

00524
68

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**



FACULTAD DE QUIMICA

**SINTESIS DE ESTERES AROMATICOS DE
PREGNADIONAS.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

CAROLINA GONZALEZ RODRIGUEZ



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.



JURADO ASIGNADO

- Presidente:** PROF. Castillo Bocanegra Rafael.
- Vocal:** PROF. Bratoeff Titeff Eugene Athanas.
- Secretaria:** PROF. Korkowski Pless Irma.
- 1er suplente:** PROF. Hernández Garciadiego Lucia.
- 2do suplente:** PROF. Gómez Garibay Federico.

SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA:

**Laboratorio 125, Edificio E, Departamento de Farmacia,
Facultad de Química, UNAM.**

Y

**Laboratorio de Hormonas G-006, Departamento de Sistemas
Biológicos. UAM, Xochimilco.**

Asesor:
Dr. Eugene Athanas Bratoeff Titeff.

Supervisor Técnico:

Dra. Elena Guadalupe Ramírez López.

Sustentante:
Carolina González Rodríguez.

AGRADECIMIENTOS Y DEDICATORIAS

A mi madre Rosa María Rodríguez por el apoyo incondicional, su tiempo y amor que siempre me brindó para alcanzar mi meta, a mi hijo por el tiempo que no estuve con él y el amor que le tengo, a mi esposo Jesús por su comprensión y ayuda económica, a mis hermanos por su apoyo, a mi padre y a todos mis tíos (AR) y parientes por sus palabras de lucha y paciencia para ver realizado mi sueño.

A mi abuelita Carolina Piña que me ayudo mucho en mi infancia y que en paz descanse.

A todos mis amigos, conocidos y compañeros con los cuales conviví dentro y fuera de la facultad, así como a mis mejores amigas de toda la vida tanto de la secundaria como de la preparatoria.

A mis compañeros del laboratorio 125 que me ayudaron y apoyaron en momentos de dudas y decaídas, por sus palabras de aliento y consuelo.

A la Dra. Elena por su amistad, orientación y conocimientos que en todo momento me brindó.

Al Dr. Eugene Bratoeff por su confianza y sabiduría que en todo momento me brindó así como sus palabras de ánimos.

A la convivencia y momentos de mucha alegría y cordialidad que se vivieron en el laboratorio que permitieron un ambiente sano y con muchas ganas de trabajar, así como al personal de laboratorio Sra. Elva Solares por su apoyo y servicio.

A la USAI por la realización de la espectroscopia de UV, IR, RMN ¹H, RMN ¹³C Y LA EM.

A DGAPA que a través del proyecto IN200301 otorgo el apoyo financiero para la realización de este trabajo de investigación.

LA PARTE QUÍMICA DE ESTA TESIS SE REALIZO EN EL LABORATORIO 125, EDIFICIO E DE LA FACULTAD DE QUÍMICA UNAM, BAJO LA SUPERVISIÓN DEL Dr. EUGENE BRATOEFF.

LA EVALUACIÓN BIOLÓGICA DEL PRESENTE TRABAJO SE REALIZÓ EN EL LABORATORIO DE HORMONAS (G-006) DEL DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA CAMPUS XOCHIMILCO, BAJO LA SUPERVISIÓN DE LA DRA. MARISA CABEZA EN EL PROYECTO G33450-M DE CONACYT QUE GRACIAS AL PROYECTO DE BECAS BRINDO EL APOYO ECONÓMICO PARA LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO DE TESIS.

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

NOMBRE: _____

FECHA: _____

FIRMA: _____

D

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	6
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	10
2.1. ESTEROIDES	10
2.1.1. Clasificación de los esteroides.	10
2.1.2. Efectos fisiológicos de los esteroides.	11
2.2. ANDRÓGENOS	13
2.2.1. La testosterona.	14
2.2.2. Mecanismos de acción de la testosterona (T).	14
2.2.3. La enzima 5 α -reductasa.	15
2.2.4. Mecanismo de acción de la enzima 5 α -reductasa.	15
2.3. CÁNCER DE LA PRÓSTATA E HIPERPLASIA PRÓSTATICA BENIGNA (HPB)	17
2.3.1. La próstata.	17
2.3.2. El proceso del cáncer de la próstata.	18
2.3.3. Cáncer de próstata e HPB: ¿Quién tiene el riesgo?	18
2.3.4. Detección del cáncer de próstata e HPB.	19
2.3.4.1. El reconocimiento de los síntomas.	19
2.3.5. Etapas del cáncer de la próstata.	19
2.3.5.1. Preparación para el tratamiento.	20

2.4. ANTIANDRÓGENOS	21
2.4.1. Acción biológica	21
2.4.1.1. Inhibidores de la síntesis de andrógenos (agonistas LH-RH).	21
2.4.1.2. Inhibidores de la enzima 5 α -reductasa.	22
2.4.1.3. Antagonistas de los receptores androgénicos.	22
2.4.2. Síntesis de Antiandrógenos	22
2.4.3. Clasificación química de los antiandrógenos	23
CAPÍTULO 3. OBJETIVOS	25
CAPÍTULO 4. METODOLOGÍA	26
4.1. MATERIALES Y MÉTODO	26
4.2. PARTE EXPERIMENTAL	26
RUTA DE SÍNTESIS	27
<u>3β-HIDROXI-5-PREGNEN-20-ONA (I)</u>	
TABLA 1.1. Características físicas.	28
TABLA 1.2. Datos espectroscópicos experimentales.	
<u>3β-ACETOXI-5-PREGNEN-20-ONA(II)</u>	
TABLA 2.1. Características físicas.	29
TABLA 2.2. Datos espectroscópicos experimentales.	
<u>3β-ACETOXI-5α,6α-EPOXI-PREGNAN-20-ONA(III)</u>	
TABLA 3.1. Características físicas.	31
TABLA 3.2. Datos espectroscópicos experimentales.	

3 β -ACETOXI-5 α -HIDROXIPREGNAN-6-20-DIONA (IV)

TABLA 4.1. Características físicas. 32

TABLA 4.2. Datos espectroscópicos experimentales.

3 β -ACETOXI-4-PREGNEN-6,20-DIONA (V)

TABLA 5.1. Características físicas. 34

TABLA 5.2. Datos espectroscópicos experimentales.

3 β -HIDROXI-4-PREGNEN-6,20-DIONA (VI)

TABLA 6.1. Características físicas. 35

TABLA 6.2. Datos espectroscópicos experimentales. 36

3 β -BENZOILOXI-4-PREGNEN-6,20-DIONA (VII)

TABLA 7.1. Características físicas. 37

TABLA 7.2. Datos espectroscópicos experimentales. 37

3 β -(*p*-TOLUILOXI)-4-PREGNEN-6,20-DIONA (VIII)

TABLA 8.1. Características físicas. 39

TABLA 8.2. Datos espectroscópicos experimentales. 40

CAPÍTULO 5. EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA 42

5.1. Etapa 2: Evaluación biológica de la actividad antiandrónica 42

5.2. Experimentos in vitro: 42

5.2.1. Inhibición de la actividad de la enzima 5 α -reductasa presente en fracción microsomal de vesícula de hámster a pH= 7.0 42

5.2.1.1. Obtención de la fracción microsomal y citosólica de las vesículas seminales de hámster. 42

5.2.2. Determinación de la unión a receptores en citosol de vesícula seminal. 45

5.3. Experimentos <i>in vivo</i>:	45
5.3.1. Efecto del compuesto VII sobre vesícula seminal y próstata de hámster.	45
 CAPÍTULO 6	 47
6.1. DISCUSIÓN DE RESULTADO	47
6.1.1. DISCUSIÓN DE LA PARTE DE EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA	47
6.1.2. DISCUSIÓN DE LA PARTE DE SÍNTESIS	47
6.2. CONCLUSIONES	56
GLOSARIO	57
BIBLIOGRAFÍA	58
ANEXO (ESPECTROSCOPIA)	
<u>3β-HIDROXI-5-PREGNEN-20-ONA (I)</u>	
ESPECTRO 1.IR.	61
ESPECTRO 2.RMN ¹ H.	62
<u>3β-ACETOXI-5-PREGNEN-20-ONA(II)</u>	
ESPECTRO 3.IR.	63
ESPECTRO 4. RMN ¹ H.	64
ESPECTRO 5.EM (IE).	65
<u>3β-ACETOXI-5α,6α-EPOXI-PREGNAN-20-ONA(III)</u>	
ESPECTRO 6.IR.	66
ESPECTRO 7.RMN ¹ H.	67
ESPECTRO 8. EM (IE).	68
<u>3β-ACETOXI-5α-HIDROXIPREGNAN-6-20-DIONA(IV)</u>	
ESPECTRO 9.IR.	69
ESPECTRO 10. RMN ¹ H.	70
ESPECTRO 11. EM (IE).	71

3I-ACETOXI-4-PREGNEN-6,20-DIONA(V)

ESPECTRO 12. IR.	72
ESPECTRO 13. UV.	73
ESPECTRO 14. RMN ¹ H.	74
ESPECTRO 15. EM (IE).	75

3II-HIDROXI-4-PREGNEN-6,20-DIONA(VI)

ESPECTRO 16. IR.	76
ESPECTRO 17. UV.	77
ESPECTRO 18. RMN ¹ H.	78
ESPECTRO 19. EM (IE).	79

3III-BENZOILOXI-4-PREGNEN-6,20-DIONA(VII)

ESPECTRO 20. IR.	80
ESPECTRO 21. UV.	81
ESPECTRO 22. RMN ¹ H.	82
ESPECTRO 23. RMN ¹³ C.	83
ESPECTRO 24. RMN ¹³ C. DEPT.	84
ESPECTRO 25. EM (IE).	85

3IV-(p-TOLUILOXI)-4-PREGNEN-6,20-DIONA(VIII)

ESPECTRO 26. IR.	86
ESPECTRO 27. UV.	87
ESPECTRO 28. RMN ¹ H.	88
ESPECTRO 29. RMN ¹³ C.	89
ESPECTRO 30. RMN ¹³ C. DEPT.	90
ESPECTRO 31. EM (IE).	91

INTRODUCCIÓN

El cáncer se puede definir como un crecimiento tisular patológico originado por una proliferación continua de células anormales que produce una enfermedad por su capacidad para elaborar sustancias con actividad biológica nociva, por sus efectos locales o por su potencial de invasión y destrucción de los tejidos adyacentes o a distancia. El cáncer, que puede originarse a partir de cualquier tipo de célula de los diferentes tejidos del organismo, no es una enfermedad única sino un conjunto de enfermedades con manifestaciones y curso clínico muy variables en función de la localización y de la célula de origen.^{1,2}

Los cánceres que producen mayor mortalidad y son los responsables de más del 55% de todas las muertes por cáncer son los del sistema respiratorio (pulmón) seguidos por los del estómago, próstata, colon y mama, así el cáncer de próstata y la hiperplasia prostática benigna son enfermedades muy comunes en hombres de edad avanzada y está aumentando su incidencia en jóvenes.^{1,2}

El cáncer surge cuando las células del tejido empiezan a multiplicarse sin ningún control y progresivamente hasta formar el tumor, el cual si éste no invade los tejidos vecinos y queda circunscrito, generalmente se le conoce como tumor benigno; sin embargo, si el tumor invade tejidos vecinos como los que se encuentran a distancia se le conoce como metástasis y este es maligno.

La alteración más frecuente del cáncer de próstata es el aumento crónico de tamaño, o hipertrofia. Se sabe que aparece en los últimos años de vida y es la causa más habitual de la dificultad para orinar y de la retención de orina.

Por otra parte la hiperplasia prostática benigna se caracteriza por la formación de voluminosos nódulos bien delimitados en la región periuretral de la próstata. Cuando alcanzan un tamaño suficiente estos empiezan a comprimir y estrechar el conducto uretral causando una obstrucción parcial, a veces prácticamente completa³ dificultando la micción y haciendo que el paciente sea más propenso a sufrir infecciones en el tracto urinario.

El cáncer de próstata y la hiperplasia prostática benigna están muy relacionados con un exceso de andrógenos en el organismo. Los andrógenos son las hormonas sexuales masculinas, las cuales se encargan de inducir y mantener las características sexuales secundarias en los varones. Los principales andrógenos son la testosterona y la androsterona, los cuales se encuentran en los testículos y las glándulas suprarrenales, donde se producen, circulan en la sangre y son excretadas en la orina. Iniciándose en la pubertad, la función principal de los andrógenos.

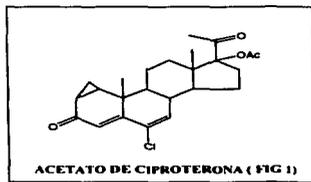
La testosterona se convierte irreversiblemente en dihidrotestosterona (DHT) siendo ésta el andrógeno activo de la testosterona involucrada con el cáncer de próstata e HPB, y se debe a que la DHT se une con mayor afinidad y de manera irreversible al receptor androgénico que la propia testosterona.

Se sabe que al disminuir la concentración de DHT se puede ayudar a controlar de alguna manera la evolución del cáncer, de esta manera surgen nuevas estrategias en la búsqueda de nuevos compuestos sintéticos con posible actividad antiandrogénica ya sea como inhibidores de la enzima 5 α -reductasa o como antagonistas del receptor de andrógenos encaminados a curar enfermedades andrógenas-dependientes.

Existen muchos compuestos no esteroideos que actúan como inhibidores de la enzima 5 α -reductasa, sin embargo la mayoría de los antiandrógenos de interés terapéutico son de tipo esteroidal, debido a que son homólogos de los esteroides de origen natural.^{5,6}

El uso del acetato de ciproterona (Fig. 1, Pág. 7) un antagonista del receptor de andrógenos ha demostrado ser eficaz en el tratamiento del cáncer de próstata y otros padecimientos como el, acné y la calvicie, por lo que su distribución en el mercado es muy amplia. Sin embargo, este fármaco presenta efectos no deseables como es la disfunción eréctil y disminución de la libido que limitan su uso, razón por la cual, existe un gran interés por desarrollar nuevos fármacos con actividad farmacológica y presente el mínimo de efectos posibles.

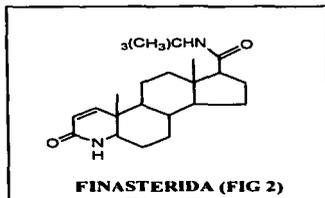
Existe otro esteroide que ha sido ampliamente utilizado para el hombre en el tratamiento de la HPB, la finasterida (Fig. 2, Pág. 8) fármaco cuyo mecanismo de acción es la inhibición de la actividad de la enzima 5 α -reductasa isotipo 2 presente en la glándula prostática.⁷



Así que a pesar de que existe la cirugía y la terapia con radiación para tratar el cáncer local, por sus efectos secundarios y dolorosos actualmente se ha hecho más uso de tratamiento hormonal principalmente en el cáncer de próstata metastático.

Aunque también es bien sabido que el tratamiento hormonal trae consigo efectos secundarios como la impotencia sexual o lesión intestinal.⁴

El análisis de la relación estructura actividad biológica de los antiandrógenos esteroidales como el acetato de ciproterona (Fig. 1, Pág. 7) entre otros, se ha concluido que su actividad se debe a la estructura casi plana de la molécula, conferida por la presencia del 1α - 2α -ciclotometilo en C-1 y C-2 o bien un doble enlace entre estos dos átomos de carbono, presenta casi el mismo efecto, a los dobles enlaces entre los carbonos C-4 y C-5 y a los carbonos C-6 y C-7, al sustituyente electronegativo en C-6 y al grupo α -cetoxi en C-17, así como a los grupos cetónicos en C-3 y C-20.⁹



Por otro lado también se han analizado numerosos esteroides, en los que los anillos A y B han sido modificados, por su capacidad para unirse a los receptores de androgenos^{10, 11} al competir con el grupo Δ^4 -3-ceto de la testosterona (Esquema B, Pág. 16) que se une al sitio activo de la enzima 5α -reductasa, por lo que así también los esteroides derivados de estas moléculas pueden tener actividad como inhibidores de la enzima 5α -reductasa.¹²

Considerando la relación estructura-actividad biológica reportada en la literatura¹³ nos llevó a proponer en el presente trabajo de tesis la síntesis de dos derivados del pregnano que reúnen las siguientes características moleculares:

- ❖ Doble ligadura en los carbonos C-4 y C-5.
- ❖ Grupos cetónicos en C-6 y C-20.

Modificaciones en el anillo A y B:

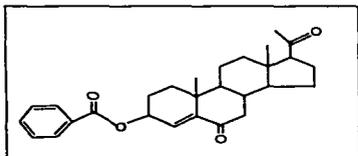
- ❖ Un grupo éster en el carbono C-3.
- ❖ Un grupo carbonilo en el carbono C-6.

Para obtener los compuestos de interés se siguió una misma ruta de síntesis con un total de 6 pasos y una variante en el paso 5 que nos llevó a obtener dos compuestos:

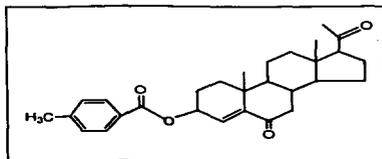
1.- 3β -BENZOILOXI-4-PREGNEN-6,20-DIONA. ESTRUCTURA (A) Y

2.- 3β -(*p*-TOLUILOXI)-4-PREGNEN-6,20-DIONA. ESTRUCTURA (B)

Estos compuestos se evaluaron farmacológicamente como posibles inhibidores de la enzima 5α -reductasa y también en su actividad antiandrogénica. Además los compuestos se caracterizaron por sus propiedades físicas (p.f) y espectroscópicas (UV, IR, RMN ^1H , RMN ^{13}C y EM (IE)).



ESTRUCTURA (A)



ESTRUCTURA (B)

ANTECEDENTES

2.1. ESTEROIDES

Los esteroides son compuestos que tienen en su estructura base el núcleo del ciclopentanoperhidrofenantreno (Fig. 3) se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, tanto en el reino vegetal como en el animal. Incluyen una gran variedad de compuestos de origen natural, entre los que se encuentran, los ácidos biliares, las hormonas sexuales, las sapogeninas entre otros.¹²

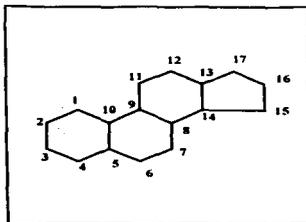


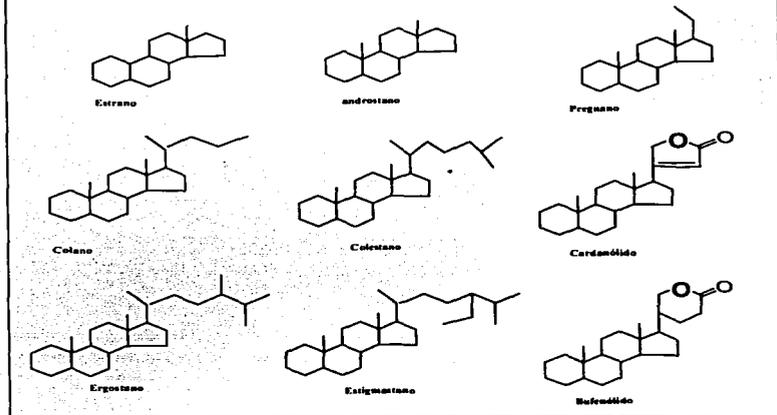
FIG 3. Núcleo del ciclopentanoperhidrofenantreno.

2.1.1. Clasificación de los esteroides

Los esteroides se clasifican de acuerdo a su esqueleto base. Por lo general se encuentran sustituidos en C-10 y C-13 por grupos metilos y un grupo oxhidrilo o carbonilo en C-3.

Para nombrarlos se toma en cuenta la cadena en la posición C-17. Los esqueletos se muestran en el siguiente esquema¹⁵ (Pág. 11).

Esquema A. Clasificación de los esteroides

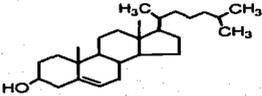
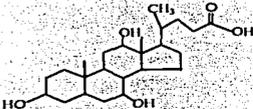
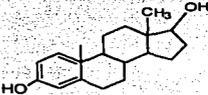
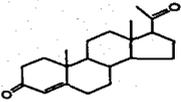


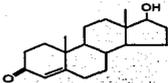
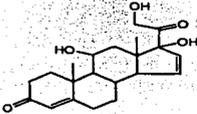
Las hormonas esteroidales se agrupan en cinco categorías: progestinas, glucocorticoides, mineralocorticoides, andrógenos y estrógenos.

2.1.2. Efectos fisiológicos de los esteroides

Los efectos fisiológicos varían considerablemente de unos compuestos a otros, desde actividades de vitaminas hasta hormonas sexuales. En la tabla (a) se muestran algunos ejemplos¹⁵ (Pág. 12).

Tabla a). Ejemplos y los usos de algunos esteroides

 <p>A) COLESTEROL</p>	<p>Constituyente vital de las membranas celulares, precursor de las hormonas esteroidales y de los ácidos biliares. Actúa como precursor de la vitamina D</p>
 <p>B) ÁCIDO CÓLICO</p>	<p>Principal ácido biliar sintetizado en el hígado, secretado en forma de conjugado de glicina o de taurina a la vesícula biliar.</p>
 <p>C) ESTRADIOL</p>	<p>Hormona estrogénica más importante de la mujer, secretada por los ovarios.</p>
 <p>D) PROGESTERONA</p>	<p>Progesterona, hormona producida por las células del cuerpo lúteo del ovario. La función principal de la progesterona es la preparación de la membrana mucosa del útero para la recepción del óvulo. También estimula la formación de estructuras celulares en las mamas; las prepara para su función de producción de leche y mantiene esta función durante la lactancia.</p>

 <p>E) TESTOSTERONA</p>	<p>Hormona sexual masculina que estimula la formación de espermatozoides en los testículos y la aparición de las características sexuales secundarias masculinas.</p>
 <p>F) CORTISOL</p>	<p>El cortisol influye sobre el metabolismo de hidratos de carbono, proteínas y grasas, la maduración de los leucocitos de la sangre, la retención de sales y agua, la actividad del sistema nervioso y la regulación de la presión arterial. La secreción de cortisol por parte de la corteza suprarrenal es estimulada por la hormona pituitaria ACTH.</p>

2.2. Andrógenos

Los testículos y las glándulas suprarrenales (Fig. 4) secretan varias hormonas sexuales masculinas, que son las sustancias que inducen y mantienen las características sexuales secundarias en los varones. Los principales andrógenos son la testosterona y la androsterona que inician en la pubertad sus funciones principales. En general, la estructura química de los andrógenos esta basada en el esqueleto androstano¹ (Ver esquema A, Pág. 11).

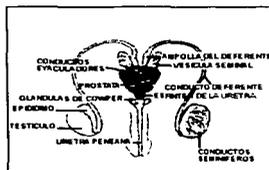


FIG. 4. APARATO REPRODUCTOR MASCULINO

2.2.1. La testosterona

Es la principal hormona masculina o andrógeno que se produce en las células de Leydig en los testículos, por influencia de la hormona luteinizante segregada por la hipófisis anterior. Las células de Leydig producen también, en cantidades muy inferiores, otros dos andrógenos menos potentes.¹

La testosterona estimula la formación de espermatozoides en los testículos y la aparición de las características sexuales secundarias masculinas después de la pubertad: crecimiento de barba y vello púbico, desarrollo del pene y evolución de la voz hacia un tono más grave. Es un esteroide anabólico que acelera la síntesis de proteínas y frena su descomposición, lo cual induce a su vez la aceleración del crecimiento. También favorece el desarrollo muscular y conforma la constitución corporal característica del varón adulto.¹

2.2.2. Mecanismos de acción de la testosterona (T)

En contraste con las hormonas proteicas cuyos receptores se encuentran en la membrana plasmática, todos los receptores para las hormonas esteroideas como lo es la testosterona son intracelulares. Debido a su naturaleza hidrofóbica no se disuelve fácilmente en la sangre, por lo que es transportado por proteínas específicas, desde el punto de su liberación hasta los tejidos en donde ejercerá su acción. En el tejido blanco, esta hormona atraviesa la membrana plasmática por difusión simple, se metaboliza y se une a proteínas receptoras específicas presentes en el citoplasma y núcleo. Estas proteínas receptoras, se encuentran en concentraciones entre 10,000 y 100,000 moléculas por célula y se unen a su respectivo esteroide en forma reversible pero con alta afinidad. De esta manera, una vez que la testosterona se encuentra en el citoplasma de una célula blanco, es tomada por la enzima 5 α -reductasa que se encuentra en la membrana nuclear y es transformada, en presencia de NADPH, a su metabolito más activo DHT. Ésta última forma un complejo con el receptor androgénico (AR), el cual se localiza dentro del núcleo¹⁶. La unión de DHT al AR (DHT-AR) genera un cambio conformacional, el cual permite que el receptor (AR) exponga el dominio de unión para los elementos de respuesta hormonal (HRE) situados en el DNA y adquiera la facultad de interaccionar con factores de transcripción específicos. El complejo hormona receptor unido puede tanto estimular como suprimir la expresión (transcripción de RNAm) de genes específicos adyacentes a los HRE y, por lo tanto, la síntesis de proteínas codificadas por los genes¹⁷. Los eventos biosintéticos que resultan de la interacción esteroide-receptor, incluyen la transcripción del RNAm precursor, el procesamiento y la traducción de proteínas específicas que alteran la función celular, el crecimiento y la diferenciación.

Finalmente la testosterona se libera de su receptor, y más tarde sale de las células blanco, se convierte en su sal en el hígado y de esta forma es eliminada del organismo a

través de la orina, o heces fecales o bien puede ser capturada de nuevo como materia prima para formar nuevos esteroides como es el caso del cortisol.

2.2.3. La enzima 5 α -reductasa

Es una proteína hidrofóbica de 259 aminoácidos que se localiza en la fracción microsomal de las células blanco para andrógenos (vesícula seminal y próstata). Tiene un peso molecular de 29,462 Da. Existen dos isoformas de la enzima 5 α -reductasa denominadas tipo I y tipo II, las cuales difieren en sus propiedades bioquímicas, tejido de localización y su función.¹¹

La isoenzima 5 α -reductasa Tipo I se encuentra predominantemente en piel no genital y en el hígado, mientras que el tipo II se encuentra predominantemente en los tejidos blanco de andrógenos, incluyendo próstata y testículos, y se relaciona directamente al cáncer de próstata e hiperplasia prostática benigna (HPB). En la siguiente tabla se muestran algunas diferencias entre estas dos isoenzimas.¹²

Tabla b). Comparación de los dos isotipos I y II de la enzima 5 α -reductasa.^{11, 12}

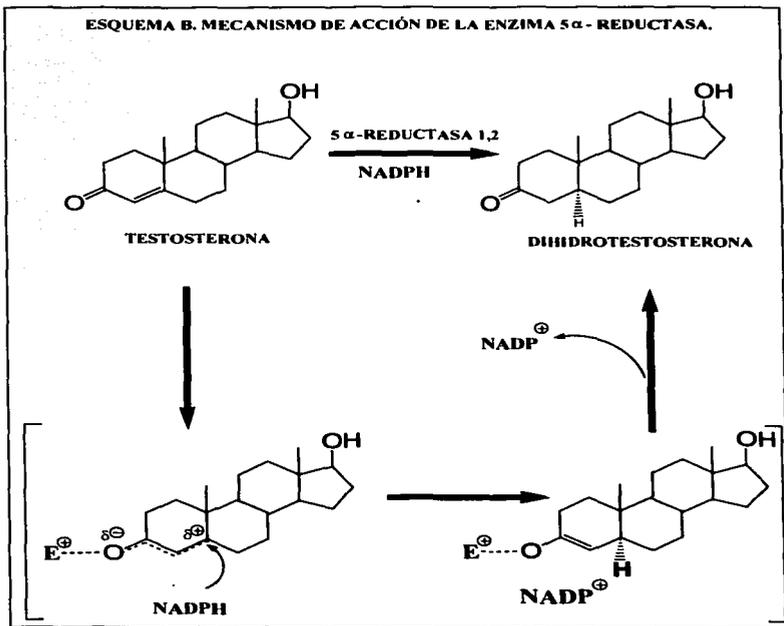
	ISOTIPO I	ISOTIPO II
pH óptimo	7-8	5.0
Localización del gene	Cromosoma 5	Cromosoma 2
Distribución en tejidos	Hígado y piel no genital	Tracto urogenital masculino
Nº de aminoácidos	259	254
Km* para testosterona	4 μ M	1 μ M

Km* = Constante de Michaelis-Menten.

2.2.4. Mecanismo de acción de la enzima 5 α -reductasa

El mecanismo de acción consiste en la formación de un complejo 5 α -reductasa-NADPH, que posteriormente se une a la testosterona para realizar una transferencia estereoespecífica del hidruro del NADPH a la posición 5 α de la testosterona lo que permite la formación del enolato en los C-3 y C-4. El enolato es estabilizado por algún residuo electrofílico (E⁺) de la enzima en el sitio activo. Este proceso podría visualizarse como la activación de la enona por el E⁺ permitiendo la aparición de una especie polarizada la cual acepta el hidruro procedente del NADPH en C-5, al mediar la enzima el tautomerismo permite la formación del producto, la DHT, con la liberación del NADP⁺ ¹² (Esquema B. Pág. 16).

ESQUEMA B. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA ENZIMA 5 α - REDUCTASA.



2.3. Cáncer de próstata e Hiperplasia Prostática Benigna (HPB)

2.3.1. La próstata

Es una glándula del sistema reproductor del hombre. Produce y almacena el líquido seminal, un líquido lechoso que alimenta el espermatozoide. Este líquido es secretado para formar parte del semen.¹⁹

La próstata es casi del tamaño de una nuez. Está situada debajo de la vejiga y enfrente del recto. Rodea la parte superior de la uretra, el tubo por donde se vacía la orina de la vejiga (Figura. 5). Si la próstata crece demasiado, el flujo de la orina puede hacerse lento o detenerse.¹⁹

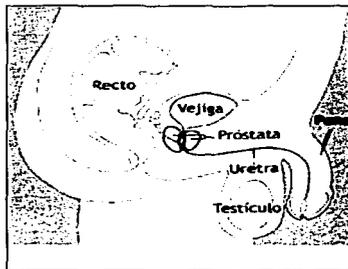


FIG. 5. ILUSTRACIÓN QUE MUESTRA LA PRÓSTATA Y ÓRGANOS CERCANOS.

Para funcionar correctamente, la próstata necesita hormonas masculinas (andrógenos). Las hormonas masculinas son responsables de las características sexuales masculinas. La principal hormona masculina es la testosterona, la cual es producida principalmente por los testículos. Algunas hormonas masculinas son producidas en pequeñas cantidades por las glándulas suprarrenales.¹⁹

2.3.2. El proceso del cáncer

El cáncer es un grupo de muchas enfermedades relacionadas. Estas enfermedades empiezan en la célula, la unidad básica de vida del cuerpo. Las células tienen muchas funciones importantes en todo el cuerpo.²⁰

Normalmente, las células crecen y se dividen para formar nuevas células en forma ordenada. Desempeñan su función y luego mueren más tarde. Este proceso ordenado ayuda al cuerpo a mantenerse sano.

Algunas veces, sin embargo, las células no mueren. Por el contrario, ellas siguen dividiéndose y crean nuevas células que el cuerpo no necesita. Forman una masa de tejido, que es lo que se llama tumor.

Los tumores pueden ser benignos o malignos: Los tumores benignos no son cancerosos. Generalmente se pueden operar y, en la mayoría de los casos, no vuelven a aparecer. Las células de tumores benignos no se esparcen a otras partes del cuerpo. Y lo que es más importante, los tumores benignos de próstata no son una amenaza para la vida, por ejemplo la hiperplasia prostática benigna (HPB) es el crecimiento anormal de células benignas de la próstata provocando así el crecimiento de la misma con la consecuencia de la opresión contra la uretra y la vejiga, obstruyendo el flujo normal de la orina.

Los tumores malignos son cancerosos. Las células de estos tumores son anormales. Se dividen sin control y sin orden, y no mueren. Estas células pueden invadir y dañar tejidos y órganos cercanos. Las células cancerosas pueden también desprenderse de un tumor maligno y entrar en el torrente de la sangre y en el sistema linfático. Así es como el cáncer se disemina desde el sitio original (primario) para formar tumores nuevos (secundarios) en otros órganos. Cuando el cáncer se disemina, se llama metástasis.²⁰

2.3.3. Cáncer de próstata e HPB: ¿Quién tiene el riesgo?

Todavía no se entienden bien las causas del cáncer de próstata. Los médicos no pueden explicar por qué el cáncer de próstata se desarrolla en un hombre pero no en otro.

Los investigadores están estudiando los factores que pueden aumentar el riesgo de esta enfermedad. Algunos estudios han encontrado que los siguientes factores de riesgo están relacionados con el cáncer de próstata.²⁰

- Edad. En Estados Unidos, el cáncer de próstata se encuentra principalmente en hombres mayores de 55 años. La edad promedio de los pacientes al momento del diagnóstico es de 70 años.
- Antecedentes familiares de cáncer de próstata. El riesgo de un hombre de

desarrollar cáncer de próstata es mayor si su padre o hermano ha tenido esta enfermedad (factores hereditarios).

- Raza. Esta enfermedad es mucho más común en hombres afroamericanos que en hombres blancos. Es menos común en hombres asiáticos e indígenas americanos.
- Dieta y factores dietéticos. Algunos resultados sugieren que una dieta alta en grasa animal puede aumentar el riesgo de cáncer de próstata y una dieta alta en frutas y verduras puede disminuir el riesgo. Se están llevando a cabo estudios para saber si los hombres pueden reducir su riesgo de cáncer de próstata si toman ciertos suplementos dietéticos.²⁰

2.3.4. Detección del cáncer de próstata e HPB

- Examen rectal digital. El médico inserta un dedo enguantado, lubricado, en el recto y siente la próstata a través de la pared del recto para buscar áreas endurecidas o abultadas.
- Análisis de sangre para antígeno prostático específico (PSA). Un laboratorio mide los niveles de PSA en una muestra de sangre. El nivel del PSA puede elevarse en hombres que tienen cáncer de próstata, hiperplasia prostática benigna o una infección en la próstata.

2.3.4.1. El reconocimiento de los síntomas

El cáncer de próstata con frecuencia no causa síntomas al principio, pero puede causar cualquiera de estos problemas:

- Necesidad de orinar frecuentemente, especialmente durante la noche;
- Dificultad en empezar a orinar o en retener la orina;
- Inhabilidad para orinar;
- Flujo débil o interrumpido de la orina;
- Dolor o ardor al orinar;
- Dificultad para tener erecciones;
- Eyaculación dolorosa;
- Sangre en la orina o en el semen, o
- Dolor o rigidez frecuente en la parte baja de la espalda, las caderas o la parte superior de los muslos.

Cualquiera de estos síntomas puede ser causado por cáncer o por otro problema de salud menos grave, como la hiperplasia prostática benigna o una infección.

2.3.5. Etapas del cáncer de próstata

- Etapa I. El cáncer no se puede detectar durante un examen rectal. Se puede encontrar accidentalmente cuando se opera por alguna otra razón, generalmente por hiperplasia prostática benigna. No hay evidencia de que el cáncer se ha diseminado fuera de la próstata.

- Etapa II. El tumor abarca más tejido dentro de la próstata, se puede sentir durante un examen rectal o se encuentra en una biopsia que se hace a causa de un nivel elevado de PSA. No hay evidencia de que el cáncer se ha diseminado fuera de la próstata.
- Etapa III. El cáncer se ha diseminado fuera de la próstata a tejidos cercanos.
- Etapa IV. El cáncer se ha diseminado a los ganglios linfáticos o a otras partes del cuerpo.

2.3.5.1. Preparación para el tratamiento

Se desarrolla un plan de tratamiento que se acomode a las necesidades de cada paciente. El tratamiento para cáncer de próstata depende de la etapa o estadio de la enfermedad y del grado del tumor (el cual indica qué tan anormales se ven las células y la posibilidad de que crezcan o que se diseminen). Otros factores importantes al hacer el plan del tratamiento son la edad del hombre y su salud en general y lo que él siente con respecto a los tratamientos y a sus posibles efectos secundarios.

Métodos de tratamiento. El tratamiento para cáncer de próstata y la HPB puede comprender la espera vigilante, cirugía, radioterapia o terapia hormonal. Algunos pacientes reciben una combinación de estas terapias.

La espera vigilante se puede recomendar para algunos hombres que tienen cáncer de próstata que se encuentra en un estadio o etapa inicial y que parece que está creciendo lentamente. La espera vigilante se puede aconsejar también para hombres de más edad o para los que tienen otros problemas médicos graves como la HPB. Para estos hombres, los riesgos y los efectos secundarios posibles de la cirugía, radioterapia o de la terapia hormonal pueden tener más peso que los beneficios posibles.

La cirugía es un tratamiento común para cáncer de próstata en etapa inicial y para la HPB cuando la obstrucción no es controlable con tratamientos médicos, el tratamiento quirúrgico es la opción más acertada. Puede extirpar toda la próstata (un tipo de cirugía llamado prostatectomía radical) o sólo una parte. En algunos casos, puede usarse una nueva técnica conocida como cirugía conservadora de nervios. Este tipo de cirugía puede salvar los nervios que controlan la erección. Sin embargo, es posible que los hombres que tienen tumores grandes o tumores que están muy cerca de estos nervios no puedan tener esta cirugía.

La radioterapia es el uso de rayos de alta energía para destruir las células cancerosas. Al igual que la cirugía, la radioterapia es terapia local, puede afectar las células cancerosas sólo en el área tratada. En cáncer de próstata en etapa inicial, la radiación puede usarse en vez de cirugía o puede usarse después de la cirugía para destruir cualquier célula cancerosa que haya quedado en el área. En etapas avanzadas, es posible que se administre para aliviar el dolor u otros problemas. En el caso de la HPB, el haz de rayos es conducido por un endoscopio hasta la uretra prostática. Con este procedimiento más del 50% de los enfermos tratados por HPB mejoran los síntomas

obstructivos pero alrededor del 30% de ellos mantienen los de tipo irritativo.

La terapia hormonal impide que las células cancerosas obtengan las hormonas masculinas que necesitan para crecer. Esto se llama terapia sistémica porque puede afectar las células cancerosas en todo el cuerpo. La terapia sistémica se usa para tratar el cáncer que se ha diseminado. Algunas veces este tipo de terapia se usa para tratar de impedir que el cáncer regrese después de la cirugía o de tratamiento con radiación.

Hay varias formas de terapia hormonal algunas de ellas son:

- La orquitectomía es la cirugía para extirpar los testículos, los cuales son la fuente principal de las hormonas masculinas (para el caso de cáncer).
- Los fármacos conocidos como agonistas de la hormona liberadora de hormona luteinizante (LH-RH). La investigación clínica, ha mostrado que la estimulación con ciertas hormonas sintéticas específicas, disminuyen entre el 32 al 75% al cabo de tres meses de tratamiento mostrándose efectiva para mejorar, no sólo los síntomas irritativos, sino también los de tipo obstructivo de la HBP.
- Los fármacos conocidos como antiandrógenos pueden bloquear la acción de los andrógenos. Un ejemplo es la flutamida (Fig. 6b, Pág. 22) que provoca un alivio a los síntomas irritativos y obstructivos tanto de la hiperplasia benigna (HPB) como del cáncer de próstata. Estas sustancias, denominadas antiandrógenos son utilizadas no sólo para el tratamiento de la HPB sino también para el control del carcinoma de la próstata.
- Existen inhibidores de la enzima 5 α -reductasa como la finasterida que ha demostrado ser un fármaco eficaz en el tratamiento de la HPB. Por otro lado fármacos que provocan inhibición de los receptores androgénicos ya que actúan como antagonistas, como es el caso del acetato de ciproterona. Que aunque se ha utiliza preferentemente en el tratamiento del cáncer de la próstata, su uso en HBP, atenúa en el 70% de estos pacientes los síntomas irritativos, el 67% consiguen mejorar la obstrucción, pero sólo el 50% reduce el volumen de la glándula hipertrofiada. Un tercio de ellos disminuye la potencia sexual.^{1, 21}

2.4. Antiandrógenos

Son compuestos que bloquean la síntesis o la acción de los andrógenos y pueden ser usados en el manejo de la HPB o del cáncer de próstata, acné, calvicie masculina, síndrome de virilización de la mujer y pubertad precoz en varones.²¹

2.4.1 Acción biológica

2.4.1.1. Inhibidores de la síntesis de andrógenos (agonistas LH-RH).

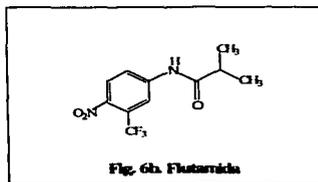
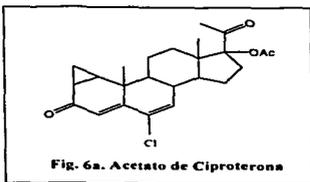
La investigación clínica ha mostrado que la estimulación con ciertas hormonas sintéticas específicas incrementa la producción de la hormona luteinizante (LH) y de la hormona foliculoestimulante (FH). Este fenómeno provoca transitoriamente, en los varones, una elevación de la testosterona. Sin embargo, si la estimulación perdura, entre dos a tres semanas, las concentraciones de las hormonas luteinizantes (LH) y Foliculo estimulantes (FSH) disminuyen dramáticamente, simulando un cuadro de castración. Este fenómeno de descenso de la Testosterona, luego de la estimulación prolongada de la hipófisis, no ha sido aún totalmente aclarado. Es posible que se deba a un proceso de agotamiento en el proceso de estimulación glandular.^{20, 22}

2.4.1.2. Inhibidores de la enzima 5 α -reductasa

La inhibición de esta enzima, puede ser selectiva al bloquear la acción del andrógeno en un tejido específico (próstata, folículo piloso) en donde es esencial la producción continua de DHT. Un ejemplo de un fármaco que tiene este mecanismo de acción es la finasterida (Fig. 2, Pág. 8).

2.4.1.3. Antagonistas de los receptores androgénicos

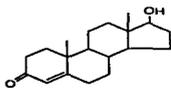
Existen numerosos fármacos que son antagonistas específicos en la unión del andrógeno con su receptor. Entre ellos está el acetato de ciproterona y la flutamida.¹² (Fig. 6a y 6b).



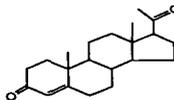
2.4.2. Síntesis de Antiandrógenos

Básicamente existen 2 métodos para sintetizar un esteroide con características antiandrógenicas. Ambos métodos se describen a continuación.²³

1. Se toma como esqueleto base a la molécula de testosterona (Fig. 7a) y se efectúan en ella diversas modificaciones estructurales, de manera que se tenga un efecto antagónico. Así, el nuevo compuesto sintetizado tendrá la capacidad de unirse al receptor sin producir efecto androgénico, bloqueando la formación del complejo andrógeno-receptor.
2. Se modifica la molécula de progesterona (Fig. 7b), pues ésta tiene cierto carácter antiandrogénico natural y se esperaría que sus análogos sintéticos presentaran la misma actividad biológica.



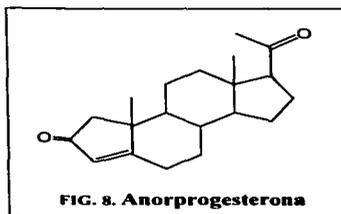
(Fig. 7a) TESTOSTERONA



(Fig. 7b) PROGESTERONA

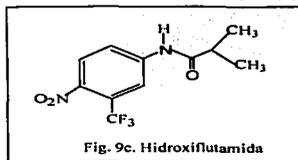
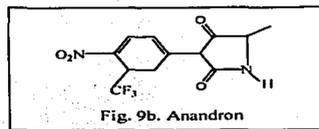
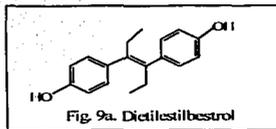
2.4.3. Clasificación química de los antiandrogénos

Los antiandrogénos se clasifican en 2 grupos: esteroidales y no esteroidales. Los antiandrogénos de tipo esterooidal son compuestos que se derivan de la progesterona. Estos compuestos son de mayor interés terapéutico, debido a que actúan específicamente sobre el receptor androgénico. La desventaja que presentan es la reducción del tamaño de los órganos sexuales. Algunos ejemplos de este tipo de antiandrogénos son el acetato de ciproterona (Fig.6a, Pág. 22), la finasterida (Fig. 2, Pág., 8) y la anorprogesterona (Fig. 8).²¹



Los antiandrogénos no esteroidales tienen afinidad por el receptor, debido a su estructura química con geometría semejante y reducen de un 25% a 30% el tamaño de la

próstata. Como desventajas presentan la inhibición de la erección e insuficiencia hepática entre otras. Como ejemplos de éstos antiandrógenos tenemos al dietilestilbestrol, anandrón e hidroxiflutamida (Fig. 9a, 9b y 9c. Pág. 24).



Existen antiandrógenos esteroidales que no se derivan de la testosterona ni de la progesterona, los cuales poseen características similares al acetato de ciproterona, como son la espirixazona (Fig.10a) y espironolactona (Fig.10b) antagonista de aldosterona, actúa como un inhibidor débil de la unión del andrógeno con su receptor.

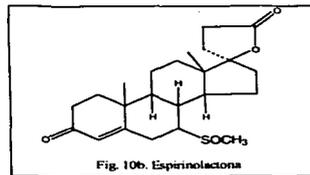
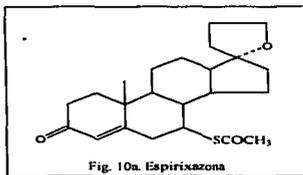


Fig. 10a y 10b. Antiandrógenos que no se derivan de la progesterona o testosterona.

OBJETIVOS GENERALES:

- ❖ Sintetizar dos compuestos de naturaleza esteroidal con posible actividad antiandrogénica.
- ❖ Determinar la actividad antiandrogénica de los compuestos (VII y VIII) mediante ensayos farmacológicos *in vivo* e *in vitro*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- ❖ Sintetizar dos compuestos que tengan en su estructura un grupo éster en C-3 β orientado, un grupo carbonilo en C-6; así como la introducción de una doble ligadura en el C-4 creando así un sistema conjugado, obteniendo dos compuestos nuevos llamados: 1.- 3 β -BENZOILOXI-4-PREGNEN-6,20-DIONA (VII) y 2.- 3 β -(*p*-TOLUILOXI)-4-PREGNEN-6,20-DIONA (VIII) (Ver estructuras en la Pág. 27).
- ❖ Purificar y caracterizar los compuestos finales e intermediarios mediante sus propiedades físicas (p.f) y espectroscópicas (UV, IR, RMN ^1H y ^{13}C , EM (IE).
- ❖ Determinar *in vitro* la posible actividad inhibitoria de los compuestos sintetizados sobre la enzima 5 α -reductasa presente en vesículas seminales de hámster.
- ❖ Determinar *in vitro* la posible capacidad antagonista de los compuestos sobre el receptor androgénico en próstata de hámster.
- ❖ Evaluar *in vivo* la actividad antiandrogénica de los compuestos.

METODOLOGÍA

4.1. MATERIALES Y MÉTODOS.

- ❖ La pureza de los compuestos y el curso de las reacciones se siguió por cromatografía en capa fina (CCF) utilizando como fase absorbente gel de sílice 60 F254 Merck.
- ❖ Como revelador una solución de CoCl_2 al 1% en H_2SO_4 2N y una lámpara UV $\lambda = 254 \text{ nm}$.
- ❖ Las purificaciones se llevaron a cabo por medio de una columna cromatográfica utilizando como adsorbente gel de sílice 60 Merck y una mezcla de elusión adecuada a cada caso.
- Los equipos empleados en los diversos estudios fueron:
 - El equipo que se utilizó para determinar los puntos de fusión (p.f) de los compuestos obtenidos fue un aparato de Fisher-Johns.
 - Para la técnica de Espectrofotometría de Absorción al Ultravioleta (UV) se empleó un equipo Pekin Elmer 200 s.
 - Para la Espectrofotometría de Absorción de Infrarrojo (IR) se utilizó un equipo Pekin Elmer 549B; utilizando la técnica de película de KBr.
 - Para la Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN 1H) y de 13C (RMN 13C) los equipos son:
 - Varian, Gemini 200 y VRX-300s, utilizando CDCl_3 como disolvente; los desplazamientos están dados en ppm referidos al TMS (tetrametilsilano) como referencia interna.
 - Finalmente para la Espectrometría de Masas (EM (IE)) se empleó un espectrómetro de masas HP 5985-B GC/MS mediante la técnica de impacto electrónico (IE).

4.2. PARTE EXPERIMENTAL.

La obtención de los compuestos (VII) y (VIII) se llevó a cabo a través de la siguiente ruta de síntesis:

RUTA DE SÍNTESIS

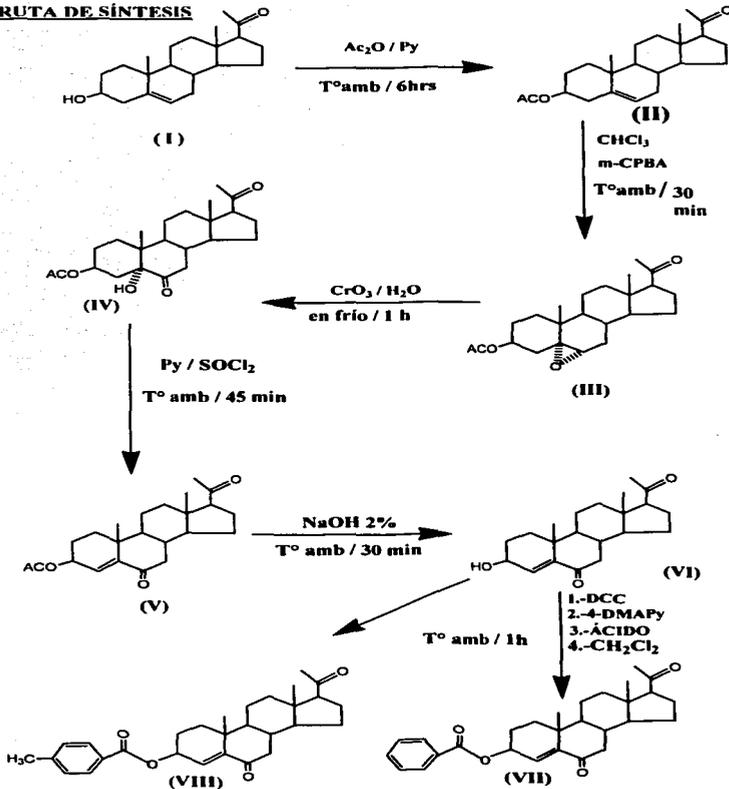


TABLA 1. Propiedades físicas y espectroscópicas de la materia prima (I)

La materia prima se purificó de acetato de etilo obteniéndose cristales de color blanco.

3 β -HIDROXI-5-PREGNEN-20-ONA (I)

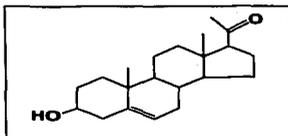


TABLA 1.1 características físicas

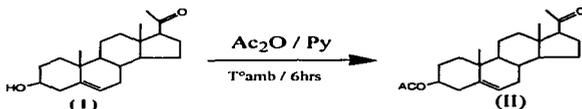
Propiedad determinada	Valor encontrado y/o calculado
Punto de fusión (°C)	193-195
Fórmula molecular	C ₂₁ H ₃₂ O ₂
Peso molecular (uma)	316

TABLA 1.2 Datos espectroscópicos experimentales

Valor espectroscópico obtenido	Asignación
IR (cm⁻¹)	
3437.96	OH- en C-3
2927.93	CH ₃ , CH ₂
1681.40	C=O en C-20
1642.22	C=C en C-5
1465.77- 1381.11	CH ₂ , CH ₃
1231.89	C-O
1050.30	C-OH en C-3
951.14	deformación de OH
RMN ¹H (ppm)	
0.633 (s,3H)	CH ₃ en C-18
1.012(s,3H)	CH ₃ en C-19
2.537(s,3H)	CH ₃ en C-21
3.530(m,1H)	H del OH en C-3
5.350(d,1H)	C=CH en C-6

B) SÍNTESIS DE 3β-ACETOXI-5-PREGNEN-20-ONA (II)

REACCIÓN DE ACETILACIÓN



En un matraz de bola de 50 ml se disolvió 1g (3.1×10^{-3} mol) de la materia prima (I) en 5 ml de piridina (0.061 mol), esta mezcla se mantuvo en baño maria hasta disolución. En seguida se agregaron 10 ml (0.105 mol) de anhídrido acético (Ac_2O). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación magnética constante y a temperatura ambiente por 6 horas. Transcurrido el tiempo, ésta se vertió en un vaso de precipitados que contenía hielo y 75 ml de agua. Bajo estas condiciones precipitó el producto II, el cual se filtró, se lavó con agua, y se dejó secar. Se recrystalizó de acetato de etilo obteniéndose cristales de color blanco y cuyo rendimiento fue del 50% con un punto de fusión de 147-151° C.

TABLA 2. Propiedades físicas y espectroscópicas para el compuesto II

3β-ACETOXI-5-PREGNEN-20-ONA (II)

TABLA 2.1 características físicas

Propiedad determinada	Valor encontrado y/o calculado
Punto de fusión (°C)	147-151
Fórmula molecular	$\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_3$
Peso molecular (uma)	358

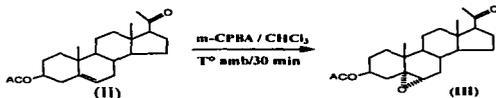
TABLA 2.2 Datos espectroscópicos experimentales

Valor espectroscópico obtenido	Asignación
IR (cm^{-1})	
2939.94	CH_3 y CH_2
1726.19	C=O de éster en C-3
1704.89	C=O en C-20
1357.82 y 1434.64	CH_3 y CH_2
1237.16	CH_3 del éster acetoxi en C-3
1027.07	C-O-C de éster en C-3

RMN 1H (ppm)	
0.633 (s,3H)	CH ₃ , C-18
1.023 (s,3H)	CH ₃ , C-19
2.036 (s,3H)	CH ₃ , C-21
2.127 (s,3H)	CH ₃ de CH ₃ -C=O en C-3
4.607 (m,1H)	H en C-3
5.380 (d,1H)	H en C-6
EM(IE) (m/z)	
358	M ⁺
357	M ⁺
342	357 - (CH ₃) ⁺
298 (pico base)	357 - (CH ₃ COO)
283	298 - (CH ₃) ⁺
255	283 - (C=O)
253	283 - 2(CH ₃) ⁺

C) SÍNTESIS DE 3β-ACETOXI-5α,6α-EPOXI-PREGNAN-20-ONA (III)

REACCIÓN DE EPOXIDACIÓN



En un matraz de bola de 250 ml se disolvió 1g (2.7×10^{-3} mol) del compuesto II en 100 ml (1.246 mol) de cloroformo. En seguida se agregaron 1.6g (9.3×10^{-3} mol) de ácido *meta*-cloroperbenzóico. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación magnética constante a temperatura ambiente durante 30 minutos. Al término de la reacción se vertió en un vaso de precipitados con agua, se agregó bisulfato de sodio y se mantuvo en agitación constante por 30 minutos. Posteriormente se adicionó poco, a poco, bicarbonato de sodio hasta pH= 8, y después se filtró la mezcla. Por último, se hicieron extracciones sucesivas del producto con cloroformo: la fase orgánica se lavó con agua hasta pH neutro, se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró en un rota- evaporador. El producto obtenido III se purificó por medio de una columna cromatográfica (Hexano: AcOEt 8:2). Se obtuvieron 55.7% de cristales como agujas color blanco con punto de fusión de 125-127° C.

TABLA 3. Propiedades físicas y espectroscópicas para el compuesto*3β - ACETOXI-5α,6α-EPOXI-PREGNAN-20-ONA (III)***TABLA 3.1 características físicas**

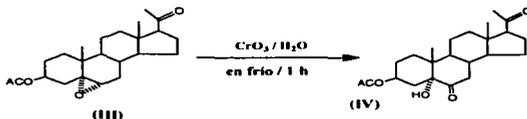
Propiedad determinada	Valor encontrado y/o calculado
Punto de fusión (°C)	125-127
Fórmula molecular	C ₂₃ H ₃₄ O ₄
Peso molecular (uma)	374

TABLA 3.2 Datos espectroscópicos experimentales

Valor espectroscópico obtenido	Asignación
IR (cm⁻¹)	
2942.01	CH ₃ y CH ₂
1733.62	C=O del éster en C-3
1703.32	C=O en C-20
1469.67-1360.16	CH ₃ CH ₂
1242.61	CH ₃ del éster acetoxi en C-3
1034.40	C-O-C de éster en C-3
960.83	Epóxido en C-5 y C-6
RMN ¹H (ppm)	
0.595 (s,3H)	CH ₃ , C-18
1.232 (s,3H)	CH ₃ , C-19
2.019 (s,3H)	CH ₃ , C-21
2.504 (m,3H)	CH ₃ de CH ₃ -COO ⁻ en C-3
3.06 (d,1H)	H del C-6
4.774 (m,1H)	H en C-3
EM(IE) (m/z)	
374	M ⁺
356	M ⁺ - (H ₂ O)
296	356-(CH ₃ COO)
314	374-(CH ₃ COO) (pico base)
281	296-(CH ₃) ⁺
253	281-(CO)

D) SÍNTESIS DE 3β-ACETOXI-5α-HIDROXIPREGNAN-6,20-DIONA (IV)

REACCIÓN DE OXIDACIÓN



En un matraz de bola de 100 ml se disolvió 1g (2.6×10^{-3} mol) del compuesto III en 50 ml de acetona en frío. En seguida se agregó una mezcla de dicromato de potasio en agua (2.1 g de CrO_3 en 7 ml de H_2O). Se agregó gota a gota la mitad de esta solución y se agitó 20 minutos en frío. Posteriormente se adicionó la segunda parte de la solución preparada y se retiró del baño de hielo dejando agitar a temperatura ambiente por 40 minutos. Transcurrido el tiempo la mezcla de reacción se vertió en un vaso de precipitados que contenía hielo y agua, bajo estas condiciones precipitó el producto IV, el cual se filtró, se lavó con agua, y se dejó secar al vacío. Finalmente se purificó por cromatografía en columna, utilizando como soporte gel de sílice 60 y un sistema de elusión hexano/AcOEt (8/2 % V/V), obteniéndose cristales de color blanco y un rendimiento del 65.5% con un punto de fusión de 224-226°C.

TABLA 4. Propiedades físicas y espectroscópicas para el compuesto

3β-ACETOXI-5α-HIDROXIPREGNAN-6-20-DIONA (IV)

TABLA 4.1 características físicas

Propiedad determinada	Valor encontrado y/o calculado
Punto de fusión (°C)	221-224
Fórmula molecular	$\text{C}_{23}\text{H}_{34}\text{O}_5$
Peso molecular (uma)	390

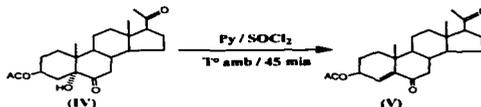
TABLA 4.2 Datos espectroscópicos experimentales

Valor espectroscópico obtenido	Asignación
IR (cm⁻¹)	
3455.84	OH en C-5
2947.73	CH ₃ y CH ₂
1737.02	C=O de éster en C-3
1715.44	C=O en C-20

1689,86	C=O en C-6
1365.11-1450.62	CH ₃ y CH ₂
1232,08	CH ₃ del éster acetoxi en C-3
1041,96	C-O-C de éster en C-3
RMN 1H (ppm)	
0,601 (s,3H)	CH ₃ , C-18
0,815 (s,3H)	CH ₃ , C-19
2,011 (s,3H)	CH ₃ , C-21
2,127 (s,3H)	CH ₃ de CH ₃ -COO en C-3
2,559 (m,1H)	H del alcohol
5,044 (m,1H)	H en C-3
EM(IE) (m/z)	
391	M+
390	M
372	390- (H ₂ O)
330 (pico base)	390- (CH ₃ COO)
312	372- (CH ₃ COO)
	330- (H ₂ O)
287	330- (CH ₃ CO)
269	287- (H ₂ O)

E) SÍNTESIS DE 3 β -ACETOXI-4-PREGNEN-6,20-DIONA (V)

REACCIÓN DE ELIMINACIÓN



En un matraz de bola de 100 ml se disolvió 1g (2.5×10^{-3} mol) del compuesto IV en 32 ml (0.3904 mol) de piridina en frío. Una vez disueltos se adicionaron poco a poco y bajo una atmósfera de nitrógeno, 2 ml (0.0274 mol) de cloruro de tionilo. Posteriormente, se retiró el enfriamiento y se dejó la reacción a temperatura ambiente, en agitación constante y en condiciones anhidras por un tiempo de 45 minutos. Transcurrido el tiempo, la mezcla de reacción se vertió en un vaso de precipitados que contenía hielo y agua, bajo estas condiciones precipitó el producto V, el cual se filtró, se lavó con agua, y se dejó secar al vacío. El producto final se purificó por cromatografía en columna,

utilizando como soporte gel de sílice 60 y un sistema de elusión hexano/AcOEt (8/2 % V/V), obteniéndose cristales de color blanco y un rendimiento del 50.5% con un punto de fusión de 139-142° C.

TABLA 5. Propiedades físicas y espectroscópicas para el compuesto

3β-ACETOXI-4-PREGNEN-6,20-DIONA (V)

TABLA 5.1 características físicas

Propiedad determinada	Valor encontrado y/o calculado
Punto de fusión (°C)	139-142
Fórmula molecular	C ₂₃ H ₃₂ O ₃
Peso molecular (uma)	372

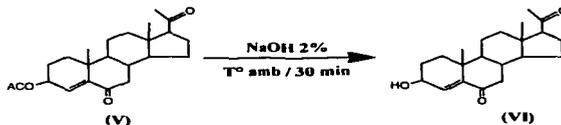
TABLA 5.2 Datos espectroscópicos experimentales

Valor espectroscópico obtenido	Asignación
UV (nm)	
λ máx 235,37	CO α,β insaturada en C-6
IR (cm⁻¹)	
2935.89	CH ₃ ,CH ₂
1737.35	C=O del éster en C-3
1698.99	C= O en C-20 y/o C-6
1642.54	C= C en C-4
1361.87-1436.66	CH ₃ y CH ₂
1243.01	CH ₃ del éster acetoxi en C-3
1021.56	C-O-C del éster en C-3
RMN ¹H (ppm)	
0.662 (s,3H)	CH ₃ , C-18
1.031 (s,3H)	CH ₃ , C-19
2.070 (s,3H)	CH ₃ , C-21
2.138 (s,3H)	CH ₃ de CH ₃ -COO ⁻ en C-3
2.580 (m,2H)	2 H en C-7
5.350 (m,1H)	H en C-3
6.100 (t,1H)	H en C-4

EM(IE) (m/z)	372 M ⁺
	330 372 - CH ₃ CO ⁻
	269 330 - CH ₃ COOH
	315 330 - CH ₃
	255 269 - CH ₂
	227 255 - CO
	199 227 - CO

F) SÍNTESIS DE 3β-HIDROXI-4-PREGNEN-6,20-DIONA (VI)

REACCIÓN DE HIDRÓLISIS



En un matraz de bola de 250 ml se disolvió 1g (2.6×10^{-3} mol) del compuesto V en 132 ml de metanol. Una vez disueltos se adicionó hidróxido de sodio al 2% (9.7 ml) (4.85×10^{-3} mol). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente y en agitación por 30 minutos. Terminado el tiempo de reacción el producto se vertió en un vaso de precipitado con agua haciendo extracciones sucesivas con cloroformo, las fases orgánicas se lavaron con agua destilada hasta pH neutro, se secaron con sulfato de sodio anhidro; se filtró y se concentró en el rota- evaporador. El producto final se purificó por cromatografía en columna, utilizando como soporte gel de sílice 60 y un sistema de elusión hexano/AcOEt (8/2 % V/V), obteniéndose un rendimiento del 53.3% con un punto de fusión de 173-175 °C

TABLA 6. Propiedades físicas y espectroscópicas para el compuesto

3β-HIDROXI-4-PREGNEN-6,20-DIONA (VI)

TABLA 6.1 características físicas

Propiedad determinada	Valor encontrado y/o calculado
Punto de fusión (°C)	173-175
Fórmula molecular	C ₂₁ H ₃₀ O ₃
Peso molecular (uma)	330

TABLA 6.2 Datos espectroscópicos experimentales

Valor espectroscópico obtenido	Asignación
UV (nm)	
λ máx 239.38	CO α,β insaturada en C-6
IR (cm⁻¹)	
3406.23	OH en C-3
2941.95	CH ₃ y CH ₂
1686.95	C=O en C-6 y/o en C-20
1631.12	C=C conjugado en C-4
1353.81-1423.62	CH ₃ y CH ₂
RMN 1H (ppm)	
0.660 (s,3H)	CH ₃ C-18
1.014 (s,3H)	CH ₃ C-19
2.139 (s,3H)	CH ₃ C-21
4.256 (t,1H)	H de OH en C-3
6.188 (t,1H)	H en C-4
EM(IE) (m/z)	
330	M
315 (<i>pico base</i>)	330- (CH ₃) ⁺
297	315- (H ₂ O)
287	330-(CH ₃ -CO) ⁺
	315- (C=O)
245	287- (CH ₃ -CO) ⁺
227	287- (CH ₃ COOH)

G) SÍNTESIS DE 3 β -BENZOILOXI-4-PREGNEN-6,20-DIONA (VII)

REACCIÓN DE ESTERIFICACIÓN



En un matraz de bola de 100 ml se adicionaron 1g (3.0×10^{-3} mol) del compuesto VI con 1.03g (4.992 mol) de 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC) , 0.6g (4.911 mol) de 4-dimetilamino piridina (4-DMAPY), 1g (0.0079 mol) de ácido benzóico y bajo una atmósfera de nitrógeno se agregaron 100 ml de diclorometano (CH_2Cl_2). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación magnética a temperatura ambiente durante 1h y en condiciones anhidras. Terminado el tiempo de reacción se vertió en un vaso de precipitado con agua haciendo extracciones sucesivas del compuesto con cloroformo, la fase orgánica se lavó con agua destilada hasta pH neutro se secó con sulfato de sodio anhidro se filtró y se concentró en el rota- evaporador obteniéndose diciclohexilurea oxidada (DCCO) + producto. Para eliminar la (DCCO) se adicionó acetato de etilo y se volvió a filtrar. Al filtrado obtenido (compuesto disuelto en acetato de etilo) se le evaporó el disolvente a baño maría formándose un sólido, el cual se purificó por cromatografía en columna, utilizando como soporte gel de sílice 60 y un sistema de clusión hexano/acetato de etilo (8/2 % V/V), obteniéndose un rendimiento del 69% con un punto de fusión de 179-182 ° C.

[TABLA 7. Propiedades físicas y espectroscópicas para el compuesto

3/β -BENZOILOXI-4-PREGNEN-6, 20-DIONA (VII)

TABLA 7.1 características físicas

Propiedad determinada	Valor encontrado y/o calculado
Punto de fusión (°C)	179-182
Fórmula molecular	$\text{C}_{28}\text{H}_{34}\text{O}_4$
Peso molecular (uma)	434

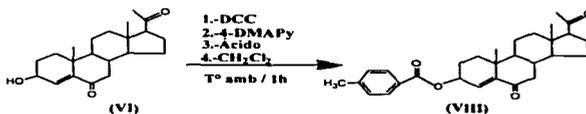
TABLA 7.2 Datos espectroscópicos experimentales

Valor espectroscópico obtenido	Asignación
UV (nm)	
λ máx	
232.13	CO α,β insaturada en C-6
IR (cm⁻¹)	
2945.08 y 2852.28	CH ₃ y CH ₂
1716.88	C=O de éster en C-3
1702.34	C=O en C-20 y/o C-6
1627.52	C=C conjugado en C-4
1600.85	C=C de anillo aromático
1357.91-1452.59	CH ₃ y CH ₂ (confirmación)
1452.59-1600.85	C-C de anillo aromático
1270.09	CH ₃ del éster acetoxi en C-3

1106.12	C-O-C del éster en C-3
713.09	Monosustitución al anillo aromático
RMN ¹H (ppm)	
0.674 (s,3H)	CH ₃ , C-18
1.078 (s,3H)	CH ₃ , C-19
2.162 (s,3H)	CH ₃ , C-21
2.586 (m,2H)	2 H en C-7
5.580 (m,1H)	H en C-3
6.235 (t,1H)	H en C-4
7.441 (m,1H)	H meta al carbonilo del éster en C-3 ^a
7.563 (m,1H)	H meta al carbonilo del éster en C-3 ^a
8.075 (m,2H)	H orto al carbonilo del éster en C-3 ^a
RMN ¹³C (ppm)	
1°	C18:13.292, C19:19.646, C21:31.459
2°	C1:20.739, C11:22.761, C2:24.087, C12:24.231, C15:34.494, C16:38.294, C7:46.077
3°	C8:34.022, C9:51.008, C14:56.625, C17:63.236, C3:69.791, C3-5':133.065, C3-7':130.002, C4:128.307, C3-3':129.694, C3-4':129.078
4°	C10:38.276, C13:43.986, C20:201.876, C6:208.959, C3-2':147.796 C3-1':166.145
EM(IE) (m/z)	
434	M ⁺
416	M ⁺ - (H ₂ O)
329	416 - (CH ₃ CH ₂ CH ₂ COO)
312	329 - (OH)
297	312 - (CH ₃) ⁺
269	297 - (CO)
251	269 - (H ₂ O)
105	297 - (CH ₂) (pico base)

H) SÍNTESIS DE 3 β -(*p*-TOLUILOXI)-4-PREGNEN-6,20-DIONA (VIII)

REACCIÓN DE ESTERIFICACIÓN



En un matraz de bola de 100 ml se adicionaron 1g (3.0×10^{-3} mol) del compuesto VI con 1.030g (4.992 mol) de 1,3-diciclohexilcarbodiimida (DCC), 0.6g (4.911 mol) de 4-dimetilamino piridina (4-DMA PY), 1g (0.0071 mol) de ácido *para*- toluico y bajo una atmósfera de nitrógeno se agregaron 100 ml de diclorometano (CH₂Cl₂). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación magnética a temperatura ambiente durante 1h y en condiciones anhidras. Terminado el tiempo de reacción se vertió en un vaso de precipitado con agua haciéndose extracciones sucesivas del compuesto con cloroformo, la fase orgánica se lavó con agua destilada hasta pH neutro se secó con sulfato de sodio anhidro se filtró y se concentró en el rota-evaporador obteniéndose diciclohexilurea oxidada (DCCO) + producto. Para eliminar la DCCO se adicionó acetato de etilo y se volvió a filtrar. Al filtrado obtenido (compuesto disuelto en acetato de etilo) se le evaporó el disolvente a baño maría formándose un sólido, el cual se purificó por cromatografía en columna, utilizando como soporte gel de sílice 60 y un sistema de elusión hexano/acetato de etilo (8/2 % V/V), obteniéndose un rendimiento del 65.8% con un punto de fusión de 225-228 ° C.

[TABLA 8. Propiedades físicas y espectroscópicas para el compuesto

3 β -(*p*-TOLUILOXI)-4-PREGNEN-6,20-DIONA (VIII)

TABLA 8.1 características físicas

Propiedad determinada	Valor encontrado y/o calculado
Punto de fusión (° C)	225-228
Fórmula molecular	C ₂₉ H ₃₆ O ₄
Peso molecular (uma)	448

TABLA 8.2 Datos espectroscópicos experimentales

Valor espectroscópico obtenido	Asignación
UV (nm)	
λ máx	
240.98	CO α,β insaturada en C-6
IR (cm⁻¹)	
2939.93-2850.28	CH ₃ y CH ₂
1706.78	C=O de éster en C-3
1686.82	C=O en C-20 y/o C-6
1607.55	C=C de anillo aromático
1636.91	C=C conjugado en C-4
1451.26-1607.55	C-C de anillo aromático
1322.34-1451.26	CH ₃ y CH ₂ (confirmación)
1265.33	CH ₃ del éster acetoxi en C-3
1104.91	C-O-C del éster en C-3
756.63	Monosustitución al anillo aromático
RMN ¹H (ppm)	
0.673 (s,3H)	CH ₃ C-18
1.074 (s,3H)	CH ₃ C-19
2.145 (s,3H)	CH ₃ C-21
2.412 (s,3H)	CH ₃ para al carbonilo del éster C-3 ⁵
2.582(m,2H)	H ₂ en C-7
5.573 (m,1H)	H en C-3
6.232 (t,1H)	H en C-4
7.249 (m,2H)	H meta al carbonilo del éster en C-3 ⁴ (protones del anillo aromático)
7.949 (m,2H)	H orto al carbonilo del éster en C-3 ⁴ (protones del anillo aromático)
RMN ¹³C (ppm)	
1°	C18:13.292, C19:19.665, C21: 31.445, C3-6': 21.640
2°	C1:20.748, C11:22.779, C2:24.096,C12:24.259,C15:34.531, C16:38.318,C7:46.082
3°	C8:34.041, C9:51.036, C14:56.648, C17:63.255, C3:69.581, C4:129.288, C3-4':129.022, C3-3':129.731
4°	C10:38.271,C13:43.990, C3-5':143.766, C3-2':147.702, C3-1':166.233, C20:201.904, C6:208.969 y C5:127.280

EM(IE) (m/z)	
464	M ⁺
448	M ⁺ - (CH ₃) ₂
433	448 - (CH ₃) ₂
344	433 - 2(CH ₃ CO) ⁺
297	312 - (CH ₃) ₂
268	297 - (CH ₃ - CH ₂)
251	268 - (OH)
299	251 - (CH ₂ CO) ⁺
119	136 - (OH) (pico base)
91	119 - (CO)

EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA

5.1. Etapa 2: Evaluación biológica de la actividad antiandrógenica

La evaluación de la actividad antiandrógenica se realizó a los compuestos VII y VIII. Estos compuestos fueron evaluados con tres pruebas diferentes; dos *in vitro*, y un ensayo biológico *in vivo*.

Para el desarrollo de los experimentos se emplearon hámsteres machos de la cepa Syriam Golden con un peso promedio de 150-200 g y gonadectomizados 30 días antes del estudio. Los animales se mantuvieron en condiciones de bioterio, a una temperatura controlada de 22°C con períodos de luz y oscuridad de 12 h y comida y agua *ad libitum*. A continuación se describe cada uno de los experimentos realizados.

5.2. Experimentos *in vitro*:

5.2.1. Inhibición de la actividad de la enzima 5 α -reductasa presente en fracción microsomal de vesícula de hámster a pH= 7.0.

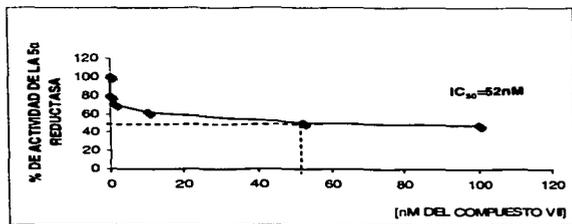
5.2.1.1. Obtención de la fracción microsomal y citosólica de las vesículas seminales de hámster.

Se sacrificaron 50 hámsteres machos con aproximadamente 72 horas de castración. Se separaron próstatas y vesículas seminales. Los tejidos se limpiaron perfectamente de grasa y se pesaron por separado. Los tejidos se homogeneizaron con una mezcla que contenía: 20 mM de HCl-tris, 1.5 mM EDTA, 20 mM molibdato de sodio y 10% glicerol, con relación al peso de tejido (v/p 3:1). Los homogenizados se centrifugaron a 140000 g, durante una hora a 2°C. Posteriormente se separó el precipitado (fracción microsomal) del sobrenadante (fracción citosólica). El precipitado se resuspendió en 3 volúmenes de medio A (0.32 M de sacarosa, 0.1 mM ditiotritol y solución 20 mM amortiguadora de fosfatos a pH=6.5) en relación con el peso del tejido obtenido inicialmente y se determinó el contenido de proteínas tanto en la fracción microsomal como en la citosólica, por el método de Bradford.²⁴

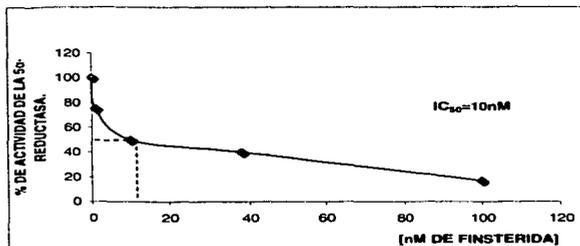
Con la fracción microsomal de vesícula seminal previamente obtenida, se realizó un estudio metabólico *in vitro* para conocer el posible efecto inhibitorio del esteroide sobre la enzima 5 α -reductasa.²⁶ Para realizar este bioensayo los esteroides a evaluar en concentraciones de 1×10^{-9} - 1×10^{-1} , 100×10^{-9} nM para VII y VIII y además 2×10^{-6} - 2×10^{-1} , 10×10^{-6} μ M para VIII se incubaron en presencia de 250 μ g de proteína de microsomas de vesícula seminal y una mezcla de incubación que contenía: 2 mM de testosterona tritiada T[H³], 2 mM de NADPH⁺, 1 mM de ditioneol y una solución amortiguadora 40 mM de fosfatos a pH= 7.0. El bioensayo se incubó durante una hora a una temperatura de 37°C con agitación constante.

Además, se preparó un control que contenía fracción microsomal y mezcla de incubación, sin inhibidor, el cual corresponde al 100 % de conversión. La incubación terminó con la adición de CH₂Cl₂, para después realizar extracciones sucesivas a la mezcla de reacción con el mismo disolvente. La separación de los productos tritiados T [H³] y DHT [H³] se realizó por CCF, en un sistema de elusión cloroformo/acetona (9:1). La región de la placa correspondiente a DHT [H³] (Rf 0.68) producto obtenido por la transformación de T [H³] a DHT [H³] en presencia de la enzima 5 α -reductasa, se colocó en viales con líquido de centelleo ultima Gool; finalmente se midió la radioactividad, utilizando un contador de centelleo (Packard tri-carb 2100TR).

Se determinó la cantidad de esteroide necesario para inhibir el 50 % de la actividad de la enzima 5 α -reductasa (IC₅₀). Los resultados se muestran en las Graficas 1 y 2. La comparación de los valores de IC₅₀ con las estructuras se muestra en la Tabla B (Pág., 44).

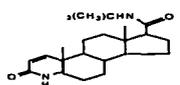
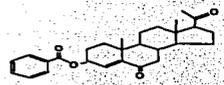
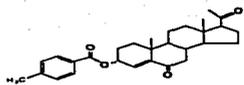


GRAFICA 1. INHIBICIÓN DE 5 α -REDUCTASA POR EL COMPUESTO VII. DETERMINACIÓN DEL IC₅₀.



GRAFICA 2. INHIBICIÓN DE 5 α -REDUCTASA POR LA FINASTERIDA. DETERMINACIÓN DE IC₅₀.

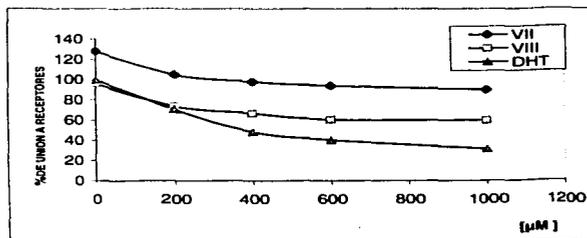
Tabla B. VALORES DE IC₅₀ COMPARADO CON ESTRUCTURAS QUÍMICAS

COMPUESTO	** IC ₅₀
 FINASTERIDA	10 nM
 COMPUESTO VII	52nM
 COMPUESTO VIII	No hay inhibición.

** IC₅₀: Cantidad de sustrato la cual inhibe el 50% de la actividad de la enzima.

5.2.2. Determinación de la unión a receptores en citosol de vesícula seminal

Este bioensayo se realizó con el fin de conocer si existe algún tipo de inhibición producida por los esteroides evaluados, hacia la unión a receptores androgénicos los cuales se encuentran presentes en el citosol de los tejidos dependientes de andrógenos como la vesícula seminal de hámster. Los compuestos VII y VIII se incubaron en concentraciones de 1×10^3 - 6×10^2 μM en presencia de 200 μl de citosol y 1 nM de dihidrotestosterona tritjada DHT [H^3] durante 18 h a 4°C. Terminado el tiempo de incubación se agregó una suspensión de carbón activado-dextrán para eliminar la radiactividad libre o no unida al receptor, incubando nuevamente durante 45 min. En hielo. Finalmente se separó el sobrenadante por centrifugación a 4000 rpm, durante 10 min a 14°C., midiéndose la radiactividad presente en el sobrenadante provocada por la DHT [H^3] unida al receptor. El análisis por competencia al receptor se llevó a cabo en presencia del sustrato natural, DHT (no marcada) o de los inhibidores. Los resultados obtenidos se presentan en la Gráfica 3.



GRAFICA 3. UNIÓN A RECEPTORES ANDROGÉNICOS.

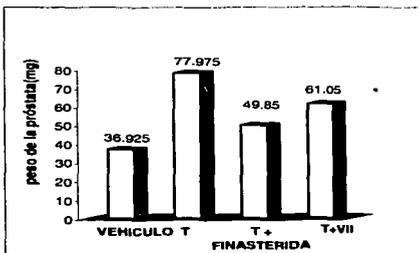
5.3. Experimentos *in vivo*:

5.3.1. Efecto del compuesto VII sobre vesícula seminal y próstata de hámster

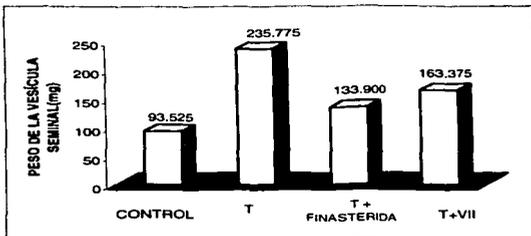
Es importante mencionar que al compuesto VIII no se le realizó esta prueba debido a que en los ensayos *in vitro* dio como resultado que no es un compuesto con actividad antiandrogénica.

Para realizar este ensayo biológico se utilizaron seis grupos de cuatro hámsteres cada uno, con diferentes tratamientos. Los animales se gonadectomizaron 30 días antes del experimento, manteniéndolos en condiciones de bioherio a una temperatura controlada de 22°C con comida y agua *ad libitum*. A cada uno de los animales de los

diversos grupos, se les administraron por vía subcutánea 200µg de testosterona y 400µg del esteroide disuelto en aceite de sésamo (ajonjolí) como vehículo. Se aplicaron inyecciones diarias por un periodo de 6 días. Se utilizaron 3 grupos de animales como controles; el primero de ellos se trató únicamente con vehículo, el segundo con una solución oleosa de testosterona y el tercero se trató con una solución oleosa de testosterona más finasterida. Después de seis días, los animales fueron sacrificados bajo la anestesia con éter y se obtuvieron las próstatas y las vesículas seminales, las cuales fueron pesadas más tarde²⁵. Los resultados obtenidos se muestran en la Gráficas 4 y 5.



GRÁFICA 4.EFECTO DEL COMPUESTO VII SOBRE EL PESO DE LA PRÓSTATA.



GRÁFICA 5. EFECTO DEL COMPUESTO VII SOBRE EL PESO DE VESÍCULA SEMINAL.

6.1. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

6.1.1. DISCUSIÓN DE RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN FARMACOLÓGICA

Los resultados del ensayo biológico *in vivo* muestran que los animales inyectados con T incrementan el peso de la próstata y de las vesículas seminales con respecto al control (animales tratados con vehículo). Mientras que aquellos animales que se trataron con finasterida presentaron la disminución del peso de las mismas tal y como está reportado.^{25, 26} Ahora bien, el compuesto VII disminuyó tanto el peso de la vesícula como el de la próstata, aunque no por debajo de la disminución provocada por la finasterida (Tabla B, Pág 44). Los resultados obtenidos del ensayo *in vitro* para la inhibición de la enzima demostraron que el compuesto VII se comporta como inhibidor, mientras que el compuesto VIII no, ya que no presenta un valor de IC₅₀ que permita decir lo contrario, como en el caso de la finasterida, cuyo IC₅₀ es de 10nM.

Por otra parte los resultados de unión a receptores (Tabla B, Pág. 44), mostraron que ninguno de los dos compuestos evaluados tienen afinidad hacia los receptores androgénicos presentes en VS y próstata.

6.1.2. DISCUSIÓN DE LA SÍNTESIS DE LOS COMPUESTOS

3 β -HIDROXI-5-PREGNEN-20-ONA (I)

Este esteroide fue utilizado como materia prima ya que presenta las funcionalidades químicas necesarias para ser transformado en el compuesto deseado. Se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas, tal como se presenta en las tablas 1.1 y 1.2 (Pág. 28).

En el IR (cm⁻¹) (Espectro 1, Pág. 61). Se encontraron dos absorciones en la zona de los carbonilos 1697.22 y 1681.40 siendo la última la señal más intensa la cual correspondió a la cetona en C-20. También se encontró la señal de 1642.22 que representa un doble enlace en C-5. Importante fue la señal de 3437.96 que correspondió al grupo alcohol en C-3. Por último, las señales de metilos y metilenos de 2927.93 y para confirmar los picos en el intervalo de 1381.11-1465.77.

RMN ¹H (ppm) (Espectro 2, Pág. 62). Presentó las siguientes señales: 3 singuletes en 0.633, 1.012 y 2.537 que integraron para tres protones cada uno, correspondientes a los protones de los metilos C-18, C-19 y C-21 respectivamente; un multiplete en 3.530 que integra para un protón de la base del alcohol en la posición C-3 y finalmente un doblete en 5.350 que corresponde al protón del carbono en la posición 6.

3 β -ACETOXI-5-PREGNEN-20-ONA (II)

El primer paso de síntesis fue la acetilación en C-3 de la materia prima. El método empleado consistió en la acetilación convencional mediante una mezcla de anhídrido acético y piridina formando de esta manera el electrófilo acetilpiridinio considerado como la especie acetilante. El producto acetilado se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas, tal como se presentaron en las tablas 2.1 y 2.2 (Pág. 29).

En el IR (cm⁻¹) (Espectro 3, Pág. 63). Se encontraron dos absorciones en la zona de los carbonilos en 1726.19 y 1704.89, correspondientes a los carbonilos del grupo acetoxi en C-3 y de la cetona en C-20, respectivamente. También se observaron señales correspondientes a metilos y metilenos en 2939.94, 1357.82 y 1434.64. Las señales en 1237.16 y 1027.07 representan la vibración del acetoxi éster y C-O-C del éster en C-3 respectivamente. Finalmente desaparece la señal que corresponde al alcohol de la materia prima, confirmando así la aparición del grupo acetilo.

En el EM (IE) m/z (Espectro 4, Pág.64). Mostró un ión molecular en 358 correspondiente al peso molecular del compuesto II. Apareció también un pico en 357 correspondiente a M-1, el pico en 342 indica la pérdida de 15 unidades equivalente al fragmento (CH₃)⁺ de M-1. El pico en 298 (pico base) se debió a la pérdida de un grupo (CH₃COO) de M-1. A su vez el pico 283 se forma por la pérdida del grupo (CH₃)⁺ del fragmento 298 (pico base). El pico en 255 se debió a la pérdida (C=O) del fragmento molecular 283 y el pico en 253 se debe a la pérdida de 2 (CH₃)⁺ del fragmento molecular 283.

En RMN¹H (ppm) (Espectro 5, Pág. 65). Presentó las siguientes señales: Dos singuletes 0.633 y 1.023 que integraron para 3 protones cada una, correspondientes a los protones de los metilos C-18 y C-19 respectivamente; 2 señales simples en 2.036 y 2.127 que integraron para 3 protones, cada una perteneciente al metilo C-21 y al metilo del grupo acetoxi en C-3 respectivamente; una señal múltiple que integra para un protón en 4.607 correspondiente al protón base del acetoxi en C-3. En la zona de protones vinílicos se observó un doblete en 5.380 que integra para un protón, el cual se debió al protón vinílico en C-6.

3 β -ACETOXI-5 α ,6 α -EPOXI-PREGNAN-20-ONA (III)

El tercer paso de la síntesis involucró la formación de un epóxido entre el C-5 y el C-6. Gracias a las adecuadas propiedades de solubilidad del sustrato y reactivo la epoxidación se realizó con MCPBA en medio ácido, produciéndose una reacción electrofílica concertada de un paso, donde se da el epóxido y el ácido directamente sin intermediario. Debido a que la reacción se lleva a cabo en medio ácido, pero en condiciones anhidras, el acetato en la posición C-3 se mantiene sin sufrir hidrólisis.

El compuesto obtenido se caracterizó mediante sus propiedades físicas y espectroscópicas, mostradas en las tablas 3.1 y 3.2 (Pág. 31).

En el IR (cm⁻¹) (Espectro 6, Pág. 66). La absorción de 1733.62 observada en el espectro como una banda intensa corresponde a un éster carboxílico en C-3. Se confirmó la presencia del mismo con la señal intensa de 1242.61 y 1034.40 del acetoxi éster y C-O-C en C-3 respectivamente. Se observó la señal de 752.80 correspondiente al grupo epóxido. Se siguieron presentando en 1703.32 las señales del carbonilo de cetona en C-20 y de metilos y metilenos en 2942.01 así como la confirmación de los mismos con los picos en el rango de 1360.16-1469.67.

En el EM (IE) m/z (Espectro 7, Pág.67). Mostró un ión molecular de 374 correspondiente al peso molecular del compuesto (III). También apareció un pico en 356 debido a la deshidratación que sufrió en primer paso el ión molecular. Las señales de 296 y 314 se debieron a la pérdida de 59 unidades o un grupo (CH₃COO) del ión molecular menos agua y del ión molecular respectivamente. Así también, el pico 281 se debió a la pérdida de 15 unidades o un metilo del fragmento 296; finalmente, 253 correspondiente a la pérdida de 28 unidades o un CO del fragmento 281.

En RMN¹H (ppm) (Espectro 8, Pág. 68). Se observó en el espectro que desaparece la señal de 5.380 que corresponde a un protón vinílico en C-6 de la reacción anterior (acetilación), para dar lugar a las señales de los protones relacionados al epóxido. Las señales simples en 0.595,1.232 y 2.019, que integran para 3 protones cada una, y corresponden a los metilos C-18, C-19 y C-21, respectivamente; finalmente, se siguieron manteniendo las señales de los protones unidos a carbonos del éster acetoxi en C-3 como son 2.504 que integra para 3 protones de metilo del éster.

3 β -ACETOXI-5 α -HIDROXIPREGNAN-6-20-DIONA (IV)

El siguiente paso en la ruta de síntesis fue la oxidación del epóxido que se encuentra entre el C-5 y C-6, para dar lugar a un grupo oxhidrilo y un carbonilo en C-5 y C-6 respectivamente. Utilizando como agente oxidante una mezcla de CrO₃/H₂O.

El compuesto obtenido se caracterizó mediante sus propiedades físicas y espectroscópicas, mostradas en las tablas 4.1 y 4.2 (Pág. 32).

En el IR (cm-1)(Espectro 9, Pág. 69). Se encuentran 3 absorciones 1737.02, 1715.44 y 1689.86 correspondientes a los carbonilos del grupo acetoxi en C-3, de las cetonas en C-20 y C-6 respectivamente. Se confirmó la oxidación del grupo epóxido con la aparición del carbonilo en C-6 y la aparición de una señal intensa en 3455.84, la cual corresponde al oxhidrilo en C-3. Las señales en 1232.08 y 1041.96 representan la vibración del éster acetoxi y C-O-C del éster en C-3 respectivamente. Se observaron señales correspondientes a metilos y metilenos en 2947.73 y se confirmaron con las señales en el intervalo de 1365.11-1450.62.

En EM (IE) m/z (Espectro 10, Pág. 70). Mostró un ión molecular en 390 correspondiente al peso molecular del compuesto IV. También apareció una señal en 391, que corresponde a M+1. Se observó un pico en 372 el cual se formó por la deshidratación del ión molecular. El pico en 330 representó el pico base y se formó por la pérdida del fragmento (CH₃COO)- del ión molecular. A su vez, el pico en 312 se debió a la deshidratación del fragmento molecular 330 o a la pérdida del fragmento (CH₃COO)- del fragmento molecular 372. El pico en 287 se debió a la pérdida de 59 unidades del grupo (CH₃-CO)+ del pico base 330 y el pico en 269 se debió a la deshidratación del fragmento molecular 287.

EN RMN¹H (ppm) (Espectro 11, Pág. 71). Un multiplete en 2.559, que integra para un protón correspondiente al oxhidrilo en C-5. Las señales simples en 0.601, 0.815 y 2.011 que integran para 3 protones cada una corresponden a los metilos C-18, C-19 y C-21 respectivamente. La señal simple en 2.127 que integra para 3 protones corresponde al metilo del grupo acetoxi en C-3. La señal múltiple de 5.044 que integra para un protón, se asignó al protón en C-3.

3β-ACETOXI-4-PREGNEN-6,20-DIONA (V)

El siguiente paso de la síntesis consistió en la eliminación del grupo OH en la posición C-5 para dar lugar a una doble ligadura entre los carbonos 4 y 5, para lo cual se utilizó piridina y cloruro de tionilo, debido a que este último se descompone fácilmente por el oxígeno fue necesario destilarlo y secarlo perfectamente. Para tomarlo y adicionarlo a la reacción se utilizó una atmósfera de nitrógeno llevándose a cabo la reacción en condiciones anhidras.

El compuesto obtenido se caracterizó mediante sus propiedades físicas y espectroscópicas, mostradas en las tablas 5.1 y 5.2 (Pág. 34).

En el IR (cm-1) (Espectro 12, Pág. 72). Se observó la señal del carbonilo del éster en C-3 en 1737.35 al igual que la señal de confirmación en 1243.01 y 1021.56 que corresponde al éster acetoxi y a la unión C-O-C en C-3. Apareció la señal de 1642.54 que nos indica una doble ligadura C=C en C-4 y que no está presente en el espectro

(9, Pág. 69) de la reacción anterior de oxidación. Por el contrario aquí se perdió la señal intensa del alcohol 3455.84, esto debido a que en la reacción de eliminación el OH da lugar a la doble ligadura en C-4. Finalmente, las señales del carbonilo de cetona en C-20 y/o C-6 de 1698.99, así como las señales de metilos y metilenos 2958.58 y la confirmación en el intervalo de 1361.87-1436.66.

EN EL UV (nm) (Espectro 13, Pág. 73). En este compuesto se observó la presencia de un grupo cromóforo CO α , β -insaturado en C-6 con $\lambda_{\text{máx}}$ de 235.37 conjugado con la doble ligadura en C-4.

En EM (IE) m/z (Espectro 14, Pág. 74). Mostró un ión molecular de 372 correspondiente al peso molecular del compuesto V. Por otro lado el ión molecular al perder 43 unidades del fragmento (CH₃CO)⁺ generó el pico en 330 el cual a su vez al perder 60 unidades de un (CH₃COOH)⁺ y 15 de un CH₃ dio dos picos en 269 que corresponde al pico base y 315 respectivamente. La señal correspondiente a 255 se debió a la pérdida de un etilo con valor de 14 unidades del fragmento 269, finalmente el pico con valor de 227 corresponde a la pérdida de un CO con valor de 28 unidades del fragmento 255 así como también se volvió a perder otro CO del fragmento 227 para dar lugar al pico con valor de 199.

EN RMN¹H (ppm) (Espectro 15, Pág. 74). Observamos una señal en 6.100, triplete que integra para 1 hidrógeno, el cual corresponde a un protón vinílico en C-4. Sigue presente el multiplete que integra para 1 H ahora en 5.350 y que nos indica el protón en la posición C-3. Los protones en posición alfa con respecto a un grupo carbonilo absorben entre 2.0 y 2.5, en este caso se observó una señal en 2.580 que integra para 2 protones y se asignaron a los protones en C-7. También se observaron las señales simples en 0.662, 1.031 y 2.070, que integran para 3 protones cada una, y corresponden a los metilos C-18, C-19 y C-21, respectivamente. Finalmente el singulete que integra para los 3 protones en 2.138 ppm se asignó al éster acetoxi en C-3.

3 β -HIDROXI-4-PREGNEN-6,20-DIONA (VI)

El siguiente paso de síntesis consistió en la hidrólisis del grupo acetato para regenerar el hidroxilo en C-3.

Esta reacción se llevó a cabo a temperatura ambiente, en medio básico y empleando como disolvente metanol. El compuesto hidrolizado obtenido se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas. Tablas 6.1 y 6.2 (Pág. 35 y 36).

En el IR (cm⁻¹) (Espectro 16, Pág. 76). Apareció una banda en 3406.23cm⁻¹ correspondiente al oxhidrilo en C-3, con la desaparición de las señales del C-O-C del éster en C-3 y el éster acetoxi confirmando así la hidrólisis, para dar lugar a pequeños picos en el intervalo de 1100-1250 que representan señales de la unión C-O. Se observó una señal 1686.95 en la zona de los carbonilos de las cetonas correspondiente al C-6 y/o

C-20. Apareció una banda en 1631.12 que corresponde al vinilo. Se observaron señales correspondientes a metilos y metilenos en 2941.95 y la confirmación en 1353.81-1423.62.

En el UV (nm) (Espectro 17, Pág. 77). De este compuesto se observó la presencia de un grupo cromóforo CO α , β - insaturado en C-6 con $\lambda_{\text{máx}}$ de 239.38 conjugado con la doble ligadura en C-4.

La EM (IE) m/z (Espectro 18, Pág. 78). Mostró un ión molecular de 330 correspondiente al peso molecular del compuesto VI. También apareció una señal en 315 que representa el pico base y se debió a la pérdida del fragmento (CH₃)⁺ del ión molecular. Se observó un pico en 297 el cual se formó por la deshidratación del fragmento molecular 315 (pico base). A su vez hay un pico en 287m/z debido a la pérdida del grupo (CH₃-CO)⁺ del fragmento molecular 330 o bien debido a la pérdida de (C=O)⁺ del fragmento 315. Hay un pico en 245 que se debió a la pérdida de (CH₃-C=)⁺ del fragmento molecular 287. Finalmente la señal de 245 y 227 se debió a la pérdida de un grupo (CH₃-CO)⁺ y (CH₃-COOH) del fragmento 287 respectivamente.

En la RMN¹H (ppm) (Espectro 19, Pág. 79). Presentó las siguientes señales: apareció un triplete que integra para un protón en 4.256 correspondiente al hidrógeno base del oxhidrilo en C-3, confirmando la hidrólisis. Se observaron 3 singuletes 0.660, 1.014 y 2.139 que integran para 3 protones cada una, correspondientes a los metilos C-18, C-19 y C-21 respectivamente. Finalmente un triplete que integró para un protón en 6.188 el cual correspondió al protón vinílico en C-4.

3 β -BENZOILOXI-4-PREGNEN-6,20-DIONA (VI)

La esterificación del grupo oxhidrilo en C-3 del compuesto (VI) se llevó a cabo con ácido benzoico para dar lugar a un nuevo compuesto cuya estructura se elucidó por sus propiedades físicas y espectroscópicas presentadas en la tablas 7.1 y 7.2. (Pág. 37).

En el IR (cm⁻¹) (Espectro 20, Pág. 8). Se comprobó la esterificación del oxhidrilo en la posición C-3, con la desaparición de la banda en 3406.23 que se ve en el espectro (16, Pág. 76) y la presencia de 2 señales en la zona de carbonilos, la primera en 1716.88 que correspondió al carbonilo del éster en C-3 la segunda de 1702.34 que correspondió al C=O en C-6 y/o en C-20. Se observó también la señal en 1627.52 correspondiente a un doble enlace conjugado en C-4.

El pico en 1600.85 confirmó la presencia del anillo aromático en C-3¹ así como la señal de 1584.28, estas dos señales son características de anillos aromáticos; se confirmó aún más con las señales de 1452.59 a 1600.85 de C-C de anillo aromático y 713.09 que corresponde a una monosustitución al mismo.

Se observaron absorciones fuertes en el intervalo de 1106.12 a 1270.09 que corresponden a la unión C-O-C y al éster acetoxi en el C-3. Finalmente se observaron señales correspondientes a metilos y metilenos de 2945.08-2852.28 y la confirmación en 1357.91-1452.59.

En el UV nm (Espectro 21, Pág. 81): Se observó la presencia de un grupo cromóforo CO α , β - insaturado en C-6 con una $\lambda_{\text{máx}}$ de 232.13 conjugado con la doble ligadura en C-4.

La EM (IE) m/z (Espectro 22, Pág. 82). Mostró un ión molecular de 434 correspondiente al peso molecular del compuesto (VII). Por otro lado el ión molecular al perder una molécula de agua con valor de 18 unidades da el valor de 416 que corresponde a otro pico el cual al perder 87 unidades de $(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{CH}_2\text{COO})^+$ generó otro pico en 329. La señal 312 corresponde a la pérdida de un OH con valor de 17 unidades del fragmento 329. La pérdida de un metilo del fragmento 312 dio otro pico en 297 el cual al perder 28 unidades (CO) y un CH_2 con valor de 14 unidades dio dos picos en 269 y 105 respectivamente, siendo este último el pico base; finalmente se observó el pico de 251 debido a la pérdida de 18 unidades de una molécula de agua del fragmento 269.

En la RMN¹H (ppm) (Espectro 23, Pág. 83). Se observó una señal en 6.235 como un doblete que integra para 1 hidrógeno, en C-4. Siguió presente el multiplete que integra para 1 H ahora en 5.580 y que indica el protón en la posición C-3. Los protones en posición alfa con respecto a un grupo carbonilo absorben entre 2.0 y 2.5²⁸, en este caso se observó una señal en 2.586 que integra para 2 protones que se asignó al C-7.

También se observaron las señales simples en 0.674, 1.078 y 2.162, que integran para 3 protones cada una, y corresponden a los metilos C-18, C-19 y C-21, respectivamente. Finalmente las señales de 7.441 y 7.563 corresponden a los protones en posición meta al carbonilo del éster en C-3³¹ y la señal de 8.075 a los que están en posición orto.

En la RMN¹³C (ppm) (Espectro 24,25. Pág. 84,85). Reafirmó la formación del éster al aparecer 3 señales en la región de carbonilos 208.959, 201.876 y 166.145; las dos primeras corresponden a carbonilo de cetona que en teoría tiene un desplazamiento químico de alrededor de 200 y la última que corresponde a un carbonilo de éster los cuales tienen desplazamientos de alrededor de 170 a 180. Los carbonos α al carbonilo generalmente absorben entre 30 (metilo) y a 44 (metileno);²⁷ por lo tanto, también se confirmó la presencia del metilo α al carbonilo en C-20 por la señal de 31.459 el cual es un carbono primario y el etilo también α al carbonilo ($\text{CH}_2\text{-C=O}$) que se encuentra en la posición C-7 de 46.077. Los carbonos enlazados al oxígeno de los ésteres absorben alrededor de 60 a 80;²⁷ por lo tanto, también se confirmó la presencia del éster al tener una señal de 69.791 que corresponde al carbono terciario unido al O-éster en C-3. Por otro lado los átomos aromáticos de carbono absorben a unos 120 a 150 en la espectrometría de C¹³.⁽²⁷⁾ con las señales de carbonos terciarios en 133.065 para (C3-5'), 130.002 (C3-3'), 129.694 (C3-4') y un cuaternario en 147.796 (C3-2'), se puede afirmar la presencia del anillo aromático del éster. Finalmente en 38.276, 43.986 y

129.078 aparecieron los carbonos cuaternarios correspondientes a C-10, C-13 y C-5 respectivamente. El C-4 es un carbono vinílico del anillo A terciario con un valor de 128.307. Los otros carbonos terciarios C-8, C-9, C-14 y C-17, cuyas señales las encontramos en 34.022, 51.008, 56.625 y 63.236 respectivamente. Finalmente los otros dos carbonos primarios aparecen a campo alto, como podemos apreciarlos en 13.292 y 19.646 para C-18 y C-19 respectivamente.

3 β -(*p*-TOLUILOXI)-4-PREGNEN-6,20-DIONA (VIII)

La esterificación del grupo oxhidrilo en C-3 del compuesto VI se llevó a cabo con ácido *para*-tolúico para dar lugar a un nuevo compuesto cuya estructura se elucidó por sus propiedades físicas y espectroscópicas presentadas en las tablas 8.1 y 8.2. (Pág. 39 y 40).

En el IR(cm⁻¹) (Espectro 26, Pág. 86): Se volvió a comprobar la esterificación del oxhidrilo en la posición de C-3, con la desaparición de la banda en 3406.23 que se ve en el espectro (16, Pág. 76) y la presencia de 2 señales en la zona de carbonilos al igual que el compuesto (VII), la primera en 1706.78 que corresponde al carbonilo del éster en C-3 la segunda de 1686.82 que corresponde al C=O en C-6 y/o en C-20. Se observó también la señal en 1636.91 correspondiente a un doble enlace en C-4 y que además es un enlace conjugado. También hay un pico ahora en 1607.55, el cual habla de la presencia del anillo aromático en C-3¹; se confirmó aún más con las señales de 1451.26 a 1607.55 de C-C de anillo aromático y 756.63 que corresponde a una monosustitución.

Se observaron absorciones fuertes en el intervalo de 1104.91 a 1265.33 que corresponden a la unión C-O-C y al éster acetoxi en el C-3. Finalmente; se observaron señales correspondientes a metilos y metilenos de 2939.93-2850.28 así como la confirmación en 1322.34-1451.26.

En el UV nm (Espectro 27, Pág. 87): Se observó la presencia de un grupo cromóforo CO α , β - insaturado en C-6 con una $\lambda_{\text{máx}}$ de 240.98 conjugado con la doble ligadura en C-4.

La EM (IE) m/z (Espectro 28, Pág. 88). Mostró un ión molecular de 464 correspondiente al peso molecular del compuesto VIII. Por otro lado, éste, al perder un metilo, presentó un pico en 448 que a su vez perdió otro metilo y dio la señal en 433. El pico correspondiente a 344 se debió a la pérdida de dos (CH₃CO)⁺ del fragmento 433. La pérdida de un metilo de 312 dio otro pico en 297 el cual al perder 29 unidades (CH₃CH₂)⁺ presentó el pico en 268 que al perder un OH dio otro pico en 251, este menos un (CH₂CO)⁺ con valor de 42 unidades una señal en 299. Finalmente, 136 menos un OH presentó el pico base de 119 y este a su vez con la pérdida de un CO el pico en 91.

En la RMN¹H (ppm) (Espectro 29, Pág. 89). Se observó una señal en 6.232 que es un doblete que integra para 1 hidrógeno, en C-4. Sigue presente el multiplete que

integra para 1 H ahora en 5.573 y que indica el protón en la posición C-3. Los protones en posición alfa con respecto a un grupo carbonilo absorben entre 2.0 y 2.5²⁷, en este caso también se observó una señal en 2.582 que integra para 2 protones que se asignaron al C-7.

Se observan las señales simples en 0.673, 1.074 y 2.145, que integran para 3 protones cada una, y corresponden a los metilos C-18, C-19 y C-21, respectivamente.

Las señales de 7.249 y 7.949 corresponden a los protones en posición *meta* y *orto* al carbonilo del éster en C-3^{4'} y C-3^{3'}, respectivamente. Así como también apareció una nueva señal que no está presente en el espectro 23 del compuesto (VII) y es de 2.412 que integra para 3 protones y se trata de los protones del metilo del anillo aromático en posición para al carbonilo del éster en C-3^{5'}.

En la RMN¹³C (ppm) (Espectro 30, 31. Pág. 90,91). Debido a que las estructuras de los compuestos VII y VIII sólo se diferencian en el metilo para al carbonilo del éster que tiene este último, se presentaron casi las mismas señales con un valor muy semejante. Por lo tanto se volvió a confirmar la formación del éster al aparecer 3 señales en la región de carbonilos 201.904, 208.969 y 166.233; las dos primeras corresponden a carbonilo de cetona en C-20 y C-6 que en teoría tienen un desplazamiento químico de alrededor de 200 y la última que corresponde a un carbonilo de éster los cuales tienen desplazamientos de alrededor de 170 a 180²⁷. Los carbonos α al carbonilo generalmente absorben entre 30 (metilo) y a 44 (metileno)²⁷, por lo tanto, aquí también se confirmó la presencia del metilo α al carbonilo en C-20 por la señal de 31.445 el cual es un carbono primario y el etilo también α al carbonilo (CH₂-C=O) que se encuentra en la posición C-7 de 46.082. Los carbonos enlazados al oxígeno de los ésteres absorben alrededor de 60 a 80²⁷, por lo tanto también se confirmó la presencia del éster al tener una señal de 69.581 que corresponde al carbono terciario unido al O-éster en C-3. Por otro lado los átomos aromáticos de carbono absorben a unos 120 a 150 en la espectrometría de C¹³ (27) con las señales de carbonos terciarios en 129.022 para (C3-4'), 129.731 (C3-3') y dos cuaternarios en 147.702 (C3-2') y una nueva señal en 143.766 (C3-5'), que hace la diferencia entre el compuesto VII y éste y que además no esta presente en el espectro del primero con lo que se confirma el grupo metilo en la posición para del anillo aromático. Finalmente en 38.271, 43.990 y 127.280 aparecen los carbonos cuaternarios correspondientes a C-10, C-13 y C-5 respectivamente. El C-4 es un carbono vinílico del anillo A terciario con un valor de 128.288. Los otros carbonos terciarios C-8, C-9, C-14 y C-17, cuyas señales las encontramos en 34.041, 51.036, 56.648 y 63.255 respectivamente. Los otros dos carbonos primarios aparecieron a campo alto, se pueden apreciar en 13.292 y 19.665 para C-18 y C-19 respectivamente así como también muy importante otra nueva señal con valor de 21.640 y que corresponde al (C3-6') carbono del metilo en posición para al carbonilo del éster, esta señal no se observa en el espectro (Espectro 24,25. Pág. 84,85) del compuesto VII con el que estamos comparando.

6.2. CONCLUSIONES:

En este trabajo se llevó a cabo la síntesis orgánica de dos compuestos de naturaleza esteroidal que sólo difieren en el grupo metilo en la posición *para* del anillo bencénico en C-3: 1.- 3 β -BENZOILOXI-4-PREGNEN-6,20-DIONA (VII) y 2.- 3 β -(*p*-TOLUILOXI)-4-PREGNEN-6,20-DIONA (VIII).

Su caracterización se logró mediante sus propiedades físicas (p.f.) y espectroscópicas (UV, IR, RMN¹H y ¹³C, EM (IE)).

Se efectuó la evaluación farmacológica *in vitro* e *in vivo* para el caso del compuesto VII en el caso del compuesto VIII sólo la primera. De lo anterior se concluye que:

El compuesto VIII no presentó actividad antiandrogénica ya que no inhibe la enzima 5 α -reductasa, ni tiene afinidad hacia los receptores androgénicos.

Por el contrario el compuesto VII se consideró con actividad antiandrogénica ya que presentó inhibición de la enzima 5 α -reductasa; este compuesto tiene propiedades semejantes a la finasterida la cual no se une a receptores de andrógenos, sin embargo disminuye el peso de la próstata y las vesículas seminales, (Gráficas 4 y 5) (Pág., 46).

El hecho de que el compuesto VII inhiba a la enzima 5 α -reductasa, mientras que el VIII no tenga este efecto, sugiere que el grupo metilo en la posición *para* del anillo bencénico en C-3 de este último (Pág.27, VIII), es determinante para que la enzima sea o no inhibida.

El compuesto VII sintetizado puede ser estudiado clínicamente para determinar sus efectos colaterales ya que puede competir con la finasterida en el futuro.

GLOSARIO:

NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato.
UV	Ultravioleta.
IR	Infrarrojo.
RMN 1H	Resonancia Magnética Nuclear Protónica.
RMN 13C	Resonancia Magnética Nuclear de Carbono 13.
EM (IE)	Espectro de Masas por Impacto Electrónico.
p.f.	Punto de fusión.
DNA	Ácido desoxirribonucleico.
RNAm	Ácido ribonucleico (mensajero).
CoCl ₂	Cloruro de cobalto.
CCF	Cromatografía en Capa Fina.
TMS	Tetrametilsilano.
CDCl ₃	Cloroformo Deuterado.
AcOEt	Acetato de etilo.
VS.	Vesícula Seminal.
3[H]	Tritiada. (marcado con tritio)
DEPT	Distortion Enhancement Proton Transference.
Tris	Búffer Trisma.
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético.
ppm	Partes por millón.
Nm	Nanometros.
m/z	Relación masa del ión /carga.

BIBLIOGRAFÍA

- 1.- Microsoft ® Encarta ® *Biblioteca de Consulta* (2003). © 1994-2003 Microsoft Corporation. Reservación todos los derechos.
- 2.-Cameron, Robert B; (1994). *Oncología práctica*. Madrid: Editorial Médica Panamericana, Manual oncológico multidisciplinar que aborda desde los principios básicos hasta cada neoplasia específica.
- 3.-Ramzi s. cotran, Vinay Kumar y Stanley L Robbins; (1990). *Patología Estructural y Funcional*. 4ª. Edición; Edit. Interamericana. McGrae-Hill. Madrid. 11: 1173-1176.
- 4.-Brian W Metcalf, Mark A. Levy and Dennis A. Holt; (1997). *Inhibitors of steroid 5 α - reductase in benign prostatic hyperplasia, male pattern baldness and acne*. Science. 12: 492-495.
- 5.-Santen R; (1989). *Hormonal Therapy of prostate cancer: Choosing among several available options*. Int. J. of Androl. 12: 165-173 .
- 6.-Wakeling A; (1978). *Antihormones and other steroid analogues*, in: Green B. and Leake R. (eds), *Steroid hormones, a Practical Approach*. IRL Press, Washington. 3: 219-236.
- 7.-Fruzzecetti, F.; Bersi, Ch.; Parrini, D.; Ricci, C.; Genazzani, A.R.; (1999). *Treatment of hirsutism: comparisons between different antiandrogens with central and peripheral effects, Fertility and Sterility*. 71: 445-451.
- 8.-Valencia N; (1997). *Síntesis de derivados del pregnano con un grupo fenilo en configuración β - en C-16 como antiandrógenos potenciales para el tratamiento del cáncer de próstata*. Tesis de Maestría de la Facultad de Química UNAM.
- 9.-Martínez A; (1997). *17- α -hidroxy-16 β -metil-4,6-pregnadien-3,20-diona como un intermediario en la síntesis de andrógenos* . Tesis de Licenciatura de la Facultad de Química UNAM.
- 10.-Burton J.L; Laschet U; Shuster S; (1973). *Reduction of sebum excretion in man by the antiandrogen, cyproterone acetate*. Brit J Dermatology. 89: 487-490.
- 11.-Saunders H.L; Holden K; Kerwin J.F; (1964). *The anti-androgenic activity of 17 α -methyl- β -nortestosterone*. Steroids. 3: 687-698.
- 12.- Dra.Marisa Cabeza Salinas; Dr.Eugene Bratoeff Titeff; Dra.Elena Ramirez López. (2003). *Mecanismo de Acción de Antiandrógenos Esteroidales*. Depto.Sistemas Biológicos, UAM-X. En prensa.

13.- Bratoeff, E.; Cabeza, M.; Ramírez, E.; Flores, E.; Quiroz, A.; Heuze, I. Ivonne.; (2003). Steroidal Antiandrogens and 5 α -reductase inhibitors, *Current Medicinal Chemistry*. 3: 225-237.

14.- Dra. Rachel Mata Essayay; M. en C. José Fausto Rivero Cruz. *Curso Teórico de Farmacognosia*. Material didáctico. Segunda versión. Depto de Farmacia. Facultad de Química. UNAM. P-120.

15.- Orten J.M y Neuhaus, O.W; (1984). *Bioquímica Humana*. 10^ª. edición, Edit. Médica Panamericana, Argentina. Pp.644-648.

16.- Loven M.A; Wood J.R; Nardulli A.M; (2001). *Interaction of estrogen receptors alpha and beta with estrogen response elements*. *Moll Cell Endocrinol* . 181: 151-163.

17.- Landers P. and Spelsberg Y.C; (1992). *New concepts in steroid hormone action: Transcription factors, proto-Oncogenes and cascade model for steroid regulation of gene expression*. *Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression*. 2: 19-63.

18.- Jenkins E.P; Anderson S; Imperato- Mc Ginley J; Wilson J.D; Russell D.W; (1992). *Genetic and Pharmacological evidence for more than one human steroid 5- α reductase*. *J.Clin.Invest*. 89: 293-300.

19.- Armenian H. K; Lilienfeld A.M; Diamond E.L; Bross I.D.J; (1974). *Relation Between benign prostatic hyperplasia and cancer of the prostate: A prospective and retrospective study*. *Lancet* , pp.115-117.

20.- Griffiths K., Akaza H., Eaton C . L., Habib F., Lee C., Robl P., Sciarra F; (1991). *Hormones, Growth Factors and Benign Prostatic Hyperplasia (BPH)*. The International Consultation on Benign Prostatic Hyperplasia (BPH). Ed. Cockett A.T.K., Aso Y., Chatelain C. Denis L., Griffiths K., Khoury S., Murphy G., S.C.I. pp.23-49.

21.- Calderón, D; (1997). et al. *Antiandrógenos más usuales*. Reflexiones sobre la síntesis orgánica. *Revista mexicana de las Ciencias farmacéuticas*. 28: 24-29.

22.- Goodman & Gilman's CD-ROM; (2002). *THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS*, Mc_Graw-Hill, 9th edition, Table 5-1, USA.

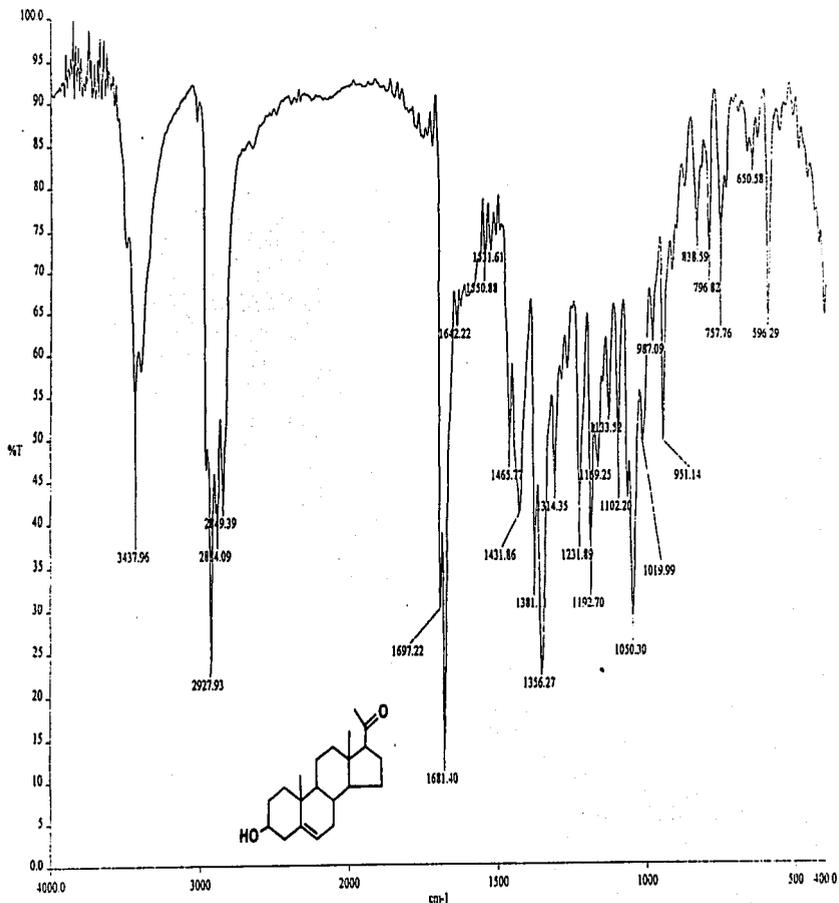
23.- Iwasaki Otake, D; (2000). *SÍNTESIS DE 17 α -BEZOILOXI-16 β -METILPREGNAN-4,6-DIEN-3,20-DIONA COMO UN ANTIANDRÓGENO ESTEROIDAL*, Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM, México.

24.- Bradford, M; A; (1976). *A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Micro quantities of Protein*. *Ann. Biochem*. 72: 248.

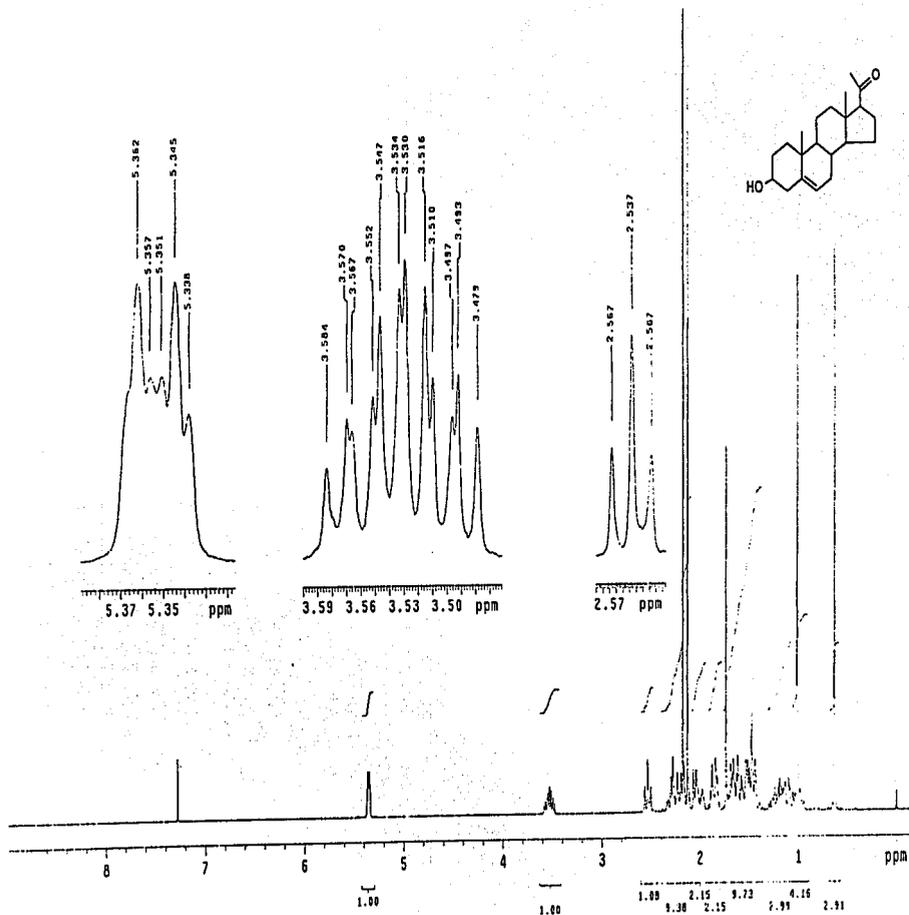
25.-Cabeza,M; Heuze, I.; Bratoeff, È.; Ramírez, E.; Martínez, R.; (2001). *Evaluation of New Pregnane Derivatives as 5 -reductase Inhibitors*,Chem.Phar.Bull. 493: 525.

26.-Bratoeff, E.; Ramírez, E.; Murillo, E.; Flores, G.; Cabeza, M.; (1999). *Steroidal Antiandrogens and 5-reductase Inhibitors*, Current Medicinal Chemistry . 53: 1007-1023.

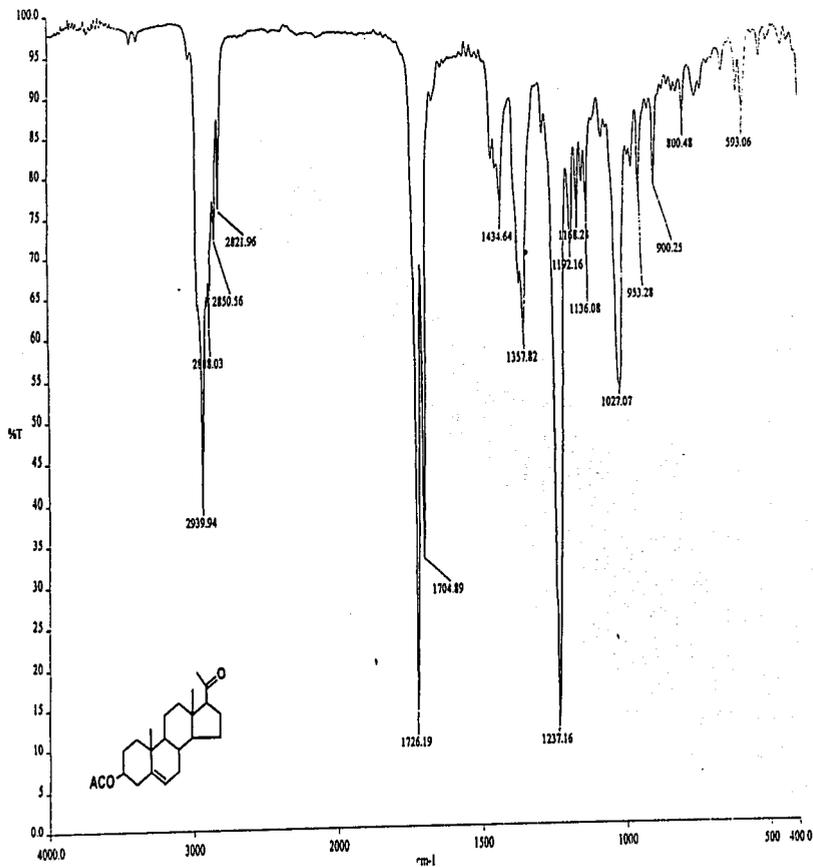
27.-L.G.Wade,JR; (1999). QUIMICA ORGÁNICA, Prentice-Hall-Hispanoamericana,S.A. Segunda edición, pp- 828,751,1002 .



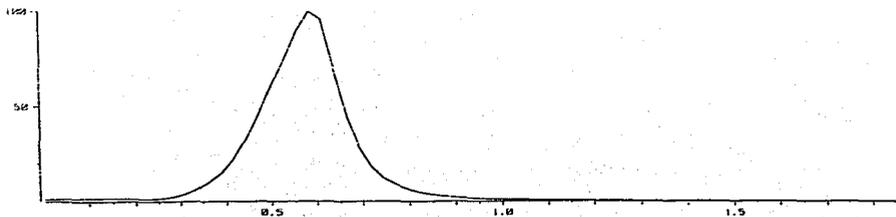
Espectro I IR de 3β-HIDROXI-5-PREGNEN-20-ONA (I)



Espectro 2 RMN¹H de 3β-HIDROXI-5-PREGNEN-20-ONA (I)



Espectro 3 IR de 3β-ACETOXI-5-PREGNEN-20-ONA (!!)

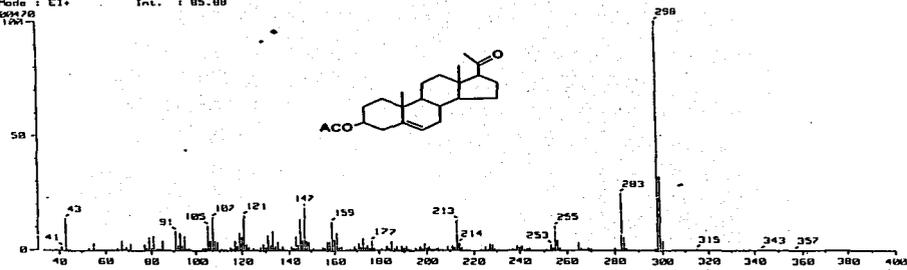
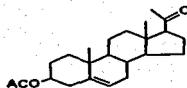


[Mass Spectrum]
 RT : 0.58 min
 Ion Mode : EI+

Scan# : (22,23)
 Int. : 85.88

Temp : 6.4 deg.C

Time (min.)

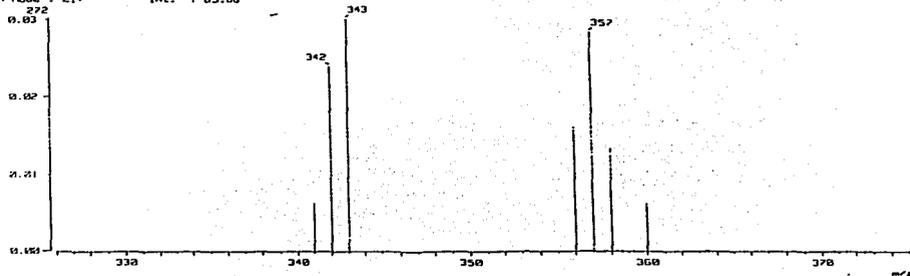


[Mass Spectrum]
 RT : 0.58 min
 Ion Mode : EI+

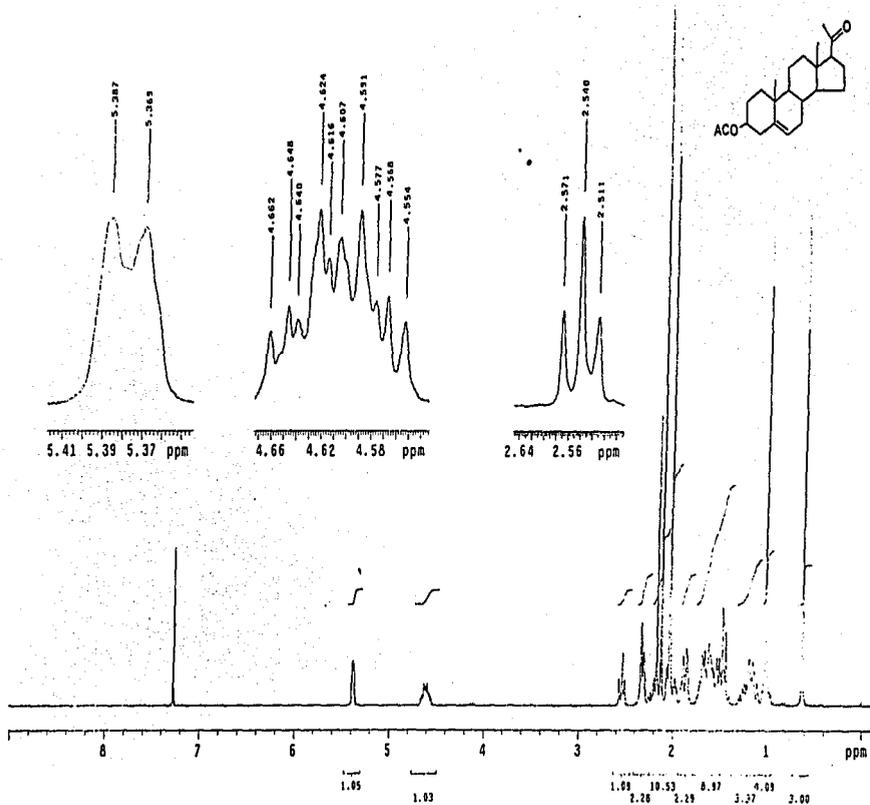
Scan# : (22,23)
 Int. : 85.88

Temp : 6.4 deg.C

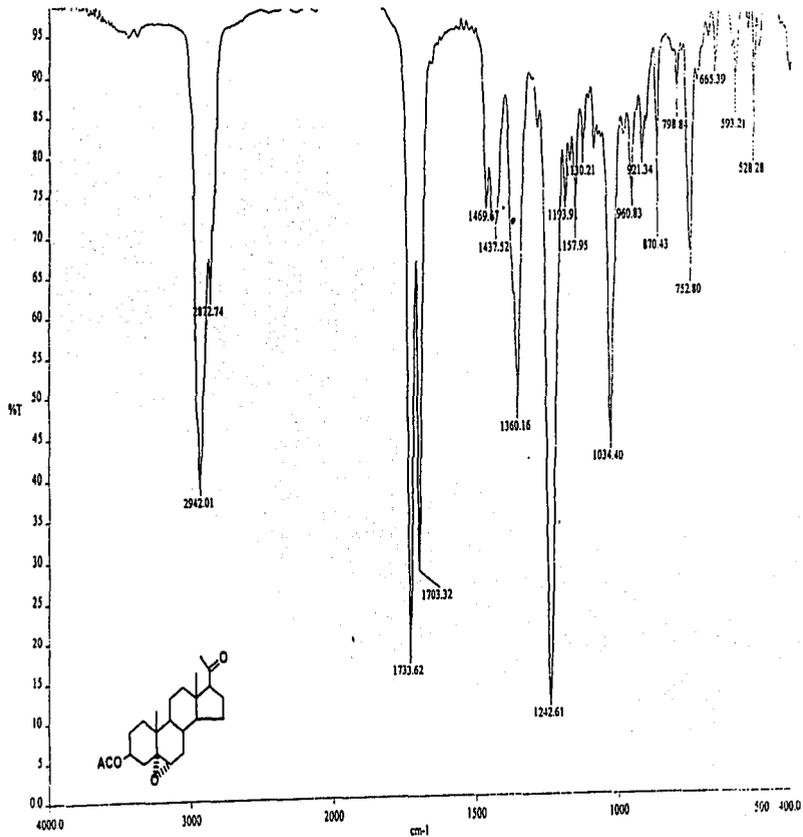
m/z



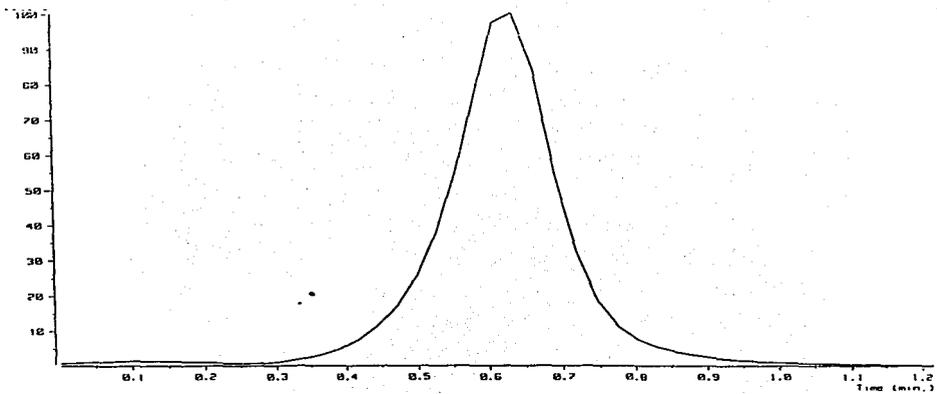
Espectro 4 EM (IE) de 3 β -ACETOXI-5-PREGNEN-20-ONA (II)



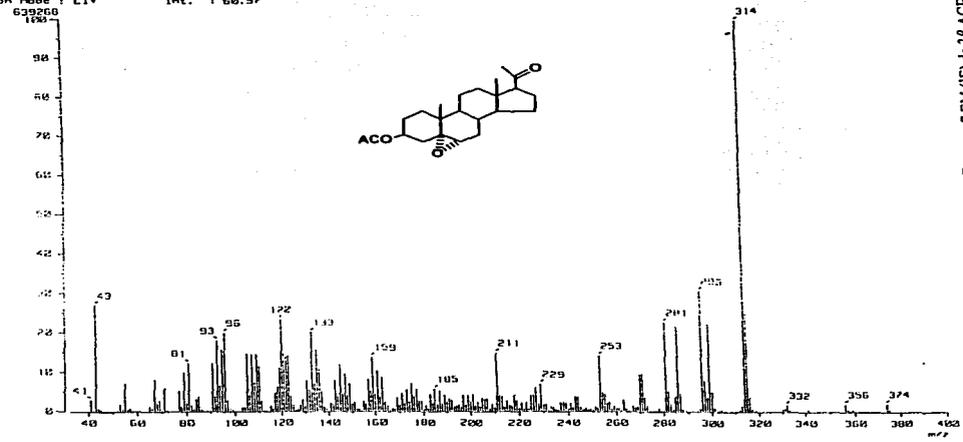
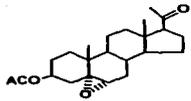
Espectro 5 RMN¹H de 3- β -ACETOXI-5-PREGNEN-20-ONA (II)



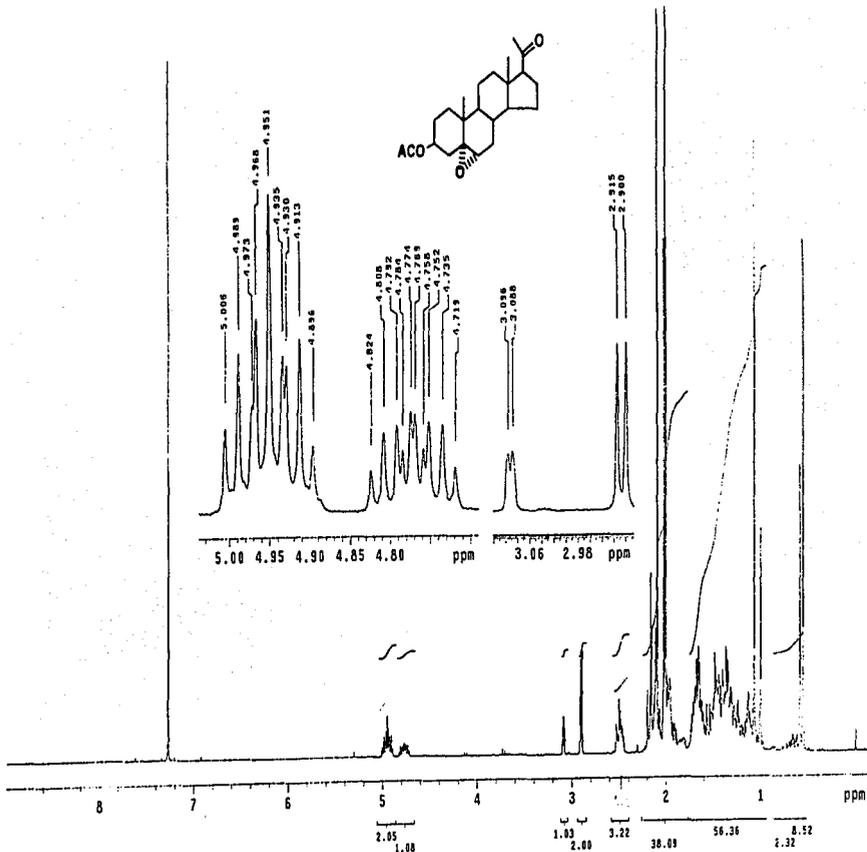
Espectro 6 IR de 3β-ACETOXI-5α,6α-EPOXI-PREGNAN-20-ONA (III)



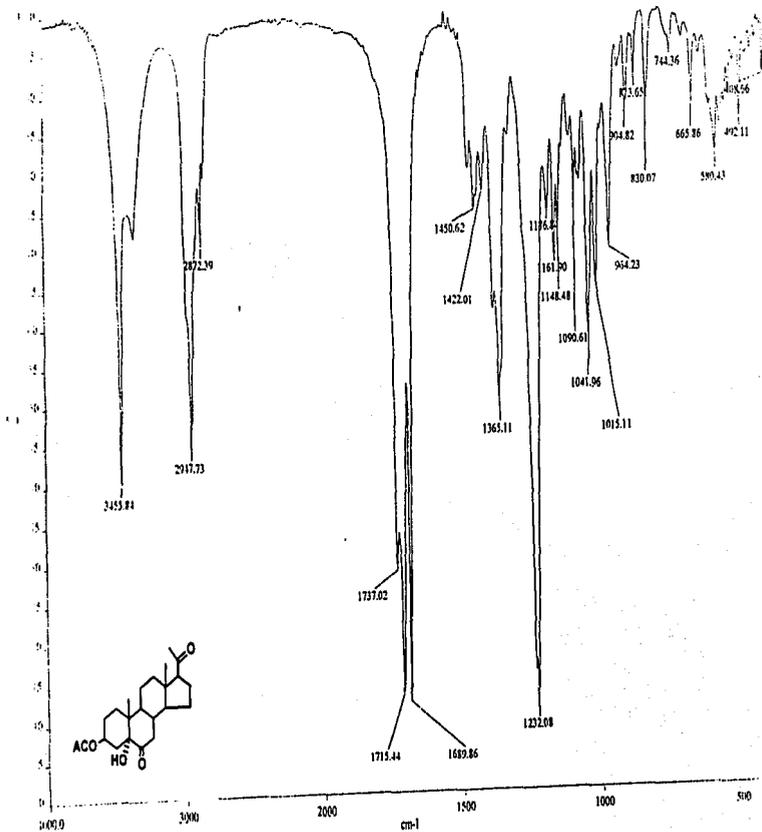
Mass Spectrum 1
 1 : 0.61 min
 on Mode : L1+
 639268
 Scans : (23,24)-(6,18)-(32,33) Temp : 23.9 deg.C
 Int. : 60.97



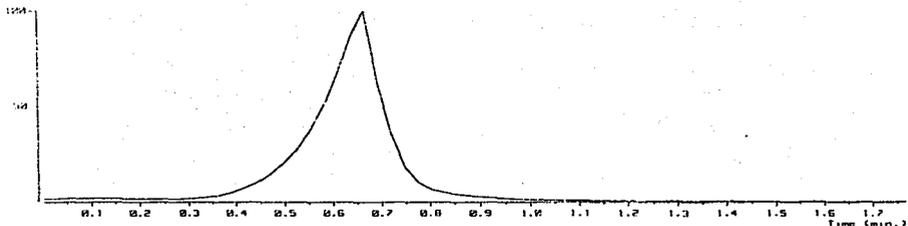
Espectro TEM (E) de 3 β -ACETOXI-5 α -6 α -EPOXI-PREGNAN-20-ONA (III)



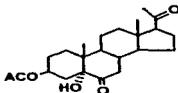
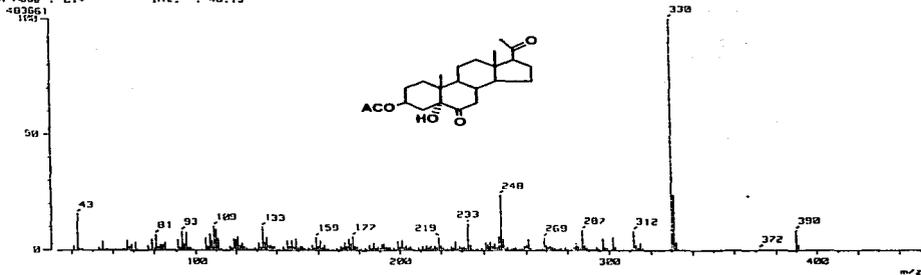
Espectro 8 RMN¹H de 3β-ACETOXI-5α,6α-EPOXI-PREGNAN-20-ONA (III)



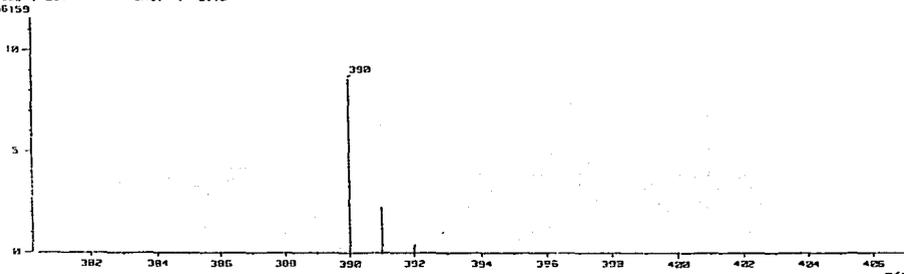
Espectro 9 IR de 3β-ACETOXI-5α-HIDROXIPREGNAN-6,20-DIONA (IV)



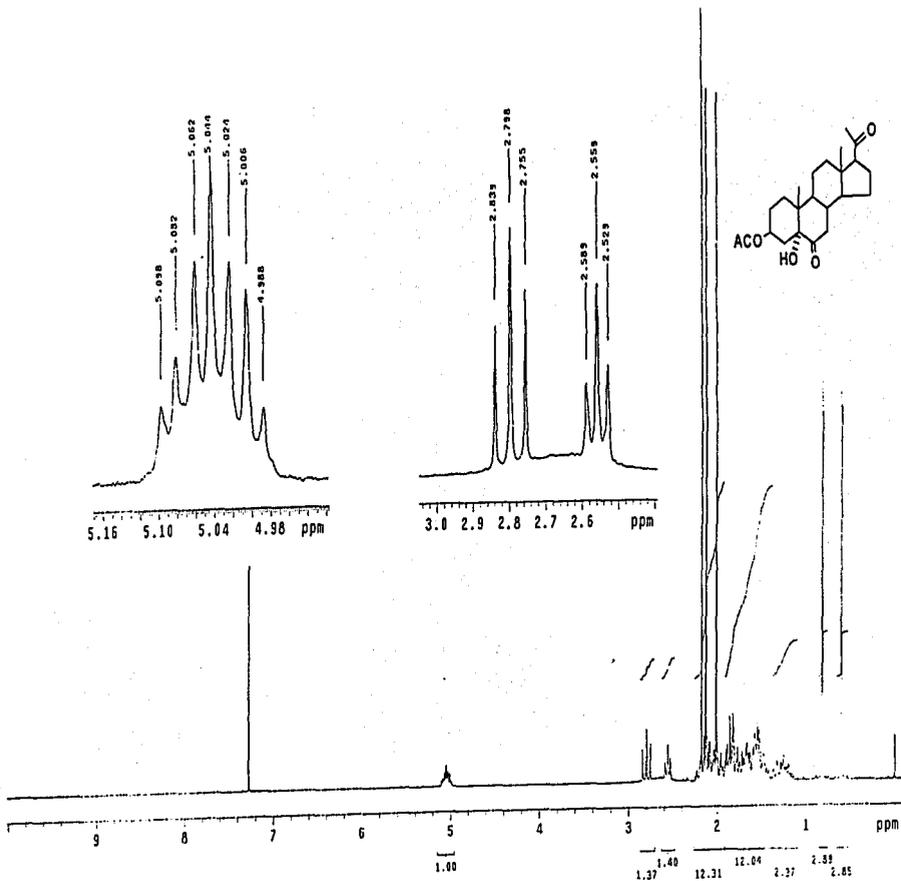
[Mass Spectrum]
 RT : 0.64 min
 Ion Mode : EI+
 Scan# : (24,25)
 Int. : 46.13
 Temp : 6.4 deg.C



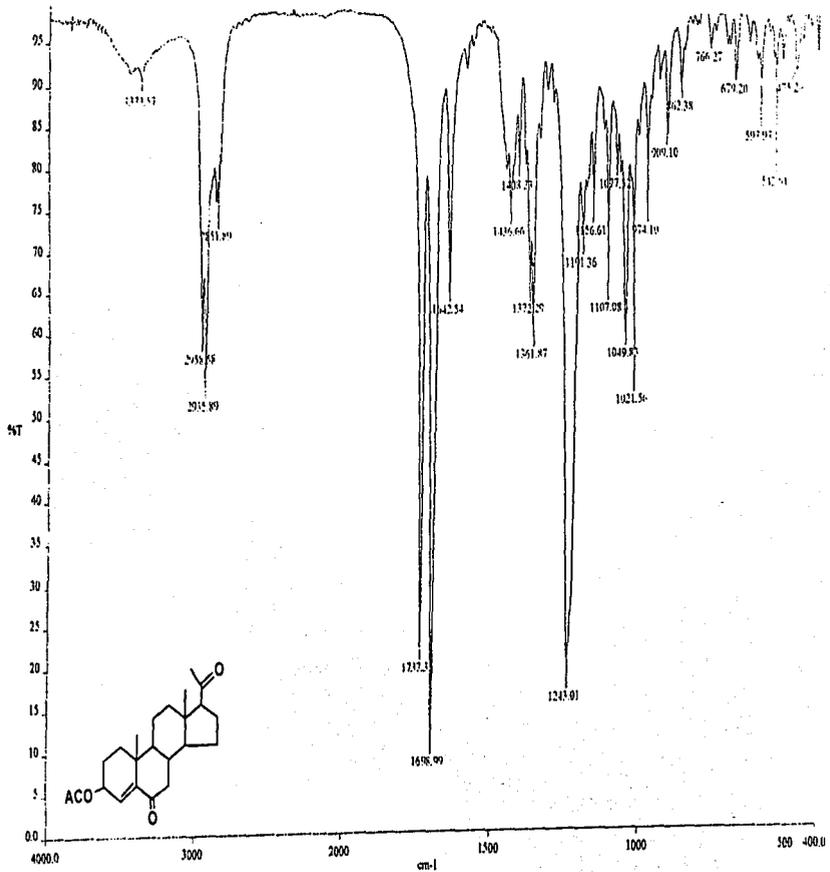
[Mass Spectrum]
 RT : 0.64 min
 Ion Mode : EI+
 Scan# : (24,25)-(45,55)
 Int. : 46.13
 Temp : 27.5 deg.C



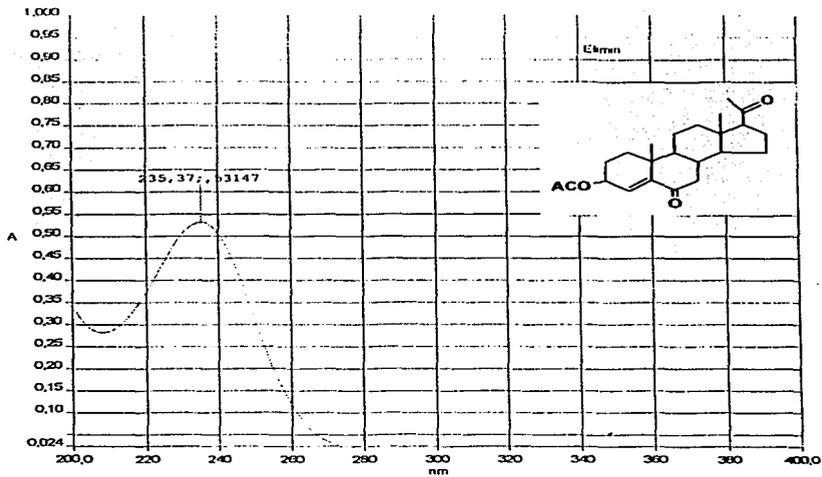
Espectro 10 βM (IE) de 10-β-ACETOXI-5α-HIDROXIPREGNAN-20-DIONA (IV)



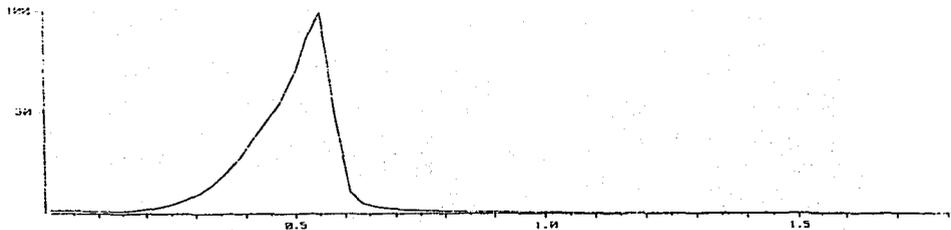
Espectro 11 RMN¹H de 3β-ACETOXI-5α-HIDROIPREGNAN-6,20-DIONA (IV)



Espectro IR de 3β-ACETOXI-4-PREGEN-6,20-DIONA (V)



Especro 13 UV de 3β -ACETOXI-4-PREGNEN-6,20-DIONA (V)

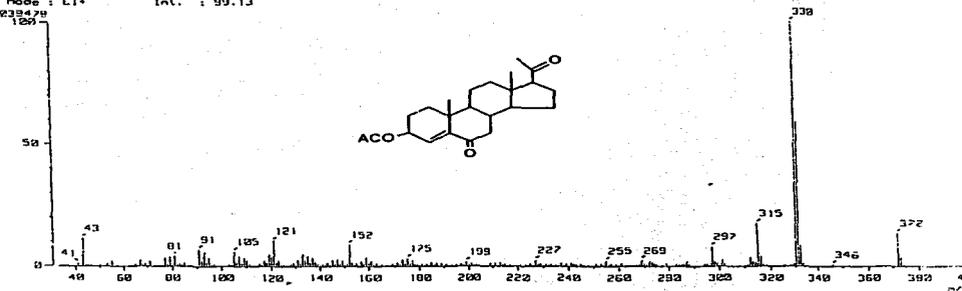


[Mass Spectrum]
 RT : 0.53 min
 Ion Mode : EI+

Scans : (20,21)
 Int. : 99.13

Temp : 6.4 deg.C

Time (min)

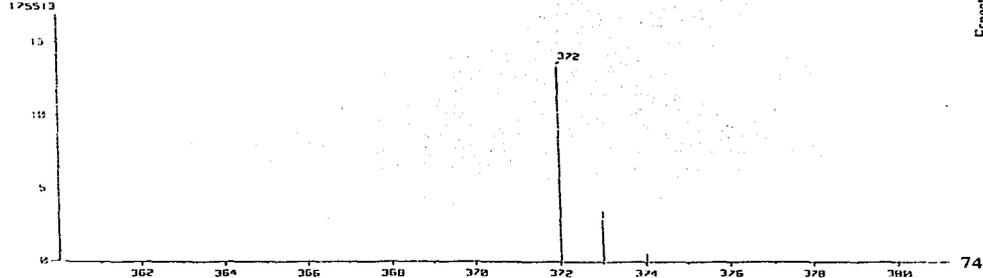


[Mass Spectrum]
 RT : 0.53 min
 Ion Mode : EI+

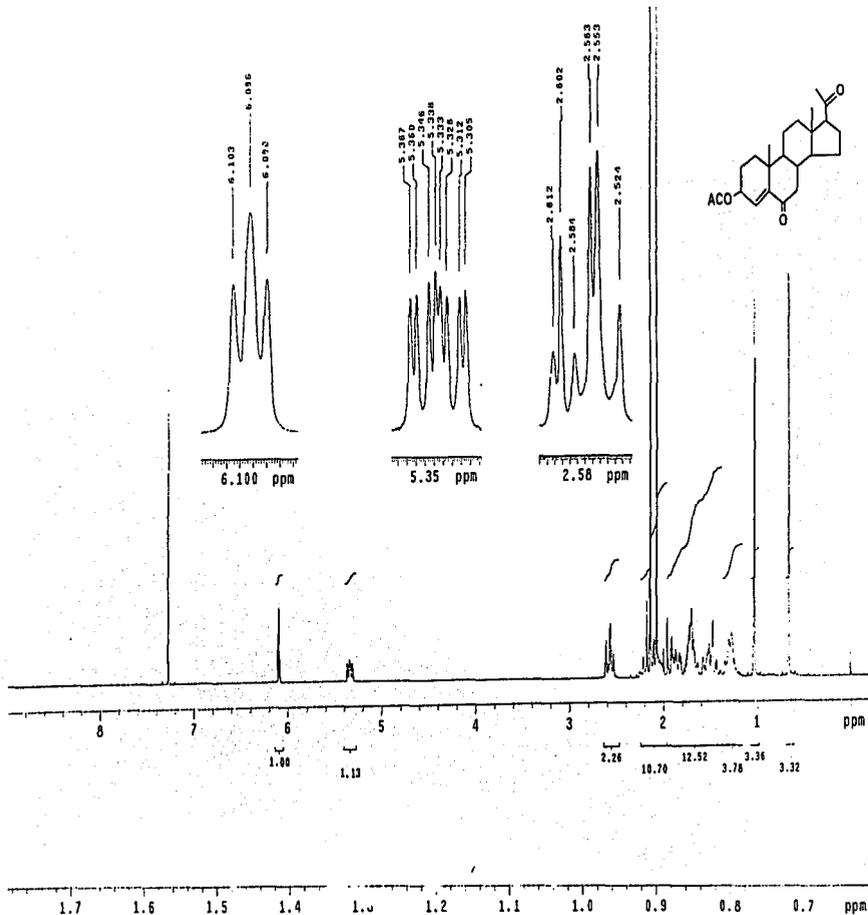
Scans : (20,21)
 Int. : 99.13

Temp : 6.4 deg.C

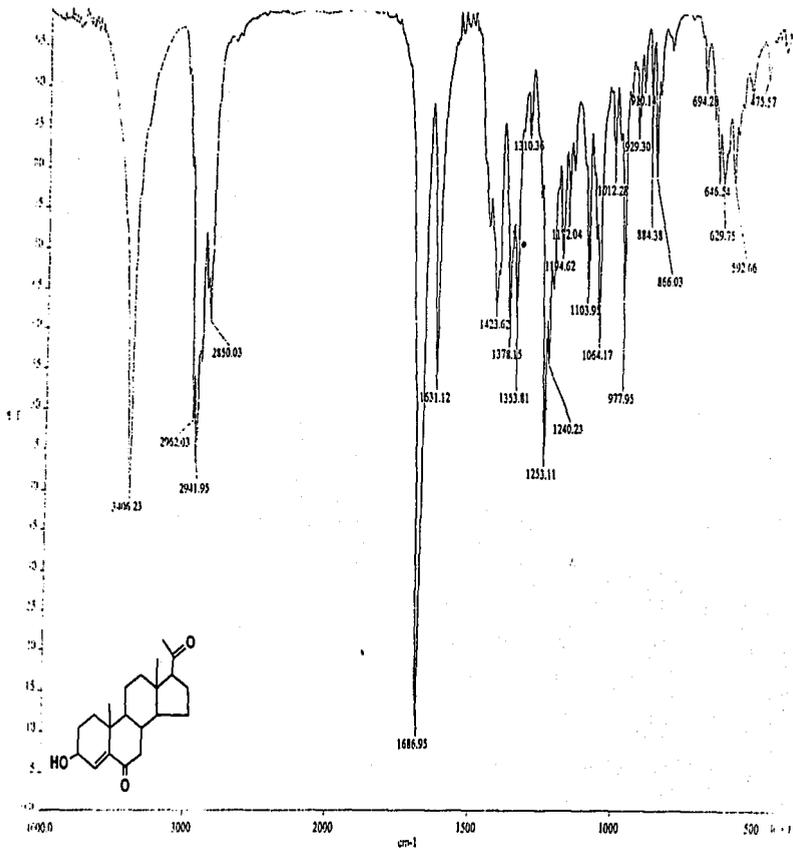
Espectro 14 EN (E) de 3-ACETOXI-14-PREGNEN-6,20-DIONA (V)



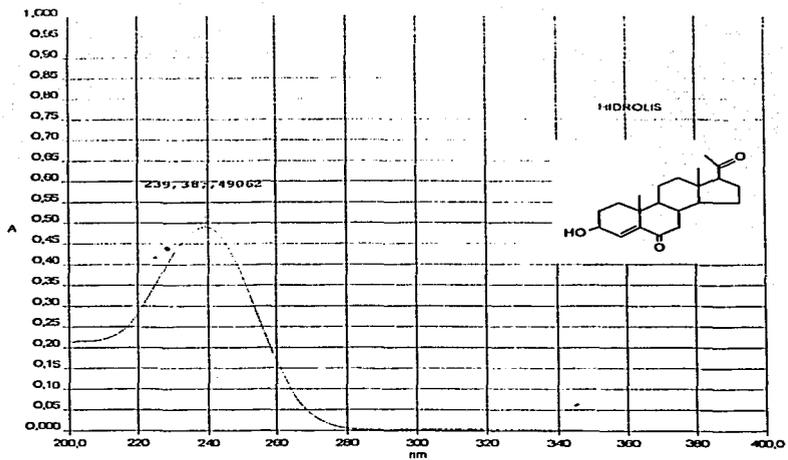
74



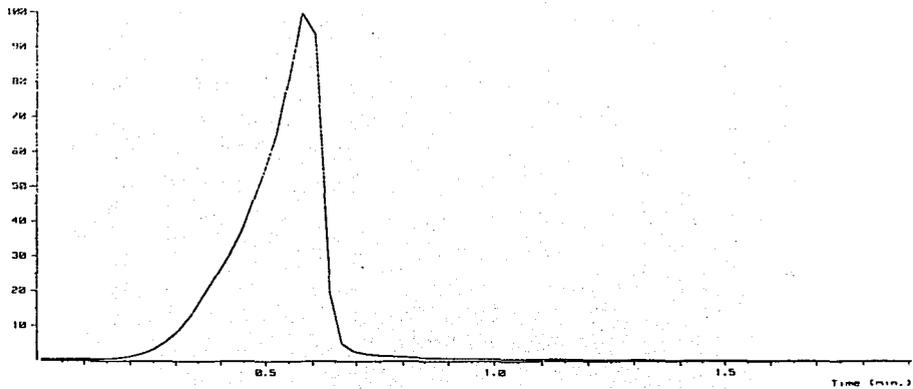
Espectro 15 RMN¹H de 3β-ACETOXI-4-PREGNEN-6,20-DIONA (V)



Espectro 16 IR de 3β-HIDROXI-4-PREGNEN-6,20-DIONA (VI)



Espectro 17 UV de 3β-HIDROXI-4-PREGEN-6,20-DIONA (VI)

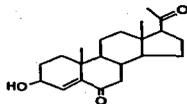
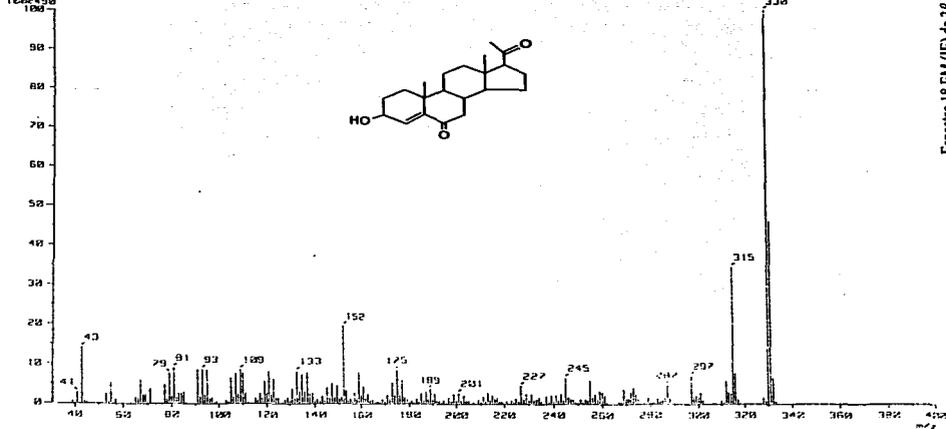


[Mass Spectrum]
 RT : 0.59 min
 Ion Mode : EI+

Scan : (21,23)
 Int. : 95.68

Temp : 6.4 deg.C

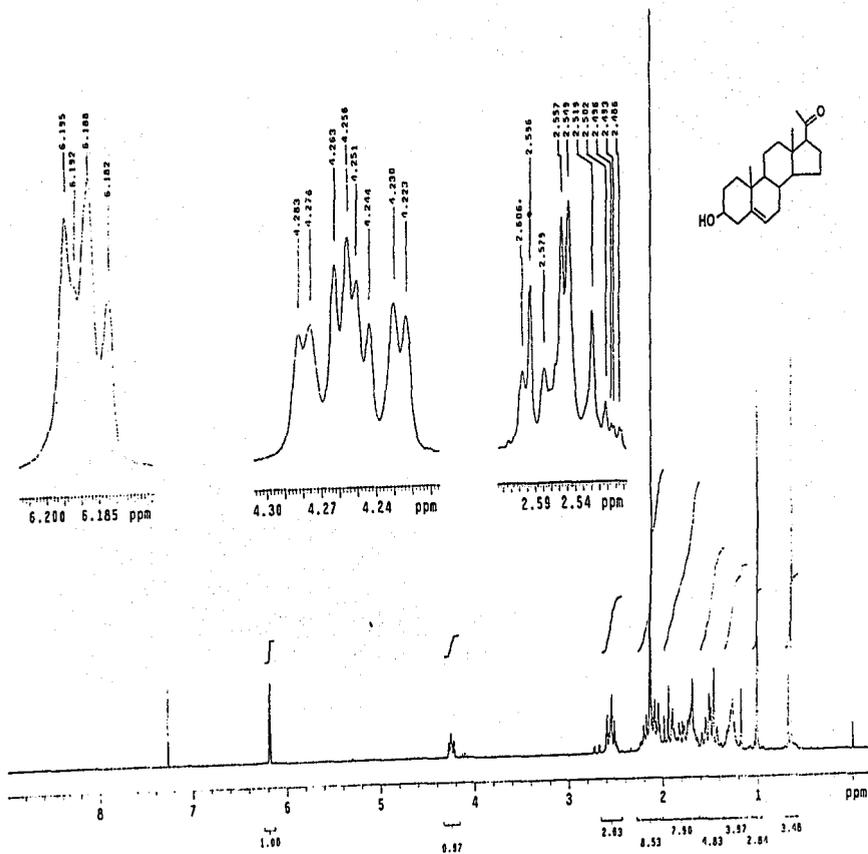
1000000



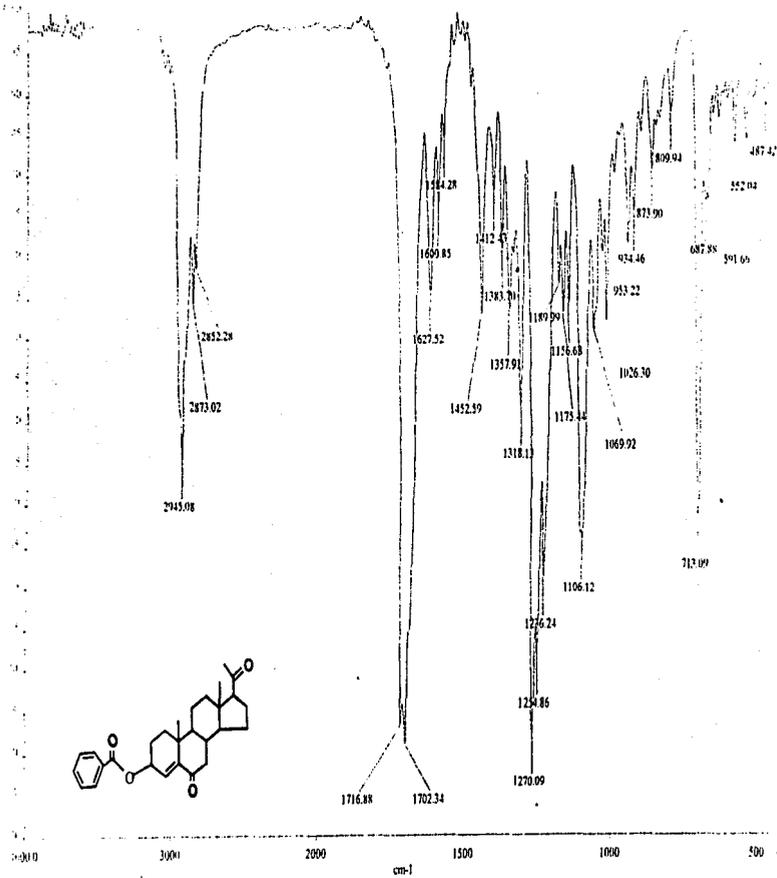
Espectro 18 EM (E) de 3 β -HIDROXI-4-PREGNEN-6,20-DIONA (VI)

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

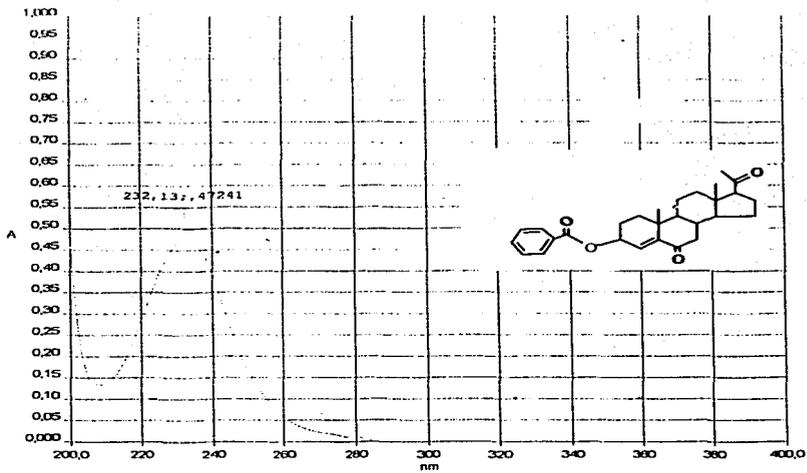
79



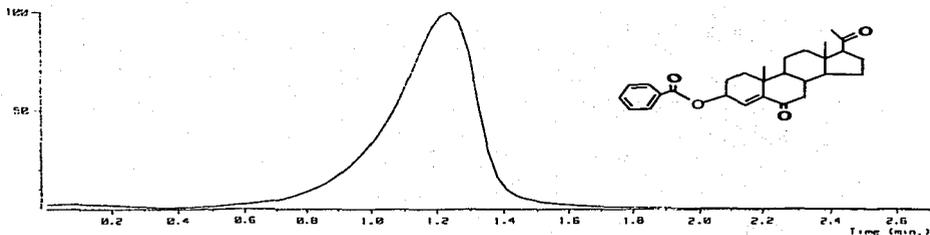
Espectro ^1H RMN de 3 β -HIDROXI-4-PREGNEN-6,20-DIONA (VI)



Espectro 20 IR de 3β-BENZOILOXI- 4-PREGNEN-6,20-DIONA (VII)



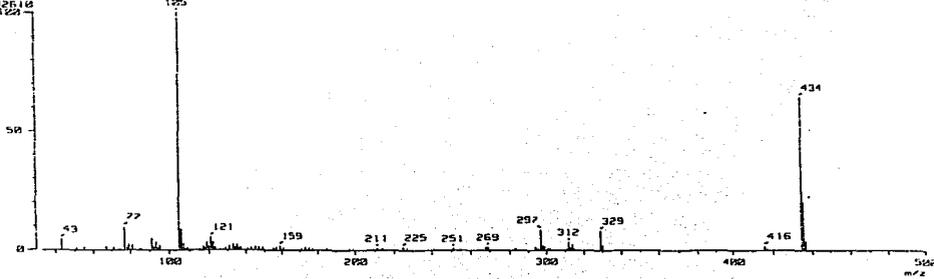
Espectro 21 UV de 3β-BENZOILOXI-4-PREGNEN-6,20-DIONA (VII)



Mass Spectrum 1
 : 1.22 min
 Mode : EI+
 682516

Scan : (44,47)
 Int. : 65.10

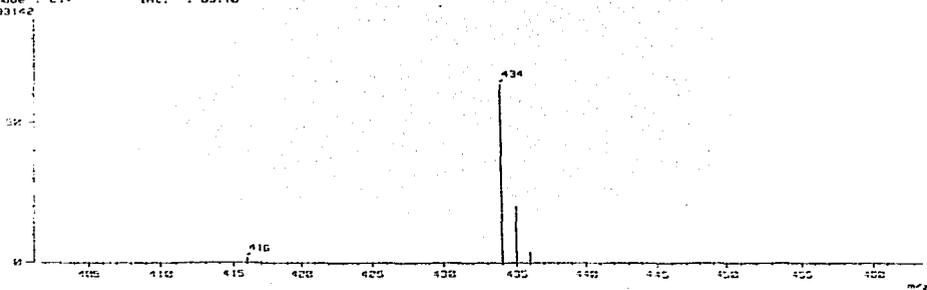
Temp : 6.4 deg.C



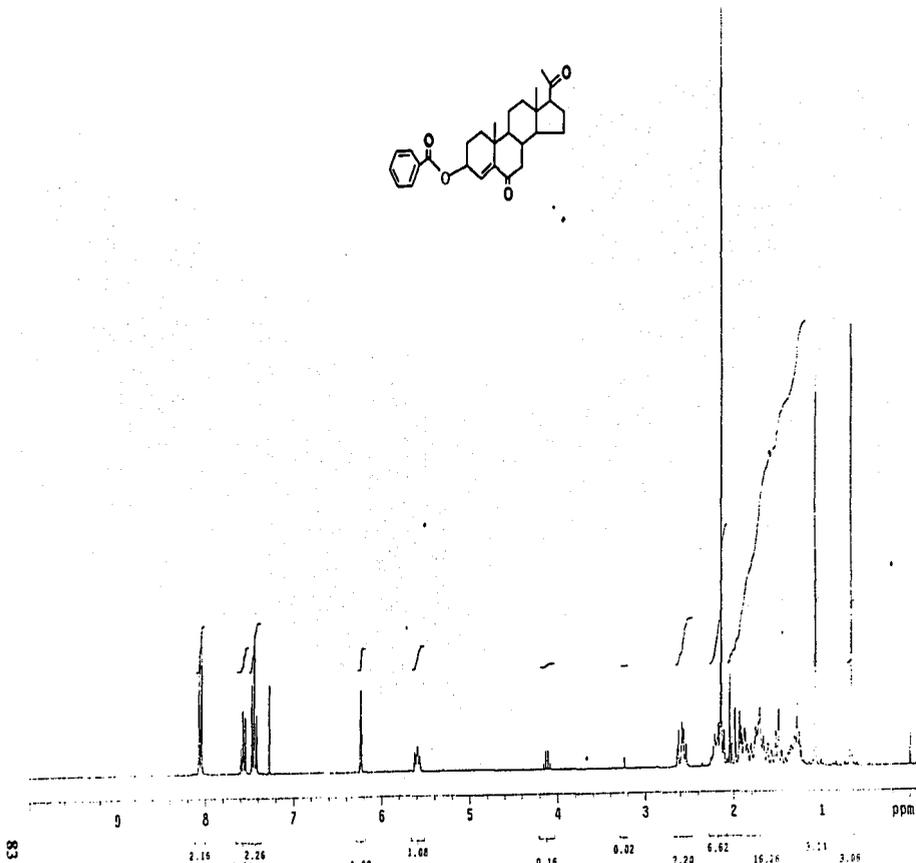
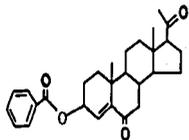
Mass Spectrum 1
 : 1.22 min
 Mode : EI+
 593162

Scan : (44,47)-(71,89)
 Int. : 65.10

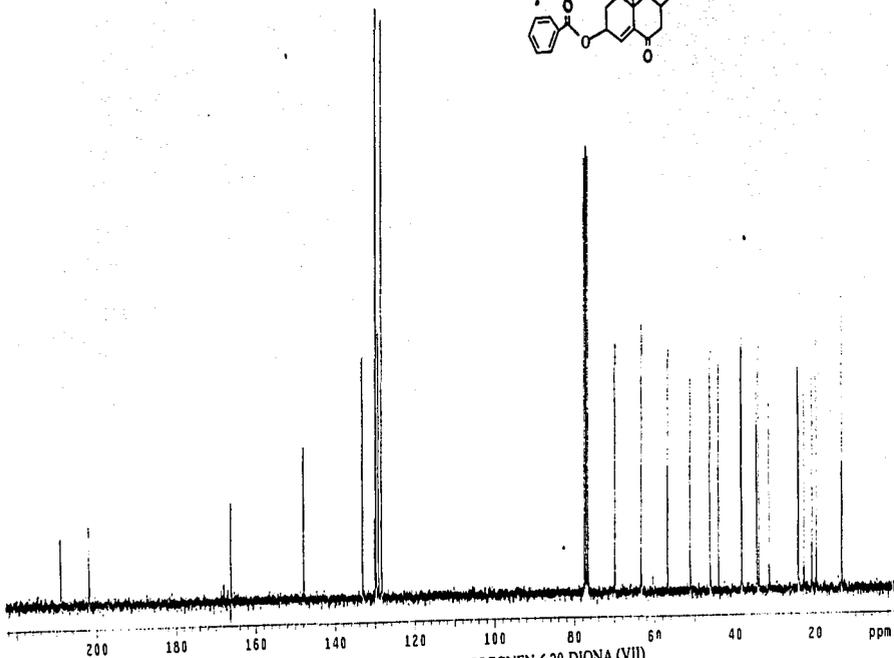
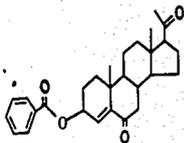
Temp : 30.6 deg.C



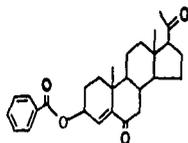
Espectro 22 EM (IE) de 3-BENZOILOXI-4-PREGNEN-6,20-DIONA (VII)



Espectro 23 RMN ^1H de 3 β -BENZOIXI-4-PREGNEN-6,20-DIONA (VII)



Espectro 24 RMN ¹³C de 3β-BENZOILOXI-4-PREGNEN-6,20-DIONA (VII)



CH₃ carbons



CH₂ carbons



CH carbons

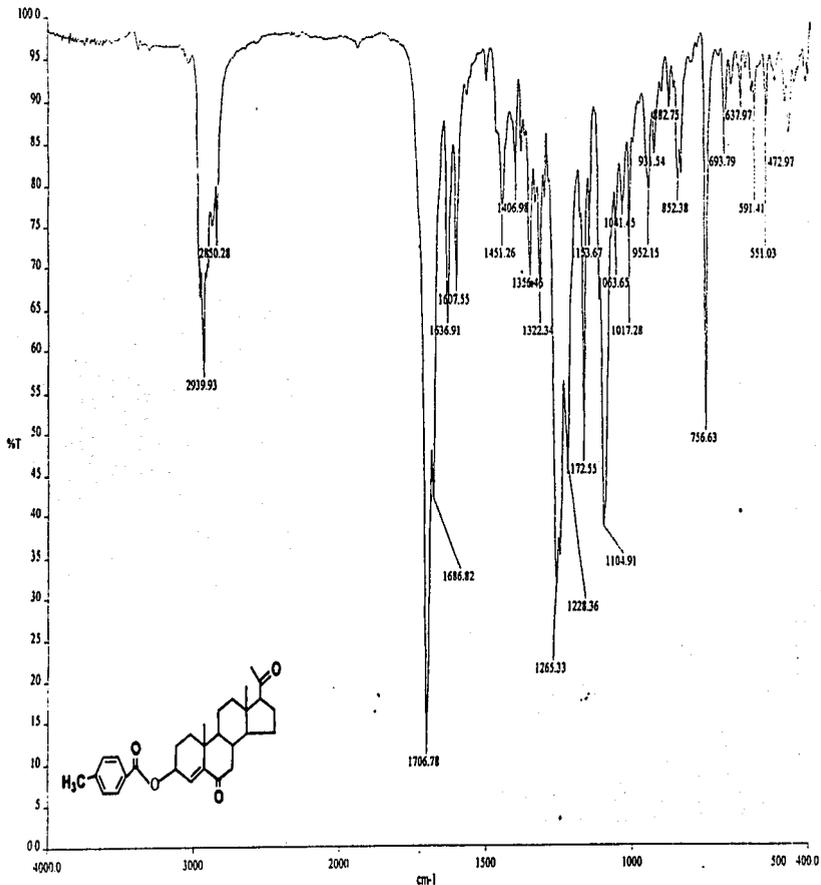


all protonated carbons

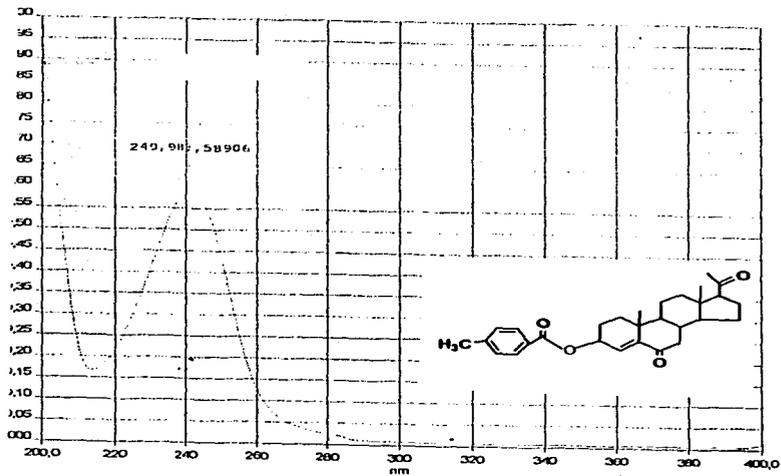


220 200 180 160 140 120 100 80 60 40 20 ppm

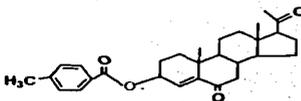
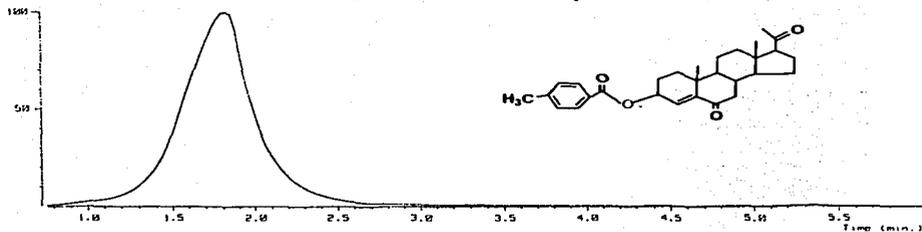
Espectro 25 RMN ¹³C. DEPT de 3β-BENZOILOXI-4-PREGNEN-6,20-DIONA (VII)



Espectro 26 IR de 3β-(P-TOLUILOXI)-4-PREGNEN-6,20-DIONA (VIII)



Espectro 27 UV de 3β-(*p*-TOLUILOXI)-4-PREGNEN-6,20-DIONA (VIII)

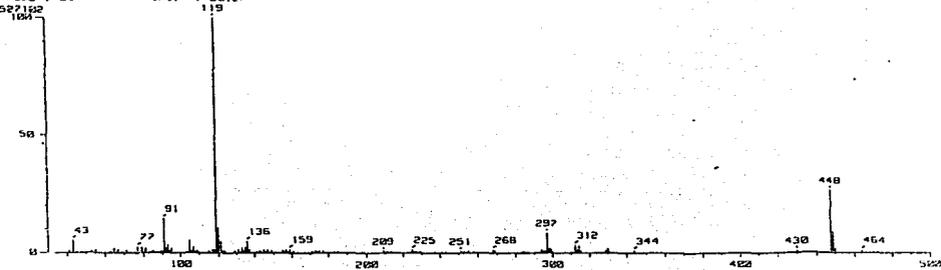


Mass Spectrum 1
 T: 1.49 min
 on Mode: EI+
 527152

Scan: (52.59)

Temp: 6.4 deg.C

Int.: 50.27

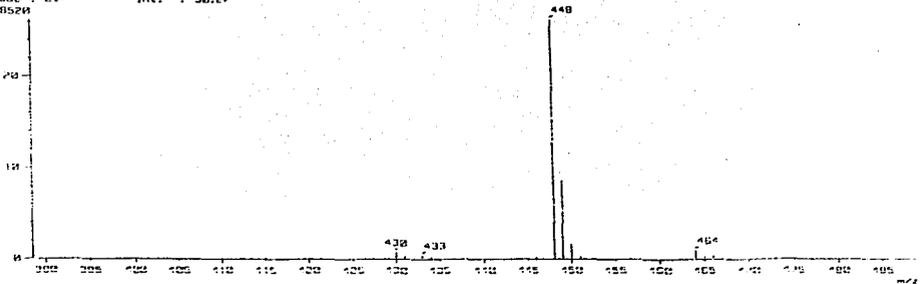


Mass Spectrum 1
 T: 1.49 min
 on Mode: EI+
 138526

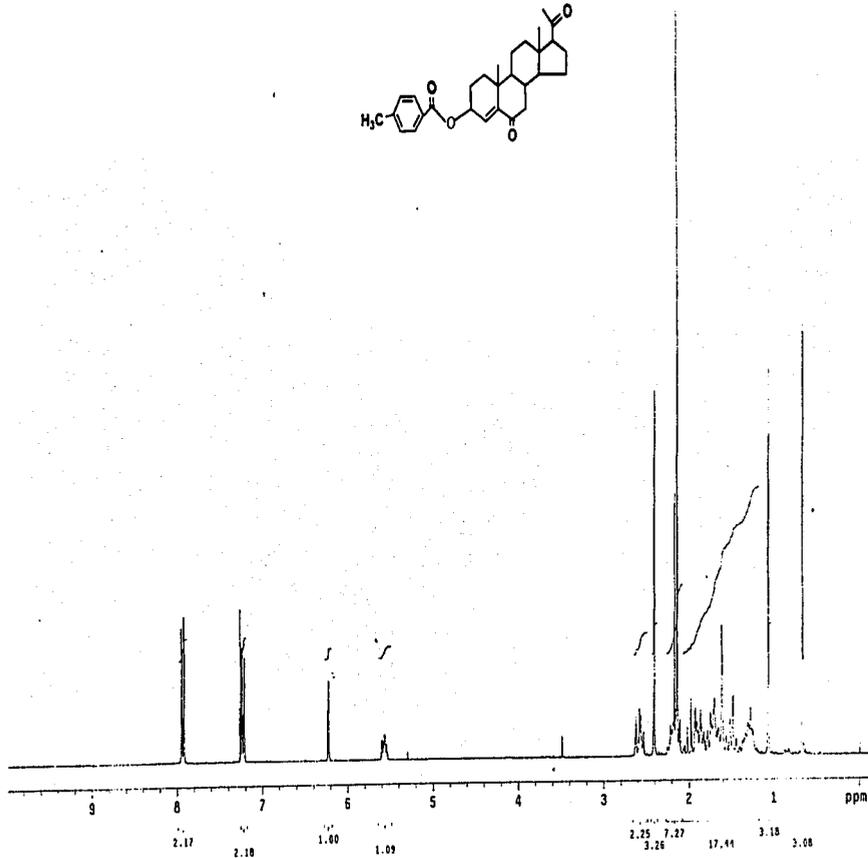
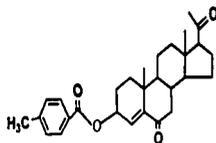
Scan: (52.59)

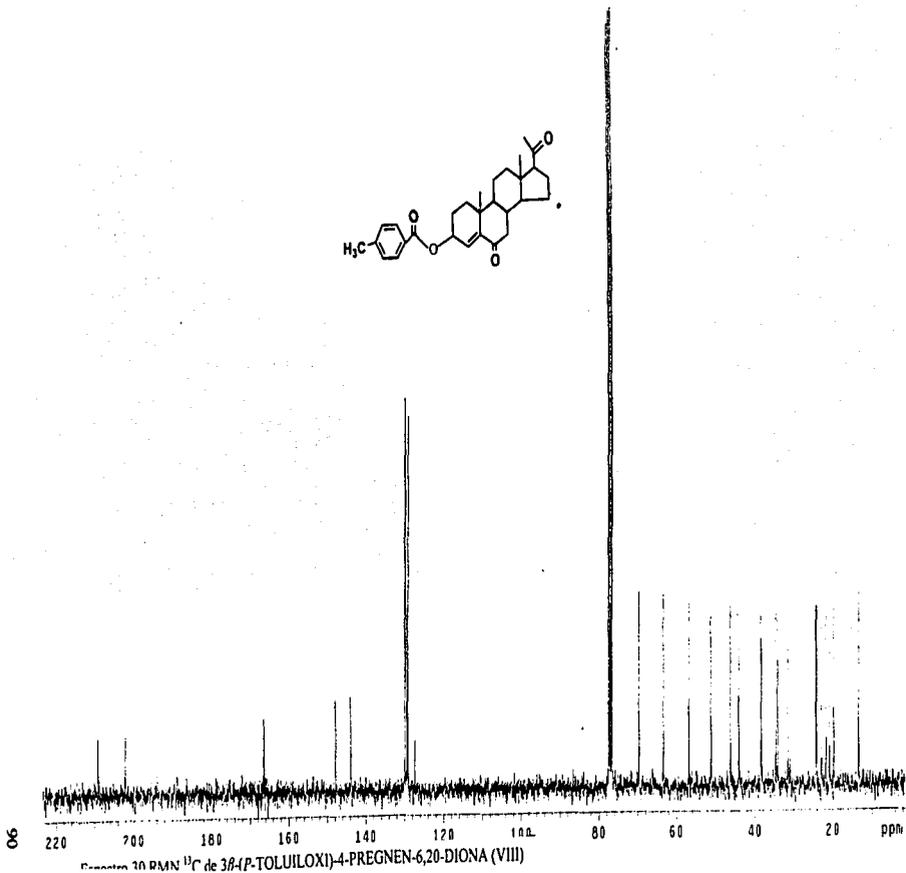
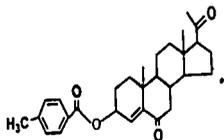
Temp: 6.4 deg.C

Int.: 50.27

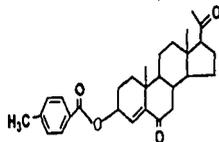


Espectro 28 EN (E) de 3β-(p-TOLUILOXI)-4-PREGNEN-6,20-DIONA (VIII)





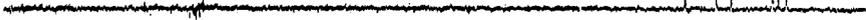
Resonances 13C RMN de 3β-(P-TOLUILOXI)-4-PREGNEN-6,20-DIONA (VIII)



CH₃ carbons



CH₂ carbons



CH carbons



all protonated carbons



200 180 160 140 120 100 80 60 40 20 ppm

Espetro 31 RMN ¹³C. DEPT de 3β-(P-TOLUILOXI)-4-PREGNEN-6,20-DIONA (VIII)