



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

**"SINTESIS Y EVALUACION ANTIANDROGENICA DE  
DERIVADOS DEL PREGNANO: 16 $\beta$ -FENIL-17 $\alpha$ -  
HIDROXI-17 $\beta$ -METIL-D-HOMO-4,6-  
PREGNADIEN-3,17 $\alpha$ -DIONA"**

**T E S I S**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:  
QUIMICA FARMACUTICA BIOLGA**

**P R E S E N T A:**

**MARIA LUISA GARCIA JOSE**



MEXICO. D. F.



2002

**EXAMENES PROFESIONALES  
FACULTAD DE QUIMICA**



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.

**Paginación**

**Discontinua**

**JURADO ASIGNADO:**

**PRESIDENTE:** Profa: Yolanda Caballero Arroyo  
**VOCAL:** Prof: Eugenio Athanas Bratoeff Titef  
**SECRETARIO:** Profa: Helgi Helen Jung Cook  
**1er. SUPLENTE:** Prof: Fernando León Cedeño  
**2do. SUPLENTE:** Prof: Lino Joel Reyes Trejo

**SITIO DONDE SE DESARROLLO EL TEMA:** Laboratorio 125 del conjunto "E",  
Departamento de Farmacia División de Estudios de Posgrado, Facultad de Química UNAM.

**ASESOR DEL TEMA:**

  
**EUGENIO ATHANAS BRATOEFF TITEF**

**SUPERVISOR TÉCNICO:**

  
**Q. ELENA GUADALUPE RAMÍREZ LOPEZ**

**SUSTENTANTE:**

  
**MARÍA LUISA GARCÍA JOSÉ**

## *AGRADECIMIENTOS*

*A la Universidad Nacional Autónoma de México*

*A mis profesores: Dr. Bratocoff Titel y Elena Guadalupe Ramírez*

*A mis padres: Pablo García H. y Anselma José V.*

*A mis hermanos: Pablo, Julio, Yolanda, Rosa, Lupe, Carmen y Beatriz*

*A mi esposo: Raúl Varela y a mi hija Ana Luisa*

*A mis amigas: Alicia Hernández, Claudia García.*

*Gracias a todos ellos por hacer cumplir esta meta.*

<b>RESUMEN</b>	I
<b>ABREVIATURAS</b>	II
<b>CAPITULO 1: INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>CAPITULO 2: ANTECEDENTES</b>	
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 $\alpha$ -Reductasa.	10
2.6 Cáncer de próstata e Hiperplasia Prostática Benigna (HPB).	
2.6.1 Generalidades.	13
2.6.2 Métodos de diagnóstico.	16
2.6.3 Tratamiento.	17
2.7 Antiandrógenos.	19
2.8 Inhibidores de la enzima 5 $\alpha$ -Reductasa	22
2.9 Desarrollo de antiandrógenos esteroidales.	24
<b>CAPITULO 3: PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA</b>	25
<b>CAPITULO 4: OBJETIVOS.</b>	28
<b>CAPITULO 5: DESARROLLO EXPERIMENTAL</b>	29
<b>CAPITULO 6: METODOLOGÍA Y RESULTADOS</b>	
<b>6.1 Parte química</b>	
<b>Tabla 1.</b> Propiedades físicas y espectroscópicas para la materia prima.	31
<b>6.1.1.</b> Síntesis de 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Epoxi-3 $\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona (I)	32
<b>Tabla 2.</b> Propiedades físicas y espectroscópicas para el compuesto (II)	32
<b>6.1.2.</b> Síntesis de 3 $\beta$ -Acetoxi-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-5-pregnen-20-ona (III).	33
<b>Tabla 3.</b> Propiedades físicas y espectroscópicas del compuesto (III).	33
<b>6.1.3.</b> Síntesis de 3 $\beta$ -Acetoxi-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-20-etilendioxi-5-pregнено (IV).	34
<b>Tabla 4.</b> Propiedades físicas y espectroscópicas para el compuesto (IV).	34
<b>6.1.4.</b> Síntesis de 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihidroxi-20-etilendioxi-16 $\beta$ -fenil-5-pregнено (V)	35
<b>Tabla 5.</b> Propiedades físicas y espectroscópicas para el compuesto (V).	36
<b>6.1.5.</b> Síntesis de 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihidroxi-16 $\beta$ -fenil-17 $\beta$ -metil-D-homo-5-pregnen-17a-ona (VI)	37

<b>Tabla 6.</b> Propiedades físicas y espectroscópicas para el compuesto (VI)	38
6.1.6. Síntesis de 16 $\beta$ -fenil-17 $\alpha$ -hidroxi-17 $\beta$ -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VII).	40
<b>Tabla 7.</b> Propiedades físicas y espectroscópicas de (VII).	40
<b>6.2 Parte biológica</b>	
6.2.1 Enzayo <i>in vivo</i> : Prueba de las vesículas seminales.	43
<b>Tabla 8.</b> Efecto de los compuestos en el peso de las vesículas seminales.	43
6.2.2 Enzayo <i>in vitro</i> : Efecto en la transformación microbiana de [ <sup>3</sup> H] Testosterona a [ <sup>3</sup> H]DHT en <i>Penicillium crustosum</i> .	45
<b>Tabla 9.</b> Efecto en la conversión de [ <sup>3</sup> H]T a [ <sup>3</sup> H]DHT en cultivos de <i>Penicillium crustosum</i> .	45
<b>CAPITULO 7: ANÁLISIS DE RESULTADOS</b>	
7.1 Parte química.	47
7.2 Parte biológica.	57
Enzayo <i>in vivo</i>	57
Enzayo <i>in vitro</i>	58
<b>CAPITULO 8: CONCLUSIONES</b>	59
<b>CAPITULO 9: BIBLIOGRAFÍA</b>	60
<b>ESPECTROSCOPIA</b>	67
<b>INDICE DE FIGURAS</b>	
<b>Figura 2.1</b> Acción de las gonadotropinas en los testículo.	4
<b>Figura 2.2</b> Eventos celulares en la biogénesis de la Testosterona (A) y Biosíntesis de la Testosterona (B)	5
<b>Figura 2.3</b> Acción de la DHT	7
<b>Figura 2.4</b> Representación enzimática del receptor androgénico	9
<b>Figura 2.5</b> Representación de los dedos de zinc	10
<b>Figura 2.6</b> Mecanismo de acción de la enzima 5 $\alpha$ -Reductasa	11
<b>Figura 2.7</b> Esquema representativo de la enzima 5 $\alpha$ -Reductasa II.	13
<b>Figura 2.8</b> Relación del consumo de grasas con el cáncer de próstata.	15
<b>CUADRO 1.</b> Índice de algunos efectos colaterales	18
<b>Figura 2.9</b> Combinación de terapias	19
<b>Figura 2.10</b> Principales Antiandrógenos esteroidales	20
<b>Figura 2.11</b> Ejemplos de Antiandrógenos no esteroidales	21
<b>Figura 2.12</b> Mecanismo de inhibición propuesto por la finasterida	23
<b>Figura 2.13</b> Estructura de la Epristerida	23
<b>Figura 5.1</b> Ruta general de síntesis	30

<b>Figura 6.2.1</b> Efecto antiandrogénico de los intermediarios y productos finales sobre el peso de las vesículas seminales.	44
<b>Figura 6.2.2</b> Efecto inhibitorio de los compuestos sintetizados sobre la conversión De [ <sup>3</sup> H]T a [ <sup>3</sup> H]DHT en cultivos de <i>Penicillium crustosum</i>	46
<b>Figura 7.1.1</b> Generación del anillo D-homo	52
<b>Figura 7.1.2</b> Estructuras resonantes de VII	55
<b>Figura 10.1</b> Espectro de UV de la materia prima: Acetato de 16-Dehidropregnenolona.	68
<b>Figura 10.2</b> Espectro de IR de la materia prima: Acetato de 16-Dehidropregnenolona (I)	68
<b>Figura 10.3</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H de la materia prima: Acetato de 16-Dehidropregnenolona (I)	69
<b>Figura 10.4</b> Espectro de IR del compuesto 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Epoxi-3 $\beta$ -hidroxi-5-Pregnen-20-ona (II)	69
<b>Figura 10.5</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Epoxi-3 $\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona (II)	69
<b>Figura 10.6</b> Espectro de IR del compuesto 3 $\beta$ -Acetoxi-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-5-pregnen-20-ona (III)	70
<b>Figura 10.7</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto 3 $\beta$ -Acetoxi-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-5-pregnen-20-ona (III)	71
<b>Figura 10.8</b> Espectro de IR del compuesto 3 $\beta$ -Acetoxi-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-20-etilendioxi-5-pregнено (IV)	71
<b>Figura 10.9</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto 3 $\beta$ -Acetoxi-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-20-etilendioxi-5-pregнено (IV)	72
<b>Figura 10.10</b> Espectro de IR del compuesto 3 $\beta$ -17 $\alpha$ -Dihidroxi-20-etilendioxi-16 $\beta$ -fenil-5-pregнено (V)	72
<b>Figura 10.11</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto 3 $\beta$ -17 $\alpha$ -Dihidroxi-20-etilendioxi-16 $\beta$ -fenil-5-pregнено (V)	73
<b>Figura 10.12</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C del compuesto 3 $\beta$ -17 $\alpha$ -Dihidroxi-20-etilendioxi-16 $\beta$ -fenil-5-pregнено (V)	73
<b>Figura 10.13</b> Espectro DEPT del compuesto 3 $\beta$ -17 $\alpha$ -Dihidroxi-20-etilendioxi-16 $\beta$ -fenil-5-pregнено	74
<b>Figura 10.14</b> Espectro de EMIE del compuesto 3 $\beta$ -17 $\alpha$ -Dihidroxi-20-etilendioxi-16 $\beta$ -fenil-5-pregнено (V)	74
<b>Figura 10.15</b> Espectro de IR del compuesto 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihidroxi-16 $\beta$ -fenil-17 $\beta$ -metil-D-homo-5-pregnen-17a-ona (VI)	75
<b>Figura 10.16</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihidroxi-16 $\beta$ -fenil-17 $\beta$ -metil-D-homo-5-pregnen-17a-ona (VI)	75
<b>Figura 10.17</b> Espectro COSY H-H del compuesto 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihidroxi-16 $\beta$ -fenil-17 $\beta$ -metil-D-homo-5-pregnen-17a-ona (VI)	76
<b>Figura 10.18</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C del compuesto 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihidroxi-16 $\beta$ -fenil-17 $\beta$ -metil-D-homo-5-pregnen-17a-ona (VI)	77
<b>Figura 10.19</b> Espectro DEPT del compuesto 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihidroxi-16 $\beta$ -fenil-17 $\beta$ -me-til-D-homo-5-pregnen-17a-ona (VI)	77



<b>Figura 10.20</b> Espectro de EMIE del compuesto 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihidroxi-16 $\beta$ -fenil-17 $\beta$ -metil-D-homo-5-pregnen-17a-ona (VI)	78
<b>Figura 10.21</b> Espectro de UV del compuesto 16 $\beta$ -fenil-17 $\alpha$ -hidroxi-17 $\beta$ -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VII)	78
<b>Figura 10.22</b> Espectro de IR del compuesto 16 $\beta$ -fenil-17 $\alpha$ -hidroxi-17 $\beta$ -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VII)	79
<b>Figura 10.23</b> Espectro de RMN <sup>1</sup> H del compuesto 16 $\beta$ -fenil-17 $\alpha$ -hidroxi-17 $\beta$ -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VII)	79
<b>Figura 10.24</b> Espectro de RMN <sup>13</sup> C del compuesto 16 $\beta$ -fenil-17 $\alpha$ -hidroxi-17 $\beta$ -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VII)	80
<b>Figura 10.25</b> Espectro DEPT del compuesto 16 $\beta$ -fenil-17 $\alpha$ -hidroxi-17 $\beta$ -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VII)	80
<b>Figura 10.26</b> Espectro de EMIE del compuesto 16 $\beta$ -fenil-17 $\alpha$ -hidroxi-17 $\beta$ -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VII)	81

## RESUMEN

En la actualidad, 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) es convertida al andrógeno endógeno más potente: la 5 $\alpha$ -Dihidrotestosterona (DHT), por la acción de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa, proceso involucrado directamente con la presencia y el desarrollo del cáncer de próstata e HPB. La inhibición de este proceso es considerado un sitio atractivo de intervención terapéutica a través del empleo de antiandrógenos.

Debido a que no existen reportes en la literatura sobre la síntesis y actividad antiandrogénica de los derivados del D- homo pregnano, y con el fin de desarrollar nuevos compuestos como probables inhibidores de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa, conservando las sustituciones químicas que otorgan actividad, este trabajo plantea la síntesis de seis derivados del D- homo pregnano, empleando como materia prima el 3 $\beta$ -acetoxi-5,16-pregnadien-20-ona (DPA) (I), la cual se sometió a diferentes transformaciones químicas, a través de una síntesis lineal de seis pasos, para obtener las estructuras de interés llamados: 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Epoxi-3 $\beta$ -hidroxi-5-Pregnen-20-ona (II); 3 $\beta$ -Acetoxi-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-5-pregnen-20-ona (III); 3 $\beta$ -Acetoxi-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-20-etilendioxi-5-pregнено (IV); 3 $\beta$ -17 $\alpha$ -Dihidroxi-20-etilendioxi-16 $\beta$ -fenil-5-pregнено (V); 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihidroxi-16 $\beta$ -fenil-17 $\beta$ -metil-D-homo-5-pregnen-17a-ona (VI); 16 $\beta$ -fenil-17 $\alpha$ -hidroxi-17 $\beta$ -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VII), así también como su bioevaluación y caracterización *in vivo* e *in vitro*.

Los estudios *in vivo* se refieren a la capacidad de disminuir el peso de las vesículas seminales; para las moléculas sintetizadas VI y VII mostraron mayor actividad antiandrogénica que el estándar Finasterida, siendo el VII el más eficaz. Mientras que los estudios *in vitro* comprenden la capacidad de inhibir la transformación de [ $^3$ H]T a [ $^3$ H]DHT en el hongo *P. Crustosum*; los compuestos sintetizados (II,III) mostraron ligeramente mayor actividad que el estándar Finasterida, siendo el compuesto II el más activo.

## ABREVIATURAS

Ab. Rel.	Abundancia Relativa
AcOEt	Acetato de Etilo
AMPc	Adenosil MonoPhosphate cyclic.
arom	aromático
as	asimétrico
ax	axial
Bz	Benceno
CCF	Cromatografía en Capa Fina
(CF <sub>3</sub> CO) <sub>2</sub> O	Anhidrido Trifluoroacético
(CH <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> Scul	Complejo de yoduro de dimetil sulfuro-cobre
(CH <sub>3</sub> CO) <sub>2</sub> O	Anhidrido Acético
CoCl <sub>2</sub>	Cloruro de cobalto
COSY	Correlated Spectroscopy
d	señal doble en RMN <sup>1</sup> H
dd	señal doble de doble en RMN <sup>1</sup> H
D <sub>2</sub> O	Agua Deuterada
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
DHT	5 $\alpha$ -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
[ <sup>3</sup> 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 <sup>1</sup> H
m/z	relación masa carga en EMIE
M	Banda de Mediana intensidad en IR
M <sup>+</sup>	ión molecular catión radical
MHz	MegaHertz
N	Normalidad
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotido fosfato (forma reducida)
NADP <sup>+</sup>	Nicotinamida Adenina Dinucleotido fosfato (forma oxidada)
nm	nanómetro
nM	nano molar
oop	out of plane (vibración fuera del plano en IR)
pb	pico base
PhCOOH	Ácido benzoico

pf	punto de fusión
PM	peso molecular
ppm	partes por millón
PTS	Ácido p-Toluensulfónico
Py	Piridina
RMN <sup>13</sup> C	Resonancia Magnética Nuclear de <sup>13</sup> C
RMN <sup>1</sup> H	Resonancia Magnética Nuclear protónica
s	señal simple en RMN <sup>1</sup> H
S	banda de fuerte intensidad en IR
si	simétrico
st	stretching (vibración de tensión en IR)
t	señal triple en RMN <sup>1</sup> 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 frecuente 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 del 2 al 3%.<sup>1,2</sup> 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 más importante es que ambos están relacionados con un exceso de andrógenos en el organismo.<sup>3</sup>

Aunque la cirugía actualmente representa el tratamiento más aceptado para el cáncer de próstata (aproximadamente 400 000 prostatectomías son realizadas 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.<sup>4</sup> 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 próstata y la HPB.<sup>4,6</sup> Desafortunadamente, los antiandrógenos más eficaces para el tratamiento del cáncer de próstata y la HPB que se encuentran en el mercado como el acetato de ciproterona (CPA) (5, Fig. 2.10 página 20), la Finasterida (6), la Flutamida (9, Fig. 2.11 página 21) y el Ketokonazol (11), muestran severos efectos colaterales, tales como diarrea, vómitos, disminución de la libido, daño hepático, entre otros, con lo cual se reduce su uso terapéutico.<sup>7</sup>

Debido a que la testosterona (Fig. 2.6 página 11) por acción de la enzima  $5\alpha$ -reductasa se convierte en  $5\alpha$ -dihidrotestosterona (DHT, 4), que es el andrógeno endógeno más potente involucrado directamente con el cáncer de próstata y la HPB, es indicativo que este paso constituye un sitio adecuado de intervención terapéutica.<sup>8</sup> De esta manera diversos inhibidores de la enzima  $5\alpha$ -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, mejor aún que la misma cirugía.

Aunque algunos compuestos no esteroideos actúan como inhibidores de la enzima  $5\alpha$ -reductasa, la mayoría de los antiandrógenos de interés terapéutico pertenecen a la serie esteroidal, específicamente a los derivados de la progesterona (2, Fig. 2.2B página 5), debido a que son homólogos de los esteroides de origen natural.<sup>7,9</sup>

Estudios previos de relación estructura-actividad en derivados de la progesterona llevados a cabo por el Dr. Bratoeff y colaboradores, han encontrado diversos requerimientos estructurales 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 carbono C-6, un grupo voluminosos en C-16 $\beta$  y un éster en C-17 $\alpha$ .<sup>74-77</sup>

En el 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. Por tal motivo se crea la necesidad de seguir desarrollando agentes potenciales contra el cáncer de próstata y la HPB, y este trabajo plantea la síntesis de seis derivados del D-homo pregnano que presenten algunas de las características estructurales descritas anteriormente: 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Epoxi-3 $\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona (II), 3 $\beta$ -acetoxi-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Epoxi-5pregnen-20 ona (III),3 $\beta$ -Acetoxi-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-20-etilendioxi-5-pregнено (IV), 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihidroxi-20-etilendioxi-16 $\beta$ -fenil-5 pregneno (V), 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihidroxi,16 $\beta$ -fenil-17 $\beta$ -metil-D-homo-5 pregnen-17a-ona (VI) , 16 $\beta$ -fenil-17 $\alpha$ -Hidroxi-17 $\beta$ -metil-D-HOMO-4,6 pregnadien-3,17a diona (VII), así como su bioevaluación antiandrogénica *in vivo* e *in vitro*, la primera sobre el efecto en el peso de las vesículas seminales de hámsters gonadectomizados, y la segunda sobre la capacidad de inhibir la conversión de testosterona a DHT en el hongo P. crustosum.

## 2. ANTECEDENTES

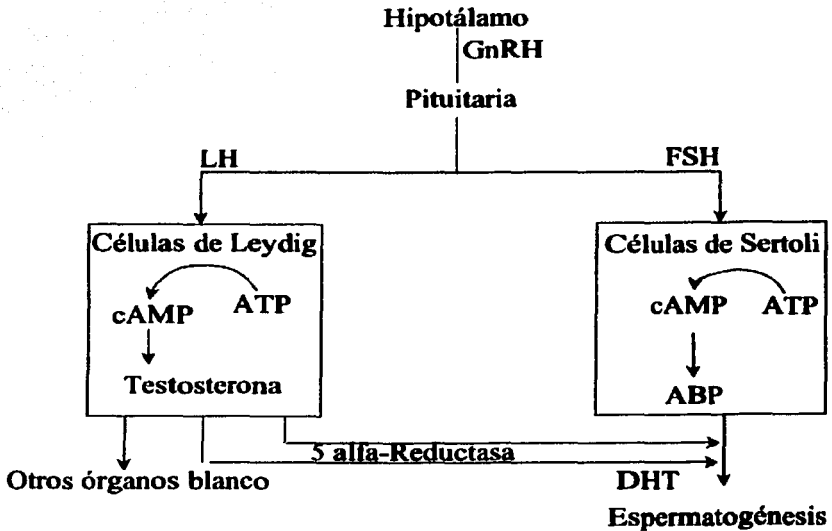
### 2.1 ANDROGENOS

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 está basada en el esqueleto androstano.<sup>10,11</sup>

La testosterona es la hormona sexual masculina predominante en circulación y es producida principalmente en los testículos. Sin embargo, su metabolito reducido  $5\alpha$ - dihidrotestosterona (DHT) 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.<sup>12,13</sup>

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 ( $KD=10^{-10}$  M) ocurre en las membranas 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.

En contraste con la estimulación de la androgénesis por LH, la hormona foliculo 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 ( $KD=10^{-8}$  M) permite aumentar la cantidad de T y DHT en los túbulos seminíferos, promoviendo así la espermatogénesis.<sup>14,15,16</sup>



**Fig. 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 las superficies 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 (Fig 2.2A-página 5).

Diversas transformaciones llevadas a cabo por enzimas no mitocondriales convierten la pregnenolona en progesterona, la cual es posteriormente convertida a testosterona que es secretada al torrente sanguíneo (Fig. 2.2B-página 5).<sup>17-19</sup>



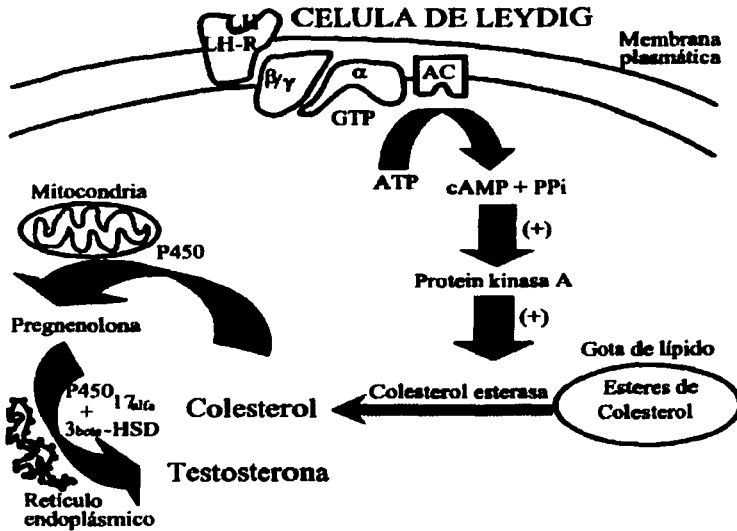


Fig. 2.2.A Eventos celulares en la biogénesis de testosterona. Compartimientos celulares donde se lleva a cabo la secuencia para la génesis de testosterona..

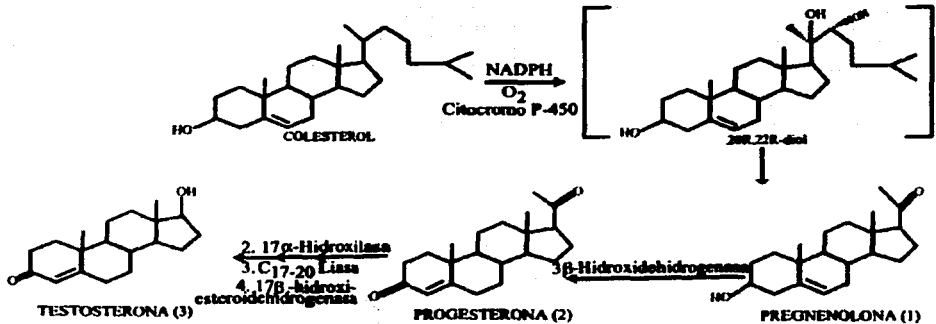


Fig. 2.2.B Biosíntesis de la testosterona. Reacciones enzimáticas de degradación de la cadena lateral del colesterol que dan origen a la pregnenolona y testosterona, entre otros (tomado de Schulster et. al. y de Brueggemeir R. W. ).

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 regulación de la producción, liberación y disponibilidad de andrógenos en el cuerpo humano.<sup>15</sup>

## 2.2 ACCION MOLECULAR DE LOS ANDROGENOS

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  $5\alpha$ -reductasa que se encuentra en el 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 de 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-página 7) 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.<sup>20,21</sup>

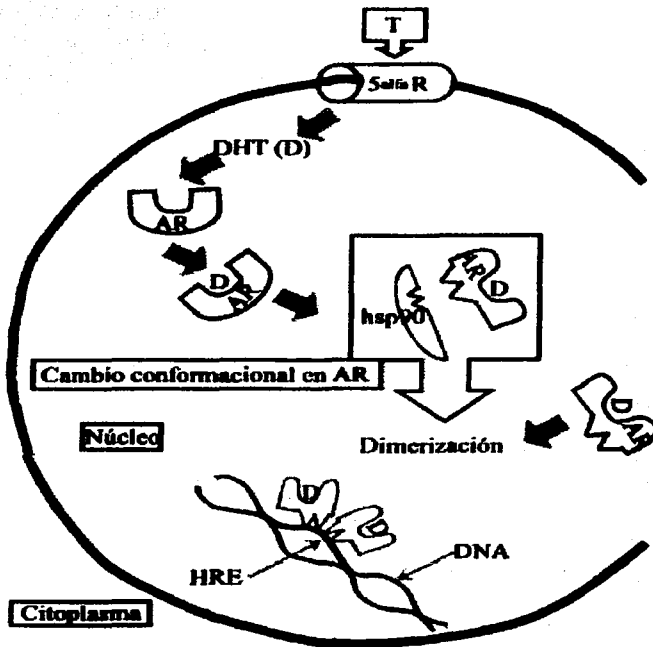


Fig. 2.3. Acción de la DHT. Representación del proceso por el cual la DHT es formada a partir de testosterona. Se une al receptor androgénico (AR) y se asocia con los elementos de respuesta hormonal (HRE) en forma de complejos DHT-AR dimerizados (tomado de Cadepond F. Et. al.).

### 2.3 PAPEL DE LOS ANDROGENOS 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, vesícula seminal, epidídimo y la próstata. Si la cantidad de T es suficiente 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. 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.<sup>22-25</sup>

Los estudios realizados en hombres con pseudohermafroditismo por la primera vez visto en la República Dominicana muestran que la glándula no crece. Ello causado por una deficiencia de la enzima 5 $\alpha$ - reductasa II. Dichos hombres desarrollan musculatura razonable en la pubertad, manifiestan genitales relativamente normales, libido y erecciones, presumiblemente por los efectos biológicos de la testosterona, pero la próstata permanece ausente debido a la carencia de **DHT**.<sup>26</sup>

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.<sup>27-28</sup>

## 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.<sup>29</sup>

El **RA** humano es un proteína de 110 kDa (919 aminoácidos) codificada por un gen ubicado en el cromosoma X cuya extensión abarca más de 90kb y se divide en 8 exones.<sup>30-32</sup> 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-página 9).<sup>33,34</sup>

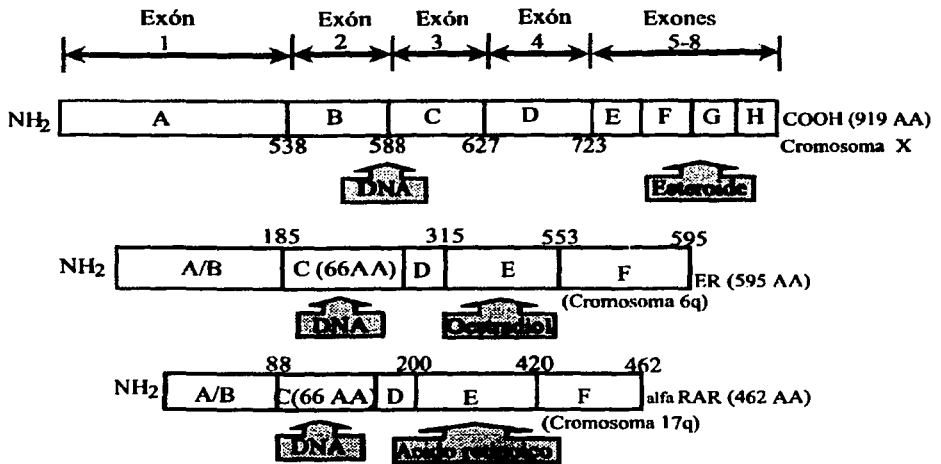


Fig. 2.4 Representación esquemática del receptor androgénico comparado con otros receptores nucleares (tomado de Faber P. et. al.).

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-página 10 ), los cuales se introducen en los surcos mayores de los HRE, confiriendo así estabilidad a la RNA polimerasa, al DNA y varios factores involucrados en la transcripción.<sup>34,35</sup>

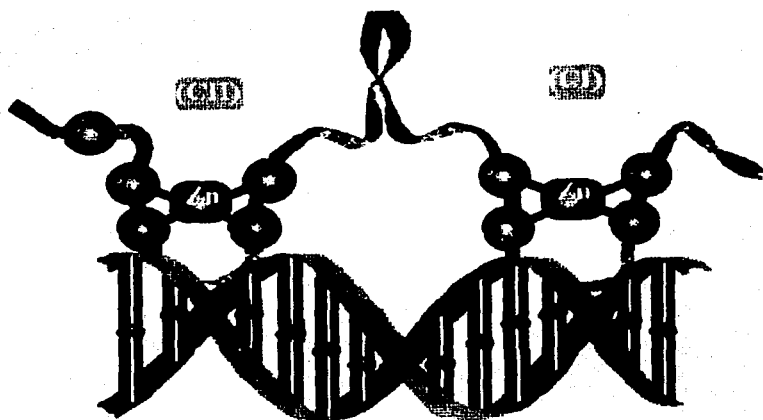


Fig. 2.5 Representación de los dedos de Zinc en el receptor androgénico, los cuales se "anclan" a los surcos mayores del DNA (tomado de Evans R y Hollenberg S.).

## 2.5 LA ENZIMA 5 $\alpha$ -REDUCTASA

La testosterona actúa como un prohormona para la formación de metabolitos activos que median muchos procesos de acción que involucran andrógenos. La testosterona (Fig. 2.6-página 11) 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 $\alpha$ -reductasa.<sup>13,36</sup> El mecanismo de acción para esta transformación consiste primeramente en la formación del complejo 5 $\alpha$ -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 electrofilico (E<sup>+</sup>) 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-página 11 ).<sup>36,37</sup>

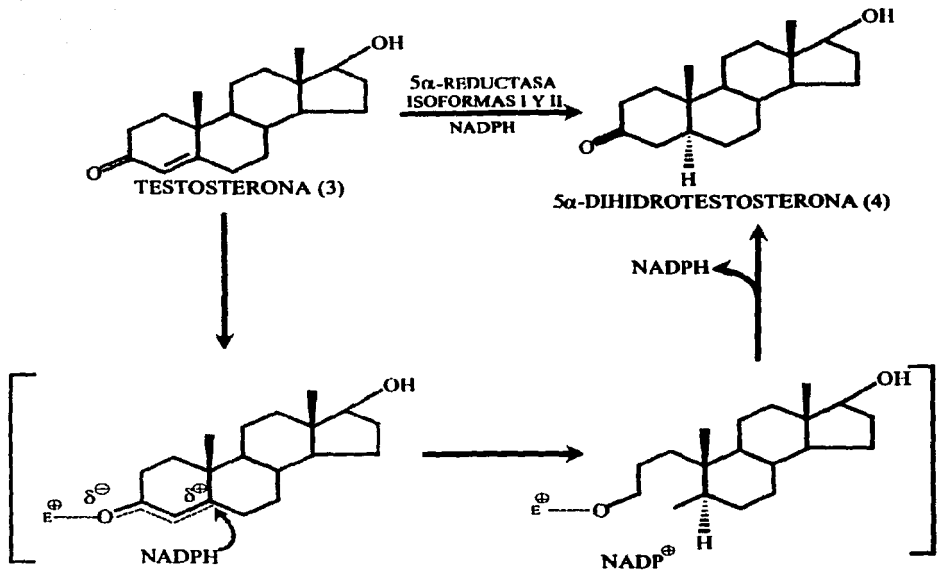


Fig. 2.6. Mecanismo de acción de la enzima 5α-reductasa.

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.<sup>38</sup> La isoenzima 5α-reductasa Tipo I se encuentra predominantemente en la piel 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.<sup>39-41</sup>

Se ha demostrado que la actividad de la enzima  $5\alpha$ -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  $20\alpha$ -hidroxi-4-pregnen-3-ona,  $17\alpha$ -Hidroxiprogesterona, epitestosterona, progesterona y androstenediona.<sup>36,42</sup>

A partir de cDNA de rata y humano, se han obtenido las estructuras primarias de las dos isoenzimas de la  $5\alpha$ -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 cromosoma 2 (banda p23) se localiza el gen que codifica para la isoenzima Tipo II, conteniendo 5 exones cada uno.<sup>36,43,44</sup>

A pesar de no contar con una estructura espacial de la enzima  $5\alpha$ -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-página 13) mientras que aquellos involucrados en la unión del NADPH se localizan en la segunda parte de la proteína.<sup>45</sup>

La expresión de la enzima  $5\alpha$ -reductasa está regulada por los andrógenos, principalmente por la dihidrotestosterona, através de una retroalimentación positiva.<sup>36</sup>



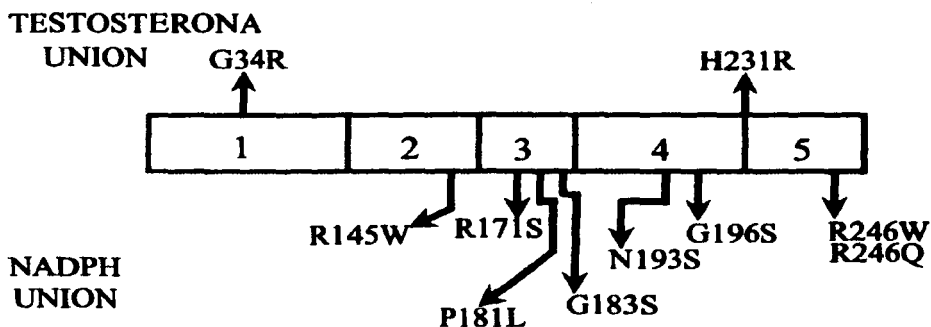


Fig. 2.7 Esquema representativo de la enzima 5 $\alpha$ -reductasa II. Obtenido a partir de estudios de mutagénesis puntual dirigida. Se indican los nombres de las mutaciones realizadas (tomado de Thigpen A. Y Rusell D. ).

## 2.6 CANCER DE PROSTATA E HIPERPLASIA PROSTATICA 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 vecinidad, 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 a partir 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.<sup>46</sup> 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.<sup>47</sup>

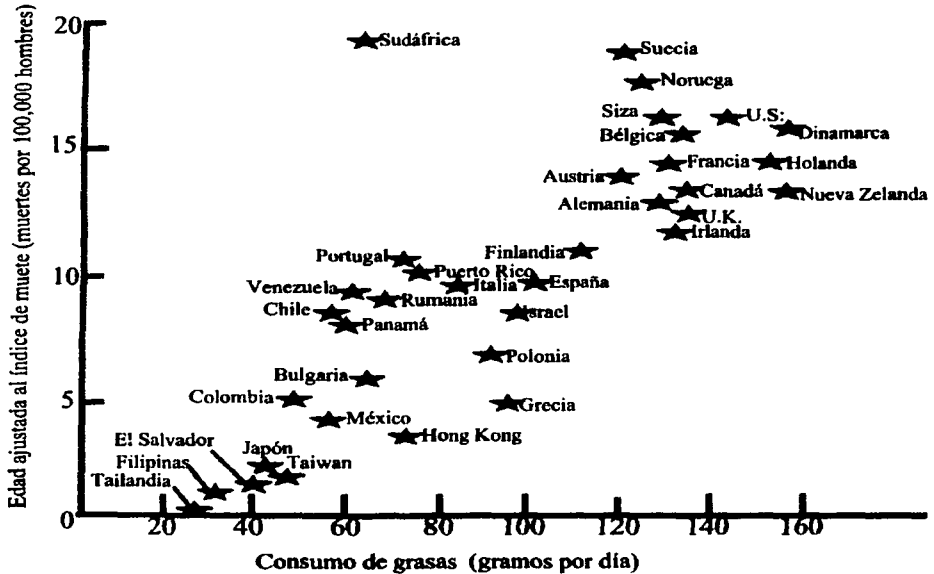
La Hiperplasia Prostática Benigna (HPB) es otro de los padecimientos que afectan a varones adultos caracterizada por el agrandamiento anormal de la próstata y la formación de nódulos.<sup>48</sup>

Aunque varios reportes afirman que la HPB no se encuentra relacionada al cáncer de próstata, recientes reevaluaciones indican lo contrario, sugiriendo una fuerte relación entre sus orígenes dentro de la glándula prostática. 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.<sup>47,51</sup>

Cabe mencionar que recientes investigaciones han demostrado la participación de diversos factores crecimiento que actúan de manera sinérgica con los andrógenos, promoviendo el cáncer de próstata e HPB. Dentro de ellos se encuentran los factores que promueven el crecimiento de las 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.<sup>52,53</sup>

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-página 15).<sup>51,54</sup>

## RELACION ENTRE LA DIETA Y EL CANCER DE PROSTATA



**Fig 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.<sup>49,5</sup>

### 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.

Una prueba que evalúa el PSA involucra 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.

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 examen 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 métodos, tanto de diagnóstico como de propensabilidad que están en investigación son : el que mide la cantidad de IGF-1 y los métodos genéticos que detectan mutantes de los genes BRCA1 (el cual está ligado al cáncer de mama) y HPC1 (Human Prostate Cancer 1) que contribuyen a algunas formas de carcinoma prostático.<sup>51,56,57</sup>

### 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 implantación 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 la 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 algunos de los procedimientos mencionados anteriormente influyen 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.

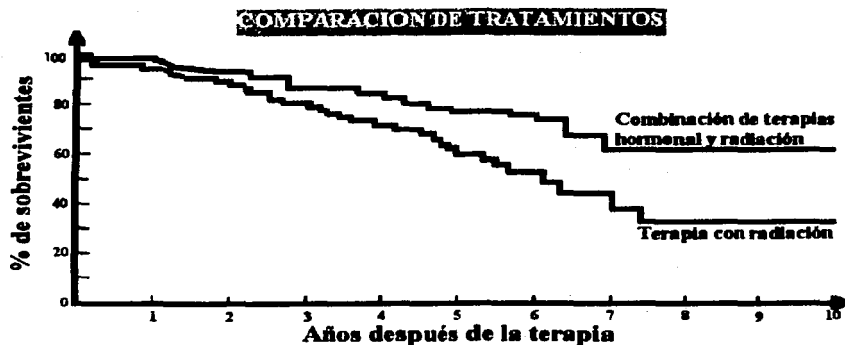
El índice en que una de estas funciones se restablece (si es que sucede) depende de la edad del paciente, estado previo de actividad sexual y la efectividad del método para remover el cáncer (Cuadro 1-página 18).<sup>47,51,56</sup>

	% que mueren de la terapia	% que se convierten en impotentes	% que sufren incontinencia severa
Braquiterapia	< 0.1	30-50	2
Prostatectomía	0.1	30-50	2
Criocirugía	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. Garick, 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 y 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-página 19).<sup>51</sup>



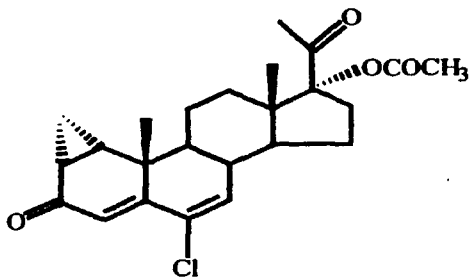
**Fig. 2.9. Combinación de terapias.** Se observa que cuando se combina la terapia hormonal con la radiación, se obtiene un mayor índice de supervivencia en los pacientes sometidos (tomado de Marc B. Garnick. et. al; 1998).

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.

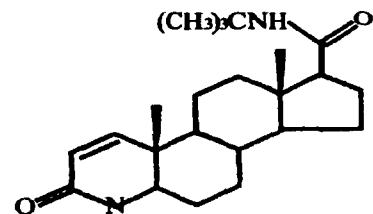
## 2.7 ANTIANDROGENOS

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 el 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.<sup>10,58</sup> Los antiandrógenos pueden ser de origen natural, como la progesterona, o bien de origen sintético (esteroidales y no esteroidales).

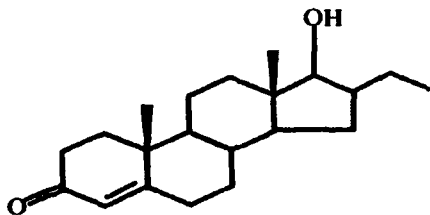
Los antiandrógenos esteroidales son los de mayor interés terapéutico, en especial los derivados de la progesterona, debido a que son homólogos de los esteroides de origen natural. Dentro de los antiandrógenos esteroidales más conocidos se encuentran el Acetato de Ciproterona (CPA) (5), Finasterida (Proscar)(6), oxendolona (7) y BOMT (8) (Fig. 2.10).



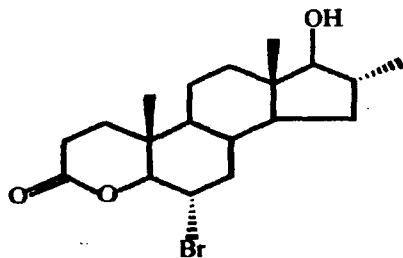
ACETATO DE CIPROTERONA (5)



FINASTERIDA (PROSCAR) (6)



OXENDOLONA (7)



BOMT (8)

Fig. 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 esteroidal más conocido y ampliamente caracterizado, es el prototipo de los compuestos que compiten con la DHT por el sitio de unión en el RA.<sup>59,60</sup>



La finasterida, conocida comercialmente como Proscar, es el prototipo de los fármacos que actúan inhibiendo la enzima  $5\alpha$ -reductasa II, reduciendo drásticamente los niveles de DHT y aumentando los de T.<sup>61</sup>

La oxendolona y BOMT son otros fármacos menos estudiados, pero se sabe que presentan actividad antiandrogénica al competir con el RA.<sup>62,63</sup>

Dentro de los efectos colaterales, se han observado con este grupo de fármacos anomalías a todos los niveles fisiológicos que van desde los progesteronales y conducta sexual, hasta anomalías hormonales, como son pérdida de la libido, ginecomastia, impotencia, anomalías en el esperma, corazón y atrofia celular.<sup>64</sup> 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).

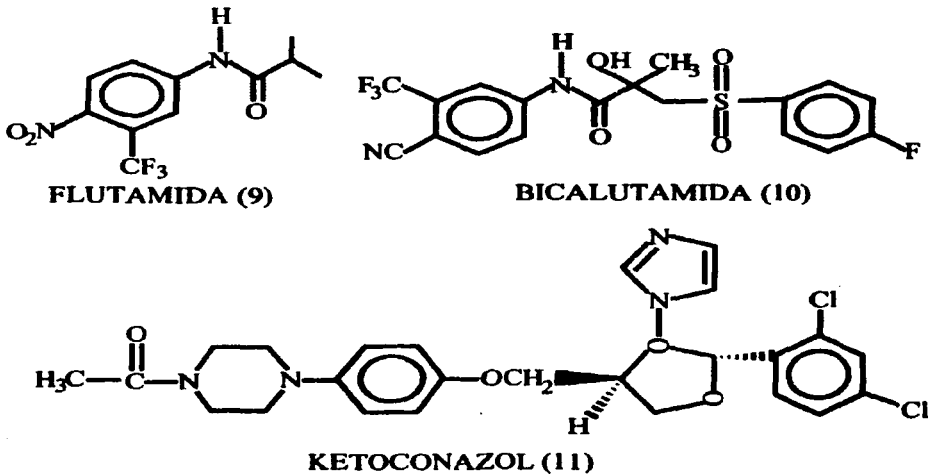


Fig. 2.11. Ejemplos de antiandrógenos no esteroideos.

El requerimiento molecular esteroidal absoluto para que una molécula presentara actividad antiandrogénica, interactuando con el RA, fue invalidado cuando se introdujo la flutamida. Este agente no esteroidal compite con los dominios de unión para DHT en el RA, cuya cadena lateral le permite adquirir la suficiente flexibilidad que asume un andrógeno.<sup>65</sup>

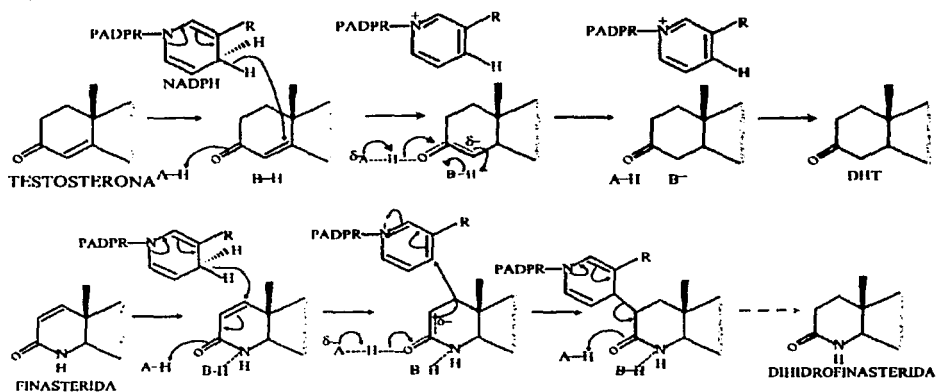
La bicalutamida es un antiandrógeno no esteroidal periféricamente selectivo, que carece de acción sobre la glándula pituitaria o sobre el hipotálamo. Se ha demostrado que el mecanismo de acción de este agente radica en su afinidad con el AR, compitiendo con la DHT en los dominios de unión.<sup>66</sup>

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.<sup>67,68</sup>

Aunque esta clase de antiandrógenos no presentan efectos agonistas hormonales, presentan severos efectos colaterales, incluyendo hepatotoxicidad, diarreas, náuseas y vómito. 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.<sup>69,70</sup>

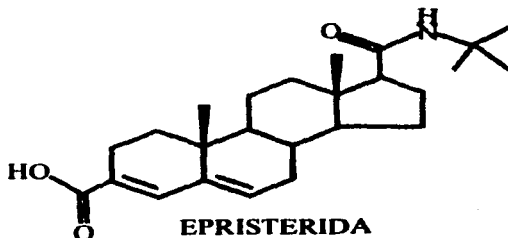
## 2.8 INHIBIDORES DE LA ENZIMA 5 $\alpha$ -REDUCTASA

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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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<sup>+</sup>, el cual imposibilita la transferencia de un último protón que completa la reducción (Fig 2.12-página 23).<sup>71</sup>



**Fig. 2.12. Mecanismo de inhibición propuesto para la Finasterida.** Se ilustra el mecanismo de reducción de la testosterona y 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<sup>+</sup> -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 5 $\alpha$ -reductasa -NADP<sup>+</sup>, 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).<sup>72</sup>



**Fig. 2.13 Estructura de la Epristerida.** Mimetiza el intermediario enolato propuesto en la reducción de la Testosterona.

Los inhibidores de la enzima  $5\alpha$ -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, 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

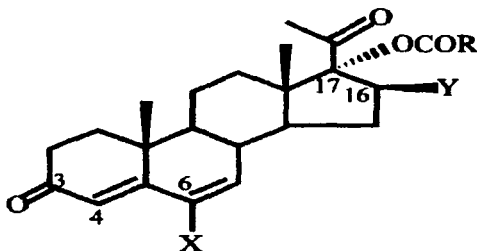
Debido a los efectos colaterales de las terapias disponibles en la actualidad y de los fármacos disponibles en el mercado, se continúan realizando esfuerzos por desarrollar nuevos agentes esteroideos con mayor actividad antiandrogénica y menores efectos secundarios.

De manera general, existen dos vías para la síntesis de nuevos antiandrógenos esteroideos: 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 esteroideos 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 figura 2.10-página 20).<sup>10,55,73</sup>

### 3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

A partir de los estudios de relación estructura-actividad de una serie de derivados del pregnano sintetizados en el laboratorio, se han encontrado los siguientes requerimientos estructurales necesarios para que una molécula presente actividad antiandrogénica.<sup>74-77</sup>



1.- Presencia de un sistema conjugado 4,6-dien-3-ona. Este sistema le permite a la molécula competir con la testosterona por la enzima  $5\alpha$ -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 importante.

2... Presencia de un átomo de halógeno en C-6. Estudios recientes llevados a cabo por Bratoeff y colaboradores,<sup>78</sup> 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  $5\alpha$ -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). Debido a 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 $\beta$ . Se ha observado que la presencia de un grupo voluminoso en C-16 beta orientado, protege la reducción del carbonilo en C-20 que resulta en una pérdida de la actividad antiandrogénica.

De 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 han demostrado que los requerimientos estructurales, tanto para la unión con el receptor androgénico como para la interacción con la 5 $\alpha$ -reductasa, pueden variar un poco en el grado de flexibilidad y tamaño de estos anillos.<sup>79-81</sup> 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.<sup>10,82</sup>

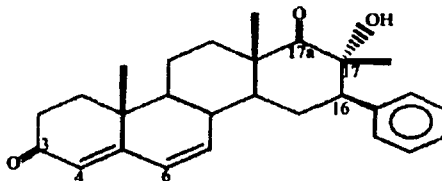
En el laboratorio se ha observado que el anillo D del esqueleto pregnano se expande a un anillo de seis miembros (formando un D-homo derivado del pregnano) únicamente cuando presenta ciertos sustituyentes y es sometido en condiciones adecuadas. Aunque esta transformación sólo ha sido descrita por Bratoeff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

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  $5\alpha$ -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 HBP, este trabajo plantea la síntesis de derivados del D-homo pregnano que presenten las siguientes características estructurales:

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

Introducción de un grupo fenilo en C-16 $\beta$  (Y= fenilo)

Introducción de un grupo hidroxilo en C-17 $\alpha$



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

#### 4. OBJETIVOS

- ☛ Sintetizar intermediarios y derivados D-homo del pregnano a partir de 3 $\beta$ -acetoxi-5,16-pregnadien-20-ona (DPA) (I); 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Epoxi-3 $\beta$ -hidroxi-5-Pregnen-20-ona (II); 3 $\beta$ -Acetoxi-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-5-pregnen-20-ona (III); 3 $\beta$ -Acetoxi-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-20-etilendioxi-5-pregнено (IV); 3 $\beta$ -17 $\alpha$ -Dihidroxi-20-etilendioxi-16 $\beta$ -fenil-5-pregнено (V); 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihidroxi-16 $\beta$ -fenil-17 $\beta$ -metil-D-homo-5-pregnen-17a-ona (VI); 16 $\beta$ -fenil-17 $\alpha$ -hidroxi-17 $\beta$ -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VII).
- ☛ Purificar, caracterizar los intermediarios y productos finales mediante sus propiedades físicas (punto de fusión), químicas, cromatográficas y espectroscópicas (UV, IR, RMN <sup>1</sup>H, <sup>13</sup>C).
- ☛ 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 $\alpha$ -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.



## 5. DESARROLLO EXPERIMENTAL

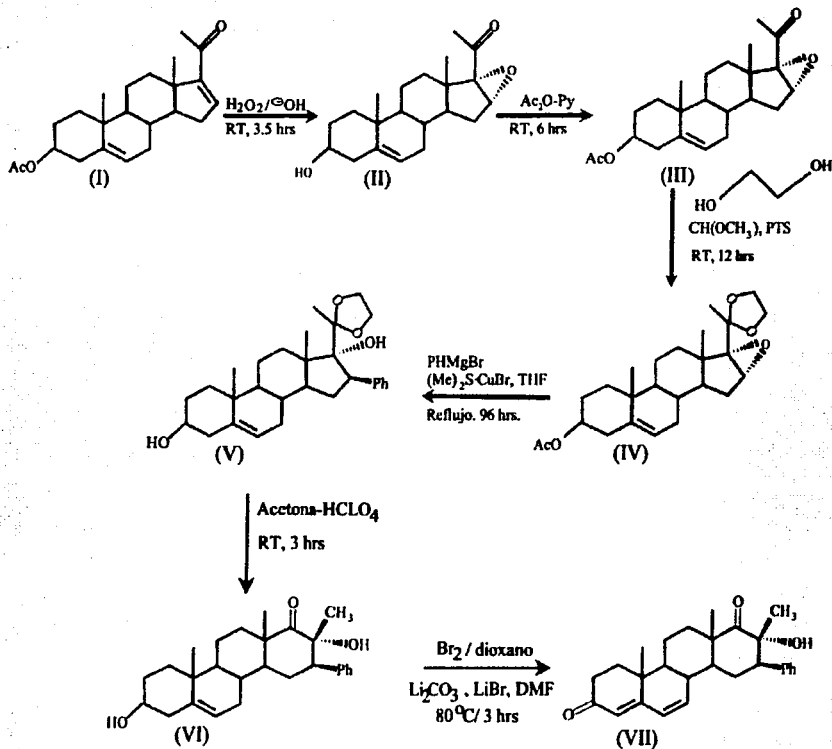
El desarrollo experimental del presente trabajo se dividió en dos partes. En la primera parte, la parte química, se realizó la síntesis química y la caracterización física y espectroscópica de los intermediarios y compuestos finales. En la figura 5.1 (página 30) se muestra la secuencia sintética que permitió obtener los compuestos finales con las características estructurales requeridas. Los puntos de fusión de los compuestos se determinaron en un aparato Fisher- Johns 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  $\text{CoCl}_2$  al 1% en  $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N y/o lámpara de luz UV ( $\lambda=254$  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 Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno ( $\text{RMN}^1\text{H}$ ) y de Carbono ( $\text{RMN}^{13}\text{C}$ ) se utilizaron los equipos Varian, Gemini 200 y VRX-300s, utilizando  $\text{CDCl}_3$  como disolvente; los desplazamientos químicos ( $\delta$ ) 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  $5\alpha$ -reductasa, presente en el hongo *Penicillium crustosum*.

FIG. 5.1. RUTA GENERAL DE SÍNTESIS



## 6. METODOLOGIA Y RESULTADOS

## 6.1 PARTE QUIMICA

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

PROPIEDAD	VALOR
Punto de fusión (°C)	170-172
Fórmula molecular	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> O <sub>3</sub>
Peso molecular (uma)	356.51
VALOR ESPECTROSCÓPICO	ASIGNACIÓN
<b>UV(nm)</b>	
λ <sub>max</sub> 238	<u>C=O</u> α,β insaturado en C-20
<b>IR (cm<sup>-1</sup>)</b>	
2945 (M)	C-H (st) de -CH <sub>3</sub> y -CH <sub>2</sub>
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 <sub>2</sub> (δ)
1440 (W)	<u>CH<sub>3</sub>-CO</u> (δ) en C-20
1372 (S)	-CH <sub>3</sub> (δ)
1247 (S)	<u>C-O</u> (st as) de CH <sub>3</sub> CO- en C-3
1037 (S)	<u>C-O</u> (st si) de CH <sub>3</sub> CO- en C-3
<b>RMN<sup>1</sup>H (ppm)</b>	
0.92 (s,3H)	-CH <sub>3</sub> en C-18
1.05 (s, 3H)	-CH <sub>3</sub> en C-19
2.03 (s, 3H)	-CH <sub>3</sub> en C-21
2.26 (s, 3H)	-CH <sub>3</sub> COO- en C-3
4.5 (m,1H)	<u>CH</u> base de CH <sub>3</sub> COO- en C-3
5.4 (dd, 1H; J1=4Hz y J2=2Hz)	C=CH en C-6
6.7 (t,1H: J=3Hz)	C=CH en C-16

**6.1.1. Síntesis de 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Epoxi-3 $\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona (II).**

En un matraz bola de 100 mL se disolvió 1.0 g ( $2.8 \times 10^{-3}$  mol) de 16-DPA en metanol caliente (66 mL), se agregó hidróxido de sodio 4N (2 mL,  $8 \times 10^{-3}$  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; concluido el tiempo de agitación, se concentró en rotavapor para eliminar todo el metanol posible, lo cual produjo que II precipitara en forma de cristales blancos. Posteriormente el producto fue lavado con H<sub>2</sub>O destilada (aprox. 250 mL) y filtrado con la finalidad de eliminar el exceso de hidróxido de sodio y llegar a un P<sup>H</sup> neutro; finalmente se dejó secar al vacío obteniendo 0.908 g (98%) de II como cristales blancos con p.f de 180-182 °C (180-181°C reportado en la literatura).

**Tabla 2.** Propiedades físicas y espectroscópicas para el compuesto 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Epoxi-3 $\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona (II).

PROPIEDAD	VALOR
Punto de fusión(°C)	180-182
Fórmula molecular	C <sub>21</sub> H <sub>30</sub> O <sub>3</sub>
Peso molecular (uma)	330.47
VALOR ESPECTROSCÓPICO	ASIGNACIÓN
<b>IR (cm<sup>-1</sup>)</b>	
3370 (M)	-OH (st) en C-3
2937 (S)	C-H (st) de -CH <sub>3</sub> y -CH <sub>2</sub>
1692 (S)	C=O en C-20
1452 (W)	-CH <sub>2</sub> ( $\delta$ )
1375 (M)	-CH <sub>3</sub> ( $\delta$ )
1056 (M)	C-O (st) de -OH secundario en C-3
857 (W)	C-O-C (st) de epóxido en C-16-C-17
<b>RMN<sup>1</sup>H (ppm)</b>	
1.02 (s, 3H)	-CH <sub>3</sub> en C-18
1.05 (s, 3H)	-CH <sub>3</sub> en C-19

2.03 (s, 3H)	-CH <sub>3</sub> 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=4Hz, J2=2Hz)	C=CH en C-6

**6.1.2. Síntesis de 3β-Acetoxi-16α,17α-epoxi-5-pregnen-20-ona (III).** En un matraz bola de 50 mL, se agregó 1 g ( $3.03 \times 10^{-3}$  mol) de **II** se disolvió en 10 mL (0.105 mol) de Ac<sub>2</sub>O 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 P<sup>H</sup> neutro para eliminar el exceso de piridina y Ac<sub>2</sub>O; finalmente se dejó secar al vacío obteniéndose 1.09 g (96%) de **III** como agujas de color blanco con p.f 157-159 °C reportado en la literatura).

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

PROPIEDAD	VALOR
Punto de fusión (°C)	157-159
Fórmula molecular	C <sub>23</sub> H <sub>32</sub> O <sub>4</sub>
Peso molecular (uma)	372.5
VALOR ESPECTROSCÓPICO	ASIGNACIÓN
<b>IR (cm<sup>-1</sup>)</b>	
2942 (M)	C-H (st) de -CH <sub>3</sub> y -CH <sub>2</sub>
1731 (s)	C=O de CH <sub>3</sub> COO- en C-3
1697 (S)	C=O en C-20
1376 (M)	-CH <sub>3</sub> (δ)
1245 (S)	C-O (st as) de CH <sub>3</sub> COO- en C-3
1032 (M)	C-O (st si) de CH <sub>3</sub> COO- en C-3
852 (W)	C-O-C de epóxido en C-16 y C-17

RMN <sup>1</sup> H (ppm)	
0.96 (s, 3H)	-CH <sub>3</sub> en C-18
0.97 (s, 3H)	-CH <sub>3</sub> en C-19
1.962 (s, 6H)	-CH <sub>3</sub> en C-21 y CH <sub>3</sub> -COO- en C-3
3.41 (s, 1H)	H base del epóxido en C-16
4.58 (m, 1H)	H base de CH <sub>3</sub> -COO- en C-3
5.3 (dd, 1H; J1=4Hz y J2=2Hz)	C=CH en C-6

**6.1.3. Síntesis de 3β-Acetoxi-16α,17α-epoxi-20-etilendioxi-5-pregнено (IV).** En un matraz bola de capacidad adecuada se disolvió 1.0 g ( $2.6 \times 10^{-3}$  mol) de III en 6mL de tolueno seco, se agregó etilenglicol (3mL, 0.053 mol), ortoformiato de trimetilo (5 mL, 0.045 mol) y ácido p-toluensulfónico seco (0.03 g,  $1.7 \times 10^{-3}$  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, tomando placa a las doce horas de reacción. Concluido el tiempo, la mezcla de reacción se neutralizó con 0.035 g ( $4.26 \times 10^{-4}$  mol) de acetato de sodio anhidro y se vertió a un embudo de separación con aprox. 30 mL de CHCl<sub>3</sub>; se lavó con H<sub>2</sub>O destilada (3 x 50 mL) y la fase orgánica se virtió en un matraz erlenmeyer de 250 mL posteriormente se secó con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anhidro. Se evaporó el disolvente produciendo un sólido amarillento que al recrystalizarse 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 3β-Acetoxi-16α,17α-epoxi-20-etilendioxi-5-pregнено (IV).

PROPIEDAD	VALOR
Punto de fusión (°C)	192-194
Fórmula molecular	C <sub>25</sub> H <sub>36</sub> O <sub>5</sub>
Peso molecular (uma)	416.56
VALOR ESPECTROSCÓPICO	ASIGNACIÓN
IR (cm <sup>-1</sup> )	
2941 (M)	C-H (st) de -CH <sub>3</sub> y -CH <sub>2</sub>


1719 (S)	<u>C=O</u> de CH <sub>3</sub> COO- en C-3
1465 (W)	-CH <sub>2</sub> δ
1440 (W)	<u>CH<sub>2</sub>-CO</u> (δ) en C-20
1371 (w)	-CH <sub>3</sub> δ
1248 (S)	<u>C-O</u> (st as) de CH <sub>3</sub> COO- en C-3
1333 (M)	<u>C-O</u> (st si) de CH <sub>3</sub> COO- en C-3
<b>RMN<sup>1</sup>H (ppm)</b>	
0.99 (s, 3H)	-CH <sub>3</sub> en C-18
1.04 (s, 3H)	-CH <sub>3</sub> en C-19
1.44 (s, 3H)	-CH <sub>3</sub> en C-21
2.04 (s, 1H)	<u>CH<sub>3</sub>-COO-</u> en C-3
3.39 (s, 1H)	H base del epóxido en C-16
3.95 (m, 4H)	-O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -O- en C-20
4.6 (m, 1H)	H base de CH <sub>3</sub> -COO- en C-3
5.38 (dd, 1H; J1=4Hz y J2=2Hz)	C=CH en C-6

**6.1.4. Síntesis de 3β,17α-Dihidroxi-20-etilendioxi-16β-fenil-5-pregneno (V).** A 1.0 g ( $2.4 \times 10^{-3}$  mol) de **IV** y 300mg ( $1.44 \times 10^{-3}$  mol) de complejo 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 a reflujo durante 4 días bajo una atmósfera de nitrógeno. Transcurrido dicho tiempo, la mezcla se transfirió lentamente a un vaso de precipitados que contenía agua con hielo en agitación y posteriormente a un embudo de separación que contenía una solución saturada de cloruro de amonio (15 mL), H<sub>2</sub>O destilada (aprox. 30 mL) y hielo. La fase acuosa se extrajo 3 veces con CHCl<sub>3</sub>; 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 con Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anh. y evaporó el disolvente, obteniéndose un producto aceitoso que cuando se recrystalizó de metanol produjo 0.71 g (65%) de **V** como agujas finas blancas con p.f.: 220-222°C (reportado: 221-222 °C).

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

PROPIEDAD	VALOR
Punto de fusión (°C)	221-221
Fórmula molecular	C <sub>29</sub> H <sub>40</sub> O <sub>4</sub>
Peso molecular (uma)	452.63
VALOR ESPECTROSCÓPICO	ASIGNACIÓN
<b>IR (cm<sup>-1</sup>)</b>	
3571 (M) y 3420 (M)	<u>-O-H</u> (st) en C-17 y C-3
2933 (S)	C-H (st) de -CH <sub>3</sub> y -CH <sub>2</sub>
2887 (S)	<u>-O-CH<sub>2</sub>-</u> (st) de etilendioxi en C-20
1599 (W)	<u>C=C</u> aromático en C-16
1450 (W)	-CH <sub>2</sub> δ
1493 (W)	<u>C=C</u> aromático en C-16
1372 (W)	-CH <sub>3</sub> δ
1048 (S)	<u>C-OH</u> (st) en C-3 y C-17
900,766 y 698	<u>C=C-H</u> arom (oop) (patrón de monosustitución del grupo β-fenilo en C-16)
<b>RMN <sup>1</sup>H (ppm)</b>	
1.06 (s,3H)	-CH <sub>3</sub> en C-18
1.10 (s, 3H)	-CH <sub>3</sub> en C-19
1.21 (s, 3H)	-CH <sub>3</sub> en C-21
3.1 (m, 1H)	C-H bencílico en C-16
3.3 (m, 2H)	-O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -O- en C-20
3.52 (m, 2H)	-O-CH <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -O- en C-20
5.39 (dd, 1H; J1=4Hz y J2=2Hz)	C=CH en C-6
7.26 (m, 5H)	H aromáticos del grupo β-fenilo en C-16



<b>RMN <sup>13</sup>C</b>	
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 <sub>2</sub> -CH <sub>2</sub> -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
<b>EMIE (m/z)</b>	
452	M <sup>+</sup>
424	M - 28 (C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> )
409	424 - 15 (CH <sub>3</sub> )
390	424 - 34 (OH + OH)
364	390 - 26 (C <sub>2</sub> H <sub>2</sub> )
347	364 - 17 (OH)
329	347 - 18 (H <sub>2</sub> O)
87 (100% Ab. Rel.) (pb)	C <sub>4</sub> H <sub>7</sub> O <sub>2</sub> <sup>+</sup> (  )

**6.1.5. Síntesis de 3β,17α-Dihidroxi-16β-fenil-17β-metil-D-homo-5-pregnen-17a-ona (VI).** A una solución de 1.0 g (2.2 × 10<sup>-3</sup> mol) de (V) en acetona (80 mL) se agregó gota a gota y con agitación 1.0 mL (0.11 mol) de HClO<sub>4</sub>. 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  $\text{NaHCO}_3$  y hielo. De esta manera el compuesto **VI** precipitó como sólido blanco amorfo el cual se filtró y lavó con  $\text{H}_2\text{O}$  destilada. Finalmente se dejó secar toda la noche al vacío obteniéndose 0.87 g (96%) de **VI** crudo. El p.f. de los cristales fué de 210-211°C (reportado 209-211°C).

**Tabla 6.** Propiedades físicas y espectroscópicas de **3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihidroxi-16 $\beta$ -fenil-17 $\beta$ -metil-D-homo-5-pregnen-17a-ona (VI).**

PROPIEDAD	VALOR
Punto de fusión (°C)	209-211
Fórmula molecular	$\text{C}_{27}\text{H}_{36}\text{O}_3$
Peso molecular (uma)	408.58
VALOR ESPECTROSCÓPICO	ASIGNACIÓN
<b>IR (cm<sup>-1</sup>)</b>	
3482(M)	<u>O-H</u> (st) en C-17
3426 (M)	<u>O-H</u> (st) en C-3
3028 (W)	<u>C=C-H</u> (st) arom
2930 (S)	C-H (st) de $-\text{CH}_3$ y $-\text{CH}_2$
1692 (S)	<u>CO</u> de cetona en C-17a
1602 (W)	<u>C=C</u> arom en C-16
1456 (M)	$-\text{CH}_2$ ( $\delta$ )
1378 (S)	$-\text{CH}_3$ ( $\delta$ )
1056 (M)	<u>C-OH</u> (st) en C-17
1002 (M)	<u>C-OH</u> (st) en C-3
<b>RMN<sup>1</sup>H (ppm)</b>	
1.038 (s, 3H)	$-\text{CH}_3$ en C-18
1.106 (s, 3H)	$-\text{CH}_3$ en C-19
1.216 (s, 3H)	$-\text{CH}_3$ $\beta$ en C-17
1.53 (m, 1H)	$-\text{CH}$ en C-14

1.7 (m, 1H)	-CH en C-8
1.99 (m, 2H)	-CH <sub>2</sub> en C-15
2.23 (m, 2H)	-CH <sub>2</sub> en C-7
2.33 (m, 1H)	-CH <sub>2</sub> en C-4
2.9 (m, 1H)	-CH bencilico en C-16
3.52 (m, 1H)	-CH base de -OH en C-3
5.39(dd, 1H; J1=4Hz y J2=2Hz)	C=CH vinílico en C-6
7.3 (m, 5H)	H' s del grupo β-fenilo en C-16
<b>RMN <sup>13</sup>C (ppm)</b>	
15.97	C-18 (-CH <sub>3</sub> )
19.34	C-19 (-CH <sub>3</sub> )
19.43	C11 (-CH <sub>2</sub> )
23.94	CH <sub>3</sub> β en C-17
26.46	C-15 (-CH <sub>2</sub> )
30.97	C-8 (-CH-)
31.46	C2 (-CH <sub>2</sub> -)
31.69	C-1 (-CH <sub>2</sub> -)
33.03	C-7 (-CH <sub>2</sub> -)
36.74	C-10 (C cuaternario)
36.78	C-12 (-CH <sub>2</sub> -)
41.89	C-4 (-CH <sub>2</sub> -)
47.03	C-13 (C cuaternario)
49.00	C-9 (-CH-)
50.96	C-14 (-CH-)
54.46	C-16 base del grupo β-fenilo
71.48	C-3 base de -OH
78.21	C-17 base de -CH <sub>3</sub> y -OH
120.86	C-6 vinílico
126.82	CH para del grupo β-fenilo en C-16
127.86	CH orto del grupo β-fenilo en C-16

129.09	<u>CH</u> meta del grupo $\beta$ -fenilo en C-16
139.72	<u>CH</u> ipso del grupo $\beta$ -fenilo en C-16
140.56	C-5 vinílico
218.15	<u>C=O</u> en C-17a
<b>EMIE (m/z)</b>	
408	$M^+$
390	M-H <sub>2</sub> O
380	M-28 (CO)
375	390-15 (CH <sub>3</sub> )
365	380-15 (CH <sub>3</sub> )
347	365 - 18 (H <sub>2</sub> O) ó 375 - 28 (CO)
91 (100% Ab. Rel.) (pb)	Ión tropilio
57	Ión oxonio ( $\text{HO}^+ \text{---} \text{C} = \text{C} \text{---} $ )

#### 6.1.6. Síntesis de 16 $\beta$ -fenil-17 $\alpha$ -hidroxi-17 $\beta$ -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VII).

A una suspensión de 1.0 g ( $2.4 \times 10^{-3}$  mol) de VI, 3.0 g (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 ( $5.82 \times 10^{-3}$  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 para eliminar sales. Al filtrado se le agregaron 180 mL de una solución acuosa de  $\text{NaHCO}_3/\text{NaHSO}_3$  (0.3 g/0.3 g) para eliminar el exceso de bromo. El producto crudo VII precipitó, obteniéndose un sólido amarillo pálido que se purificó por recristalización de acetona dando 0.59 g (60%) de un sólido amorfo blanco con p.f.:  $278\text{-}280^\circ\text{C}$  (reportado  $276\text{-}280^\circ\text{C}$ )

**Tabla 7.** Propiedades físicas y espectroscópicas de 16 $\beta$ -fenil-17 $\alpha$ -hidroxi-17 $\beta$ -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VII).

PROPIEDAD	VALOR
Punto de fusión $^\circ\text{C}$	278-280
Fórmula molecular	$\text{C}_{27}\text{H}_{32}\text{O}_3$

Peso molecular (uma)	404.55
<b>VALOR ESPECTROSCÓPICO</b>	<b>ASIGNACIÓN</b>
<b>UV (nm)</b>	
282.79	<u>CO</u> $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ insaturado en C-3
<b>IR (cm<sup>-1</sup>)</b>	
3446 (M)	<u>O-H</u> (st) en C-17
3028 (W)	<u>C=C-H</u> (st)
2944 (M)	<u>C-H</u> (st) de $-\text{CH}_3$ y $-\text{CH}_2$
1694 (M)	<u>CO</u> de cetona en C-17a
1656 (S)	<u>CO</u> $\alpha,\beta,\gamma,\delta$ insaturada en C-3
1616 (M)	<u>C=C</u> aro en C-16 y <u>C=C</u> dieno conjugado en C-5 y C-6
1452 (M)	$-\text{CH}_2$ ( $\delta$ )
1356 (W)	$-\text{CH}_3$ ( $\delta$ )
1126 (S)	<u>C-OH</u> terciario en C-17
878,758 y 701 (W)	<u>C=C-H</u> (oop) arom (patrón de monosustitución del grupo $\beta$ -fenilo en C-16
<b>RMN<sup>1</sup>H (ppm)</b>	
1.170 (s, 3H)	$-\text{CH}_3$ en C-18
1.176 (s, 3H)	$-\text{CH}_3$ en C-19
1.329 (s, 3H)	$-\text{CH}_3$ $\beta$ en C-17
3.00 (dd, 1H; J=3Hz)	$-\text{CH}$ bencílico en C-16
5.73 (s, 1H)	<u>C=CH</u> en C-4
6.20 (dd, 1H; J1=10Hz, J2=2Hz)	<u>C=CH</u> en C-6
6.33 (dd, 1H; J1=10Hz, J2=2Hz)	<u>C=CH</u> en C-7
7.3 (m, 5H)	H's aro del grupo $\beta$ -fenilo en C-16
<b>RMN<sup>13</sup>C (ppm)</b>	
16.19	C-18 ( $-\text{CH}_3$ )
16.25	C-19 ( $-\text{CH}_3$ )
19.25	C-11 ( $-\text{CH}_2$ -)

23.98	-CH <sub>3</sub> β en C-17
26.16	C-15 (-CH <sub>2</sub> -)
33.02	C-2 (-CH <sub>2</sub> -)
33.53	C-1 (-CH <sub>2</sub> -)
33.81	C-12 (-CH <sub>2</sub> -)
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 <sub>3</sub>
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
<b>EMIE (m/z)</b>	
404 (100% Ab. Rel) (pb)	M <sup>+</sup>
387	M+ -17 (HO)
386	M+ -18 (H <sub>2</sub> O)
376	M+ -28 (CO)
361	376 - 15 (CH <sub>3</sub> )
343	361 - 18 (H <sub>2</sub> O)
91	Ión tropilio

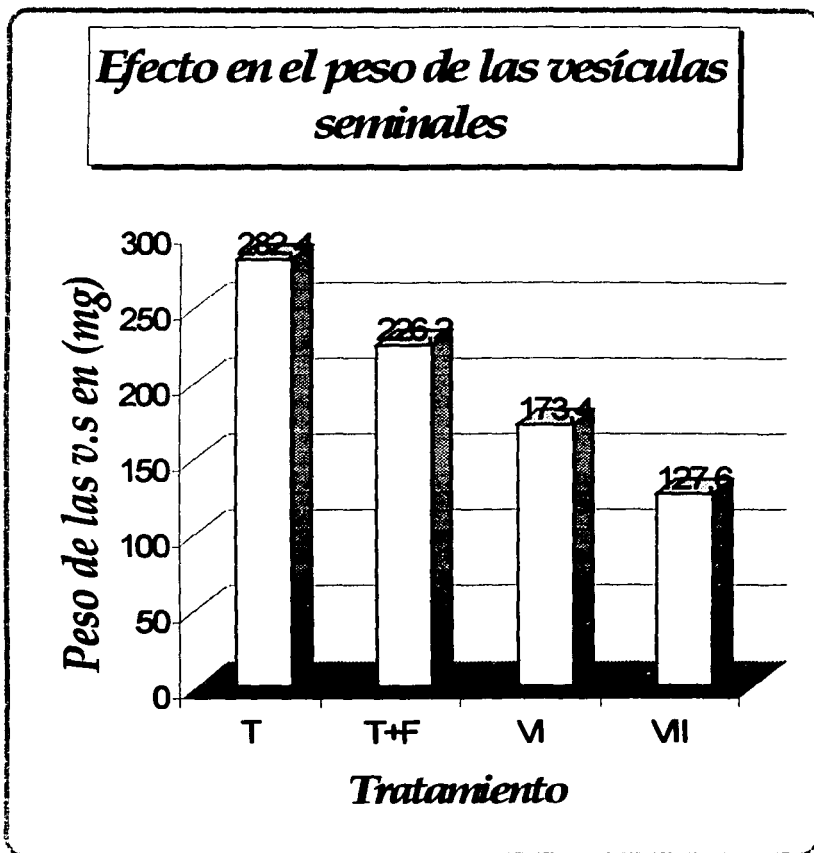
## 6.2 PARTE BIOLÓGICA

### 6.2.1 Ensayo *in vivo*: prueba de las vesículas seminales.

Se determinó el efecto antiandrogénico de los esteroides sobre las vesículas seminales de hámsters machos (150-200 g) castrados, de la cepa Syrian Golden, en 4 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 dos grupos; a un grupo se le administró Finasterida (F) mas testosterona, y al otro se le administró únicamente testosterona disuelta en el vehiculo. 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.)
1	T+Vehículo	282.4 ± 0.108
2	T+Finasterida (F)	
3	T+3β,17α-Dihidroxi-16β-fenil-17β-metil-D-homo-5-pregnen-17a-ona (VI)	173.4 ± 0.026
4	T+17β-Estradiol (E)	176.4 ± 0.014



**Fig. 6.2.1. Efecto antiandrogénico de los intermediarios y productos finales sobre el peso de las vesículas seminales (T: testosterona, F: finasterida; estructuras en la página 30)**

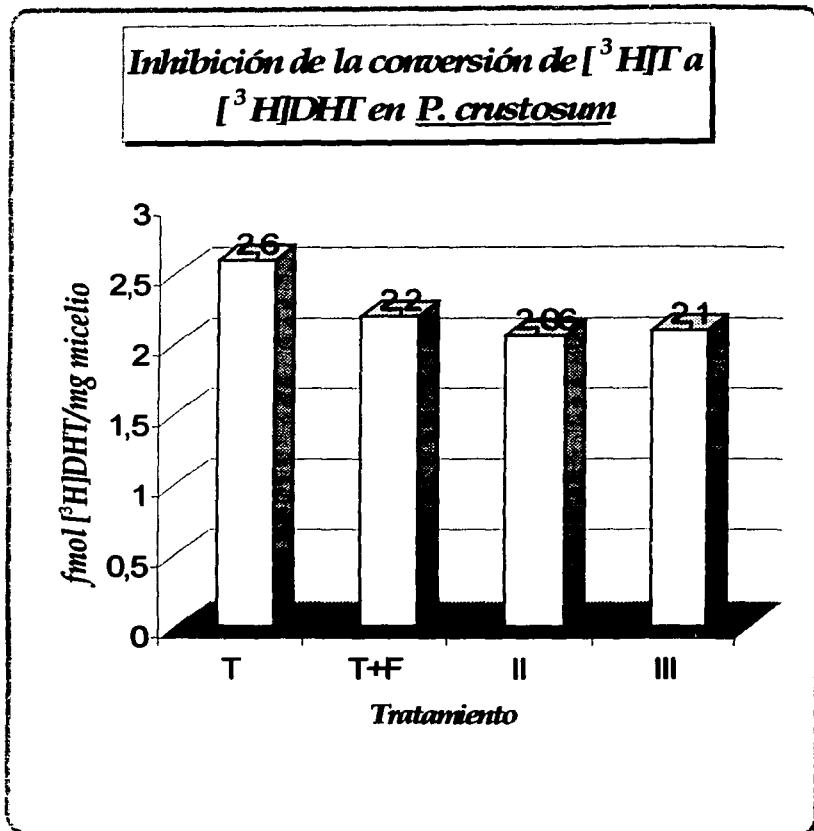


**6.2.2. Ensayo *in vitro*: Efecto en la transformación microbiana de [<sup>3</sup>H]Testosterona a [<sup>3</sup>H]DHT en *Penicillium crustosum*.**

En un matraz Erlenmeyer se colocaron 16 mL de medio papa- dextrosa P<sup>H</sup> 6, [<sup>3</sup>H]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 (3x 10 mL) y se secó al vacío en un rotavapor. De una alícuota (1:100) del extracto, se purificó la [<sup>3</sup>H]DHT utilizando CCD preparativa (sistema de elución CHCl<sub>3</sub>: acetona, 9:1; testosterona y DHT como estándares; reveladores: ácido fosfomolibdico, luz UV-240 nm y autoradiografía). La [<sup>3</sup>H]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 [<sup>3</sup>H] fue del 67.09% y los datos fueron analizados con el programa EPISTAT.

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

T	2.6 ± 0.70
T+16α,17α-Epoxi-3β-hidroxi-5-pregnen-20-ona (II)	2.06 ± 0.280
T+β-Aceto-10α	



**Fig. 6.2.2. Efecto inhibitorio de los compuestos sintetizados sobre la conversión de [ $^3$ H]T a [ $^3$ H]DHT en cultivos de *Penicillium crustosum* (Estructuras en la página 30) (T: testosterona, F: finasterida, estructuras en la página 11 y 20).**

## 7. ANÁLISIS DE RESULTADOS

### 7.1. PARTE QUIMICA

La ruta de síntesis que se planteó en este trabajo (Fig. 5.1-página 30), utiliza como materia prima **3 $\beta$ -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. Como paso previo a la síntesis, se caracterizó a la materia prima por sus propiedades físicas y espectroscópicas (Tabla 1-página 31), correspondiendo con las reportadas en la literatura. En espectrofotometría de UV (Fig.10.1) presentó una  $\lambda$  máxima de absorción a 238 nm correspondiente a la cetona  $\alpha,\beta$  insaturada en C-16-en-20-ona. En IR (Fig.10.2) se presentaron las bandas de alargamiento C-H de metilos y metilenos alrededor de 2945  $\text{cm}^{-1}$  y las correspondientes a carbonilos en 1729  $\text{cm}^{-1}$  y 1661  $\text{cm}^{-1}$ , indicativos del grupo acetoxi en C-3 y la cetona  $\alpha,\beta$  insaturada en C-20 respectivamente. En cuanto a la RMN<sup>1</sup>H (Fig.10.3), 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 más altos (desplazamientos más 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 ( $J=4\text{Hz}$ ) y también muestra un acoplamiento alílico con los protones en C-4 ( $J=2\text{Hz}$ ). 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 ( $J=3\text{Hz}$ ). Uno de los objetivos de la secuencia sintética planteada consistió en introducir un grupo  $\beta$ -fenilo en C-16 y un grupo  $\alpha$ -hidroxilo en C-17 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 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Epoxi-3 $\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona (II) con peróxido de hidrógeno en medio básico, produciéndose la adición nucleofílica (tipo Michael) del anión hidropéroxido sobre la doble ligadura de la cetona  $\alpha$ ,  $\beta$  insaturada. El compuesto deseado se obtuvo con un rendimiento del 98% y se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas (Tabla 2-página 32), correlacionando con las reportadas.

En espectroscopia de UV no presentó absorción debido a la desaparición del sistema 16-en-20-ona. El espectro de IR (Fig. 10.4) para este compuesto presentó, a diferencia de 16-DPA, una banda intensa en 1692  $\text{cm}^{-1}$  asignada a la cetona no conjugada en C-20 y una banda de intensidad media en 857  $\text{cm}^{-1}$  correspondiente al alargamiento C-O-C del epóxido en C16-C17. 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  $\text{cm}^{-1}$  y 1056  $\text{cm}^{-1}$  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 RMN<sup>1</sup>H (Fig. 10.5) se observa, a diferencia del de 16-DPA, 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 D<sub>2</sub>O) 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. 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. De esta manera se obtuvo 3 $\beta$ -Acetoxi-16 $\alpha$ , 17 $\alpha$ -epoxi-5-pregnen-20-ona (III), con un rendimiento del 96% y se identificó por sus constantes físicas y espectroscópicas (Tabla 3-página 33) comparándolas con los reportados.

En el espectro de IR (Fig. 10.6), a diferencia de II, no se observó la banda intensa en  $3370\text{ cm}^{-1}$  del alcohol en C-3, sino que aparecieron tres bandas intensas en  $1735$ ,  $1245$  y  $1032\text{ cm}^{-1}$  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  $\text{RMN}^1\text{H}$  (Fig. 10.7), a diferencia de II, se observa una señal simple que integra para 6 protones en  $1.96\text{ ppm}$ , 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  $\text{RMN}^1\text{H}$  de II en  $3.52\text{ ppm}$  (correspondiente al protón base del alcohol en C-3), se desplazó a campos más bajos ( $4.58\text{ ppm}$ ) 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 etilénglicol, ortoformiato de trimetilo y ácido p-toluensulfónico como catalizador, produciendo el derivado etiléndioxi  $3\beta$ -Acetoxi- $16\alpha$ , $17\alpha$ -epoxi-20-etiléndioxi-5-pregno (IV) con un rendimiento del 74% y se identificó por sus propiedades físicas y espectroscópicas (Tabla 4-página 34) comparándolas con las reportadas.

En espectrofotometría de IR (Fig. 10.8) no se observó la banda en  $1697\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al carbonilo en C-20 presente en III y se aprecia solamente la banda  $1719\text{ cm}^{-1}$  correspondiente al carbonilo del grupo acetoxi en C-3. En espectroscopía de  $\text{RMN}^1\text{H}$  (Fig. 10.9), a diferencia del de III, se observa que la señal de los protones de metil cetona en C-2, se ha desplazado a campo más alto ( $1.44\text{ ppm}$ ), mientras que la señal de los protones del metilo en C-18 se desplazó a campo ligeramente más 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  $3.95\text{ ppm}$  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  $\beta$ -fenilo en C-16, así como la generación simultánea del hidroxilo  $\alpha$  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 ( $(\text{CH}_3)_2\text{S}\cdot\text{CuBr}$ ) 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. Una vez terminada la reacción, se neutralizó con  $\text{NH}_4\text{Cl}$  para regenerar los grupos oxhidrilo en C-3 y C-17, obteniéndose así  $3\beta,17\alpha$ -Dihidroxi-20-etilendioxi-16 $\beta$ -fenil-5-pregнено V con un rendimiento del 65%, el cual se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas (**Tabla 5-página 36**) correlacionándolas con las reportadas.

El espectro de IR (Fig. 10.10) presenta una banda ancha en  $3420\text{ cm}^{-1}$  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  $3571\text{ cm}^{-1}$  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  $1048\text{ cm}^{-1}$  característica del alargamiento C-O. Se observan las bandas de intensidad débil en  $1599$  y  $1493\text{ cm}^{-1}$  indicativo del alargamiento C=C para el grupo  $\beta$ -fenilo en C-16. Las bandas en  $900$ ,  $766$  y  $698\text{ cm}^{-1}$  indican el patrón de monosustitución para el núcleo aromático, confirmando con lo anterior su presencia.

En  $\text{RMN}^1\text{H}$  (Fig. 10.11) se corrobora la presencia del grupo fenilo por 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 etilendioxi 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  $\beta$ -fenilo en C-16 sobre el grupo etilendioxi haciendo que la señal se desplace a campo más 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 bencilico con los protones del grupo  $\beta$ -fenilo insertado en ese mismo carbono.

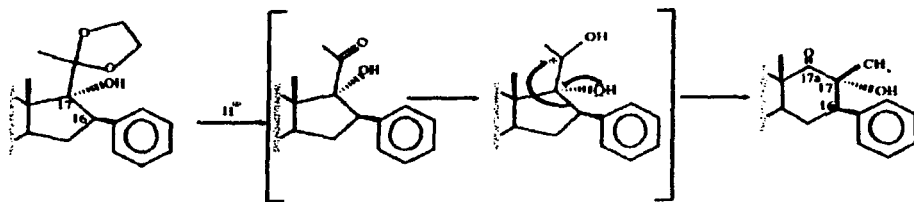
En  $\text{RMN}^{13}\text{C}$  normal (Fig. 10.12), las señales en 14.5, 19.4 y 21.2 ppm que aparecieron en el espectro DEPT (Fig. 10.13) como metilos, fueron asignadas a los carbonos C-18, C-19 y C-21 respectivamente. Las señales en 61.41 y 64.45 ppm que aparecieron como metilenos se asignaron a los carbonos del grupo etilendioxi 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. 10.14) 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<sub>2</sub>H<sub>4</sub> debido a la ruptura del anillo dioxolano en C-20; la siguiente pérdida de 15 unidades (CH<sub>3</sub>) 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<sub>4</sub>H<sub>7</sub>O<sub>2</sub><sup>+</sup>: [  ]

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<sub>4</sub> 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: 3β,17α-Dihidroxi-16β-fenil-17β-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-página 52), que después de una transposición de tipo Wagner Meerwein del enlace 16-17 genera el anillo D-homo.



**Fig. 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. <sup>83</sup>)**

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 $\alpha$ -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-página 38) difieren de las reportadas con anterioridad.

En el espectro de IR (Fig. 10.15) se presentaron dos bandas de alargamiento O-H en 3482 y 3426  $\text{cm}^{-1}$  indicativas de los oxhidrilos en C-3 y C-17. Se aprecian también dos bandas de alargamiento C-H en 3028 y 2930  $\text{cm}^{-1}$  indicativas de insaturaciones y carbonos saturados, respectivamente. Las bandas en 1602 y 1452  $\text{cm}^{-1}$  manifiestan el alargamiento C=C, y con las localizadas en 900, 768 y 698  $\text{cm}^{-1}$  se confirma la presencia del grupo fenilo. La banda intensa en 1692  $\text{cm}^{-1}$ , característica del alargamiento C=O de cetonas, fué asignada al carbonilo regenerado en C-17a de VI.

En el análisis de RMN<sup>1</sup>H normal y COSY H-H (Figs. 10.16 y 10.17) 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  $\beta$  en C-17, confirmando con ello el cambio de posición del metilo C-21, debido a que la señal de los protones de un metil cetona aparece normalmente alrededor de 2.1 ppm. Sin embargo, se esperaba 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  $\beta$  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 bencilico y que muestra correlación en el espectro COSY con una señal múltiple en 1.99 ppm, indicando con ello, la interacción del protón bencilico 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 espectroscopia de RMN<sup>13</sup>C normal y DEPT (Figs. 10.18 y 10.19) 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 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. 10.20) 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 parte estable. La pérdida de 18 unidades del ión molecular dada por la deshidratación (-H<sub>2</sub>O) 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 decarboxilación (-CO) en C-17a para formar el pico en 380. La pérdida de 15 unidades (-CH<sub>3</sub>) 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 (-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:  <sup>99, 100</sup> 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 Shapiro que implica una bromación-dehidrobromación. Dicho método ya ha sido empleado en la síntesis de antiandrógenos anteriores por el grupo de Bratoeff y colaboradores.<sup>74-77</sup> 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. 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 16β-fenil-17α-hidroxi-17β-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-página 40).

En UV (Fig.10.21) se observó un máximo de absorción a 282.79 nm correspondiente al sistema 4.6-dién-3-ona (285 nm teórico), confirmando con ello la oxidación de VI.

En espectroscopia de IR (Fig. 10.22 ) se aprecia la banda ancha del alargamiento O-H en 3446 cm<sup>-1</sup> y la de 1126 cm<sup>-1</sup> del alargamiento C-O, confirmando con ello la presencia de un alcohol terciario en C-17. Las bandas del alargamiento C-H sp<sub>3</sub> y sp<sub>2</sub> se observan en 2944 y 3028 cm<sup>-1</sup> respectivamente, y con las bandas de deformación de metilenos y metilos en 1452 y 1356 cm<sup>-1</sup> respectivamente, se confirma su presencia. La banda en 1616 cm<sup>-1</sup> manifiesta el alargamiento C=C, la cual es indicativa de insaturaciones conjugadas y un núcleo aromático.

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

En  $\text{RMN}^1\text{H}$  (Fig. 10.23) 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 $\alpha$  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  $\gamma$  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. 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).

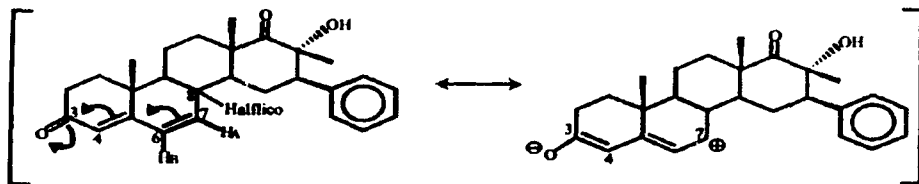


Fig. 7.1.2. Estructuras resonantes de VII

En RMN<sup>13</sup>C convencional y DEPT (Figs. 10.24 y 10.25) 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.

En EMIE (Fig.10.26) 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 (-H<sub>2</sub>O) 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 (CH<sub>3</sub>) se genera el pico en 361. Con la deshidratación de este último fragmento (-H<sub>2</sub>O) se forma el pico en 343. Por último, se observa la presencia del ión tropilio (91 unidades m/z), indicativo del grupo β-fenilo.

## 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  $5\alpha$ -reductasa ya que su actividad se encuentra directamente relacionada con el cáncer de próstata e HPB. Debido a que la enzima  $5\alpha$ -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  $5\alpha$ -reductasa Tipo II. Cabe mencionar que se ha demostrado una relación inversa entre la actividad de las dos isoenzimas frente a un mismo tipo de inhibidor, es decir que si 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  $5\alpha$ -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  $5\alpha$ -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 se observa claramente que cuando los hámster previamente castrados son tratados 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. Estudios anteriores han demostrado que los intermediarios I-V no presentan actividad antiandrogénica, 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  $\beta$ -fenilo en C-16, y el segundo además presenta el sistema 4,6-dien-3-ona. Con lo anterior se puede deducir que la presencia del anillo D-homo, con un grupo  $\beta$ -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.

### Ensayo *in vitro*

Con el propósito de utilizar un sistema de bioevaluación que implicara la inhibición específica de la enzima  $5\alpha$ -reductasa, se utilizó el ensayo microbiano de la conversión de [ $^3$ H]T a [ $^3$ H]DHT por el hongo *Penicillium crustosum* in vitro. Dicho hongo ya ha sido caracterizado, demostrándose que es capaz de convertir la testosterona a dihidrotestosterona (y diversos sustratos) a través de la enzima  $5\alpha$ -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  $P^H=6$  y otro en  $P^H=8$ , y que los metabolitos predominan en el medio de cultivo. En vista que la isoenzima Tipo II tiene un  $P^H$  óptimo de actividad ligeramente ácido, los ensayos se realizaron a  $P^H=6$ , y la [ $^3$ H]DHT fue extraída del medio de cultivo.

Como podrá observarse en la Fig. 6.2.2-página 46, cuando en los cultivos se encuentra presente únicamente la [ $^3$ H]T, la conversión a [ $^3$ H]DHT es máxima, no siendo disminuida significativamente cuando se encuentra la Finasterida presente. Los intermediarios II y III, de igual manera presentaron prácticamente la misma actividad que la Finasterida.

## 8. CONCLUSIONES

De los resultados obtenidos del presente trabajo se puede concluir que:

- 1 Se sintetizaron los intermediarios y derivados del D-homo pregnano a partir de 3 $\beta$ -acetoxi-5,16-pregnadien-20-ona (DPA) (I) llamados: 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Epoxi-3 $\beta$ -hidroxi-5-Pregnen-20-ona (II); 3 $\beta$ -Acetoxi-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-5-pregnen-20-ona (III); 3 $\beta$ -Acetoxi-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-20-etilendioxi-5-pregнено (IV); 3 $\beta$ -17 $\alpha$ -Dihidroxi-20-etilendioxi-16 $\beta$ -fenil-5-pregнено (V); 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihidroxi-16 $\beta$ -fenil-17 $\beta$ -metil-D-homo-5-pregnen-17a-ona (VI); 16 $\beta$ -fenil-17 $\alpha$ -hidroxi-17 $\beta$ -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VII).
- 2 Los compuestos mencionados se caracterizaron por sus propiedades físicas (p.f., apariencia, color), cromatográficos, y espectroscópicos (UV, IR, RMN<sup>1</sup>H, RMN <sup>13</sup>C y EMIE).
- 3 Se realizó la evaluación biológica *in vivo* e *in vitro* de los compuestos sintetizados, encontrándose la presencia del anillo D-homo, con un grupo fenilo en C-16 $\beta$  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.

**9.- BIBLIOGRAFIA**

- 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 1944, 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, Jhon Wiley Inc., 5<sup>a</sup> 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, 7<sup>a</sup> 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 90as a critical factor in monitoring glucocorticoid receptor in a nonfunctional state. *J. Biol. Chem.* 1991, **266**: 5834-5641.
- 21.- Picard D., Khurshheed 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 5alpha-reductase deficiency in man: An inherited form of male pseudohermaphroditism. *Science* 1974, **186**: 1213-1215.
- 27.- Krieg M., Bartsch 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: Complementary 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 110kDa 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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -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 $\alpha$ -reductase. *J. Clin. Invest.* 1992, **89**: 293-300.
- 39.- Labrie F., Sugimoto Y., Luu-The, et al., Structure of human type II 5 $\alpha$ -reductase gene. *Endocrinology* 1992, **131**: 1571-1573.
- 40.- Isaacs J. T., 5 $\alpha$ -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 $\alpha$ -reductase isozyme expression. *J. Clin. Invest.* 1993, **92**: 903-910.
- 42.- Andersson S. And Rusell D. W., Structural and biochemical properties of cloned and expressed human and rat steroid 5 $\alpha$ -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., Howw 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., Liliensfeld A. M., Diamond E. L., Bross I. D. J., Relation between benign prostatic hyperplasia and cancer of the prostate: A prsopective 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, Proccedings 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 Topert 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., Ketokonazole 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 5 $\alpha$ -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, 8<sup>a</sup> 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 5 $\alpha$ -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 Ramírez 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 $\beta$ -metil-17 $\alpha$ -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 $\alpha$ -Acetoxy- 17 $\beta$ - methyl-16 $\beta$ -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 $\alpha$ -hydroxyprogesterones. *J. Med. Chem.* 1972, **15**: 716-720.
- 86.- Loken B., Kaufman B., Rosenkraz S., Sondheimer G., *Steroids LXXVII: Synthesis and reactions of 16 $\beta$ -oxygenated pregna-20-one derivatives. J. Am. Chem. Soc.* 1956, **78**: 1738-1744.
- 87.- Julian P., Meyer E., Ryden I., *Sterols 17 $\alpha$ -hydroxyprogesterone. J. Am. Chem. Soc.* 1950, **72**: 367-370.
- 88.- Glatz b., Helmchen G., A total Synthesis and structural aspects of racemic 8-oxygenated tetracyclines. *J. Am Chem. Soc.* 1979, 101: 2171-2176.
- 89.- Dauben H., Loken B., Ringold B., Preparation of ethylendioxy derivatives of improved synthesis of testosterone from  $\Delta^4$ -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., Ramírez 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 quantiation 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  $5\alpha$ -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<sup>a</sup> 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<sup>a</sup> 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., Coté J., Laplante S., Veilleux R., Labrie F., Synthesis and in vitro evaluation of 4-sustituted N-(1,1-Dimethylethyl)-3-oxo-4-androstene-17 $\beta$ -carboxamides as  $5\alpha$ -reductase inhibitors and antiandrogens. *J. Med. Chem.* 1995, **38**: 1456-1461.
- 103.- Murillo C., Síntesis de derivados del pregnano con actividad antiandrogénica potencial; 17 $\alpha$ -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.- Iken B., Kaufman B., Roserkrantz S. And Sondheimer G., *Steroids* LXXVII: Synthesis and reactions of 16-oxigenated pregnane-20-one derivatives, *J. Am. Chem. Soc.* 1956, **78**: 1738-1744.
- 106.- Bratoeff E., Rubio M., Ramírez E., Flores G., García J., y Ramírez G. *Chemistry Today* (1998) November/december, p. 33-35

- 107.-** Cabeza M., Gutierrez E., Miranda R., Hueze I., Bratoeff E., Flores G., y Ramirez E., *Steroids* 1999, V. 64, 413-421.
- 108.-** Bratoeff E., Ramirez E., Murillo E., Flores G and Cabeza M. *Current Medicinal Chemistry* 1999 V., p. 1107-1173.
- 109.-** Bratoeff E., Herrera H., Ramirez E., Solórzano K., Murillo E., Quiros A y Cabeza M. *Chemical Pharmaceutical. Bulletin* (2000), V. 48 (a), 1249-1255.
- 110.-** Cabeza M., Quiroz A., Heuze I., Bratoeff E., Herrera H., Ramirez E., Murillo E y Proc .  
west Pharmacological Soc. (2000), V. 43, 1-2
- 111.-** Cabeza M., Heuze I., Bratoeff E., Ramirez E. Y Martínez R., *Chemical Pharmaceutical Bulletin* (2001), V. 49, 525-530

ANEXO DE ESPECTROSCOPÍA

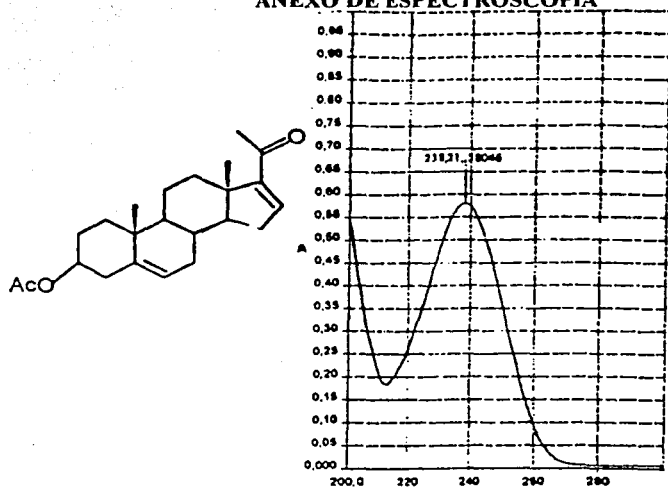


Figura 10.1 Espectro de UV de la materia prima: Acetato de 16-Dehidropregnenolona (I).

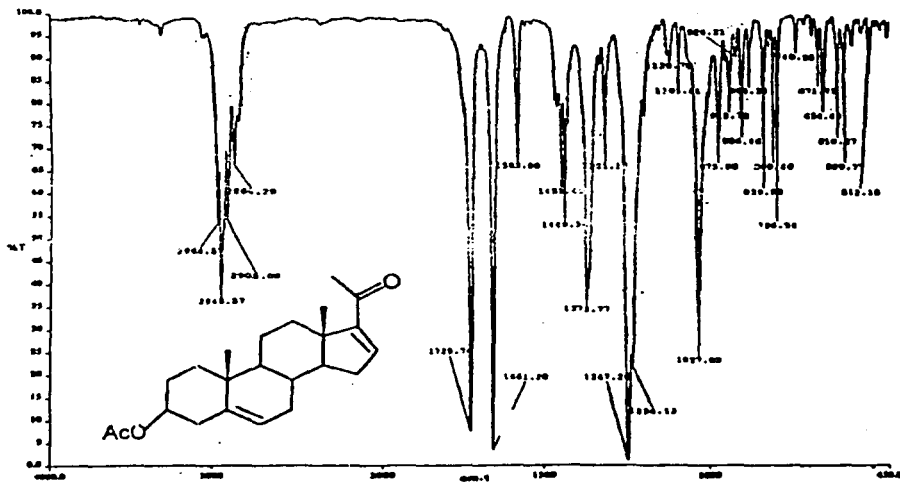


Figura 10.2 Espectro de IR de la materia prima: Acetato de 16-Dehidropregnenolona (I).



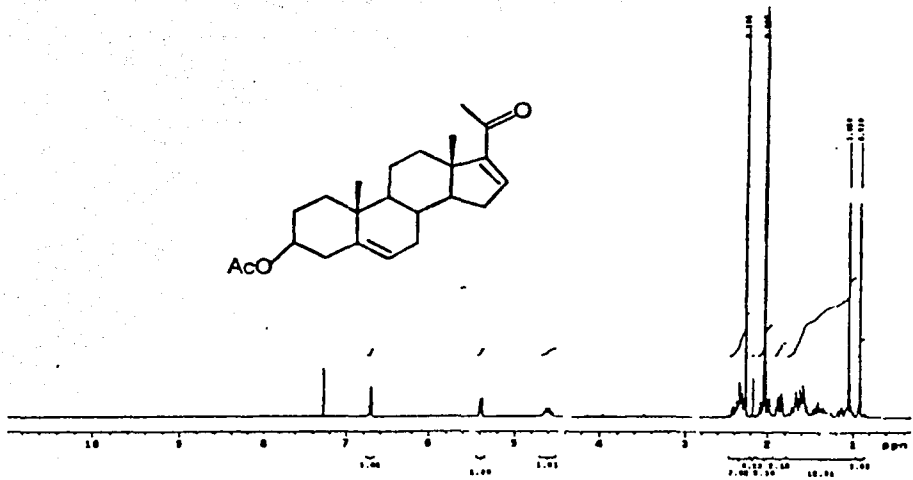


Figura 10.3 Espectro de RMN<sup>1</sup>H de la materia prima: Acetato de 16-Dehidropregnenolona (I)

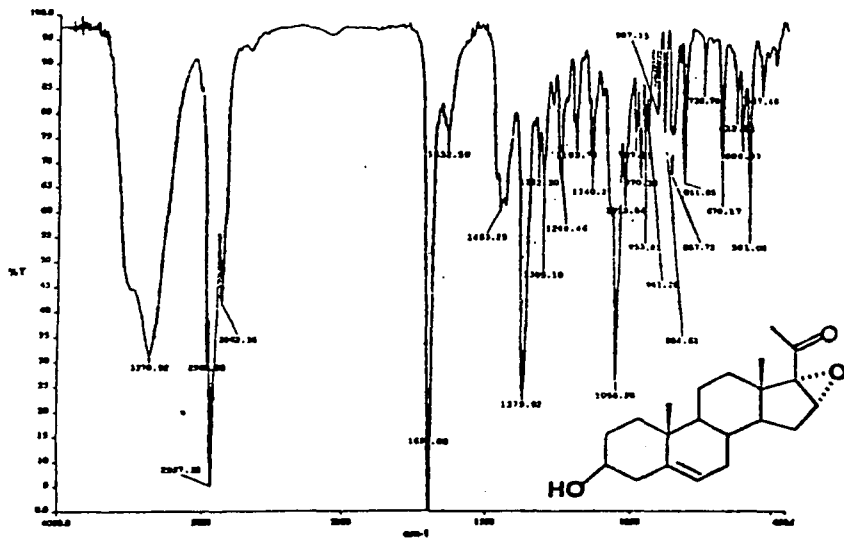


Figura 10.4 Espectro de IR de 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Epoxi-3 $\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona (II)

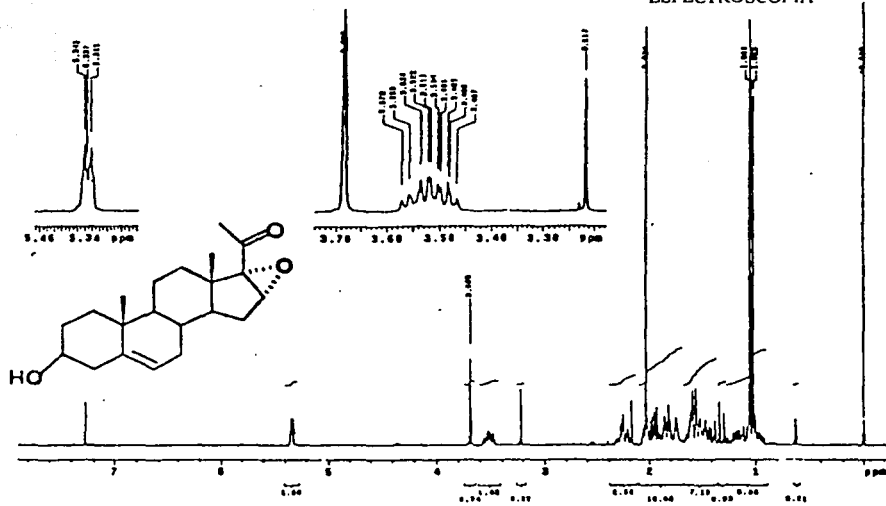


Figura 10.5 Espectro de RMN $^1\text{H}$  del compuesto 16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -Epoxy-3 $\beta$ -hidroxi-5-pregnen-20-ona (II)

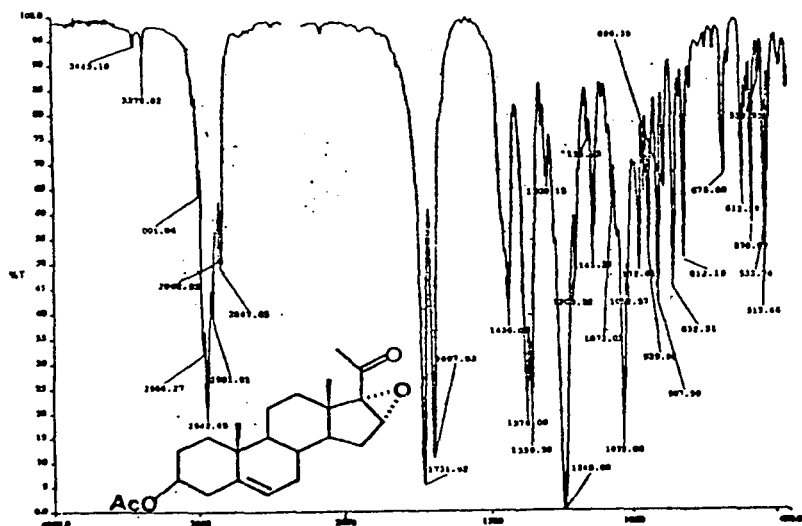


Figura 10.6 Espectro de IR del compuesto 3 $\beta$ -Acetoxy-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxy-5-pregnen-20-ona (III).

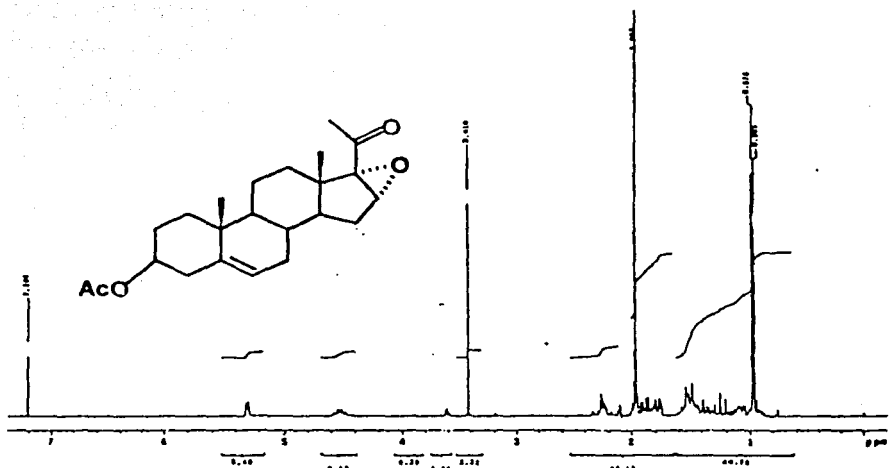


Figura 10.7 Espectro de RMN  $^1\text{H}$  del compuesto  $3\beta$ -Acetoxi- $16\alpha,17\alpha$ -epoxi-5-pregnen-20-ona (III).

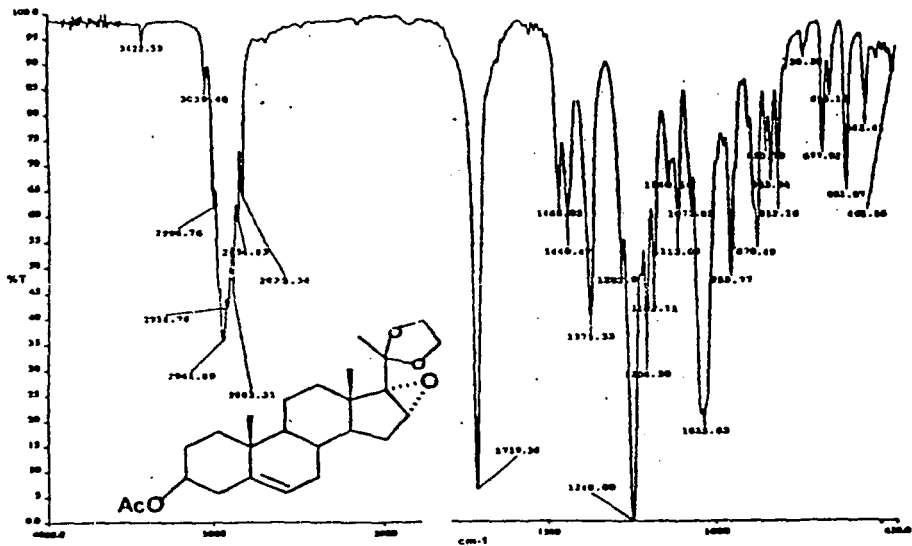


Figura 10.8 Espectro de IR del compuesto  $3\beta$ -Acetoxi- $16\alpha,17\alpha$ -epoxi-20-etilendioxo-5-pregnenona (IV)

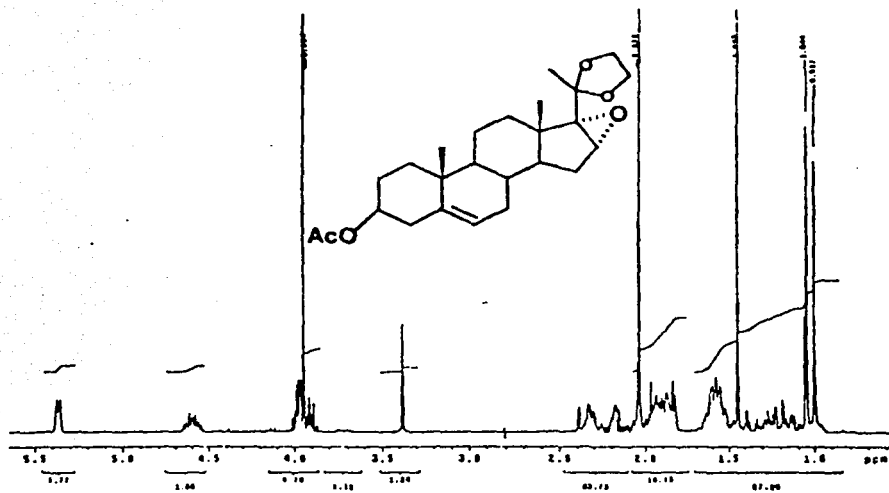


Figura 10.9 Espectro de  $\text{RMN}^1\text{H}$  del compuesto de 3 $\beta$ -Acetoxy-16 $\alpha$ ,17 $\alpha$ -epoxi-20-etilendioxo-5-pregeno (IV)

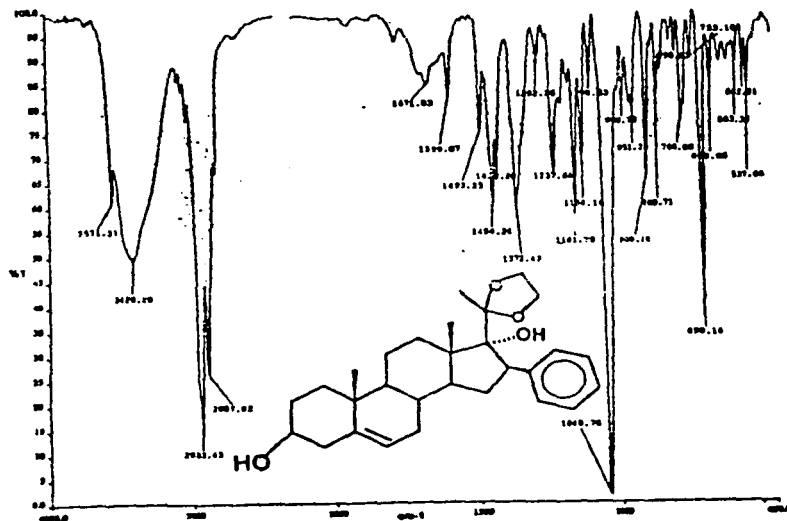


Figura 10.10 Espectro de IR del compuesto 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihidroxi-20-etilendioxo-16 $\beta$ -fenil-5-pregeno (V)

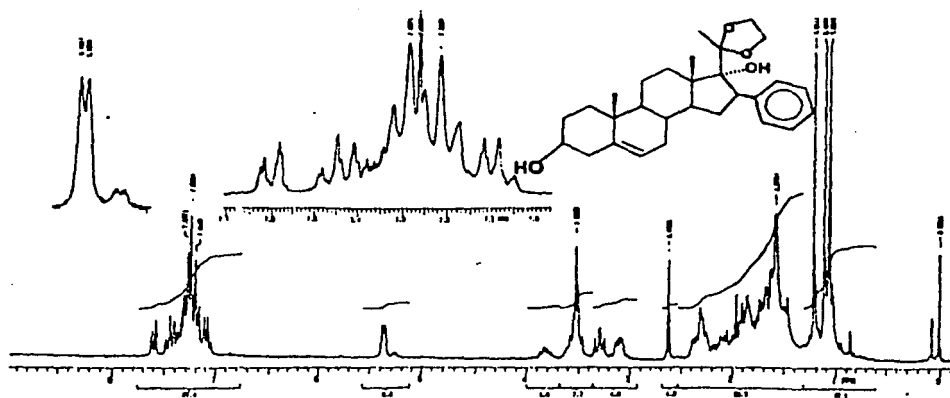


Figura 10.11 Espectro de RMN<sup>1</sup>H del compuesto 3β,17α-Dihidroxi-20-etilendioxi-16β-fenil-5-pregнено (V)

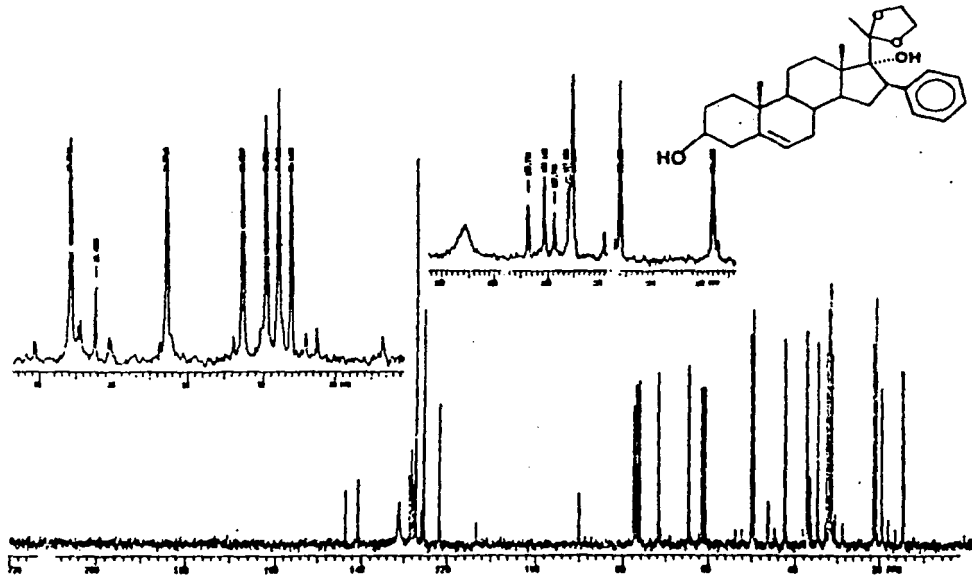


Figura 10.12 Espectro de RMN<sup>13</sup>C del compuesto 3β,17α-Dihidroxi-20-etilendioxi-16β-fenil-5-pregнено (V)

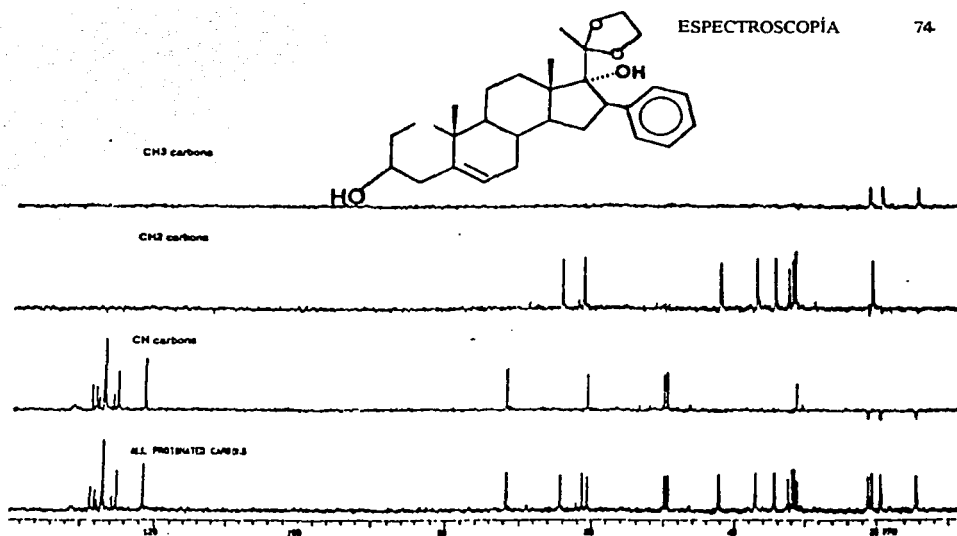


Figura 10.13 Espectro de RMN<sup>13</sup>C DEPT del compuesto 3β,17α-Dihidroxi-20-etilendioxi-16β-fenil-5-pregнено (V)

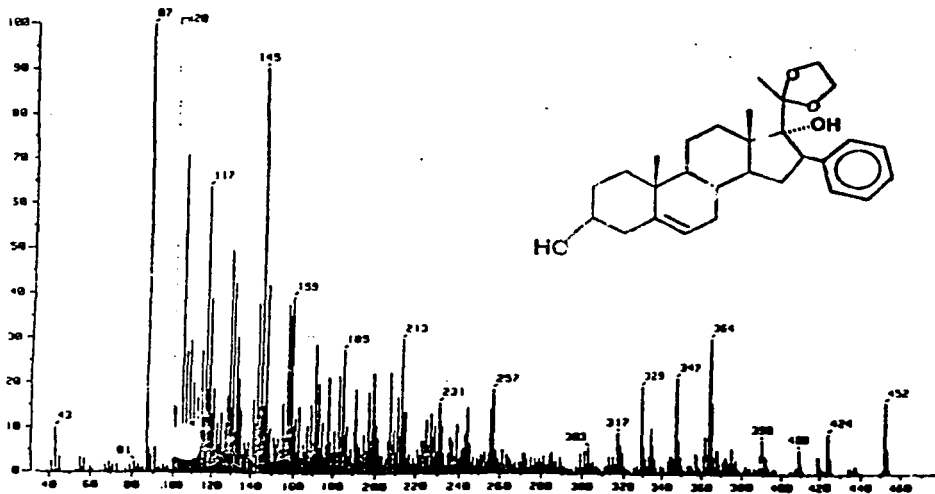


Figura 10.14 Espectro de EMIE del compuesto 3β,17α-Dihidroxi-20-etilendioxi-16β-fenil-5-pregнено (V)

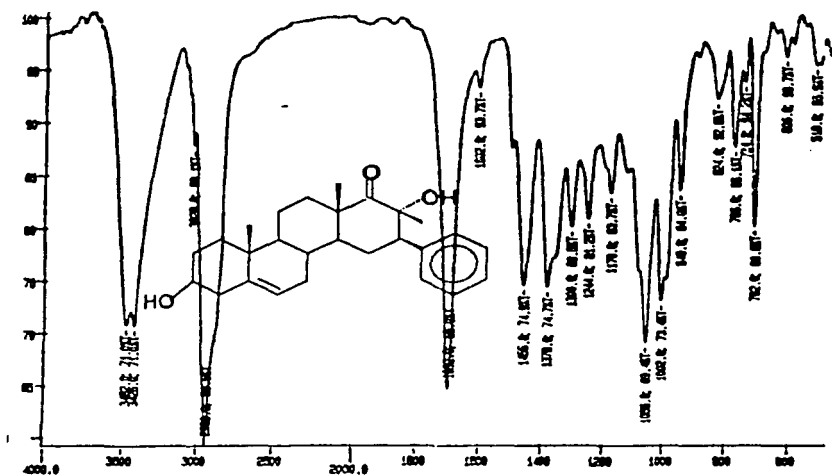


Figura 10.15 Espectro de IR del compuesto 3β,17α-Dihidroxi-16β-fenil-17β-metil-D-homo-5-pregnen-17a-ona (VI)

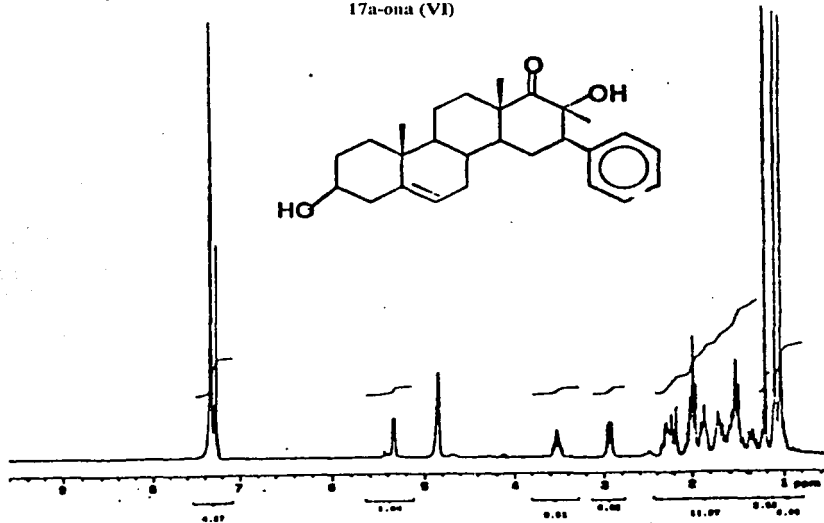


Figura 10.16 Espectro de RMN<sup>1</sup>H del compuesto 3β,17α-Dihidroxi-16β-fenil-17β-metil-D-homo-5-pregnen-17a-ona (VI)

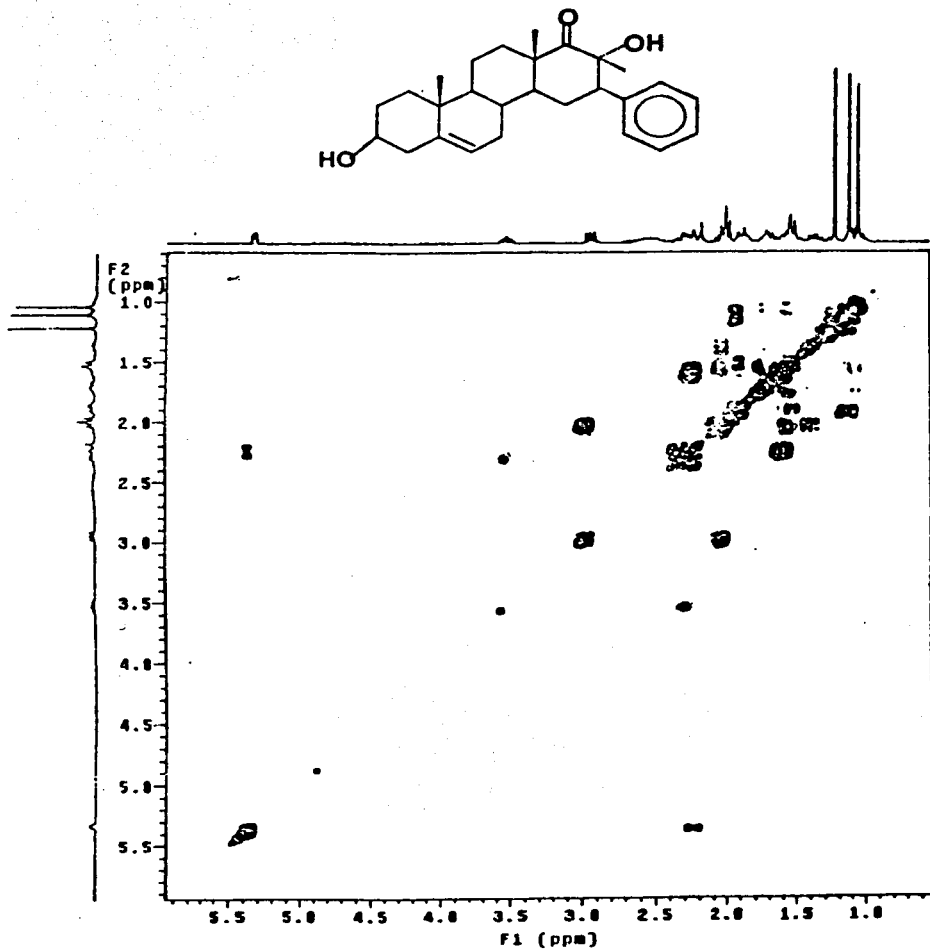


Figura 10.17 Espectro de COSY H-H del compuesto 3β,17α-Dihidroxi-16β-fenil-17β-metil-D-homo-5-pregnen-17a-ona (VI)



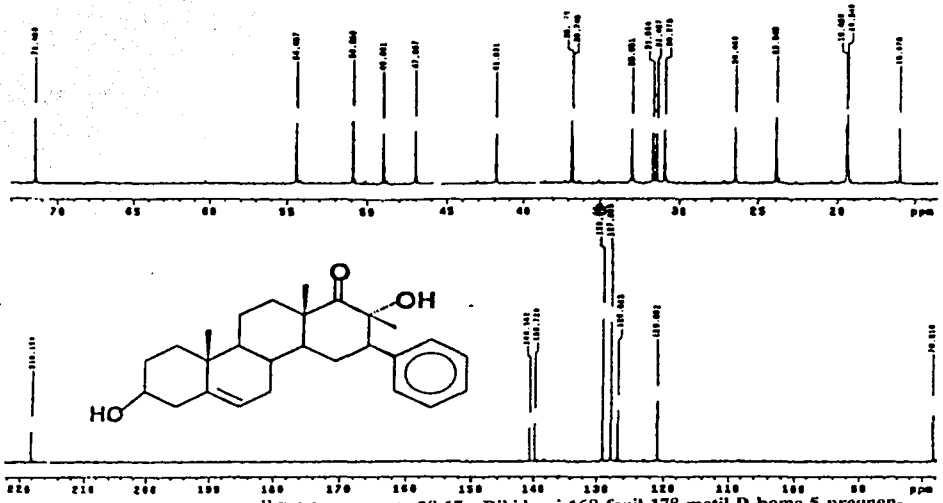
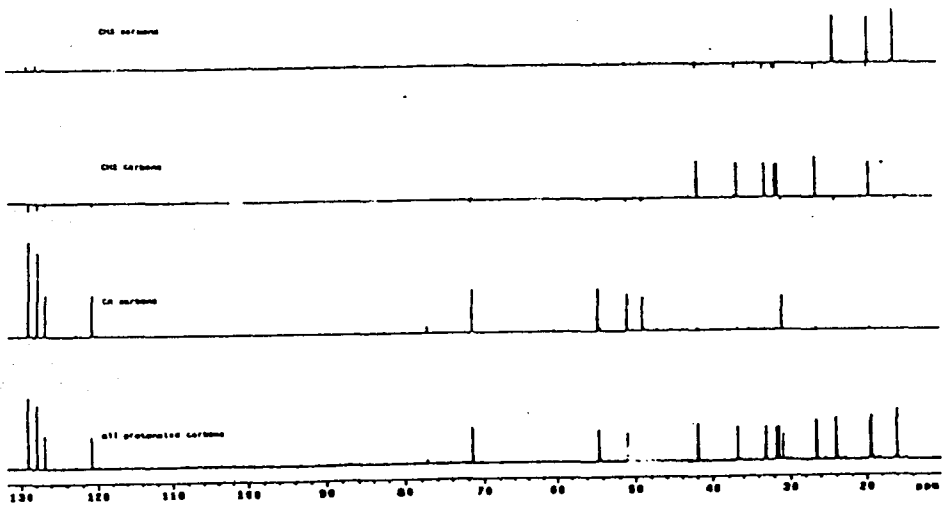


Figura 10.18 Espectro de RMN $^{13}\text{C}$  del compuesto  $3\beta,17\alpha$ -Dihidroxi-16 $\beta$ -fenil-17 $\beta$ -metil-D-homo-5-pregnen-17a-ona (VI)



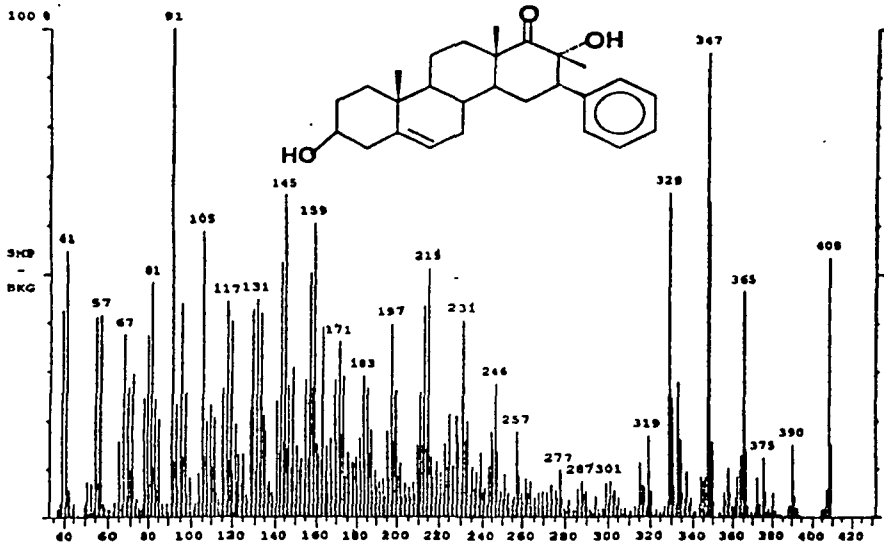


Figura 10.20 Espectro EMIE del compuesto 3 $\beta$ ,17 $\alpha$ -Dihidroxi-16 $\beta$ -fenil-17 $\beta$ -metil-D-homo-5-pregnen-17-ona (VI)

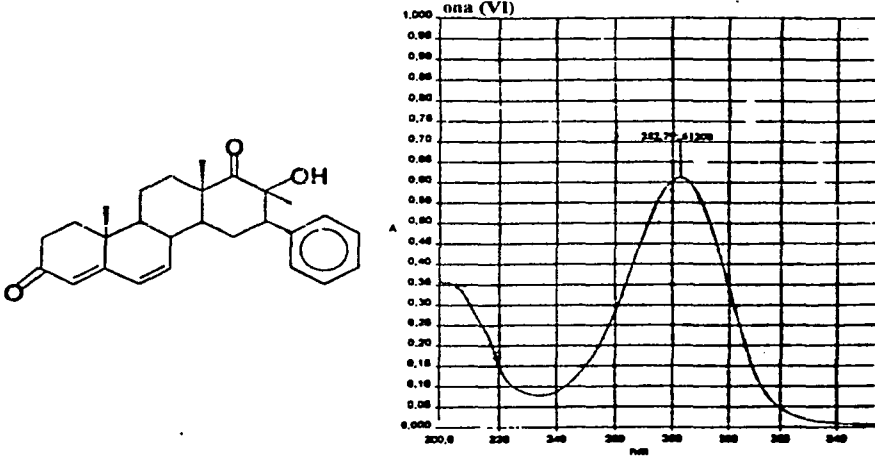


Figura 10.21 Espectro de UV del compuesto 16 $\beta$ -fenil-17 $\alpha$ -hidroxi-17 $\beta$ -metil-D-homo-4,6-pregadien-3,17-diona (VII)

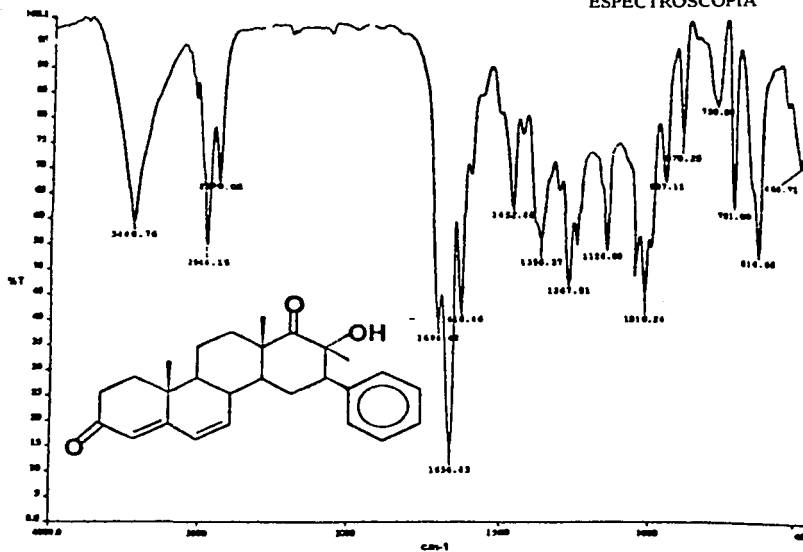


Figura 10.22 Espectro de IR del compuesto 16 $\beta$ -fenil-17 $\alpha$ -hidroxi-17 $\beta$ -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VII)

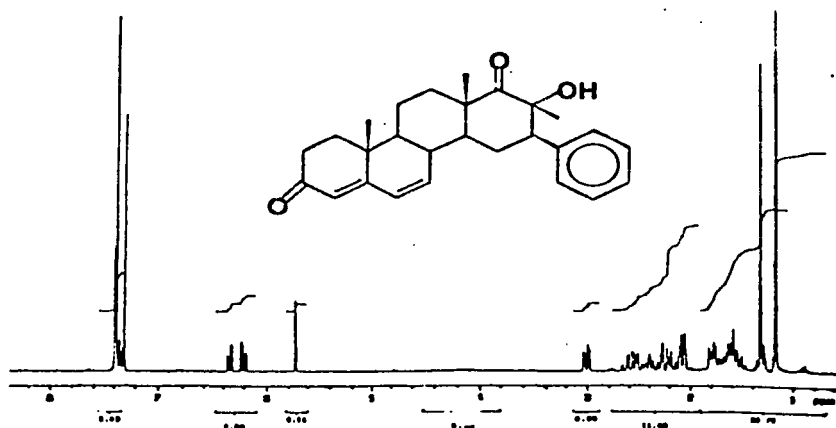


Figura 10.23 Espectro de RMN<sup>1H</sup> del compuesto 16 $\beta$ -fenil-17 $\alpha$ -hidroxi-17 $\beta$ -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VII)

ESTA TESIS NO SALE  
DE LA BIBLIOTECA

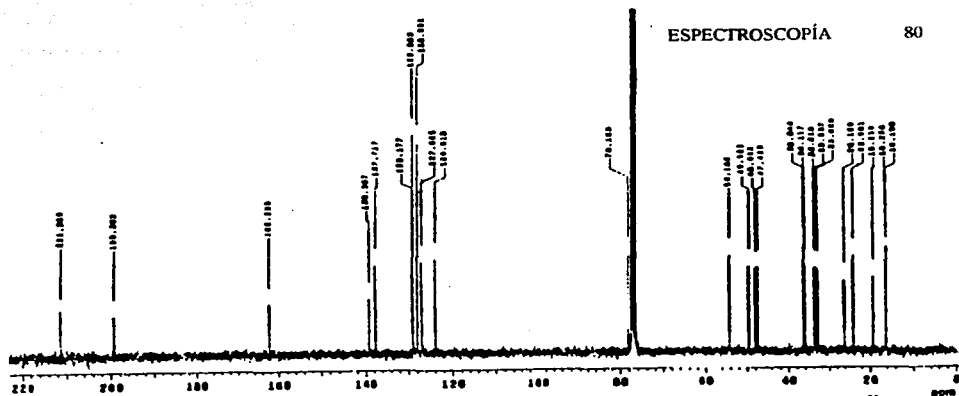


Figura 10.24 Espectro de RMN<sup>13</sup>C del compuesto 16 $\beta$ -fenil-17 $\alpha$ -hidroxi-17 $\beta$ -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VII)

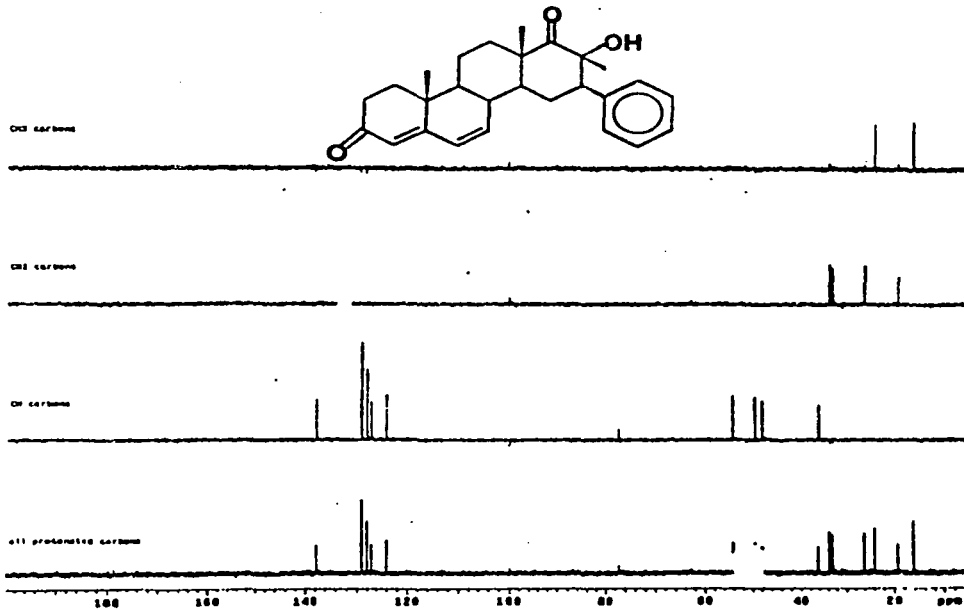


Figura 10.25 Espectro DEPT del compuesto 16 $\beta$ -fenil-17 $\alpha$ -hidroxi-17 $\beta$ -metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17a-diona (VII)

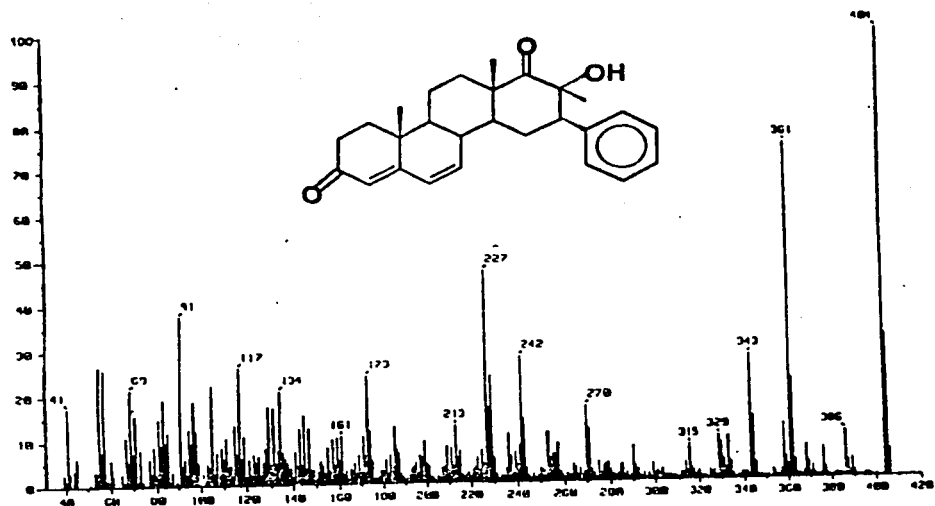


Figura 10.26 Espectro de EMIE del compuesto 16β-fenil-17α-hidroxi-17β-metil-D-homo-4,6-pregnadien-3,17α-diona (VII)