

00524
131



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

**SINTESIS DE ESTERES ALIFATICOS DE LA
PREGNADIONA**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA
P R E S E N T A :
SHEILA PALMA ARELLANO



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**

MEXICO, D. F.

2003



A



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

JURADO ASIGNADO

Presidente Elvia Del Socorro Reynoso Herrera.

Vocal María Del Rayo Salinas Vázquez.

Secretario Elena Guadalupe Ramírez López.

1^{er}.Suplente Josefina Elizalde Torres.

2^{do}.Suplente Martha Yolanda González Quezada.

Sitio donde se desarrolló el tema:

Departamento de Farmacia Edif.E Lab. 125 DEPg Facultad de Química, UNAM.

Asesora:


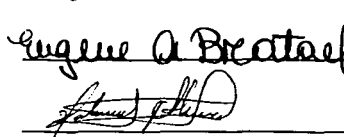
Dra. Elena Guadalupe Ramírez López

Supervisor Técnico:

Dr. Eugene Athanas Bratoeff Titeff

Sustentante:

Sheila Palma Arellano

La parte química del presente trabajo se realizó en el Laboratorio L-125 del Conjunto "E" de la Facultad de Química, UNAM.

La determinación de la actividad biológica del presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Hormonas (G-006) del Departamento de Sistemas Biológicos de la Universidad Autónoma Metropolitana campus Xochimilco, bajo la supervisión de la Dra. Marissa Cabeza.

AGRADECIMIENTOS

Para la realización de este trabajo agradezco a:

- ❖ Dra. Elena Ramírez por la asesoría y tiempo dedicado.
- ❖ Al Dr. Eugene Bratoeff por su apoyo y consejos.
- ❖ A las profesoras integrantes del jurado por el tiempo dedicado a la revisión a éste trabajo.
- ❖ A la Dra. Marissa Cabeza por su valioso apoyo en la determinación de la actividad biológica de los compuestos.
- ❖ A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) que a través del proyecto IN 200301 otorgó el soporte financiero.
- ❖ Al consejo Nacional de ciencia y Tecnología (CONACYT) que a través del proyecto G-33450-M por la beca otorgada para la Licenciatura.
- ❖ A la USAI por la realización de la espectroscopia de IR, RMN¹H, RMN¹³C y EMIE.

- ❖ A mi madre Silvia Arellano y hermano Alejandro por su cariño, confianza, apoyo y comprensión dados durante toda mi vida, que han estado a mi lado en las buenas y en las malas, por lo cual les dedico mi tesis con amor, cariño y respeto, esperando corresponder a su confianza al lograr alcanzar una de mis metas más anheladas.

- ❖ A mi padre Dr. Roberto Palma L. por su apoyo y confianza durante mi carrera.

- ❖ A mi familia en especial a mi abuelita Leonor Silva y a mi prima Irlanda Palacios por su cariño, apoyo y confianza que han brindado.

- ❖ A mis amigos por su amistad y apoyo que me brindaron durante mi carrera, que para mí fueron muy valiosos en esta etapa de mi vida: Larissa, Karina, Berenice, Katia, Selene, Lizeth, Laura, Israel, Rafael, Ari, Manuel, Moisés, Ernesto, Alejandro, Víctor y en especial a Josué Delgado V.
- ❖ A la Dra. Elena Ramírez por su amistad y apoyo brindado durante la realización de mi tesis, mil gracias.
- ❖ A mis compañeros del Laboratorio 125 Conjunto E por compartir conmigo su tiempo y conocimientos durante mi estancia.

INDICE GENERAL

CAPITULO 1

INTRODUCCIÓN	3
---------------------	----------

CAPITULO 2

ANTECEDENTES	7
2.1 Esteroides.	7
2.1.1 Clasificación.	8
2.1.2 Efectos Fisiológicos.	9
2.2 Hormonas sexuales.	10
2.3 Hormonas adrenocorticales.	11
2.4 Esteroides sintéticos.	11
2.5 Andrógenos.	12
2.5.1 La Testosterona.	12
2.5.2 Síntesis y biogénesis de la testosterona.	12
2.5.3 Mecanismo de acción de la testosterona.	14
2.5.4 Enzima 5 α -reductasa.	15
2.6 Antiandrógenos.	16
2.6.1 Síntesis de antiandrógenos.	16
2.6.2 Clasificación química de los antiandrógenos.	16
2.7 Acción biológica de los antiandrógenos.	18
2.7.1 Inhibidores de la síntesis de andrógenos	18
2.7.2 Inhibidores de la enzima 5 α -reductasa.	19
2.7.3 Antagonistas de los receptores androgénicos.	19
2.8 Patologías prostáticas	20
2.8.1 Síntomas de cáncer de próstata.	21
2.8.2 Tratamiento del cáncer de próstata.	21

CAPITULO 3

OBJETIVOS	23
------------------	-----------

CAPITULO 4

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

Etapas 1. Síntesis y caracterización	26
4.0 Purificación y caracterización de la materia prima (I) 3 β -ol-5-pregnen-20-ona.	27
4.1 Síntesis de 3 β -acetoxi-5-pregnen-20-ona (II).	28
4.2 Síntesis de 3 β -acetoxi-5,6-epoxi-pregna-20-ona (III).	29
4.3 Síntesis de 3 β -acetoxi-5-ol-pregna-6,20-diona (IV).	31
4.4 Síntesis de 3 β -acetoxi-4-pregnen-6,20-diona (V).	33
4.5 Síntesis de 3 β -ol-4-pregnen-6,20-diona (VI).	35
4.6 Síntesis de 4-pregnen-3 β -valeroiloxi-6,20-diona (S ₁ -A).	36
4.7 Síntesis de 3 β -(5-fenilvaleroiloxi)-4pregnen-6,20-diona (S ₂ -A).	38
Etapas 2. Actividad Biológica.	40
4.8 Actividad Biológica.	40
4.8.1 Evaluación <i>in vivo</i> del efecto antiandrogénico de los nuevos compuestos 4-pregnen-3 β -valeroiloxi-6,20-diona (S ₁ -A) y de 3 β -(5-fenilvaleroiloxi)-4pregnen-6,20-diona (S ₂ -A).	40
4.8.1.1 Efecto de los compuestos S ₁ -A y S ₂ -A sobre el diámetro de la mancha pigmentada de los órganos del flanco del hámster macho (Prueba de los órganos del flanco).	40
4.8.1.2 Efecto de los compuestos S ₁ -A y S ₂ -A sobre el peso de vesícula seminal y próstata.	41
4.8.2 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto inhibitorio de 4-pregnen-3 β -valeroiloxi-6,20-diona (S ₁ -A) y de 3 β -(5-fenilvaleroiloxi)-4pregnen-6,20-diona (S ₂ -A) sobre la enzima 5 α -reductasa.	41
4.8.3 Evaluación <i>in vitro</i> de la unión a receptores de andrógenos (presentes de la fracción citosólica obtenida de las vesículas seminales de hámster) con los	42

CAPITULO 5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etapa 1. Síntesis y caracterización.	44
Etapa 2. Actividad Biológica.	49

CAPITULO 6

CONCLUSIONES	53
--------------	----

CAPITULO 7

REFERENCIA BIBLIOGRAFIA	54
-------------------------	----

CAPITULO 8

ESPECTROSCOPIA	56
----------------	----

8.1 Espectros.

Espectros de 3 β -ol-5-pregnen-20-ona.

1 IR
2 RMN ¹H

Espectros de 3 β -acetoxi-5-pregnen-20-ona.

3 IR
4 RMN ¹H

Espectros de 3 β -acetoxi-5,6-epoxi-pregna-20-ona.

5 IR
6 RMN ¹H

Espectros de 3 β -acetoxi-5-ol-pregna-6,20-diona.

7 IR
8 RMN ¹H

Espectros de 3 β -acetoxi-4-pregnen-6,20-diona.

9 IR
10 RMN ¹H

Espectros de 3 β -ol-4-pregnen-6,20-diona.

11 IR
12 RMN ¹H

Espectros de 4-pregnen-3 β -valeroloxi-6,20-diona (S₁-A).

13 IR
14 EMIE
15 RMN ¹H
16- 21 RMN ¹³C

Espectros de 3 β -(5-fenilvaleroloxi)-4-pregnen-6,20-diona (S₂-A).

22 IF
23 EMIE
24 RMN ¹H
25 - 30 RMN ¹³C

INTRODUCCIÓN

Los esteroides son compuestos que contienen el núcleo del ciclopentanoperhidrofenantreno. Incluyen una gran variedad de compuestos de origen natural, entre los que se encuentran los esteroides, los ácidos biliares, las hormonas sexuales como los andrógenos (hormonas masculinas) y los estrógenos (hormonas femeninas).

Una hormona es una sustancia química secretada en los líquidos corporales internos por una célula o grupo de células que ejercen un efecto de control fisiológico sobre otras células del organismo.

Los andrógenos son secretados por los testículos y la hipófisis. La testosterona (T) (Figura 1.1), es el andrógeno que regula la diferenciación sexual, la expresión de las características sexuales secundarias y los modelos de comportamiento sexual². Está bien establecido que los andrógenos juegan un papel importante en los desórdenes prostáticos como en la hipertrofia prostática benigna (HPB) y en el cáncer de próstata³.

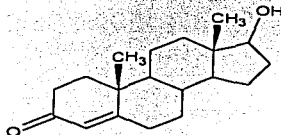


Figura 1.1 Testosterona (T)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

El cáncer de próstata y la hiperplasia prostática benigna (HPB) son enfermedades muy comunes en hombres de edad promedio de 55 años, debido a que la próstata es un órgano susceptible de sufrir aumento de tamaño y que está relacionado con tumores benignos o malignos y enfermedades de tipo infeccioso. Este órgano está localizado en la pelvis debajo de la vejiga rodeando la porción superior de la uretra, por tal razón, cualquier trastorno ocurrido a la próstata puede obstruir el flujo de orina causando que la micción se torne difícil y dolorosa provocando alteraciones graves en la vejiga, los uréteres y los riñones^{4,5}.

Entre los factores que dan origen al cáncer y la hiperplasia prostática benigna (HPB) se encuentran la predisposición genética, los factores ambientales (ocupacionales, dietas, fármacos, contaminantes) y desórdenes hormonales (presencia del andrógeno 5 α -dihidrotestosterona)⁶.

La 5α -dihidrotestosterona (5α -DHT) (Figura 1.2), es el metabolito activo del andrógeno T que se forma por la presencia de la enzima 5α -reductasa. Por lo que la inhibición de esta enzima podría ser entonces una estrategia farmacológica adecuada para curar tanto la HPB como el cáncer de próstata.

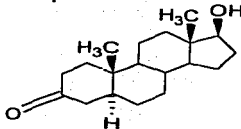


Figura 1.2 5α -dihidrotestosterona (5α -DHT).

Los tratamientos actuales para desórdenes prostáticos incluyen la cirugía y la radiación, empleados principalmente para eliminar el cáncer local. Sin embargo, estos tratamientos presentan efectos secundarios como incontinencia, impotencia sexual y los efectos propios de la radiación⁹. (La terapia hormonal empieza a utilizarse más ampliamente, principalmente en hombres con cáncer de próstata metastásico). En la actualidad se dispone de compuestos sintéticos para inhibir la acción androgénica de la T y de la 5α -DHT. Uno de ellos es el acetato de ciproterona (ACP) (Fig. 1.3) que se une al receptor androgénico para dar una respuesta antiandrogénica. Por otra parte, la finasterida (Fig. 1.4) es un inhibidor de la enzima 5α -reductasa¹⁰ que efectúa una disminución del tamaño de la próstata, mejoras del flujo urinario y reducción de los síntomas de desórdenes prostáticos^{11,12}.

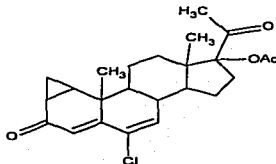


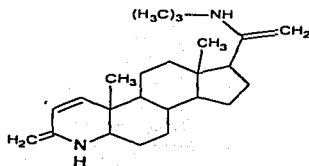
Figura 1.3 Acetato de ciproterona (ACP)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Debido al amplio uso que tienen los antiandrógenos en la terapia se hace indispensable la síntesis de nuevos productos que tengan actividad antiandrogénica y provoquen bajos efectos secundarios.

Es por esta razón, que surgen nuevas estrategias terapéuticas para buscar compuestos sintéticos que sean capaces de actuar sobre el receptor androgénico o como inhibidores de la 5α -reductasa para el tratamiento de varias enfermedades provocadas por andrógenos como el acné, seborrea, alopecia androgénica, pubertad precoz, así como cáncer de próstata y la HPB^{7,8}.

La finasterida (F) (Fig 1.4), es el primero de una clase de compuestos farmacéuticos conocidos como inhibidores de la enzima 5 α -reductasa tipo 2 que está presente en la glándula prostática. Este fármaco tiene un efecto inhibitorio limitado para la isoenzima tipo 1 encontrada en la piel. La finasterida (Proscar nombre comercial) ha sido indicado para el tratamiento de la HPB y cáncer de próstata, el medicamento efectúa una disminución del tamaño de la próstata, mejoras del flujo urinario y reducción de los síntomas. Este medicamento proporciona una alternativa a la intervención quirúrgica. Existen antecedentes de que los pacientes tratados presentan pocos efectos colaterales y casi todos presentan tolerancia al fármaco ^{11,12}.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 1.4 Finasterida (F)

El análisis de la relación estructura-actividad biológica de los antiandrogénos esteroidales reportados en la literatura, ha concluido que su actividad se debe a la presencia de funciones químicas que modifican el esqueleto del esteroide como la coplanaridad, conferida por la presencia del 1 α -2 α -ciclotometilo en C-1 y C-2, las insaturaciones entre los carbonos C-4 y C-5, C-6 y C-7, un grupo electronegativo en C-6 y un sustituyente en C-17; así como la presencia de los grupos cetónicos en C-3 y C-20 ¹³.

Considerando lo anterior, en este trabajo se propuso la síntesis de dos compuestos esferoidales que poseen en su estructura los grupos necesarios para mostrar actividad antiandrogénica (inhibidor de la enzima 5 α -reductasa ó competidor por el receptor androgénico). Los compuestos sintetizados son: el compuesto S₁-A (4-pregnen-3 β -valeroiloxi-6,20-diona.) (Fig. 1.5) y el compuesto S₂-A (3 β -(5-fenilvaleroiloxi)-4-pregnen-6,20-diona.) (Fig. 1.6). Para obtener los compuestos de interés se siguió una ruta de síntesis con un total de 6 pasos, empleando como materia prima el 3 β -ol-5-pregnen-20-ona (I) (Fig.1.7).

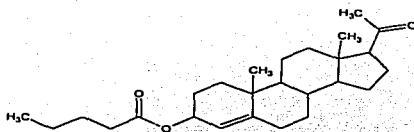


Figura 1.5. S₁-A (4-pregnen-3β-valeroloxi-6,20-diona)

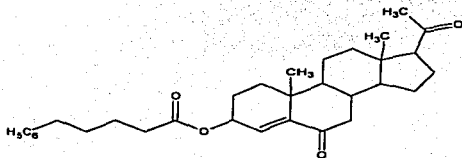


Figura 1.6. S₂-A (3β(5-fenilvaleroloxi)-4pregnen-6,20-diona)

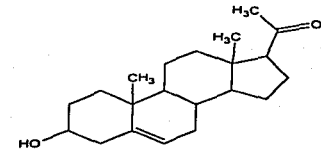


Figura 1.7. 5-pregnen-3β-ol-20-ona (I)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La evaluación de estos compuestos se hizo *in vivo* considerando el efecto antiandrógeno, la evaluación *in vitro* como inhibidores de la enzima 5α-reductasa y la evaluación *in vitro* de la unión a receptores androgénicos. Además, los nuevos compuestos se caracterizaron por sus propiedades físicas (punto de fusión) y espectroscópicas (IR, RMN ¹H y RMN ¹³C, EMIE).

ANTECEDENTES

2.1 Esteroides.

Los esteroides son lípidos de plantas y animales con un esqueleto tetracíclico de carbono característico mostrado en la Fig. 2.1. Al igual que las prostaglandinas, los esteroides se encuentran ampliamente distribuidos en los tejidos corporales y tienen una gran variedad de actividades fisiológicas.

Un esteroide es una molécula orgánica, los cuatro anillos se designan A, B, C y D, comenzando con el extremo inferior izquierdo y los átomos de carbono se numeran comenzando con el anillo A¹⁴.

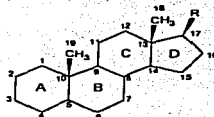


Fig. 2.1 Esqueleto característico de los esteroides

Los esteroides más característicos son:

- a) **Esteroles.** De todos ellos, el colesterol es el de mayor interés biológico. Forma parte de las membranas biológicas a las que les confiere resistencia y además es el precursor de casi todos los demás esteroides. (Fig. 2.2)

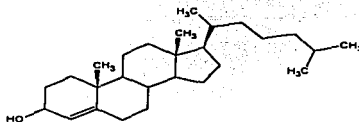


Figura 2.2 Colesterol, alcohol esteroide presente en los tejidos de los vertebrados, principal constituyente para producir otros esteroides.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

- b) **Ácidos biliares.** Derivan de los ácidos cólico, desoxicólico y quenodesoxicólico, cuyas sales emulsionan las grasas por lo que favorecen su digestión y absorción intestinal.

c) **Hormonas.** Mensajeros químicos secretados por las glándulas y transportados por la corriente sanguínea a los tejidos blanco o efectores¹⁵. Incluyen las de la corteza suprarrenal, que estimulan la síntesis del glucógeno y la degradación de grasas y proteínas (*cortisol*) y las que regulan la excreción de agua y sales minerales por las nefronas del riñón (*aldosterona*). También son de la misma naturaleza las hormonas sexuales masculinas (andrógenos como la *testosterona*) y femeninas (*estrógenos* y *progesterona*) que controlan la maduración sexual, comportamiento y capacidad reproductora¹.

2.1.1 Clasificación.

Los esteroides, se clasifican de acuerdo a su esqueleto base. Por lo general, se encuentran sustituidos en C-10 y C-13 por grupos metilo y un grupo hidroxilo o carbonilo en C-3. Para nombrarlos se toma en cuenta la cadena presente en posición C-17. Los esqueletos se muestran en la Fig. 2.3.

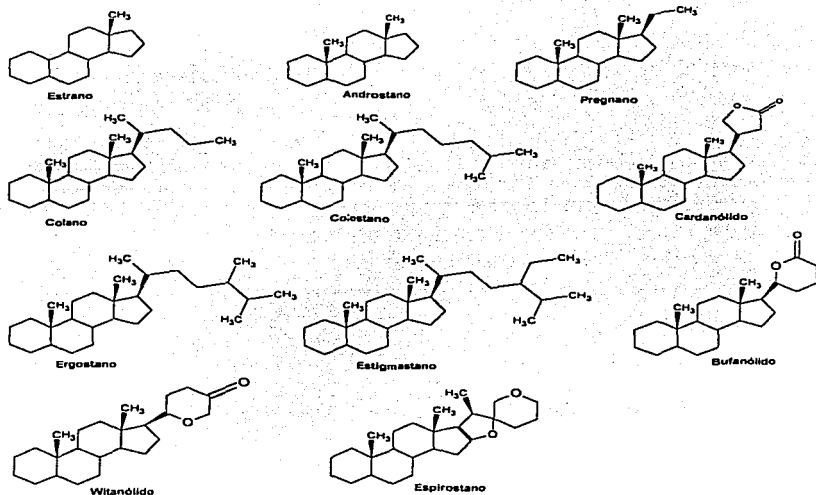
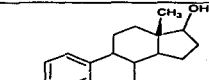
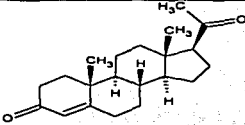
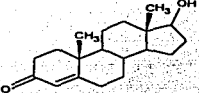
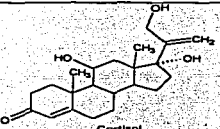
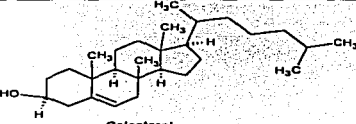


Figura 2.3 Clasificación de los esteroides según su esqueleto base.

2.1.2 Efectos Fisiológicos.

Los efectos fisiológicos de los esteroides varían considerablemente de unos a otros, desde su comportamiento como vitaminas hasta como hormonas sexuales ^{8,10}. En la Fig. 2.4 se muestran algunos ejemplos.

 <p><chem>CC12CCC3=C4C=CC(=C4O)CCC3=C1O</chem></p> <p>Estradiol</p>	<p>Hormona estrogénica más importante de la mujer, secretada en por los ovarios.</p>
 <p><chem>CC(=O)CC12CCC3=C(C)CC(=O)CCC3=C1</chem></p> <p>Progesterona</p>	<p>Hormona del embarazo, se secreta por el cuerpo lúteo. Es la progestina más abundante, es un precursor de los glucocorticoides, de los mineralocorticoides y de la testosterona.</p>
 <p><chem>CC12CCC3=C(C)CC(=O)CCC3=C1O</chem></p> <p>Testosterona</p>	<p>Hormona sexual masculina, regula la diferenciación sexual, la expresión de las características sexuales secundarias y los modelos de comportamiento sexual.</p>
 <p><chem>CC12CCC3=C(C)CC(=O)CCC3=C1(O)C(O)C(O)C</chem></p> <p>Cortisol</p>	<p>Posee múltiples funciones metabólicas para el control del metabolismo de las proteínas, de los hidratos de carbono y de las grasas.</p>
 <p><chem>CC(C)CCCC(C)[C@H]1CC[C@@H]2[C@@]1(CC[C@H]3[C@H]2CC=C4[C@@]3(CC[C@@H](C4)O)C)C</chem></p> <p>Colesterol</p>	<p>Precursor de las hormonas esteroidales y de los ácidos biliares. Se encuentra en casi todos los tejidos de los vertebrados y es el principal constituyente de los cálculos o piedras biliares.</p>

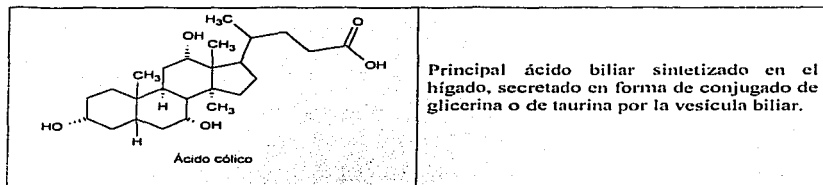


Figura 2.4 Estructuras y efectos fisiológicos de algunos esteroides.

2.2 Hormonas sexuales.

La *Testosterona* (Fig. 2.4) y la *Androsterona* (Fig. 2.5) son las dos hormonas sexuales masculinas más importantes. Son las encargadas del desarrollo de las características sexuales secundarias del varón durante la pubertad y promueven el desarrollo tisular y muscular. Ambas son sintetizadas en los testículos a partir de colesterol.

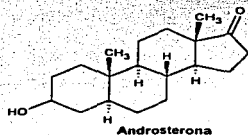


Figura 2.5 ejemplo de un Andrógeno importante.

La estrona y el estradiol son las dos hormonas sexuales femeninas **estrógenos** (Fig 2.6) más importantes. Son sintetizadas en los ovarios a partir de la testosterona y a ellas se debe el desarrollo de las características sexuales secundarias de la mujer y la regulación del ciclo menstrual. Ambas tienen un anillo A aromático tipo benceno. Además, otro grupo de hormonas sexuales llamadas progestinas son esenciales ya que de preparan el útero para la implantación durante el embarazo del óvulo fecundado. La progesterona es la progestina más importante ¹⁴.

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

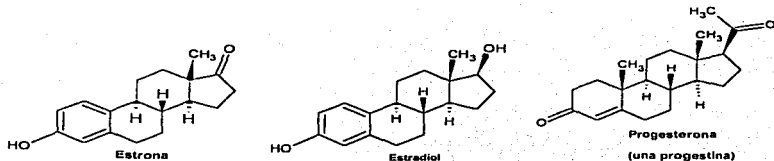


Figura 2.6 Estrógenos más importantes.

2.3 Hormonas adrenocorticales.

Los esteroides adrenocorticales son secretados por las glándulas suprarrenales, pequeños órganos localizados cerca del extremo superior del riñón. Existen dos tipos de esteroides adrenocorticales, llamados *mineralocorticoides* y *glucocorticoides*. Los mineralocorticoides como la *aldosterona* (Fig. 2.7), controlan la hinchazón tisular regulando el equilibrio salino celular entre Na^+ y K^+ . Los glucocorticoides como la *hidrocortisona* (Fig. 2.7) participan en la regulación del metabolismo de la glucosa y en el control de la inflamación. Los ungüentos de glucocorticoides se utilizan ampliamente para reducir la inflamación causada por el contacto con encino venenoso o con hiedra venenosa

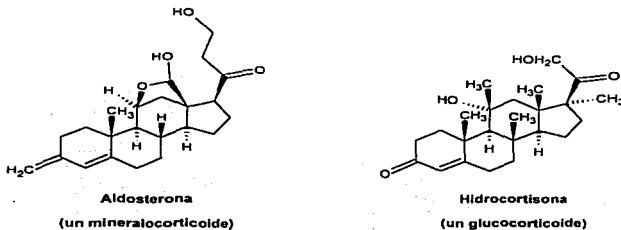


Figura 2.7 Ejemplos de esteroides *mineralocorticoides* y *glucocorticoides*.

2.4 Esteroides sintéticos.

Además de los muchos cientos de esteroides aislados de plantas y animales, se han sintetizado otros miles en laboratorios farmacéuticos, en la búsqueda de nuevos medicamentos. La idea es que, a partir de una hormona natural, se modifique químicamente su estructura y después determinar qué propiedades biológicas presenta el esteroide modificado.

Entre los esteroides sintéticos mejor conocidos se encuentran los anticonceptivos ingeribles y los agentes anabólicos. La mayoría de las píldoras para el control natal consisten de una mezcla de dos compuestos a saber, un estrógeno sintético como el *etinilestradiol* y una progestina sintética como la *noretindrona* Fig. 2.8. Los esteroides anabólicos como el *estanozolol*, detectado en el organismo de algunos atletas durante los juegos olímpicos de 1988 y 1992, son andrógenos sintéticos que imitan los efectos formadores de tejido de la testosterona natural ¹⁴.

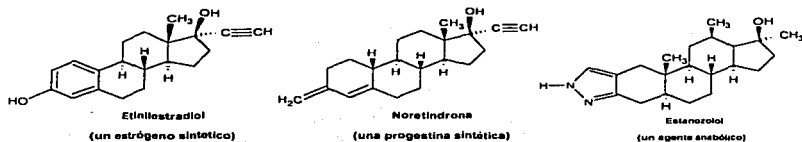


Figura 2.8 Ejemplos de algunos esteroides sintéticos

2.5 Andr6genos.

Los andr6genos son compuestos esteroidales que regulan las caracteristicas m1s importantes en el comportamiento sexual de los hombres, tienen tres efectos principales como regular el funcionamiento de la pr6stata y vesiculas seminales, actuar como anab6lico y son los responsables de la expresi6n de algunos caracteres secundarios ¹⁷.

2.5.1 La Testosterona.

La testosterona (Fig.2.4) se forma en las c6lulas intersticiales o c6lulas de Leydig, que est1n situadas en los intersticios que quedan entre los t6bulos seminiferos y que constituyen aproximadamente el 20 % de la masa de los testiculos adultos ¹.

La cantidad de T es tan superior a las otras, que se puede considerar como la hormona testicular m1s importante y la mayoria de ella es convertida a 5a-DHT, que es m1s activa en los tejidos blanco o tejidos diana ¹.

2.5.2 Sntesis y biog6nesis de la testosterona.

La producci6n de T en los testiculos y su liberaci6n en el organismo se muestran en la Fig. 2.9. El hipot1lamo secreta la Hormona Liberadora de Gonadotropinas (GnRH) que controla la sntesis y liberaci6n de las hormonas de las g6nadas, su nombre especifico es Factor de Liberaci6n de la Hormona Luteinizante, el cual, estimula la secreci6n de la Hormona Estimulante de las C6lulas Intersticiales (HSCI) y la Hormona Foliculo Estimulante (FSH) en el l6bulo anterior de la hip6fisis. El siguiente paso es la producci6n de testosterona en los testiculos, bajo la influencia de HSCI y la hormona luteinizante (LH).

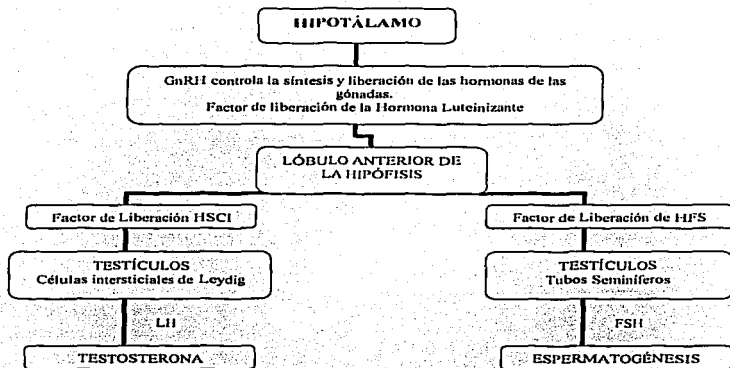


Figura.2.9 Liberación de testosterona en el organismo.

Aproximadamente un 95 % de la T es producida en los testículos y el 5% es liberada en las glándulas suprarrenales. La T es la hormona sexual masculina predominante en circulación y se encuentra relacionada con el desarrollo, crecimiento y conservación de los órganos genitales masculinos ^{4,18}.

La biogénesis de T en el organismo Fig. 2.10¹⁸ se lleva a cabo mediante la degradación enzimática parcial de la cadena lateral del colesterol (C-20) dando lugar a la formación de la pregnenolona (1) y posteriormente la producción de progesterona (2) que es el precursor de la testosterona (3) ^{16,19}.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

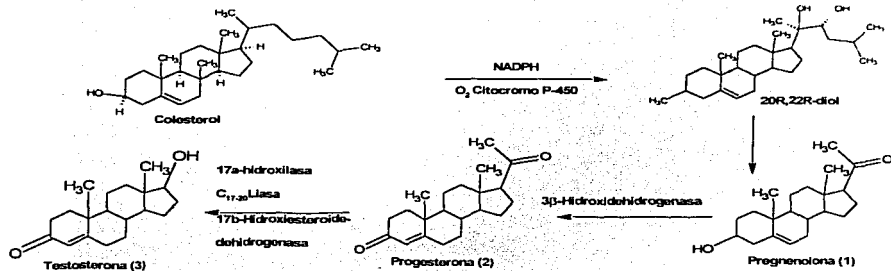


Figura 2.10 Biogénesis de Testosterona en el organismo. Reacciones enzimáticas de degradación de la cadena lateral de colesterol que dan origen a la pregnenolona y testosterona.

2.5.3 Mecanismo de acción de la testosterona.

La transformación de T a su metabolito reducido 5α -DHT, en presencia de la enzima 5α -reductasa (presente en el citoplasma de las células prostáticas) es dependiente del factor NADPH.

La T está considerada como una prehormona, el mecanismo de acción consiste en que la T penetra en las células blanco, al parecer por difusión pasiva^{20,21}, en el retículo endoplásmico o en la membrana nuclear se lleva a cabo la transformación de la prehormona en 5α -DHT, la transformación es biológicamente irreversible y está catalizada por una enzima que se encuentra fija en la membrana, 5α -reductasa que requiere de NADPH.

Esta transformación consiste en la reducción regio y estereoespecífica por la adición del hidruro del NADPH a la posición 5 de la T. El enolato resultante en C-3 y C-4 se estabiliza por un residuo electrofílico (E+) de la enzima 5α -reductasa. Posteriormente, por tautomerismo, se regenera el grupo del carbonilo formandose así la 5α -DHT y la liberación de NADPH. Fig.2.11^{6,11,22}.

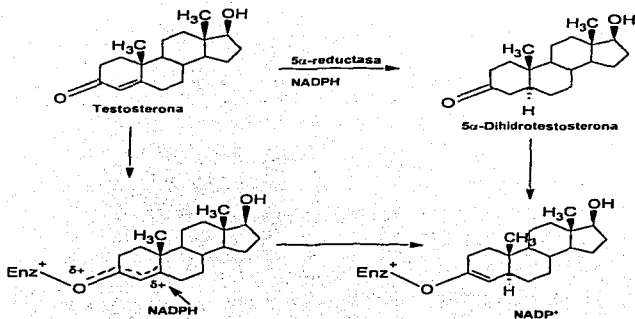


Figura 2.11 Mecanismo de conversión de T a 5α-DHT

La T penetra en las células en pocos minutos tras la secreción, se convierte a 5α-DHT y, se enlaza a una "proteína" citoplasmática. Esta combinación emigra después al núcleo, donde se une a una proteína nuclear e induce el proceso de transportación de ADN a ARN. En los 30 minutos siguientes, se ha activado la polimerasa de ARN y la concentración de éste comienza a aumentar en las células; esto va seguido de un aumento progresivo de la proteína celular. Tras varios días, la cantidad de ADN de la glándula también se ha incrementado y se ha producido un aumento simultáneo del número de células prostáticas. Por tanto, la T estimula la producción de proteínas en casi cualquier lugar del organismo aunque aumenta más específicamente las proteínas en órganos o tejidos "diana" responsables del desarrollo de los caracteres sexuales secundarios¹.

La unión de la 5α-DHT a receptores intracelulares específicos forman un complejo hormona receptor²³, que penetra al núcleo celular y se une a la cromatina, se produce entonces una estimulación de la síntesis ARN tanto mensajero como ribosómico, como consecuencia, se produce un aumento de la síntesis proteica y de enzimas intracelulares, las cuales son responsables de las acciones androgénicas¹¹.

2.5.4 Enzima 5α-reductasa.

Existen dos isoenzimas de la 5α-reductasa: la de tipo I y la de tipo II, las cuales difieren en sus propiedades bioquímicas, tejido de localización y su función^{6,18,22}.

La tipo I se encuentra en la piel no genital, hígado y próstata ventral. Tiene un pH óptimo ligeramente alcalino (pH=6-8.5) y requiere de concentraciones elevadas de T para saturarse (Km=3μM), funcionando de un modo catabólico en la remoción de andrógenos por el hígado y la piel no genital.

La tipo II, se encuentra presente predominantemente en la próstata ventral, vesículas seminales y testículos. Tiene un pH óptimo ácido (pH=5) y requiere de concentraciones bajas de T para saturarse ($K_m = 0.5 \mu M$), funciona de manera anabólica en la expresión de los andrógenos por la conversión efectiva de T a 5 α -DHT^{11,18,23-25}. También se menciona la relación inversa que presenta la actividad de las dos isoenzimas frente a un mismo tipo de inhibidor, pues mientras un compuesto resulta ser muy activo sobre la isoenzima tipo II, en la mayoría de los casos es poco activo sobre la isoenzima tipo I¹⁸.

2.6 Antiandrógenos.

Son sustancias químicas, generalmente esteroides sintéticos o de origen endógeno, que constituyen una amplia gama de fármacos asociados con hiperandrogenismo²⁶.

Los antiandrógenos previenen la expresión de los andrógenos en su sitio de acción al bloquear los receptores androgénicos en los órganos blanco, esto debido al carácter antagonico competitivo de los antiandrógenos frente a los andrógenos por unirse a la misma proteína receptora. Esto puede deberse también a que inhiben o modifican la entrada de testosterona a la célula o bien a la inhibición de su conversión a su forma activa 5 α -DHT²³⁻²⁵.

Muchos estudios realizados han demostrado que cuando el cáncer de próstata se manifiesta, los niveles de T y en particular de 5 α -DHT están altos, por lo que los antiandrógenos juegan un papel muy importante, ya que con su estructura similar a los andrógenos, actúan como inhibidores competitivos de la enzima 5 α -reductasa, disminuyendo así los niveles de la forma activa del andrógeno.

2.6.1 Síntesis de antiandrógenos.

Existen básicamente dos métodos para sintetizar un esteroide con características antiandrogénicas. Los cuales se describen a continuación^{9,27}:

1. Se toma como esqueleto base a la molécula de T y se efectúan en ella diversas modificaciones estructurales, de manera que se tenga un efecto antagonico. Así, el nuevo compuesto sintetizado tendrá posiblemente la capacidad de unirse al receptor sin producir efecto androgénico.
2. Se modifica la molécula de progesterona, pues ésta tiene cierto carácter antiandrogénico natural y se esperaría que sus análogos sintéticos presentarían la misma actividad biológica.

2.6.2 Clasificación química de los antiandrógenos.

Los antiandrógenos se clasifican en dos grupos: esteroidales y no esteroidales.

- a) Los tipo esterooidal, son compuestos que derivan de la progesterona (Fig. 2.6, pág. 11), como son la medrogesterona, acetato de ciproterona (Fig. 1.3), anorprogesterona (Fig. 2.12) y la finasterida (Fig. 1.4) o de la testosterona como por

ejemplo la metiltestosterona (Fig.2.13). Además de los antiandrógenos ya mencionados se conocen otro grupo de éstos cuya síntesis no deriva ni de la T ni de la progesterona; tal es el caso de la espirolactona y la espirixazona (Fig. 2.14), que poseen características similares a la progesterona²⁸.

Dentro de las ventajas que presentan dichos compuestos son: actuar específicamente sobre el receptor androgénico y gran interés terapéutico por su costo-eficiencia. Algunas desventajas que provocan estos compuestos son: la caída de cabello, reducción del tamaño de los órganos sexuales e impotencia.

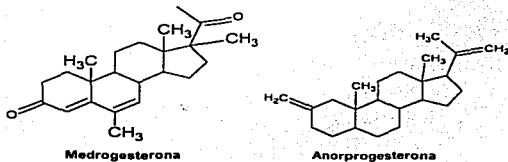


Figura 2.12 Antiandrógenos esteroidales derivados de la progesterona.

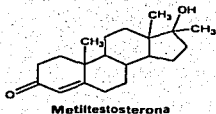


Figura 2.13 Antiandrógeno esteroideal derivado de la testosterona.

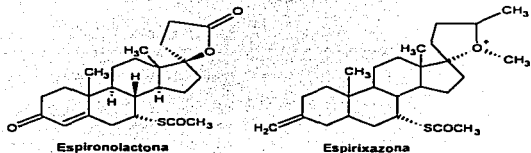


Figura 2.14. Antiandrógenos que no derivan de la progesterona y/o testosterona.

- b) Los antiandrógenos no esteroidales (Fig. 2.15), también presentan algunas ventajas: tienen afinidad por el receptor debido a su estructura química con geometría semejante y reducen en un 25 a 30 % el tamaño de la próstata. Dentro de las desventajas que se han observado son que actúan sobre la *óxido nítrico sintetasa* que estimula la erección y ocasiona insuficiencia hepática²⁹.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

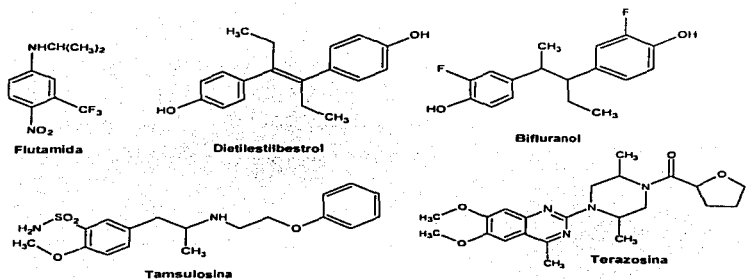


Figura 2.15 Antiandrógenos no esteroideos.

2.7 Acción biológica de los antiandrógenos.

2.7.1 Inhibidores de la síntesis de andrógenos.³⁰

Los compuestos leuprolina y goserelina (Fig. 2.16) provocan una respuesta antiandrogénica por la inhibición de la síntesis de T al bloquear la acción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRF) (Fig. 2.9, pág. 13) sobre la adenohipófisis, resultando una baja en la liberación de la hormona luteinizante que promueve la formación de testosterona en los testículos.

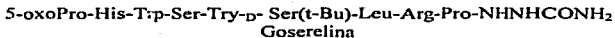
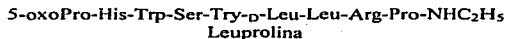


Figura 2.16. Inhibidores de la hormona liberadoras de gonadotropinas (GnRF)

Algunos agentes del tipo imidazol, como el ketoconazol (Fig. 2.17) tienen, como efectos secundarios, la propiedad de bloquear al citocromo P-450, complejo enzimático involucrado en la biosíntesis de hormonas esteroideas. Este fármaco inhibe las enzimas 17 α -hidroxilasa y 17,20-liasa, que convierten la pregnenolona y la progesterona en andrógenos.

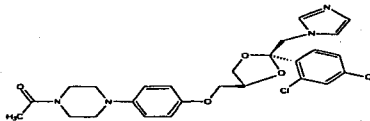


Figura 2.17 Ketoconazol

La espironolactona (Fig.2.14), antagonista de aldosterona, actúa como un inhibidor débil de la unión del andrógeno con su receptor.

2.7.2 Inhibidores de la enzima 5 α -reductasa.

La inhibición de esta enzima, puede ser selectiva al bloquear su acción sobre la T en un tejido específico (próstata, folículo piloso) en donde es esencial la producción continua del metabolito 5 α -DHT (Fig. 2.11. pág. 15). Un ejemplo de un fármaco que tienen este mecanismo de acción es la finasterida (Fig 1.4)

2.7.3 Antagonistas de los receptores androgénicos.

Existen numerosos fármacos que son antagonistas específicos (competidores) por la unión al receptor androgénico. Entre ellos está el acetato de ciproterona (Fig. 1.3) y la flutamida (Fig. 2.15).

El compuesto acetato de ciproterona (ACP)³¹ (Fig. 1.3), es uno de los medicamentos antiandrogénicos que se encarga de inhibir el desarrollo de todos los órganos y las funciones reguladas por los andrógenos: glándulas sexuales accesorias, espermatogénesis, maduración ósea, así como algunos sistemas menos específicos del sexo. Su síntesis creó muchas expectativas en el tratamiento del cáncer de próstata por su menor potencial de efectos secundarios en comparación con los *estrógenos* y la capacidad del ACP de contrarrestar los efectos tanto de los andrógenos de origen testicular como suprarrenal. Además, el ACP actúa como antiandrógeno por:

1. La inhibición de la secreción de gonadotropinas en el hipotálamo (Fig. 2.9 pág.15)
2. La competencia por el receptor androgénico.

2.8 Patologías prostáticas.

La formación del andrógeno 5 α -DHT por la enzima 5 α -reductasa a partir de la testosterona (Fig. 2.11. pág. 15) está relacionada con diversas patologías prostáticas.

La próstata es una glándula exclusiva del sexo masculino que normalmente tiene el tamaño y forma de una castaña, produce parte del fluido seminal³². Se ubica inmediatamente bajo la vejiga donde rodea completamente la porción inicial de la uretra

por el cual fluye la orina cuando se vacía la vejiga, por delante de la última porción del intestino (el recto) y como la pared de éste órgano es de una consistencia blanda por lo que permite que un médico entrenado pueda examinar su cara posterior por medio de la introducción del dedo en el recto (tacto rectal).

En esta cara donde se originan el mayor porcentaje de tumores y en algunos casos el tacto permite deducir la presencia de ellos, antes de que aparezca alguna alteración en los exámenes de sangre.

Básicamente la próstata puede desarrollar tres patologías:

- a) Crecer: Adenoma Prostático.
- b) Inflamarse: Prostatitis
- c) Desarrollar cáncer: Cáncer de próstata

a) El adenoma prostático, más correctamente llamado "Hipertrofia Prostática Benigna", (HPB) es un crecimiento de la glándula prostática que no corresponde a cáncer ³³. Puede comenzar a aparecer clínicamente desde antes de los 50 años en algunos casos y ya cercano a los 70 años más del 70 % de los hombres lo presentan. Sólo en algunos pacientes produce síntomas derivados de la compresión del conducto de salida de la orina (uretra prostática) y del mayor esfuerzo que debe hacer la vejiga para lograr la micción.

b) La prostatitis es la inflamación de la próstata debe ser evaluado para determinar el grado de obstrucción y las posibles complicaciones que se producen por la dificultad en el vaciamiento vesical. Existen múltiples alternativas terapéuticas que varían mucho entre sí, nuevamente no hay un tratamiento mejor que otro, cada caso es distinto. Es la evaluación individual la que determinará cual es la mejor opción para cada paciente.

c) El cáncer de próstata es una enfermedad originada en la glándula prostática, que en la medida que no se detecta tempranamente puede crecer y diseminarse más allá de la glándula. Son algunas células de la próstata que pierden su control natural y se multiplican aceleradamente, en este crecimiento pueden invadir el tejido vecino o dispersarse a otras ubicaciones a distancia (*metástasis*) ³⁴. La única opción curativa en la actualidad se tiene cuando se logra detectar antes de su propagación. Para su detección es fundamental el tacto rectal y el examen de antígeno prostático específico (PSA). La confirmación se obtiene por medio de la biopsia.

La próstata crece a partir de los 40 años de edad, de forma que es muy frecuente presentar a partir de los 50-60 años una próstata "agrandada" o HPB, mucho más común que el cáncer de próstata. Los síntomas de la HPB son parecidos a los del cáncer de próstata, por ello no se debe confundir ambas patologías que coinciden en el mismo grupo de riesgo de edad: los varones mayores de 50 años. Una de las mejores formas de detectar el cáncer es a través del **antígeno específico prostático (PSA)** ³⁵ que es una proteína producida en la próstata que puede elevarse cuando el cáncer está presente. Los niveles de PSA pueden ayudar al médico en el seguimiento de un paciente con problemas de próstata.

Gracias a la detección de PSA y a otros métodos de diagnóstico como el tacto rectal, la ecografía transrectal y la punción de próstata, cada vez son más los casos de cáncer de próstata que se detectan.

La única posibilidad de tener opción a un tratamiento curativo en cáncer de próstata es su diagnóstico oportuno, antes que aparezca algún síntoma. La evaluación preventiva debe ser anual desde los 50 años en hombres sin antecedentes de desórdenes prostáticos, a los 40 años en familiares directos (hijo o hermano) de un enfermo de cáncer de próstata ya que el riesgo es mayor, así como hombres de raza negra.

2.8.1 Síntomas del cáncer de la próstata.

En su estudio inicial, el cáncer de próstata puede no producir signos o síntomas. Según crece el tumor, pueden notarse éstos:

- Dificultad con comenzar o terminar de orinar.
- Fuerza reducida del chorro de orina.
- Goteo al final de la micción.
- Micción dolorosa o con ardor.
- Eyaculación dolorosa.
- Sangre en la orina.
- Incapacidad para orinar.
- Dolor continuo en la parte baja de la espalda, en la pelvis, o en la zona superior de los muslos.

El cáncer de próstata es una de las enfermedades más frecuentes y su incidencia se incrementa cada año. Pese a la incorporación de nuevos métodos y de la utilización del PSA para el diagnóstico precoz, cerca del 50% de los casos en el momento de la primera visita al médico, el tumor se encuentra fuera de los límites de la glándula. Mientras que en los tumores iniciales el tratamiento puede ser curativo ya sea con cirugía radical o con radioterapia, en los tumores localmente avanzados o metastáticos el tratamiento más idóneo es el bloqueo de la hormona masculina *testosterona* (Fig.1.1). Esto se debe a que los andrógenos son imprescindibles para el mantenimiento de la próstata pero también contribuye en algunos casos, al desarrollo del cáncer de próstata.

El 95 % de la *testosterona* circulante es producida por los testículos por lo que realizando simplemente la extirpación testicular se puede controlar a los tumores de próstata metastáticos durante un tiempo de 18 a 24 meses. Aunque los andrógenos suprarrenales representan una mínima parte de los andrógenos circulantes en el hombre sano, en los pacientes en los que han sido sometidos a orquiectomía (extirpación de los testículos) se considera que los andrógenos suprarrenales pueden llegar a representar al 40 % de los andrógenos intraprostáticos provocando un desorden hormonal y mayor producción de andrógenos.

2.8.2 Tratamiento del cáncer de próstata.

El tratamiento del cáncer de próstata es sumamente individualizado y deben considerarse muchos factores, sobre todo: la etapa en la que se encuentra el cáncer, los antecedentes médicos generales del paciente, la edad, el estado general de salud y la esperanza de vida. Algunos tratamientos se describen brevemente a continuación.

Prostatectomía radial. Consiste en la extirpación de la próstata y parte del tejido que la rodea. La cirugía se puede realizar mediante una incisión en el espacio situado entre el escroto y el ano (*prostatectomía perineal*) o mediante una incisión en el abdomen inferior (*prostatectomía pública*). La prostatectomía radial se lleva a cabo sólo si el cáncer no se ha diseminado fuera de la próstata.

Los efectos colaterales principales de la extirpación de próstata son la **impotencia** y la **incontinencia urinaria** (incapacidad para controlar la función urinaria). Generalmente son temporales, pero en algunos casos pueden ser permanentes.

Resección transuretral. Consiste en la extirpación empleando un instrumento que se introduce en la próstata a través de la uretra. Esta operación a veces se hace para aliviar los síntomas causados por el tumor antes de aplicar otro tratamiento, o en los hombres que no pueden soportar una *prostatectomía radial* debido a la edad u otra enfermedad.

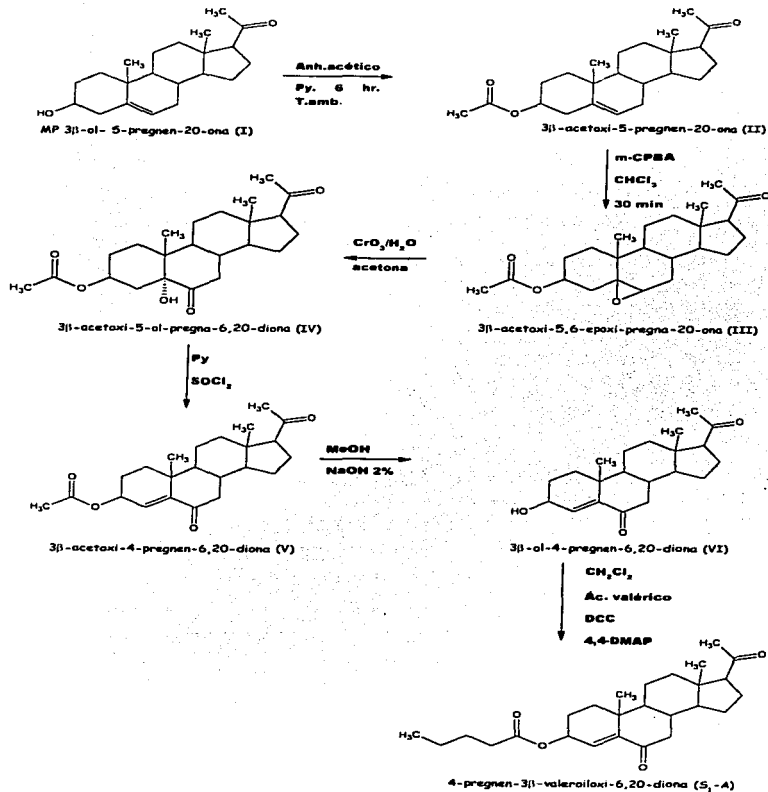
Criocirugía. Un tipo de cirugía en el que el cáncer se destruye por congelamiento.

Además de la cirugía pueden estar indicadas una o varias de las siguientes terapias:

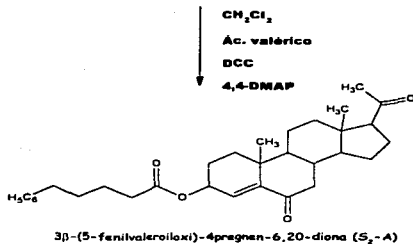
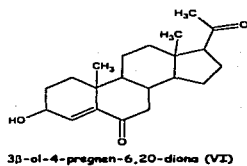
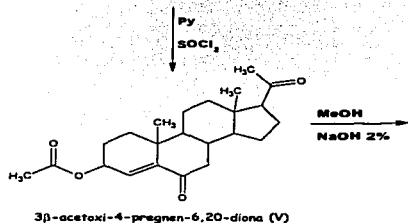
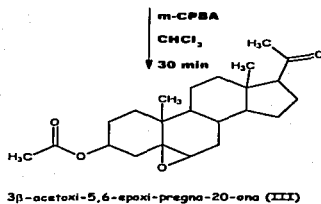
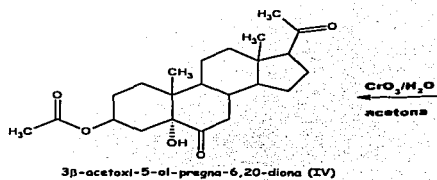
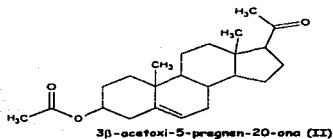
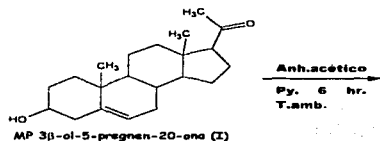
Radiaciones ionizantes (Radioterapia), Medicamentos contra el cáncer (Quimioterapia), Terapia biológica o Inmunoterapia (uso del sistema inmune del cuerpo para combatir el cáncer) y hormonoterapia en la cual se utilizan compuestos antiandrogénicos que actúen como inhibidores de la enzima 5 α -reductasa (finasterida Fig. 1.4 pág. 5) o como competidores por el receptor androgénico (acetato de ciproterona Fig. 1.3 pág. 5).

OBJETIVOS

- Sintetizar y purificar compuestos derivados de la progesterona con un éster como grupo sustituyente en C-3, que presenten actividad antiandrogénica considerable con respecto a la finasterida que es el fármaco de uso actual para el tratamiento de hiperplasia prostática benigna y el cáncer de próstata. La ruta de síntesis de los compuestos S₁-A y S₂-A se muestran en los esquemas 1 y 2 respectivamente (pág. 24 y 25).
- Probar la actividad *in vivo* del efecto antiandrogénico, *in vitro* como inhibidores de la 5 α -reductasa, así como la unión a receptores androgénicos de los compuestos finales, comparándolos con la actividad biológica de la finasterida, esperando que los compuestos finales sean más activos.
- Los objetivos se plantean tomando en cuenta la relación existente entre la estructura química-actividad biológica de los antiandrógenos de tipo esterooidal y tomando como modelo al compuesto de finasterida.



Esquema 1. Síntesis de 4-pregnen-3β-valeriloxi-6,20-diona (S₁A).



Esquema 2. Síntesis de 3β-(5-fenilvaleroiloxi)-4pregnen-6,20-diona. (S₂-A).

PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

El procedimiento experimental del presente trabajo se llevó a cabo en dos etapas. La primera involucró la síntesis química y caracterización física y espectroscópica de los productos finales S₁-A y S₂-A (esquema 1 y 2). La segunda etapa involucró probar la actividad biológica *in vivo* del efecto antiandrógeno, la evaluación *in vitro* como inhibidores de la enzima 5 α -reductasa y la evaluación *in vitro* de la unión a receptores androgénicos.

Etapas 1. Síntesis y caracterización.

El equipo empleado para determinar los espectros de Absorción Ultravioleta fue Perkin-Elmer Hitachi modelo 200 y se utilizó como disolvente metanol. La espectrofotometría de Absorción en el Infrarrojo se determinó empleando el espectrofotómetro IR de Transformadas de Fourier Perkin-Elmer modelo 1600, las determinaciones se realizaron en película.

Los espectros de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN ¹H) y Carbono (RMN ¹³C) para los compuestos se determinaron en un espectrofotómetro analítico Varian VXR-300s, utilizando como disolvente cloroformo deuterado (CDCl₃) y como referencia interna tetrametilsilano (TMS). Los desplazamientos químicos se informan en partes por millón (ppm) relativas al TMS, utilizando el parámetro δ . Los patrones de acoplamiento se designan con las siguientes abreviaturas: s (singulete), d (doblete), t (triplete), c (cuadruplete), q (quintuplete), m (multiplete), dd (doble dobleteado).

La Espectrometría de Masas se realizó en espectrómetro Hewlett-Packard 5985-B CG/MS empleando la técnica de impacto electrónico a 70 eV. Los valores se expresan en relación m/Z (masa/carga).

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato de Fisher-Johns y no están corregidos.

El monitoreo de los diferentes intermediarios y compuestos finales se realizó mediante la técnica de cromatografía en capa fina (CCF) utilizando gel de sílice Merck 7730 Silica Gel 60 GF 254 y Silica Gel 60 G; como revelador se utilizó una solución de CoCl₂ al 1% en H₂SO₄ 2N y una lámpara de UV $\lambda = 254$ nm.

Purificación y caracterización del 3 β -ol-5-pregnen-20-ona (I).

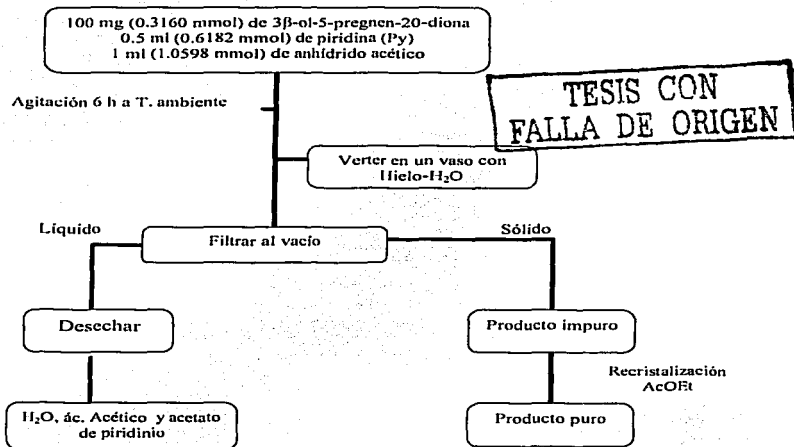
Materia prima.

La materia prima (I) se encontraba como polvo blanco el cual se recrystalizó en acetato de etilo. El producto se obtuvo como cristales en forma de agujas de color blanco con punto de fusión 193-195 °C. Como paso previo a la síntesis del compuesto II, se caracterizó a la materia prima por sus propiedades físicas y espectroscópicas.

PM (g/mol): 316. Formula condensada: C₂₁H₃₂O₂

IR (cm⁻¹). Espectro 1. 3437 (OH en C-3), 2927 (CH saturados), 1697 (C=O en C-20), 1681 (C=C en C-5), 1468 (CH₃-CH₂) y 1381 (CH₃). **RMN ¹H (ppm).** Espectro 2. 5.40 (dd, 1H) en C-6, 3.58 (q, 1H) en C-3, 2.53 (t, 1H) en C-17, 2.20 (s, 3H) en C-21, 1.01 (s, 3H) en C-19 y 0.63 (s, 3H) en C-18.

Síntesis de 3 β -acetoxi-5-pregnen-20-ona (II).

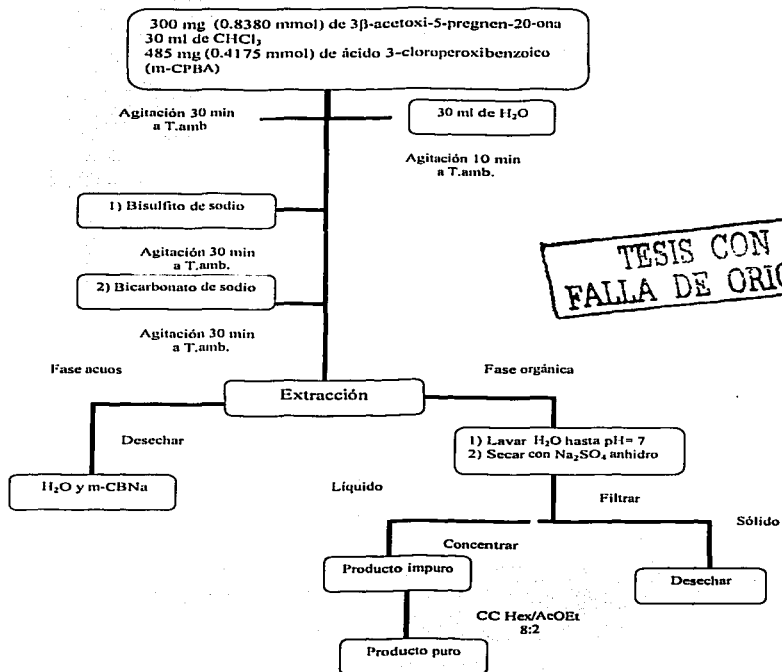


En un matraz de bola se colocaron 100 mg (0.3160 mmol) de I, 0.5 ml (0.6182 mmol) de Piridina, se agitó hasta disolución de I con ayuda de un baño maría. Una vez disuelto, se adicionó 1 ml (0.0598 mmol) de Anhídrido acético. La mezcla se dejó con agitación a temperatura ambiente durante 6 horas. Posteriormente, la mezcla se vertió en un vaso de precipitado el cual contenía 8 ml de mezcla agua -hielo. Se dejó unos minutos en agitación hasta la formación de un sólido cristalino (II) el cual se filtró y secó al vacío. Se recristalizó de acetato de etilo. Punto de fusión (147-151 °C). Rendimiento 95.8 %.

Compuesto II cristales blancos en forma de agujas. **PM (g/mol): 358**
Fórmula condensada: C₂₃H₃₄O₅.

IR (cm⁻¹). Espectro 3. 2939 (CH saturados), 1726 (C=O éster en C-3), 1704 (C=O en C-20), 1642 (C=C entre C-5 y C-6), 1434 (CH₃-CH₂), 1357 (CH₃), 1237 (COO del éster en C-3) y 1027 (C-O-C del éster en C-3). **RMN ¹H (ppm).** Espectro 4. 5.38 (dd, 1H) en C-6, 4.60 (q, 1H) en C-3, 2.54 (t, 1H) en C-17, 2.19 (s, 3H) en C-20, 2.03 (s, 3H) CH₃ del éster en C-3, 1.02 (s, 3H) en C-19 y 0.63 (s, 3H) en C-18.

Síntesis de 3 β -acetoxi-5,6-epoxi-pregna-20-ona (III).



m-CBNA: m-crolobenzoato de sodio

En un matraz de bola de 100 ml se colocaron 300 mg (0.8380 mmol) de **II**, 30 ml de cloroformo, la mezcla se agitó hasta disolución. Se adicionaron 485 mg (0.4175 mmol) de ácido 3-cloroperóxibenzoico (m-CPBA), bajo agitación constante durante 30 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo de reacción se agregaron 30 ml de agua y se agitó 10 minutos. Se agregó bisulfito de sodio para reducir el perácido y se agitó media hora, después se agregó bicarbonato de sodio para neutralizar los ácidos correspondientes y se agitó media hora más.

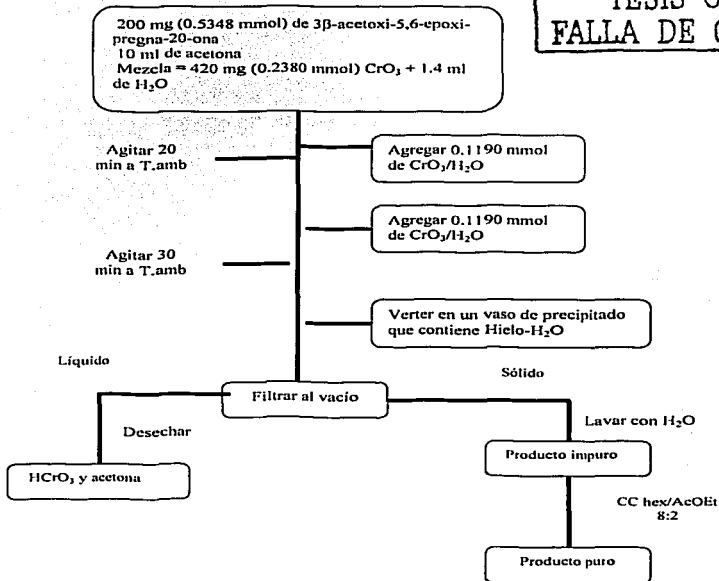
Posteriormente la mezcla se vertió en un embudo de separación y se extrajo la fase orgánica, la cual se lavó con agua hasta pH =7. La fase orgánica se secó con Na_2SO_4 anhidro y se filtró. El filtrado se evaporó a presión reducida quedando un sólido (**III**) se purificó por cromatografía en columna (CC) utilizando como eluyente una mezcla de hexano /acetato de etilo 8:2. Se obtuvo un sólido cristalino. Punto de fusión (125-127 °C). Rendimiento 55.7 %.

Compuesto **III** cristales blancos en forma de agujas. **PM (g/mol): 374**
Fórmula condensada: $\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_4$.

IR (cm^{-1}). Espectro 5. 2942 (CH saturados), 1733 (C=O éster en C-3), 1703 (C=O en C-20), 1437 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 1360 (CH_3), 1242 (COO en C-3 y C-O-C en C-5 -C-6) y 1034 (C-O-C de CH_3COO en C-3). **RMN ^1H** (ppm). Espectro 6. 4.77 (q, 1H) en C-3, 3.06 (dd, 1H) en C-6, 2.91 (d, 2H) en C-4, 2.50 (t, 1H) en C-17, 2.17 (s, 3H) en C-21, 2.12 (s, 3H) CH_3 del éster en C-3, 1.01 (s, 3H) en C-19 y 0.59 (s, 3H) en C-18.

Síntesis de 3 β -acetoxi-5-ol-pregna-6,20-diona (IV).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

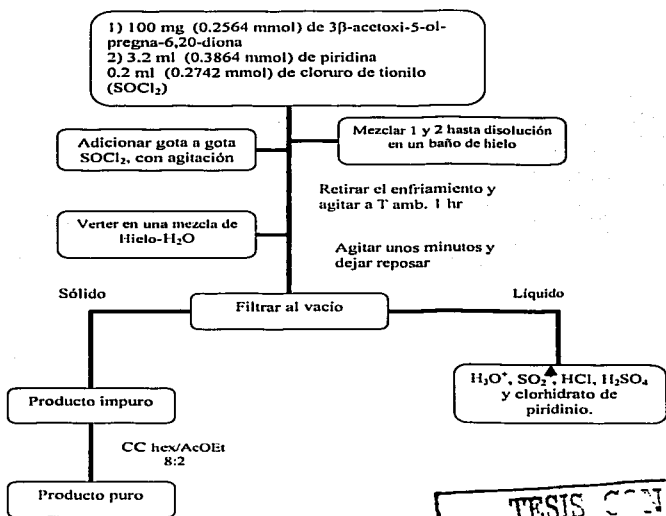


En un matraz de bola de 50 ml se colocaron 200 mg (0.5348 mmol) de **III**. 10 ml de acetona como disolvente, se agitó y se colocó en un baño de hielo. Se preparó una mezcla de óxido de cromo VI 420 mg (0.2390 mmol) y agua 1.4 ml y se adicionó en dos partes. Se adicionó 0.1190 mmol de mezcla crómica en frío, se retiró el baño de hielo y se mantuvo bajo agitación constante durante 20 minutos a temperatura ambiente. Transcurrido este tiempo se adicionó 0.1190 mmol de la mezcla crómica, retirando el baño de hielo y dejando a temperatura ambiente 30 minutos en agitación. Al término de la agitación se vertió la mezcla de reacción a un vaso de precipitado que contenía 50 ml de una mezcla agua/hielo, hasta la formación de un sólido que se filtró al vacío y se lavó con H₂O. El producto crudo (**IV**) se purificó por cromatografía en columna (CC) utilizando como eluyente una mezcla de hexano/acetato de etilo 8:2. Al producto obtenido (**IV**) se le determinó punto de fusión (224-226 °C). Rendimiento 65.5 %.

Compuesto **IV** cristales blancos en forma de agujas. **PM (g/mol): 390**
Fórmula condensada: C₂₃H₃₄O₅.

IR (cm⁻¹). Espectro 7. 3455 (OH en C-5), 2947 (CH saturados), 1737 (C=O éster en C-3), 1715 (C=O cetona en C-6), 1689 (C=O cetona en C-20), 1422 (CH₃-CH₂), 1365 (CH₃), 1232 (COO en C-3 y C-O-C en C-5 -C-6) y 1015 (C-O-C de CH₃COO en C-3). **RMN ¹H** (ppm). Espectro 8. 5.05 (q, 1H) en C-3, 2.70 (d, 2H) en C-4, 2.55 (t, 1H) en C-17, 2.17 (s, 3H) en C-21, 2.12 (s, 3H) CH₃ del éster en C-3, 0.81 (s, 3H) en C-19 y 0.60 (s, 3H) en C-18

Síntesis de 3 β -acetoxi-4-pregnen-6,20-diona (V).



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

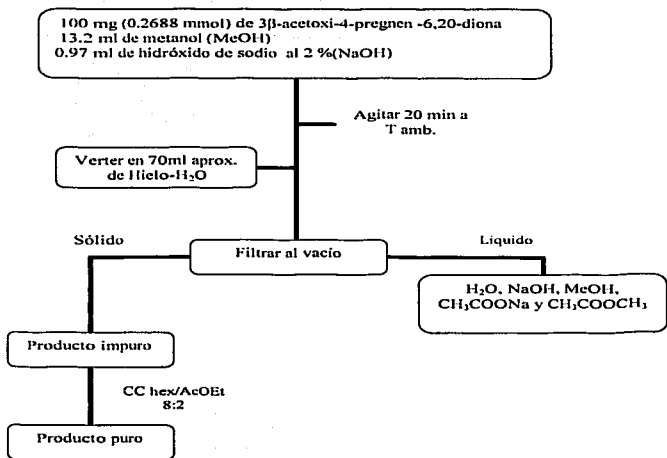
En un matraz de bola de 100 ml se colocaron 100 mg (0.2564 mmol) de **IV**, 3.2 ml (0.3864 mmol) de piridina, bajo agitación en un baño de hielo. Después se adicionaron gota a gota 0.2 ml (0.2742 mmol) de SOCl_2 , terminada la adición, se retiró el baño de hielo y se dejó agitar durante 1 hora a temperatura ambiente. Al término de este tiempo el producto de reacción se vertió sobre una mezcla de hielo-agua hasta la formación de un precipitado que se filtró al vacío.

El compuesto (**V**) crudo se purificó por cromatografía en columna (CC) utilizando como eluyente una mezcla de hexano/acetato de etilo 8:2. Se obtuvo un sólido cristalino con punto de fusión (139-142 °C). Rendimiento 50.5 %.

Compuesto **V** cristales blancos en forma de agujas. **PM (g/mol): 372**
Fórmula condensada: $\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_4$

IR (cm^{-1}). Espectro 9. 2935 (CH saturados), 1737 (C=O éster en C-3), 1698 (C=O cetona en C-6 y C-20), 1624 (C=C entre C-4 y C-5), 1434 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 1361 (CH_3), 1243 (COO en C-3 y C-O-C en C-5 -C-6) y 1021 (C-O-C de CH_3COO en C-3) **RMN ^1H** (ppm). Espectro 10. 6.09 (d, 1H) en C-4, 5.35 (q, 1H) en C-3, 2.60 (d, 1H) en C-7, 2.55 (t, 1H) en C-17, 2.17 (s, 3H) en C-21, 2.13 (s, 3H) CH_3 del éster en C-20, 1.03 (s, 3H) en C-19 y 0.66 (s, 3H) en C-18.

Síntesis de 3 β -ol-4-pregnen-6,20-diona (VI).

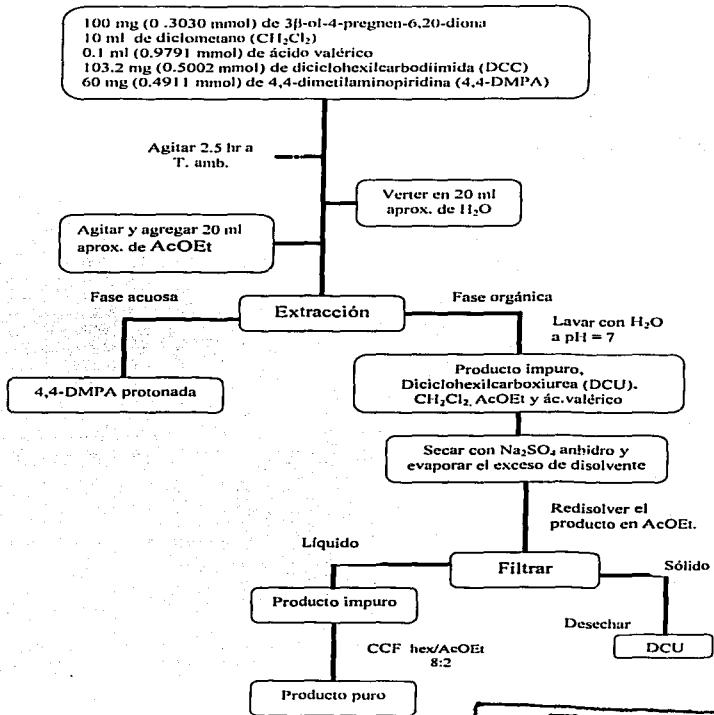


En un matraz de bola de 100 ml, se colocaron 100 mg (0.2688 mmol) de V y 13.2 ml de metanol. Se agitó hasta disolución y se agregaron 0.97 ml de hidróxido de sodio (NaOH) al 2 %. Se agitó durante 20 min a temperatura ambiente. Al término de la reacción se agregaron 70 ml de una mezcla de hielo-H₂O, se dejó reposar unos minutos observándose la formación de un sólido (VI) el cual se filtró al vacío y posteriormente se purificó por cromatografía en columna (CC) utilizando como eluyente una mezcla de hexano /acetato de etilo 8:2. Se obtuvo un sólido cristalino con punto de fusión (173-175 °C). Rendimiento 53.3 %.

Compuesto VI cristales blancos en forma de agujas. PM (g/mol): 330. Fórmula condensada: C₂₁H₃₀O₃

IR (cm⁻¹). Espectro 11. 3406 (OH en C-3), 2941 (CH saturados), 1686 (C=O en C-6 y C-20), 1631 (C=C entre C-4 y C-5), 1423 (CH₃-CH₂) y 1378 (CH₃). RMN ¹H (ppm). Espectro 12. 6.18 (d, 1H) en C-4, 4.25 (q, 1H) en C-3, 2.69 (d, 1H) en C-7, 2.54 (t, 1H) en C-17, 2.15 (s, 3H) en C-21, 1.01 (s, 3H) en C-19 y 0.66 (s, 3H) en C-18.

Síntesis de 4-pregnen-3 β -valeroiloxi-6,20-diona (S₁,A)



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En una matraz de bola de 100 ml, se disolvieron 100 mg (0.3030 mmol) de VI en 10 ml de diclorometano (CH_2Cl_2), 0.1 ml (0.9791 mmol) de ácido valérico, 103.2 mg (0.5002 mmol) de dicitohexilcarbodiimida (DCC) y 60 mg (0.4911 mmol) de 4,4-dimetilaminopiridina (4,4-DMPA). La mezcla se mantuvo en agitación durante 2.5 horas. El avance de la reacción se realizó por medio de CCF cada 30 minutos tomando una alícuota.

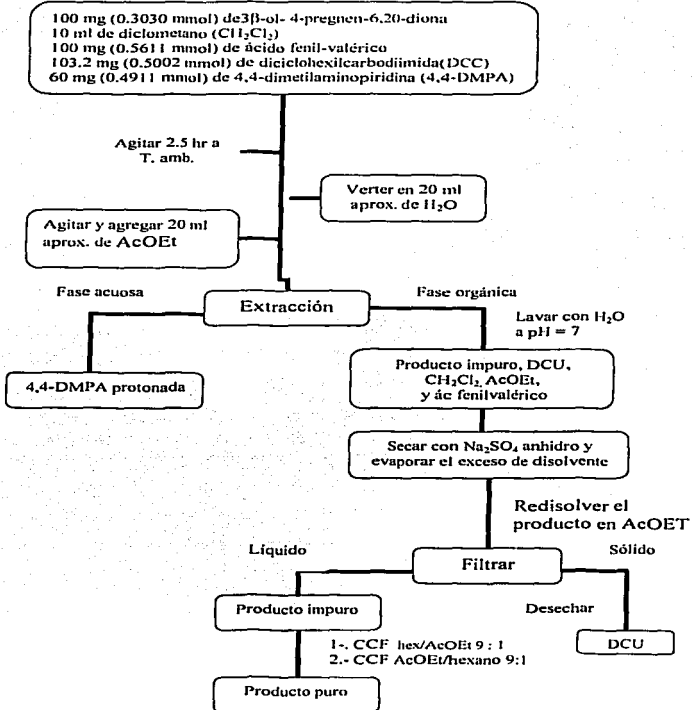
La mezcla de reacción se vertió sobre 20 ml aprox. de H_2O , se agitó unos minutos y se adicionaron 20 ml de AcOEt . La fase orgánica, se secó con Na_2SO_4 anhidro se filtró y se evaporó a sequedad evaporó. El producto crudo se redisolvió en AcOEt caliente y se filtró. El filtrado de recuperación y se concentró.

El compuesto ($\text{S}_1\text{-A}$) impuro (líquido), se purificó por cromatografía en capa fina (CCF) eluyendo con una mezcla de hexano/acetato de etilo 7:3. Se determinó punto de descomposición (100°C). Rendimiento de 76 %

Compuesto ($\text{S}_1\text{-A}$) aceite transparente de color amarillo con olor agradable.
PM (g/mol): 414. Fórmula condensada: $\text{C}_{26}\text{H}_{38}\text{O}_4$.

IR (cm^{-1}). Espectro 13. 2943 (CH saturados), 1732 (C=O éster en C-3), 1702 (C=O en C-6 y C-20), 1634 (C=C entre C-4 y C-5), 1453 ($\text{CH}_3\text{-CH}_2$), 1381 (CH_3), 1237 (COO en C-3 y C-O-C en C-5 -C-6) y 1042 (C-O-C del éster en C-3). **EMIE** (m/z). Espectro 14. 414 (M^+) y 330 (M^+ - ($\text{CO}(\text{CH}_2)_3\text{-CH}_3$)). **RMN ^1H** (ppm). Espectro 15. 6.09 (d, 1H) en C-4, 5.35 (q, 1H) en C-3, 2.60 (d, 1H) en C-7, 2.55 (t, 1H) en C-17, 2.30 (t, 2H) en C-2', 2.17 (s, 3H) en C-21, 1.03 (s, 3H) en C-19, 0.91 (s, 3H) en C-5' y 0.66 (s, 3H) en C-18. **RMN ^{13}C** (ppm). Espectros 16-21. 208.8 en C-20, 201.8 en C-6, 173.4 en C-1', 147.5 en C-5, 129.2 en C-4, 68.9 en C-3, 63.2 en C-17, 56.6 en C-14, 50.9 en C-8, 33.9 en C-9, 31.4 en C-21, 24.1 en C-19, 13.8 en C-18 y 13.3 en C-5'.

Síntesis de 3 β -(5-fenilvaleroiloxi)-4pregnen-6,20-diona (S₂-A)



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

En una matraz de bola de 100 ml, se disolvieron 100 mg (0.3030 mmol) de VI en 10 ml de diclorometano (CH_2Cl_2), 100 mg (0.5611 mmol) de ácido fenilvalérico, 103.2 mg (0.5002 mmol) de dicitclohexilcarbodiimida (DCC) y 60 mg (0.4911 mmol) de 4,4-dimetilaminopiridina (4,4-DMPA). La mezcla se mantuvo en agitación durante 2.5 horas. El avance de la reacción se realizó por medio de CCF cada 30 minutos tomando una alícuota.

La mezcla de reacción se vertió sobre 20 ml aprox. de H_2O , se agitó unos minutos y se adicionaron 20 ml de AcOEt. La fase orgánica, se secó con Na_2SO_4 anhidro se filtra y se evaporó a sequedad evaporó. El producto crudo se redisolvió en AcOEt caliente y se filtró. El filtrado de recuperó y se concentró.

El compuesto ($\text{S}_2\text{-A}$) impuro (líquido), se purificó por cromatografía en capa fina (CCF) eluyendo 2 veces con hexano/acetato de etilo 7:3 y una vez con acetato de etilo/hexano 9:1. Se determinó punto de descomposición ($100\text{ }^\circ\text{C}$). Rendimiento de 67 %.

Compuesto ($\text{S}_2\text{-A}$) aceite transparente de color amarillo con olor agradable. PM (g/mol): 490. Fórmula condensada: $\text{C}_{32}\text{H}_{42}\text{O}_4$.

IR (cm^{-1}). Espectro 22. 3024 (CH insaturados), 2941 (CH saturados), 1850 (Sobre tono del fenilo indicando monosustitución), 1731 (C=O éster en C-3), 1701 (C=O cetona en C-6 y C-20), 1634 (C=C entre C-4 y C-5 además del fenilo), 1453 ($\text{CH}_2\text{-CH}_2$), 1380 (CH_2), 1234 (COO en C-3 y C-O-C en C-5 -C-6), 1106 (C-O-C de CH_3COO en C-3), 749 (C_6H_5 monosustitución) y 700 (C_6H_5 monosustitución). **EMIE** (m/z). Espectro 23. 490 (M^+), 314 (M^+ - (5-fenilvaleroiloxi)) y 91 (M^+ - ion tropilo). **RMN ^1H** (ppm). Espectro 24. 7.30 (2H,m,H-meta) de fenilo en C-5', 7.02 (2H,m,H-orto y 1H,m,H-para) de fenilo en C-5', 6.08 (d, 1H) en C-4, 5.34 (q, 1H) en C-3, 2.65 (d, 1H) en C-7, 2.60 (t, 2H) en C-5', 2.55 (t, 1H) en C-17, 2.30 (t, 2H) en C-2', 2.17 (s, 3H) en C-21, 1.02 (s, 3H) en C-19 y 0.66 (s, 3H) en C-18. **RMN ^{13}C** (ppm). Espectros 25-30. 208.9 en C-20, 201.7 en C-6, 173.2 en C-1', 147.5 en C-6', 142.0 en C-5, 129.1 en C-4, 128.2 en C-7' y C-8', 125.7 en C-9', 68.9 en C-3, 63.3 en C-17, 50.9 en C-8, 31.4 en C-9, 30.8 en C-21, 24.1 en C-19 y 13.2 en C-18.

Etapa 2. Actividad Biológica.

4.8 Actividad Biológica.

4.8.1.- Evaluación *in vivo* del efecto antiandrogénico de los nuevos compuestos 4-pregnen-3 β -valeroiloxi-6,20-diona (S₁-A) y de 3 β -(5-fenilvaleroiloxi)-4pregnen-6,20-diona (S₂-A).

La evaluación farmacológica se determinó en cuatro grupos de animales (hámsteres) machos adultos de la cepa Syriam Golden, con un peso promedio de 150-200 g gonadectomizados ^{nota 1} 30 días antes del estudio, manteniéndolos a una temperatura controlada de 22 °C, en periodos de luz oscuridad de 12 h, comida y agua *ad libitum* ^{nota 2}.

Se utilizaron cuatro grupos de animales que se dividieron de la siguiente forma: 3 grupos control, al primero se le administraron 200 μ l de aceite de sésamo como vehículo, al segundo se le administraron 200 μ g de testosterona en 200 μ l de vehículo y un tercero que se le administró una mezcla de 200 μ g de testosterona más 200 μ g de finasterida en 200 μ l de vehículo. Al último grupo se le administraron 200 μ g del esteroide a analizar más 200 μ g de testosterona en 200 μ l de vehículo. La administración fue cada 24 horas por seis días (vía subcutánea).

Para esta evaluación *in vivo* se analizó el efecto del compuesto sobre el diámetro de la mancha pigmentada de los órganos del flanco del hámster macho (Prueba de los órganos del flanco sección 4.8.1.1) y el efecto sobre el peso de las vesículas seminales y próstata (sección 4.8.1.2).

4.8.1.1.- Efecto de los compuestos S₁-A y S₂-A sobre el diámetro de la mancha pigmentada de los órganos del flanco del hámster macho (Prueba de los órganos del flanco).

Los órganos flanco son estructuras pilosebáceas que se encuentran en la parte dorsal de los hámsteres. En los machos miden 8 mm, mientras que en las hembras miden 2 mm, se observan como dos manchas pigmentadas que recuerdan lunares. Estas estructuras son dependientes de andrógenos ya que la castración en los machos disminuye su tamaño, el cual se restablece por inyecciones diarias con testosterona (T) ⁸. Estos órganos son capaces de metabolizar a la T en su forma más activa que es la 5 α -dihidrotestosterona (5 α -DHT), lo que demuestra la presencia de la 5 α -reductasa en este tejido.

Se ha visto que los inhibidores de la 5 α -reductasa disminuyen el diámetro de la mancha pigmentada en los órganos del flanco ⁸.

Nota 1 Gonadectomizados. Proceso de extirpación de las glándulas masculinas o testículos.

Nota 2 *ad libitum*: sin restricción.

4.8.1.2.- Efecto de los compuestos S₁-A y S₂-A sobre el peso de vesícula seminal y próstata.

La próstata y las vesículas seminales son glándulas anexas del aparato reproductivo masculino. Estas glándulas para su crecimiento y desarrollo dependen de los andrógenos, principalmente de la DHT. La DHT se forma a partir de la reducción de la T, reacción que se lleva a cabo gracias a la presencia de la enzima 5 α -reductasa en estos tejidos.

En este estudio se determinó la capacidad de los nuevos esteroides S₁-A y S₂-A para inhibir el crecimiento de la próstata y las vesículas seminales de hámsteres macho castrados un mes antes del experimento y tratados con 200 μ g del esteroide a analizar disueltos en 200 μ l de aceite de sésamo. El esteroide finasterida (Fig. 1.4) se utilizó como estándar. Este compuesto se encuentra como principio activo en el medicamento Proscar.

Una vez terminado el tratamiento se sacrificaron los hámsteres en cámara de CO₂ para posteriormente hacer la disección de las vesículas seminales y las próstatas, las cuales fueron pesadas por separado.

4.8.2.- Evaluación *in vitro* del efecto inhibitorio de 4-pregnen-3 β -valeroiloxi-6,20-diona (S₁-A) y de 3 β -(5-fenilvaleroiloxi)-4-pregnen-6,20-diona (S₂-A) sobre la enzima 5 α -reductasa.

La enzima 5 α -reductasa es la responsable de la reducción de la testosterona a su metabolito más activo que es la 5 α -dihidrotestosterona en los tejidos blanco para andrógenos como son: la próstata y las vesículas seminales.

Obtención de material biológico.

Se sacrificaron 57 hámsteres macho castrados previamente (5 días antes de castrados), en una cámara de CO₂ por 3 min, para hacer la disección de las vesículas seminales, pesarlas mas tarde, se homogenizaron con buffer de TEDAM (20 mM Tris-HCl, pH 7.4 a 4 °C, 1.5 mM de EDTA, y 10 mM de molibdato de sodio) sin DTT (ditiotretol) en relación 3:1 (v/vp). Los tejidos ya homogeneizados se centrifugaron a 37000 rpm a 4 °C durante 1hr, separándose el precipitado del sobrenadante.

El sobrenadante (citósol) se utilizó para determinar las uniones totales al receptor de andrógenos mientras que el precipitado (microsomos) se resuspendió en relación 3:1 en medio A (0.32 M sacarosa, 0.1 mM de DTT y 20 mM de buffer de fosfato) a pH= 6.5. Se determinó el contenido de proteínas por el método de Bradford ³⁶, utilizando albúmina sérica bovina para construir la curva estándar. Este método involucra la unión del colorante azul brillante de coomassieG-250 a la proteína. La unión del colorante a la proteína provoca un desplazamiento en la longitud de absorción máxima de 465 nm (rojo) a 595 nm (azul). El contenido de proteínas en cada fracción se presenta en la tabla 4.9.

Contenido de proteínas en vesículas seminales mg/mL	
Citosol	Microsomias
65.5	51

Tabla 4.9.- Contenido de proteínas en los homogenizados de vesículas seminales de hámsters macho.

Para determinar el efecto de los esteroides S_1 -A, S_2 -A y la finasterida sobre la enzima se incubó testosterona tritiada ($T[^3H]$) en presencia de diferentes concentraciones de los esteroides a probar ($1 \times 10^{-9}M - 1 \times 10^{-6}M$) en un medio de buffer de fosfatos (40 mM, pH=7), NADPH (dinucleótido fosfato de adenina y nicotinamida) (2mM), DTT (1mM) y 160 μ L de vesícula seminal fracción microsomal (equivalente a 8.16 mg de proteína) a 37 °C por 1 h. El control fue la $T[^3H]$ (2nM) la cual se trató de igual forma que los tubos que con inhibidor. La incubación terminó con la adición de CH_2Cl_2 el esteroide tritiado y se extrajo con el mismo disolvente.

Los extractos se evaporaron a sequedad y se le adicionaron 10 μ g de 5 α -DHT y MeOH a c/u. Los extractos se aplicaron en placas cromatograficas con estándares de referencia en ambos lados: T, 5 α -DHT y T + 5 α -DHT. Más tarde las placas se eluyeron 3 veces en cloroformo-acetona 9:1. Después de dejar secar las placas. Los estándares de T se visualizaron con lámpara de uv a 254 nm y los de 5 α -DHT se revelaron con primulina y se visualizaron con lámpara uv a 302 nm. La región correspondiente a 5 α -DHT se cortó y se introdujo en un vial, al que se le agregó Ultima Gold (líquido de centelleo). Lo mismo se hizo para cada extracto cromatográfico. La radiactividad contenida en cada fracción de la placa se leyó en un contador de centelleo líquido modelo Tri-carb 2100TR. La eficiencia de conteo del aparato fue de 67 %.

El control de T [3H] (2nM) representa al 100 % de 5 α -DHT obtenida. Los resultados se obtuvieron en desintegraciones por minuto (dpm).

4.8.3.- Evaluación *in vitro* de la unión a receptores de andrógenos (presentes de la fracción citosólica obtenida de las vesículas seminales de hámster) con los compuestos S₁-A y S₂-A.

Para verificar que el material biológico estuviera aun activo, se incubaron 100 µl de citosol (6.55 mg de proteína) y 100 µl de buffer TEDAM en presencia de 5α-DHT [³H] y diferentes concentraciones de 5α-DHT no marcada (2×10^{-4} M – 10×10^{-3} M). El tiempo de incubación fue de 18 hr a 4 °C.

Para separar la radiactividad libre de la unida, se agregaron 0.8 ml de una mezcla de carbón dextrán, se agitó y se incubó por 45 min. a 4°C, tiempo después los tubos se centrifugaron a 4000 rpm por 10 min., más tarde se tomaron alícuotas de 0.2 ml, las cuales se adicionaron a viales conteniendo Ultima Gold. La radiactividad en cada fracción de la placa se leyó en un contador de centelleo líquido modelo Tri-carb 2100TR. La eficiencia de conteo del aparato fue de 67 %.

Para determinar la unión de los nuevos esteroides S₁-A y S₂-A a receptores de andrógenos, fracciones de 100 µl de citosol (6.55 mg proteína) se incubaron con 5α-DHT [³H] en presencia de diferentes concentraciones de los esteroides a probar (2×10^{-4} M – 10×10^{-3} M) y 100 µl de buffer TEDAM con DTT. Después de la incubación, las muestras se trataron como se menciona en el párrafo anterior.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Etapa 1. Síntesis y caracterización.

El presente trabajo consistió en la preparación de cinco intermediarios y dos productos finales S₁-A y S₂-A (Esquema 1 y 2. Pág. 24 y 25) que de acuerdo a las estructuras de estos pueden funcionar como inhibidores de la enzima 5 α -reductasa y utilizarse como fármacos para el control del cáncer de próstata y HPB.

En primer término se caracterizó a la materia prima (I) por sus propiedades físicas y espectroscópicas. El análisis por espectroscopía de infrarrojo (espectro 1) se observó la presencia de una banda en 3437 cm⁻¹ correspondiente al OH de un alcohol secundario en C-3, en 2927 cm⁻¹ correspondiente a CH saturados, otras dos bandas en 1697 y 1681 cm⁻¹ correspondientes al grupo carbonilo en C-20. También se observaron en 1496 y 1381 cm⁻¹ correspondientes a etilos y metilos.

El espectro de Resonancia Magnética Nuclear ¹H (espectro 2) mostró la señal en 5.40 ppm un doble de dobles correspondiente al protón vinílico H-6 acoplado a los protones de H-7. La señal en 3.58 ppm mostró un quintuplete que integró para un protón y se asignó al hidrógeno en C-3. En 2.53 ppm se observó un triplete que integró para un hidrógeno y se asignó al hidrógeno en C-17, también se registraron tres señales simples en 2.12, 1.01 y 0.63 ppm., cada señal integró para tres hidrógenos correspondientes a los protones H-21, H-19 y H-18, respectivamente.

El siguiente paso en la síntesis fue la acetilación en C-3 con anhídrido acético y piridina. El derivado acetoxi (II) se obtuvo con un rendimiento del 95.8 %. Se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas.

En el espectro de IR (espectro 3) se observó una banda correspondiente a CH saturados, se observaron dos bandas intensas en 1726 y 1704 cm⁻¹ correspondientes al carbonilo del éster y a la cetona en C-20. La señal en 1642 cm⁻¹ asignada a la doble ligadura entre C-5 y C-6. También se observaron en 1434 y 1357 cm⁻¹ correspondientes a etilos y metilos. Por último las bandas en 1237 y 1027 cm⁻¹ se asignaron a las vibraciones C-O-C del grupo acetoxi.

En el espectro de RMN ^1H (espectro 4) mostró la señal en 5.38 ppm un doble de dobles correspondiente al protón vínico H-6 acoplado a los protones de H-7. La señal en 4.60 ppm mostró un quintuplete que integra para un protón en C-3. La señal en 2.54 ppm se observó un triplete que integró para un hidrógeno en C-17. La señal en 2.19 ppm mostró un singulete para tres H y se asignó al H en C-20. El singulete en 2.03 ppm se asignó a los protones del metilo del éster en C-3, también se registraron dos señales simples en 1.02 y 0.63 ppm., cada señal integró para tres hidrógenos correspondientes a los protones H-19 y H-18, respectivamente.

El siguiente paso en la síntesis fue la epoxidación con CHCl_3 y m-CPBA de la doble ligadura entre C-5 y C-6. El derivado epoxi (III) se obtuvo con un rendimiento del 55.7%. Se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas. (Tabla 4.3) pág. 29.

En el espectro de IR (espectro 5) se observó una banda correspondiente a CH saturados, se observaron dos bandas intensas en 1733 y 1703 cm^{-1} correspondientes al carbonilo del éster y a la cetona en C-20. También se observaron en 1437 y 1360 cm^{-1} correspondientes a etilos y metilos. Por último las bandas en 1242 y 1034 cm^{-1} se asignaron a las vibraciones C-O-C del grupo acetoxi y C-O-C del grupo epoxi entre C-5 y C-6. La desaparición de la señal en 1642 cm^{-1} correspondiente a la doble ligadura entre C-5 y C-6, confirmó la epoxidación entre estos carbonos.

En el espectro de RMN ^1H (espectro 6) mostró un quintuplete en 4.77 ppm que integra para un protón y se asignó al H en C-3. La señal en 3.06 mostró un doble de dobles que integra para un protón en C-6. La señal en 2.91 ppm mostró un doblete que integró para dos protones en C-4. La señal 2.50 ppm se observó un triplete que integró para un protón en C-17. La señal en 2.12 ppm mostró un singulete para tres H y se asignó a los protones del metilo del éster en C-3, también se registraron tres señales simples en 2.17, 1.01 y 0.59 ppm., cada señal integró para tres hidrógenos correspondientes a H-21, H-19 y H-18, respectivamente.

El siguiente paso en la síntesis fue la oxidación con $\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{O}$. El derivado oxidado (IV) se obtuvo con un rendimiento del 65.5%. Se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas.

En el espectro de IR (espectro 7) se observó la presencia de una banda en 3455 cm^{-1} correspondiente al OH del alcohol terciario en C-5, en 2947 cm^{-1} se observó una banda correspondiente a CH saturados, se observaron las bandas intensas en 1737, 1715 y 1689 cm^{-1} correspondientes al carbonilo del éster, a la cetona en C-6 y a la cetona en C-20. También se observaron en 1422 y 1365 cm^{-1} correspondientes a etilos y metilos. Por último las bandas en 1232 y 1015 cm^{-1} se asignaron a las vibraciones C-O-C del grupo acetoxi. La aparición de la banda correspondiente al alcohol confirma la desaparición del grupo epoxi.

El espectro de RMN ¹H (espectro 8) mostró la señal en 5.05 ppm un quintuplete que integró para un protón y se asignó al H en C-3. La señal en 2.70 ppm mostró un doblete que integró para dos H en C-4. La señal en 2.55 ppm se observó un triplete que integró para un protón en C-17. La señal en 2.12 ppm mostró un singulete para tres H y del metilo del éster en C-4, también se registraron tres señales simples en 2.17, 0.81 y 0.60 ppm., cada señal integró para tres hidrógenos correspondientes a los protones en H-21, H-19 y H-18, respectivamente.

El siguiente paso en la síntesis fue la eliminación con Py y SOCl₂. El derivado (V) se obtuvo con un rendimiento del 50.5 %. Se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas.

En el espectro de IR (espectro 9) en 2935 cm⁻¹ se observó una banda correspondiente a CH saturados, se observaron dos bandas intensas en 1737 y 1689 cm⁻¹ correspondientes al carbonilo del éster, a la cetona en C-6 y a la cetona en C-20. La señal en 1624 cm⁻¹ asignada a la doble ligadura entre C-4 y C-5. También se observaron en 1434 y 1361 cm⁻¹ correspondientes a etilos y metilos. Por último las bandas en 1243 y 1021 cm⁻¹ se asignaron a las vibraciones C-O-C del grupo acetoxi. La desaparición de la banda correspondiente al alcohol confirma la eliminación y la aparición de la banda correspondiente a la doble ligadura entre C-4 y C-5.

En el espectro de RMN ¹H (espectro 10) mostró la señal en 6.09 un doblete que integra para un protón en C-4. La señal en 5.35 ppm un cuadruplete que integró para un protón en C-3. La señal en 2.60 ppm mostró un doblete que integró para un protón en C-7. La señal 2.55 ppm se observó un triplete que integró para un protón en C-17. La señal en 2.13 ppm mostró un singulete para tres H del metilo del éster en C-3, también se registraron tres señales simples en 2.17, 1.03 y 0.66 ppm., cada señal integró para tres hidrógenos correspondientes a los protones en H-21, H-19 y H-18, respectivamente.

El siguiente paso en la síntesis fue la hidrólisis del compuesto V con NaOH al 2 %. El derivado (VI) se obtuvo con un rendimiento del 53.3 %. Se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas.

En el espectro de IR (espectro 11) se observó la presencia de una banda en 3406 cm⁻¹ correspondiente al OH del alcohol secundario en C-3, en 2941 cm⁻¹ se observó una banda correspondiente a CH saturados, se observó una banda intensa en 1686 cm⁻¹ correspondiente a la cetona en C-6 y a la cetona en C-20. También se observaron en 1426 y 1378 cm⁻¹ correspondientes a etilos y metilos. La aparición de la banda correspondiente al alcohol confirma la desaparición del grupo acetoxi en C-3.

En el espectro de RMN ¹H (espectro 12) mostró la señal en 6.18 un doblete que integra para un protón en C-4. La señal en 4.25 ppm un cuadruplete que integró para un protón en C-3. La señal en 2.69 ppm mostró un doblete que integró para un protón en C-7. La señal 2.54 ppm se observó un triplete que integró para un protón en C-17. La señal en 2.13 ppm mostró un singulete para tres H en C-21. También se registraron dos señales

simples en 1.01 y 0.66 ppm., cada señal integró para tres hidrógenos correspondientes a los protones en H-19 y H-18, respectivamente.

El compuesto S₁-A se obtuvo por esterificación en CH₂Cl₂, con ácido valérico, DCC, 4,4-DMPA, con un rendimiento del 76 % y fue caracterizado por IR, EMEI, RMN¹H y RMN¹³C.

En el espectro de IR (espectro 13) se observó en 2943 cm⁻¹ una banda correspondiente a CH saturados, se observaron dos bandas intensas en 1732 y 1702 cm⁻¹ correspondientes al carbonilo del éster, a la cetona en C-6 y a la cetona en C-20. La señal en 1634 cm⁻¹ se asignó a la doble ligadura entre C-4 y C-5. También se observaron en 1453 y 1381 cm⁻¹ correspondientes a etilos y metilos. Por último, las bandas en 1237 y 1042 cm⁻¹ se asignaron a las vibraciones C-O-C.

El espectro de EMEI del compuesto S₁-A (espectro 14) mostró en 414 m/z señal que se asignó a M⁺ (ión molecular).-El pico base se observó en 330 m/z y se generó por la pérdida de [- CO-(CH₂)₃-CH₃] a partir del ión molecular.

En el espectro de RMN ¹H (espectro 15) mostró la señal en 6.09 un doblete que integra para un protón en C-4. La señal en 5.35 ppm un cuadruplete que integró para un protón en C-3. La señal en 2.55 ppm se observó un triplete que integró para un protón en C-17. La señal en 2.30 ppm se observó un triplete que integró para dos H en C-2'. También se registraron cuatro señales simples en 2.17, 1.03, 0.91 y 0.66 ppm., cada señal integró para tres hidrógenos correspondientes a los protones en H-21, H-19, H-5', y H-18, respectivamente.

En el análisis por RMN ¹³C del compuesto S₁-A (espectros 16-21) se observaron las señales en 208.9 y 201.8 ppm para los carbonos C-20 y C-6. La señal en 173.4 ppm se asignó al éster en C-3. Los desplazamientos a 147.5 y 129.2 ppm se asignaron a los carbonos C-5 y C-4. Las señales en 68.9, 63.2, 56.6, 50.9 y 33.9 ppm se asignaron a los carbonos terciarios en C-3, C-17, C-14, C-8 y C-9. Las señales en 31.4, 24.1, 13.8 y 13.3 ppm se asignaron a los carbonos primarios en C-21, C-19, C-18 y C-5'.

El compuesto S₂-A se obtuvo por esterificación en CH₂Cl₂, con ácido fenil-valérico, DCC, 4,4-DMP, con un rendimiento del 67 %. Se caracterizó por IR, EMEI, RMN¹H y RMN¹³C.

En el espectro de IR (espectro 22) se observó en 2943 cm⁻¹ una banda correspondiente a CH saturados. La señal en 1850 cm⁻¹ corresponde al sobre tono del fenilo indicando mono sustitución, se observaron dos bandas intensas en 1731 y 1701 cm⁻¹ correspondientes al carbonilo del éster, a la cetona en C-6 y a la cetona en C-20. La señal en 1634 cm⁻¹ asignada a la doble ligadura entre C-4 y C-5 y además las del fenilo. También se observaron en 1453 y 1380 cm⁻¹ correspondientes a etilos y metilos. Por último las bandas en 1234 y 1106 cm⁻¹ se asignaron a las vibraciones C-O-C. Las bandas en 749 y 700 cm⁻¹ que indican que el fenilo hay mono sustitución.

En el espectro de EMEI del compuesto S₂-A (espectro 23) mostró en 490 m/z una señal que se asignó a M⁺ (ion molecular). El pico base se observó en 314 m/z y se generó por la pérdida del [5-fenilvaleriloiloxi] a partir del ión molecular y en 91 m/z se asignó al ión tropilo.

En el espectro de RMN ¹H (espectro 24) se observó una señal en 7.3 ppm (integró para 2H) que se asignó a los protones H-*meta* del fenilo en C-5'. El desplazamiento en 7.2 ppm (integración para 2H) se asignó a los protones H-*orto* y H-*para* del fenilo en C-5'. La señal en 6.08 ppm un doblete que integra para un protón en C-4. La señal en 5.34 ppm un cuadruplete que integró para un protón en C-3. El doblete en 2.65 que integró para un protón se asignó en C-7. El desplazamiento en 2.6 ppm hay un triplete que integró para 2H en C-5'. La señal en 2.55 ppm se observó un triplete que integró para un protón en C-17. La señal en 2.30 ppm se observó un triplete que integró para dos H y se asignó al H en C-2'. Se registraron tres singuletes en 2.17, 1.02 y 0.66 ppm., cada señal integró para tres hidrógenos correspondientes a los protones en H-21, H-19, y H-18, respectivamente.

En el análisis por RMN ¹³C para el compuesto S₂-A (espectros 25-30) las señales en 208.9 y 201.7 ppm se asignaron a los carbonos C-20 y C-6. La señal en 173.2 ppm se asignó al éster en C-1'. Los desplazamientos a 147.5, 142.0 y 129.2 ppm se asignaron a los carbonos C-6', C-5 y C-4. Las señales correspondientes al anillo aromático en C-5' se observaron en 128.2 (C-*meta* y C-*orto*), 125.7 (C-*para*). Las señales en 68.9, 63.2, 50.9 y 31.4 ppm se asignaron a los carbonos terciarios en C-3, C-17, C-8 y C-9. Las señales en 30.8, 24.1 y 13.2 ppm se asignaron a los carbonos primarios en C-21, C-19 y C-18.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Etapa 2. Actividad Biológica.

Cabe mencionar que el compuesto S₁-A no fue evaluado in vivo por falta de material biológico, ya que por causas ajenas a nuestro control, no se contó con el número adecuado de hámsteres castrados (30 días antes) para integrar el grupo de animales destinado para la evaluación del compuesto. Al no estar completo el grupo de hámsteres, se decidió no aplicar el esteroide debido a que los resultados serían puntuales y estadísticamente no serían confiables.

5.1.1.- Efecto del S₂-A sobre el diámetro de la mancha pigmentada de los órganos flanco del hámster macho

La prueba de los órganos flanco, permitió evaluar el efecto inhibitorio del compuesto a analizar sobre la enzima 5 α -reductasa. A mayor inhibición de la enzima será el diámetro de la mancha pigmentada de las glándulas. Los resultados se muestran en la Figura 5.1.

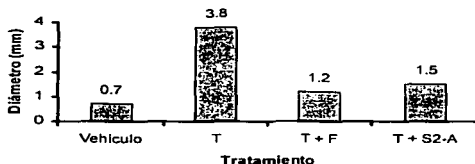


Figura 5.1. Diámetro de la mancha pigmentada del hámster macho bajo diferentes esquemas de tratamiento
T = Testosterona F = Finasterida S₂-A = 4-pregnen-3 β -valeroloxi-6,20-diona

De acuerdo a los resultados de la Figura 5.1, la castración de los animales disminuyó el diámetro de los órganos flanco hasta un valor de 0.7 mm, mientras que la testosterona regeneró el diámetro de la mancha pigmentada hasta un valor de 3.8 mm. La finasterida (Fig.1.4) disminuyó el diámetro de la mancha pigmentada hasta 1.2 mm, cuando se inyectó conjuntamente con la T.

El compuesto S₂-A Fig. 4.3 disminuyó el diámetro de la mancha pigmentada cuando de inyectó conjuntamente con la T hasta un valor de 1.5 mm. El conjunto de datos indicaron que el compuesto S₂-A es inhibidor de la conversión de T a 5 α -DHT en el órgano del flanco del hámster macho castrado y tratado con T, ya que el diámetro de la mancha pigmentada depende de esta conversión.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.1.2.- Efecto del S₂-A sobre el peso de vesícula seminal y próstata.

El efecto del compuesto S₂-A sobre el peso de las vesículas seminales y la próstata se muestran en las Figuras 5.2 y 5.3 respectivamente.

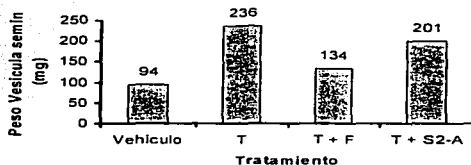


Figura 5.2. Peso en mg de las vesículas seminales de hámster macho bajo diferentes esquemas de tratamiento
T = Testosterona F = Finasterida S₂-A = 3β-(5-fenilvaleroiloxi)-4pregnen-6,20-diona.

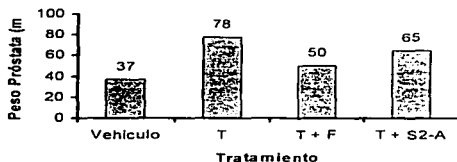


Figura 5.3. Peso en mg de las próstatas de hámster macho bajo diferentes esquemas de tratamiento
T = Testosterona F = Finasterida S₂-A = 3β-(5-fenilvaleroiloxi)-4pregnen-6,20-diona.

Los resultados de las Figuras 5.2 y 5.3, mostraron que el tratamiento con inyecciones diarias de 200 µg de testosterona, aumentó el peso de vesículas seminales hasta 236 mg y de la próstata hasta 78 mg, mientras que la finasterida disminuyó significativamente ($P < 0.05$) el peso de vesículas seminales hasta 134 mg y de la próstata hasta 50 mg. De igual manera el compuesto S₂-A (Fig. 5.2) disminuyó el peso de vesícula seminal hasta 201 mg y próstata 65 mg. Como se observa, el compuesto S₂-A, mostró un efecto inhibitorio en estas pruebas, aunque más pobre con respecto a la finasterida (Fig.1.4) que es el único esteroide inhibidor de la 5α-reductasa presente en el mercado.

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

5.2.- Evaluación *in vitro* del efecto inhibitorio del éster (S₁-A) y (S₂-A) sobre la 5 α -reductasa.

El efecto inhibitorio del compuesto S₁-A (Fig.5.1) sobre la 5 α -reductasa presente en la fracción microsomal obtenida a partir de homogenizados de vesículas seminales se muestra en la Figura 5.4.

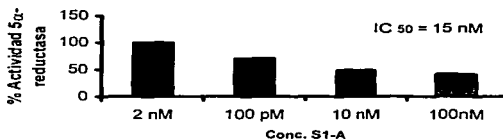


Figura 5.4. Determinación del IC₅₀ del esteroide de la fracción microsomal de vesículas seminales de hámster macho castrado.

El IC₅₀ es la concentración del compuesto que inhibió el 50 % de la actividad de la 5 α -reductasa presente en las vesículas seminales (IC₅₀) fue de 15 nM, mientras que la de finasterida fue de 10 nM³⁷.

Los resultados mostraron que el compuesto S₁-A (Fig. 5.1) es un buen inhibidor de la actividad de la enzima 5 α -reductasa a bajas concentraciones con IC₅₀ = 15 nM, por lo cual se requiere poca cantidad del esteroide sintetizado para obtener buenos resultados.

El IC₅₀ del compuesto S₂-A (Fig.5.4) se obtuvieron datos los cuales no fueron confiables por lo cual no se reportaron, ya que éste compuesto precipita al adicionar el MeOH, que es el medio de incubación.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

5.3.- Evaluación *in vitro* de la unión a receptores de andrógenos (presentes en la fracción citosólica de las vesículas seminales de hámster) con los compuestos S₁-A y S₂-A.

Los resultados de esta prueba se muestran en la Figura 5.5.

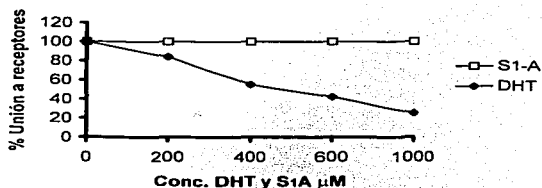


Figura 5.5. % Unión a receptores androgénicos.

El IC₅₀ de la serie control de DHT fue de 585.3 μM , mientras que el compuesto S₁-A no presenta unión a receptores y se mantiene constante en 100 %.

El compuesto S₁-A presenta la misma conducta que la finasterida, la cual se ha reportado en la literatura que tampoco se une a los receptores de andrógenos y solo presenta actividad sobre la enzima 5 α -reductasa, el compuesto S₂-A no se evaluó por su insolubilidad en MeOH.

Los resultados indicaron que el compuesto S₁-A es un inhibidor de la enzima 5 α -reductasa y no se une a los receptores de andrógenos presentes de la fracción citosólica de vesículas seminales de hámsteres macho castrados.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CONCLUSIONES

En el presente trabajo se realizó la síntesis y la evaluación de la actividad biológica de los compuestos nuevos derivados de la progesterona: **4-pregnen-3 β -valeroiloxi-6,20-diona (S₁-A)** y de **3 β -(5-fenilvaleroiloxi)-4pregnen-6,20-diona (S₂-A)**. La síntesis de estos nuevos compuestos no ha sido reportada con anterioridad en la literatura por lo cual se purificaron y se caracterizaron por propiedades físicas (p.f) y sus datos espectroscópicos (IR, RMN ¹H, RMN ¹³C y EMIE).

Los nuevos esteroides sintetizados S₁-A y S₂-A se comportaron como inhibidores de la enzima 5 α -reductasa; el compuesto S₁-A en el modelo *in vitro* (Evaluación sobre el efecto inhibitorio sobre la enzima 5 α -reductasa y la evaluación de la unión a receptores de andrógenos) y el compuesto S₂-A en el modelo *in vivo* (Prueba del órgano del flanco y de la determinación del peso de las vesículas seminales y de la próstata).

El compuesto S₁-A (valeroiloxi en C-3) mostró actividad moderada como inhibidor de la enzima 5 α -reductasa (*in vitro*) comparable con el estándar de finasterida. Además no presentó afinidad por los receptores de andrógenos por lo que se concluye que su efecto antiandrogénico se debe exclusivamente a su comportamiento como inhibidor de la enzima 5 α -reductasa.

El compuesto S₂-A (5-fenilvaleroiloxi en C-3) se comportó como inhibidor de la enzima 5 α -reductasa en el modelo *in vivo*. Mostró una disminución considerable en el crecimiento del diámetro de la mancha pigmentada de la glándula del flanco (1.5 mm), en el peso de las vesículas seminales (201 mg) y en el peso de la próstata (65 mg) después del tratamiento de los animales con testosterona y con respecto al estándar de finasterida.

El compuesto S₁-A será evaluado como inhibidor de la enzima 5 α -reductasa *in vivo* para comparar su actividad con respecto al que mostró *in vitro*. Además este compuesto se evaluará en tejido prostático humano para ver el comportamiento de la inhibición de la enzima 5 α -reductasa tipo II.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. Guyton, C. A.; May, E. J., Tratado de Fisiología Médica, McGraw Hill Interamericana, 9ª edición pág. 1009-1017, México (1997).
2. Voet, D.; Voet, G. J., Bioquímica, Ediciones Omega, 1ª edición, pág. 1243, Barcelona (1992).
3. Battmann, T.; et. al., Pharmacological Profile of RU 58642, a Potent Systemic Antiandrogen for the Treatment of Androgen-dependent Disorders, *J. Steroid Biochem. Molec. Biol.* **64**, 103-111 (1998).
4. Tortora G., Anagnostakos N., Principios de Anatomía y Fisiología, Harla, 3ª edición, México 1984.
5. Cesarsimo R., Carr D., Therapy Update: *Am. J. Health-Syst Pharm.*, **53** pág 381 (1996).
6. Hernández, L. F., Curso teórico de Toxicología, Capítulo 11, Facultad de Química, UNAM, México, 2001
7. Ramzi, D. F., Patología estructural y funcional, McGraw Hill Interamericana, vol. II pág. 1173-1176, Madrid, 1990,
8. Cabeza, M.; et. al., "Androgenic and anti-androgenic effects of progesterona derivatives with different halogens as substituents at the C-6 position", *Steroids* **64**, 413-421 (1999).
9. Sánchez Huerta, N., Síntesis de 17 α -butiriloxi-16 β -metilpregna-4,6-dien-3,20-diona como un antiandrógeno esferoidal, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, 2000.
10. Bratoeff E., Flores G., Ramírez E., Valencia N., *Chimica Oggi/Chemistry today*, v. **15**, 67-69 (1997).
11. Litter M. *Farmacología experimental y clínica*, 6ª edición. El Atenéo. Argentina 1980., pág. 1218-1233.
12. Shulster D., Burstein S. and Cooke B.A., *Molecular endocrinology of Steroid Hormones*, Wiley, London 1976.
13. Martínez A., Síntesis de 17 α -hidróxi-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona como un intermediario en la síntesis de andrógenos. Tesis de Licenciatura de la Facultad de Química de la UNAM, (1997).
14. McMurry John, *Química Orgánica*, 3ª edición, Grupo editorial Iberoamericana USA (1992) pág. 1071-1078.
15. Raymond J., Fiet et al., Design of antiandrogens and their mechanism of action: A case study (Anandron), *Hormone Res*, **28**: 230-241 (1987).
16. Orten J. M., Neuhaus, O. W., *Bioquímica Humana*, Panamericana, pág. 664-648 Argentina, 1984.
17. Lozano Teruel J. A., Galindo Cháscales J. A., Solano Muñoz F., *Bioquímica para Ciencias de la Salud*, Editorial Interamericana McGraw Hill, España 1995. pág. 174-177.
18. Hocker, C. W., Reproduction in the male. In Ruch, T. C. and Patton, H. D., *Physiology and Biophysics* 19th Ed., W.B. Saunders Co., Philadelphia, pág 1205 (1965).

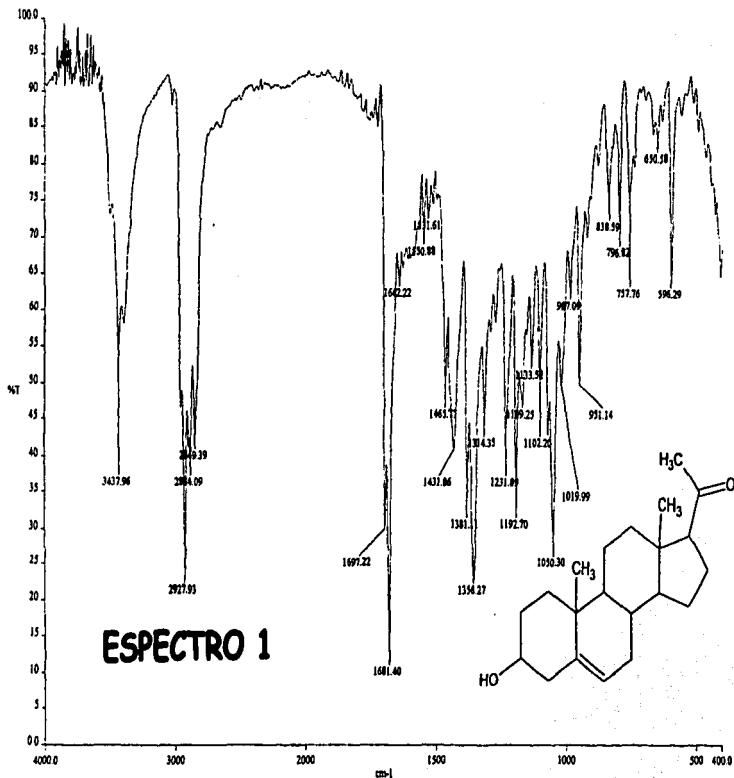
19. Drugs of Today 1995, v. 31: 537-544.
20. Bratoeff E., Herrera H., Ramírez E., Solórzano K., Murillo E., Quiroz A. y Cabeza M. Chemical Pharmaceutical. Bulletin, v 48 (9), 1249-1255 (2000).
21. Wilson , J. D., Recent Studies on the Mechanism of Action of Testosterona, New Engl J. Med. 1972 pág. 1248.
22. Holt D., Levy M., J. Med. Chem., v. 33, pág. 943 (1990).
23. Labrie F., Sugimoto Y., Endocrinology, v. 131 pág.1571 (1992).
24. Isaacs J., Drugs of today, v. 29 pág. 335 (1993).
25. Shankar M., Li X., Leplante S., J. Med. Chem, (1995) v. 38 pág. 1456
26. Catalona, W. J., and Scott, W. W., Carcinoma of the prostate In Walsh, P. C., et al. (eds): Campbell's Urology. Fifth edition. Saunders Co. Philadelphia 1986, pág 1463.
27. Iwasaki Otake, D., Síntesis de 17 α -benzoiloxi-16 β -metilpregna-4,6-dien-3,20-diona como antiandrógeno esterooidal, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México, 2000.
28. Bratoeff E., Flores G., Ramírez E., Calderón D. y Hernández E. Rev. Mex. Cien. Farm., v 28 13-19 (1997).
29. Calderón D., Hernández N., Barragán G., Bratoeff E., Ramírez E., Antiandrógenos más usuales. Reflexiones sobre la Síntesis Orgánica. Rev. Mex. Cien. Farm. v. 28 (1) 24-29 (1997).
30. Goodman & Gilman's CD-ROM, The Pharmacological basis of Therapeutics, McGraw hill 9th edition, USA 1196.
31. Traish A., Muller R., Wotiz H., Interaction of cyproterone acetate with rats prostatic androgen receptors, Steroids, 45: 247-252 (1985).
32. [http:// www.prostata.cl/](http://www.prostata.cl/)
<http://www.braquiterapia-prostata.com/cancer.html>
33. Barry K., Stephen B., Julian B., Fox D., Pharmacological Options in the Treatment of Bening Prostatic Hyperplasia, J. Med. Chem. 40: (9), 1293-1294 (1997).
34. [http:// www.tuotromedico.com/temas/cancer_de_protta.htm](http://www.tuotromedico.com/temas/cancer_de_protta.htm)
35. [http:// www.infodoctor.org/bandolera/b73s-6.html](http://www.infodoctor.org/bandolera/b73s-6.html)
[http:// www.fonendo.com/noticias/9/2000/07/ 1.s.html](http://www.fonendo.com/noticias/9/2000/07/1.s.html).
36. Bradford M.M., A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye bending. Am-Biochem.72, 248-254 (1976).
37. Cabeza M., Bratoeff E., Hueze I., Ramirez., Sánchez M. and Flores E. Enzymatic and Binding Activites of 5 α -reductase and androgen receptors in hamster prostate. Artículo Pro. West. Pharmacol. Soc 46: 1-4 (2003).

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

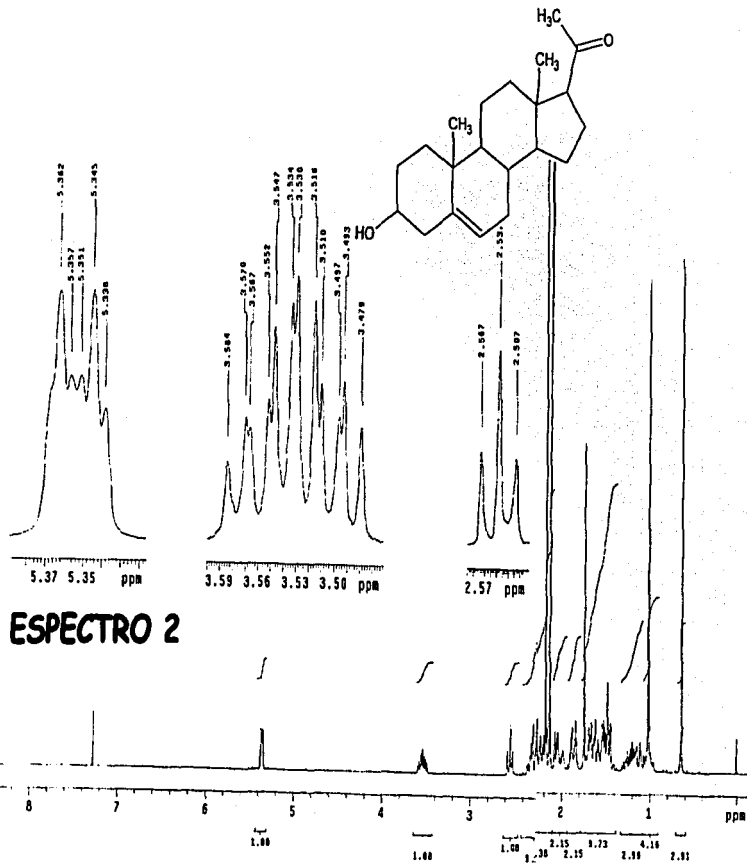
Capítulo 8

ESPECTROSCOPIA

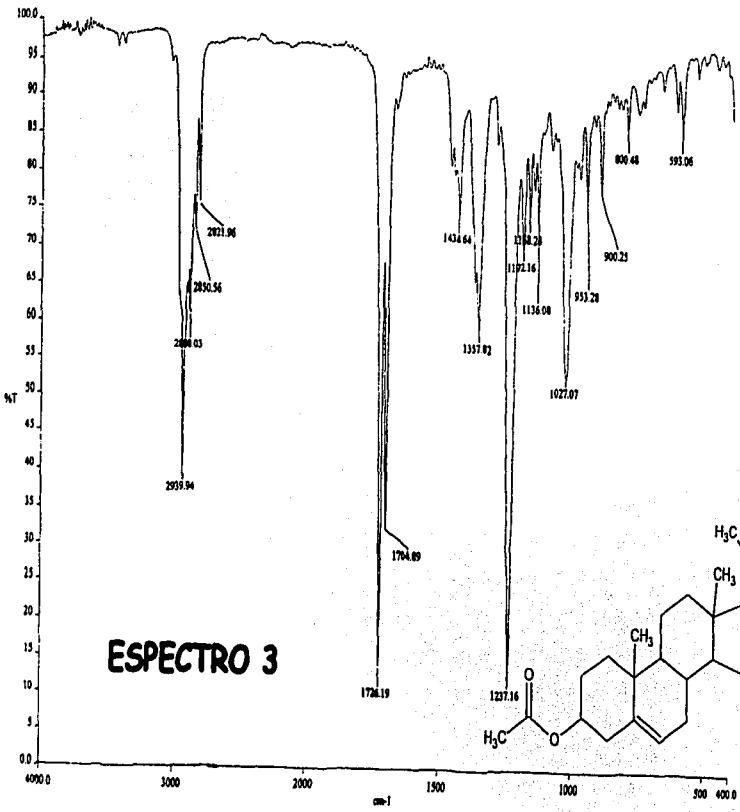
TESIS CON
FALTA DE ORIGEN



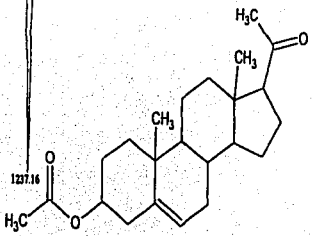
TESIS CON
FALTA DE ORIGEN



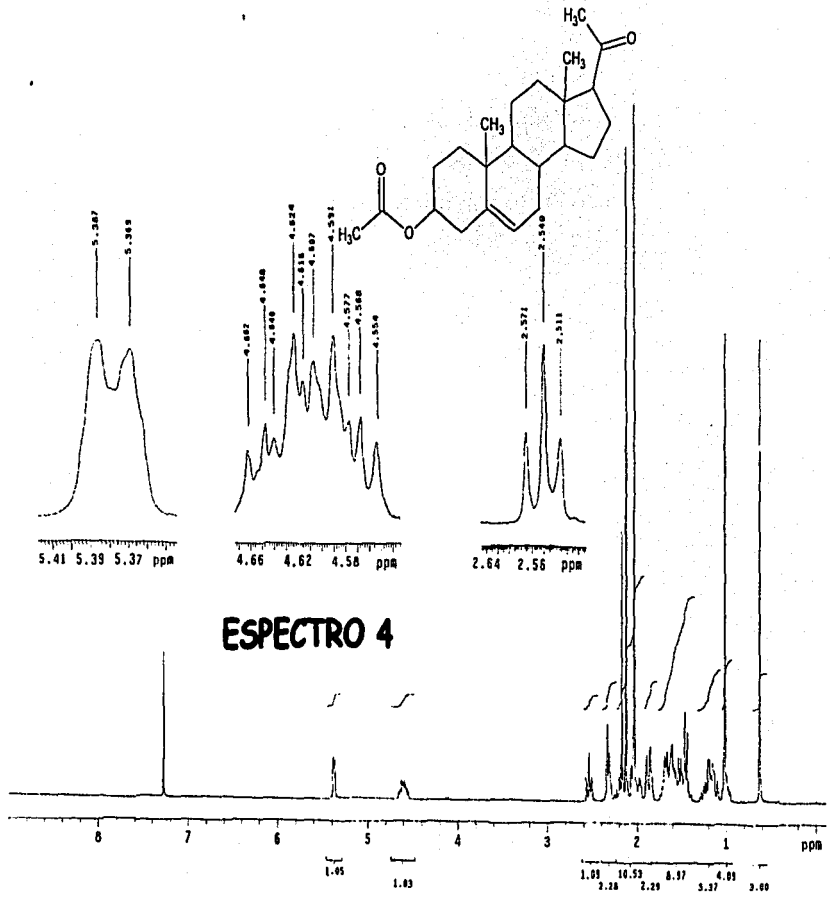
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



ESPECTRO 3

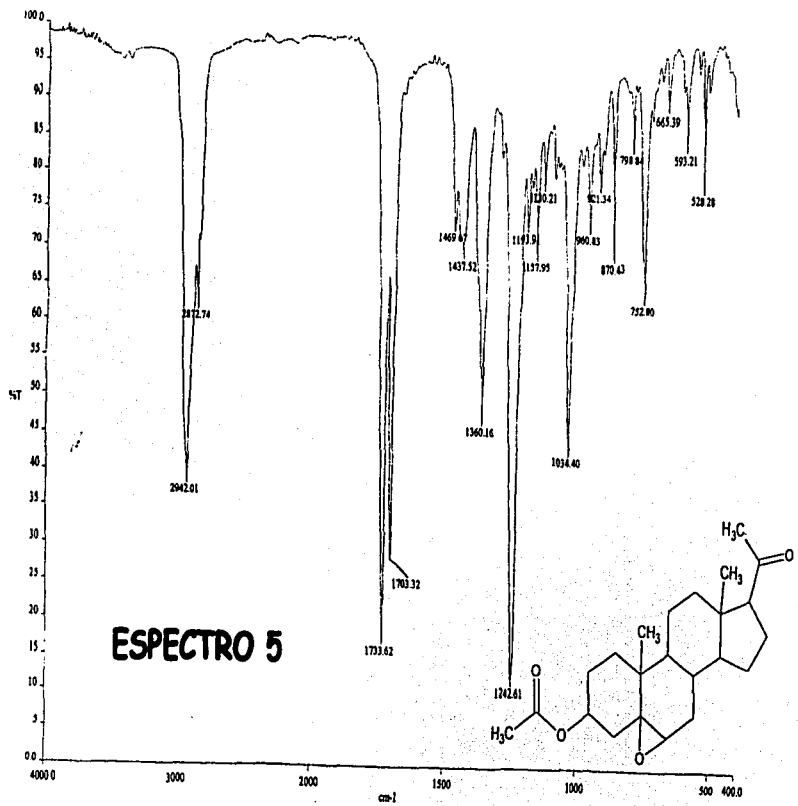


TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

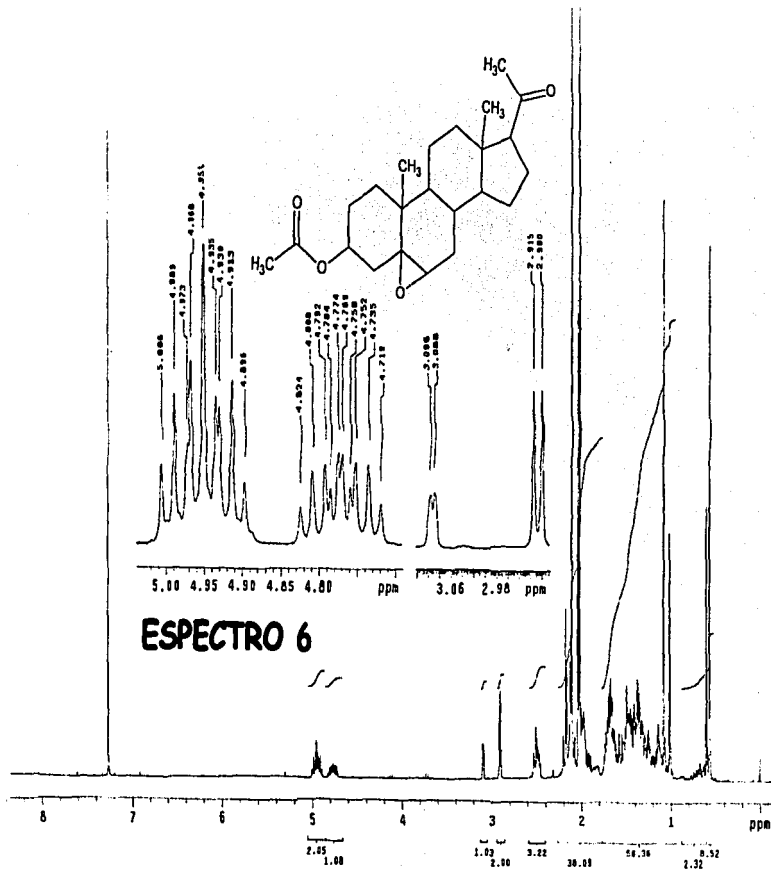


ESPECTRO 4

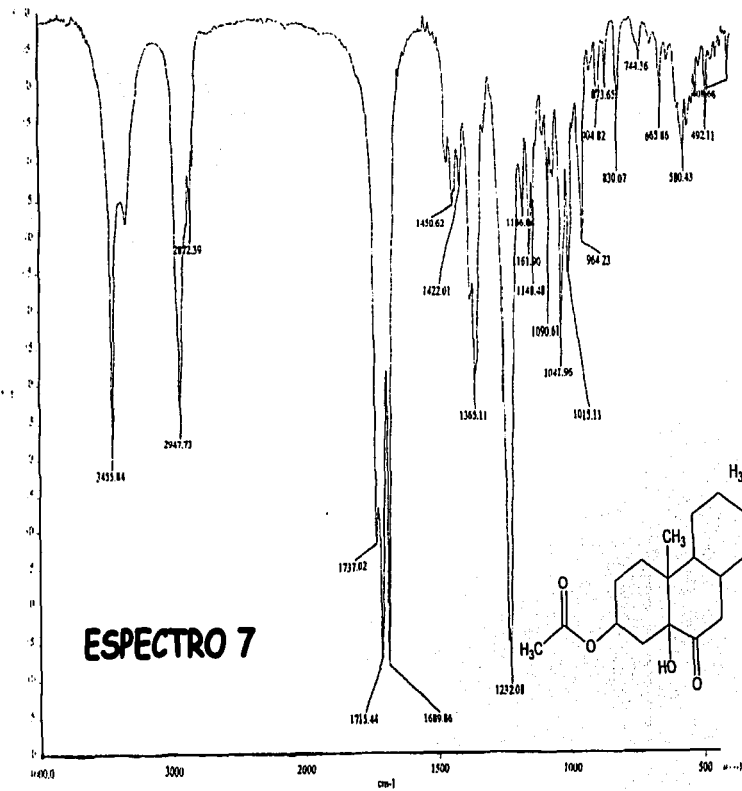
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



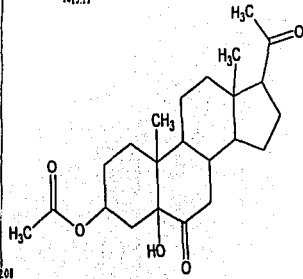
TESIS CON
FALTA DE ORIGEN



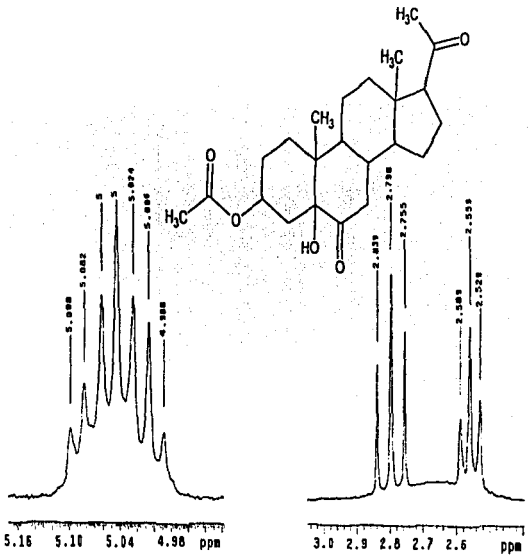
TESIS CON
FALTA DE ORIGEN



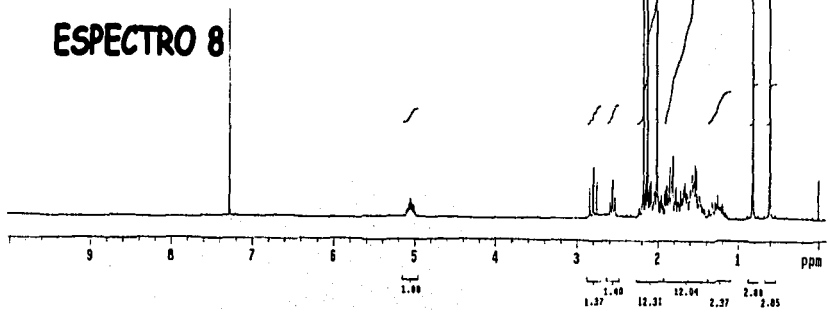
ESPECTRO 7



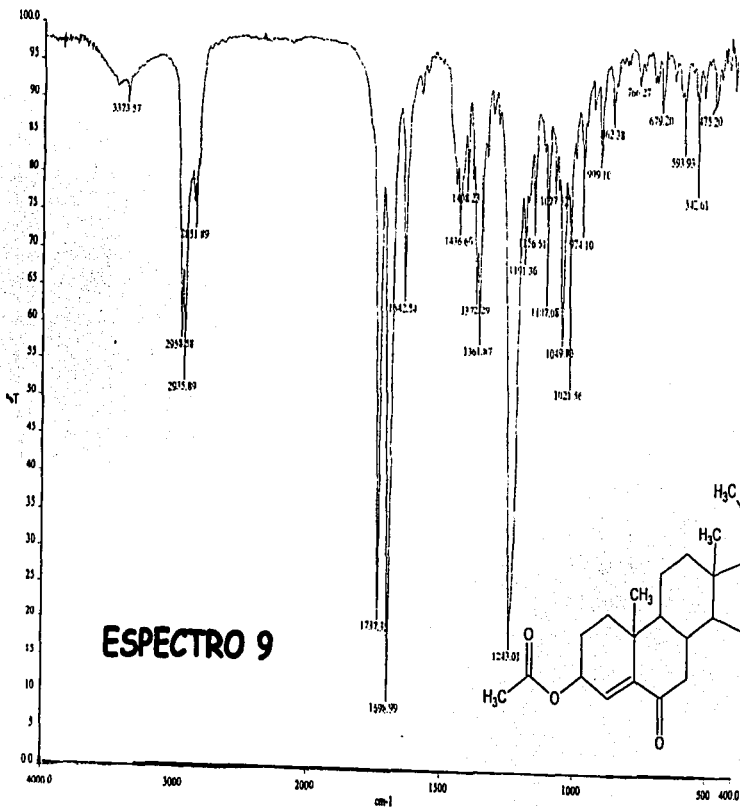
TESIS CON
FALTA DE ORIGEN



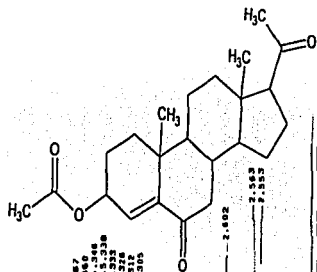
ESPECTRO 8



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



6.100 ppm

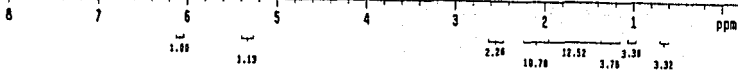


5.35 ppm



2.58 ppm

ESPECTRO 10



1.58

1.19

2.28

10.70

12.32

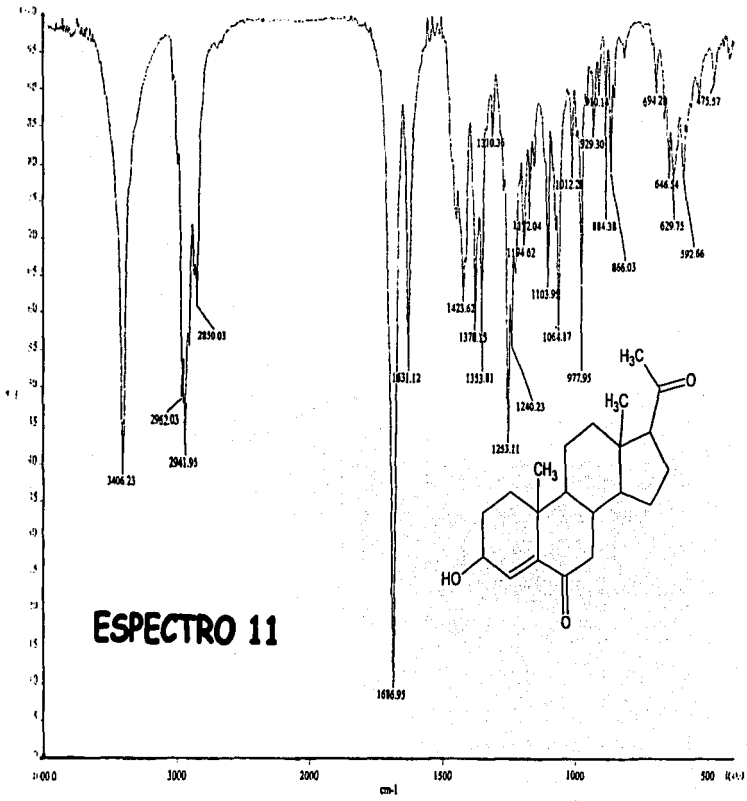
3.70

3.31

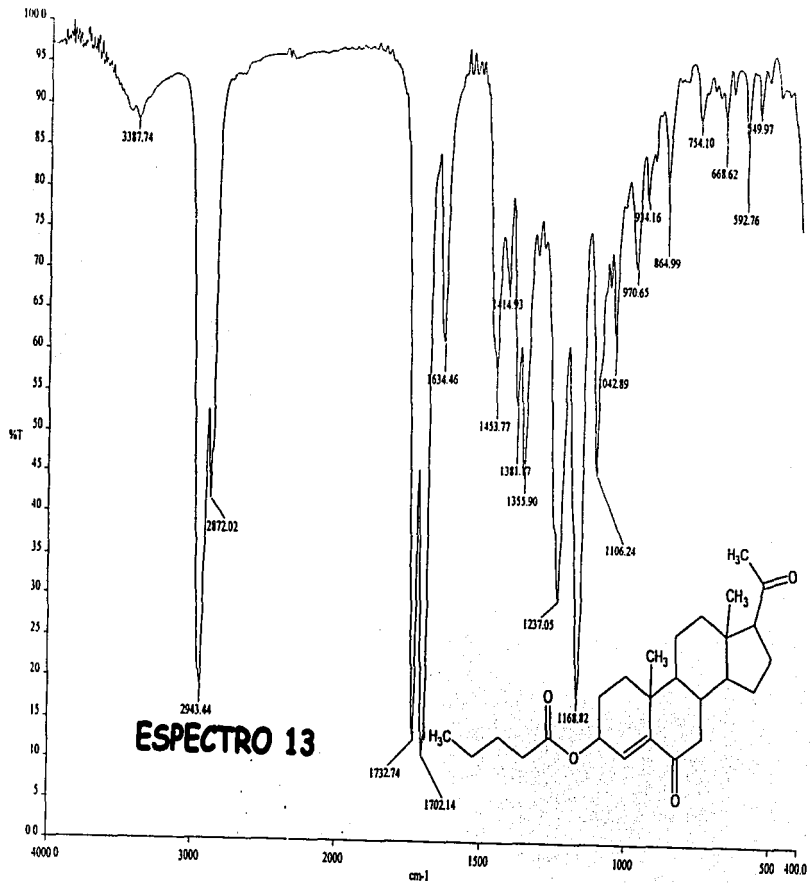
3.32

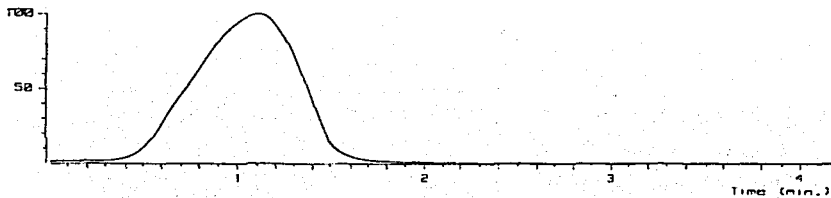
TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

66



TESIS
FALTA DE ORIGEN





Mass Spectrum 1

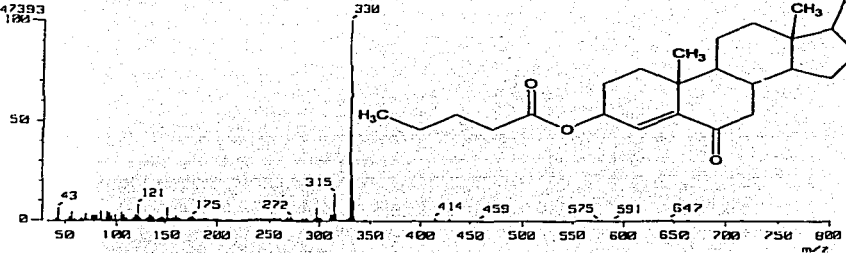
T : 1.11 min
an Mode : EI+

Scan# : (35,46)

Int. : 99.89

Temp : 5.4 deg.C

Time (min.)



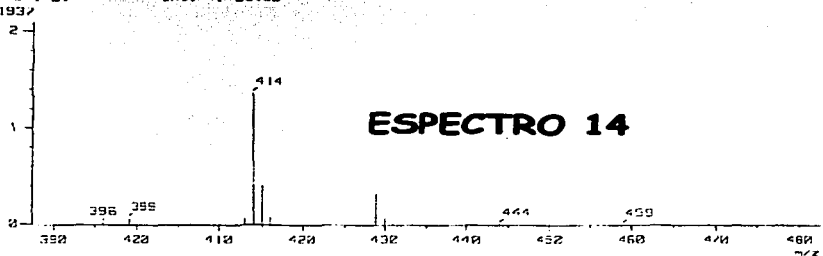
Mass Spectrum 1

T : 1.11 min
an Mode : EI+

Scan# : (35,46)-(95,123)

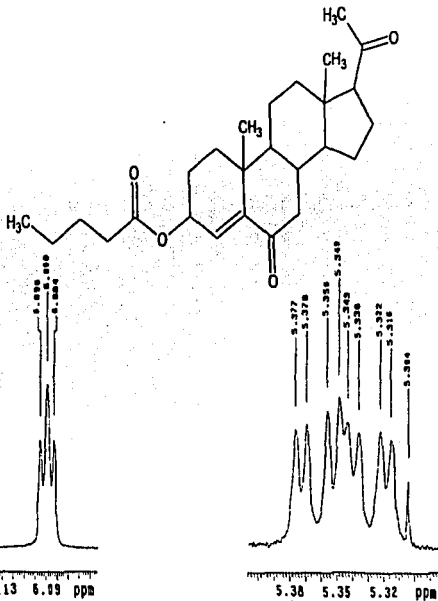
Int. : 99.89

Temp : 27.5 deg.C



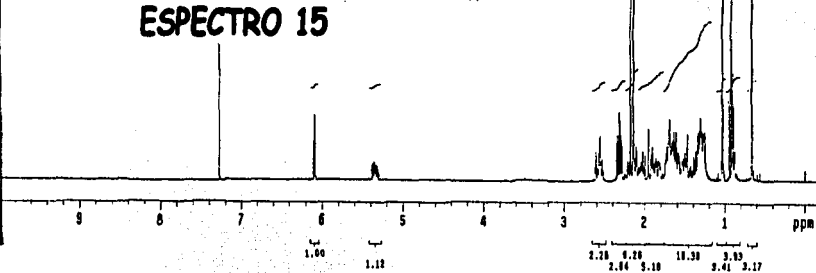
ESPECTRO 14

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

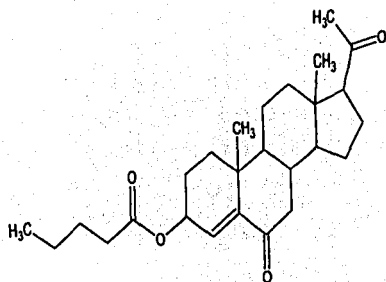


ESPECTRO 15

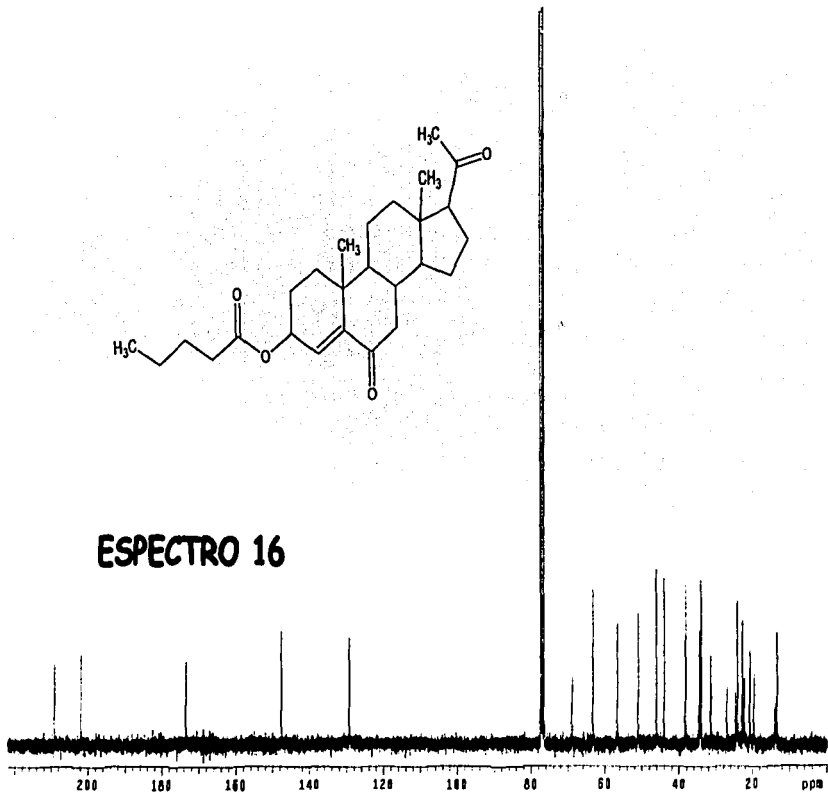
TESIS CON
FALTA DE ORIGEN



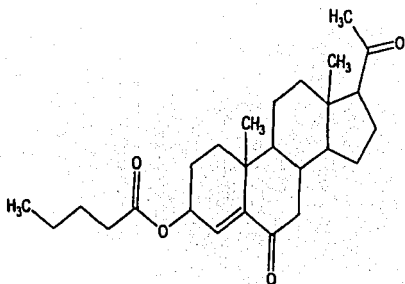
ot



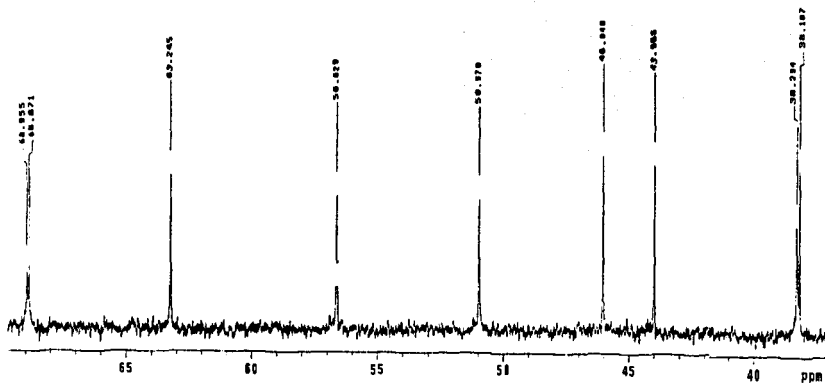
ESPECTRO 16



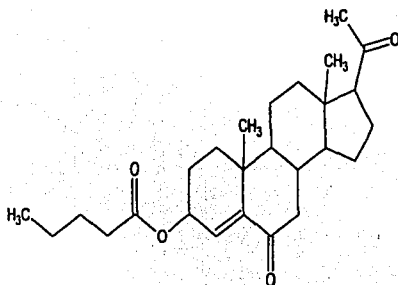
TESIS COM
 PATA DE ORIGEN



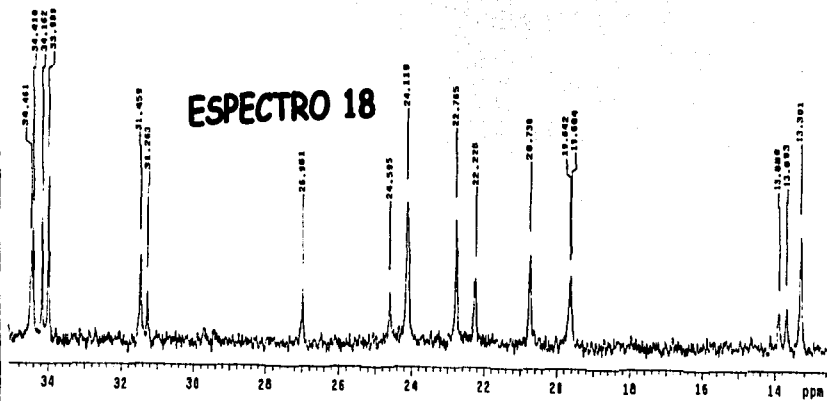
ESPECTRO 17



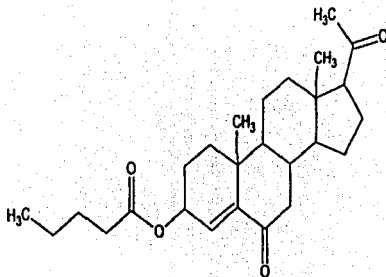
TESIS COM
FALTA DE ORIGEN



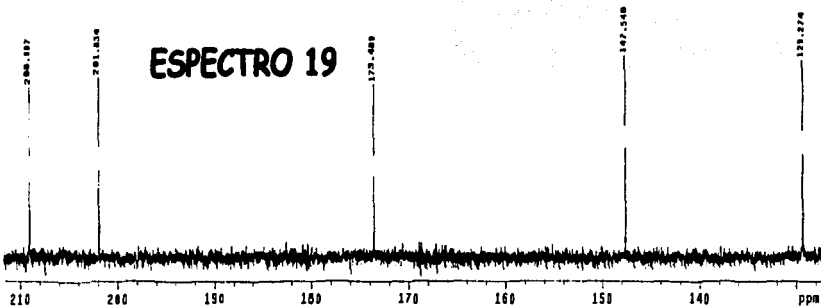
ESPECTRO 18



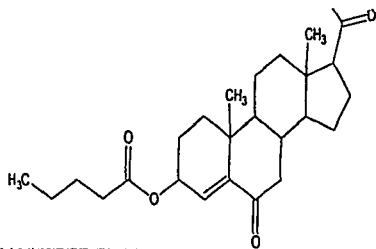
TESIS COM
FALLA DE ORIGEN



ESPECTRO 19



TESIS CON
FALTA DE ORIGEN



CH₃ carbons



CH₂ carbons



CH carbons



ESPECTRO 20

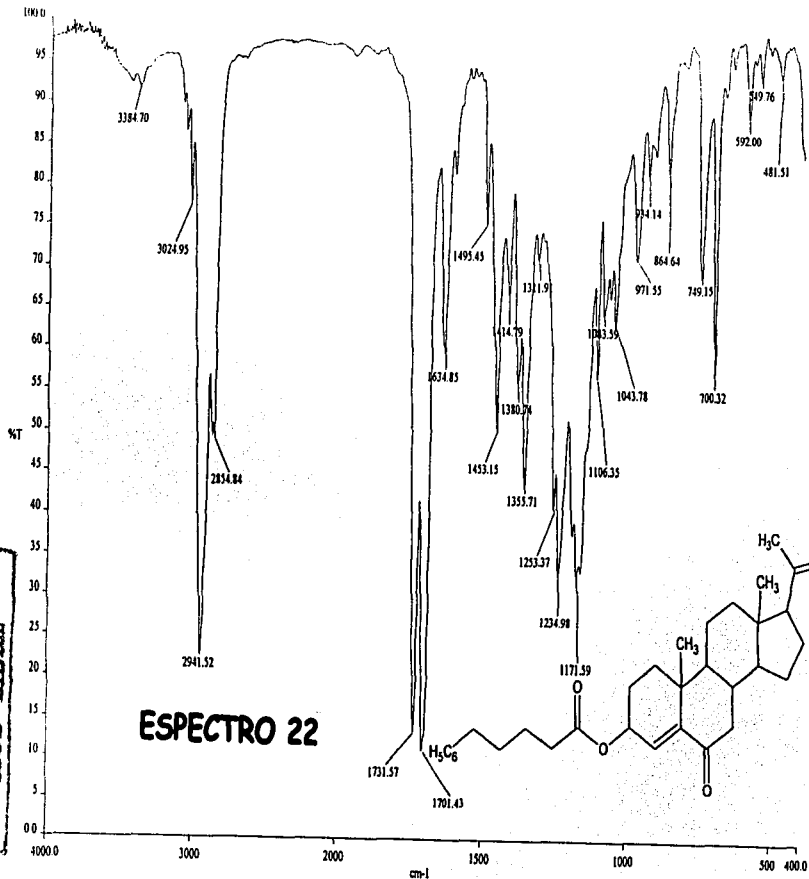
all protonated carbons



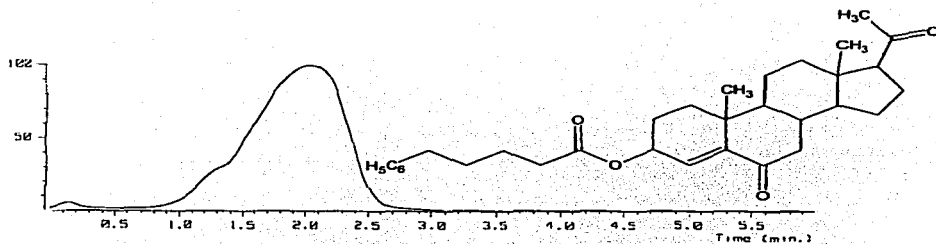
200 180 160 140 120 100 80 60 40 20 ppm

TESIS
FALTA DE ORIGEN

TESIS COM
FALTA DE ORIGEN



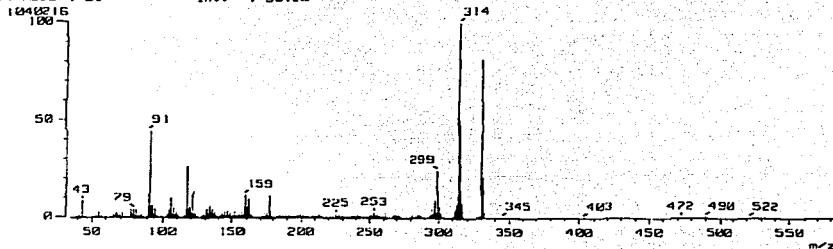
77



[Mass Spectrum]
 RT : 2.01 min
 Ion Mode : EI+

Scan# : (69,80)
 Int. : 99.20

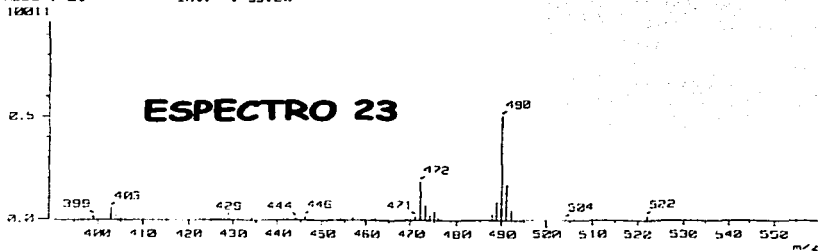
Temp : 6.4 deg.C



[Mass Spectrum]
 RT : 2.01 min
 Ion Mode : EI+

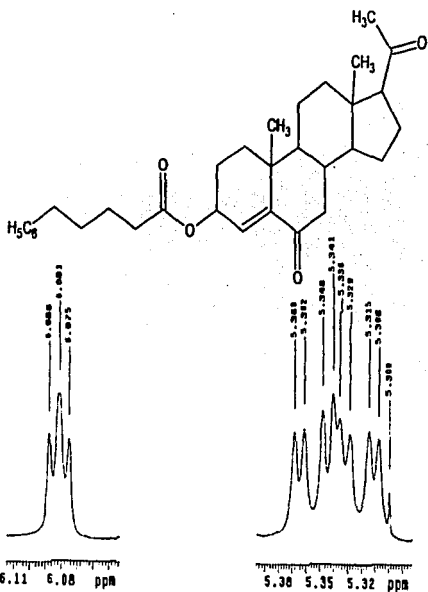
Scan# : (69,80)-(131,182)
 Int. : 99.20

Temp : 35.0 deg.C

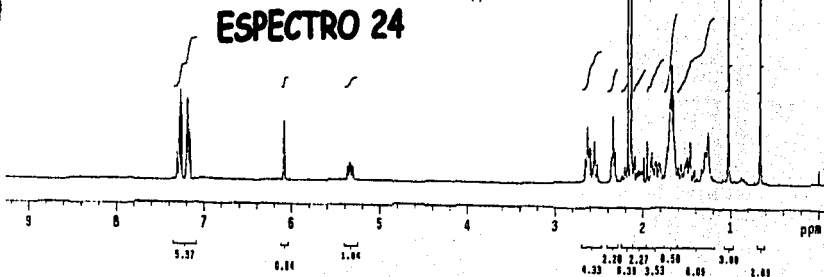


ESPECTRO 23

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

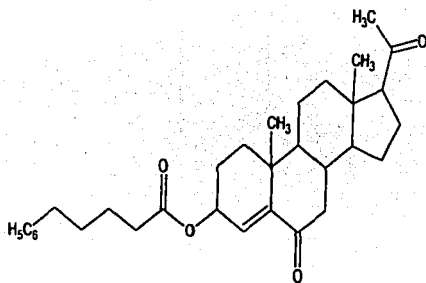


ESPECTRO 24

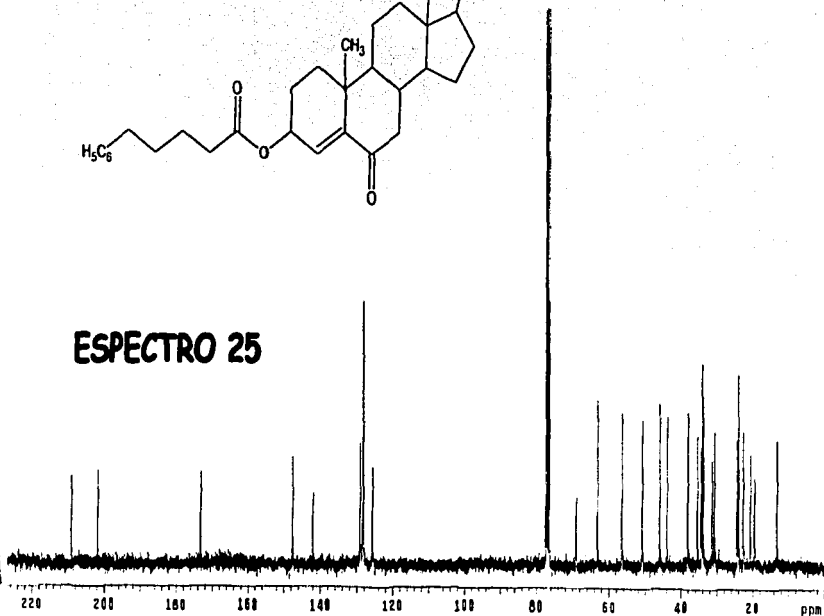


TESTIS
PALLA DE ORIGEN

bt

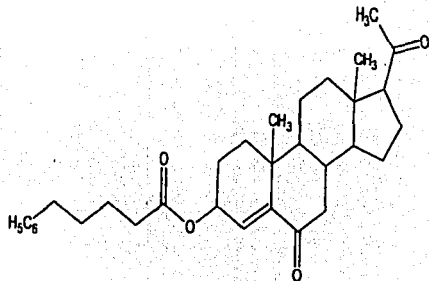


ESPECTRO 25

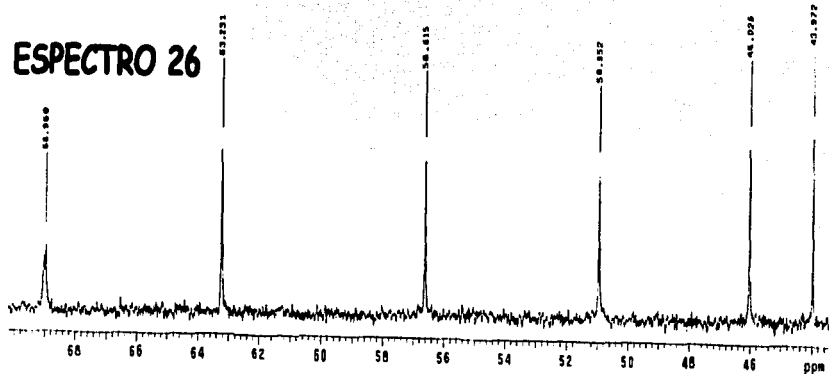


TESIS 2007
FALIA DE ORIGEN



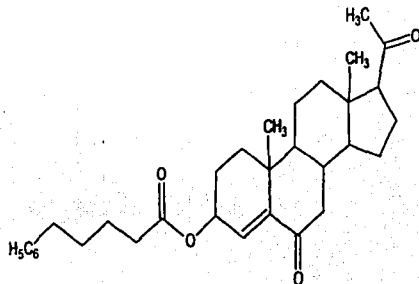


ESPECTRO 26

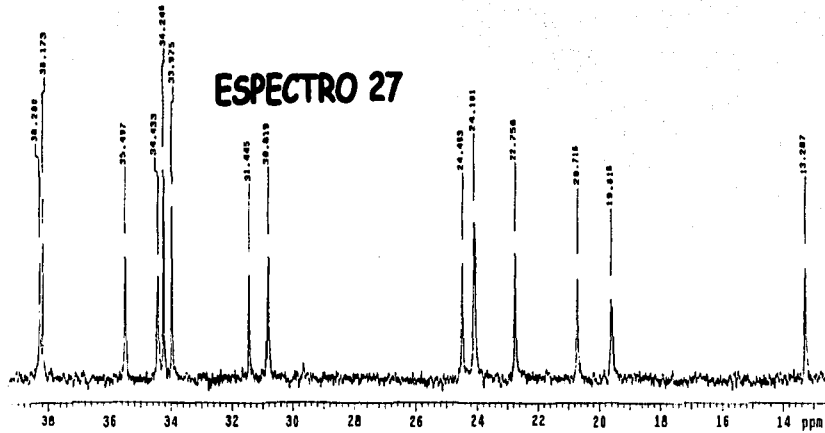


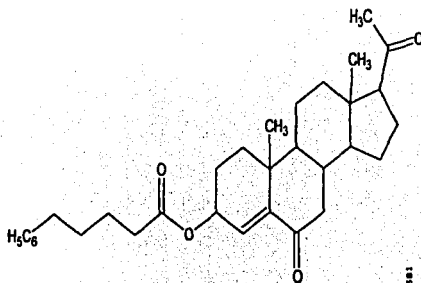
TESIS
FALTA DE ORIGEN

TESIS COMAF
FALLA DE ORIGEN

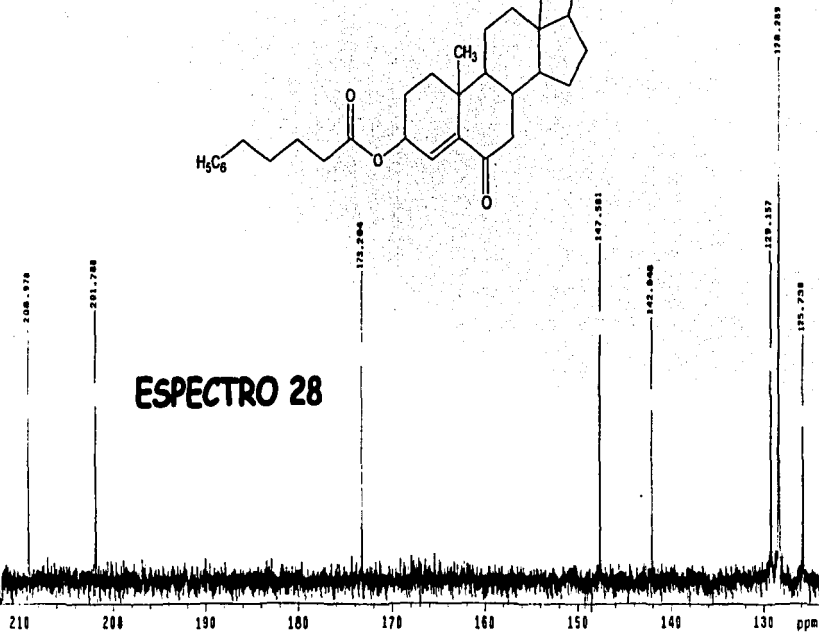


ESPECTRO 27

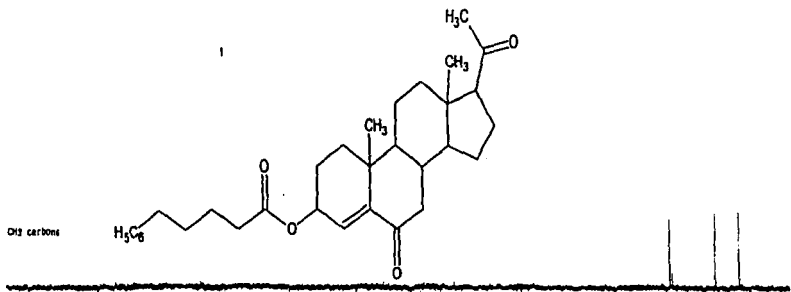




ESPECTRO 28



TESIS
FALLA DE ORIGEN

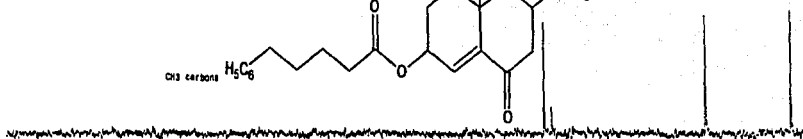
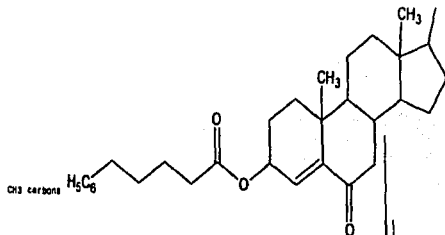


ESPECTRO 29

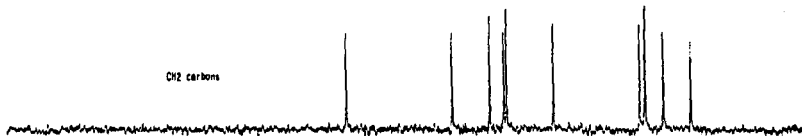


200 180 160 140 120 100 80 60 40 20 ppm

CENTRO DE INVESTIGACIONES
 TALLA DE ORIGEN
 TESIS



CH₂ carbons

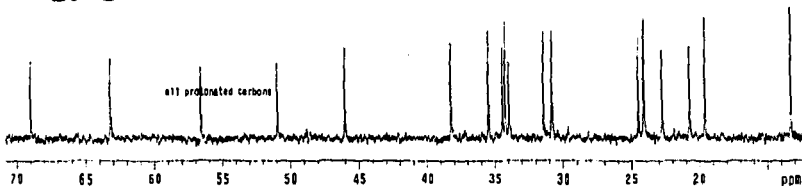


CH carbons



ESPECTRO 30

all protons carbons



TESTE
 FALLA DE ORIGEN