-5-pregno (V).

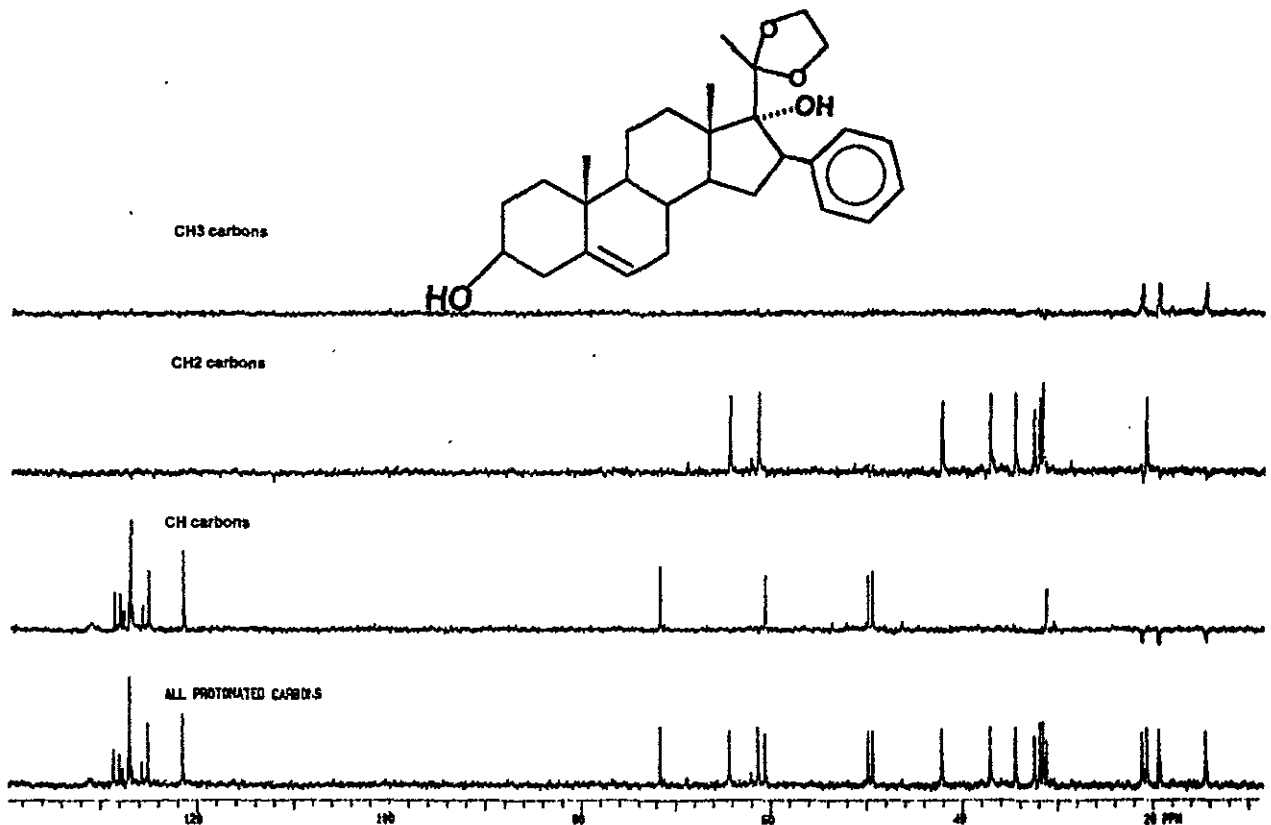


Figura 9.13. Espectro de RMN¹³C DEPT del compuesto 3β,17α-Dihidroxi-20-etilendioxi-16β-fenil-5-pregнено (V).

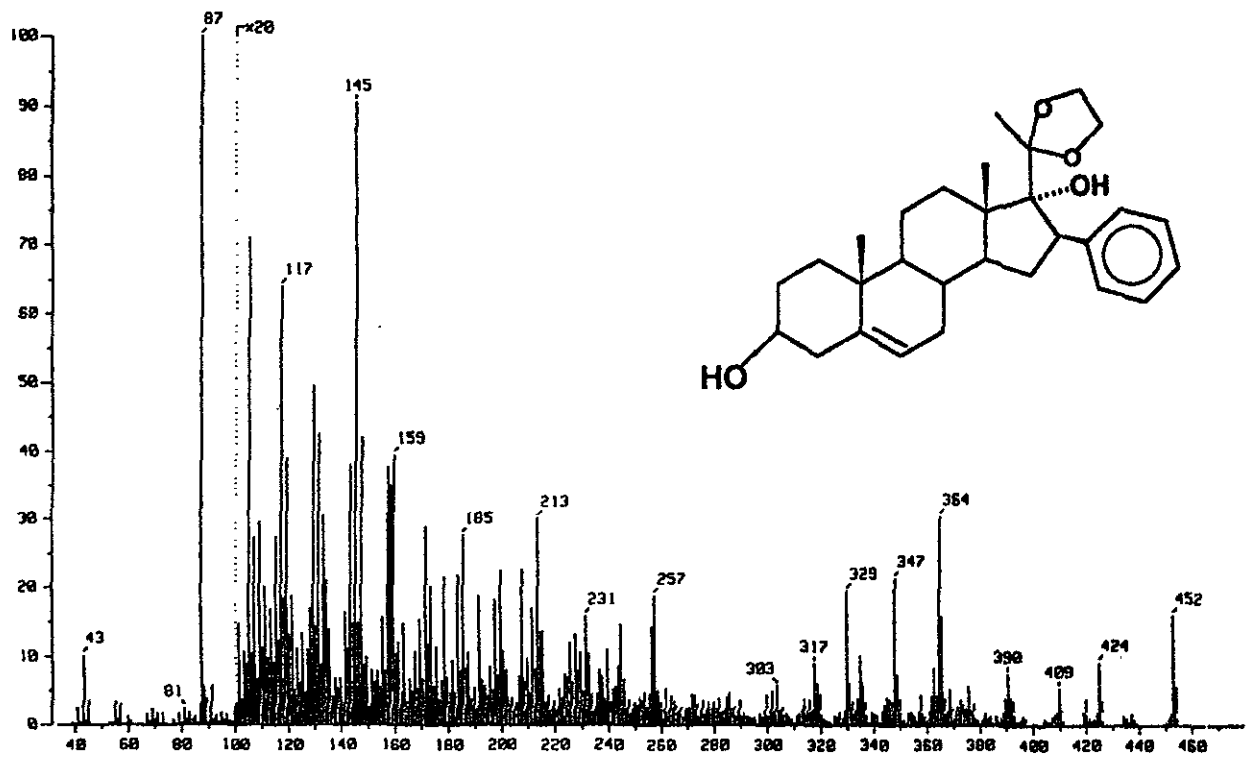


Figura 9.14. Espectro de EMIE del compuesto 3β,17α-Dihidroxi-20-etilendioxi-16β-fenil-5-pregнено (V).

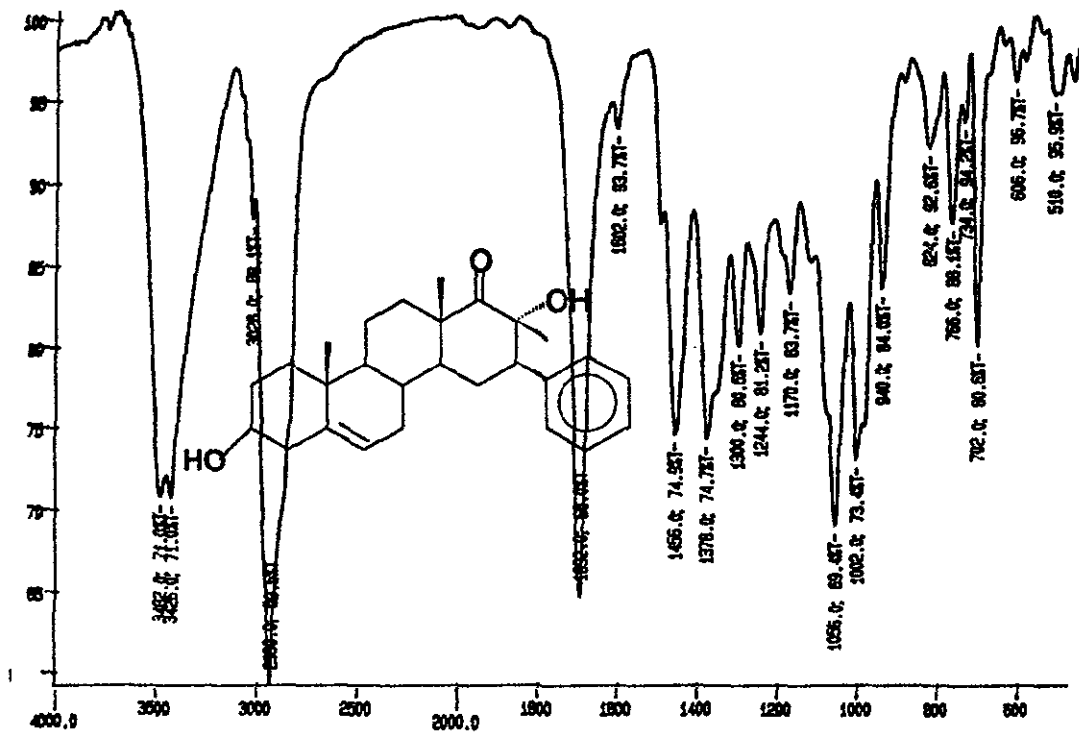


Figura 9.15. Espectro de IR del compuesto: 3 β ,17 α -Dihidroxi-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-5-pregnen-17a-ona (VI).

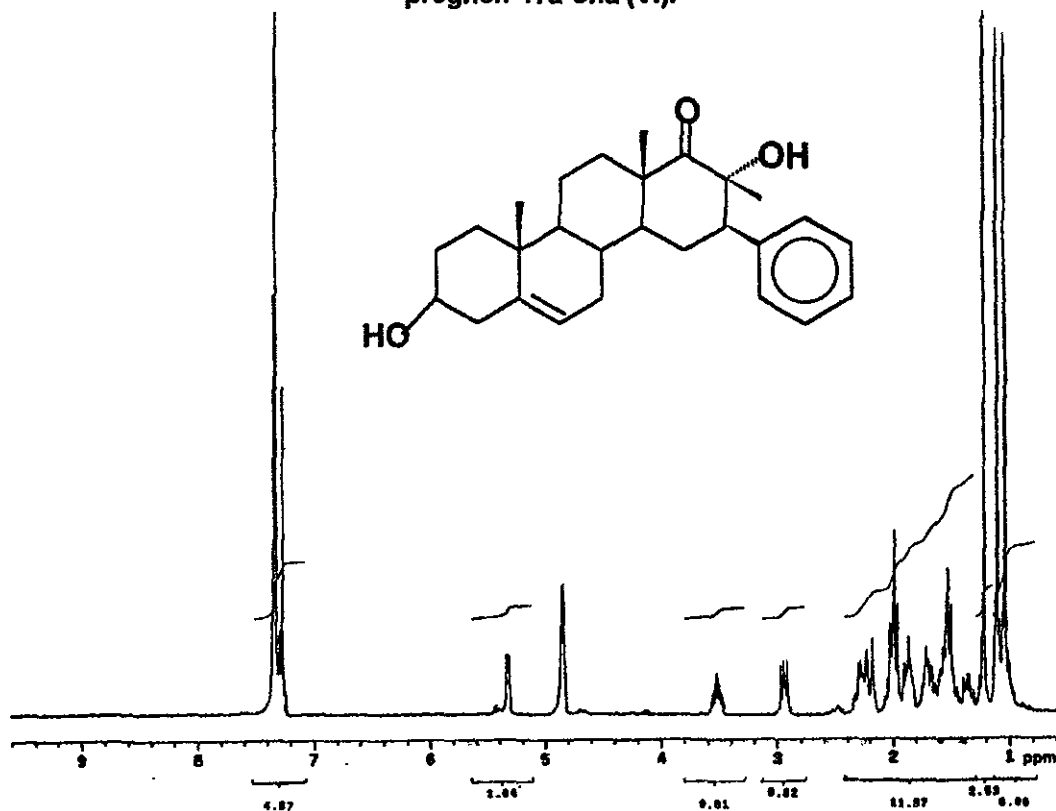


Figura 9.16. Espectro de RMN¹H del compuesto : 3 β ,17 α -Dihidroxi-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-5-pregnen-17a-ona (VI).

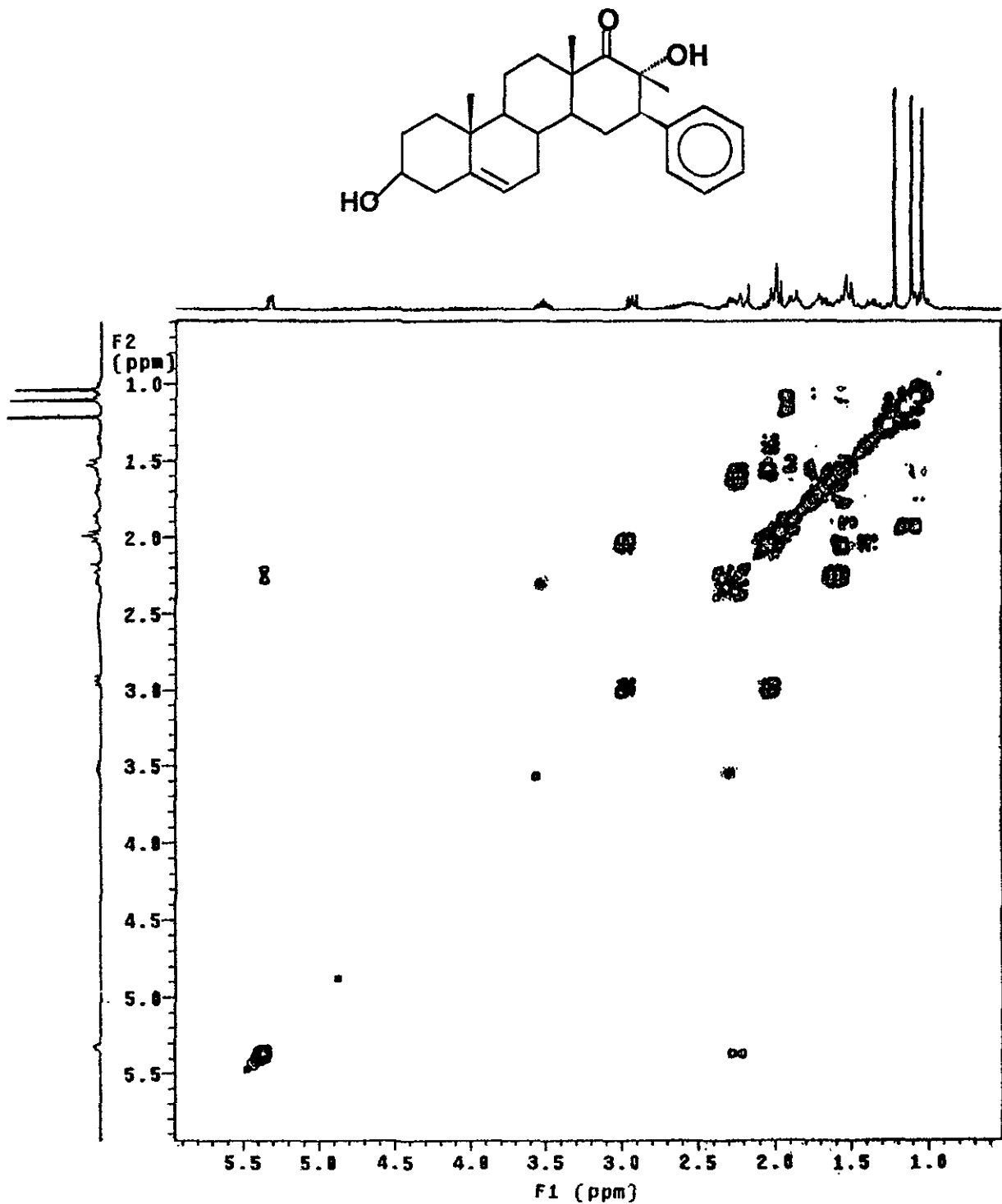


Figura 9.17. Espectro COSY H-H del compuesto: 3β,17α-Dihidroxi-16β-fenil-17β-metil-D-homo-5-pregnen-17a-ona (VI).

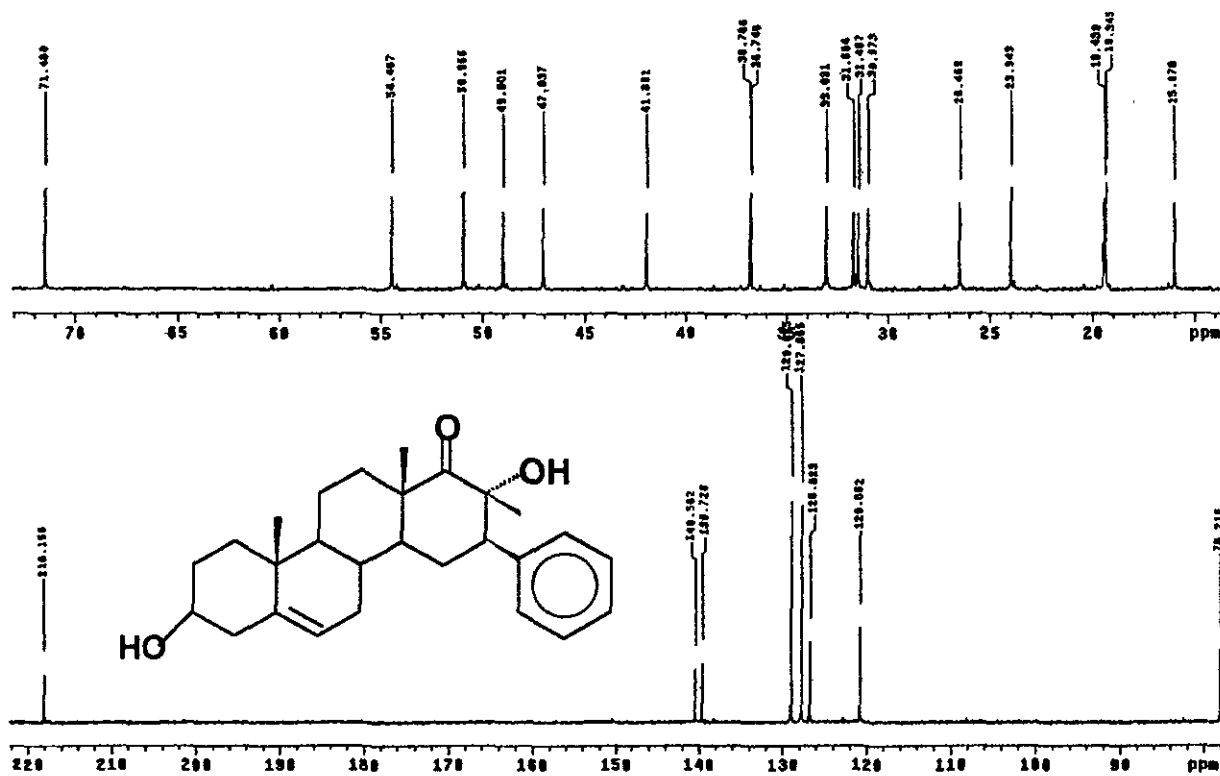


Figura 9.18. Espectro deRMN ^{13}C del compuesto: 3 β ,17 α -Dihidroxi-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-5-pregnen-17a-ona (VI).

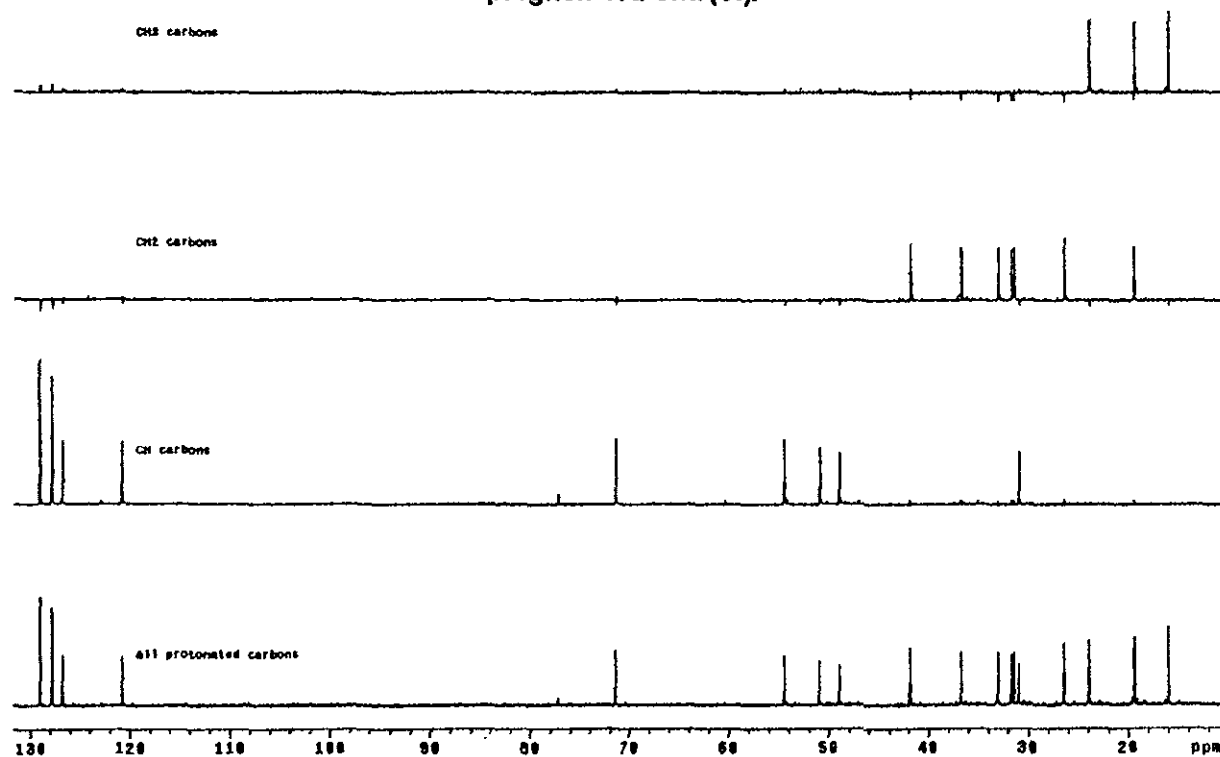


Figura 9.19. Espectro DEPT del compuesto: 3 β ,17 α -Dihidroxi-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-5-pregnen-17a-ona (VI).

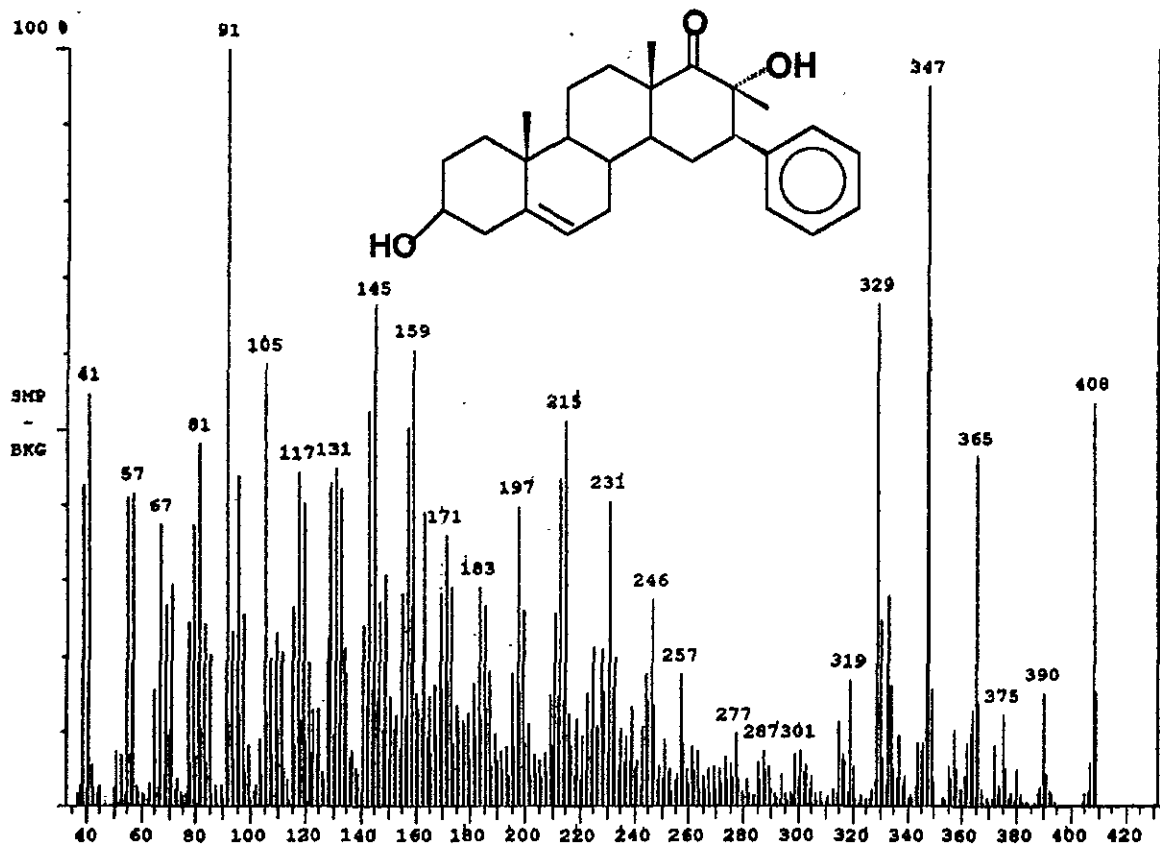


Figura 9.20. Espectro de EMIE del compuesto: $3\beta,17\alpha$ -Dihidroxi- 16β -fenil- 17β -metil-D-homo-5-pregnen- $17a$ -ona (VI).

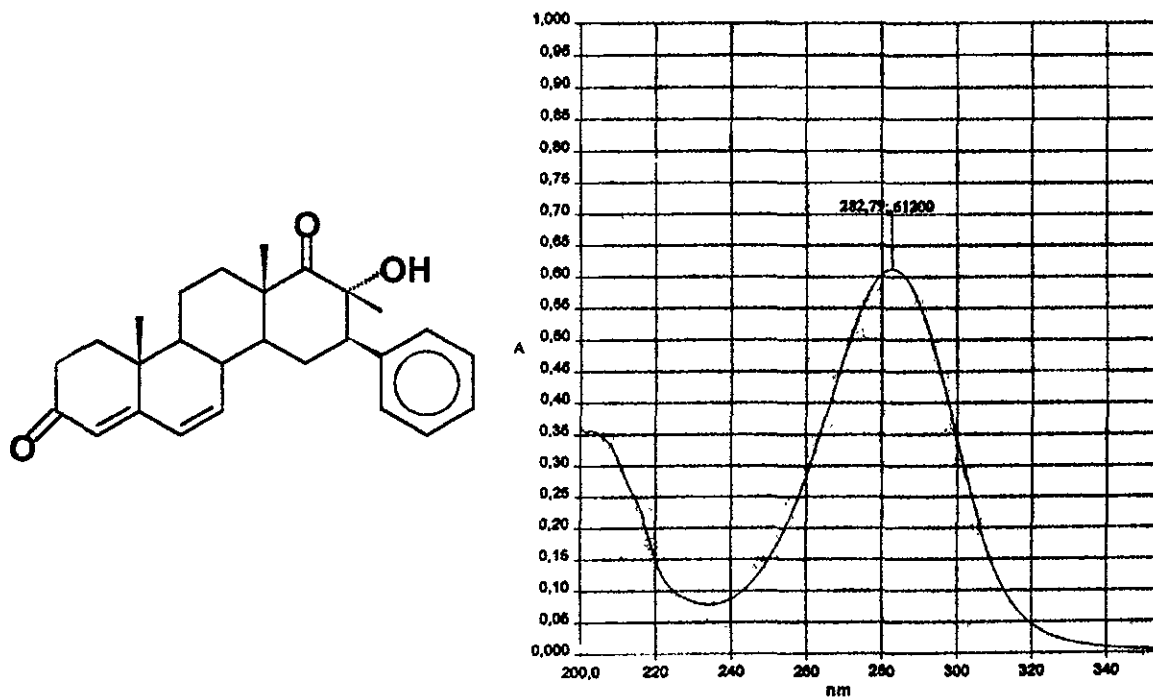


Figura 9.21. Espectro de UV del compuesto 16β -fenil- 17α -hidroxi- 17β -metil-D-homo-4,6-pregnadien- $3,17a$ -diona (VII)

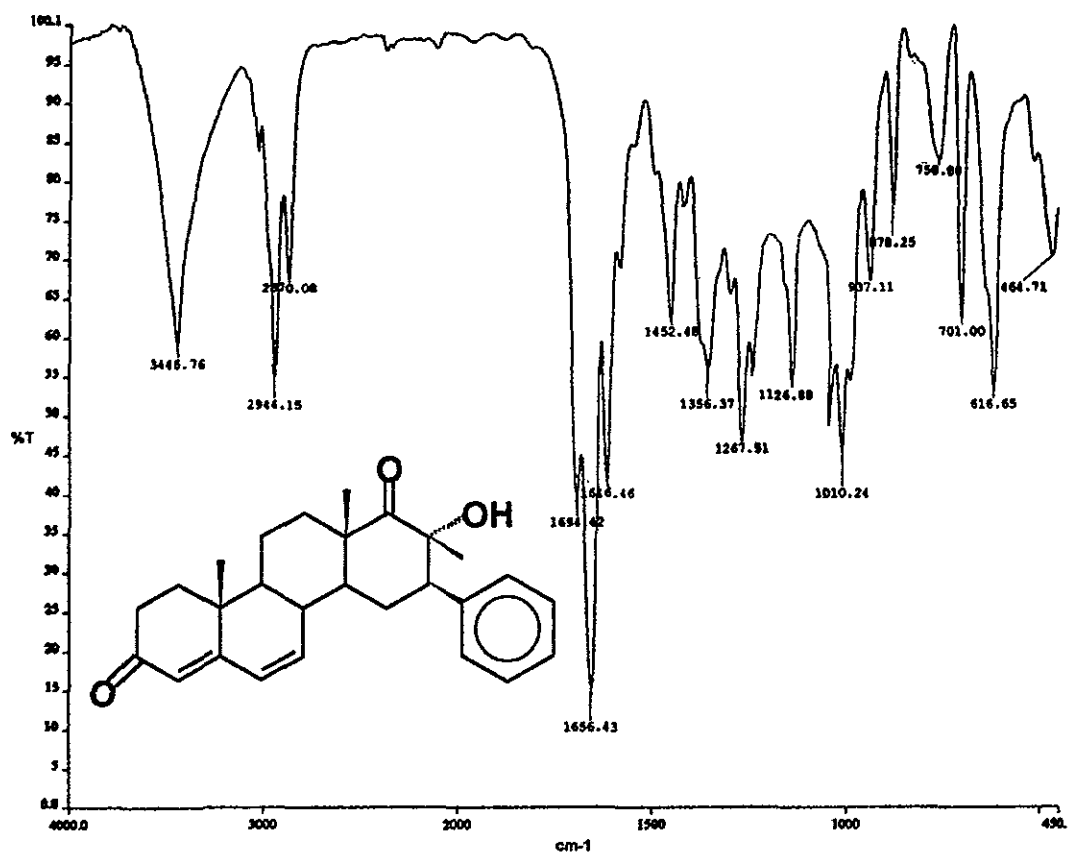


Figura 9.22. Espectro de IR del compuesto 16β-fenil-17α-hidroxi-17β-metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VII)

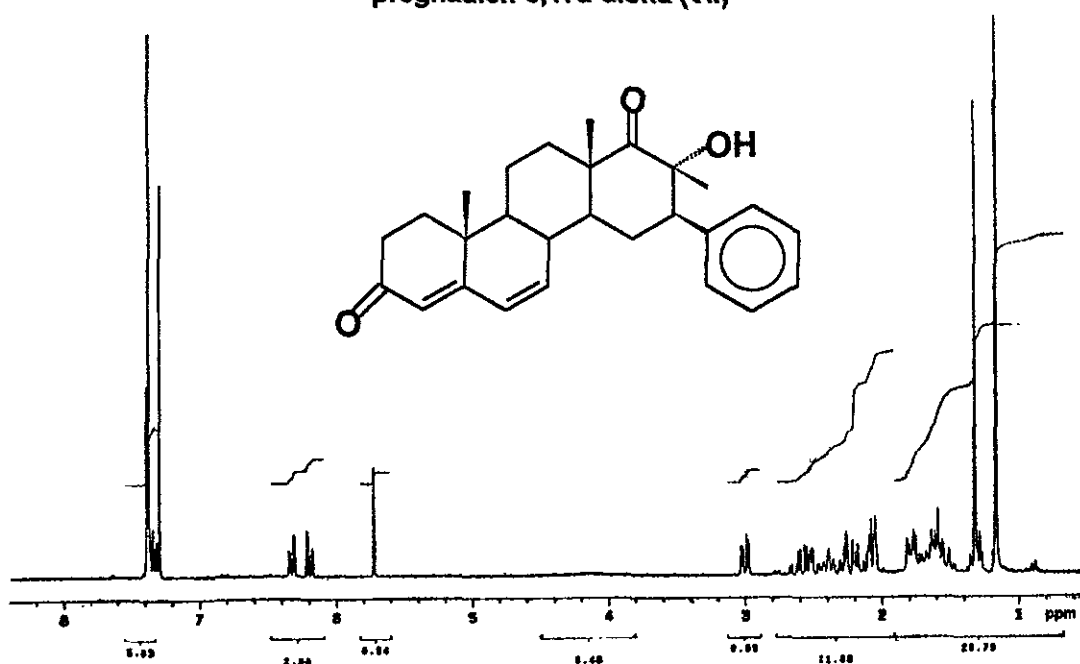


Figura 9.23. Espectro de RMN¹H del compuesto 16β-fenil-17α-hidroxi-17β-metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VII)

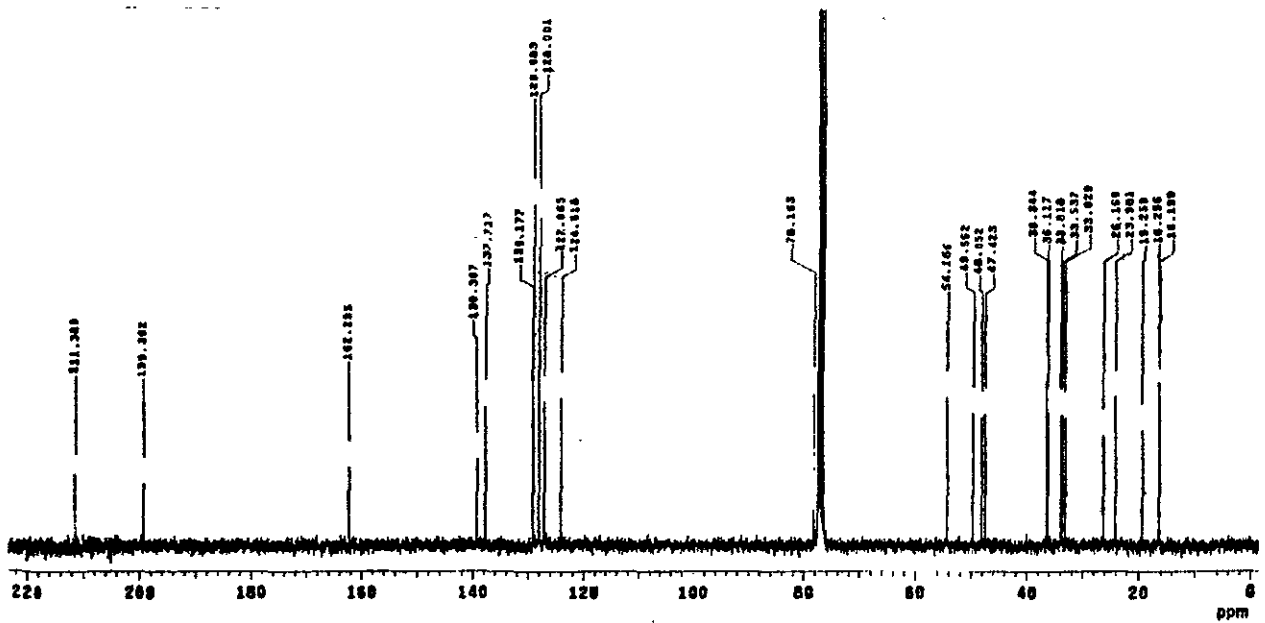


Figura 9.24. Espectro de RMN^{13}C del compuesto 16 β -fenil-17 α -hidroxi-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VII)

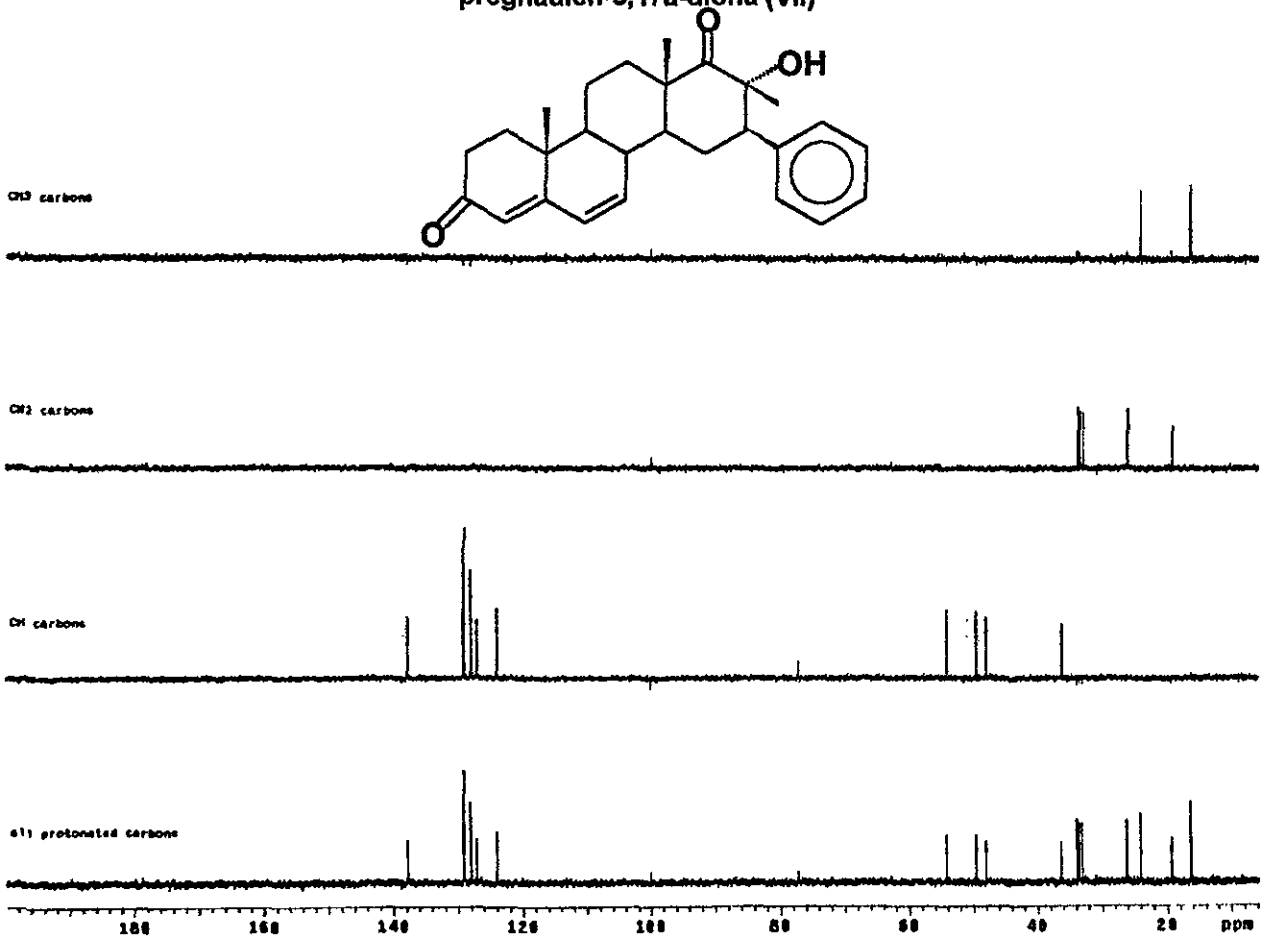


Figura 9.25. Espectro DEPT del compuesto 16 β -fenil-17 α -hidroxi-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VII)

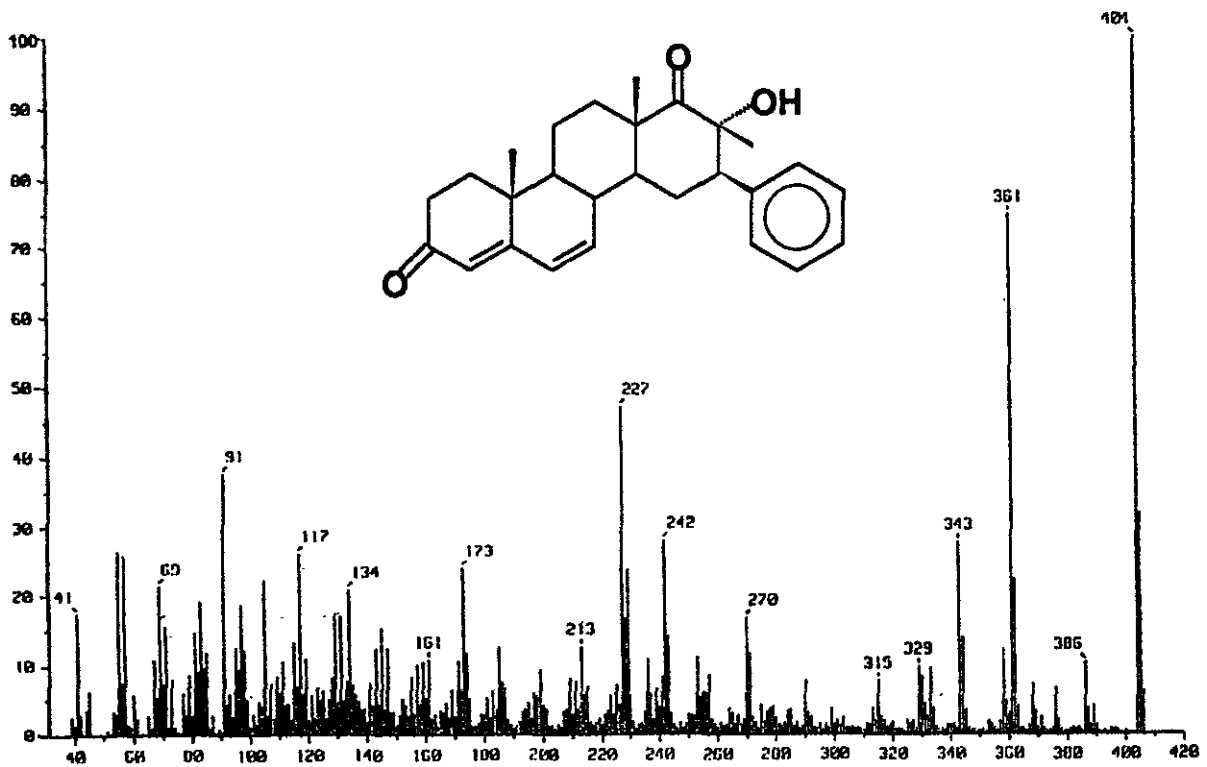


Figura 9.26. Espectro de EMIE del compuesto 16β-fenil-17α-hidroxi-17β-metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VII)

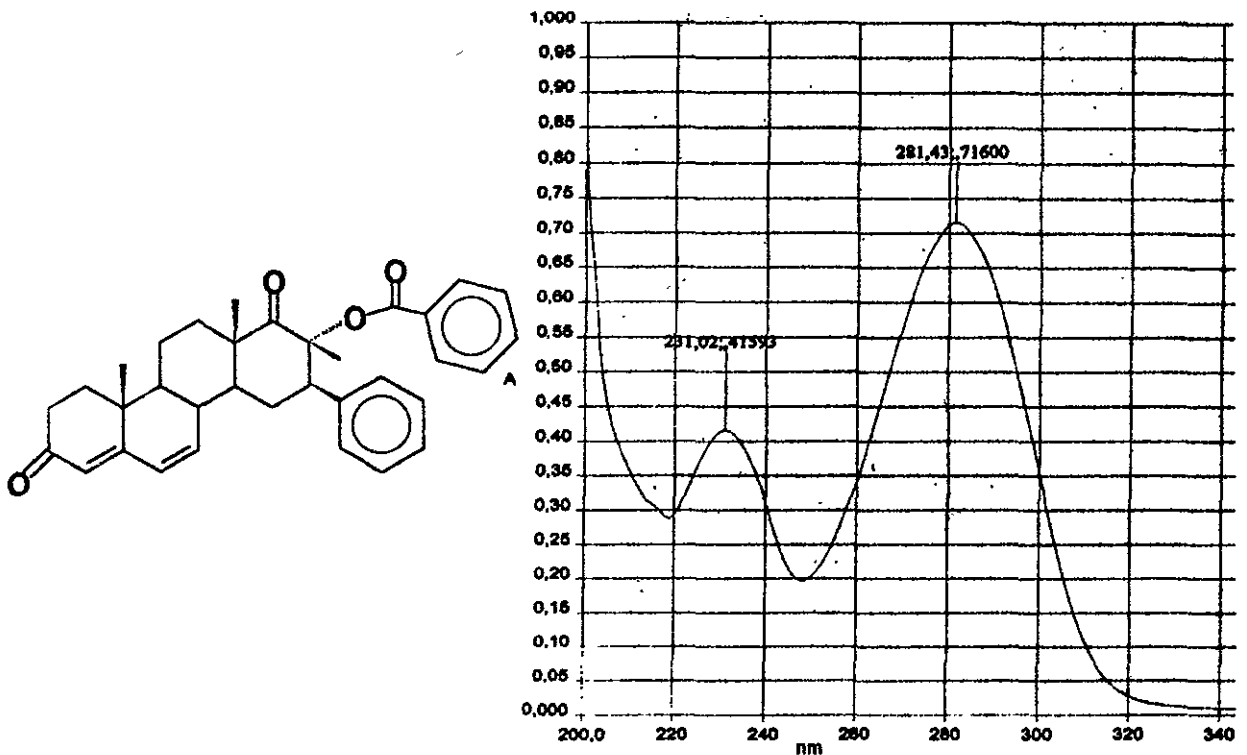


Figura 9.27. Espectro UV del compuesto 17α-Benzoloxi-16β-fenil-17β-metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VIII).

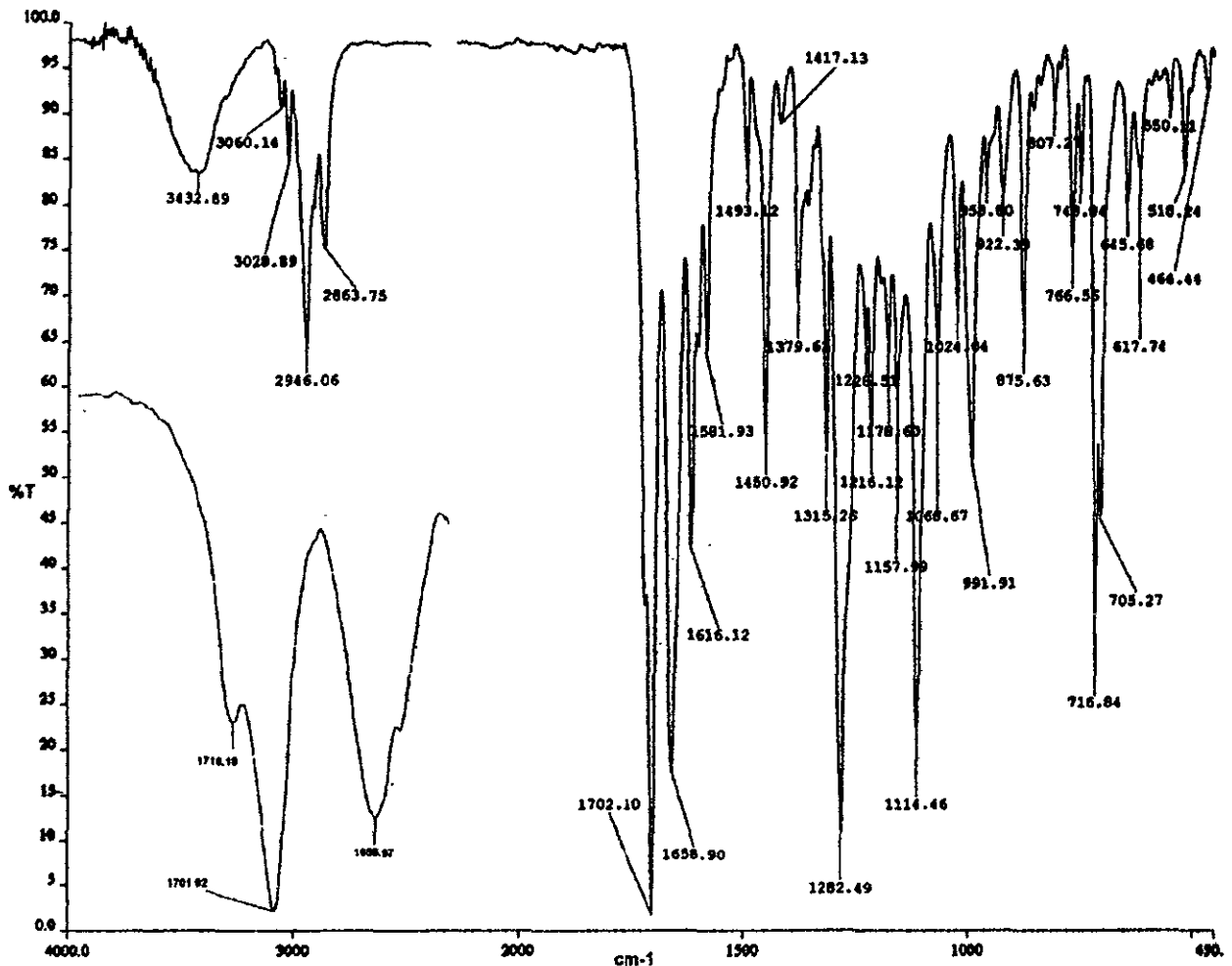


Figura 9.28. Espectro IR del compuesto 17α -Benzoiloxi- 16β -fenil- 17β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VIII).

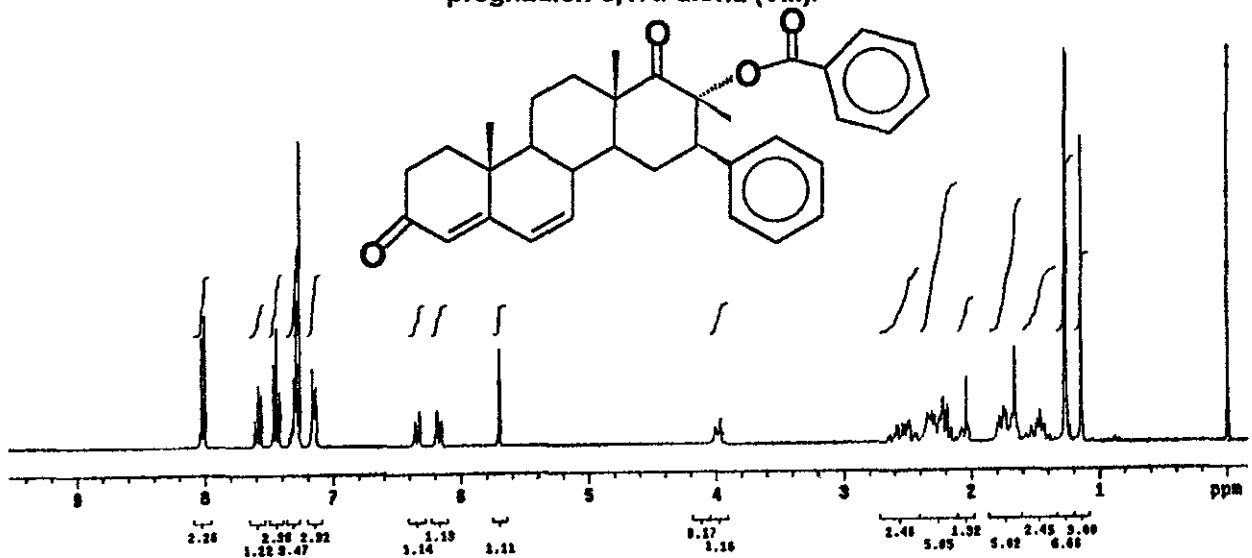


Figura 9.29. Espectro RMN¹H del compuesto 17α -Benzoiloxi- 16β -fenil- 17β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VIII).

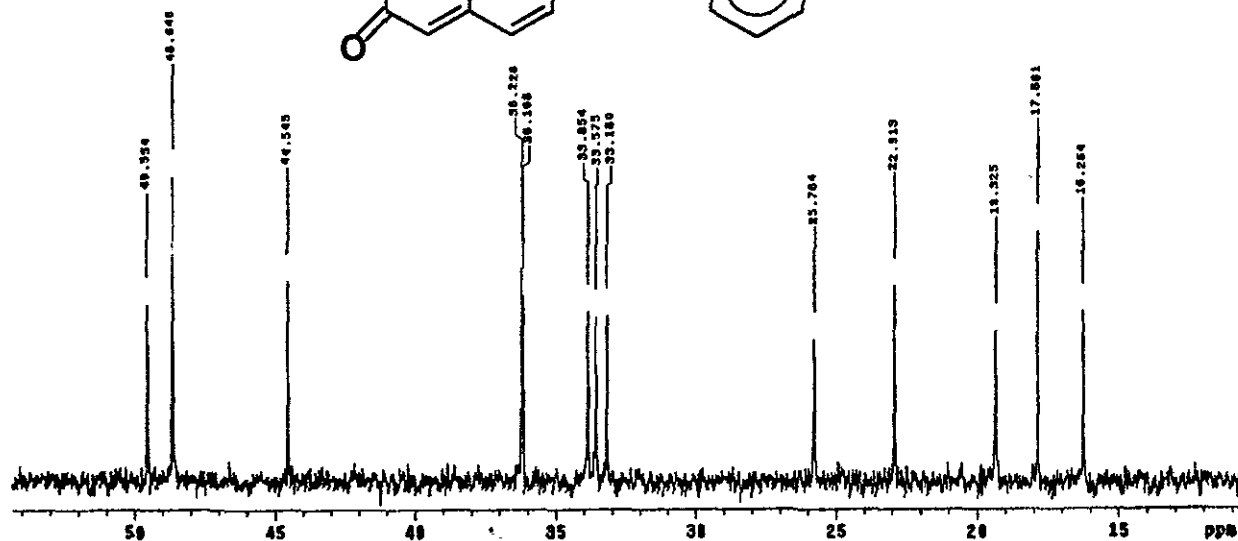
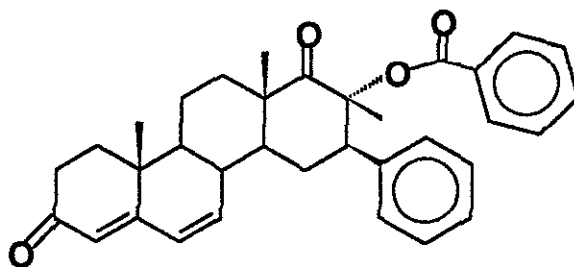
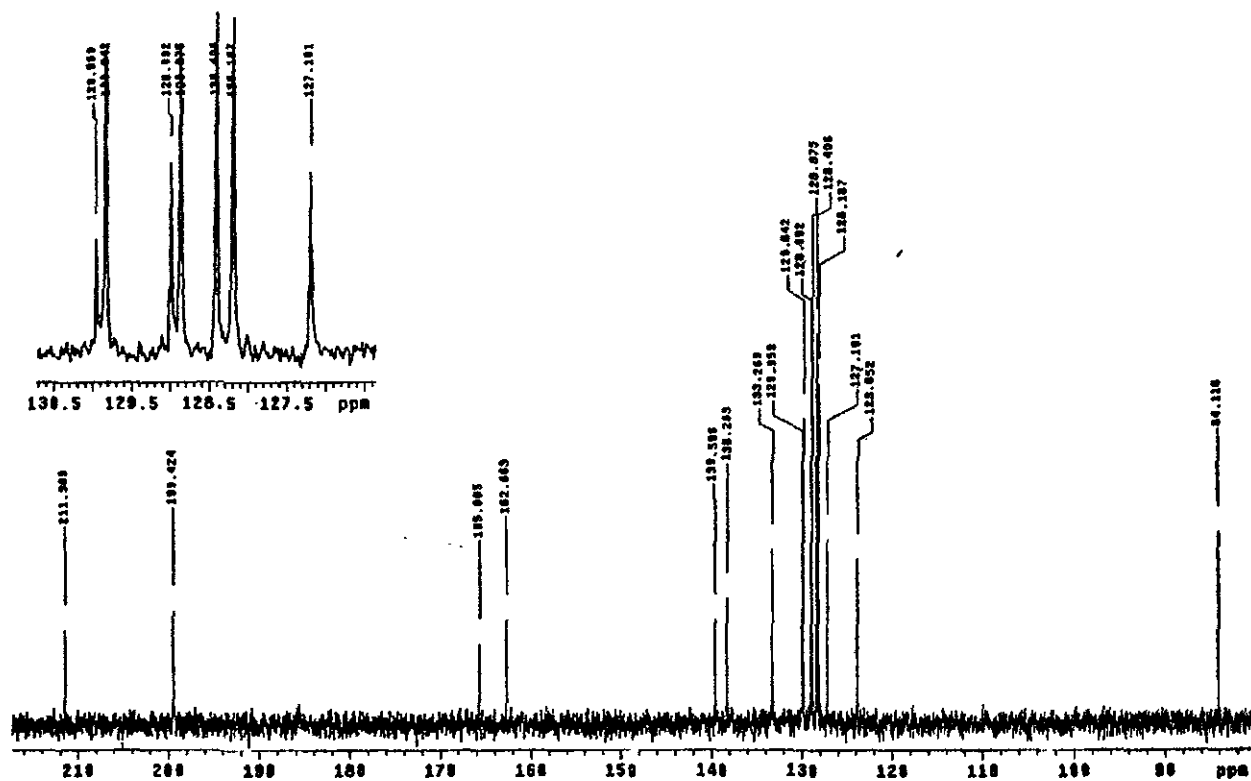


Figura 9.30. Espectro RMN¹³C del compuesto 17 α -Benzoiloxi-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VIII).

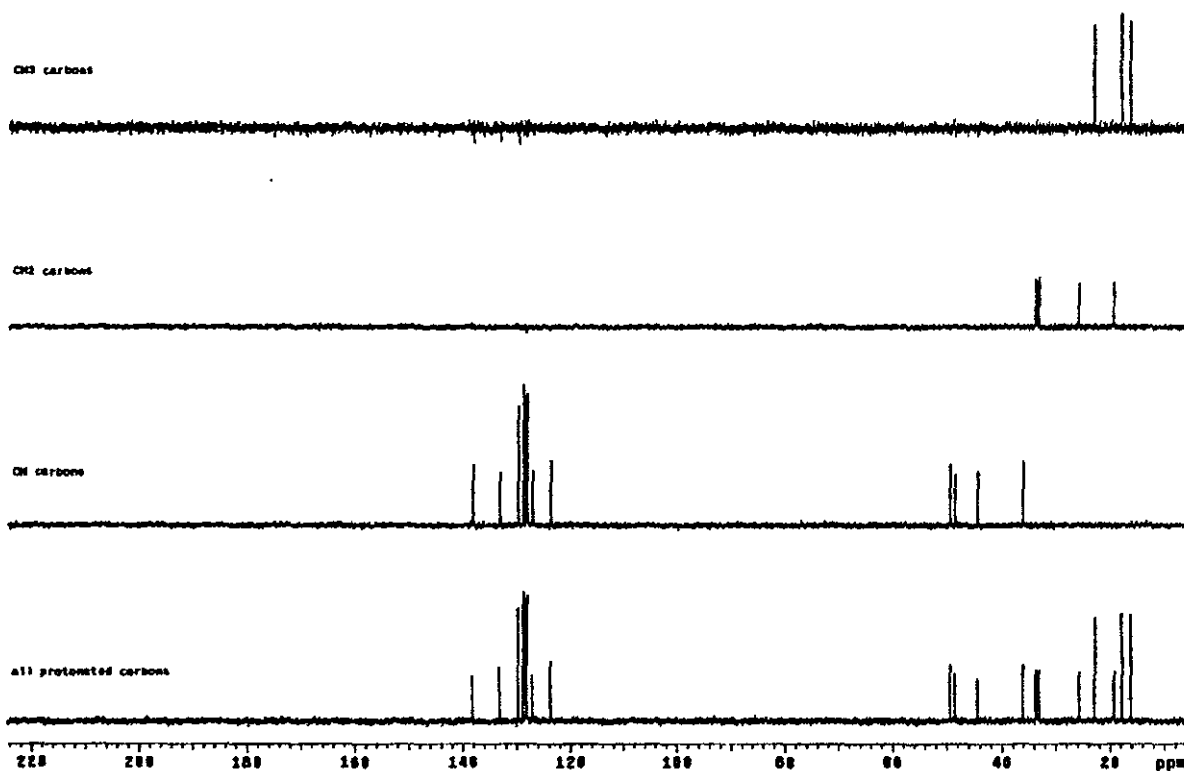


Figura 9.31. Espectro DEPT del compuesto 17α -Benzoiloxi- 16β -fenil- 17β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VIII).

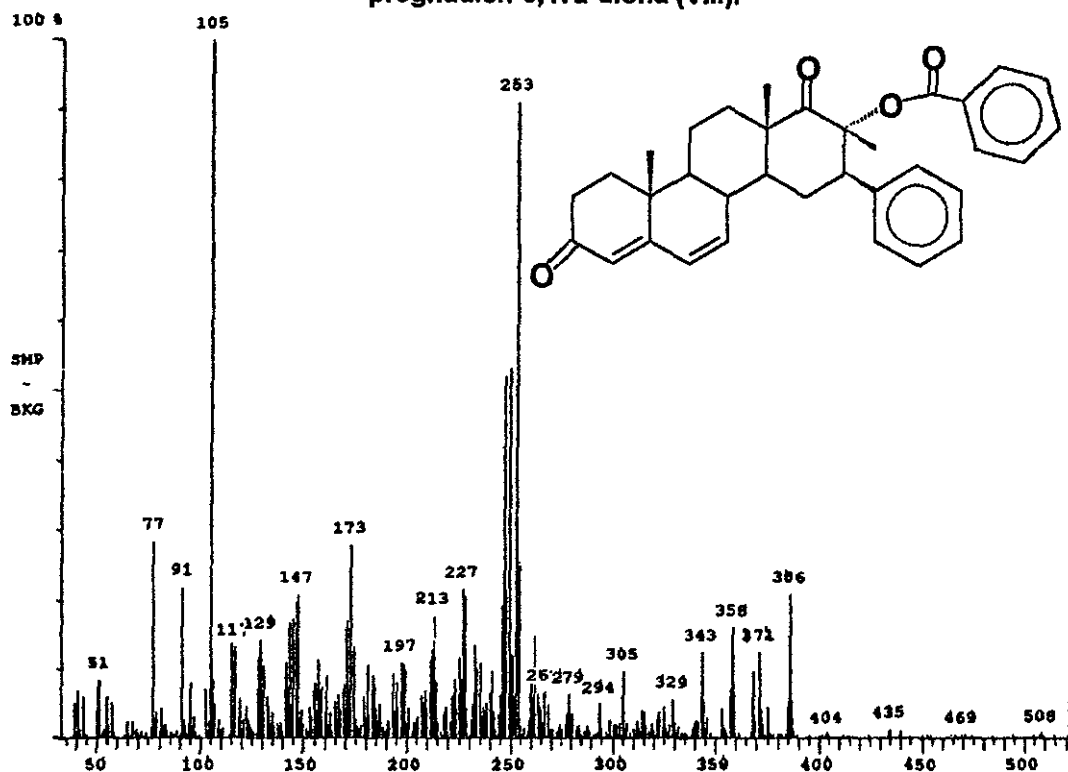


Figura 9.32. Espectro de EMIE del compuesto 17α -Benzoiloxi- 16β -fenil- 17β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VIII).

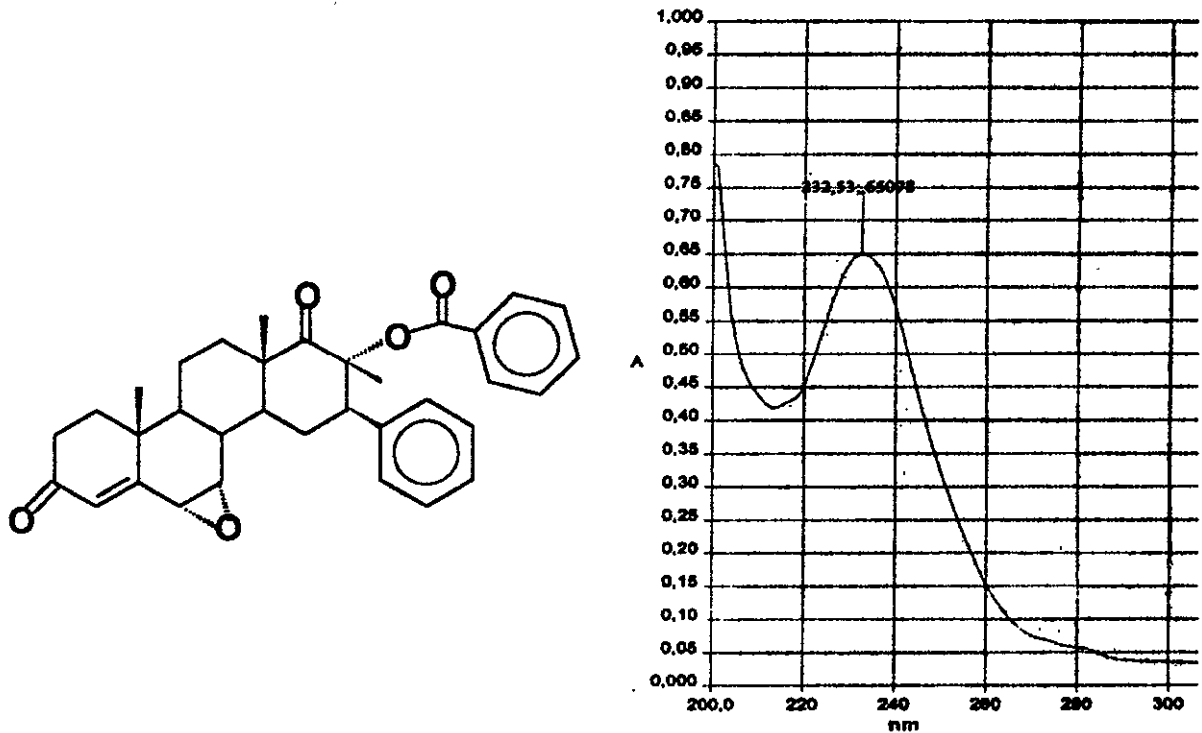


Figura 9.33. Espectro de UV del compuesto 17 α -Benzoiloxi-6 α ,7 α -epoxi-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4-pregnen-3,17a-diona (IX).

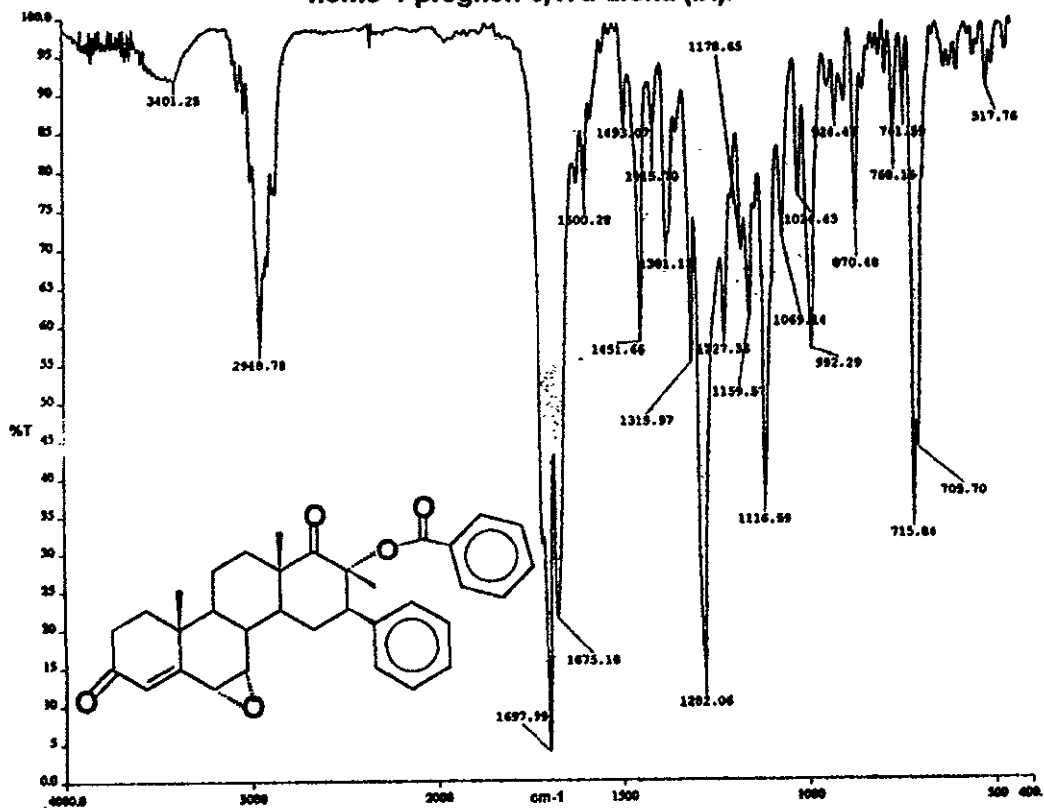


Figura 9.34. Espectro de IR del compuesto 17 α -Benzoiloxi-6 α ,7 α -epoxi-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4-pregnen-3,17a-diona (IX).

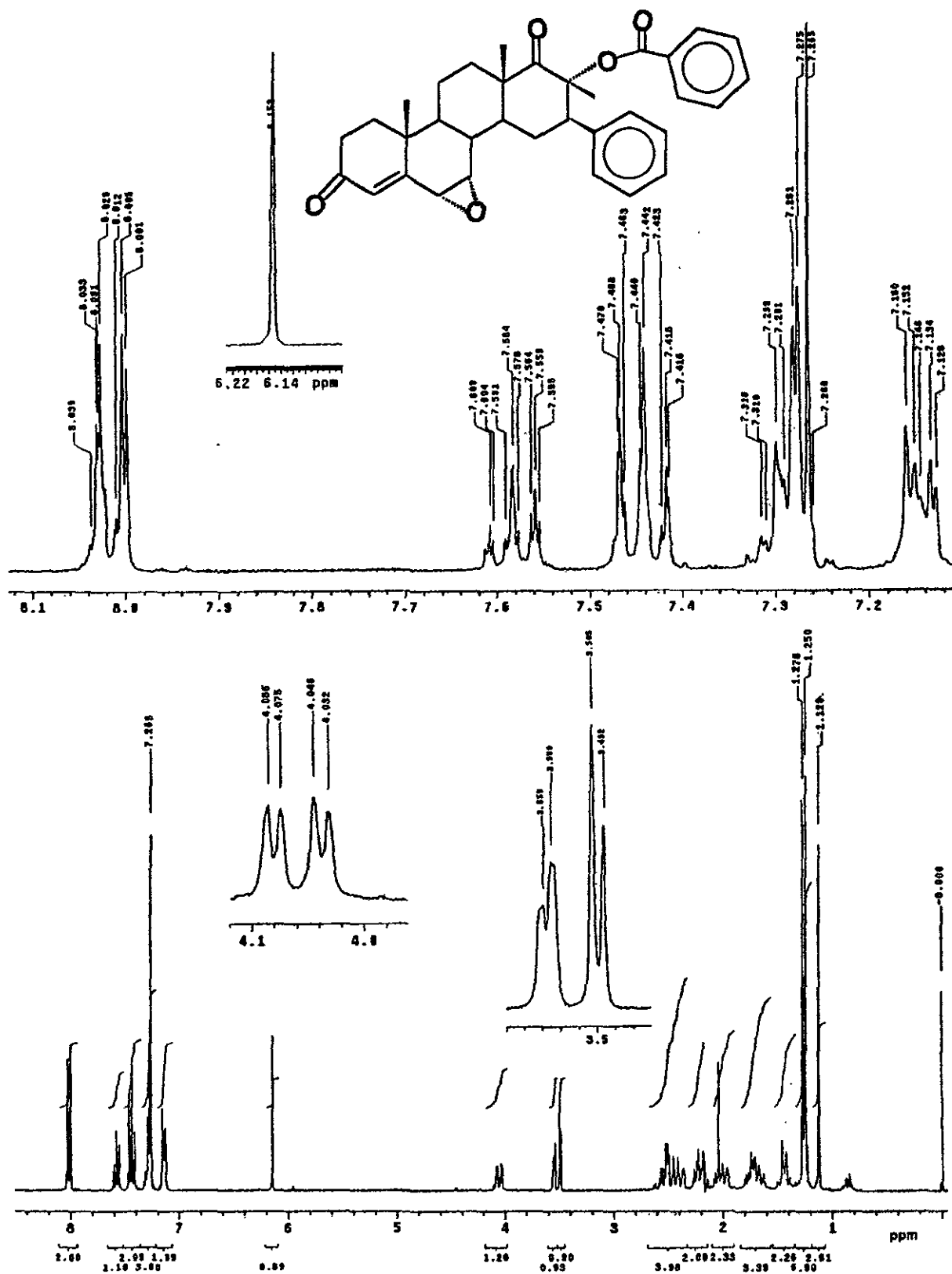


Figura 9.35. Espectro de RMN¹H del compuesto 17 α -Benzoyloxi-6 α ,7 α -epoxi-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4-pregnen-3,17a-diona (IX).

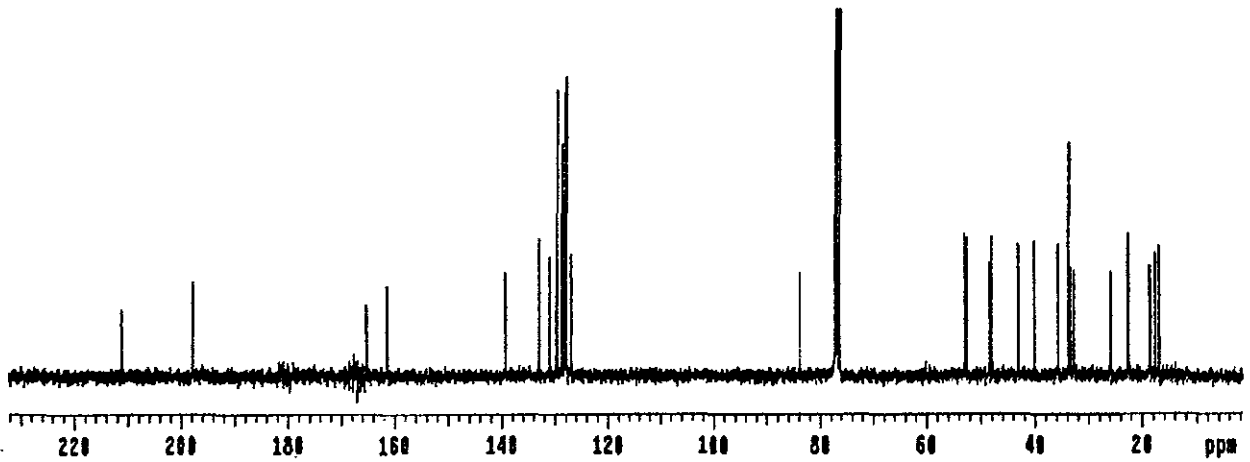


Figura 9.36. Espectro de RMN¹³C del compuesto 17 α -Benzoiloxi-6 α ,7 α -epoxi-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4-pregnen-3,17a-diona (IX).

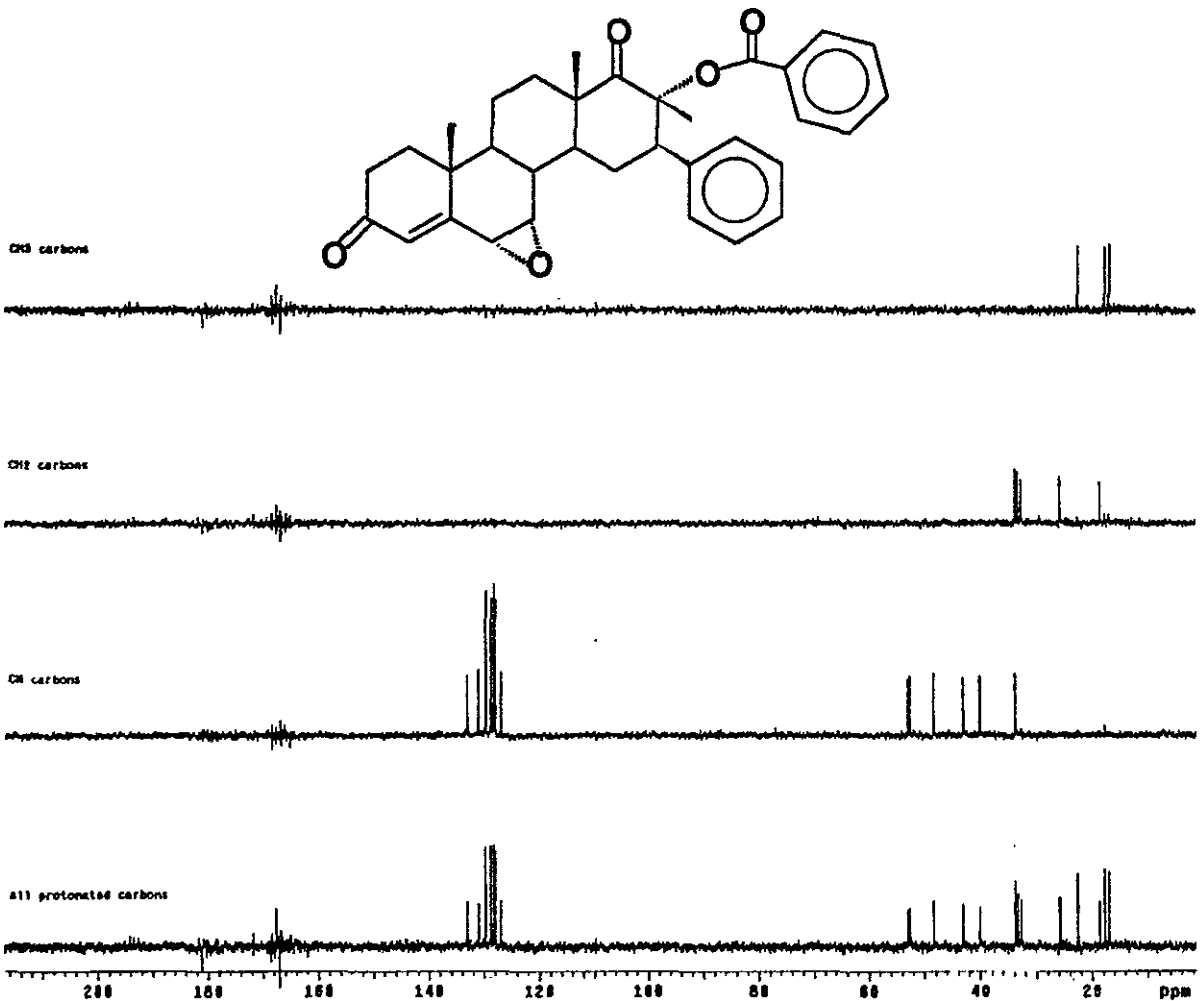


Figura 9.37. Espectro DEPT del compuesto 17 α -Benzoiloxi-6 α ,7 α -epoxi-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4-pregnen-3,17a-diona (IX).

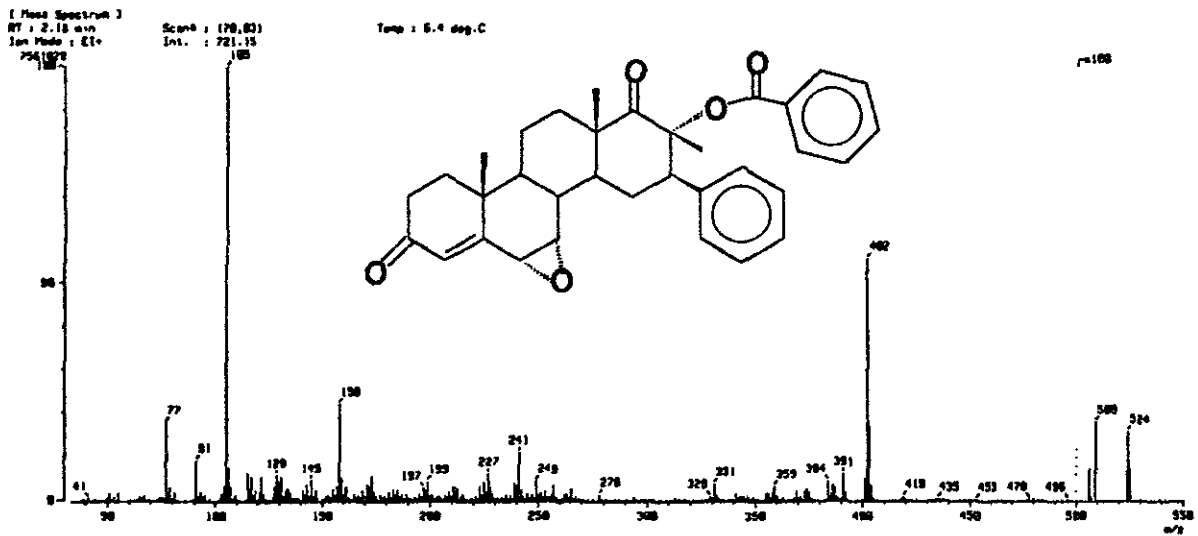


Figura 9.38. Espectro de EMIE del compuesto 17 α -Benzoiloxi-6 α ,7 α -epoxi-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4-pregnen-3,17a-diona (IX).

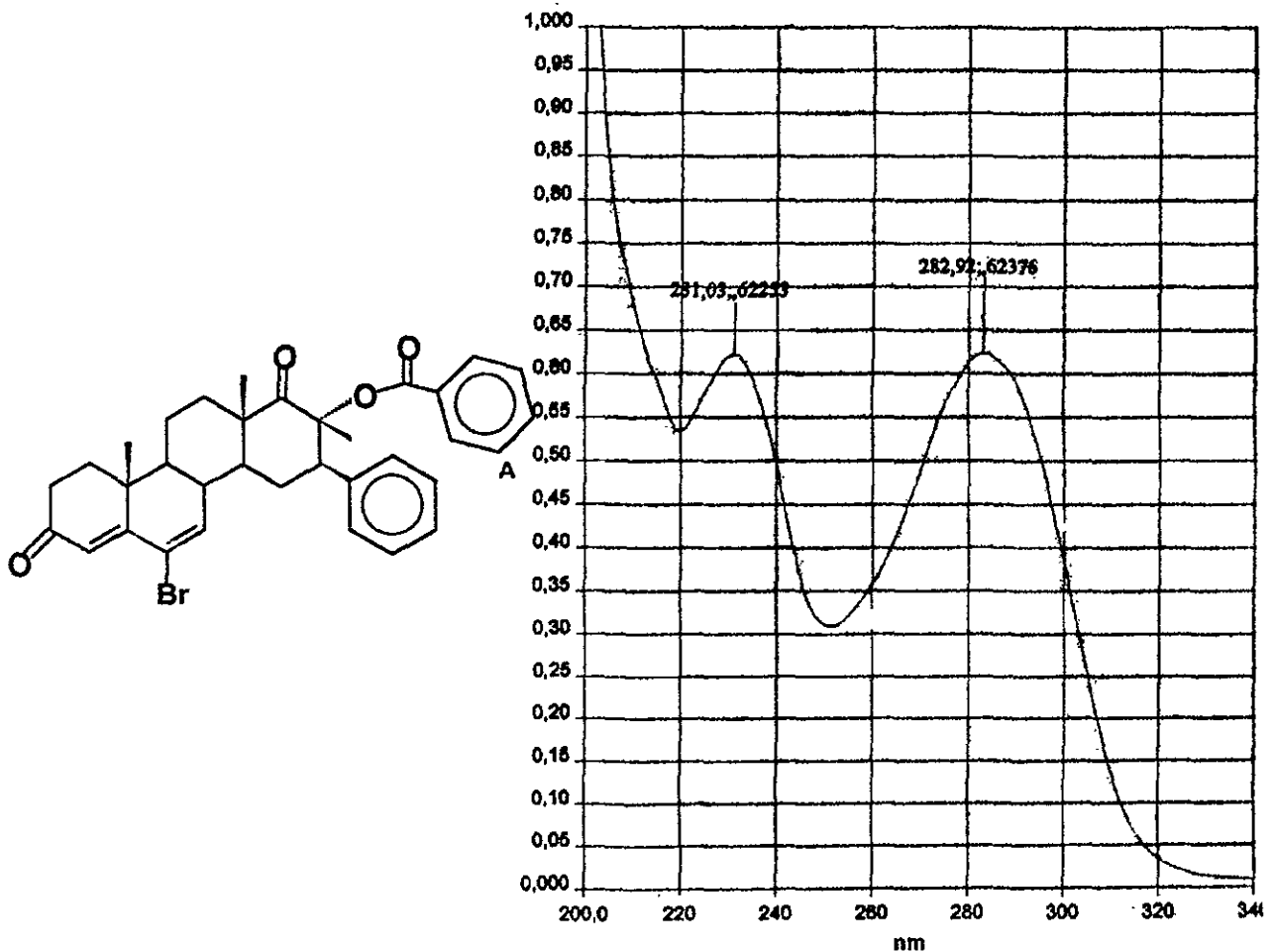


Figura 9.39. Espectro de UV del compuesto 17 α -Benzoiloxi-6-bromo-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona Xa

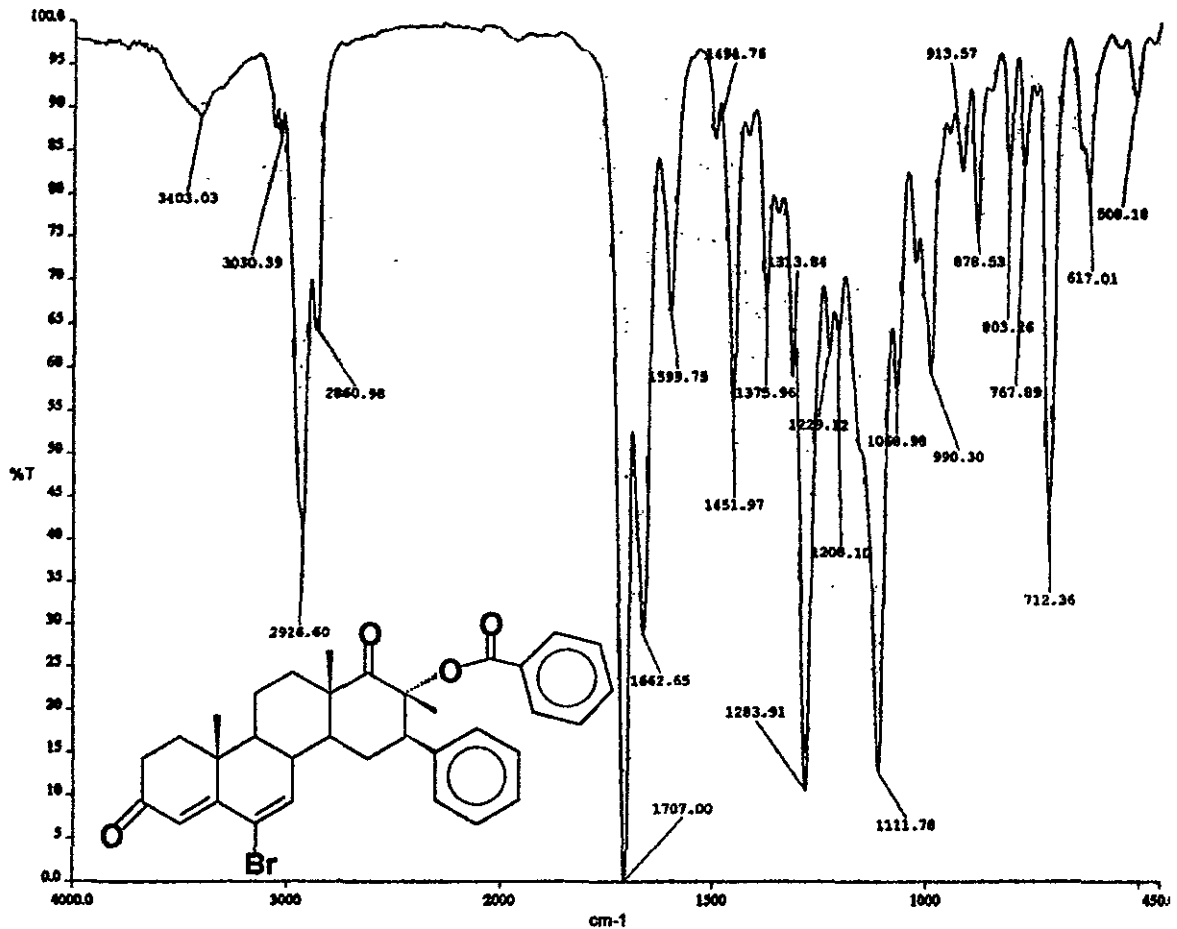


Figura 9.40. Espectro de IR del compuesto 17α -Benzoloxi-6-bromo- 16β -fenil- 17β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona Xa.

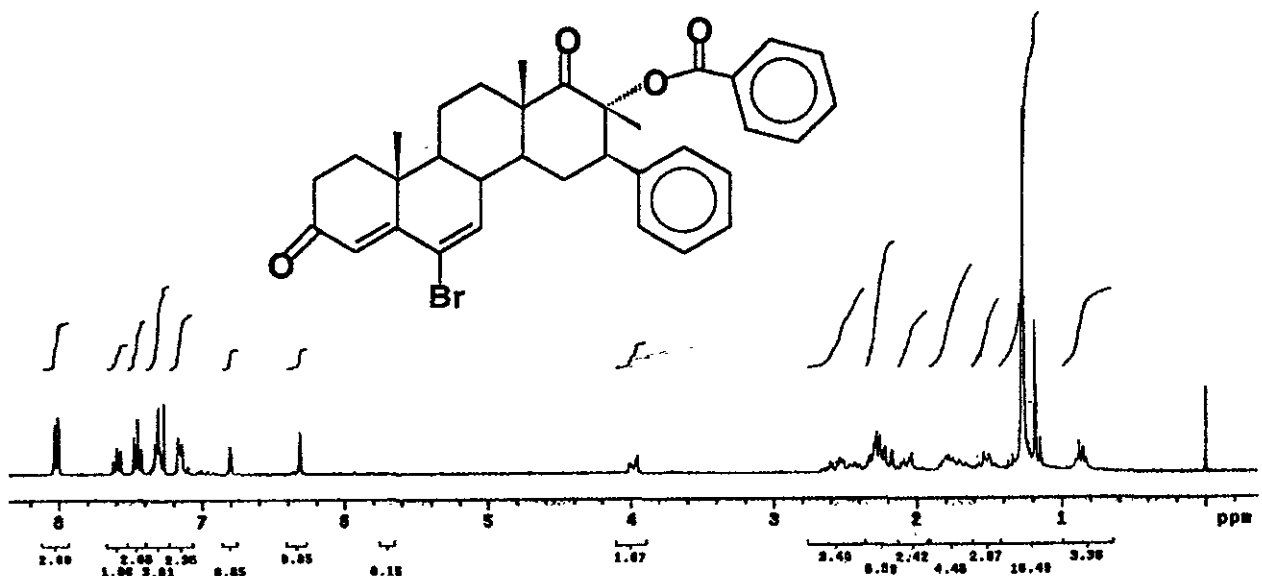


Figura 9.41. Espectro de RMN¹H del compuesto 17α -Benzoloxi-6-bromo- 16β -fenil- 17β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona Xa.

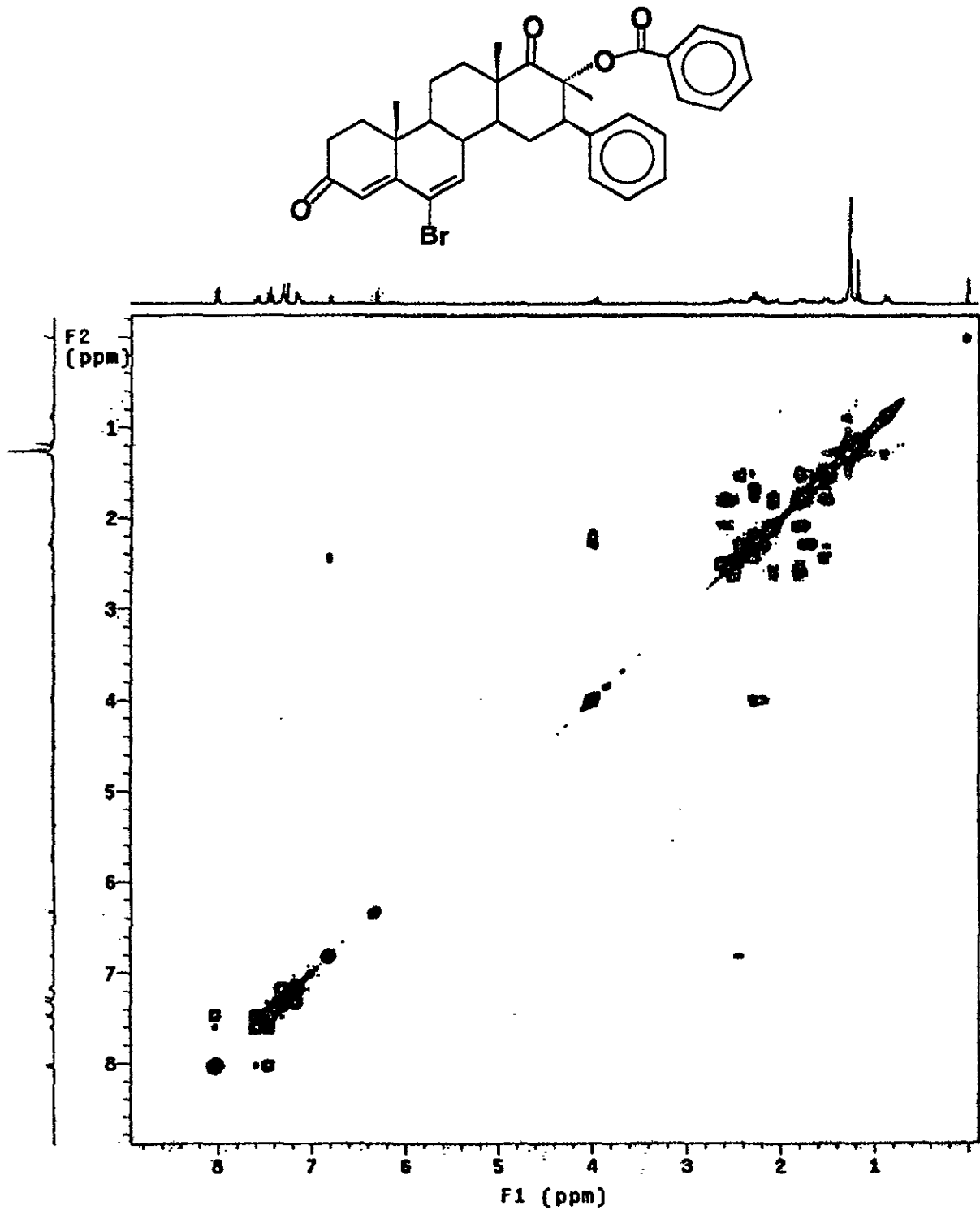


Figura 9.42. Espectro de COSY H-H del compuesto 17 α -Benzoiloxi-6-bromo-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona Xa.

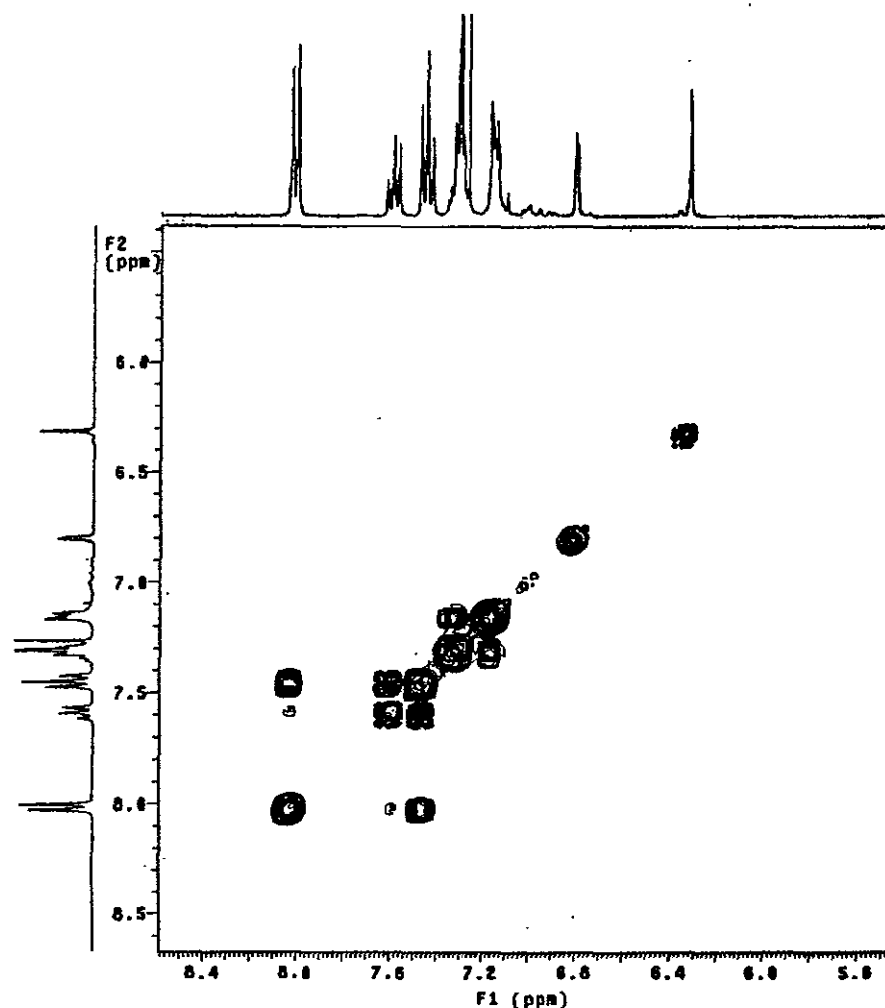


Figura 9.43. Espectro de COSY H-H (ZONA AROMÁTICA) del compuesto 17α -Benzoiloxi-6-bromo- 16β -fenil- 17β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona Xa.

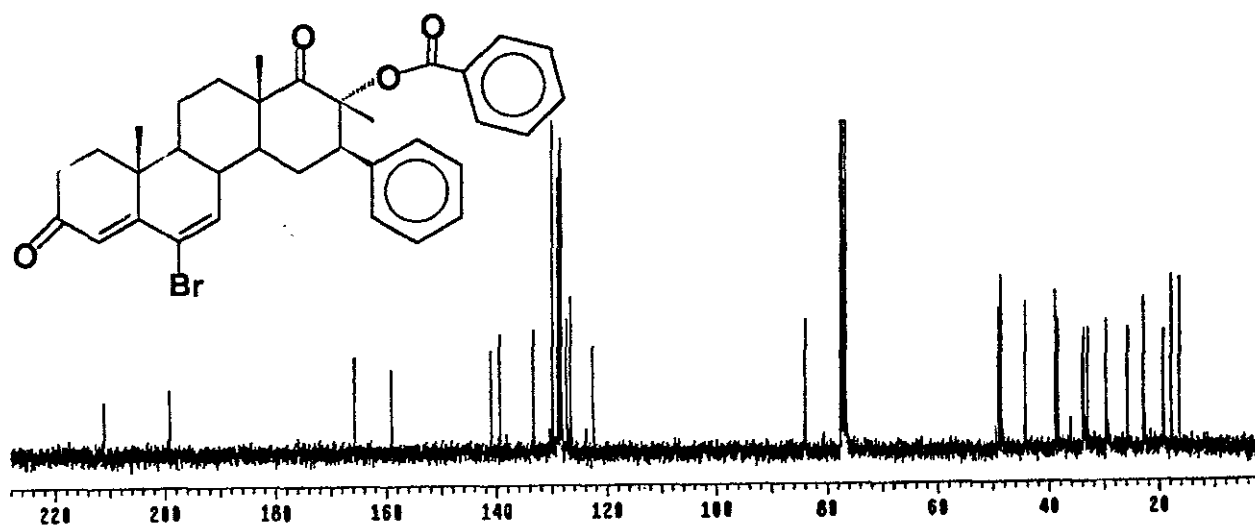


Figura 9.44. Espectro de RMN¹³C del compuesto 17α -Benzoiloxi-6-bromo- 16β -fenil- 17β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona Xa.

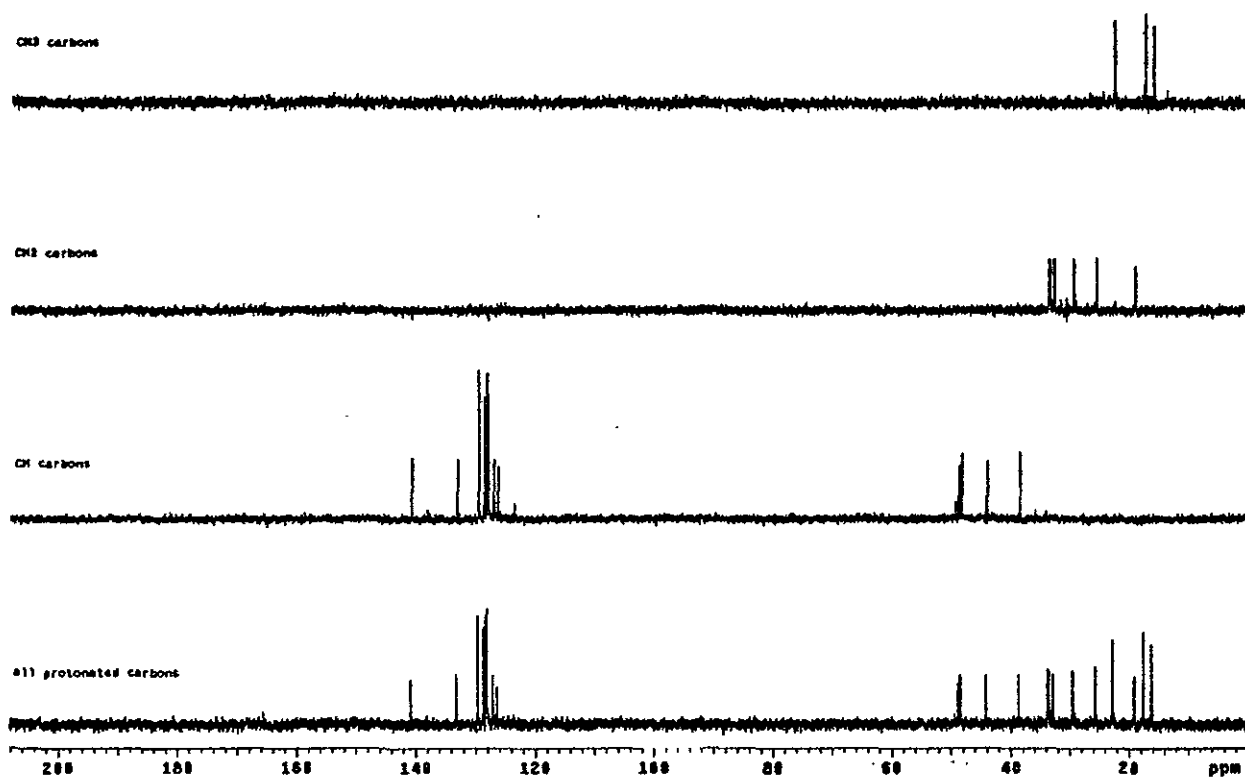


Figura 9.45. Espectro DEPT del compuesto 17α -Benzoiloxi-6-bromo- 16β -fenil- 17β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona Xa.

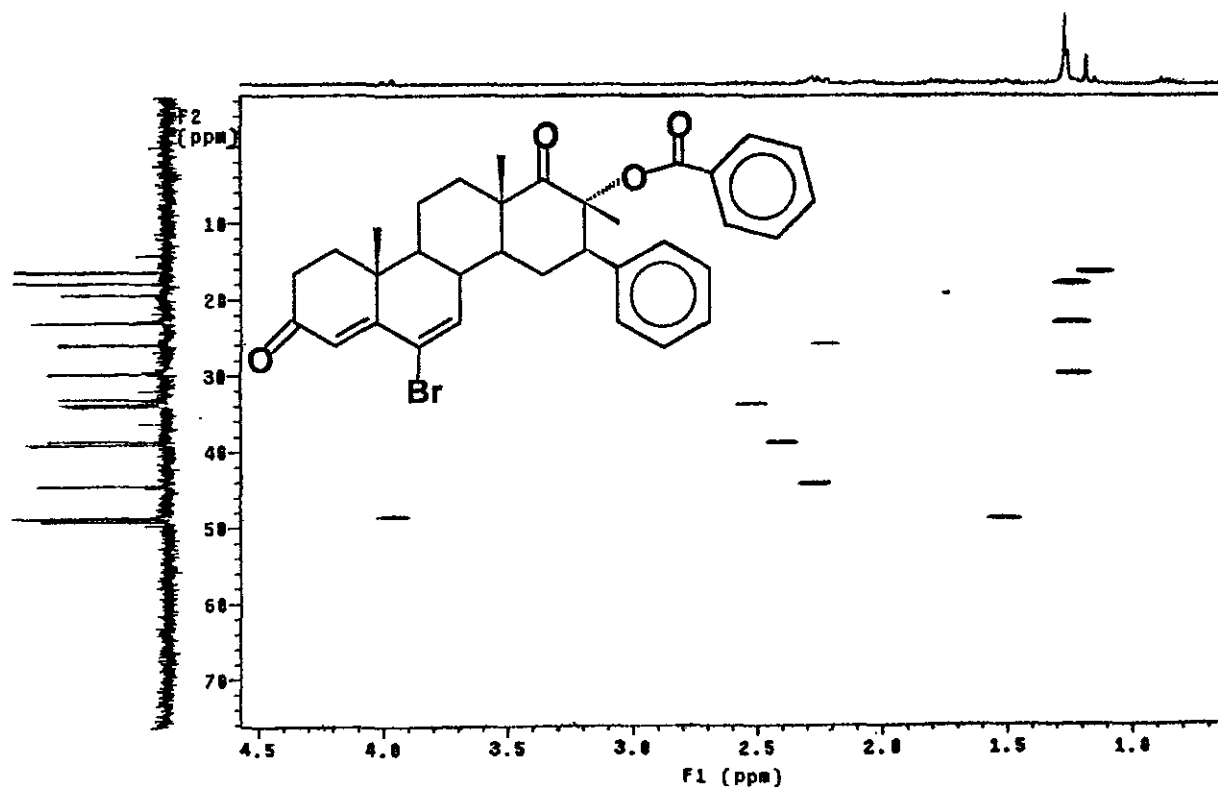


Figura 9.46. Espectro HETCOR del compuesto 17α -Benzoiloxi-6-bromo- 16β -fenil- 17β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona Xa.

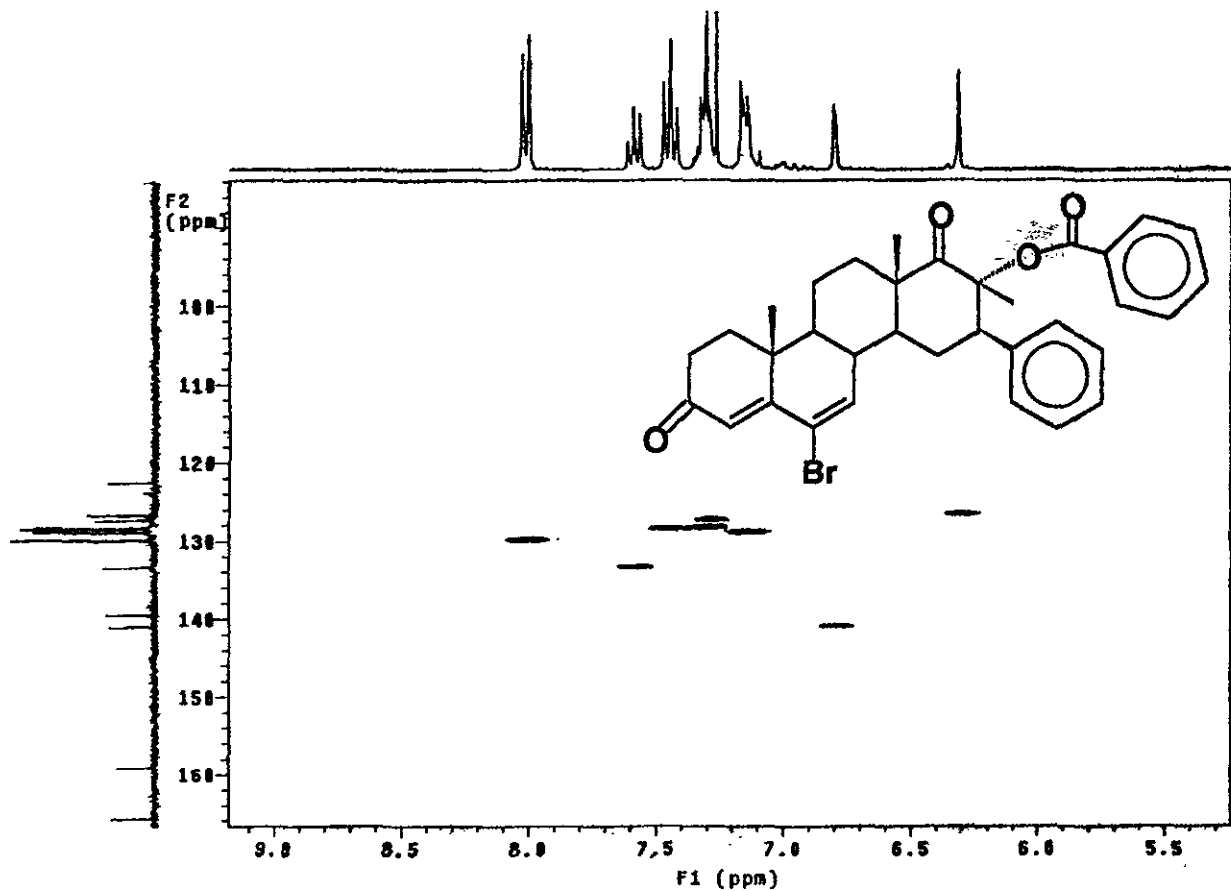


Figura 9.47. Espectro HETCOR (ZONA AROMÁTICA) del compuesto 17α -Benzoiloxi-6-bromo- 16β -fenil- 17β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona Xa.

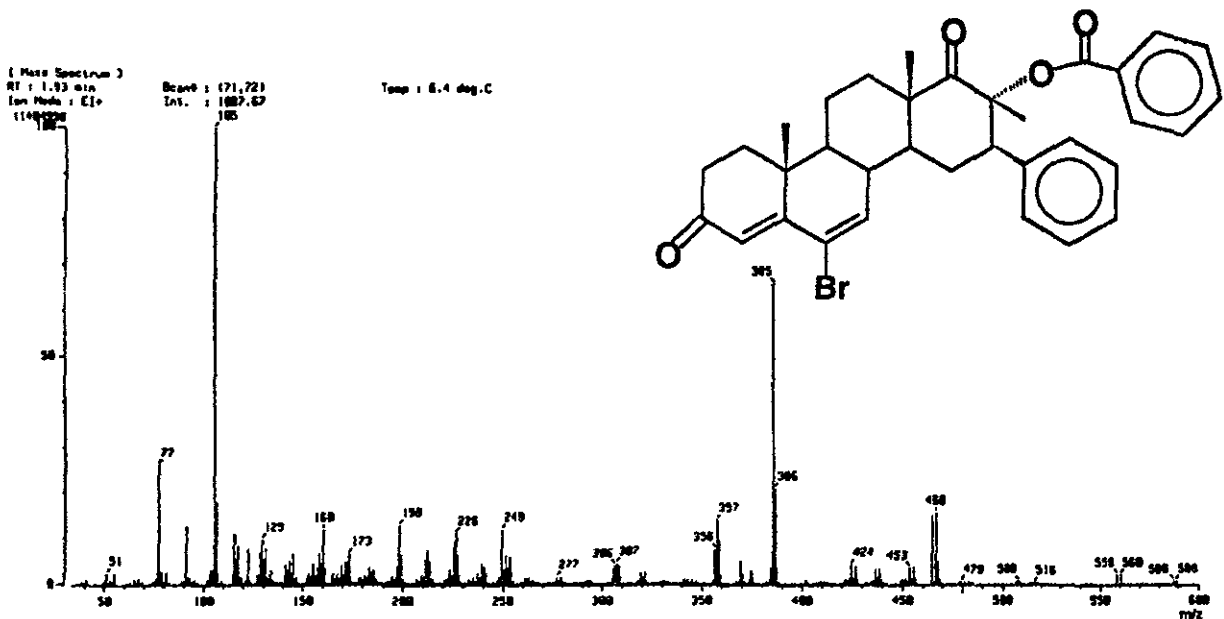


Figura 9.48. Espectro de EMIE del compuesto 17α -Benzoiloxi-6-bromo- 16β -fenil- 17β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona Xa.

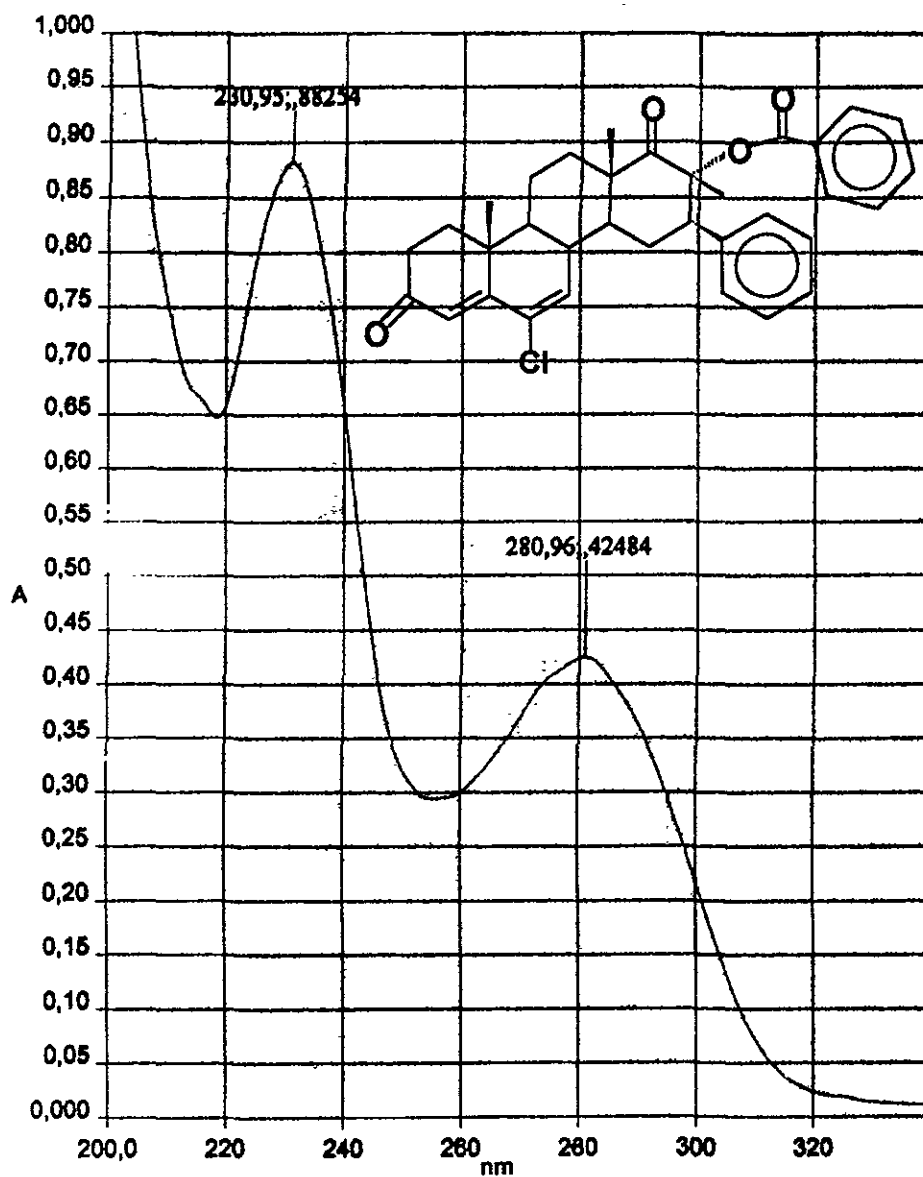


Figura 9.49. Espectro de UV del compuesto 17 α -Benzoloxi-6-cloro-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (Xb).

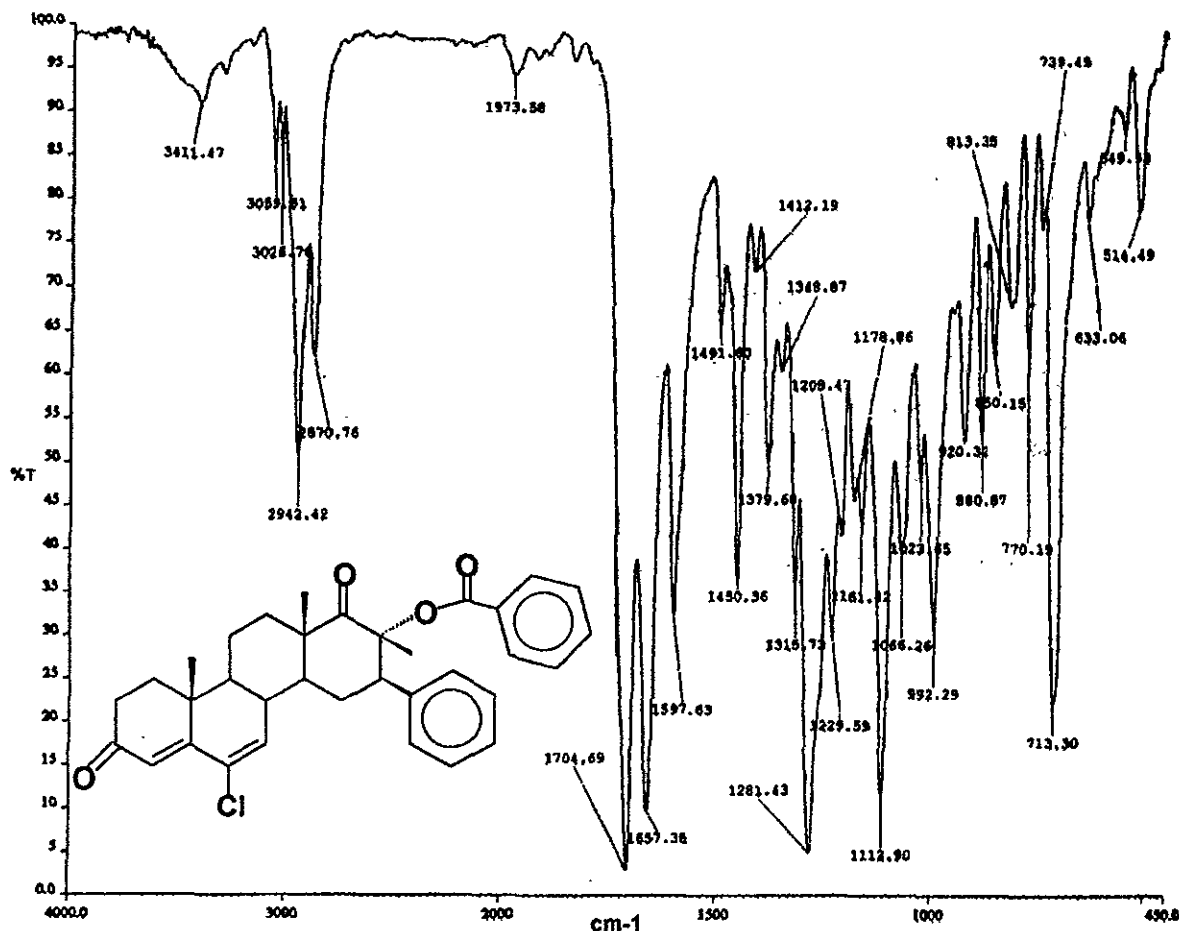


Figura 9.50. Espectro de IR del compuesto 17α -Benzoiloxi-6-cloro- 16β -fenil- 17β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (Xb).

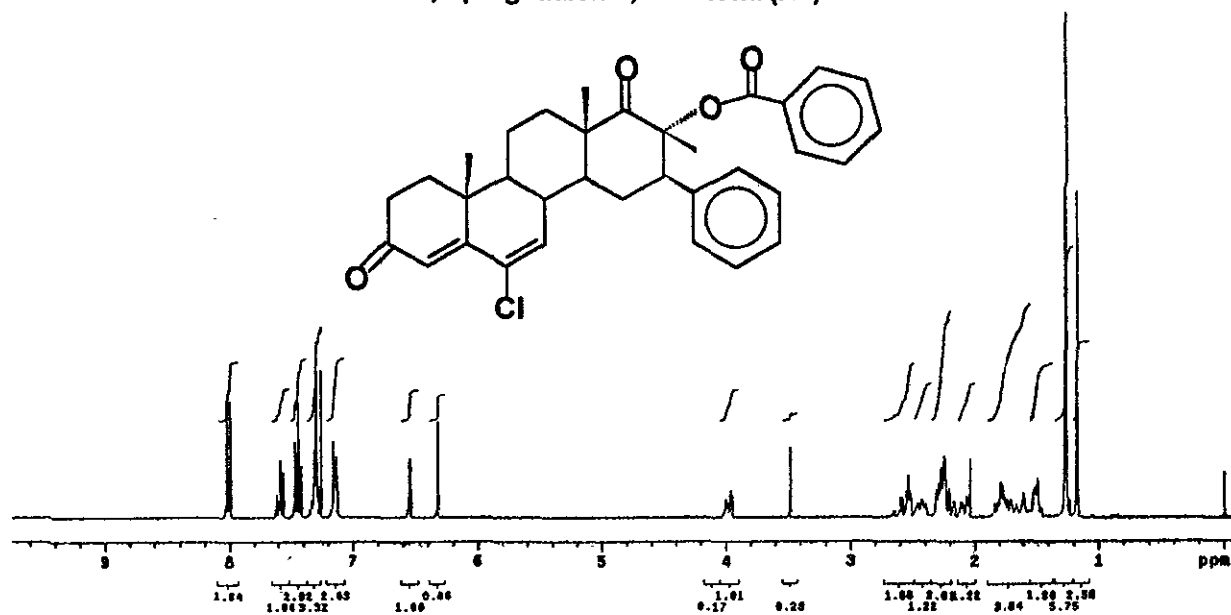


Figura 9.51. Espectro de IR del compuesto 17α -Benzoiloxi-6-cloro- 16β -fenil- 17β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (Xb).

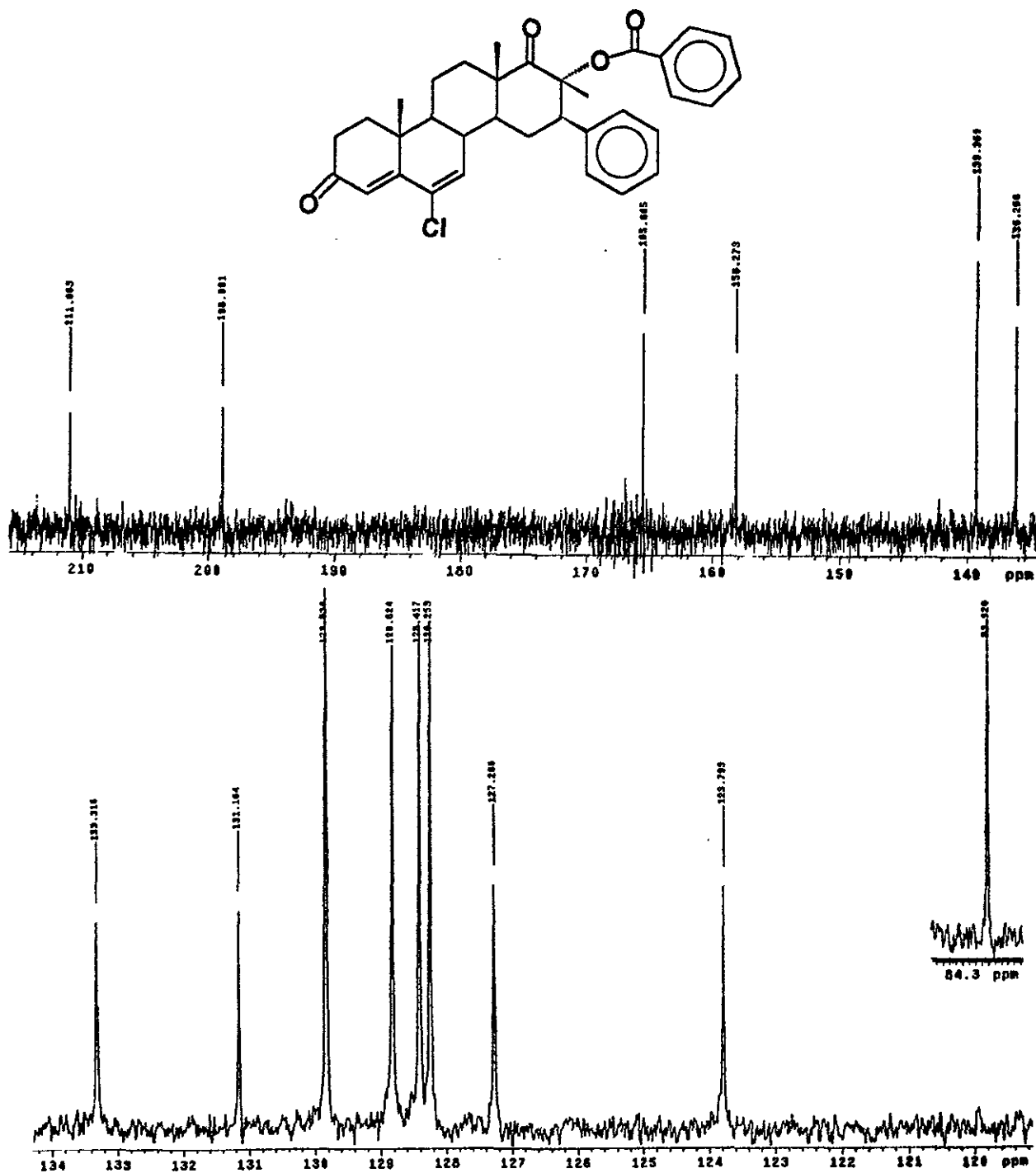


Figura 9.52. Espectro de RMN¹³C del compuesto 17 α -Benzoiloxi-6-cloro-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (Xb).

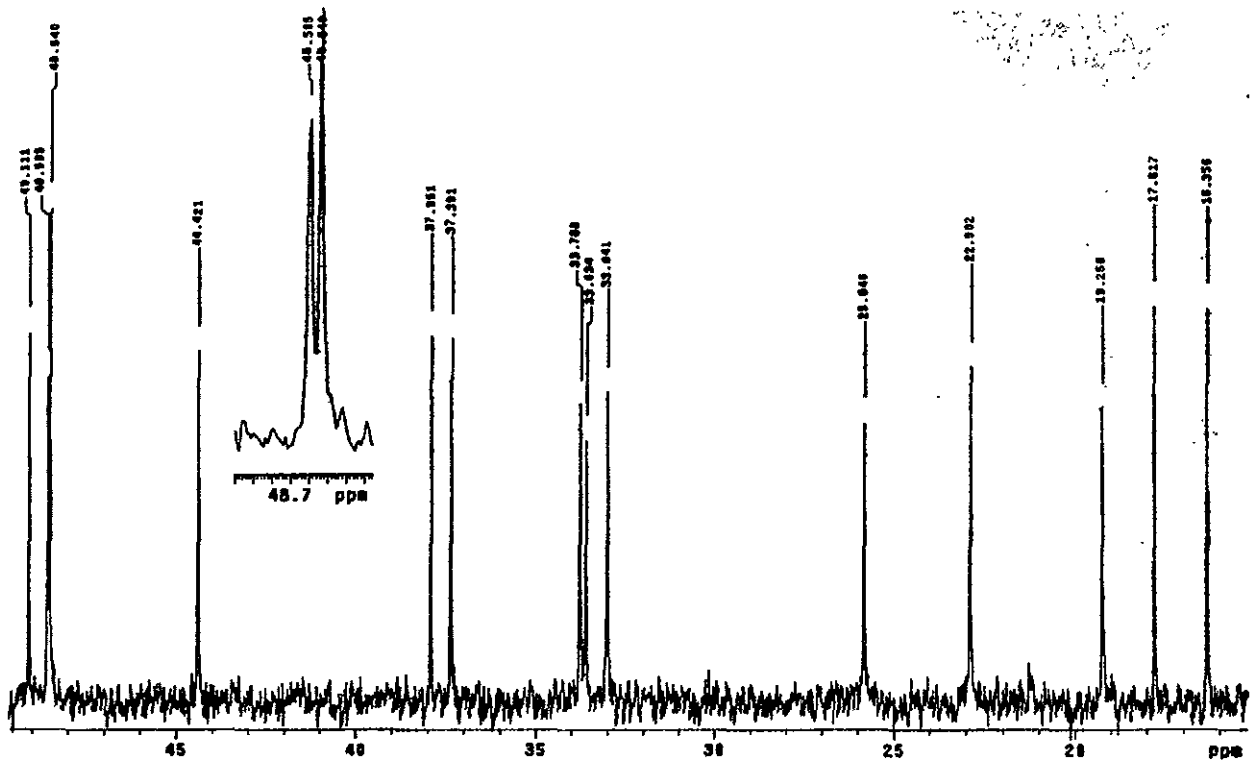


Figura 9.52. (continuación) Espectro de RMN¹³C del compuesto 17 α -Benzoiloxi-6-cloro-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (Xb).

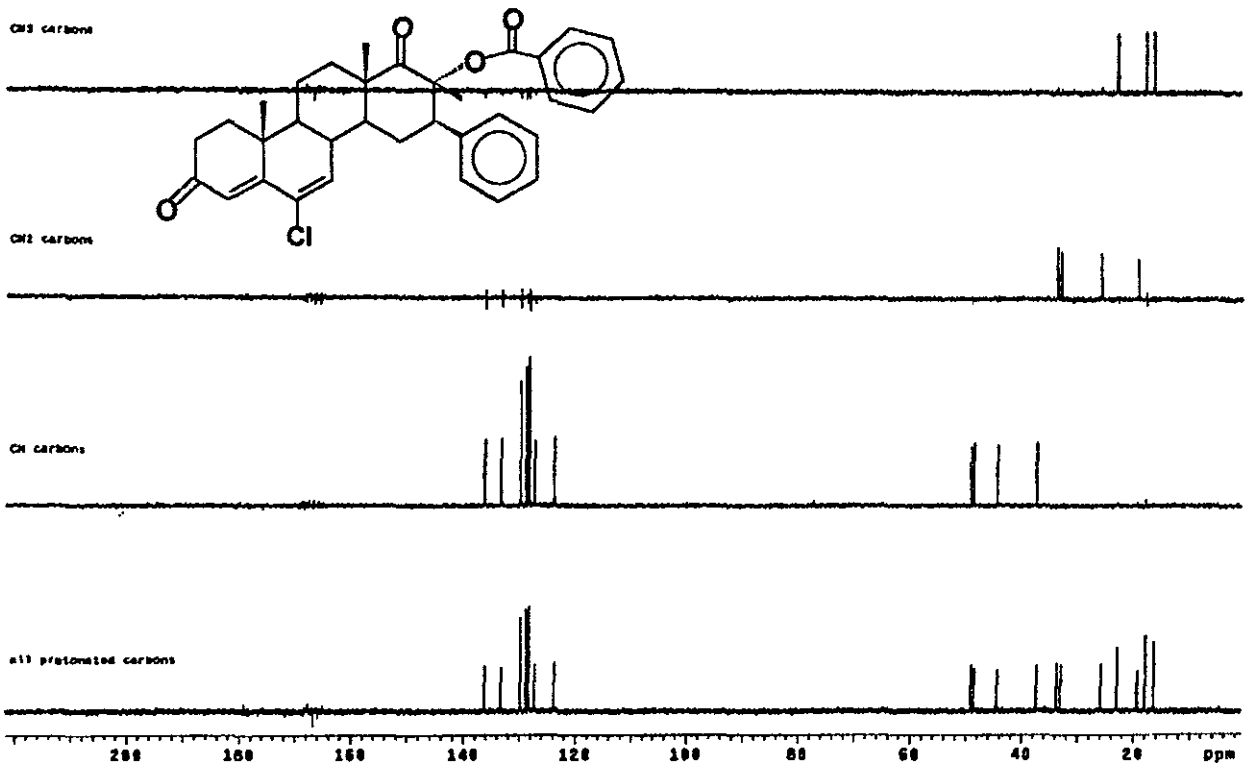


Figura 9.53. Espectro DEPT del compuesto 17 α -Benzoiloxi-6-cloro-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (Xb).

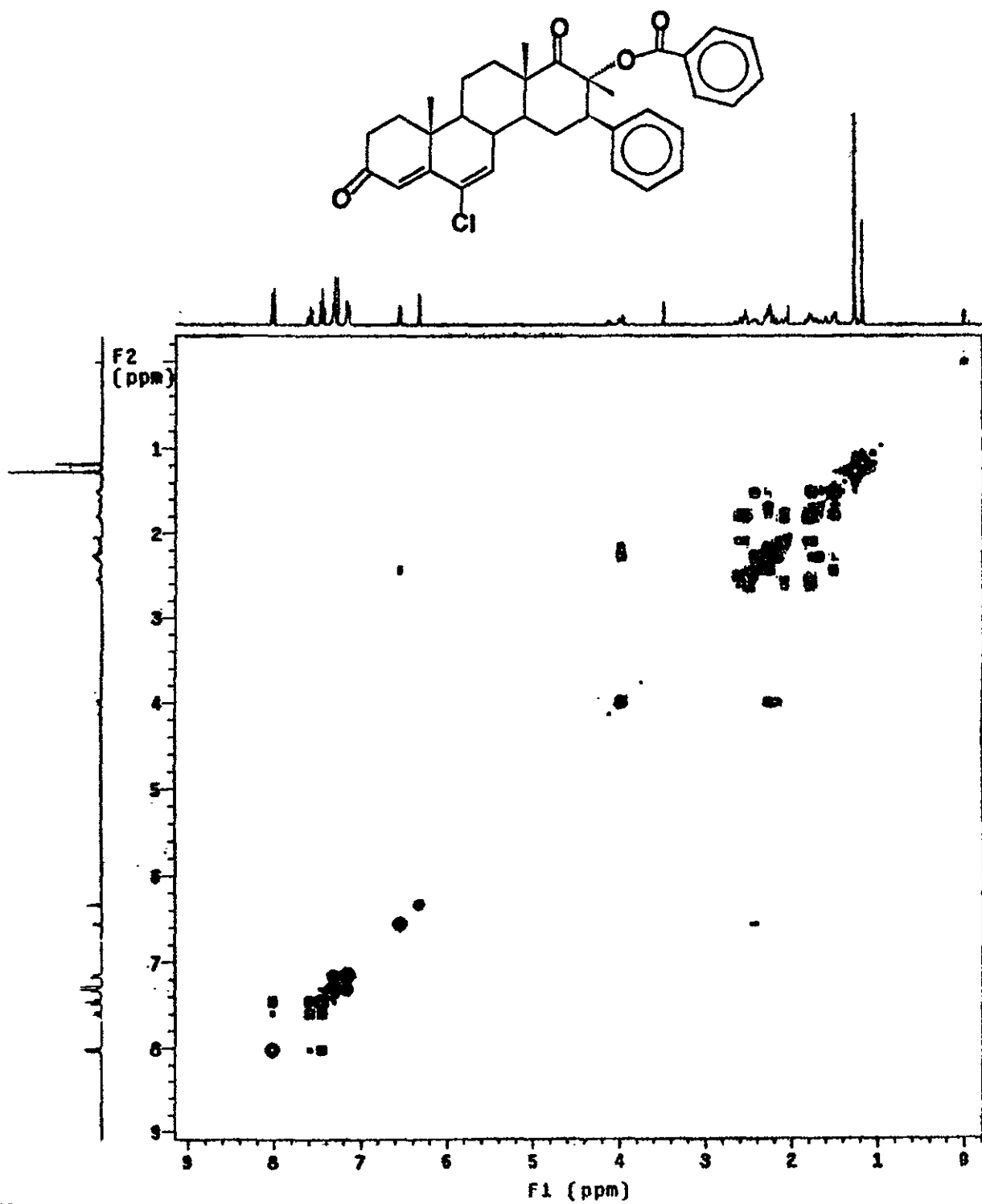


Figura 9.54. Espectro COSY H-H del compuesto 17 α -Benzoyloxi-6-cloro-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (Xb).

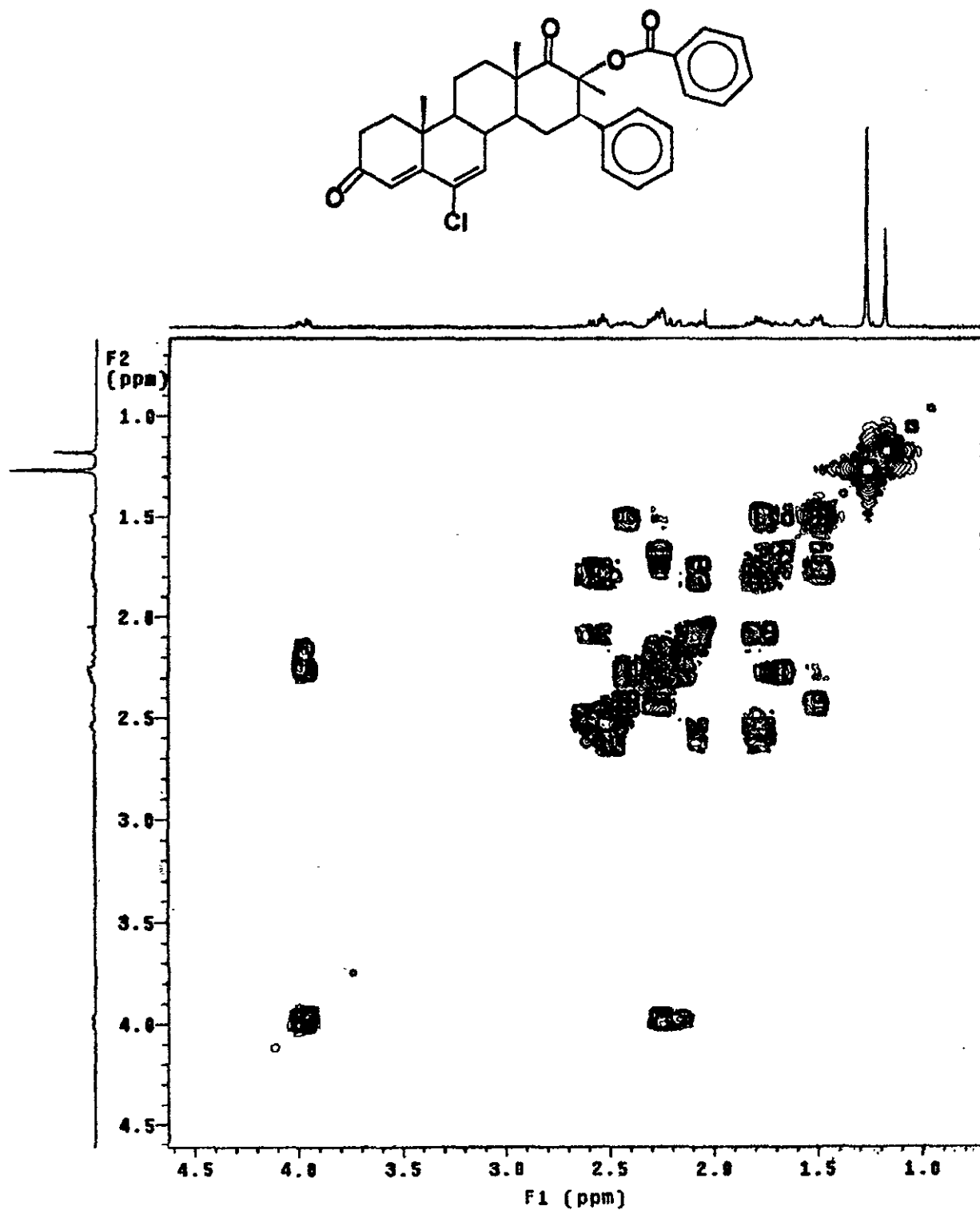


Figura 9.54. (continuación) Espectro COSY H-H del compuesto 17 α -Benzoiloxi-6-cloro-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (Xb).

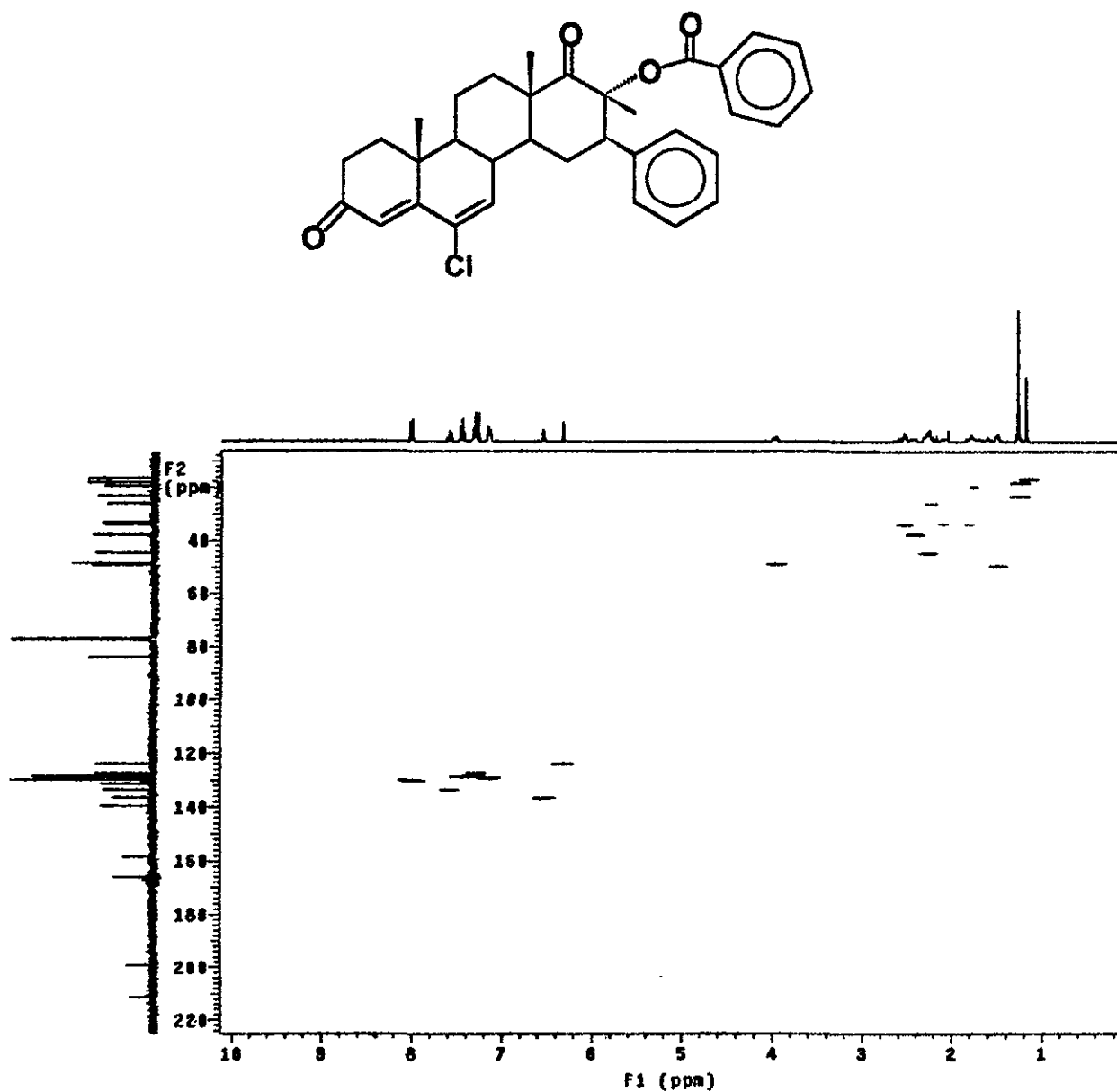


Figura 9.55. Espectro DEPT del compuesto 17 α -Benzoyloxi-6-cloro-16 β -fenil-17 β -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (Xb).

