

00524
158

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**



FACULTAD DE QUIMICA

**"SINTESIS DE HALOESTERES 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 :

ROJAS ARENAS ROSA ARELY



MEXICO, D. F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2003

A



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico o impreso el contenido de mi trabajo recensional.

NOMBRE: Rojas Arenas Rosa Arely
FECHA: 22-Oct-03
FIRMA: [Firma]

Jurado Asignado :

Presidente Prof. Gómez Gómez María Reyna.
Vocal Prof. Villatoro Méndez María Elena.
Secretario Prof. Ramírez López Elena Guadalupe.
1er. Suplente Prof. Rojo Callejas Francisco.
2º. Suplente Prof. Lira Rocha Alfonso Sebastián.

Sitio donde se desarrolló el tema : Lab 125 Conjunto E, Facultad de Química,
Lab 006 Dpto de Sistemas Biológicos UAM
Xochimilco

Asesor del tema: Dra. Elena Guadalupe Ramírez López

Supervisor técnico: Dr. Eugene A. Bratoeff Tifeff

Sustentante: Rojas Arenas Rosa Arely

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

AGRADECIMIENTOS

A mis padres porque este trabajo refleja su esfuerzo, su apoyo, su paciencia y su confianza en mi.

A mis queridos hermanos María, Adelina y Oscar por todo este tiempo en el que hemos crecido juntos

A Edgar Amaro por su linda presencia en mi vida.

A Marlene, Lucía y Elena por compartir nuestras alegrías, nuestras tristezas, nuestras locuras...

A Gabriel Navarrete por creer en mi, por facilitar mi camino, Gracias.

A la Dra. Elena Ramírez por sus enseñanzas, su ayuda en todo momento y por su gran calidad humana.

Al Dr. Eugene Bratoeff por su interés, sus palabras de aliento y por su cariño.

Al CONACyT por la beca otorgada para la realización de este trabajo.

A todos mis compañeros del laboratorio 125 por sus consejos y su ayuda incondicional.

LA PARTE QUÍMICA DEL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÒ EN EL
LABORATORIO 125, CONJUNTO E, FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

LA PARTE BIOLÓGICA SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE
HORMONAS (G-006) DEL DEPARTAMENTO DE SISTEMAS
BIOLÓGICOS DE LA UAM CAMPUS XOCHIMILCO BAJO LA
SUPERVISIÓN DE LA DRA. MARISA CABEZA

ÍNDICE

	PÁG.
I INTRODUCCIÓN	4
II ANTECEDENTES	
A. ESTEROIDES	6
B. ANDRÓGENOS	8
C. REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE TESTOSTERONA	11
D. MECANISMO DE ACCIÓN DE ANDRÓGENOS	14
E. PAPEL DE LA DIHIDRÓTESTOSTERONA (DHT) EN LA FUNCIÓN PROSTÁTICA	15
F. ANTIANDRÓGENOS	17
G. ENZIMA 5 α -REDUCTASA	19
H. RECEPTOR DE ANDRÓGENOS (AR)	21
I. RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD.	22
III. OBJETIVOS	27
IV. TRABAJO EXPERIMENTAL	
A. ASPECTO QUÍMICO	28
B. ASPECTO BIOLÓGICO	45
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	
A. ASPECTO QUÍMICO	50
B. ASPECTO BIOLÓGICO	59
VI. CONCLUSIONES	65
VII. BIBLIOGRAFÍA	66
VIII. ANEXO EXPERIMENTAL	72

I. INTRODUCCIÓN

La Dihidrotestosterona (DHT), un metabolito activo de la Testosterona (T), juega un papel importante en la diferenciación y crecimiento de la próstata humana (1); sin embargo se ha implicado en la patogénesis de enfermedades tales como la hiperplasia prostática benigna (HPB), cáncer de próstata, acné, hirsutismo en mujeres y alopecia androgénica; de aquí que dichas enfermedades se han denominado como androgeno-dependientes (2,3,4).

Para el diagnóstico del cáncer de próstata se recurre frecuentemente a la prueba del antígeno específico de la próstata (PSA, por sus siglas en inglés), aunque existen otras pruebas de confirmación como la biopsia prostática (5). La prueba de PSA se basa en la medición de una glucoproteína que sintetizan las células prostáticas independientemente de que sean normales o malignas, una concentración por encima de 4 ng/mL de PSA puede alertar la existencia de un cáncer en la glándula prostática.

Para el tratamiento de cáncer de próstata se han empleado varios métodos dependiendo del estadio del cáncer, desde la prostatectomía (eliminación de la glándula prostática), radioterapia, braquiterapia (implantes de microesferas que emiten radiación), orquiectomía (extirpación de testículos) y terapia hormonal (6,7).

Bajo este último contexto se han utilizado agonistas de la Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) que incrementan inicialmente la secreción de Testosterona, pero al cabo de unas semanas inhiben la producción de la Testosterona como por ejemplo leuprolida (Lupron) y acetato de goserlina (Zoladex); por otra parte el uso de antagonistas de GnRH como dietilestilbestrol producen efectos secundarios tales como dolor en huesos, pérdida de la libido e impotencia sexual.

También se han empleado antagonistas del receptor andrónico como la bicalutamida (Casodex) y aunque la impotencia es menos común en los pacientes, la ginecomastia aparece como principal efecto secundario (8).

Otra alternativa terapéutica es el uso de inhibidores de la enzima 5α -reductasa (tipo 2), la cual cataliza la conversión de T a DHT, como por ejemplo la finasterida (Proscar) (9) que actualmente es el fármaco de elección para el tratamiento de cáncer de próstata e hiperplasia prostática benigna pero que presenta efectos colaterales como daño hepático. Debido a la mayor selectividad que presentan los inhibidores de la enzima 5α -reductasa para suprimir la acción andrónica de la DHT se buscan nuevos agentes terapéuticos que inhiban de manera eficiente y con un mínimo de efectos colaterales la actividad de dicha enzima. Bajo este rubro, el grupo de investigación del Dr. Bratoeff ha sintetizado una variedad de compuestos esteroidales con cierta actividad antiandrónica, sin embargo se requiere aportar nuevos datos acerca de la relación estructura-actividad biológica para la inhibición de la enzima 5α -reductasa (tipo 2).

Por lo anterior, en este trabajo se presenta la síntesis de haloesteres alifáticos de la pregnadiona y su evaluación biológica como inhibidores de la enzima 5α -reductasa (tipo 2). Adicionalmente se evaluará la capacidad de éstos compuestos para unirse al receptor de andrógenos (AR).

II. ANTECEDENTES

A. ESTEROIDES

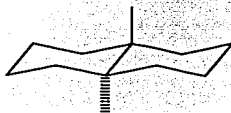
Los esteroides son compuestos orgánicos que tienen como estructura básica un anillo de fenantreno completamente reducido (perhidrofenantreno) fusionado a un ciclopentano formando el núcleo de ciclopentanoperhidrofenantreno de 4 anillos que se conocen como A, B, C y D además de 2 metilos angulares.



Fig. 1 Estructura de un esteroide.

En los esteroides naturales éstos metilos se encuentran por encima del plano de la molécula (10) posición conocida como beta (β), mientras que aquellos sustituyentes que se encuentran por debajo de dicho plano se dice que están en posición alfa (α).

En la mayoría de los esteroides la unión de los anillos B-C y C-D son de tipo trans; sin embargo la unión de A-B puede ser de tipo cis o trans, debido a esto son posibles dos series de esteroides: la serie 5α (unión trans) y la serie 5β (unión cis)



Unión de A-B trans



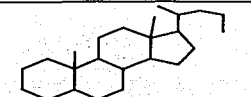
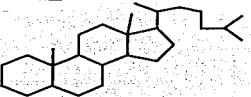
Unión de A-B cis

Fig. 2. Unión de los anillos A-B

Los esteroides que existen naturalmente están incluidos en distintos grupos, que se denominan de acuerdo a la estructura del compuesto parental como se describe en la Tabla 1.

Tabla 1

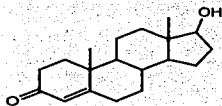
Compuesto parental	Nombre	Ejemplo
	Gonano 17 átomos de carbono	7-alfa-cloro-5-beta-gonano.
	Estrano 18 átomos de carbono	Estradiol
	Androstrano 19 átomos de carbono	Testosterona Dihidrottestosterona
	Pregnano 21 átomos de carbono	Progesterona Cortisol

	Colano 24 átomos de carbono	Acidos biliares como el ácido cólico
	Colestano 27 átomos de carbono	Colesterol

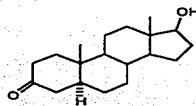
B. ANDRÓGENOS

Los andrógenos son compuestos esteroideos conocidos como hormonas sexuales masculinas las cuales se biosintetizan en los testículos y corteza adrenal.

Los andrógenos producidos en los testículos son la Testosterona y su metabolito reducido la Dihidrotestosterona, predominando la producción de la primera, además de estradiol (11).



Testosterona
17β-hidroxi-androstan-4-en-3-ona



Dihidrotestosterona
17β-hidroxi-5α-androstan-3-ona

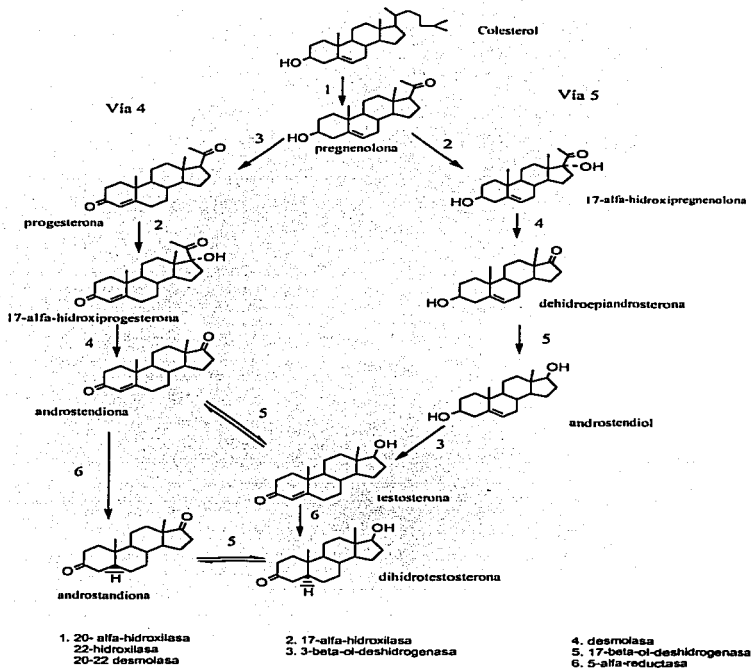
Fig. 3. Andrógenos

La Testosterona cumple funciones importantes en el organismo masculino como el desarrollo y mantenimiento de caracteres sexuales secundarios (crecimiento de pelo, el timbre de la voz), espermatogénesis, la libido, conducta sexual, además de sus efectos sobre tejidos somáticos como hueso y músculo conocidos como propiedades anabólicas, que se caracteriza por el aumento en la producción de nitrógeno para la síntesis de proteínas (12). Por su parte la Dihidrotestosterona es esencial para la diferenciación del seno urogenital, genitales externos y próstata (13).

Biosíntesis de la Testosterona y la Dihidrotestosterona.

En el organismo la DHT se forma a partir de la reducción del doble enlace Δ^4 de la Testosterona por la enzima 5α -reductasa. A su vez la Testosterona, al igual que otros esteroides se sintetiza a partir del colesterol, el cual puede ser adquirido a través de la dieta o las células lo pueden sintetizar a partir de glucosa y ácidos grasos (13).

El primer paso para la síntesis de la Testosterona es la conversión de colesterol a pregnenolona que implica la escisión de 6 átomos de carbono (C-22 a C-27) de la cadena lateral y oxidación de C-20. La formación de pregnenolona representa el paso limitante para la producción de andrógenos y a partir de esta última se pueden seguir 2 rutas conocidas como vías Δ^4 y Δ^5 (6, 14) para obtener de manera endógena la DHT (esquema 1).



Esquema 2. Biosíntesis de la Testosterona

TESIS CON
 FALLA DE ORIGEN

C. REGULACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE TESTOSTERONA

La producción de la Testosterona en el organismo está regulada por dos ejes conocidos como eje hipotálamo-hipófisis-células de Leydig y eje hipotálamo-hipófisis-células de Sertoli (esquema 2).

El eje hipotálamo-hipófisis-células de Leydig está formado por el hipotálamo y sus conexiones neurales con el resto del cerebro, las células productoras de gonadotropinas de la hipófisis anterior (adenohipófisis) y las células de Leydig ubicadas en los testículos.

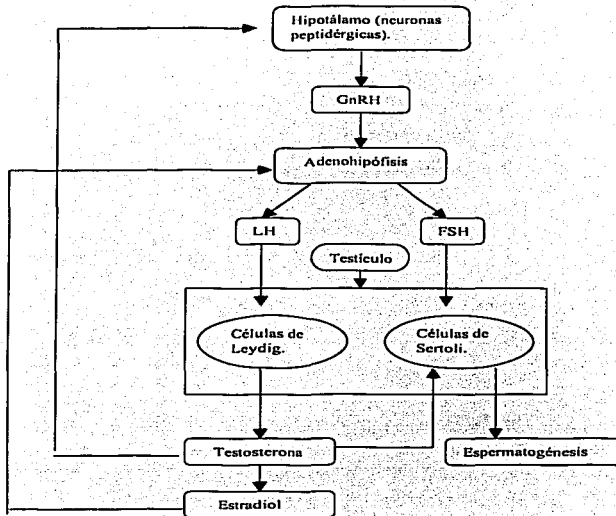
La porción basal del hipotálamo contiene una serie de neuronas peptidérgicas capaces de secretar a la Hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), neuronas procedentes de muchas partes del Sistema Nervioso Central (SNC) conectan con este sistema peptidérgico; entre las más importantes de ellas que pueden controlar directa o indirectamente la secreción de GnRH son las fibras dopa y catecolaminicas (13).

La LHRH es un decapeptido (Piro-Glu1-His2-Trp3-Ser4-Tir5-Gli6-Leu7-Arg8-Pro9-Gli10-NH₂) que estimula la liberación tanto de Hormona Luteinizante (LH) como de la Hormona Foliculoestimulante (FSH, por sus siglas en inglés) a nivel de la adenohipófisis mediante un mecanismo dependiente de Ca²⁺. La cantidad de cada hormona liberada depende de la edad y estado hormonal del individuo (13).

La LH viaja por la corriente sanguínea hasta llegar a las células de Leydig ubicadas en el testículo. En estas células, la LH se une a receptores específicos hormonales presentes en las membranas.

La interacción LH-receptor estimula a la subunidad catalítica de una proteincinasa la cual produce un aumento intracelular de adenosina monofosfato cíclico (AMPC) que activa a las enzimas involucradas en la biosíntesis de andrógenos. La producción de andrógenos en este eje está regulado por un mecanismo de retroalimentación de la misma Testosterona a nivel del hipotálamo y por el estradiol a nivel de la hipófisis.

El eje hipotálamo-hipófisis-células de Sertoli como su nombre lo indica, está formado por el hipotálamo, hipófisis y las células de Sertoli ubicadas en el testículo. En este eje la FSH secretada por las células de la hipófisis anterior actúa sobre las células de Sertoli mediante la unión a receptores específicos de la membrana plasmática. Esta interacción estimula una variedad de acontecimientos metabólicos en estas células, incluyendo síntesis de ácido desoxiribonucleico (DNA) y ácido ribonucleico (RNA), secreción proteica, conversión de Testosterona en estradiol y junto con la Testosterona regula el proceso de espermatogénesis (11,13). En este eje la acción de la inhibina, una glucoproteína que sintetizan las células de Sertoli, representa un mecanismo de regulación para la producción de andrógenos (esquema 2).



Esquema 2. Regulación de la testosterona

D. MECANISMO DE ACCIÓN DE ANDRÓGENOS

Una vez que la Testosterona se sintetiza en las células de Leydig, sale del testículo a la circulación general a través de la sangre venosa espermática y se une a la globulina fijadora de estradiol-Testosterona o a la albúmina (15) para dirigirse a los tejidos blanco (próstata, vesículas seminales, piel).

La Testosterona penetra en el tejido mediante difusión simple y puede actuar de las siguientes maneras:

- Sin ser metabolizada, la Testosterona se liga directamente a un receptor intracelular de andrógenos.
- La Testosterona es metabolizada en el retículo endoplásmico por la enzima 5α -reductasa a 5α -Dihidrotestosterona (DHT), un metabolito que presenta mayor afinidad por el mismo receptor intracelular de andrógenos y con lo cual se cree que se amplifica el efecto androgénico.

De cualquier modo, los complejos T-receptor o DHT-receptor son transferidos al núcleo para unirse a secuencias de DNA altamente específicas que se conocen como elementos de respuesta hormonal (HRE). El complejo hormona-receptor unido, puede tanto estimular como suprimir la expresión de genes específicos adyacentes a los HRE (transcripción de RNA) y por lo tanto la síntesis de proteínas codificadas por los genes (16,17).

Los eventos biosintéticos que resultan de la interacción esteroide-receptor, incluyen la transcripción de ácido ribonucleico mensajero (RNAm), el procesamiento y la traducción de proteínas específicas que alteran la función celular, el crecimiento y la diferenciación.

Una vez que el complejo hormona-receptor ha interceptado con sitios aceptores del DNA, el esteroide se libera de su receptor desocupando los sitios de éste y sale de las células blanco.

El metabolismo de la T y DHT implica la oxidación del C-17 y la reducción de la cetona en C-3 a 3α y 3β -alcoholes, estos se conjugan con ácido glucurónico o ácido sulfúrico para ser eliminados del organismo por orina y heces fecales. Como metabolitos principales se encuentran la etioolanona, androsterona y androstandiol (15).

E. PAPEL DE LA DIHIDROTESTOSTERONA (DHT) EN LA FUNCIÓN PROSTÁTICA

La próstata es una glándula que se encuentra en el aparato reproductor masculino ubicada debajo de la vejiga, cuya función junto con las vesículas seminales y los testículos es la formación del semen.

Como cualquier órgano del cuerpo humano, la próstata puede verse afectada por muchos procesos patológicos, uno de los más característicos es la hiperplasia prostática benigna (HPB). La HPB se define como un crecimiento adenomatoso de la glándula que obstruye gradualmente la uretra, provocando dificultad en la micción y constituye el tumor benigno más frecuente del varón; aunque tal crecimiento no es una condición cancerosa los síntomas son parecidos a los de cáncer de próstata.

El cáncer de próstata es una enfermedad en la cual las células del tejido glandular presentan un crecimiento anormal y descontrolado por lo que la función celular se ve alterada. El cáncer de próstata ocupa el segundo lugar a nivel internacional entre los tumores que son causa directa de la muerte de varones (18).

Desde 1895, se demostró que la hiperplasia prostática benigna no se desarrollaba en aquellos hombres que habían sido castrados y que además la castración provocaba regresión del cáncer de próstata. Estos hechos establecieron claramente los efectos benéficos de la disminución de andrógenos en el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna y sentaron las bases para el tratamiento de tal enfermedad por modulación hormonal (17).

Por otra parte, Imperato y col. (19,20) describieron un desorden genético innato causando una deficiencia de la 5α -reductasa, la enzima que convierte a la T en DHT. Los hombres con este desorden genético presentan un raro fenotipo en el cual los genitales internos son normales mientras que los externos se encuentran feminizados, esta enfermedad es conocida como pseudohermafroditismo; sin embargo estos sujetos no desarrollaban síntomas asociados con la HPB, cáncer de próstata y alopecia andrógena.

De esta manera, aunque la T es el mayor andrógeno circulante, la DHT es el andrógeno más activo en próstata y piel, así mientras que la espermatogénesis, la libido y aumento de la masa muscular están mediados por la T, el crecimiento de la próstata y el desarrollo de la alopecia androgénica son procesos controlados por la DHT.

A nivel celular se sabe que la función de la T y la DHT en la próstata implica la estimulación de las células epiteliales así como de inhibir su apoptosis (muerte programada de las células) (21). La DHT es más potente que la T para mantener la función epitelial; aunque ambos andrógenos son equipotentes para prevenir la apoptosis epitelial (21).

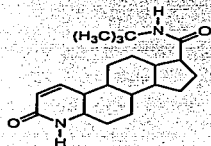
F. ANTIANDRÓGENOS

Al establecerse que el cáncer de próstata y la HPB son enfermedades andrógeno-dependientes surgieron como alternativa terapéutica los antiandrógenos, destinados a suprimir la acción hormonal de los andrógenos, en particular de la Dihidrotestosterona.

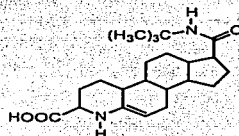
Los mecanismos por los cuales se lleva a cabo la inhibición de la acción hormonal pueden ser a distintos niveles (22, 23) como por ejemplo:

- Inhibición de la enzima 5α -reductasa (Fig. 4)
- Inhibición de los receptores andrógenicos por el uso de antagonistas (Fig. 5 y 6)
- Modificación del eje hipotálamo-hipófisis (Fig. 7).

La mayoría de los antiandrógenos de origen sintético son derivados de la progesterona. El segundo grupo lo constituyen los antiandrógenos de tipo no esterooidal.

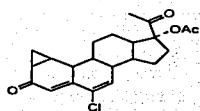


Finasterida

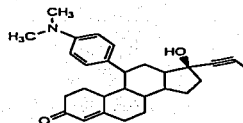


Epristerida

Fig. 4. Antiandrógenos esteroidales que inhiben a la enzima 5α -reductasa

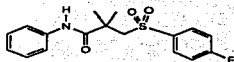


Acetato de ciproterona

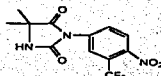


Mefepristona

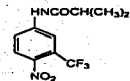
Fig. 5. Antiandr6genos esteroidales que se unen al receptor andr6geno



Bicalutamida

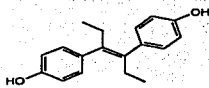


Nilutamida

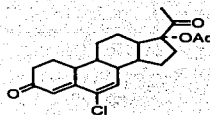


Flutamida

Fig. 6. Antiandr6genos no esteroidales que se unen al receptor andr6geno.



Dietilestilbestrol



Acetato de Clormadinona

Fig. 7 Antiandr6genos que modifican el eje hip6talamo-hip6fisis.

G. ENZIMA 5 α -REDUCTASA

La enzima 5 α -reductasa humana es un sistema de 2 isoenzimas: 5 α -reductasa tipo 1 (5 α -R1) y 5 α -reductasa tipo 2 (5 α -R2), ambas catalizan la reducción irreversible de Testosterona a Dihidrotestosterona utilizando como cofactor fosfato de nicotinamida adenina dinucleótido en su forma reducida (NADPH). Estas enzimas se encuentran en la fracción microsomal de las células blanco para andrógenos y son codificadas por genes diferentes (24).

La isoenzima tipo 1 (5 α -R1) es predominante en hígado y glándulas sebáceas de la piel, mientras que la isoenzima tipo 2 (5 α -R2) es predominante en el tracto genitourinario, incluyendo la próstata, en el hígado y en los folículos del cuero cabelludo (25). En el humano, al igual que en otras especies como el perro y la rata (26), se han encontrado diferencias bioquímicas de estas isoenzimas (21, 27) como se muestra en la tabla 2.

Tabla 2

Características bioquímicas de la enzima 5 α -R1 y 5 α -R2 Humana.

Parámetro	5 α -R1	5 α -R2
pH óptimo	6.5 - 7.5	5.5
Km (μ M Testosterona)	7.7	0.3
Finasterida IC ₅₀ (nM)	670	4.2

Es importante observar que la isoenzima 5 α -R1 es menos sensible a la finasterida (inhibidor de 5 α -reductasa) comparada con la isoenzima 5 α -R2. Por otra parte, la isoenzima 5 α -R2 tiene 25 veces mayor afinidad por la Testosterona por lo tanto su contribución a la formación de DHT es mayor.

El mecanismo de acción de la enzima 5 α -reductasa involucra la formación de un complejo enzima-esteroide y posterior transferencia de un hidruro del NADPH a la posición 5 α de la Testosterona dando lugar a la formación de un enolato en C3-C4 el cual puede ser estabilizado por algún residuo electrofílico (E+) de la enzima (2). Finalmente por tautomerismo ceto-enolico se produce Dihidrotestosterona (metabolito reducido) y NADP+ (cofactor oxidado) (fig. 9).

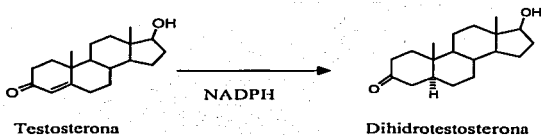


Fig. 9. Conversión de T a DHT por 5 α -reductasa

Los inhibidores de la enzima 5 α -reductasa previenen la formación de DHT sin afectar la formación del complejo Testosterona-receptor, por lo que sólo aquellas funciones dependientes del complejo DHT-receptor son suprimidas.

La finasterida (fig. 4) es un inhibidor potente de la isoenzima tipo 2 que reduce el volumen de la próstata a través de la supresión en los niveles de DHT intraprostáticos, reduciendo la estimulación de DHT sobre la función de las células epiteliales y disminuyendo el efecto protector contra la apoptosis (9,21). También se ha mostrado que este fármaco tiene una pobre afinidad por el receptor de andrógenos y no tiene propiedades androgénicas, estrogénicas ó progestacionales.

De aquí que una de las estrategias farmacológicas para el tratamiento de hiperplasia prostática benigna (HPB) y cáncer de próstata sea el desarrollo de moléculas que inhiban la actividad de esta enzima de manera eficiente y con un mínimo de efectos colaterales.

H. RECEPTOR DE ANDRÓGENOS (AR)

Los efectos de los andrógenos T y DHT son mediados a través del receptor de andrógenos. Este receptor de origen proteico es un miembro de la superfamilia de receptores nucleares que incluye entre otros, los receptores de estrógenos, glucocorticoides, mineralocorticoides y progestinas (17).

El AR de 110 KDa (kilodaltones) está dividido en tres dominios funcionales: un dominio de unión al ligando COOH-terminal, que contiene aproximadamente 250 aminoácidos en el cual se fija el ligando. Éste se une a través de una zona hidrofílica de unos 50 a 70 aminoácidos a la región central denominada dominio de unión al DNA, que contiene aproximadamente 65 aminoácidos y a la que se fija el DNA. Por último se encuentra la región N-terminal que es altamente inmunogénica (28).

La principal fuerza de unión entre las hormonas esteroideas y sus receptores es la formación de enlaces de hidrógeno y otras interacciones como las electrostáticas y de Van der Waals, que estabilizan el complejo ligando-receptor.

La función de este receptor implica la unión con el esteroide (T y/o DHT) para formar un complejo esteroide-receptor que al unirse a secuencias específicas del DNA regula la expresión de genes. La formación de dicho complejo es un evento esencial para que se susciten cambios en la función celular, no obstante existen mecanismos que regulan la activación de los receptores como se ha informado para las proteínas chaperonas conocidas como "heat shock" (activación térmica) las cuales se sabe que están asociadas a la forma inactiva del receptor (29). La fosforilación es otro evento que también ocurre antes y durante la activación del receptor.

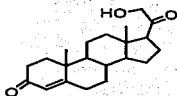
Por lo tanto el bloqueo del receptor androgénico por un antagonista representa un blanco farmacológico por medio del cual se puede suprimir la acción androgénica.

En contraste con los efectos de los inhibidores de 5α -reductasa, los antagonistas del receptor androgénico bloquean la unión con el receptor tanto para la Testosterona como para la Dihidrotestosterona resultando en una supresión menos selectiva del efecto androgénico.

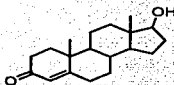
Actualmente el Acetato de Ciproterona ha demostrado ser junto con la Flutamida (fig. 5 y 6) una importante vía para detener el cáncer de próstata (7,30).

I. RELACIÓN ESTRUCTURA-ACTIVIDAD BIOLÓGICA

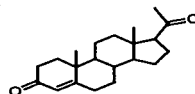
Se ha informado que la progesterona y la desoxicorticosterona inhiben la formación de DHT por competir con el grupo Δ^4 -ceto de la Testosterona que se une al sitio activo de la enzima 5α -reductasa. Por lo tanto, los esteroides derivados de estas moléculas pueden tener actividad como inhibidores de dicha enzima (29).



Desoxicorticosterona



Testosterona



Progesterona

Bajo la dirección del Dr. Eugene Bratoeff se han sintetizado previamente una gran variedad de compuestos derivados de la pregnendiona, pregnatriendiona además de D-homo derivados (expansión del anillo D del núcleo esteroidal) (30).

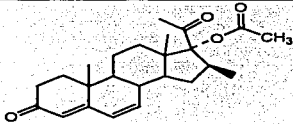
Para la síntesis de tales compuestos se ha considerado:

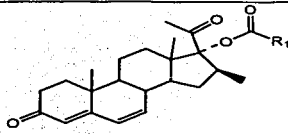
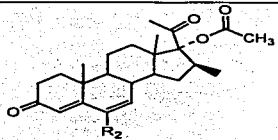
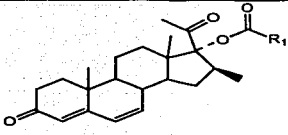
1.- Las inactivaciones metabólicas que experimenta la progesterona en el organismo como la reducción enzimática del carbonilo en posición 20 y la degradación de la cadena lateral (31).

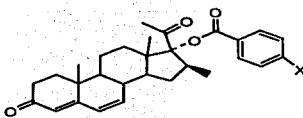
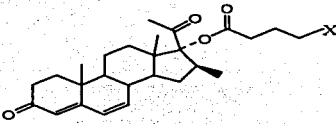
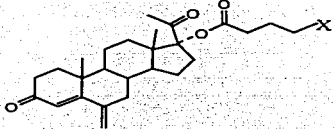
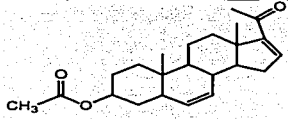
2.- El mecanismo de inhibición de la enzima 5α -reductasa propuesto por Dr. Bratoeff y col. (32,33) que implica el ataque nucleofílico de la enzima por un grupo amino al doble enlace conjugado del esteroide en una adición 1-4 tipo Michael para formar un aducto irreversible.

A continuación en la tabla 3 se hace una reseña de algunas de estas moléculas esteroideas sintetizadas previamente mencionando las relaciones estructura-actividad biológica que se han encontrado para la inhibición de la enzima 5α -reductasa (tipo 2).

Tabla 3

Estructura	Comentario
 <p>X</p>	<p>Se estableció la entidad 4-6-dien-3-ona como estructura básica para la actividad inhibitoria de la enzima 5α-reductasa (34).</p> <p>Se introdujo un grupo ester en C-17 para evitar la reducción de C-20 (35).</p>

 <p style="text-align: center;">XI</p> <p>R1 -CH₃ -C₂H₅ -C₃H₇ -C₄H₉ -C₅H₁₁</p>	<p>Se estableció que a mayor longitud de la cadena del ester, menor actividad biológica; se determinó que ésta no debe ser mayor a 5 átomos de carbono (35).</p> <p>Se introdujo un grupo metilo β orientado como protección para evitar la hidrólisis enzimática del ester en C-17 y/o evitar la reducción del carbonilo en C-20 (34).</p>
 <p style="text-align: center;">XII</p>	<p>La introducción de un átomo de halógeno en posición 6 incrementó la actividad antiandrogénica como resultado de la interferencia en la resonancia usual de la cetona α-β insaturada (36, 37).</p> <p>El ester metílico bromado (R₂=Br) presentó mayor actividad que su homólogo clorado (R₂=Cl) ambos comparables con la finasterida (fig. 4) (36).</p>
 <p style="text-align: center;">XIII</p>	<p>La introducción de los grupos R1a =C₃H₇ y R1b= CH₂C₃H₇ en la molécula aumentaron ligeramente la actividad inhibitoria sobre la enzima 5α-reductasa con respecto a la finasterida (fig. 4) (38).</p>

 <p style="text-align: center;">XIV</p>	<p>La presencia de un grupo fenilo sustituido en posición para por un átomo de halógeno (X= F, Cl, Br) disminuyó la actividad biológica con respecto a la finasterida (fig. 4) (33).</p>
 <p style="text-align: center;">XV</p>	<p>El derivado bromado (X=Br) presentó ligeramente mayor actividad que su homólogo clorado (X=Cl), ambos comparables con la finasterida (fig. 4) (34).</p>
 <p style="text-align: center;">XVI</p>	<p>La introducción de un doble enlace exocíclico en el anillo B contribuyó a una mejor actividad del compuesto con respecto a la finasterida (fig. 4) (39).</p>
 <p style="text-align: center;">XVII</p>	<p>Este compuesto presentó actividad inhibitoria comparable con la finasterida, (fig. 4). Tal actividad se puede atribuir a la presencia del sistema Δ^{16-17}-20-ona en la molécula (40).</p>

En base a los resultados de la evaluación biológica de los compuestos XVI y XVII los cuales presentaron actividades como inhibidores de la enzima 5 α -reductasa comparables con la finasterida, se propuso que los nuevos esteroides presenten modificaciones en el anillo A (conjugación 4-en-3-ona y grupo ester en C-3) y en el anillo D (ausencia del sistema $\Delta^{16,17}$ -20-ona) con el fin de analizar la importancia de estos grupos en el comportamiento antiandrogénico de la molécula.

Por lo anterior, en este trabajo se propone la síntesis y evaluación biológica de los compuestos 3 β -(5-clorovaleroiloxi)-4-pregnen-6,20-diona **7** y 3 β -(5-bromovaleroiloxi)-4-pregnen-6,20-diona **8** (esquema 3, pág. 29).

III. OBJETIVOS

General

- Determinar la influencia de la longitud de la cadena del ester en C-3, así como la presencia de un átomo de halógeno sobre la actividad antiandrogénica de los compuestos 3 β -(5-clorovaleroiloxi)-4-pregnen-6,20-diona **7** y 3 β -(5-bromovaleroiloxi)-4-pregnen-6,20-diona **8** (esquema 3, pág. 29)

Específicos

- Sintetizar los compuestos 3 β -(5-clorovaleroiloxi)-4-pregnen-6,20-diona **7** y 3 β -(5-bromovaleroiloxi)-4-pregnen-6,20-diona **8** así como los productos intermedios (esquema 3, pág. 29)
- Purificar y caracterizar a los compuestos intermedios y finales mediante parámetros físicos (aparición, punto de fusión) y espectroscópicos (UV, IR, RMN-¹H y RMN-¹³C)
- Determinar y comparar la actividad antiandrogénica de los compuestos **7** y **8** mediante un ensayo in vitro con la enzima 5 α -reductasa.
- Determinar y comparar la afinidad de los compuestos **7** y **8** por el receptor androgénico mediante un ensayo in vitro por competencia con la DHT.

IV. TRABAJO EXPERIMENTAL

A. ASPECTO QUÍMICO

Material y Equipo

Los espectros de I.R. para los derivados y productos finales se determinaron en un espectrofotómetro de I.R. Perkin Elmer 549B. Las determinaciones se realizaron en película. Para indicar la intensidad de las bandas se emplearon las siguientes abreviaturas: S (fuerte), M (media) y W (débil).

Los espectros de RMN de hidrógeno y carbono-13 se determinaron en el aparato de RMN Varian Gemini 200 y Varian VRX-300S, utilizando tetrametilsilano (TMS) como referencia interna. Los desplazamientos están dados en ppm.

El análisis por espectrometría de masas se realizó en el espectrómetro de masas modelo HD 5985-B por introducción directa utilizando la técnica de Impacto Electrónico (EMIE). Los valores se expresan en m/z (masa-carga).

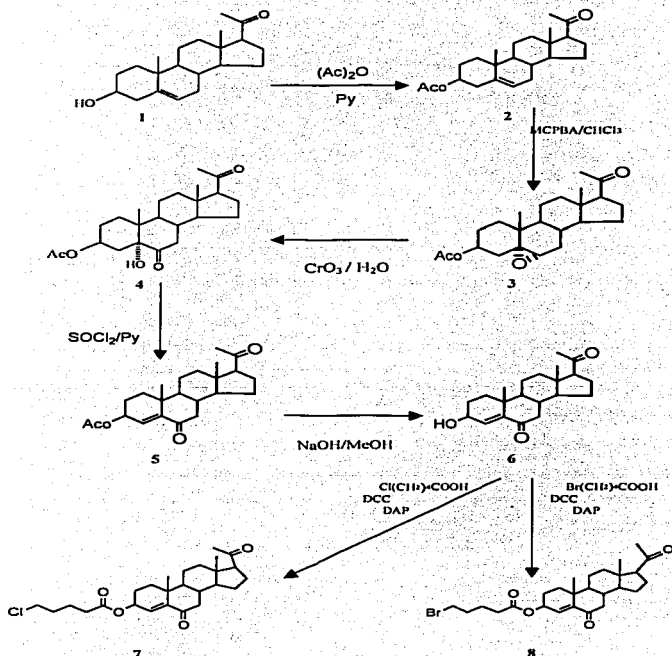
Los espectros de absorción en el UV de los esteroides sintetizados se registraron en el espectrofotómetro UV-VIS Perkin Elmer Hitachi modelo 200, utilizando como disolvente metanol.

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

El avance y pureza de las reacciones se determinó por Cromatografía en Capa Fina (C.C.F.) empleando gel de sílice 60GF254 y sílica gel 60G de Merck. Como reveladores se emplearon una solución de CoCl_2 al 2% en H_2SO_4 (2N) y lámpara de UV ($\lambda=254$ nm).

Síntesis y caracterización de los nuevos esteroides.

La síntesis de los productos 3 β -(5-clorovalcroiloxi)-4-pregnen-6,20-diona **7** y 3 β -(5-bromovalcroiloxi)-4-pregnen-6,20-diona **8** se llevó a cabo bajo la siguiente ruta sintética (esquema 3).



DCC dicitlohexcarbodiimida
 DAP dimetilaminopiridina
 MCPBA ácido m-cloro-perbenzoico

Para el uso del compuesto **1** (**3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona** ò **pregnenolona**) en la ruta de síntesis planteada, se procedió a caracterizarlo por medio de apariencia, Rf, punto de fusión y datos espectroscópicos.

El compuesto **1** se purificó mediante una recristalización simple con acetato de etilo, obteniéndose cristales blancos con punto de fusión de 193-195 ° C y Rf de 0.33 (eluyente hexano-acetato de etilo 8:2 % v/v)

Los datos espectroscópicos se enlistan a continuación:

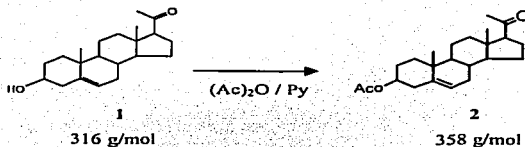
IR (espectro 1) ν : 3437.96 (M, -OH en C-3), 2927.93 (S, CH₂-, CH₃), 1681.40 (S, C=O de C-20) y 1642.22 cm⁻¹ (W, C=C de C-5).

RMN-¹H (espectro 2) δ : 0.62 (s, 3H en C-18), 1.01 (s, 3H en C-19), 2.20 (s, 3H en C-21), 2.53 (t, 1H en C-17), 3.53 (q, 1H en C-3) y 5.35 ppm (d, 1H vinílico en C-6).

RMN-¹³C (espectros 3 y 4) δ : 13.19 (C-18), 19.35 (C-19), 31.81 (C-21), 71.63 (C-3), 121.33 (C-6), 140.73 (C-5) y 209.59 ppm (C-20).

Síntesis de 3 β -acetoxi-5-pregnen-20-ona, 2

Reacción



En un matraz de bola de 50 mL se colocó 1 g de la materia prima **1** (3.16 mmoles) y se disolvió con 2.5 mL de piridina anhidra (30.9 mmoles) empleando calentamiento suave para la disolución total de ésta, enseguida se adicionaron 10 mL de anhídrido acético (110 mmoles). La mezcla de reacción se agitó a temperatura ambiente durante 6 hr.

Al término de la reacción, el contenido del matraz se vertió en una mezcla hielo-agua en la misma proporción en la cual el producto de reacción precipitó y se filtró haciendo tres lavados con agua destilada para eliminar los residuos de ácido acético originado como subproducto de la reacción.

El compuesto **2** se purificó mediante recristalización simple con acetato de etilo obteniéndose cristales blancos con punto de fusión de 147-151 °C y Rf de 0.51 (eluyente hexano-acetato de etilo 8:2 % v/v, 2 eluciones). El rendimiento fue del 50 %.

Los datos espectroscópicos se enlistan a continuación:

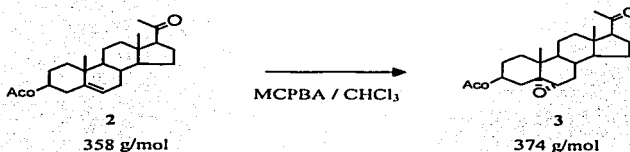
IR (espectro 5) ν : 2939.94 (M, $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$), 1726.19 (S, $\text{C}=\text{O}$ del ester metílico en C-3), 1704.89 (M, $\text{C}=\text{O}$ en C-20), 1642 (W, de $\text{C}=\text{C}$ en C-5 y C-6) y 1237.16 cm^{-1} (S, $\text{C}-\text{O}$ del ester en C-3).

RMN- ^1H (espectro 6) δ : 0.63 (s, 3H en C-18), 1.02 (s, 3H en C-19), 2.03 (s, 3H metilo del ester en C-3), 2.12 (s, 3H en C-21), 2.54 (t, 1H en C-17), 4.60 (m, 1H en C-3) y 5.38 ppm (d, 1H vinílico en C-6).

RMN- ^{13}C (espectros 7 y 8) δ : 13.19 (C-18), 19.27 (C-19), 21.38 (C-2'), 31.80 (C-21), 73.80 (C-3), 122.29 (C-6), 139.65 (C-5), 170.46 (C-1') y 209.59 ppm (C-20).

Síntesis de 3 β -acetoxy-5 α ,6 α -epoxi-pregnan-20-ona. 3

Reacción



En un matraz de bola de 250 mL se colocó 1 g de 2 (2.79 mmoles) y se disolvió con 100 mL de cloroformo, enseguida se adicionaron 1.617 g (6.56 mmoles) de ácido-m-cloroperbenzoico (MCPBA). La mezcla de reacción anterior se agitó a temperatura ambiente durante 30 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, el contenido del matraz se vertió en un vaso de pp. con 100 mL de agua destilada formándose 2 fases, posteriormente se adicionó aproximadamente 0.5 g de bisulfito de sodio (NaHSO₃) y la mezcla se agitó por 30 minutos al final de los cuales se agregó bicarbonato de sodio (NaHCO₃) hasta pH básico manteniendo la agitación por 30 minutos más.

El contenido del vaso se transfirió en un embudo de separación para extraer la fase orgánica (cloroformo). Esta fase se lavó con agua destilada (3 x 100 mL) hasta pH neutro. Finalmente se secó con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida en el rotaevaporador.

El compuesto 3 se purificó por cromatografía en columna utilizando como soporte sílica gel 60 (0.040-0.063 mm, Merck) y como fase móvil hexano-acetato de etilo 8:2. Se obtuvieron cristales blancos en forma de agujas con punto de fusión de 125-127°C y R_f de 0.14 (eluyente hexano-acetato de etilo 8:2 % v/v). El rendimiento fue del 55.7 %.

Los datos espectroscópicos se enlistan a continuación:

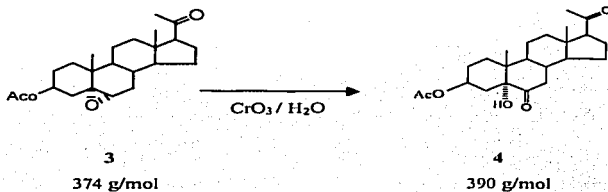
IR (espectro 9) ν : 2942.01 (M, $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$), 1733.62 (S, $\text{C}=\text{O}$ del ester metílico en C-3), 1242.61 (S, $\text{C}-\text{O}$ del ester en C-3), 1703.32 (S, $\text{C}=\text{O}$ en C-20) y 1034.40 cm^{-1} (M, $\text{C}-\text{O}$ del epóxido en C-5).

RMN- ^1H (espectro 10) δ : 0.56 (s, 3H, en C-18), 1.02 (s, 3H en C-19), 2.03 (s, 3H metilo del ester en C-3), 2.10 (s, 3H en C-21), 2.50 (t, 1H en C-17), 2.90 (d, 2H en C-4), 3.09 (d, 1H en C-6) y 4.77 ppm (m, 1H en C-3).

RMN- ^{13}C (espectros 11 y 12) δ : 13.20 (C-18), 15.80 (C-19), 21.30 (C-2), 31.52 (C-21), 71.21 (C-3), 63.31 (C-6), 65.13 (C-5), 170.20 (C-1') y 209.41 ppm (C-20).

Síntesis de 3 β -acetoxi-5 α -hidroxi-pregnan-6,20-diona. 4

Reacción



En un matraz de bola de 100 mL se colocó 1 g de 3 (2.67 mmoles) y se disolvió con 50 mL de acetona. Por otra parte, en un vaso de pp. de 50 mL se pesaron 2.1 g de trióxido de cromo (CrO_3 , 21 mmoles) y se disolvieron con 7 mL de agua destilada. Ambas disoluciones se enfriaron en baño de hielo por 20 minutos.

Posteriormente con agitación constante se adicionó gota a gota la mitad de $\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{O}$ (3.5 mL) a la primera disolución; terminada la adición se retiró el baño de hielo y se mantuvo la agitación por 30 minutos. Transcurrido este tiempo, de la misma manera se adicionó la otra mitad de $\text{CrO}_3/\text{H}_2\text{O}$ (3.5 mL) y se mantuvo la agitación por 40 minutos más. Al término de la reacción, el contenido del matraz se vertió en una mezcla hielo-agua en la misma proporción, para favorecer la precipitación del producto. Una vez formado, se filtró y se lavó con agua destilada hasta eliminar los residuos de CrO_3 sin reaccionar.

El producto 4 se purificó por cromatografía en columna utilizando como soporte sílica gel (0.040-0.063 mm, Merck) y como fase móvil hexano-acetato de etilo 8:2. Se obtuvieron cristales blancos con punto de fusión de 224-226 °C y Rf de 0.32 (eluyente hexano-acetato de etilo 8:2 % v/v). El rendimiento fue de 65.5 %.

Los datos espectroscópicos se enlistan a continuación:

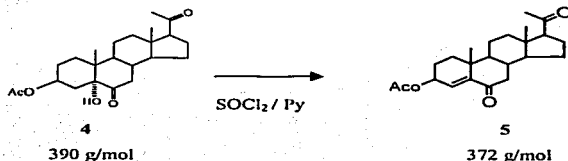
IR (espectro 13) ν : 3455.84 (M, -OH en C-5), 2947.73 (M, -CH₂, -CH₃), 1737.02 (C=O del ester metílico en C-3), 1715.44 (S, C=O en C-20), 1689.86 (S, C=O en C-6) y 1232.08 cm⁻¹ (S, C-O del ester en C-3).

RMN-¹H (espectro 14) δ : 0.60 (s, 3H en C-18), 0.81 (s, 3H en C-19), 2.01 (s, 3H metilo del ester en C-3), 2.17 (s, 3H en C-21), 2.55 (t, 1H en C-17), 2.79 (d, 2H en C-7) y 5.04 ppm (m, 1H en C-3).

RMN-¹³C (espectros 15 y 16) δ : 13.35 (C-18), 13.87 (C-19), 21.34 (C-2'), 31.44 (C-21), 70.53 (C-3), 80.15 (C-5), 171.00 (C-1'), 209.20 (C-20) y 211.81 ppm (C-6).

Síntesis de 3 β -acetoxi-4-pregnen-6,20-diona. 5

Reacción



En un matraz de bola de 100 mL se colocó 1 g de 4 (2.56 mmoles) y se disolvió con 32 mL de piridina anhidra, ésta disolución se enfrió en baño de hielo por 30 minutos, enseguida con un embudo de adición se agregaron gota a gota 2 mL de cloruro de tionilo (27.4 mmoles) con agitación constante. Una vez terminada la adición, se retiró el baño de hielo y se mantuvo la agitación por espacio de 1 hora. Transcurrido el tiempo de reacción, el contenido de matraz se vertió en una mezcla hielo-agua en la misma proporción para favorecer la precipitación del producto. Una vez formado éste se filtró y se lavó con agua destilada (2 x 50 mL) hasta pH neutro.

El producto 5 se purificó por cromatografía en columna, utilizando como soporte sílica gel (0.040-0.063 mm, Merck) y como fase móvil hexano-acetato de etilo 8:2. Se obtuvieron cristales blancos con punto de fusión de 139-142 °C y Rf de 0.24 (eluyente hexano-acetato de etilo 8:2 v/v). El rendimiento fue del 50.5 %.

Los datos espectroscópicos se enlistan a continuación:

UV (espectro 18): $\lambda_{\text{máx}}=235.37\text{nm}$ $\epsilon=53147$

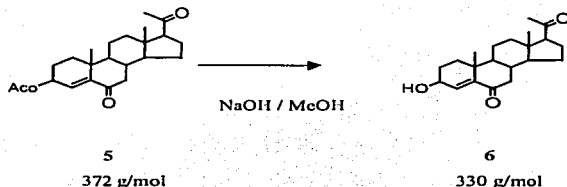
IR (espectro 17): 2935.89 (M, $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$), 1737.35 (S, $\text{C}=\text{O}$ del ester metílico en C-3), 1698.99 (S, $\text{C}=\text{O}$ de cetona en C-6 y C-20), 1642.54 (W, $\text{C}=\text{C}$ conjugado en C-4) y 1243.01 cm^{-1} (S, $\text{C}-\text{O}$ de ester en C-3).

RMN- ^1H (espectro 19) δ : 0.60 (s, 3H en C-18), 1.09 (s, 3H en C-19), 2.07 (s, 3H metilo de ester en C-3), 2.13 (s, 3H en C-21), 2.55 (t, 1H en C-17), 2.60 (d, 2H en C-7), 5.35 (q, 1H en C-3) y 6.09 ppm (d, 1H vinílico en C-4).

RMN- ^{13}C (espectros 20 y 21) δ : 13.28 (C-18), 19.57 (C-19), 21.15 (C-2'), 31.44 (C-21), 69.16 (C-3), 129.00 (C-4), 147.64 (C-5), 170.69 (C-1'), 201.79 (C-6) y 208.95 ppm (C-20).

Síntesis de 3 β -hidroxil-4-pregnen-6,20-diona. 6

Reacción



En un matraz de bola de 250 mL se colocó 1 g de 5 (2.69 mmoles) y se disolvió con 132 mL de metanol, enseguida se agregaron 9.7 mL de NaOH al 2% (4.85 mmoles). La mezcla de la reacción se mantuvo por agitación a temperatura ambiente por 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de reacción, el contenido del matraz se vertió en una mezcla hielo-agua en la misma proporción y se agitó para favorecer la precipitación del producto 6. Una vez formado éste, se filtró y se lavó con agua (2 x 50 ml.) hasta pH neutro. El producto 6 se obtuvo en forma de un polvo muy fino color crema.

Por otra parte, se hicieron extracciones con cloroformo a las aguas del filtrado (4 x 100 mL). Se reunieron las fases orgánicas y se lavaron con agua hasta pH neutro; enseguida se secó la fase orgánica con sulfato de sodio anhidro, se filtró y se eliminó el disolvente a presión reducida en el rotaevaporador, obteniéndose un polvo de color amarillo que correspondió al compuesto 6. Este se purificó por cromatografía en columna utilizando como soporte sílica gel (0.040-0.063 mm, Merck) y como fase móvil hexano-acetato de etilo 8:2.

Se obtuvieron cristales en forma de agujas color blanco con punto de fusión de 173-175 °C y Rf de 0.15 (eluyente hexano-acetato de etilo 5:5 % v/v). El rendimiento fue de 53.3 %.

Los datos espectroscópicos se enlistan a continuación.

UV (espectro 23) $\lambda_{\text{máx}} = 239.38 \text{ nm}$ $\epsilon = 49062$

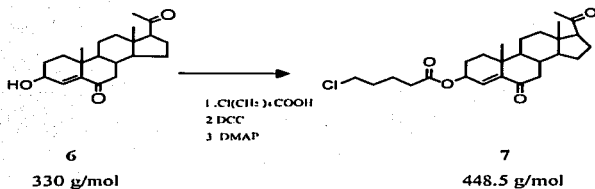
IR (espectro 22) ν : 3456.23 (M, -OH en C-3), 2941.95 (M, -CH₂, -CH₃), 1686.95 (S, C=O en C-6 y C-20) y 1631.12 cm^{-1} (W, C=C en C-4).

RMN-¹H (espectro 24) δ : 0.66 (s, 3H en C-18), 1.01 (s, 3H en C-19), 2.13 (s, 3H en C-21), 2.54 (t, 1H en C-17), 2.60 (d, 2H en C-7), 4.25 (m, 1H en C-3) y 6.18 ppm (d, 1H vinílico en C-4).

RMN-¹³C (espectros 25 y 26) δ : 13.28 (C-18), 19.78 (C-19), 31.44 (C-21), 67.16 (C-3), 133.14 (C-4), 146.30 (C-5), 202.40 (C-6) y 209.09 ppm (C-20).

Síntesis de 3 β -(5-clorovaleroiloxi)-4-pregnen-6,20-diona. 7

Reacción



En un matraz de bola de 25 mL. se colocaron 100 mg de 6 (0.303 mmoles) y se disolvieron con 10 mL de diclorometano. Enseguida se adicionaron en el siguiente orden 0.1 mL de ácido cloro-valérico (0.757 mmoles), 103 mg de dicitclohexilcarbodiimida (DCC 0.50 mmoles) y 60 mg de dimetilaminopiridina (DMAP 0.49 mmoles). Ésta última se secó previamente en la estufa a 50 °C por 10 minutos. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación por 2 hrs. a temperatura ambiente. Al término de la reacción, el contenido del matraz se vertió en 50 mL de H₂O y posteriormente se agregaron 50 mL de acetato de etilo formándose dos fases.

Con un embudo de separación se extrajo la fase orgánica y se lavó con agua (2 x 30 mL) hasta pH neutro, en esta etapa se observó la formación de un precipitado color blanco que correspondió a la dicitclohexilurea (DCU), subproducto de la reacción por lo que se procedió a filtrar. El filtrado se secó con sulfato de sodio anhidro, se decantó y finalmente se eliminó el disolvente a presión reducida en el rotaevaporador.

El compuesto 7 se obtuvo como residuo aceitoso color amarillo el cual fue purificado por placas preparativas utilizando como medio de elución hexano-acetato de etilo (7:3 % v/v) y eluyendo tres veces.

En la placa se marcó y raspó la zona correspondiente al compuesto 7. Este se extrajo de la sílica gel con 250 mL de acetato de etilo bajo calentamiento suave y agitación constante por 30 min. Posteriormente se filtró la sílica gel y se eliminó el disolvente a presión reducida.

El compuesto 7 se obtuvo en forma de cristales con punto de fusión 96-97 ° C y Rf=0.55 (eluyente hexano-acetato de etilo 5:5 % v/v). El rendimiento fue de 59 %.

Los datos espectroscópicos y espectrométricos se enlistan a continuación:

IR (espectro 27) ν : 2943.89 (M, $-\text{CH}_2$, $-\text{CH}_3$), 1732.14 (S, C=O del ester en C-3), 1700.11 (S, C=O de cetona en C-6 y C-20) y 1635.31 cm^{-1} (W, C=C conjugado en C-4).

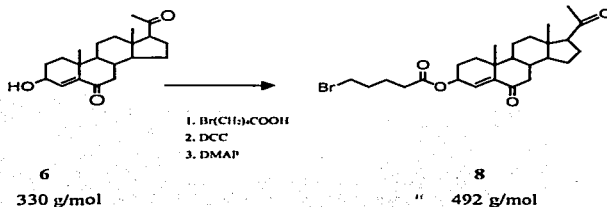
RMN-¹H (espectro 28) δ : 0.66 (s, 3H en C-18), 1.03 (s, 3H en C-19), 2.13 (s, 3H en C-21), 2.36 (t, 2H en C-2' del ester), 2.55 (t, 1H en C-17), 2.60 (d, 2H en C-7), 3.55 (t, 2H en C-5' del ester), 5.35 (m, 1H en C-3) y 6.08 ppm (d, 1H vinílico en C-4).

RMN-¹³C (espectros 29 y 30) δ : 13.29 (C-18), 19.60 (C-19), 22.78 (C-4'), 31.45 (C-21), 31.81 (C-3'), 33.53 (C-2'), 44.39 (C-5'), 69.20 (C-3), 128.96 (C-4), 147.71 (C-5), 172.76 (C-1'), 201.79 (C-6) y 208.97 ppm (C-20).

EMIE (espectro 31) Ion molecular (M^+): 448m/z, $M^+ + 2$ 450 m/z, pico base 330 (M^+ , $-\text{Cl}(\text{CH}_2)_4\text{CO}^+$).

Síntesis de 3β-(5-bromovaleroiloxi)-4-pregnen-6,20-diona. 8

Reacción



En un matraz de bola de 25 mL se colocaron 100 mg de **6** (0.303 mmoles) y se disolvieron con 10 mL de diclorometano. Enseguida se adicionaron en el siguiente orden: 137 mg de ácido bromo-valérico (0.756 mmoles), 103 mg de dicitclohexilcarbodiimida (DCC, 0.50 mmoles) y 60 mg de dimetilaminopiridina (DMAP, 0.49 mmoles). Ésta última se secó previamente en la estufa a 50 °C por 10 minutos. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación por 2 hrs. a temperatura ambiente. Al término de la reacción, el contenido del matraz se vertió en 50 mL de agua y posteriormente se agregaron 50 mL de acetato de etilo formándose 2 fases. Con un embudo de separación, se extrajo la fase orgánica y se lavó con agua (2 x 30 mL) hasta obtener un pH neutro. En esta etapa se observó la formación de un precipitado color blanco que correspondió a la dicitclohexilurea (DCU), subproducto de la reacción por lo que se procedió a filtrar. El filtrado se secó con sulfato de sodio anhidro, se decantó y finalmente se eliminó el disolvente a presión reducida en el rotaevaporador.

El compuesto **8** se obtuvo como un residuo aceitoso color amarillo el cual fue purificado por placas preparativas utilizando como medio de elución hexano-acetato de etilo (7:3 % v/v) y eluyendo 3 veces.

En la placa se marcó y se raspó la zona correspondiente al compuesto **8**. Este se extrajo de la sílica gel con 250 mL de acetato de etilo bajo calentamiento suave y agitación constante por 30 min. Transcurrido el tiempo de agitación, se filtró la sílica gel y el disolvente se eliminó a presión reducida.

El compuesto **8** se obtuvo en forma de cristales con punto de fusión 94-95°C y Rf=0.55 (eluyente hexano-acetato de etilo 5:5 % v/v). El rendimiento fue del 58.6 %.

Los datos espectroscópicos y espectrométricos se enlistan a continuación:

IR (espectro 32) ν : 2943.38 (M, -CH₂, -CH₃), 1731.76 (S, C=O del ester en C-3), 1761.29 (S, C=O en C-4 y C-20) y 1634.03 cm⁻¹ (W, C=C conjugado en C-6).

RMN-¹H (espectro 33) δ : 0.66 (s, 3H en C-18), 1.09 (s, 3H en C-19), 2.14 (s, 3H en C-21), 2.36 (t, 2H en C-2' del ester), 2.55 (t, 1H en C-17), 2.60 (d, 2H en C-7), 3.41 (t, 2H en C-5' del ester), 5.35 (m, 1H en C-3) y 6.08 ppm (d, vinílico en C-4).

RMN-¹³C (espectros 34 y 35) δ : 13.29 (C-18), 19.60 (C-19), 22.79 (C-4'), 31.44 (C-21), 31.96 (C-3'), 32.93 (C-2'), 33.41 (C-5'), 69.22 (C-3), 128.95 (C-4), 147.72 (C-5), 172.72 (C-1'), 201.77 (C-6) y 208.95 ppm (C-20).

EMIE (espectro 36) Ion molecular (M⁺): 492 m/z, M⁺+2 494 m/z, pico base 330 (M⁺, -Br(CH₂)₄CO⁺).

V. TRABAJO EXPERIMENTAL

B. ASPECTO BIOLÓGICO

Equipo y material.

Para la obtención de las funciones citosólica y microsomal de próstata y vesícula seminal se utilizaron 57 hámsters macho de la cepa Syriam Golden con 5 días de castración con peso entre 200 y 250 g

Para la preparación de las soluciones de referencia de los compuestos 7 y 8 (1 mg/mL), así como de la DHT[H^3], T[H^3], DHT y T (no radiactivas) se empleó metanol como disolvente. Para la preparación de las soluciones stock de nicotinamida adenina dinucleotido fosfato (NADPH) y de ditioneitol (DTT) se utilizó buffer de fosfato pH=7 40 mM. El buffer TEDM sin DTT se preparó a partir de Tris-HCl 20 mM pH=7.4 a 4 °C, 1.5 mM de ácido etilendiaminotetraminacético (EDTA), 10 mM de Molibdato de sodio y 10 % de glicerol v/v. El buffer TEDM con DTT se preparó al igual que la anterior pero con una concentración de DTT igual a 0.25 mM.

El medio A pH=6.5 se preparó a partir de sacarosa 0.32 M, 0.1 mM de DTT y buffer de fosfatos 20 mM. La solución de primulina se preparó a partir de 10 mg de primulina y se disolvieron con 400 mL de una mezcla agua-acetona (1:5 % v/v)

Para centrifugar las muestras se utilizaron rotores modelo SWGOTI y SW27. Para la CCF se utilizaron placas cromatográficas de silica gel de 20 cm x 20 cm 60G 254 (Merck). El conteo de la radioactividad se realizó en el equipo liquid Scintillation Analyzer modelo Tri-Carb 2100TR (Packard).

Obtención de las fracciones citosólica y microsomal de próstata y vesícula seminal.

Se sacrificaron 57 hámsteres macho con 5 días de castración en cámara de gas (dióxido de carbono) y se realizó la disección de próstatas y vesículas seminales

Se pesaron estos órganos y se homogeneizaron en buffer TEDM sin DTT en 3 volúmenes en relación a su peso. Los homogeneizados de ambos tejidos se centrifugaron por 1 hora a 140000 g a 4°C. Se separó el pellet del sobrenadante. El sobrenadante se utilizó como citosol para el ensayo con los receptores y el precipitado se resuspendió en 3 volúmenes de medio A pH = 6.5.

Se tomaron alícuotas de 1 mL tanto para la fracción citosólica como para la microsomal las cuales se congelaron a -70 ° C para su posterior utilización.

Se determinó el contenido de proteínas por el método de Bradford (41) utilizando albúmina sérica bovina como estándar. El contenido de proteínas se muestra en la Tabla 4.

Tabla 4
Contenido de Proteínas

Fracción	Próstata (mg/mL)	Vesícula seminal (mg/mL)
Citosólica	77	65.5
Microsomal	59.3	51

1.-Ensayo in vitro con la enzima 5 α -reductasa

Se preparó una serie de tubos con concentraciones entre $2 \cdot 10^{-6}$ y $1 \cdot 10^{-2}$ mM de los compuestos 7 y 8, además de dos tubos controles a los cuales solo se les adicionó T [H^3]. A todos los tubos, se les adicionó un volumen conocido de T [H^3] suficiente para alcanzar una concentración final de 2 nM.

Se adicionaron volúmenes crecientes del compuesto a probar suficientes para alcanzar concentraciones finales de entre $2 \cdot 10^{-6}$ y $1 \cdot 10^{-2}$ mM.

Los tubos se colocaron en baño maría y atmósfera de nitrógeno para evaporar el disolvente hasta sequedad.

Enseguida se adicionaron en el siguiente orden: 640 μ L de buffer de fosfatos pH=7, 160 μ L de fracción microsomal de vesícula seminal (8.16 mg de proteína), 100 μ L de DTT 1 mM y 100 μ L de NADPH 2mM. Los tubos se agitaron y se incubaron a 37°C por 1 hora. Al término de la incubación se agregó 1 mL de diclorometano para detener la reacción y se agitaron en un vórtex por 1 minuto.

Se extrajo la fase orgánica (diclorometano) en la cual se encontraba la DHT [H^3] formada. Se realizaron 4 extracciones más. Posteriormente el diclorometano se evaporó en baño maría hasta sequedad.

A cada uno de los tubos, incluyendo los controles, se les adicionó 10 μ L de DHT (no radiactiva, 1mg/mL) 6 gotas de metanol y se agitaron en el vórtex.

El contenido de cada tubo se aplicó gota a gota en placas cromatográficas para separar la DHT [H^3] formada. También se aplicaron estándares de T, DHT y una mezcla de las 2 en ambos lados de la placa.

Las placas se eluyeron tres veces empleando como sistema de elución cloroformo-acetona 9:1 % v/v; al término de las eluciones las placas se observaron bajo la luz UV a 254 nm y se marcó la zona correspondiente a la testosterona (Rf=0.45).

Posteriormente las placas de CCF se revelaron con una solución de primulina y se observaron bajo la luz UV a 304 nm; se marcaron las zonas correspondientes a la DHT [H^3] (Rf=0.64).

Se cortaron las zonas correspondientes a la DHT [H^3] y se colocaron en viales.

Finalmente se adicionaron 5mL de líquido de centello Ultima Gold, se agitaron y se leyó la radioactividad en el Analizador de centello

La actividad de la enzima se calculó en base a los controles que fueron incubados en presencia únicamente de $T[H^3]$.

Se trazó una curva y se calculó la concentración del compuesto necesaria para inhibir el 50% de la conversión de $T[H^3]$ a $DHT[H^3]$ (IC_{50}).

2. Ensayo de unión a receptores androgénicos de los compuestos 7 y 8.

Curva de referencia

Para este ensayo se utilizaron tubos control de cuentas totales (CT) para conocer la radioactividad total, tubos de carbón-dextrán (CD) para eliminar la cantidad de radioactividad no unida y tubos de uniones totales (UT) para conocer la radioactividad unida al receptor. Esto se realizó por duplicado.

Para la curva de referencia se marcaron tubos con concentraciones de 0.2 mM a 1 mM por duplicado.

A todos los tubos se les adicionó un volumen conocido de $DHT[H^3]$ suficiente para alcanzar una concentración final de 1 nM.

A los tubos de la curva de referencia se les adicionaron cantidades crecientes de $DHT[H^3]$ suficientes para alcanzar concentraciones finales de 0.2 mM a 1 mM. Estos tubos se colocaron en baño maría para evaporar al disolvente hasta sequedad.

A los tubos control CT y CD se les adicionó 200 μ L de buffer TEDM con DTT, a los tubos UT se les adicionó 100 μ L del mismo buffer y 100 μ L de citosol de vesícula seminal (6.55 mg de proteína).

A los tubos de la curva se les adicionó 100 μ L de buffer TEDM con DTT y 100 μ L de citosol de vesícula seminal. Todos los tubos se incubaron por 18 horas a 4 ° C.

Al término de la incubación, a los tubos CT se les adicionó 800 μ L de buffer TEDM con DTT y a los tubos restantes se les adicionó 800 μ L de una suspensión de carbón-dextrán previamente agitada por 30 minutos.

Los tubos se agitaron y se incubaron a 4 ° C por 45 minutos, posteriormente se centrifugaron por 10 minutos a 4000 rpm.

De cada tubo se tomaron 200 μL del sobrenadante y se colocaron en un vial previamente marcado. A cada vial se le adicionó 5 mL de líquido de centelleo Ultima Gold, se agitaron y se leyó la radioactividad en el Analizador de centelleo.

Ensayo con los compuestos 7 y 8

Para cada compuesto se marcaron los tubos con concentraciones entre 0.2 mM y 1 mM por duplicado.

A cada tubo se le adicionó un volumen conocido de DHT[^3H] suficiente para alcanzar una concentración final de 1nM.

Enseguida se adicionaron volúmenes crecientes del compuesto a probar suficientes para alcanzar concentraciones finales de 0.2 mM a 1 mM.

Se realizó el mismo tratamiento descrito para los tubos de la curva de referencia.

El porcentaje de DHT[^3H] unido a receptores se calculó en base a los controles de uniones totales (UT).

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

A. ASPECTO QUÍMICO.

En la tabla 5 se resumen las características de los compuestos intermedios y finales (esquema 3, pág. 29)

Tabla 5]

Compuesto	Fórmula condensada	Peso molecular (g/mol)	Punto de fusión (° C)	Rendimiento (%)	Rf
1	C ₂₁ H ₃₂ O ₂	316	193 - 195	51.5	0.33 ^a
2	C ₂₃ H ₃₄ O ₃	358	147 - 151	50.0	0.51 ^a
3	C ₂₃ H ₃₄ O ₄	374	125 - 127	55.7	0.14 ^b
4	C ₂₃ H ₃₄ O ₅	390	224 - 226	65.5	0.32 ^b
5	C ₂₃ H ₃₂ O ₄	372	139 - 142	50.5	0.24 ^b
6	C ₂₁ H ₃₀ O ₃	330	173 - 175	53.3	0.15 ^c
7	C ₂₆ H ₃₇ O ₄ Cl	448.5	96 - 97	59.0	0.55 ^c
8	C ₂₆ H ₃₇ O ₄ Br	492	94 - 95	58.6	0.55 ^c

a hexano: acetato de etilo 8:2

b hexano: acetato de etilo 8:2 (2 eluciones)

c hexano: acetato de etilo 5:5

Con respecto a la caracterización de la materia prima, en su espectro de IR (espectro 1) se observó la presencia de los grupos funcionales alcohol secundario en 3437.96 cm⁻¹, doble enlace de C-5-C-6 en 1642.22 cm⁻¹ y una banda intensa en 1681.40 cm⁻¹ correspondiente al carbonilo de la cetona en C-20.

En el espectro de RMN-¹H (espectro 2) las señales en 0.62, 1.01 y 2.20 ppm que integraron para 3 hidrógenos cada una se asignaron a los protones de C-18, C-19 y C-21 respectivamente. La señal en 5.35 ppm que integró para un hidrógeno fue asignada al protón vinílico en C-6 en tanto que la señal a 3.53 ppm fue asignada al protón base en C-3. La señal registrada como triplete para el protón de C-17 se ubicó en 2.53 ppm, éste se acopló a los protones de C-16.

Por comparación de los espectros de RMN-¹³C normal y modalidad DEPT, (espectros 3 y 4) las señales registradas a campo alto en 13.19, 19.35 y 31.81 ppm se asignaron a C-18, C-19 y C-21 respectivamente. El desplazamiento registrado en 71.63 ppm correspondió al C-3 que se encuentra unido al oxígeno del alcohol. Los desplazamientos registrados en 121.33 y 140.73 ppm fueron asignados a C-6 y C-5 del doble enlace y finalmente en la zona de carbonilos la señal en 209.59 ppm correspondió a la cetona en C-20 (42).

Una vez caracterizada física y espectroscópicamente a la materia prima 1, se procedió a sintetizar el compuesto 2. Este fue obtenido a partir de una reacción de acetilación con la cual se busca proteger al C-3 ya que de lo contrario en la reacción de oxidación con CrO₃/H₂O éste también se oxidaría dando lugar a un grupo carbonilo.

La reacción de acetilación transcurre mediante la formación de la especie acetilpiridinio que actúa como electrófilo. El rendimiento de la reacción fue de 50 %.

Para este compuesto el análisis de su espectro de IR (espectro 5) mostró desaparición de la banda que corresponde al alcohol en tanto que apareció una banda intensa en 1726.19 cm⁻¹ asignada al carbonilo del ester, la presencia de la banda en 1237.16 cm⁻¹, vibración stretching C-O del ester, confirmó la existencia de dicho grupo en la molécula. Adicionalmente se observaron las bandas en 1704.89 cm⁻¹ de la cetona en C-20 y una banda en 1642 cm⁻¹ correspondiente a la insaturación en C-5 y C-6.

En la resonancia magnética protónica (espectro 6), además de las señales en 0.63, 1.02 y 2.12 ppm asignadas a los protones de C-18, C-19 y C-21, la señal en 2.03 ppm como singlete que integró para 3 hidrógenos corroboró la presencia del metilo del ester en C-3. La señal como multiplete en 4.60 ppm que integró para 1 hidrógeno se asignó al protón base de C-3, éste se encontró desplazado a un campo más bajo con respecto al valor asignado para el mismo protón en el compuesto anterior (1) indicando que está más desprotegido; esto es debido a que existe un fenómeno de resonancia entre el carbonilo y el oxígeno del ester en C-3. La señal en 5.38 ppm asignada para el protón vinílico de C-6, no mostró cambio sustancial con el valor dado para el mismo protón en el compuesto anterior (1).

El espectro de RMN-¹³C (espectros 7 y 8) también confirmó la existencia del ester ya que además de las señales de C-18, C-19 y C-21 apareció a nueva señal en 21.38 ppm asignada al carbono del metilo del ester. En la zona de carbonilos, además de la señal en 209.59 ppm de la cetona en C-20, apareció otra señal en 170.46 ppm que correspondió carbonilo del ester. La señal en 73.8 ppm fue signada al C-3 en tanto que las señales a 122.29 y 139.65 ppm asignadas a C-6 y C-5 confirmaron que se mantuvo el doble enlace en la molécula.

El compuesto 3 fue obtenido mediante una reacción de epoxidación, en la que ocurre la transferencia de un átomo de oxígeno del ácido-m-cloro-perbenzoico al doble enlace del esteroide. Esta adición ocurre principalmente en la posición alfa de la molécula (adición de tipo syn) (43).

El rendimiento de la reacción fue del 55.7 % y el subproducto formado durante la reacción, ácido-m-clorobenzoico, es eliminado mediante la formación de su sal correspondiente, insoluble en cloroformo.

La estructura del compuesto 3 se verificó por la banda en 1034.40 cm⁻¹ (espectro 9) que correspondió a la vibración stretching C-O del epóxido, también se apreciaron bandas del carbonilo del ester en 1733.62 cm⁻¹ y de la cetona en 1703.32 cm⁻¹ (42).

En lo que concierne a RMN-¹H (espectro 10), se observó una señal en 3.09 ppm que integró para 1 hidrógeno y correspondió al protón de C-6, la señal registrada como doblete en 2.90 ppm y que integró para 2 hidrógenos fue asignada a los protones de C-4, los cuales se acoplaron al protón de C-3. La señal múltiple para el protón en C-3 se ubicó en 4.77 ppm. Cabe mencionar que las señales para los protones de C-18, C-19, C-21 y C-2' (metilo de ester) se mantienen prácticamente constantes con respecto al compuesto anterior (2).

Por su parte la RMN-¹³C (espectros 11 y 12) mostró las señales de carbonilo de C-20 en 209.41 ppm y carbonilo de ester en 170.20 ppm; el C-6 unido al oxígeno del epóxido se ubicó 63.31 en tanto que el C-3 se ubicó en 71.21 ppm. Los desplazamientos observados a 13.20, 15.80, 21.30, y 31.52 fueron asignados a C-18, C-19, C-2' (metilo del ester) y C-21 respectivamente.

Para la síntesis del compuesto 4 se llevó a cabo una reacción de oxidación en la cual el ácido crómico (H_2CrO_4), formado a partir de trióxido de cromo y agua, actúa como una especie oxidante, de esta manera la molécula esteroideal es oxidada en la posición 6 en tanto que el H_2CrO_4 es reducido a H_2CrO_3 (44).

La transformación química de la molécula se manifestó con una absorción en el IR (espectro 13) a 3455.84 cm^{-1} para el alcohol y 1689.86 cm^{-1} para el carbonilo en C-6, 1715.44 cm^{-1} para el carbonilo de la cetona en C-20 así como en 1737.02 cm^{-1} para el carbonilo del ester en C-3.

En la RMN- ^1H (espectro 14) se observaron los desplazamientos para el protón de C-17 en 2.55 ppm, los protones de C-7 en 2.79 ppm y el protón beta de C-3 en 5.04 ppm. Los desplazamientos para los protones de C-18, C-19, C-2' (metilo del ester) y C-21 que integraron para 3 hidrógenos cada una se ubicaron en 0.60, 0.81, 2.01 y 2.17 ppm respectivamente.

En la RMN- ^{13}C (espectros 15 y 16) se apreciaron dos señales, una en 211.81 ppm asignada para el carbonilo de C-6 y la otra para C-5' desplazada hacia campo bajo en 80.15 ppm. Los desplazamientos químicos ubicados a 13.35, 13.87, 21.34 y 31.44 ppm se asignaron para C-18, C-19, C-2' (metilo del ester) y C-21, en tanto que el carbonilo del ester se ubicó en 171.00 ppm.

La obtención del compuesto 5 implicó una reacción de eliminación para la cual se utilizó cloruro de tionilo y piridina anhidra, esta última es la que extrae un protón de C-4 para dar lugar a la formación del doble enlace C-4-C-5 en la molécula esteroideal. El rendimiento de la reacción fue de 50.5 %.

Debido al cromóforo que presentó el compuesto (entidad 4-en-6-ona), se registró un máximo de absorción en la región UV a 235.37 nm con valor de $\epsilon=53147$ (espectro 18).

Su análisis de IR (espectro 17) confirmó la presencia del doble enlace conjugado en C-4 con una banda en 1642.54 cm^{-1} y otra muy intensa en 1698.99 cm^{-1} debido a la vibración stretching C=O de la cetona en C-6 y C-20 (42).

Con respecto a la RMN-¹H (espectro 19) en la zona de protones vinílicos apareció una señal en 6.09 ppm asignada para el protón de C-4, otra señal registrada como doblete a 2.60 ppm asignada a los protones de C-7 los cuales se acoplaron al protón de C-8 y la señal múltiple en 5.35 ppm asignada al protón base de C-3. Los desplazamientos químicos registrados como singuletes para los hidrógenos de C-18, C-19, C-2' (metilo del ester) y C-21 se ubicaron en 0.60, 1.09, 2.07 y 2.13 ppm respectivamente.

Por su parte la RMN-¹³C (espectros 20 y 21) también corroboró la presencia del doble enlace ya que aparecieron 2 señales, una a 129.00 ppm asignada a C-4 y otra a campo mas bajo en 147.64 ppm para C-5 que está mas desprotegido en relación a C-4; en la zona de carbonilos se mantuvieron las señales para C-6 a 201.79 ppm, carbonilo del ester en 170.69 ppm y carbonilo en C-20 en 208.95 ppm. Finalmente las señales registradas a 13.28, 19.57 y 21.15 ppm fueron asignadas a C-18, C-19 y C-2' (metilo del ester) respectivamente.

Para la formación de compuesto 6 se llevó a cabo una reacción de hidrólisis catalizada en medio básico, para regenerar el alcohol esteroidal y el acetato correspondientes. El rendimiento de la reacción fue de 53.3 % (45).

La conjugación de 4-en-6-ona en la molécula se mantuvo y registró un máximo de absorción en $\lambda = 299.38\text{ nm}$ con valor de $\epsilon = 49062$ (espectro 23).

La generación de alcohol fue verificado en su espectro de IR (espectro 22) ya que apareció una banda de intensidad media en 3406.23 cm^{-1} característica para la vibración stretching -OH, las bandas en 1685.95 cm^{-1} para la cetona en C-6 y 1631.12 cm^{-1} para el doble enlace confirmaron el sistema conjugado del esteroide.

El espectro de RMN-¹H (espectro 24) confirmó la formación de alcohol, ya que el protón base en C-3 nuevamente se desplazó a campo alto en 4.25 ppm, se mantuvieron las señales para el protón vinílico en C-4 a 6.18 ppm y para los protones de C-7 a 2.60 ppm. Los desplazamientos en 0.66, 1.01 y 2.13 que integraron para tres hidrógenos cada una fueron asignados a los protones de C-18, C-19 y C-21 respectivamente.

En el espectro de RMN-¹³C (espectros 25 y 26) se observaron las señales para C-18, C-19 y C-21 en 13.28, 19.78 y 31.44 ppm. En la zona de carbonilos se apreciaron los desplazamientos en 202.40 para C-6 y en 209.09 para C-20. Otras señales que se observaron fueron a 133.14 ppm para C-4 y 146.30 ppm para C-5.

Los compuestos finales 7 y 8 se obtuvieron mediante una reacción de esterificación a partir del alcohol y ácido correspondiente, utilizando dimetilaminopiridina (DMAP) y dicitclohexilcarbodiimida (DCC) (46).

Se propuso como primer paso la reacción ácido-base entre la dimetilaminopiridina y el ácido correspondiente para formar el nucleófilo RCOO⁻ el cual ataca al carbono sp² de la DCC formando un intermediario de tipo anhídrido mixto que finalmente es atacado por el oxígeno del alcohol esteroideal (fig. 8).

El rendimiento de la reacción fue del 59 % para el compuesto 7 y 58.6 % para el compuesto 8.

La estructura del compuesto 7 se verificó en su espectro de IR (espectro 27) ya que apareció una banda intensa en 1732.14 cm⁻¹ para el carbonilo del éster en C-3. Las absorciones registradas en 1700.11 cm⁻¹ para la cetona α,β insaturada en C-6 y en 1635.31 cm⁻¹ para el doble enlace conjugado confirmaron el sistema 4-en-6-ona en la molécula esteroideal (42).

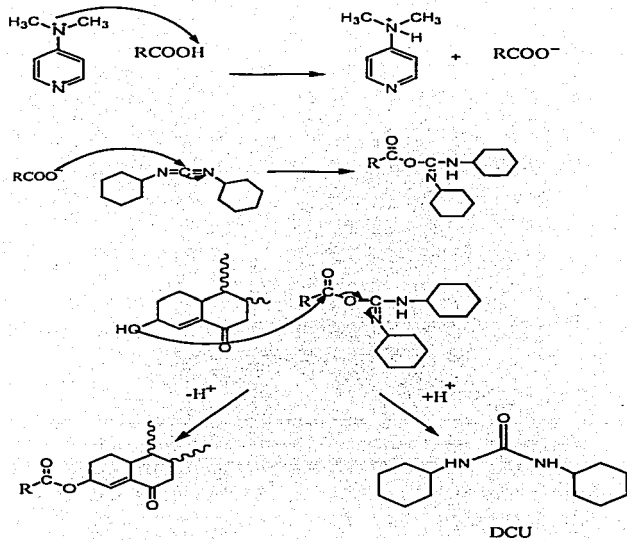


Fig. 8 Mecanismo para la reacción de esterificación

En lo que se refiere al espectro de RMN-¹H (espectro 28), éste confirmó la formación del ester ya que aparecieron dos señales, una a 2.36 ppm como triplete que integró para 2 hidrógenos asignado a los protones de C-2' de la cadena del ester valérico y otra a 3.55 ppm como triplete asignada a los protones de C-5' de la cadena del ester, éstos se encuentran desprotegidos debido a la presencia del cloro adyacente. Otras señales que se mostraron fueron a 2.60 ppm para los protones de C-7, a 5.35 ppm para el protón base en C-3 y a 6.08 ppm para el protón vinílico en C-4. Las señales para los protones en C-18, C-19 y C-21 se mantuvieron prácticamente constantes con respecto al compuesto anterior (6).

En cuanto a la resonancia de carbono-13 (espectros 29 y 30), en la zona de carbonilos apareció una señal en 172.76 ppm asignada para el carbonilo de ester en tanto que las señales para C-4, C-5, carbonilo en C-6 y carbonilo en C-20 se mantuvieron prácticamente constantes con respecto al compuesto anterior (6). En la zona de carbonos metilénicos, aparecieron 4 señales más que correspondieron a los metilenos de la cadena del ester valérico. Estos de ubicaron a 33.53 para C-2', 31.81 para C-3', 22.78 para C-4' y 44.39 ppm para C-5'. Las señales para C-18, C-19 y C-21 no presentaron variación alguna.

En el EMIE (espectro 31) se detectó el ión molecular (M⁺) en 448 m/z y un pico en M⁺+2 (450 m/z), que representó aproximadamente la tercera parte de la intensidad del pico M⁺, indicativo de la presencia de cloro. El pico base se registró en 330 m/z por pérdida de la entidad -Cl(CH₂)₄CO⁺ a partir del ión molecular.

La estructura del compuesto 8 se verificó por el análisis de su espectro de IR (espectro 32) ya que se apreció una banda intensa en 1731.76 cm⁻¹ para el carbonilo del ester, y otras bandas en 1761.29 cm⁻¹ para la cetona α,β insaturada en C-6 y en 1634.03 cm⁻¹ para doble enlace conjugado en C-4 y C-5 (42).

El espectro de RMN-¹H (espectro 33) confirmó la presencia del ester, al registrar una señal cuya multiplicidad fue de un triplete que integró para 2 hidrógenos en 3.41 ppm asignada a los protones de C-5' de la cadena del ester valérico, éstos se encuentran un poco más protegidos con respecto a los protones de la misma posición en el compuesto 7 debido a que el bromo es menos electronegativo que el cloro (43).

Otra señal que se presentó fue a 2.36 ppm como triplete asignado a los protones C-2' del ester, los cuales se acoplaron a los protones de la posición C-3'. Los desplazamientos para el protón base en C-3, para el protón vinílico en C-6 y para los protones en C-7 se presentaron en 5.35, 6.08 y 2.60 ppm respectivamente. Las señales para los protones de C-18, C-19 y C-21 se mantuvieron sin cambio con respecto al compuesto 6.

Por su parte la RMN-¹³C (espectros 34 y 35) también corroboró la presencia del ester al registrarse una señal en 172.72 ppm asignado para el carbonilo del ester, en la zona de carbonos metilénicos de nuevo aparecieron 4 señales más que correspondieron a las señales de los metilenos de la cadena del ester valérico. Éstos se ubicaron a 32.93 para C-2', 31.96 para C-3', 22.79 para C-4' y 33.41 ppm para C-5'. Las señales para C-4, C-5 y C-6 al igual que para C-18, C-19 y C-21 se mantuvieron invariables con respecto al compuesto 7.

En el EMIE (espectro 36) el ion molecular (M^+) se detectó en 492 m/z además de otro pico en $M^+ + 2$ (494 m/z), la intensidad de éste último fue prácticamente igual a la intensidad del pico M^+ indicando la presencia de bromo en la molécula; el pico base se detectó en 330 m/z por pérdida de la entidad $-Br(CH_2)_4CO^+$ a partir del ión molecular.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

B. ASPECTO BIOLÓGICO

1.- Ensayo in vitro con la enzima 5 α -reductasa

En la figura 9 se muestran los resultados obtenidos para los compuestos 7 y 8 (esquema 3, pág. 29) así como el valor de IC₅₀ (concentración del esteroide a la cual se inhibe el 50 % de la actividad enzimática) obtenido.

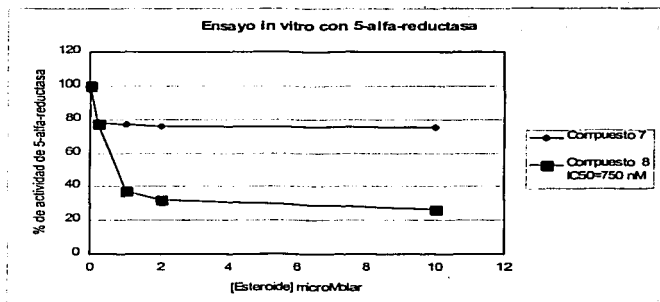


Fig. 9 Actividad inhibitoria de los compuestos 7 y 8 sobre la enzima 5 α -reductasa

El compuesto 7 bajó la actividad de la enzima 5 α -reductasa hasta un 75 % a una concentración de 10 μ M. Lo anterior indicó que el compuesto 7 presentó una baja actividad como inhibidor de la enzima con respecto a la finasterida, ya que el valor de IC₅₀ para ésta última es de 10 nM (tabla 6). Este valor fue determinado previamente bajo las mismas condiciones experimentales descritas para este ensayo (38).

En cambio el compuesto **8** a medida que aumentó su concentración, disminuyó la actividad de la enzima 5α -reductasa hasta un 26 % a una concentración de 10 μ M. Su IC_{50} fue de 750 nM. Sin embargo, este valor resulta alto comparado con el IC_{50} de la finasterida (10 nM) indicando que la actividad inhibitoria del compuesto **8** es moderada (tabla 6).

Tabla 6

Esteroides	IC_{50} nM
7	---
8	750
Finasterida	10

2.- Ensayo de unión a receptores androgénicos de los compuestos 7 y 8.

El análisis por competencia de los compuestos 7 y 8 (esquema 3, pág. 29) por los sitios de unión al receptor androgénico se muestra en la figura 10.

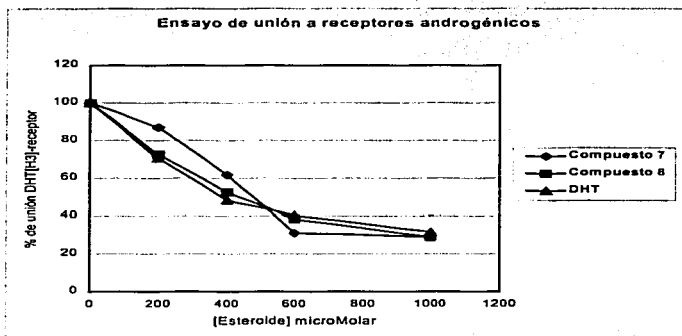


Fig. 10. Análisis por competencia de los sitios del receptor de andrógenos por los compuestos 7 y 8

Para este ensayo se realizó una curva de referencia con el ligando natural del receptor androgénico la DHT; para ésta curva se mantuvo constante la concentración de la DHT[H^3] y se aumentó gradualmente la concentración de DHT (no radioactiva). En el ensayo con los compuestos 7 y 8 de manera similar se mantuvo constante la concentración de DHT[H^3] y se aumentaron gradualmente las concentraciones de cada uno de los compuestos. En ambos casos, sólo se cuantificó la DHT[H^3] unida al receptor.

En la figura 10 se observó que en la curva de DHT, a medida que aumentó la concentración de esta última, el porcentaje de DHT[H³] unida a los receptores disminuyó lo cual se esperaba.

En la curva correspondiente al compuesto 7 (fig. 10) se observó que a medida que aumentó la concentración del compuesto, el porcentaje de DHT[H³] unida a los receptores disminuyó. Lo anterior implica que tal compuesto compite con la DHT[H³] por los sitios de unión del receptor, incluso a la concentración de 1 mM sólo el 29 % de DHT[H³] está unida al receptor indicando que el compuesto 7 la está desplazando.

La curva correspondiente al compuesto 8 (fig. 10) también mostró una tendencia similar al compuesto 7 y por lo tanto también presentó afinidad por el receptor. De igual forma se observó que a una concentración 1 mM del compuesto 8 sólo el 29 % de DHT[H³] está unida al receptor.

Mediante interpolación en la gráfica (fig. 10) se obtuvo el valor de IC₅₀ (concentración del esteroide que inhibe por competencia el 50 % de los receptores) tanto para la DHT como para los compuestos 7 y 8 (Tabla 7).

Por otra parte se realizó el cálculo de la constante de inhibición Ki (constante de inhibición para el complejo esteroide-receptor) (Tabla 7) con la siguiente fórmula:

$K_i = IC_{50} + C/K_d$ en donde

K_d (constante de disociación) = 1.365 nM*

C (concentración de DHT[H³]) = 1 nM

*Este valor se calculó previamente a partir de un estudio de cinética e indica la concentración del esteroide a la cual se une el 50 % de los sitios del receptor.

Tabla 7

Esteroides	IC ₅₀ (μM)	Ki (μM)
DHT	385	385.7
7	475	475.7
8	440	440.7

Al comparar los valores de IC₅₀ obtenidos mostraron la siguiente tendencia: DHT < 8 < 7. Lo anterior indica que la DHT necesita una menor concentración que los compuestos 7 y 8 para saturar a los receptores y por lo tanto su afinidad por éstos es mayor. Con respecto al comportamiento de los compuestos 7 y 8, éste último presentó ligeramente mayor afinidad que el compuesto 7 por los receptores andrógenicos. Lo anterior también se reflejó en los valores de Ki (constante de inhibición para el complejo esteroide-receptor), ya que Ki 7 > Ki 8 > Ki DHT.

Los resultados obtenidos para el ensayo con la enzima 5α-reductasa indicaron que sólo el compuesto 8 presentó actividad inhibitoria moderada sobre la enzima (IC₅₀ = 750 nM) en comparación con la finasterida (IC₅₀ = 10 nM).

Es posible que la baja actividad inhibitoria sobre la enzima 5α-reductasa encontrada en los compuestos sintetizados se deba a que la enzima no se adicione de manera eficiente al sistema conjugado 4-en-6-ona por la voluminosidad del ester valérico en C-3.

Aunque la longitud de la cadena proporcione a la molécula características lipofílicas indispensables para ejercer su acción biológica (paso a través de membranas celulares), también es factible que ésta pueda causar impedimento estérico y en consecuencia no se lleve a cabo la inhibición de la enzima por la formación de un aducto irreversible mediante una adición 1-4 de tipo Michael (32,33).

Por otra parte la diferencia de actividad encontrada para los compuestos 7 y 8 puede ser debido a la presencia del átomo de halógeno en la posición 5 de la cadena del ester valérico. Al parecer la electronegatividad influye de manera importante para la actividad antiandrogénica del esteroide.

Lo anterior confirma que los derivados bromados presentan mayor actividad inhibitoria con respecto a los derivados clorados (34,47) De aquí que se puede plantear que a mayor electronegatividad del halógeno, menor actividad biológica.

En el ensayo de unión a receptores androgénicos se determinó que los compuestos 7 y 8 presentaron afinidad por el receptor. Lo anterior puede ser atribuido a que la conjugación que presentan ambos esteroides, 4-en-3-ona, les proporciona características de coplanaridad en los anillos A y B del núcleo esteroideal que pueden influir en su interacción química con el receptor (48, 49).

Finalmente se presume que la presencia del halógeno en la posición 5 de la cadena del ester valérico también contribuye a la unión esteroide-receptor, ya que se han probado derivados bromados de la hidroxiflutamida (48,50) encontrándose que los valores para K_i (constante de inhibición) son bajos, lo que implica que este fármaco presenta alta afinidad por el receptor androgénico.

VI. CONCLUSIONES

Se sintetizaron y caracterizaron física y espectroscópicamente los compuestos 3β -(5-clorovaleroiloxi)-4 pregnen-6,20 diona.7 y 3β -(5-bromovaleroiloxi)-4 pregnen-6,20-diona 8 así como los productos intermedarios.

El compuesto 8 se comportó como un inhibidor moderado de la enzima 5α -reductasa (tipo 2) (IC_{50} =750 nM) con respecto a la finasterida (IC_{50} =10 nM)

Los compuestos 7 y 8 presentaron afinidad por el receptor androgénico (K_i =475 μ M y K_i =440 μ M respectivamente) ambos comparables con la DHT (K_i =385 μ M).

La actividad antiandrogénica de los compuestos 7 y 8 medida como la capacidad para inhibir la actividad de la enzima 5α -reductasa (tipo 2), disminuyó al aumentar la longitud del ester en C-3; la electronegatividad del átomo de halógeno en la cadena del ester coadyuvó a la baja actividad inhibitoria del compuesto 7, el cual no se consideró inhibidor de la enzima 5α -reductasa (tipo 2)

La afinidad química que presentaron los compuestos 7 y 8 por el receptor de andrógenos puede ser atribuido a la coplanaridad de los anillos A y B y a la electronegatividad del átomo de halógeno en la posición 5 de la cadena del ester valérico.

Los resultados obtenidos en este trabajo, pueden aportar datos para en un futuro realizar un estudio de relación estructura-actividad biológica cuantitativa (QSAR) que relacione la actividad inhibitoria de los esteroides con su estructura química para el diseño de nuevas moléculas para el tratamiento de cáncer de próstata e hiperplasia prostática benigna entre otros padecimientos andrógeno-dependientes.

VII. BIBLIOGRAFÍA

- 1) Imperato-Mc Ginley J., Gauter T., Zirinski K. Prostate visualization studies in males homozygous for 5 α -reductase deficiency. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1992, 75, 1022-1026.
- 2) Bratocoff E., Flores G., Ramirez E., Valencia N. The pharmacology of the antiandrogens. *Chemistry today.* 1997, 15,67-69.
- 3) Brooks J.R. Treatment of hirsutism with 5 α -reductase inhibitors. *J. Clin. Endocrinol. and Metab.* 1986,15,391-405.
- 4) Metcalf B.W., Levy M.A., Hold D.A. Inhibitors of 5 α -reductase in benign prostatic hyperplasia, male pattern baldness and acne. *Trend. Pharmacol. Sci.* 1989, 10, 491-495.
- 5) Garnick B.M., Fair R.W. El cáncer de próstata, en *Investigación y Ciencia.* 1999, 7-16.
- 6) Ellen M., Shuck H. The endocrinology of prostate cancer. *J. Clin. Endocrinol and Metab.* 2001, 86(8), 3467-3477.
- 7) Brawley O. W. Hormonal prevention of prostate cancer. *Urologic oncologic: seminars and original investigations.* 2003, 21, 67-72.
- 8) Kaisary A.V. Current clinical studies with a nonsteroidal antiandrogen "Casodex". *Prostate.* 1994, 5, 27-33.
- 9) Mc Connel J., Wilson D., George F.G., Sellar J., Pappas F. and Stoner E. Finasteride, an inhibitor of 5 α -reductase, suppress prostatic dihydrotestosterone in men with benign prostatic hyperplasia. *J. Clin. Endocrinol and Metab.* 1992, 74, 505-508.

- 10) Coffey S. Rodd's Chemistry of carbon compounds. 1970, segunda edición, vol. 2, págs. 15-16
- 11) Newsholme E.A., Leech A.R. Bioquímica médica. cap. 20. España 1986. Ed. Interamericana Mc Graw Hill, págs 189-192.
- 12) Foye W. O. Principios de Química Farmacéutica, vol. 2, 1ª Edición, Edit. Reverté. España, 1988, págs. 765-770
- 13) Williams R.H. Tratado de endocrinología. Cap. 6. España 1985. Edit. Interamericana, págs. 308-325.
- 14) Dence J. B. Steroids and peptides. 1980, Ed. Wiley-Interscience publication, pág. 18-25.
- 15) Goodman G.A., Gilman L.S. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 8ª. Edición. Editorial Panamericana 1994, págs. 1531-1546.
- 16) Hippaka R.A., Shutsung L. Molecular mechanism of androgen action. Trends. Endocrinol. Metab. 1998, 9(8), 317-324.
- 17) Heinlein C.A., Chang C. Androgen receptor coregulators: an overview. Endocrin. Reviews. 2002, 23(2), 175-200.
- 18) www.siludhoy.com/articulo/homb/eanpros
- 19) Imperato-Mc Ginley., Gautier T. Inherited 5 α -reductase deficiency in men. Trend. Genet. 1986, 2, 130-133.
- 20) Imperato-Mc Ginley J., Peterson R. J., Leshin M. Steroid 5 α -reductase deficiency in 65 years old male pseudohermafrodite: the natural history, ultrastructure of the testes and evidence for the inherited enzyme heterogeneity. J. Clin. Endocrinol. and Metab. 1980, 50, 15-22.

- 21) McConnell J. and Stoner E. 5α -reductase inhibitors. *Advanced in protein chemistry*. 2001, 56, 143-179.
- 22) Debes J. The role of androgens and the androgen receptor in prostate cancer. *Cancer Letters*. 2002, 87(2), 1-7.
- 23) Griffiths K., Morton M.S., Nicholson R. I. Androgens, androgen receptor, antiandrogens and the treatment of prostate cancer *Eur. Urol.* 1997, supplement. 3, 24-40.
- 24) Russell D. W. Steroid 5α -reductase: two genes/two enzymes. *Annu. Rev. Biochem.* 1994, 63, 26-61.
- 25) Georgianna Harris; Barbara Azzolina., Baginsky W. Identification and selective inhibition of a isoenzyme of steroid 5α -reductase in human scalp. *Proc Natl. Acad. Scien. USA.* 1992, 89, 10787-10791.
- 26) Liang T., Cascieri M., Cheung A. H., Rasmussen G. H. Species differences in prostatic steroid 5α -reductase of rat, dog and human. *Endocrinology*. 1985, 117, 571-579.
- 27) Anderson S. and Russell D. W. Structural and biochemical properties of cloned and expressed human and rat 5α -reductases. *Proc. Natl. Acad. Scien. USA.* 1990, 87, 3640-3644.
- 28) Avendaño C. Y Espada M. *Introducción a la Química Farmacéutica*. Cap. 17. Ed. Interamericana McGraw Hill, Madrid España, 1996, págs. 491-493.
- 29) Bratoeff E., Ramírez E., Murillo E., Flores G., Cabeza M. Steroidal antiandrogens and 5α -reductase inhibitors. *Current Med. Chem.* 1999, 6, 1107-1123.

- 30) Bratoeff E., Herrera E., Ramírez E., Solorzano K., Murillo E., Quiroz A. and Cabeza M. Antiandrogenic effect of 16-substituted, non substituted and D-homopregnane derivatives. Chem. Pharm. Bull. 2000, 48(9), 1249-1255.
- 31) Valencia N. Síntesis de derivados del pregnano con un grupo fenilo en configuración β en C-16 como antiandrógenos potenciales para el tratamiento de cáncer de próstata. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, 1997.
- 32) Ramírez E., Cabeza M., Heuze I., Gutierrez E., Bratoeff E., Membrillo M. and Lira A. Synthesis and pharmacological evaluation of new 16-methyl-pregnane derivatives. Chem. Pharm. Bull. 2002, 50(1), 15-20.
- 33) Bratoeff E., Cabeza M., Flores E., Ramírez E., Quiroz A. Synthesis and pharmacological evaluation of new steroidal 5α -reductase inhibitors. Proc. West. Pharmacol. Soc. 2002, 45, 187-190.
- 34) Ramírez E. Síntesis de 17-alfa-aciloloxi derivados del pregnano con un sustituyente en C-16 β como antiandrógenos. Tesis de doctorado, Facultad de Química, UNAM, 2002.
- 35) Ramírez E. Síntesis de 6-halo-16- β -metil-17 α -valeroloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona como antiandrógenos. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM, 1998.
- 36) Cabeza M., Gutierrez E., Miranda R., Heuze I., Bratoeff E., Flores G., Ramírez E. Synthesis and pharmacological effect of 6-halo-16- β -methyl-pregnane derivatives. Proc. West. Pharmacol. Soc. 1998, 41, 1-3.
- 37) Cabeza M., Gutierrez E., Miranda R., Heuze I., Bratoeff E., Flores G., Ramírez E. Androgenic and antiandrogenic effect of progesterone derivatives with different halogen as substituents of the C-6 position. Steroids. 1999, 64, 413-41.

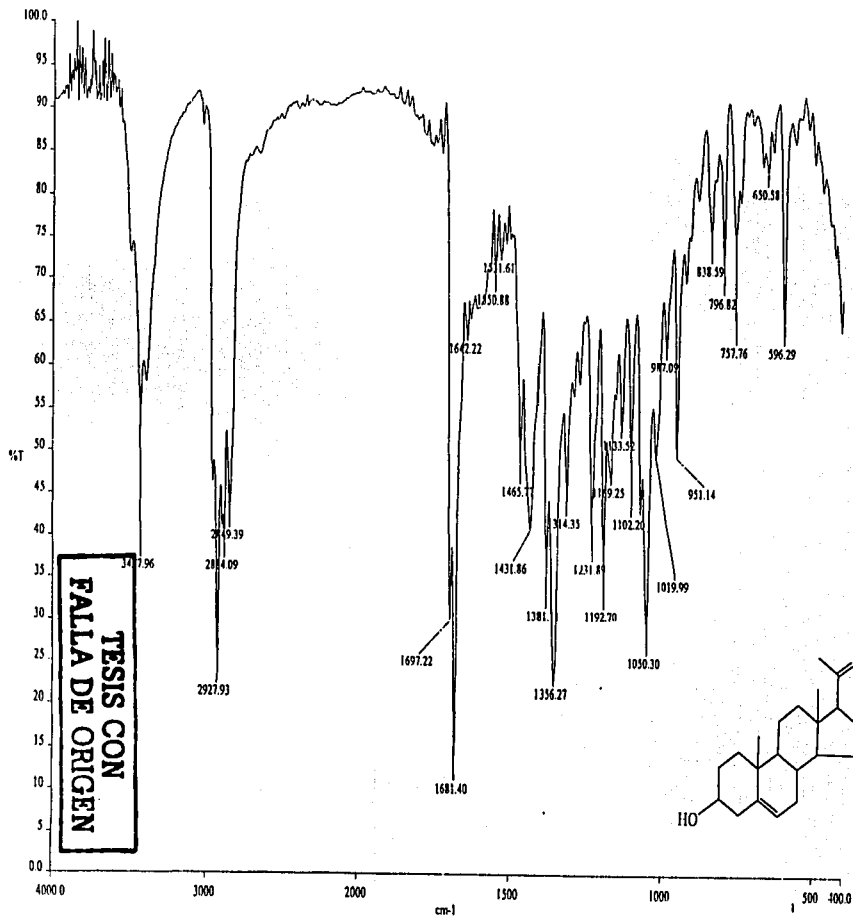
- 38) Cabeza M., Bratoeff E., Flores G., Ramírez E. 5-alpha-reductase inhibitory and antiandrogenic activities of novel steroids in hamster seminal vesicles. Chem. Pharm. Bull. 2002, 50(11), 1447-1452.
- 39) Rivera F. Síntesis de derivados de 17 α -acetoxi-6metilen-4-pregnen-3,20-diona como antiandrógenos. Tesis de licenciatura, Facultad de Química, UNAM, 2002.
- 40) Cabeza M., Heuze I., Bratoeff E., Ramirez E. And Martínez R. Evaluation of new pregnane derivatives as 5-alpha-reductase inhibitors. Chem. Pharm. Bull. 2001, 49(5), 525-530.
- 41) Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding. *Annal. Biochem.* 1986, 72, 248-254.
- 42) Pretsch Clerc Simon. Spectral Data for Structure Determination of organic compounds. 2a. edición, London.
- 43) Solomons G.T. Organic Chemistry. 3^a. Edición. Ed. Mc Graw Hill.
- 44) March Jerry. Advanced Organic Chemistry, reactions, mechanisms and structure. 2a. Edición, Ed. McGraw Hill, pág. 920
- 45) Bjarte L.; Kaufmann S and Sondheimer F. Synthesis and reactions of 16-oxygenated pregnan-20-one derivatives. *J. Med. Chem.* 1995, 78, 1738-1742.
- 46) Valencia N.; Hamed Abbas and Rachel Mata. Phytotoxic compounds from *prinosciadium watsoni*. *J. Nat. Prod.* 2002, 19.
- 47) Cabeza M., Heuze I., Bratoeff E., Murillo E., Ramírez E. And Lira A. New progesterone esters as 5-alpha-reductase inhibitors. Chem. Pharm. Bull. 2001, 49(9), 1081-1084.

- 48) Yin Donghua, He Yali., Perera Minolli., Hong Seoung., Kyrkovsky Leonid. And Miller D. Key structural features of nonsteroidal ligands for binding and activation of the androgen receptor. *Molecular pharmacology*. 20003, 63, 211-223.
- 49) Eneka K., Katzenellenbogen J., and Katzenellenbogen B. S. Determinants of ligand specificity of estrogen receptor modulators based on 4-(trifluoromethyl)-2(1H)-pyrrolidino [3,2-g] quinoline. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 1998, 8, 745-750.
- 50) Tucker H., Crook J.W. and Chesterson G. Nonsteroidal antiandrogens. Synthesis and structure-activity relationships of 3-substituted derivatives of 2-hydroxipropioanilides. *J. Med. Chem.* 1988, 31, 954-959.

VIII. ANEXO EXPERIMENTAL

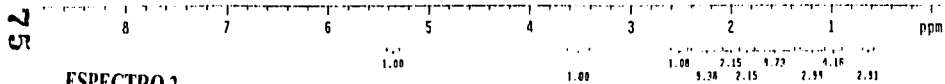
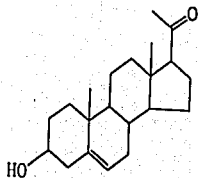
ESPECTRO 1	IR	3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona. 1
ESPECTRO 2	RMN- ¹ H	3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona. 1
ESPECTRO 3	RMN- ¹³ C	3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona. 1
ESPECTRO 4	DEPT- ¹³ C	3 β -hidroxi-5-pregnen-20-ona. 1
ESPECTRO 5	IR	3 β -acetoxi-5-pregnen-20-ona. 2
ESPECTRO 6	RMN- ¹ H	3 β -acetoxi-5-pregnen-20-ona. 2
ESPECTRO 7	RMN- ¹³ C	3 β -acetoxi-5-pregnen-20-ona. 2
ESPECTRO 8	DEPT- ¹³ C	3 β -acetoxi-5-pregnen-20-ona. 2
ESPECTRO 9	IR	3 β -acetoxi-5 α -6 α -epoxi-pregnan-20-ona. 3
ESPECTRO 10	RMN- ¹ H	3 β -acetoxi-5 α -6 α -epoxi-pregnan-20-ona. 3
ESPECTRO 11	RMN- ¹³ C	3 β -acetoxi-5 α -6 α -epoxi-pregnan-20-ona. 3
ESPECTRO 12	DEPT- ¹³ C	3 β -acetoxi-5 α -6 α -epoxi-pregnan-20-ona. 3
ESPECTRO 13	IR	3 β -acetoxi-5 α -hidroxi-pregnan-6,20-diona. 4
ESPECTRO 14	RMN- ¹ H	3 β -acetoxi-5 α -hidroxi-pregnan-6,20-diona. 4
ESPECTRO 15	RMN- ¹³ C	3 β -acetoxi-5 α -hidroxi-pregnan-6,20-diona. 4
ESPECTRO 16	DEPT- ¹³ C	3 β -acetoxi-5 α -hidroxi-pregnan-6,20-diona. 4
ESPECTRO 17	IR	3 β -acetoxi-4-pregnen-6,20-diona. 5
ESPECTRO 18	UV	3 β -acetoxi-4-pregnen-6,20-diona. 5
ESPECTRO 19	RMN- ¹ H	3 β -acetoxi-4-pregnen-6,20-diona. 5
ESPECTRO 20	RMN- ¹³ C	3 β -acetoxi-4-pregnen-6,20-diona. 5
ESPECTRO 21	DEPT- ¹³ C	3 β -acetoxi-4-pregnen-6,20-diona. 5
ESPECTRO 22	IR	3 β -hidroxi-4-pregnen-6,20-diona. 6
ESPECTRO 23	UV	3 β -hidroxi-4-pregnen-6,20-diona. 6

ESPECTRO 24	RMN-¹H	3β-hidroxi-4-pregnen-6,20-diona. 6
ESPECTRO 25	RMN-¹³C	3β-hidroxi-4-pregnen-6,20-diona. 6
ESPECTRO 26	DEPT-¹³C	3β-hidroxi-4-pregnen-6,20-diona. 6
ESPECTRO 27	IR	3β-(5-clorovaleroiloxi)-4-pregnen-6,20-diona. 7
ESPECTRO 28	RMN-¹H	3β-(5-clorovaleroiloxi)-4-pregnen-6,20-diona. 7
ESPECTRO 29	RMN-¹³C	3β-(5-clorovaleroiloxi)-4-pregnen-6,20-diona. 7
ESPECTRO 30	DEPT-¹³C	3β-(5-clorovaleroiloxi)-4-pregnen-6,20-diona. 7
ESPECTRO 31	EMIE	3β-(5-clorovaleroiloxi)-4-pregnen-6,20-diona. 7
ESPECTRO 32	IR	3β-(5-bromovaleroiloxi)-4-pregnen-6,20-diona. 8
ESPECTRO 33	RMN-¹H	3β-(5-bromovaleroiloxi)-4-pregnen-6,20-diona. 8
ESPECTRO 34	RMN-¹³C	3β-(5-bromovaleroiloxi)-4-pregnen-6,20-diona. 8
ESPECTRO 35	DEPT-¹³C	3β-(5-bromovaleroiloxi)-4-pregnen-6,20-diona. 8
ESPECTRO 36	EMIE	3β-(5-bromovaleroiloxi)-4-pregnen-6,20-diona. 8



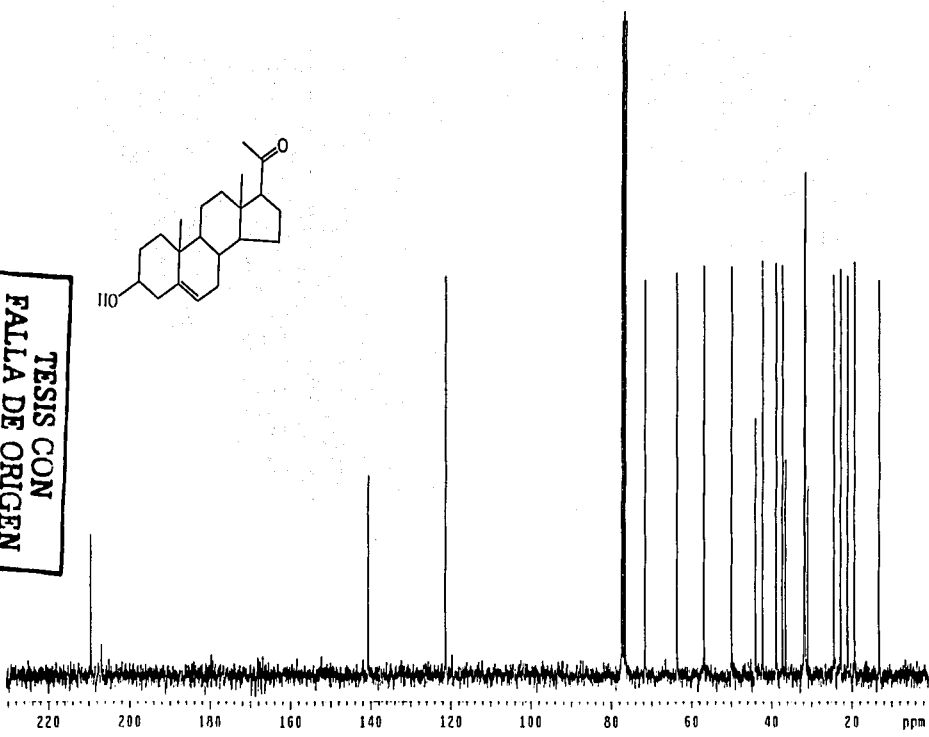
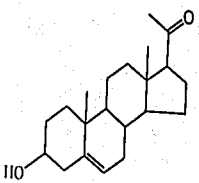
ESPECTRO 1

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

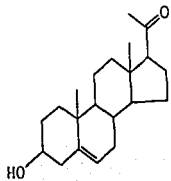


ESPECTRO 2

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN



ESPECTRO 3



DH3 carbons



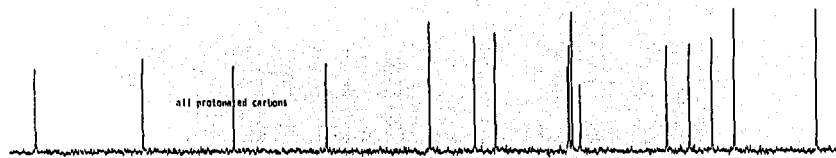
DH2 carbons



DH1 carbons

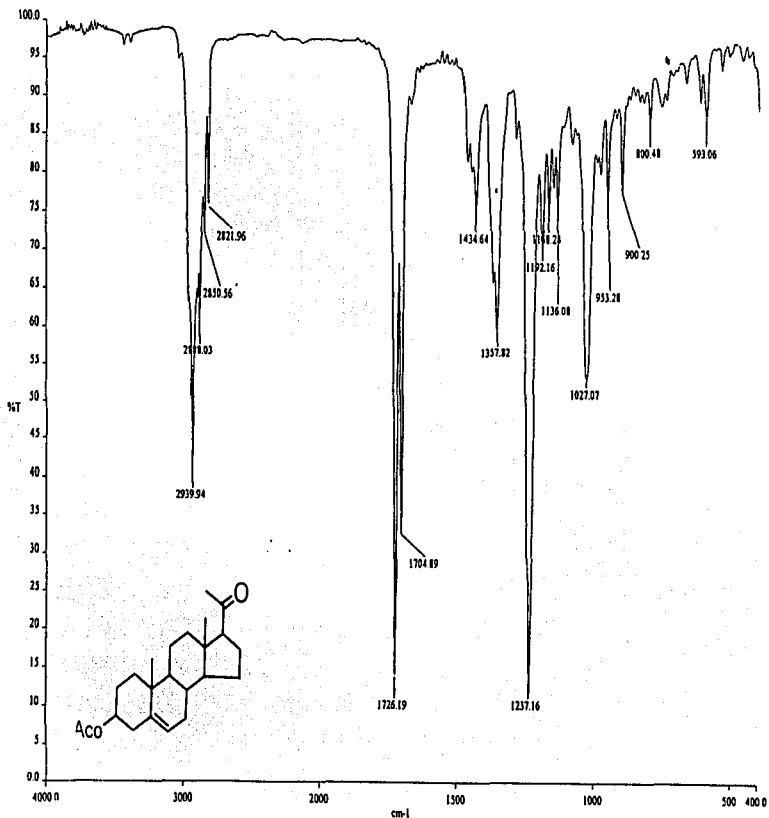


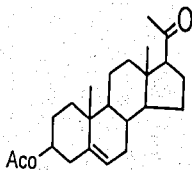
all protonated carbons



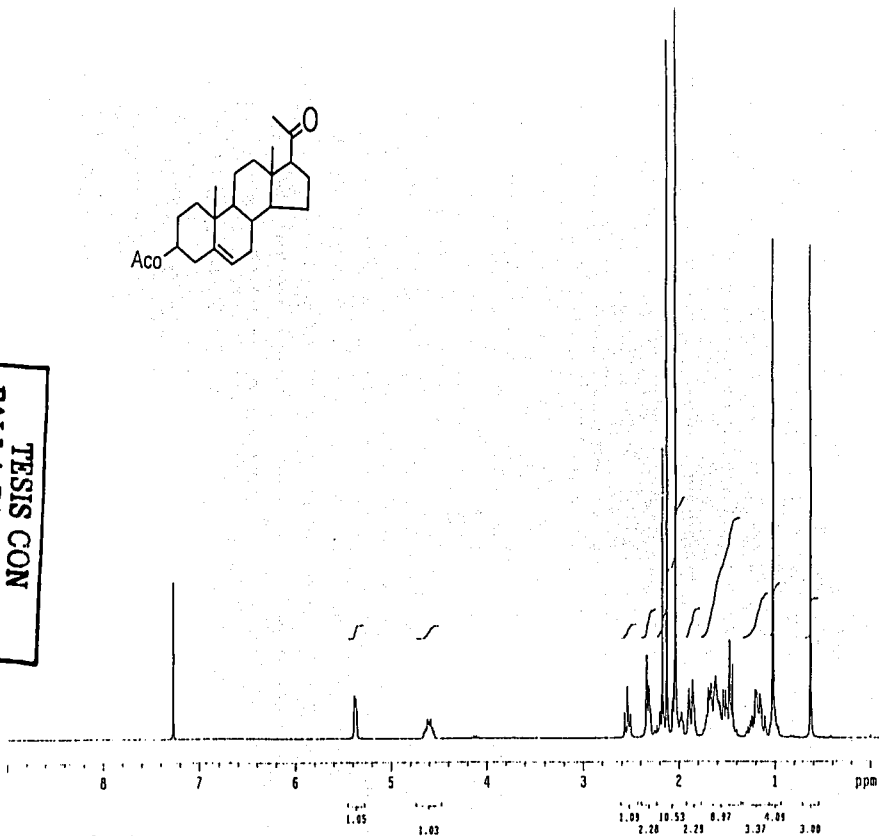
ESPECTRO 4

FALIA DE UNICEN

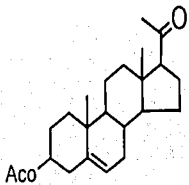




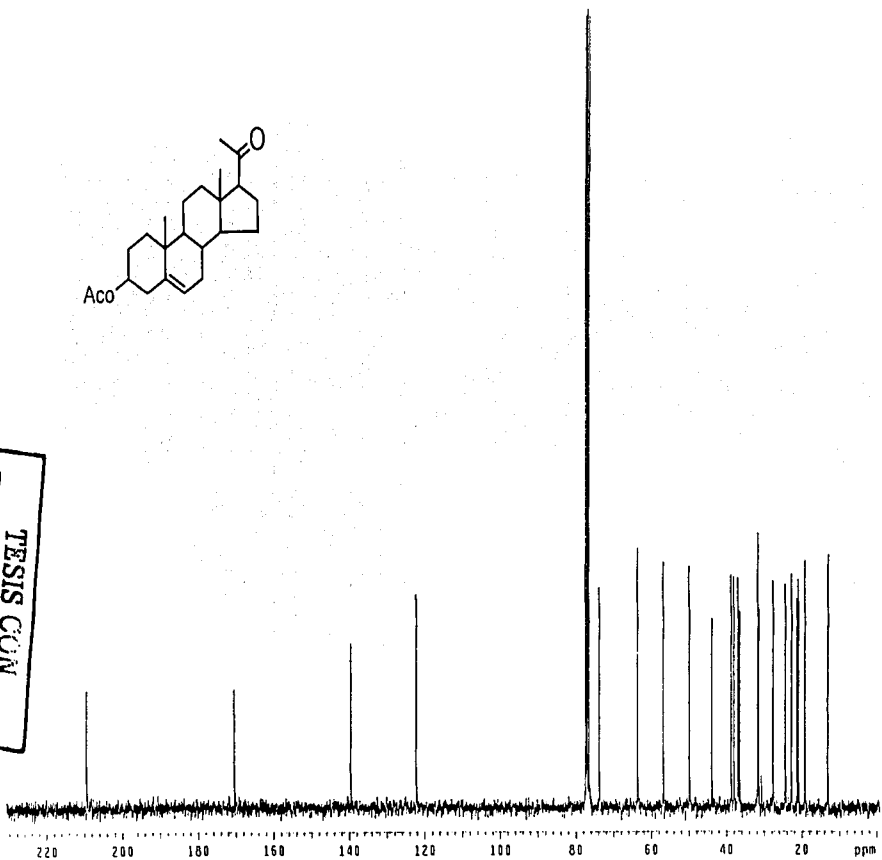
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



ESPECTRO 6

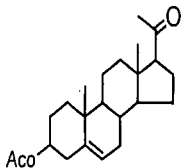


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



80

ESPECTRO 7



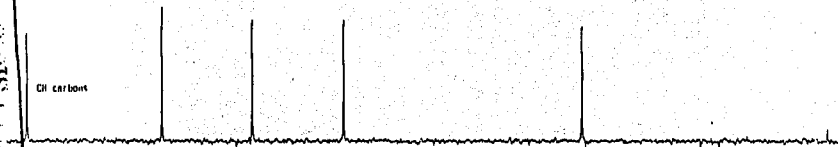
CH₃ carbons



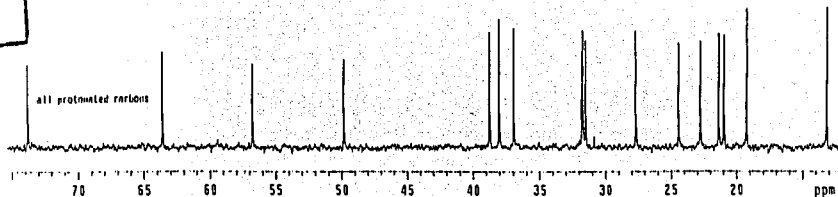
CH₂ carbons



CH carbons



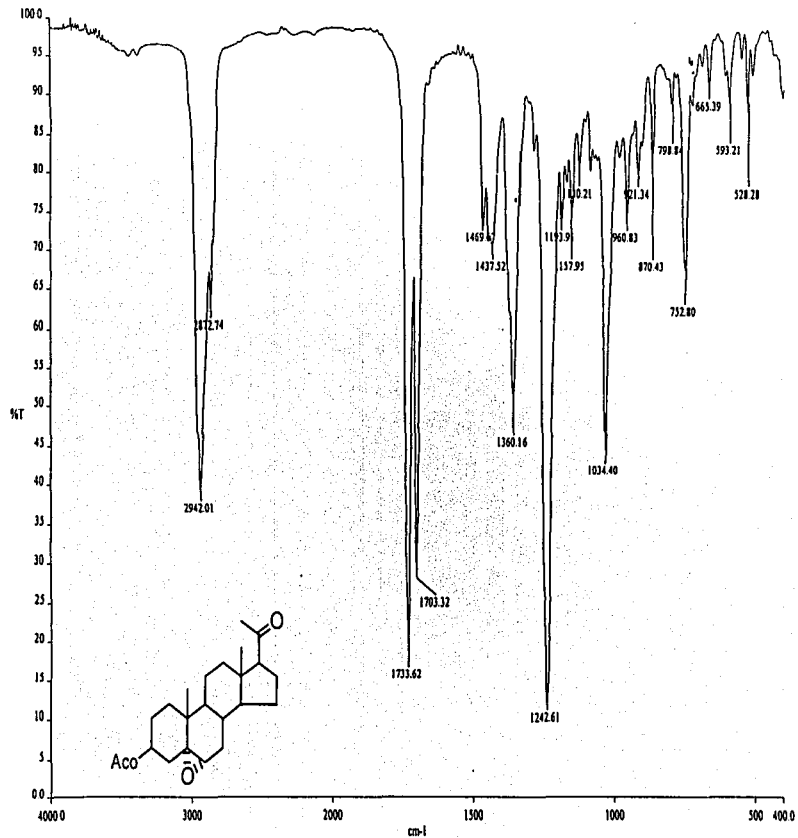
all protonated carbons



81.

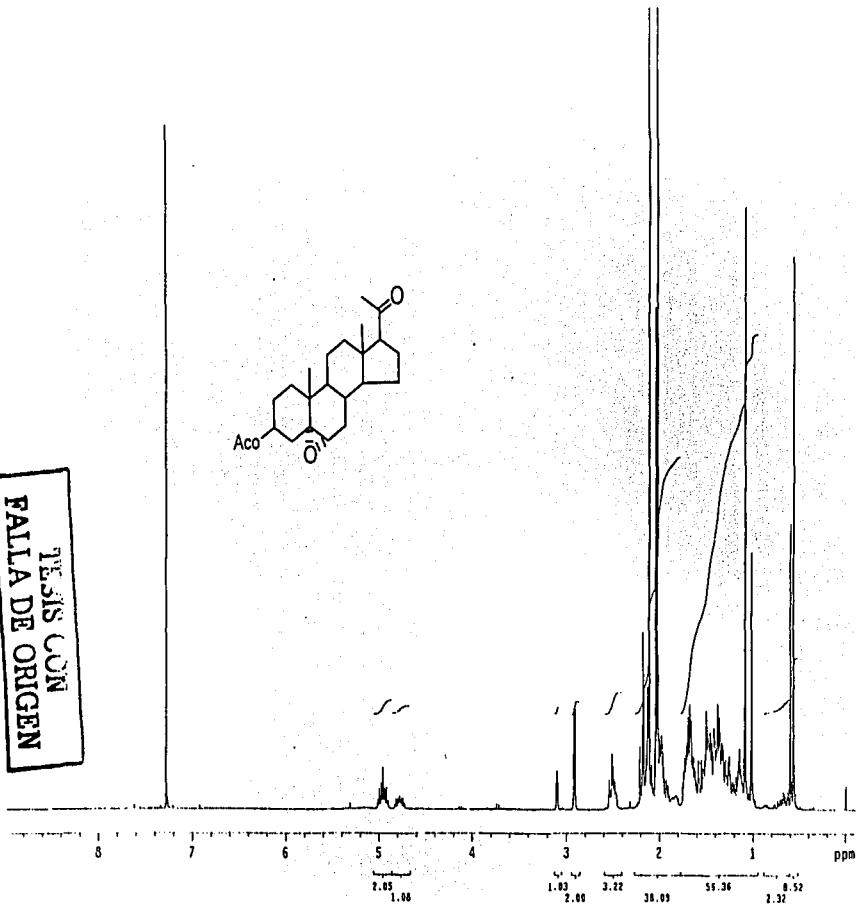
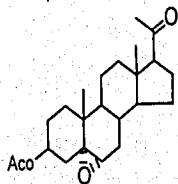
ESTRIS CON
FALTA DE ORIGEN

ESPECTRO 8



ESPECTRO 9

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



7.85
1.08

1.83
2.00

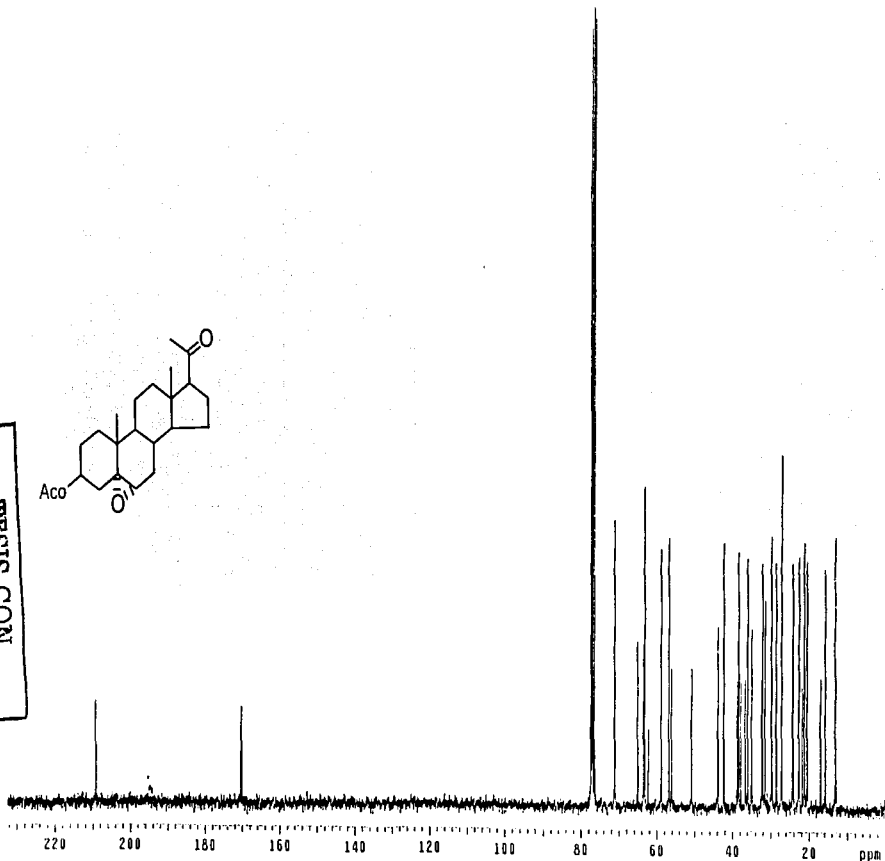
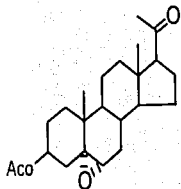
3.22
38.03

51.34

8.52
2.37

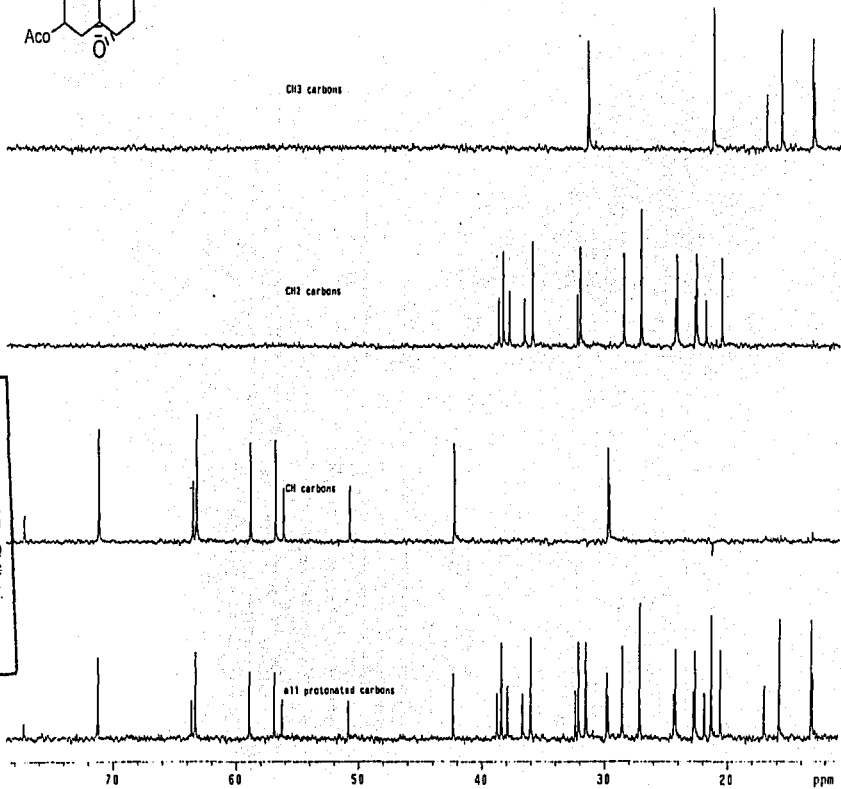
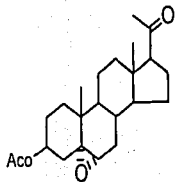
ESPECTRO 10

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



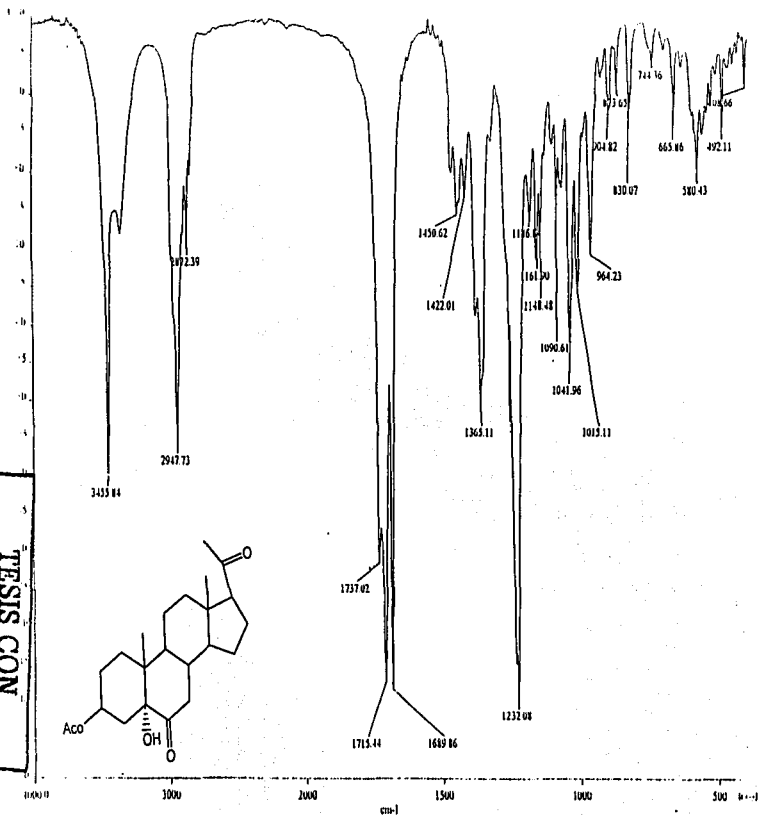
84

ESPECTRO 11



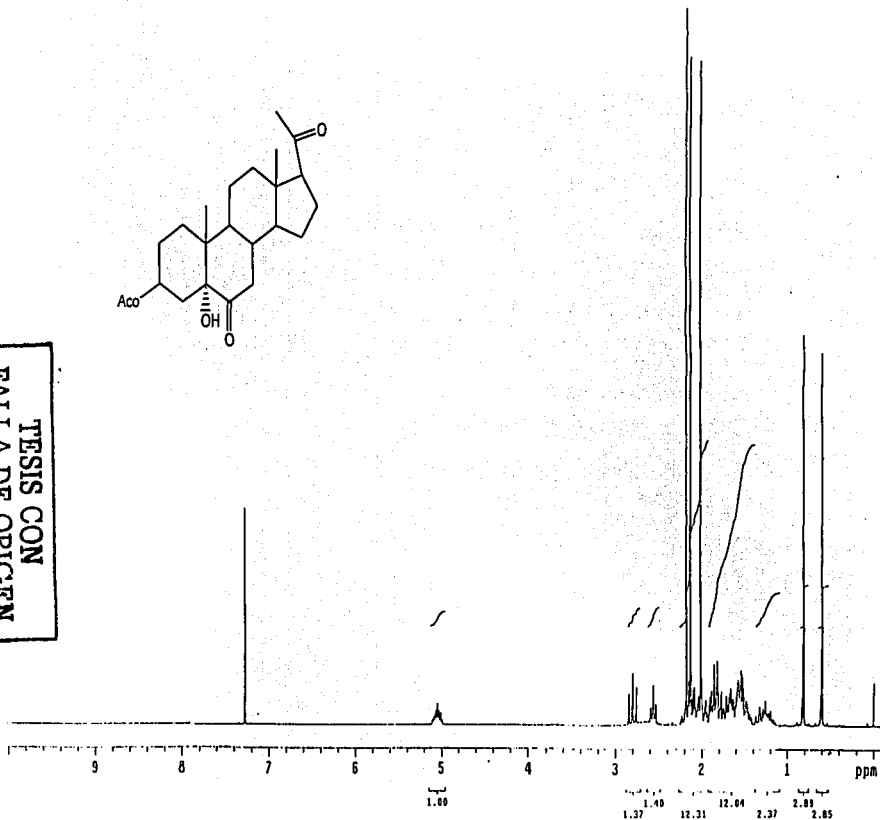
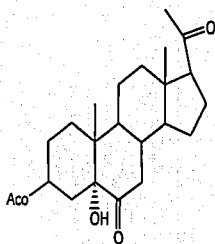
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

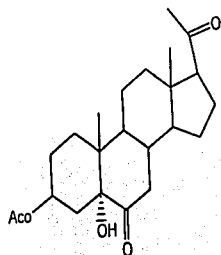
TESIS CON
FALTA DE ORIGEN



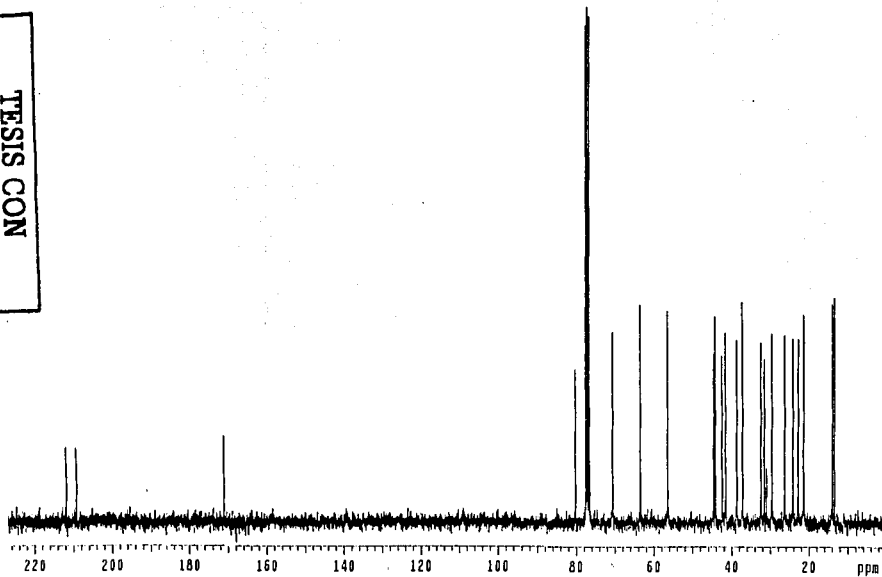
ESPECTRO 13

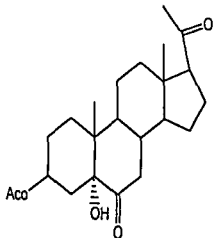
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN





TESIS CON
FALTA DE ORIGEN





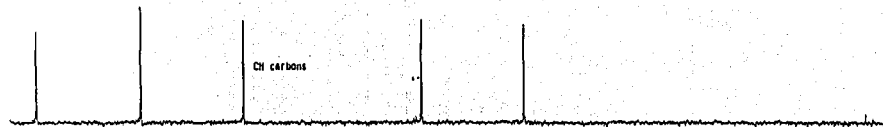
CH3 carbons



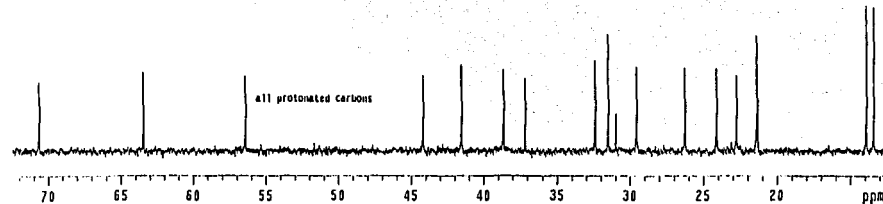
CH2 carbons



CH carbons



all protonated carbons



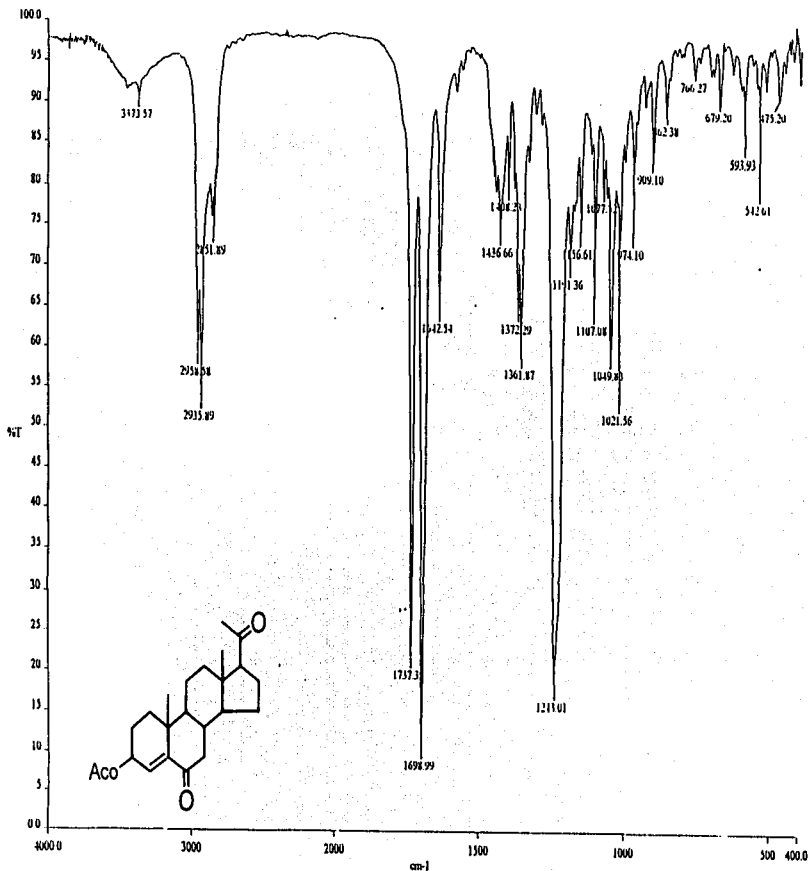
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

89

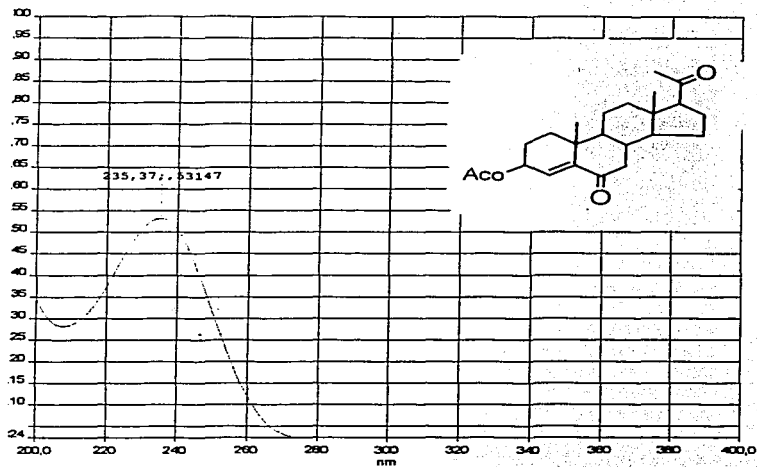
ESPECTRO 16

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

90



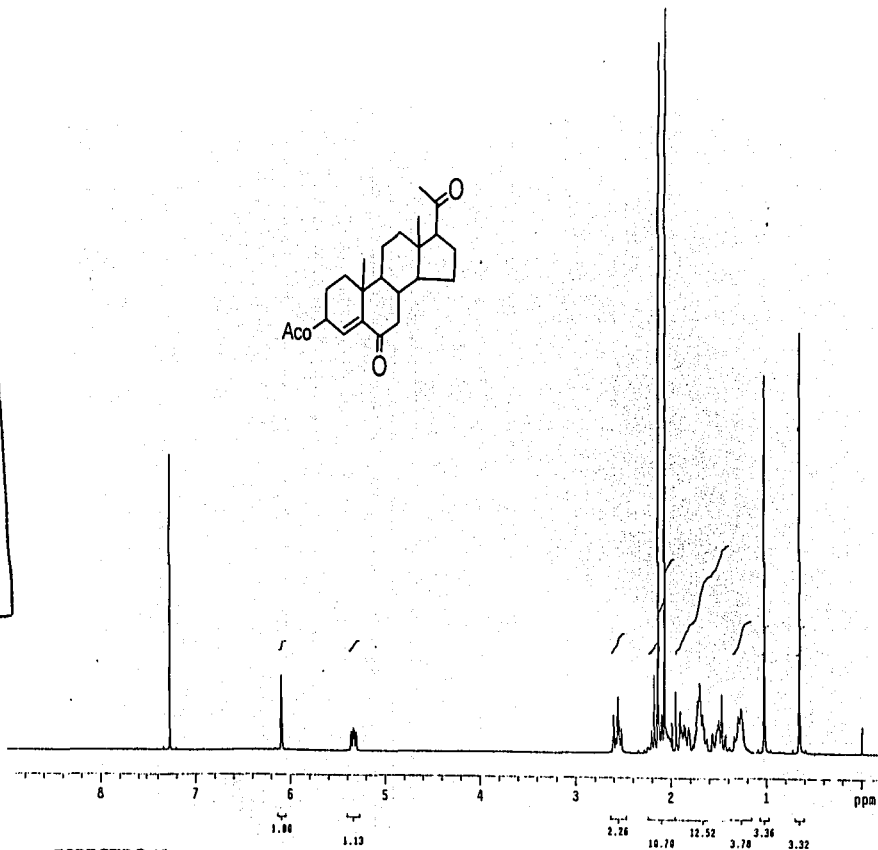
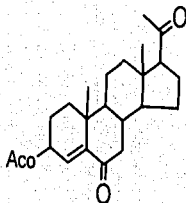
ESPECTRO 17



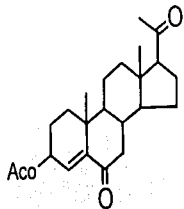
ESPECTRO 18

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

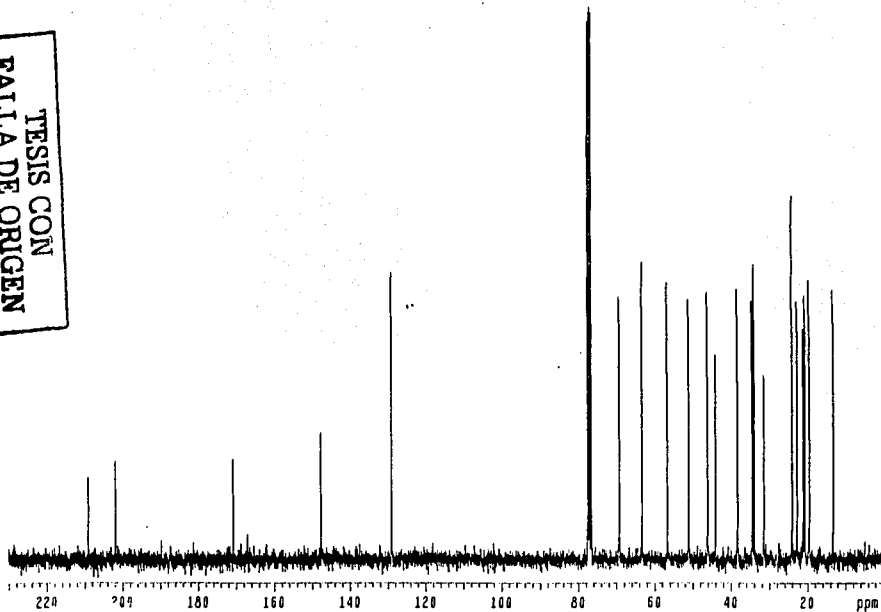
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



ESPECTRO 19

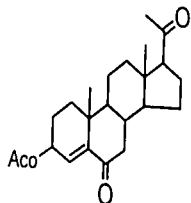


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



93

ESPECTRO 20



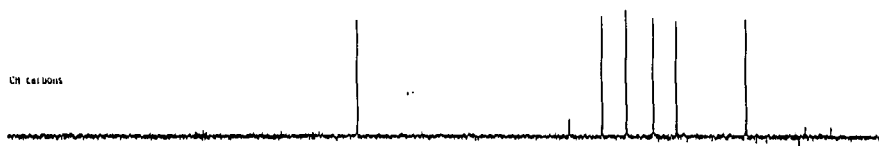
CH₃ carbons



CH₂ carbons



CH carbons



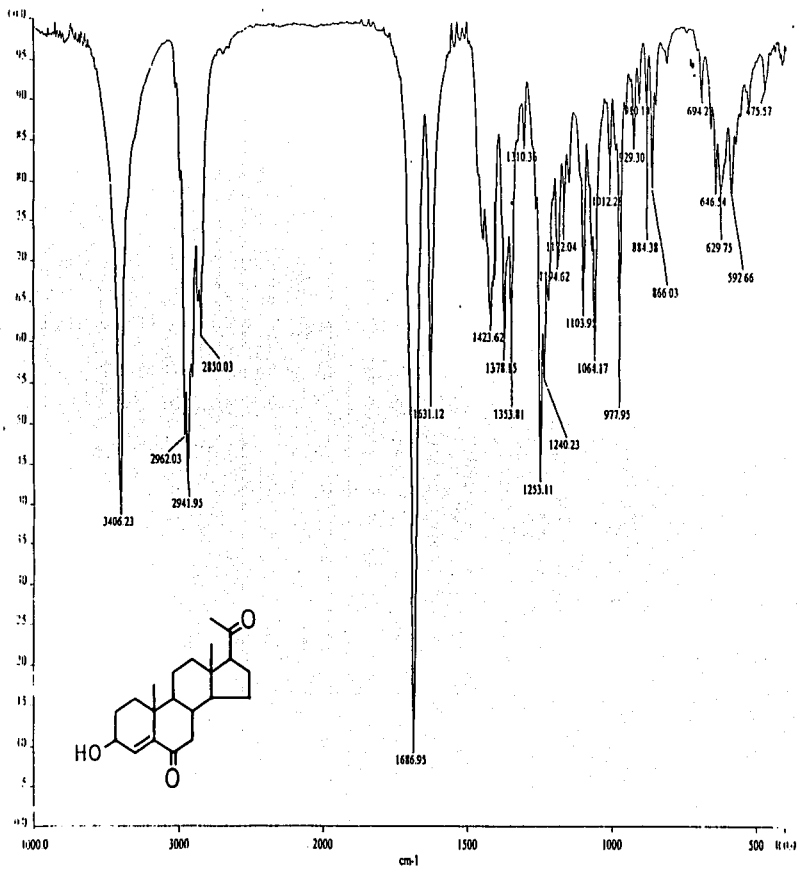
all protons carbons



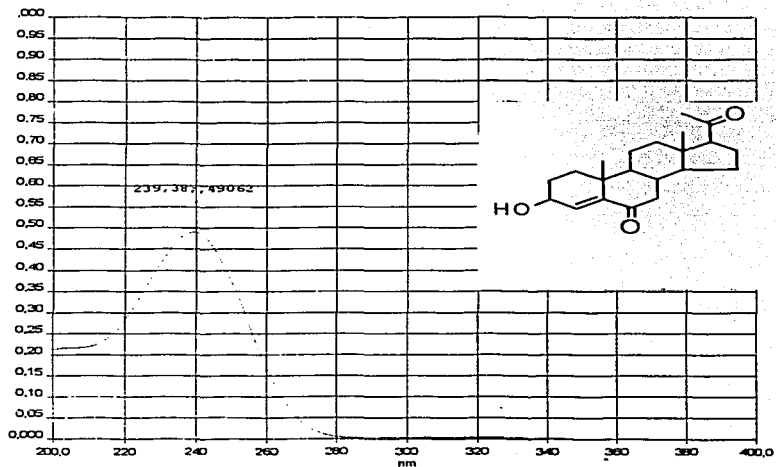
ESPECTRO 21

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

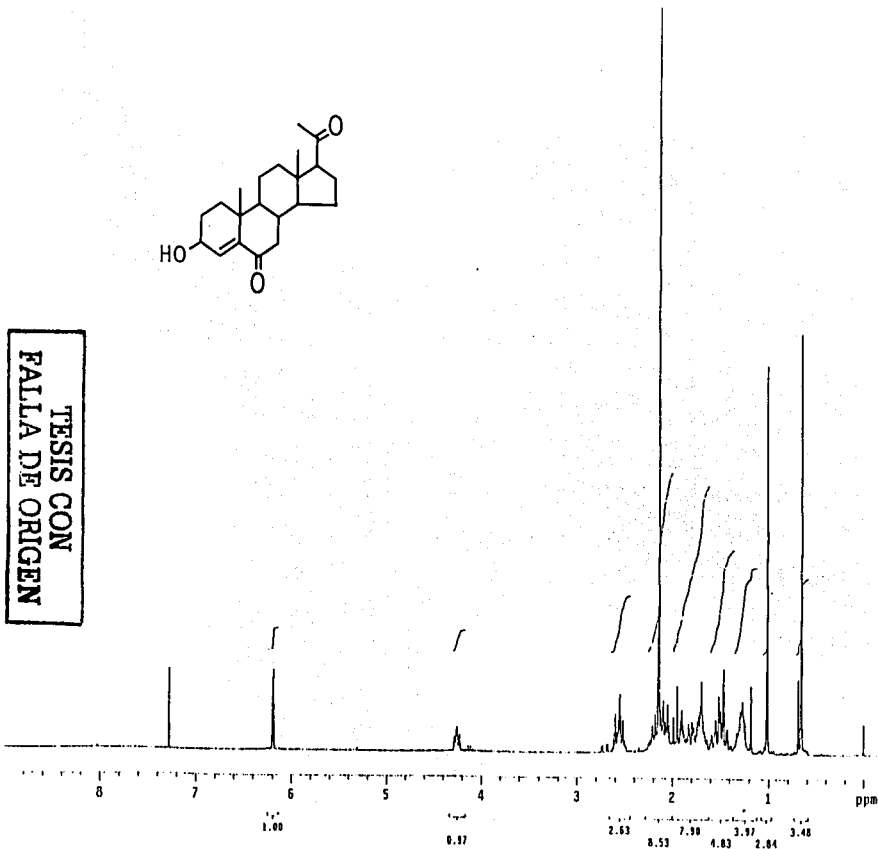
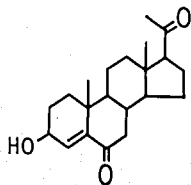


ESPECTRO 22

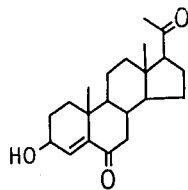


ESPECTRO 23

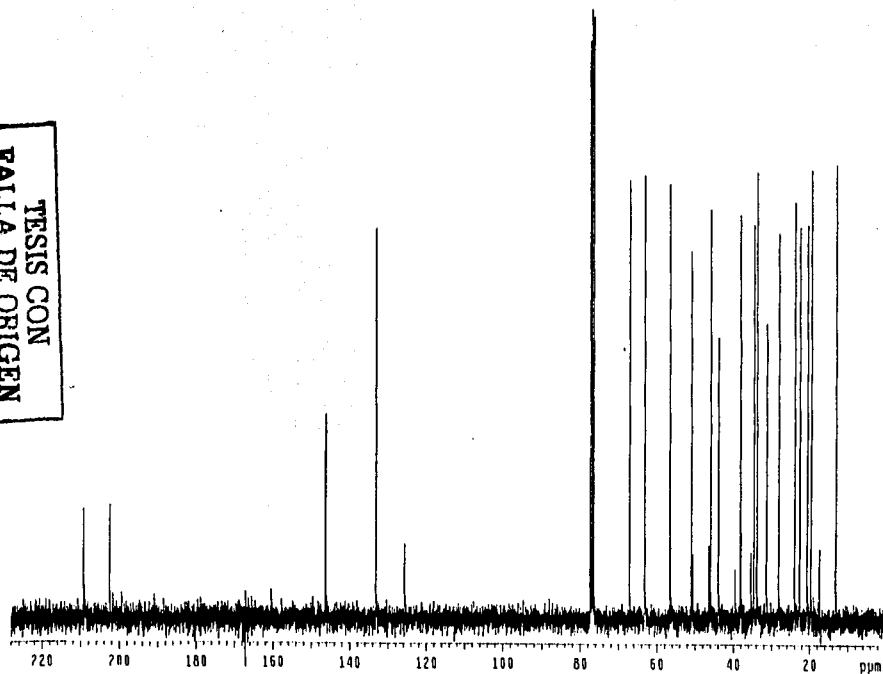
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

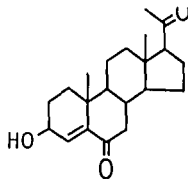


TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN





CH₃ carbons



CH₂ carbons



CH carbons



protonated carbons



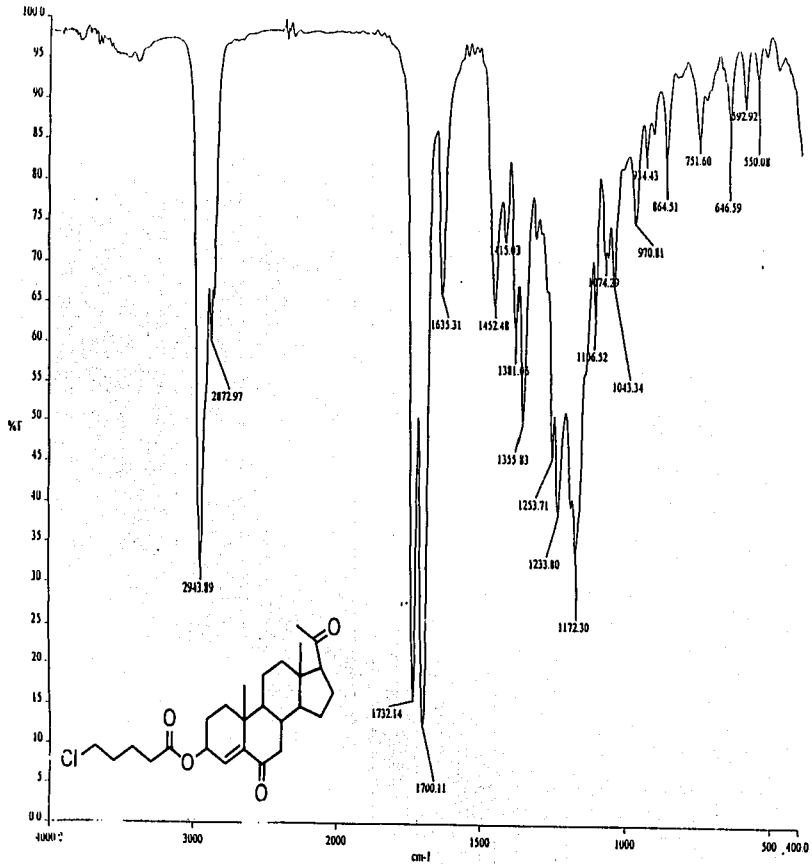
TESIS CON
 FALTA DE ORIGEN

99

200 180 160 140 120 100 80 60 40 20 ppm

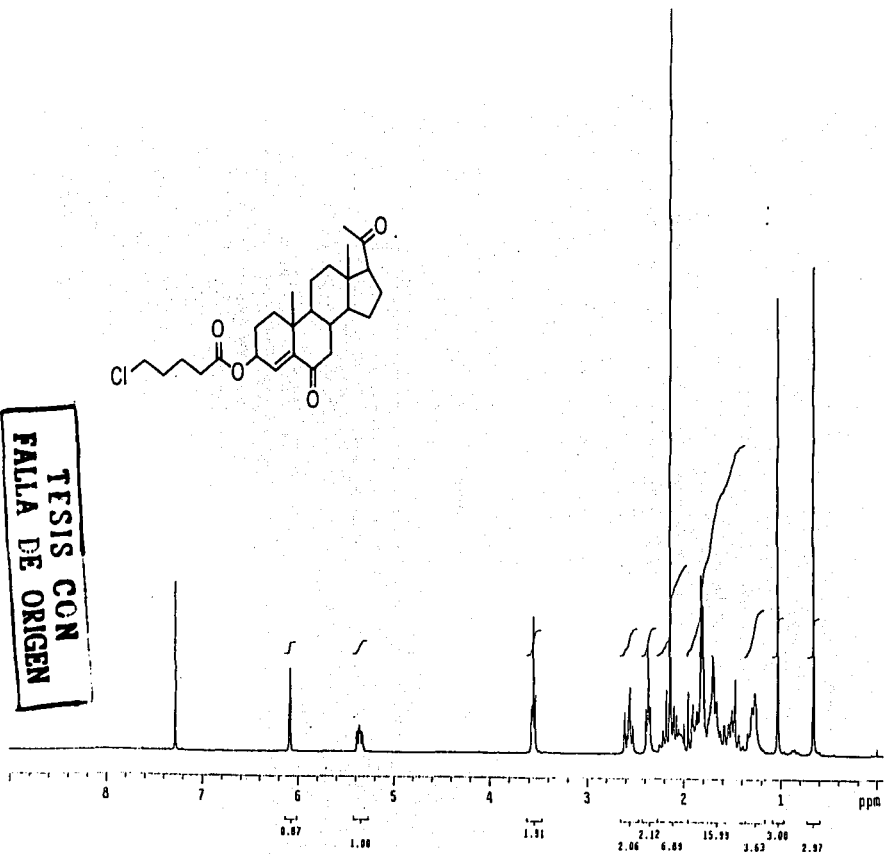
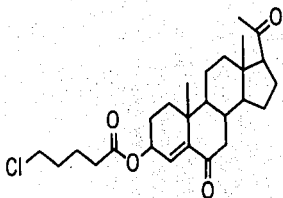
ESPECTRO 26

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

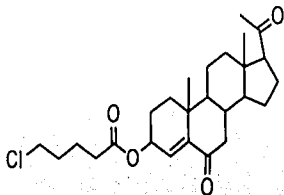


ESPECTRO 27

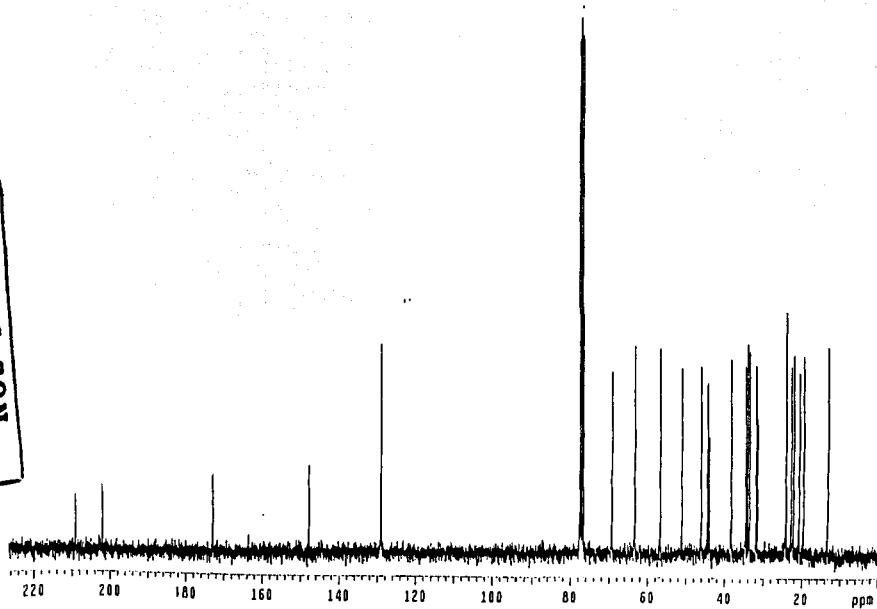
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



ESPECTRO 28

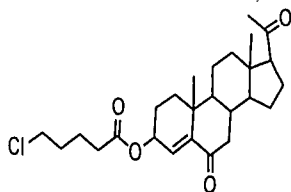


TFSIS CON
VIA INTERNET



ESPECTRO 29

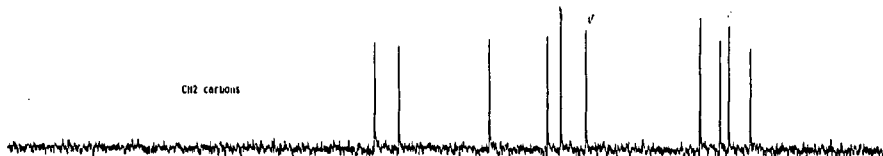
102



CH3 carbons



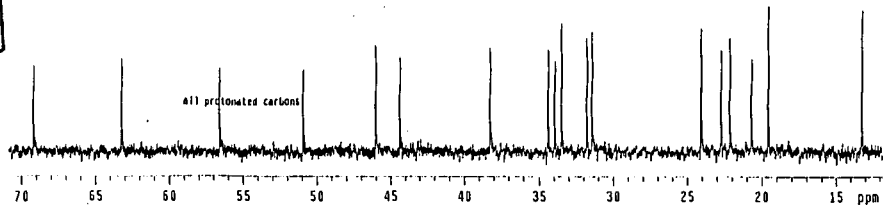
CH2 carbons



CH carbons



all protonated carbons



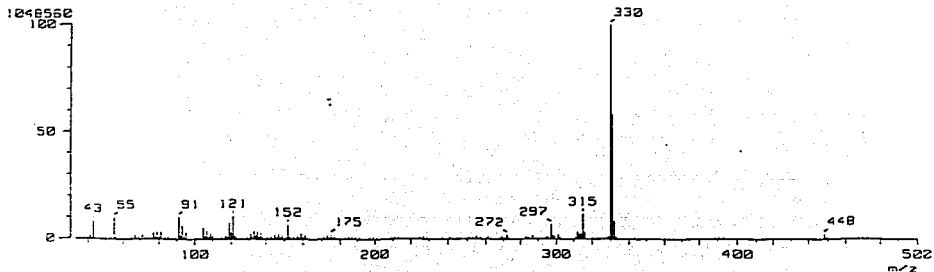
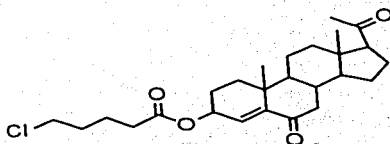
70 65 60 55 50 45 40 35 30 25 20 15 ppm

ESPECTRO 30

TESIS CON
FALTA DE ORIGEN

303

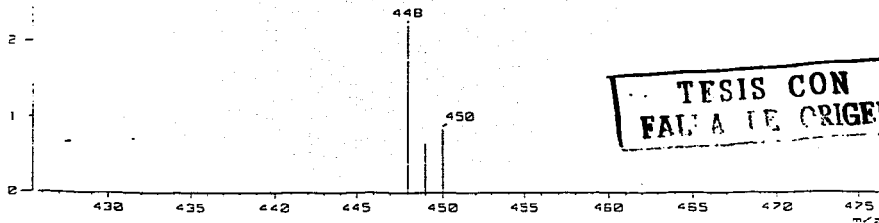
ESPECTRO 31



Mass Spectrum]
 RT : 1.11 min
 Ion Mode : EI+
 29979

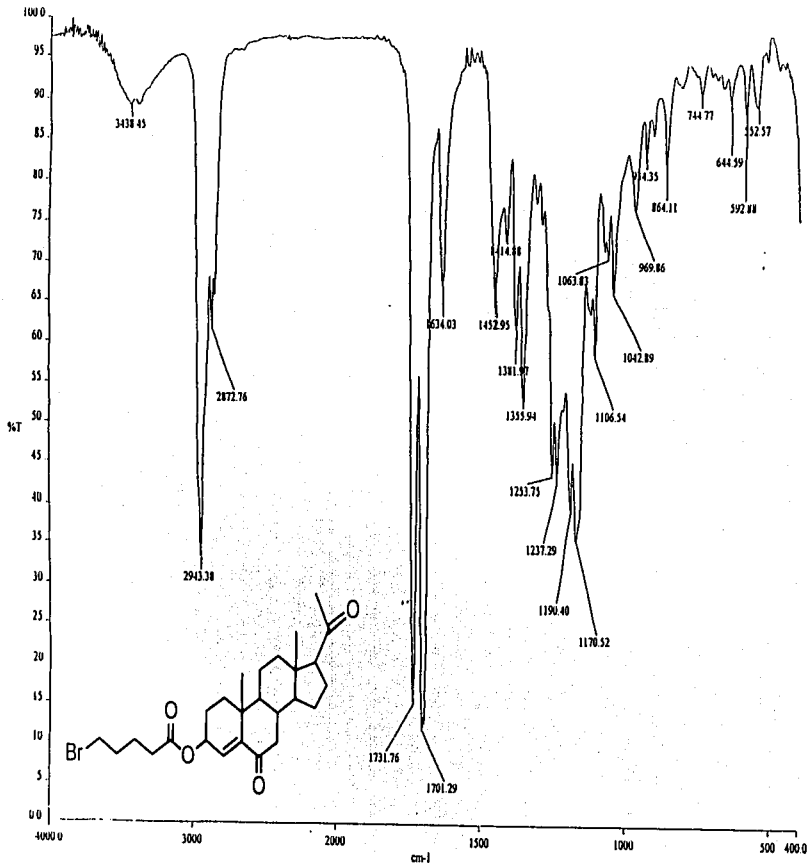
Scan# : (39,44)-(61,89)
 Int. : 99.73

Temp : 32.7 deg.C



TESIS CON
 FALSA ORIGEN

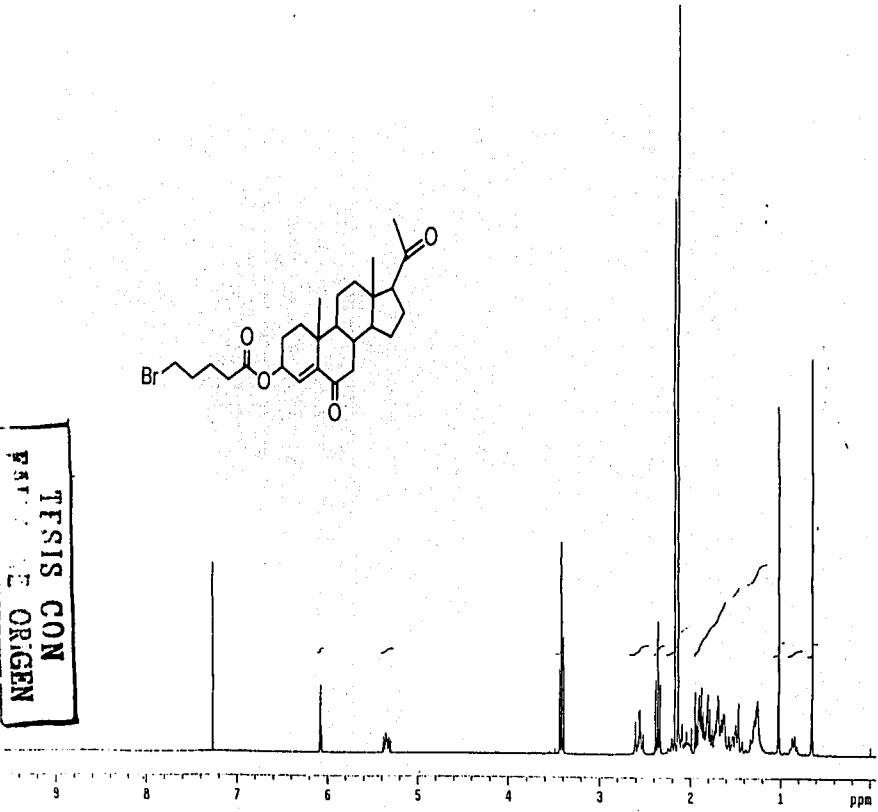
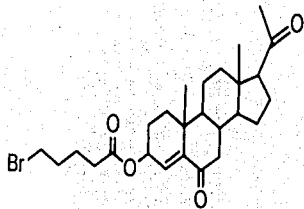
TPSIS CON
FAL A FE ORGEN



ESPECTRO 32

305

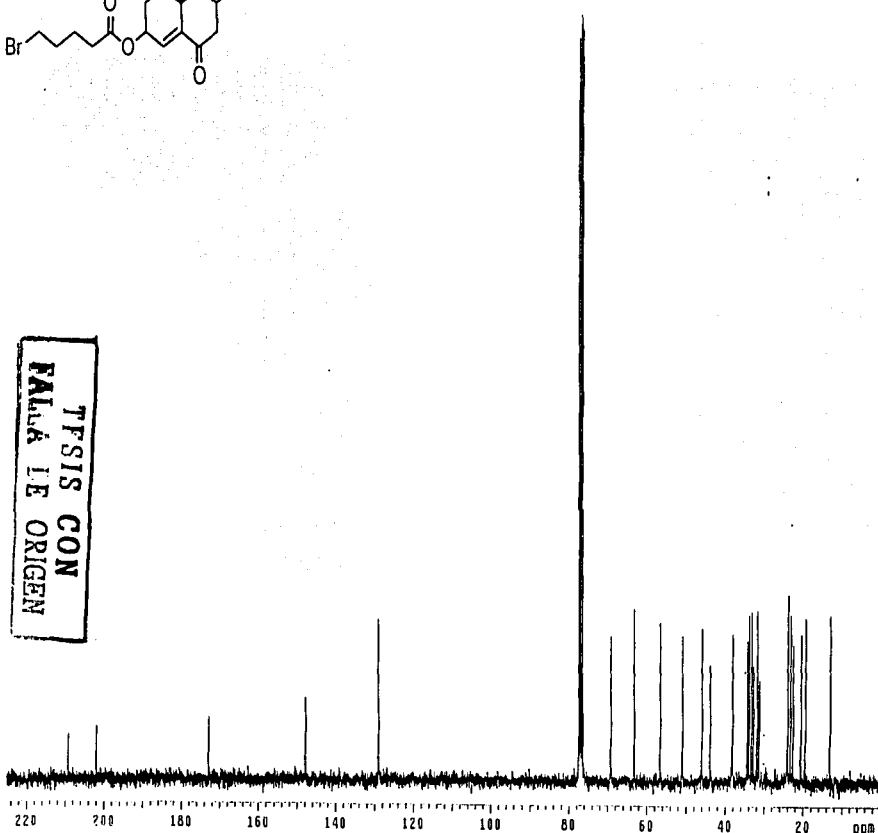
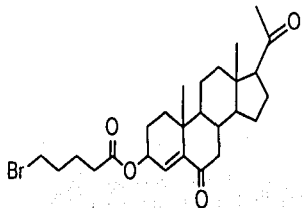
TESIS CON
PARTICIPACION
ORIGEN



106

ESPECTRO 33

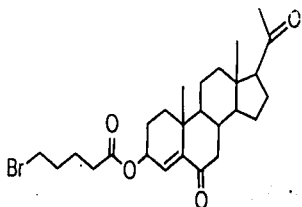
1.00 1.08 2.00 2.26 2.25 7.77 22.21 3.26 3.87



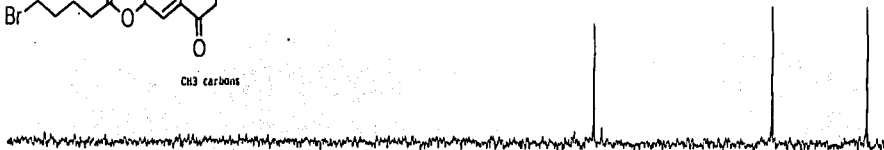
TF SIS CON
FALSA LE ORIGEN

207

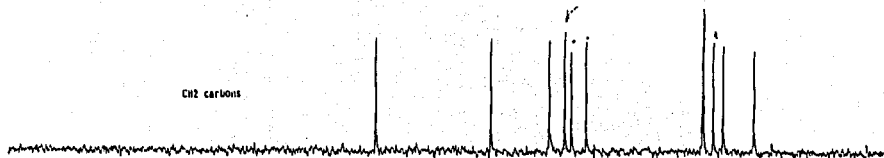
ESPECTRO 34



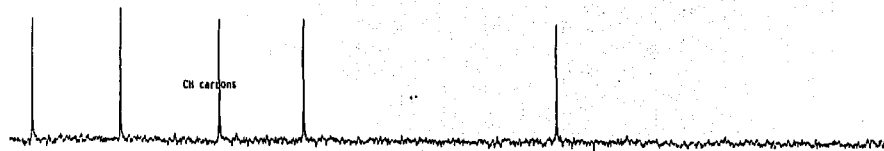
CH3 carbons



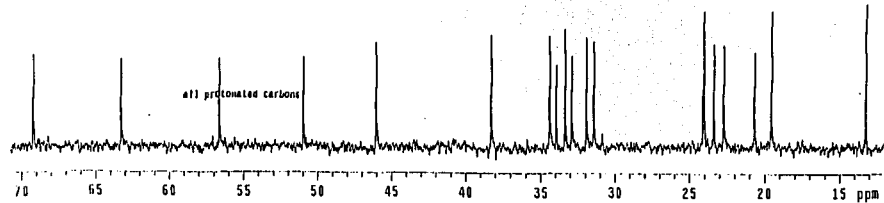
CH2 carbons



CH carbons



all protonated carbons

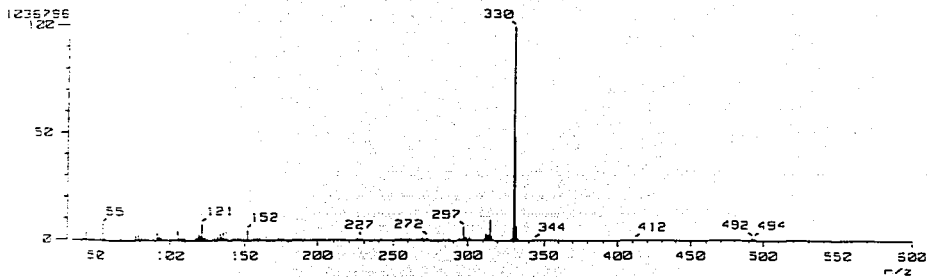
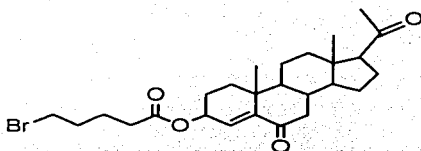


70 65 60 55 50 45 40 35 30 25 20 15 ppm

ESPECTRO 35

80E

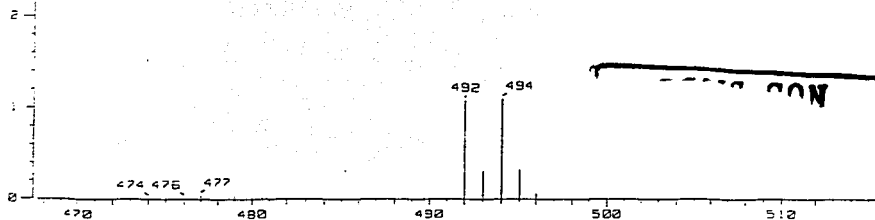
TPSIS CON
PTA 11 11 11



Mass Spectrum]
 Scan : 122 Min
 Mode : EI
 24755

Scan# : (42,48)-(67,83)
 Int. : 98.88

Temp : 30.8 deg.C



NON