

00524
118



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

FACULTAD DE QUIMICA

DERIVADOS DE LA PREGNADIONA CON UN GRUPO
ELECTRONEGATIVO EN C-3 COMO ANTIANDROGENOS

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICA FARMACEUTICA BIOLOGA

P R E S E N T A :

ALEJANDRA MUNGUIA HERRERA



MEXICO, D. F.



**EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA**

2003



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

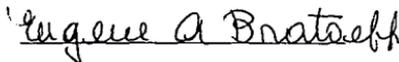
PRESIDENTE: EUGENE ATHANAS BRATOEFF TITEFF
VOCAL: CARLOS RIUS ALONSO
SECRETARIO: ROSA LUZ CORNEJO ROJAS
1^{ER} SUPLENTE: LINO JOEL REYES TREJO
2^{DO} SUPLENTE: MARCO ANTONIO TAFUYA RODRIGUEZ

Sitios donde se desarrollo el tema:

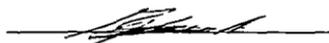
DEPARTAMENTO DE FARMACIA, CONJUNTO "E", LABORATORIO 125,
FACULTAD DE QUÍMICA, UNAM.

LABORATORIO DE HORMONAS (G006) DEL DEPARTAMENTO DE SISTEMAS
BIOLÓGICOS DE LA UAM-XOCHIMILCO.

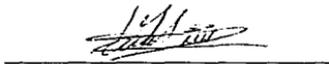
Asesor:
Dr. Eugene A. Bratoeff Titeff



Supervisor Técnico:
Dra. Elena Guadalupe Ramirez López



Sustentante:
Alejandra Munguía Herrera



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

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.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Eugene A. Bratoeff Titeff, por todo su apoyo, paciencia y conocimientos brindados.

A la Dra. Elena Guadalupe Ramirez López por toda su tiempo, conocimientos, enseñanza y también por ser una gran compañera de trabajo durante la realización de este trabajo.

A la Dra. Marisa Cabeza por todo su conocimiento y tiempo brindado durante los ensayos biológicos.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) que gracias al programa N200301 dio el apoyo económico al laboratorio, con el cual se realizó este trabajo.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) que gracias al programa de becas G33450-M brindó el apoyo económico para la realización de este proyecto.

Al personal académico de la USAI por el análisis espectroscópico (UV, IR, RMN1H, RMN13C y EMIE) de los compuestos sintetizados en el laboratorio para este trabajo.

Dedico este trabajo con mucho cariño:

A mis padres Carmen Herrera y Miguel Munguia O. que me apoyaron durante toda mi preparación profesional, a los cuales les doy las gracias por todo.

A Edgar Borja por todo su apoyo moral incondicional durante todo este tiempo.

A mis amigas que creyeron siempre en mi, en especial a Brenda Barajas.

A todos mis compañeros con los cuales trabajé en el laboratorio 125 del edificio E, en especial a Alex Orozco por todo su apoyo y ayuda incondicional siempre.

A la Dra. Elena Ramírez por su toda su ayuda y al Dr. Eugene A. Bratoeff.

INDICE

	<i>Página</i>
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1 Esteroides	4
2.1.1 Hormonas sexuales	7
2.1.2 Esteroides sintéticos	8
2.2 Andrógenos	8
2.3 Producción y función de la testosterona	9
2.3.1 Transformación de la testosterona a dihidrotestosterona	10
2.4 Antiandrógenos	11
2.4.1 Clasificación química de los antiandrógenos	13
2.5 La próstata	14
2.5.1 Función de la próstata	14
2.6 Cáncer de la próstata	15
2.6.1 Tratamiento para el cáncer de la próstata	17
2.6.1.1 Hormonoterapia (Antiandrógenos)	18
2.7 Hiperplasia prostática benigna	18
3. OBJETIVOS	20
3.1 Ruta de síntesis	21
4. METODOLOGÍA Y RESULTADOS	22
4.1 Parte química. Síntesis	22
4.1.1 Caracterización de la materia prima	23
4.1.2 Síntesis del compuesto 3 β -acetoxi-5,6-epoxi-pregna-16-en-20-ona (II)	24
4.1.3 Síntesis del compuesto 3 β -acetoxi-5- α hidroxi-pregna-16-en-6,20-diona (III)	26
4.1.4 Síntesis del compuesto 3 β -acetoxi-pregna-4,16-dien-6,20-diona (IV)	28
4.1.5 Síntesis del compuesto 3 β -hidroxi-pregna-4,16-dien-6,20-diona (V)	29
4.1.6 Síntesis del compuesto 3 β -(p-nitrobenzoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (AM-13)	31
4.1.7 Síntesis del compuesto 3 β -(p-toluiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (AM-14)	33
4.1.8 Síntesis del compuesto 3 β -(2-ciclohexilacetoxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (AM-15)	35
4.2 Evaluación biológica	37
4.2.1 Obtención de la fracción microsomal de próstata de hámster	37
4.2.2 Experimentos in vitro: inhibición de la actividad de la enzima 5 α -reductasa presente en fracción microsomal de próstata de hámster a pH=7.0	38
4.2.3 Determinación de la competencia de los compuestos	40

	sintetizados por receptores de andrógenos presentes en el citosol de vesículas seminales.	
5. ANÁLISIS DE RESULTADOS		42
5.1	Discusión de resultados de la parte química	42
5.1.1	Materia prima 3β -acetoxi-pregna-5,16-dien-20-ona (I)	42
5.1.2	Compuesto 3β -acetoxi-5,6-epoxi-pregna-16-en-20-ona (II)	44
5.1.3	Compuesto 3β -acetoxi-5- α hidroxi-pregna-16-en-6,20-diona (III)	45
5.1.4	Compuesto 3β -acetoxi-pregna-4,16-dien-6,20-diona (IV)	47
5.1.5	Compuesto 3β -hidroxi-pregna-4,16-dien-6,20-diona (V)	48
5.1.6	Compuesto 3β -(p-nitrobenzoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (AM-13)	49
5.1.7	Compuesto 3β -(p-toluoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (AM-14)	51
5.1.8	Compuesto 3β -(2-ciclohexilacetoxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (AM-15)	53
5.2	Discusión de resultados del ensayo biológico	54
5.2.1	Inhibición de la actividad de la enzima 5α -reductasa en fracción microsomal	54
5.2.2	Determinación la competencia de los compuestos sintetizados por receptores de andrógenos presentes en el citosol de vesículas seminales.	55
5.2.3	Relación estructura actividad	56
6. CONCLUSIONES		57
7. APÉNDICE		58
8. BIBLIOGRAFÍA		86

1

INTRODUCCIÓN

El cáncer de próstata es el tipo más común de cáncer en los hombres (con excepción del cáncer de piel). De todos los hombres diagnosticados con cáncer cada año, más de la cuarta parte tienen cáncer de próstata. Es el segundo más común en los hombres y la segunda causa principal de muertes por cáncer, después del cáncer de pulmón

El cáncer de próstata y la hiperplasia prostática benigna son enfermedades muy comunes en hombres con edad promedio de 55 años. En 1998, fueron detectados 184,500 casos de cáncer de próstata en USA, de estos se pronosticó que aproximadamente 39,200 hombres morirán por esta enfermedad¹.

El cáncer de próstata es un tipo muy frecuente de cáncer en varones. Entre los factores que dan origen a este tipo de cáncer se encuentran la edad, raza, dieta, y factores ambientales²; datos disponibles también sugieren que en su aparición participan los andrógenos³.

El cáncer de próstata surge cuando las células del tejido empiezan a multiplicarse sin control y de manera progresiva hasta llegar a la formación de un tumor; si este tumor no invade los tejidos y queda circunscrito, generalmente es un tumor benigno. Sin embargo, si el tumor invade tanto los tejidos vecinos como los que encuentran a distancia (metástasis) entonces se trata de un tumor maligno.

La hiperplasia prostática benigna (BPH) es el crecimiento anormal de células benignas de la próstata. En la hiperplasia prostática benigna, la próstata crece más y presiona contra la uretra y la vejiga, obstruyendo el flujo normal de orina. Más de la mitad de los hombres de Estados Unidos entre los 60 y 70 años y como un 90 por ciento entre los 70 y los 90 años tienen síntomas de hiperplasia prostática benigna. Para algunos hombres, los síntomas pueden ser lo suficientemente graves como para requerir tratamiento.

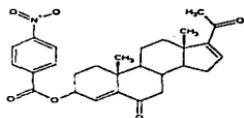
Se ha observado que la testosterona, hormona sexual masculina influye en el desarrollo del cáncer de próstata. La testosterona es sintetizada en los testículos, los ovarios y la corteza suprarrenal. Es convertida de manera irreversible a 5α -dihidrotestosterona (DHT) por acción de una enzima llamada 5α -reductasa localizada en la membrana celular y dependiente de NADPH⁴. La DHT es la forma activa de la testosterona, ya que se une con mayor afinidad y de manera irreversible al receptor androgénico.

Al disminuir la concentración de DHT se ayuda a controlar la evolución del cáncer de próstata y el desarrollo de hiperplasia prostática benigna; de esta forma surgen nuevas estrategias en la búsqueda de nuevos compuestos sintéticos capaces de actuar con el receptor androgénico

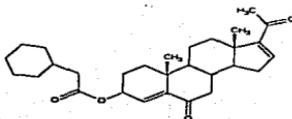
El tratamiento que se sigue tanto para la hiperplasia prostática benigna como para el cáncer de próstata incluye la cirugía, la radiación y la terapia hormonal, empleados principalmente para erradicar el cáncer local. Un ejemplo de agente hormonal es la Finasterida o Proscar que es un compuesto farmacéutico conocido como inhibidor de la enzima 5α -reductasa tipo 2 que está presente en la próstata. La Finasterida ha sido indicado para el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna y cáncer de próstata, este medicamento origina una disminución constante del tamaño de la próstata y el 33% de los varones tratados presentó mejorías del flujo urinario y reducción de los síntomas; así esto proporciona una alternativa a la intervención quirúrgica en varones con manifestaciones de la enfermedad¹.

Actualmente la terapia hormonal empieza a utilizarse más ampliamente por lo que la síntesis de nuevos agentes tiene una importancia cada vez mayor principalmente para hombres con cáncer de próstata metastático. Sin embargo, los tratamientos empleados presentan efectos secundarios como incontinencia, lesión intestinal, impotencia sexual así como los propios de la radiación.

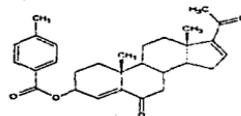
Por lo anterior el presente trabajo consiste en la síntesis, caracterización y evaluación biológica de tres compuestos 3 β -(p-Nitrobenzoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (AM-13), 3 β -(p-toluoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (AM-14) y 3 β -(2-ciclohexilacetoxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (AM-15) con posible actividad antiandrógena potencial. Para esto, se partió de una materia prima disponible, a la cual se le realizaron las transformaciones necesarias. Posteriormente ya que se tuvieron los compuestos puros y caracterizados se evaluaron para determinar su actividad biológica.



AM-13



AM-14



AM-15

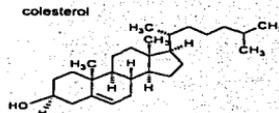
Figura 1.1 Estructuras de los compuestos esteroidales a sintetizar

2

ANTECEDENTES

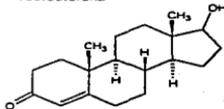
2.1 Esteroides

Los esteroides son lípidos derivados del colesterol, se caracterizan por tener en su estructura base el núcleo del ciclopentanoperhidrofenantreno, denominado gonano (antiguamente esterano). Fig. 2.1

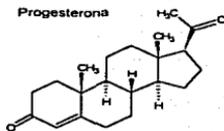


El colesterol forma parte estructural de las membranas a las que confiere estabilidad. Es la molécula base que sirve para la síntesis de casi todos los esteroides

Testosterona



Progesterona



Entre las hormonas sexuales se encuentran la progesterona que prepara los órganos sexuales femeninos para la gestación y la testosterona responsable de los caracteres sexuales masculinos.

Estradiol

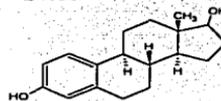


Figura 2.1 Principales esteroides derivados del colesterol

La estructura de los esteroides la forman cuatro anillos de carbono (A, B, C y D) comenzando en el extremo inferior izquierdo, numerando los átomos de carbono por el anillo A Fig. 2.2. Los esteroides se diferencian entre sí por el número y localización de sustituyentes⁵.

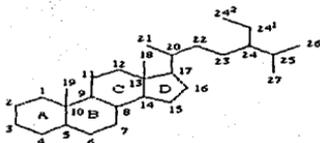


Figura 2.2 Estructura y numeración general de un esteroide

Los esteroides más característicos son:

a) **Esteroles.** De todos ellos, el colesterol es el de mayor interés biológico. Forma parte de las membranas biológicas a las que confiere resistencia, por otra parte es el precursor de casi todos los demás esteroides.

Otros esteroides constituyen el grupo de la vitamina D o calciferol, imprescindible en la absorción intestinal del calcio y su metabolización.

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

c) **Hormonas esteroideas.** Incluyen las de la corteza suprarrenal, que estimulan la síntesis del glucógeno y la degradación de grasas y proteínas (cortisol) y las que regulan la excreción de agua y sales minerales por las nefronas del riñón (aldosterona). También son de la misma naturaleza las hormonas sexuales masculinas y femeninas (andrógenos como la testosterona, estrógenos y progesterona) que controla la maduración sexual, comportamiento y capacidad reproductora⁶.

En el ser humano; la mayoría de los esteroides actúan como hormonas, mensajeros químicos secretados por las glándulas y transportados por la corriente sanguínea a los tejidos blancos o efectores. Existen dos clases principales de hormonas esteroides: las hormonas sexuales, que controlan la maduración sexual y la reproducción, y las hormonas adrenocorticales, que regulan una gran cantidad de procesos metabólicos⁷. Los esteroides se clasifican de acuerdo a su esqueleto básico: Fig. 2.3

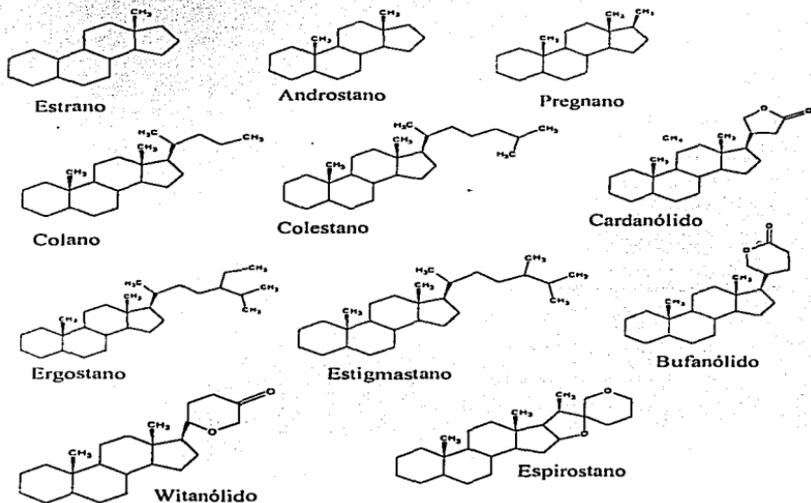


Figura 2.3 Clasificación de los esteroides según su esqueleto básico

2.1.1 Hormonas sexuales

Otros ejemplos de esteroides son la testosterona y androsterona que son dos hormonas sexuales masculinas (andrógenos) más importantes. Son los encargados del desarrollo de las características sexuales de los varones durante la pubertad, promueven el desarrollo tisular y muscular. Ambas son sintetizadas en los testículos a partir del colesterol.

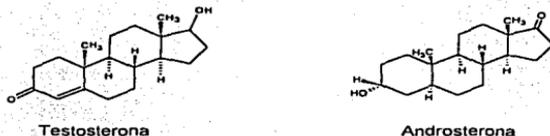


Figura 2.4 Andrógenos más importantes

La estrona y estradiol, son las hormonas sexuales femeninas (estrógenos) Fig. 2.5, más importantes. Son sintetizados en los ovarios a partir de la testosterona y a ellas se les debe el desarrollo de las características sexuales secundarias de la mujer y la regulación del ciclo menstrual. Ambas tienen un anillo A tipo benceno. Además otro grupo de hormonas sexuales llamadas progestinas es esencial a fin de preparar el útero para la implantación durante el embarazo del óvulo fecundado. La progesterona es la progestina más importante⁸.

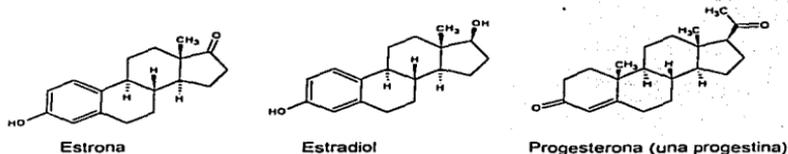


Figura 2.5 Estrógenos más importantes

2.1.2 Esteroides sintéticos

Además de los muchos cientos de esteroides aislados de plantas y animales, se han sintetizados otros miles en laboratorios farmacéuticos⁹. Entre los esteroides sintéticos mejor conocidos se encuentran los anticonceptivos orales y los agentes anabólicos. Fig. 2.6

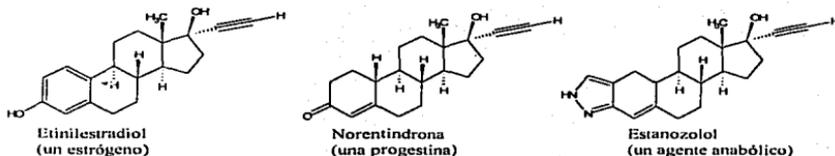


Figura 2.6 Algunos esteroides sintéticos

2.2 Andrógenos

Los andrógenos son hormonas esteroidales pertenecientes al grupo del androstano Fig. 2.3 (Pág. 6), y son los que regulan las características fisiológicas más importantes en el comportamiento sexual de los hombres, como regular el funcionamiento de la próstata y vesículas seminales, actúan como anabólicos y son los responsables de la expresión de algunos caracteres secundarios¹⁰. Uno de los principales andrógenos es la *testosterona*, que para realizar sus funciones tiene que estar en su forma activa como dihidrotestosterona (DHT).

2.3 Producción y función de la testosterona

La producción de testosterona en los testículos, se encuentra regulada por la hormona luteinizante (LH) que es liberada de la glándula pituitaria por acción de la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH), secretada por el hipotálamo. La unión de LH por los receptores ($K_d=10^{-10}$ M) ocurre en las membranas de las células de Leydig, localizadas en el tejido intersticial de los testículos. Ocurre un subsecuente incremento de la concentración intracelular de AMP cíclico (cAMP), lo que origina la estimulación de la síntesis y liberación de andrógenos. En contraste con la estimulación de la androgénesis por LH, la hormona foliculo estimulante (FSH), que también es liberada por la glándula pituitaria, estimula la síntesis proteica en las células de Sertoli. La principal proteína secretada por dichas células, es la proteína de unión androgénica (ABP) cuya afinidad alta ($K_d=10^{-8}$ M) permite aumentar la cantidad de testosterona y DHT en los túbulos seminíferos, promoviendo así la espermatogénesis^{11,12,13} Fig. 2.7

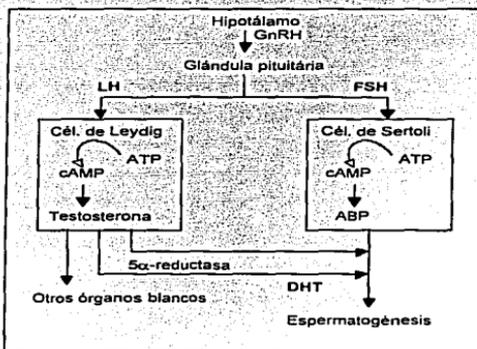


Figura 2.7 Acción de las gonadotropinas en los testículos. Regulación de la síntesis y liberación de testosterona en el organismo (tomado de Schulster et al.)

La acción primaria de la testosterona a nivel molecular consiste en aumentar la síntesis proteica en los órganos blancos, específicamente próstata y vesículas seminales. Su principal función es producir el desarrollo normal de los órganos reproductores masculinos y mantener las características sexuales secundarias. La testosterona también es efectiva para mantener la espermatogénesis. Las características masculinas desarrolladas en presencia de la testosterona son: cambio de voz, crecimiento de pene, crecimiento de escroto, así como el desarrollo del músculo esquelético. Inhibe el desarrollo y función de la glándula mamaria y estimula la libido¹⁴.

2.3.1 Transformación de testosterona a dihidrotestosterona

La testosterona (Fig. 2.8, Pág. 11) es convertida irreversiblemente a DHT (Fig. 2.8, Pág. 11) a través de la acción de una enzima que se localiza en la membrana nuclear dependiente de NADPH llamada 5α -reductasa-NADPH; posteriormente la testosterona se une a este complejo y se realiza la transferencia regio y estereoespecífica de un hidruro del NADPH a la posición 5 de la testosterona. El enolato resultante en C3-C4 se estabiliza por un residuo electrofílico (E^+) de la enzima, y por último, la regeneración de la misma se logra a través de otro ciclo catalítico^{17,18}. Fig. 2.8

La enzima 5α -reductasa se encuentra en dos isoformas denominadas Tipo I y II, las cuales difieren en sus propiedades bioquímicas, tejido, localización y su función. La isoenzima 5α -reductasa Tipo I se encuentra predominantemente en la piel no genital y en el hígado, tiene un pH óptimo ligeramente alcalino (6.0-8.5), requiere de concentraciones elevadas de testosterona para saturarse ($K_m=3\mu M$), funcionando de un modo catabólico en la remoción de andrógenos por el hígado y la piel no genital. La isoenzima 5α -reductasa Tipo II tiene un pH óptimo de 5 y requiere de concentraciones bajas de testosterona para saturarse ($K_m=0.5\mu M$). Se encuentra presente predominantemente en la próstata y testículos relacionándose directamente al cáncer de próstata y a la hiperplasia prostática benigna, funciona

de manera anabólica en la expresión de los andrógenos por la conversión efectiva de testosterona a dihidrotestosterona^{15,16}.

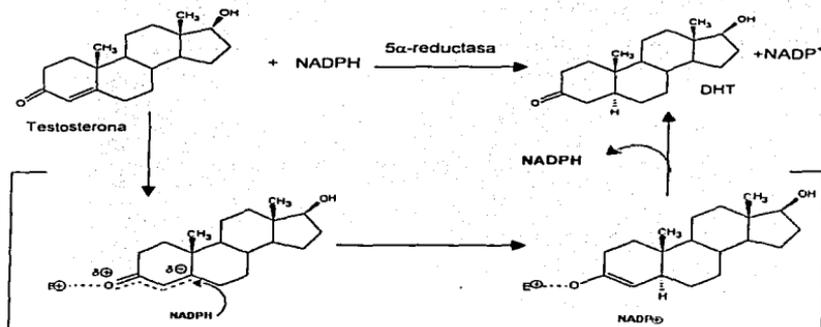


Figura 2.8 Conversión de testosterona a dihidrotestosterona

2.4 Antiandrógenos

Los antiandrógenos son compuestos que pueden ser esteroidales como la Finasterida (Fig. 2.9, Pág. 13), o no esteroidales como la flutamida (Fig. 2.10, Pág. 14) reducen los efectos biológicos de los andrógenos por competencia directa con la enzima receptora. Para que esta se pueda fijar al andrógeno la característica principal de estos es que su estructura sea parecida a la del andrógeno.

Las características idóneas de un antiandrógenos son:

- No debe ser tóxico
- Debe tener baja actividad hormonal
- Debe tener elevada actividad antiandrogénica
- No debe disminuir la libido

El uso terapéutico de los antiandrógenos es en el tratamiento de hiperplasias y de carcinoma de próstata, calvicie con patrón androgénico, síndromes virilizantes en mujeres y pubertad temprana en varones, así como la inhibición del impulso sexual en varones con tendencias a cometer delitos sexuales^{19,20}.

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

Existe una amplia gama de compuestos antiandrogénicos; pero es importante mencionar que la diversidad de compuesto ha estado determinada por cada variante de hiperandrogenismo, el grado de avance de la enfermedad, la vía de administración, las contraindicaciones de su utilización y los efectos colaterales nocivos de cada fármaco. Este factor ha estimulado el esfuerzo en la búsqueda de nuevos fármacos con mayor potencia antiandrogénica y menor efecto colateral posible. Entre los efectos nocivos que reducen la utilidad clínica de los antiandrógenos, se ha evaluado los que se pueden presentar a corto y largo plazo y a todos los niveles fisiológicos que van desde comportamiento sexual hasta anomalías hormonales y atrofia celular^{21,22,23,24,25}.

Antiandrógeno	Efecto nocivo
Dietilestilbestrol	Ginecomastia, retención de fluidos, náuseas, fallas cardíacas
Espirolactona	Ginecomastia, pérdida de la libido, impotencia, anomalías en el semen, irregularidades menstruales
Ketoconazol	Efectos hepatotóxicos
Flutamida	Náuseas severas
Acetato de ciproterona	Disminuye la libido, impotencia sexual

Tabla 1 Ejemplo de algunos efectos colaterales que algunos antiandrógenos presentan

2.4.1 Clasificación química de los antiandrógenos

Los antiandrógenos se clasifican en dos grupos: esferoidales y no esteroidales²⁶.

1. Los **antiandrógenos esteroidales** son compuestos que derivan de la molécula de la progesterona (Fig. 2.5, Pág. 7), y las ventajas que presenta son las siguientes: actúan específicamente con el receptor antiandrogénico, son de mayor interés terapéutico y la relación costo-beneficio es la mejor opción. Las desventajas: reduce la concentración de la testosterona (Fig. 2.8, Pág. 11) y como consecuencia la actividad enzimática de la 5 α -reductasa reduce el tamaño de los órganos sexuales. Fig. 2.9
2. Los **antiandrógenos no esteroidales** también presentan algunas ventajas: tienen afinidad por el receptor debido a su estructura química y reducen en un 25 a 30% el tamaño de la próstata. Las desventajas observadas: actúan sobre la óxido nítrico sintetasa, que estimula la erección y ocasiona efectos adversos como insuficiencia hepática. Fig. 2.10

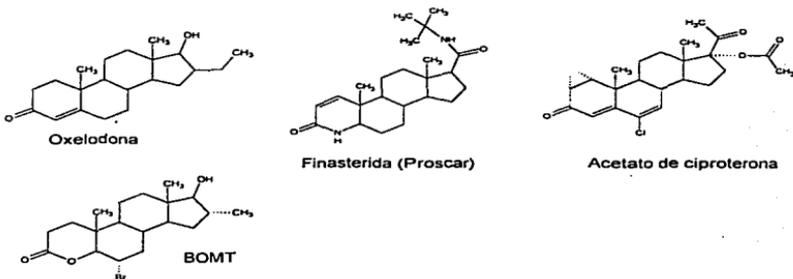


Figura 2.9 Ejemplos de antiandrógenos esteroidales

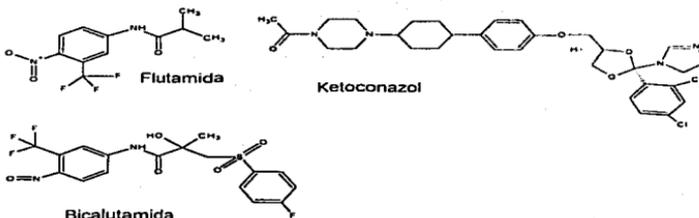


Figura 2.10 Ejemplos de antiandrógenos no esteroideos

2.5 La próstata

La próstata es una glándula que rodea a la uretra masculina justo debajo de la vejiga Fig. 2.11, Pág. 15.

El tamaño normal de la próstata es el de una nuez. Sin embargo el tamaño puede variar y en muchos hombres la próstata incrementa su tamaño (hipertrofia) conforme avanza en edad, principalmente cuando se llega a la edad de 40 a 50 años. Esta hipertrofia puede obstruir de manera parcial la uretra, dificultando el orinar^{1,27}.

Por lo general, la hipertrofia es benigna, y es tratada solo si los síntomas así lo requieren. Sin embargo, siempre se debe pensar que los cambios en la próstata pueden ser debidos al cáncer.

2.5.1 Función de la próstata

La próstata tiene dos funciones: la primera consiste en ayudar en el control urinario y la segunda es su participación en la actividad sexual.

En el proceso urinario la próstata juega un papel pasivo, ayudando a controlar la velocidad con que sale la orina de la vejiga y entra en la uretra. Esta acción es realizada por las fibras musculares de la próstata que rodea a la uretra.

En su segunda función la próstata ejerce un papel mas activo. Es el órgano encargado de secretar un líquido blanquecino en la uretra durante la eyaculación. Esta secreción ayuda a la motilidad del espermatozoides en la uretra y constituye la tercera parte de flujo seminal dándole a esta su apariencia blanquecina¹.

Básicamente la próstata puede desarrollar tres patologías:

- crecer: adenoma prostático
- desarrollar cáncer: cáncer de próstata
- inflamarse: prostatitis



Figura 2.11 Localización de la próstata

2.6 Cáncer de la próstata

El cáncer de próstata es uno de los cánceres más comunes en los hombres. En los últimos años, ha habido un incremento significativo en el uso de pruebas de exploración del cáncer de próstata y con ello en el diagnóstico de la enfermedad. Es una enfermedad originada en la glándula prostática, que en la medida que no se detecta tempranamente puede crecer y diseminarse más allá de la glándula

misma. Son algunas células de la próstata que pierden su control natural y se multiplican aceleradamente, en este crecimiento pueden invadir el tejido vecino o dispersarse a otras ubicaciones a distancia (metástasis)²⁷.

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

- Dificultad con comenzar o terminar de orinar
- Fuerza reducida del chorro de orina
- Goteo al final de la micción
- Micción dolorosa o con ardor
- Orinar poca cantidad cada vez y frecuentemente, especialmente por la noche.
- Eyaculación dolorosa.
- Sangre en la orina
- Incapacidad para orinar
- Dolor continuo en la parte baja de la espalda, en la pelvis, o en la zona superior de los muslos.

La secreción de testosterona influye en el desarrollo de carcinoma de próstata. El cáncer de próstata se origina generalmente en el lóbulo posterior del órgano adyacente al recto y cuando provoca metástasis invade otros órganos alejados como los huesos y ganglios linfáticos²⁸.

Las células del carcinoma prostático, al igual que las células glandulares prostáticas normales, dependen en su desarrollo y procuración de la secreción de la testosterona (cáncer hormona dependiente)²⁹.

El papel que desempeña el sistema endocrino en la inducción del cáncer de próstata no es conocido; pero se ha comprobado que la existencia metastásica del cáncer de próstata se puede detener o retrasar durante cierto tiempo mediante castración, administración de estrógenos o ambos²⁹.

La única posibilidad de tener opción a un tratamiento curativo en cáncer de próstata es su diagnóstico oportuno, por lo que su evaluación preventiva debe ser anual desde los 50 años en hombres normales, 40 años en familiares directos (hijo

o hermano) de su enfermo de cáncer de próstata ya que el riesgo es mayor, así como hombres de raza negra²⁹.

2.6.1 Tratamiento para el cáncer de la próstata

El tratamiento del cáncer de próstata es sumamente individualizado y deben considerarse muchos factores, sobre todo: la etapa de la enfermedad, los antecedentes médicos del paciente, la edad, la esperanza de vida. Algunos tratamientos utilizados para esta enfermedad son^{32,33,34,35,36}:

- a) *Prostatectomía radical*. Es la extirpación de la próstata y parte del tejido que la rodea. Se lleva a cabo sólo si el cáncer no se ha diseminado fuera de la próstata.
- b) *Resección transuretral*. Es la extirpación empleando un instrumento que se introduce en la próstata a través de la uretra. Esta operación a veces se hace para aliviar los síntomas causados por el tumor antes de aplicar otro tratamiento, o en los hombres que no pueden soportar una prostatectomía radical debido a la edad u otra enfermedad.
- c) *Criocirugía*. Un tipo de cirugía en el que el cáncer se destruye por congelamiento.
- d) *Otras terapias*. Puede ser: radiaciones ionizantes (Radioterapia), medicamentos contra el cáncer (Quimioterapia), Terapia biológica o Inmunoterapia (uso del sistema inmune del cuerpo para combatir el cáncer) y Hormonas (Hormonoterapia). Tradicionalmente, la terapia hormonal ha sido usada para el tratamiento de pacientes de próstata metastásico avanzado. Cuando el cáncer de próstata se encuentra confinado en la próstata, el tratamiento se enfoca en la cirugía o radiación para eliminar el cáncer local. En este grupo, del 50 al 80% de los pacientes continúa con vida después de los 10 años. El gran número de pacientes que se tratan con terapia hormonal son hombres con cáncer prostático avanzado, pero este tipo de terapia también se usa en hombres con cáncer prostático inicial

o bien cuando el cáncer se encuentra localizado. Como las células tumorales dependen para su mantenimiento de los andrógenos la intención de estas manipulaciones endocrinas es privar a las células tumorales de testosterona.

2.6.1.1 Hormonoterapia (Antiandrógenos)

La mayoría de estos agentes tienen diferentes mecanismos de acción y algunos muestran efectos secundarios severos que reducen su utilidad clínica. Así el acetato de ciproterona (ACP, Fig. 2.10, Pág. 14) es quizá el antiandrógeno esterooidal más conocido y ampliamente caracterizado, es el prototipo de los compuestos que compiten con la DHT por el sitio de unión en el receptor androgénico (AR). Es uno de los medicamentos que se encarga de inhibir el desarrollo de todos los órganos y las funciones reguladas de los andrógenos; glándulas sexuales accesorias libido, espermatogénesis, maduración ósea, así como algunos sistemas menos específicos del sexo. El ACP es un potente progestágeno, inhibe la secreción de gonadotropinas (a diferencia de los antiandrógenos puros), por lo que combina los dos principios básicos de la deprivación andrónica: reducir la síntesis de andrógenos, e inhibir la acción androgénica a nivel celular. La dosis recomendada para monoterapia con ACP es de 300 mg/día. La Finasterida Fig. 2.10 conocida comercialmente como Proscar, es el prototipo de los fármacos que actúan inhibiendo a la enzima 5 α -reductasa II, reduciendo drásticamente los niveles de DHT y aumentando los de testosterona. La oxendolona y BOMT Fig. 2.10 son otros fármacos menos estudiados, pero que presentan actividad antiandrogénica al competir con el AR.

2.7 Hiperplasia prostática benigna

El adenoma prostático, más correctamente llamado Hipertrofia Prostática Benigna, es un crecimiento anormal de la glándula prostática que no corresponde a cáncer. Puede comenzar a aparecer clínicamente desde antes de los 50 años en algunos casos y ya cercano a los 70 años más del 70% de los hombres lo presentan. Solo en algunos pacientes produce síntomas derivados de la compresión del conducto

de salida de la orina (uretra prostática) y del mayor esfuerzo que debe hacer la vejiga para lograr la micción³⁸.

El presentar un crecimiento prostático debe ser evaluado para determinar el grado de obstrucción y las posibles complicaciones que se producen por la dificultad en el vaciamiento vesical. Existen múltiples alternativas terapéuticas que varían mucho entre sí, nuevamente no hay un tratamiento mejor que otro; cada caso es distinto. Es la evaluación individual la que determina cual es la mejor opción para cada paciente.

En el tratamiento para la hiperplasia prostática benigna destaca la cirugía; sin embargo esta resulta una experiencia traumática para el paciente y es entonces donde entra el importante papel de los antiandrógenos. Actualmente debido a su gran demanda en el mercado el producto sintético llamado Finasterida (Proscar) (Fig. 2.9, Pág. 13) es el que se utiliza en la terapéutica de esta enfermedad.

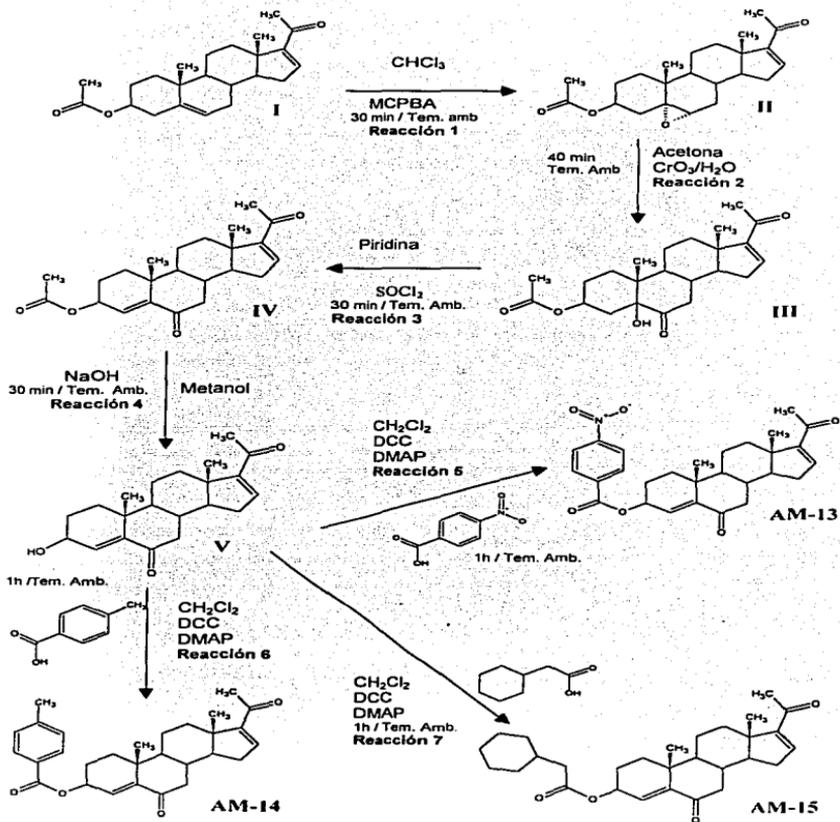
3

OBJETIVOS

Considerando la relación existente entre la estructura química-actividad biológica ^{37,38,39,40,41} de los antiandrogénicos de tipo esteroidal; se plantean los siguientes objetivos de este trabajo:

- Sintetizar, purificar y caracterizar física y espectralmente los intermediarios de las reacciones para la obtención de los compuestos finales.
- Sintetizar el compuesto 3 β -(p-Nitrobenzoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona con posible actividad antiandrogénica
- Sintetizar el compuesto 3 β -(p-toluoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona con posible actividad antiandrogénica
- Sintetizar el compuesto 3 β -(2-ciclohexilacetoxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona con posible actividad antiandrogénica
- Purificar y caracterizar dichos compuestos mediante sus propiedades físicas (p.f.) y espectroscópicas (UV, IR, RMN)
- Realizar la evaluación biológica *in vitro* (unión al receptor androgénico e inhibición de la enzima 5 α -reductasa) de los compuestos finales sintetizados, y comparar la actividad biológica de estos con uno de los fármacos utilizados en el mercado (Finasterida).

Figura 3.1 Ruta de síntesis



4

METODOLOGÍA Y RESULTADOS

Este trabajo consta de dos etapas, la primera es la parte química la cual consta de la síntesis, purificación y caracterización física y espectroscópica de los intermediarios de la ruta de síntesis (Fig. 3.1, Pág. 21) (compuestos I, II, III, IV, V) y de los compuestos finales (AM-13, AM-14, AM-15), la segunda etapa es la evaluación biológica de los compuestos finales, esta consta de dos ensayos *in vitro*, el primero es la inhibición de la actividad de la enzima 5 α -reductasa y el otro ensayo es la determinación de la competencia de los compuestos sintetizados por receptores de andrógenos presentes en el citosol de las vesículas seminales.

4.1 Parte química. Síntesis

El equipo empleado para determinar los espectros de Absorción ultravioleta fue Perkin-Elmer Hitachi modelo 200 y se utilizó como disolvente metanol.

La espectrofotometría de Absorción en el infrarrojo se determino empleando al espectrofotómetro IR de transformada de Fourier Perkin-Elmer modelo 1600, las determinaciones se realizaron en película.

Los espectros de resonancia magnética nuclear de hidrogeno (RMN ^1H) y carbono (RMN ^{13}C), se determinaron en un espectrómetro analítico Varian VXR-300s, utilizando como disolvente cloroformo deuterado (CDCl_3) y como referencia interna tetrametilsilano (TMS) o DMSO. Los desplazamientos químicos se informan en partes por millón (ppm) relativas al TMS utilizando el parámetro δ . Los patrones de acoplamiento se designan con las siguientes abreviaturas: s

(singulete), d (doblete), t (triplete), m (multiplete). La constante de acoplamiento se abrevia como J y está expresada en Hertz.

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

Los puntos de fusión se determinaron en un aparato Fisher Johns y no están corregidos ya que los compuestos sintetizados son nuevos y no hay referencias contra quien compararlos.

El monitoreo de los diferentes intermediarios y compuesto final se realizó mediante la técnica de cromatografía en capa fina (ccf) utilizando Gel de sílice Merck 7730 Sílica Gel GF 254 y Sílica Gel 60 G; como revelador se utilizó una solución de CoCl_2 al 1% en H_2SO_4 2N y una lámpara (UV $\lambda=254\text{nm}$).

Los compuestos finales se purificaron por medio de una columna cromatográfica, utilizando como adsorbente Gel de sílice 60 Merck y una mezcla de elución adecuada para cada caso.

4.1.1 Caracterización de la materia prima (16-DPA)

Propiedad	Valor
Punto de fusión ($^{\circ}\text{C}$)	170-172
Formula molecular	$\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_3$
Peso molecular (g/mol)	356
Valor espectroscópico	Asignación
UV (nm)	
λ_{max} 237.92	CO α,β insaturado en C-20
IR (cm^{-1})	
2940.80	C-H de $-\text{CH}_3$ y $-\text{CH}_2$
2860.78	C-H de $-\text{CH}_3$ y $-\text{CH}_2$
1731.28	C=O de éster en C-3
1664.68	C=O α,β insaturado en C-20
1586.24	C=C conjugado en C-16
1435.28	$\text{CH}_3\text{-CO}$ en C-20

1371.75	CH ₂ y CH ₃
1244.72	C-O-C de CH ₃ COO- en C-3
1032.79	C-O-C de CH ₃ COO- en C-3
RMN ¹H (ppm)	
0.920 (s, 3H)	-H en C-18
1.059 (s, 3H)	-H en C-19
2.036 (s, 3H)	-H del -CH ₃ COO- en C-3
2.265 (s, 3H)	-H en C-21
4.610 (m, 1H)	-H en C-3
5.386 (t, 1H)	C=CH en C-6
6.712 (t, 1H)	C=CH en C-16
RMN ¹³C (ppm)	Carbono
15.685 (1°)	C-18
19.193 (1°)	C-19
21.401 (1°)	C-21
27.121 (1°)	CH ₃ del acetoxi en C-3
73.833 (3°)	C-3
121.958 (3°)	C-6 vinílico
140.223 (4°)	C-5 vinílico
144.386 (3°)	C-16 vinílico
155.308 (4°)	C-17 vinílico
170.504 (4°)	Carbonilo del éster en C-3
196.800 (4°)	C-20
EMIE (m/z)	
357	M+
341	M+ -CH ₃
296	M+ -CH ₃ COOH (pico base)
281	296 -CH ₃
253	296 -CO
225	296 -28

Tabla 2 Propiedades físicas y espectroscópicas de la materia prima 3β-acetoxi-5,16-pregnadien-20-ona (I)

4.1.2 Síntesis del compuesto 3β-acetoxi-5,6-epoxi-pregn-16-en-20-ona (II)

En un matraz bola de 250 mL se colocaron 3 g (8.4×10^{-3} mol) de acetato de 16-dehidropregnenolona (16-DPA) como materia prima, 150 mL de cloroformo (CHCl₃) como disolvente y 4 g (0.023 mol) de ácido 3-cloroperoxibenzoico (MCPBA). La mezcla de reacción se mantuvo en agitación en una parrilla eléctrica por 30 minutos a temperatura ambiente. Terminado el tiempo la reacción se neutralizó con una solución de bisulfito de sodio y bicarbonato de sodio (NaHCO₃) al 5%. Después a esta mezcla se le realizaron 3 extracciones sucesivas con 50

mL de CHCl_3 cada una, posteriormente la fase orgánica se colocó en un matraz bola para evaporar el CHCl_3 en un rotaevaporador. Se obtiene un producto no cristalino amarillento (2.8 g, 89% de rendimiento).

El producto seco se recrystalizó con una mezcla hexano/acetato de etilo (7:3), lavando los cristales con la misma mezcla fría. Se obtienen el compuesto puro en forma de cristales blancos (2.0 g, 63% de rendimiento)

Propiedad	Valor
Punto de fusión ($^{\circ}\text{C}$)	170-172
Formula molecular	$\text{C}_{23}\text{H}_{32}\text{O}_4$
Peso molecular (g/mol)	372
Valor espectroscópico	Asignación
UV (nm)	
λ_{max} 238.11	CO α, β insaturado en C-20
IR (cm^{-1})	
2940.52	C-H de $-\text{CH}_3$ y $-\text{CH}_2$
2860.11	C-H de $-\text{CH}_3$ y $-\text{CH}_2$
1732.28	C=O de éster en C-3
1664.89	C=O α, β insaturado en C-20
1587.32	C=C conjugado en C-16
1370.85	$-\text{CH}_3$ y $-\text{CH}_2$
1241.43	C-O-C de $\text{CH}_3\text{CO}-$ en C-3
1034.67	Estiramiento C-C-O
RMN ^1H (ppm)	
0.848 (s, 3H)	-H en C-18
1.114 (s, 3H)	-H en C-19
2.034 (s, 3H)	-H del $\text{CH}_3\text{COO}-$ en C-3
2.251 (s, 3H)	-H en C-21
4.180 (t, 1H)	-H en C-6
4.770 (m, 1H)	-H en C-3
6.685 (t, 1H)	C=CH en C-16
RMN ^{13}C (ppm)	
15.822 (1°)	C-18
16.962 (1°)	C-19
21.388 (1°)	C-21
27.149 (1°)	C del CH_3 del acetoxi en C-3
63.269 (3°)	C-6 base del epóxido
65.351 (4°)	C-5 base del epóxido
71.210 (3°)	C-3

144.126 (4°)	C-16 vinílico
155.243 (4°)	C-17 vinílico
170.524 (4°)	Carbonilo del éster en C-3
196.703 (4°)	C-20 base de C=O
EMIE (m/z)	
373	M+1
357	M+ -CH ₃
329	M+ -CH ₂ C=O
312	M+ -CH ₃ COO (pico base)

Tabla 3 Propiedades físicas y espectroscópicas del compuesto 3β-acetoxi-5,6-epoxi-pregn-16-en-20-ona (II)

4.1.3 Síntesis del compuesto 3β-acetoxi-5-αhidroxi-pregn-16-en-6,20-diona (III)

En un matraz bola de 50 mL se colocaron 200 mg (5.4×10^{-4} mol) del compuesto II, 10 mL de acetona y una carga de solución oxidante de 0.21 g (4×10^{-3} mol) de CrO₃ en 0.7 mL de agua, la cual se adicionó gota a gota con una pipeta pasteur estando la mezcla de reacción en agitación. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación por 10 minutos a temperatura ambiente. Se adicionó otra carga igual de solución oxidante gota a gota. La reacción se mantuvo en agitación por 30 minutos a temperatura ambiente.

Terminado el tiempo de reacción la mezcla se vertió en un vaso de precipitados el cual contenía 200 mL de agua con hielo para que el producto precipitara esta mezcla se filtró a vacío, se lavó con agua y se dejó secar.

Se obtiene un producto amorfo de color beige (170 mg, 81% de rendimiento).

La purificación de este compuesto se realizó por medio de una recristalización con una mezcla hexano/acetato de etilo (7:3). Se obtuvo un producto cristalino de color blanco (110 mg, 52% de rendimiento).

Propiedad	Valor
Punto de fusión (°C)	244-245
Formula molecular	C ₂₃ H ₃₂ O ₅

Peso molecular (g/mol)	388
Valor espectroscópico	Asignación
UV (nm)	
λ _{max} 237.8	CO α, β insaturado en C-20
IR (cm⁻¹)	
3409.82	-OH en C-3
2940.32	C-H de -CH ₃ y -CH ₂
1712.26	C=O en C-6
1664.74	C=O α, β insaturado en C-20
1585.74	C=C conjugado en C-16
1432.14	-CH ₂
1366.00	-CH ₃
1236.75	C-O-C de CH ₃ COO-
1039.74	Estiramiento C-O-C
RMN ¹H (ppm)	
0.844 (s, 3H)	-H en C-18
1.110 (s, 3H)	-H en C-19
2.011 (s, 3H)	-H del CH ₃ de CH ₃ COO- en C-3
2.264 (s, 3H)	-H en C-21
2.881 (d, 2H)	-H en C-4
5.032 (m, 1H)	H en C-3
6.688 (dd, 1H)	C=CH en C-16
RMN ¹³C (ppm)	
13.875 (1°)	C-18
15.793 (1°)	C-19
21.335 (1°)	C-21
27.084 (1°)	C del CH ₃ del CH ₃ COO- en C-3
70.573 (3°)	C-3
80.330 (4°)	C-5
143.890 (3°)	C-16 vinílico
155.092 (4°)	C-17 vinílico
171.009 (4°)	Carbonilo de éster en C-3
196.636 (4°)	C-20
211.739 (4°)	C-6
EMIE (m/z)	
388	M+
373	M+ -CH ₃
345	M+ -CH ₃ C=O
328	345 -H ₂ O, pico base

Tabla 4 Propiedades físicas y espectroscópicas del compuesto 3β-acetoxi-5-hidroxi-pregna-16-en-6,20-diona (III)

4.1.4 Síntesis del compuesto 3 β -acetoxi-pregna-4,16-dien-6,20-diona (IV)

En una matraz bola de 50 mL y bajo atmósfera de nitrógeno se colocaron 100 mg (2.6×10^{-4} mol) del compuesto III en 3.2 mL (0.038 mol) de piridina. La mezcla se mantuvo en agitación en un baño de hielo, después se le adicionaron lentamente 200 μ L (2.75×10^{-3} mol) de cloruro de tionilo (SOCl_2), una vez que la mezcla de reacción llegó a temperatura ambiente se retiró el baño de hielo. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación por 30 minutos a temperatura ambiente.

Una vez concluida la reacción el contenido del matraz bola se vertió a un vaso de precipitados el cual contenía 100 mL de agua con hielo para que precipite el compuesto.

El compuesto se extrajo con 3 volúmenes de acetato de etilo de 100 mL cada uno, se reunieron las fases orgánicas y se lavaron con 2 volúmenes de 50 mL cada uno de una solución de HCl al 10% y 2 volúmenes de 50 mL de NaHCO_3 al 5% y finalmente se lava con volúmenes de 100 mL de H_2O hasta un pH neutro de la fase acuosa, la fase orgánica se seca con sulfato de sodio anhidro. Se destila el exceso de acetato de etilo en el rotaevaporador.

Se obtuvo un compuesto cristalino amarillento (83 mg, 87% de rendimiento). Este compuesto se purificó por medio de una recrystalización con una mezcla hexano/acetato de etilo (7:3). Se obtuvo un compuesto cristalino blanco (60 mg, 62% de rendimiento).

Propiedad	Valor
Punto de fusión ($^{\circ}\text{C}$)	193-197
Formula molecular	$\text{C}_{23}\text{H}_{30}\text{O}_4$
Peso molecular (g/mol)	370
Valor espectroscópico	Asignación
UV (nm)	
λ_{max} 236.68	$\text{CO } \alpha, \beta$ insaturado en C-20
IR (cm^{-1})	

2942.70	C-H de $-\text{CH}_3$ y $-\text{CH}_2$
2862.55	C-H de $-\text{CH}_3$ y $-\text{CH}_2$
1735.14	C=O de éster
1691.47	C=O α, β insaturado en C-20
1664.19	C=O α, β insaturado en C-6
1371.54	$-\text{CH}_3$
1233.12	Estiramiento de $\text{CH}_3\text{COO}-$
1042.00	Estiramiento C-O-C del éster
RMN ^1H (ppm)	
0.930 (s, 3H)	-H en C-18
1.062 (s, 3H)	-H en C-19
2.076 (s, 3H)	-H del CH_3 del $\text{CH}_3\text{COO}-$ en C-3
2.276 (s, 3H)	-H en C-21
5.330 (m, 1H)	-H en C-3
6.096 (d, 1H)	Protón vinílico en C-4
6.705 (d, 1H)	Protón vinílico en C-16
RMN ^{13}C (ppm)	
15.752 (1°)	C-18
19.553 (1°)	C-19
21.145 (1°)	C-21
27.089 (1°)	C del CH_3 del $\text{CH}_3\text{COO}-$ en C-3
69.193 (3°)	C-3
129.045 (3°)	C-4 vinílico
143.762 (3°)	C-16 vinílico
147.875 (4°)	C-5 vinílico
154.869 (4°)	C-17 vinílico
170.678 (4°)	Carbonilo de éster en C-3
196.554 (4°)	C-20
201.746 (4°)	C-6
EMIE (m/z)	
370	M+
355	M+ $-\text{CH}_3$
328	M+ $-\text{CH}_3\text{C}=\text{O}$ (pico base)
313	328 $-\text{CH}_3$

Tabla 5 Propiedades físicas y espectroscópicas del compuesto 3 β -acetoxi-pregna-4,16-dien-6,20-diona (IV)

4.1.5 Síntesis del compuesto 3 β -hidroxi-pregna-4,16-dien-6,20-diona (V)

En un matraz bola de 50 mL se adicionaron 100 mg (2.7×10^{-4} mol) del compuesto IV, 5.3 mL de metanol y 1 mL (5.0×10^{-4} mol) de una solución de hidróxido de sodio (NaOH) al 2%. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación por 30

minutos a temperatura ambiente. Terminada la reacción la mezcla se vertió en 100 mL de agua fría para que precipitara el producto; se filtró a vacío y se lavó el precipitado con agua.

Se obtiene un producto blanco (45 mg, 50% de rendimiento).

Este compuesto fue recristalizado con una mezcla hexano/acetato de etilo (7:3). Se obtuvo un compuesto cristalino blanco (34 mg, 38% de rendimiento).

Propiedad	Valor
Punto de fusión (°C)	168-170
Formula molecular	C ₂₁ H ₂₈ O ₃
Peso molecular (g/mol)	328
Valor espectroscópico	Asignación
UV (nm)	
λ _{max} 238.41	CO α,β insaturado en C-20
IR (cm⁻¹)	
3430.87	OH en C-3
2941.04	C-H de -CH ₃ y -CH ₂
2859.50	C-H de -CH ₃ y -CH ₂
1688.51	C=O α,β insaturado en C-6
1663.74	C=O α,β insaturado en C-20
1371.53	-CH ₃
RMN ¹H (ppm)	
0.930 (s, 3H)	-H en C-18
1.062 (s, 3H)	-H en C-19
2.275 (s, 3H)	-H en C-21
4.251 (t, 1H)	-H en C-3
6.096 (d, 1H)	Protón vinílico en C-4
6.705 (d, 1H)	Protón vinílico en C-16
RMN ¹³C (ppm)	
15.757 (1°)	C-18
19.763 (1°)	C-19
27.089 (1°)	C-21
67.172 (3°)	C-3
133.219 (3°)	C-4 vinílico
143.92 (3°)	C-16 vinílico
146.498 (4°)	C-5 vinílico
154.85 (4°)	C-17 vinílico
196.656 (4°)	C-20

202.376 (4 ^o)	C-6
EMIE (m/z)	
328	M+ (pico base)
313	M+ -CH ₃
295	313 -H ₂ O
285	M+ -CH ₃ C=O

Tabla 6 Propiedades físicas y espectroscópicas del compuesto 3β-hidroxi-pregna-4,16-dien-6,20-diona (V)

4.1.6 Síntesis del compuesto 3β-(p-nitrobenzoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (AM-13)

En un matraz bola de 50 mL se adicionaron 50 mg (1.5×10^{-4} mol) del compuesto V, 51.6 mg de diciclohexilcarbodiimida (DCC), 30 mg de dimetilaminopiridina (DMAP) y 50 mg de ácido 4-nitrobenzoico (2.7×10^{-4} mol), el matraz se tapó con un tapón de hule y con una jeringa de 10 mL se adicionó 5 mL de diclorometano (CH₂Cl₂) anhidro. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación 1 hora a temperatura ambiente con un ambiente de nitrógeno.

La mezcla de reacción se adicionó a un vaso de precipitados el cual contenía 20 mL de agua fría, a esto se le realizó 3 extracciones sucesivas con 3 volúmenes de CHCl₃ de 20 ml cada uno, las fases orgánicas se reunieron y el disolvente se evaporó a sequedad en un rotaevaporador, al producto seco se le adicionaron 10 mL de acetato de etilo y se filtró (este procedimiento se lleva a cabo 3 veces). El producto se lavo con acetato de etilo, el filtrado se llevó a sequedad en una cámara de vacío.

Se obtuvo un compuesto de color amarillo claro no cristalino (57 mg, 78% de rendimiento).

El producto se purificó mediante una columna de alumina (óxido de aluminio) teniendo como fase móvil una mezcla de hexano/acetato de etilo (8:2).

Se obtuvieron cristales de color beige (42 mg, 57% de rendimiento) con un punto de fusión de: 226-228 °C

Propiedad	Valor
Punto de fusión (°C)	226-228
Formula molecular	C ₂₈ H ₃₁ NO ₆
Peso molecular (g/mol)	477
Valor espectroscópico	Asignación
UV (nm)	
λ _{max} 242.93	CO α,β insaturado en C-20
IR (cm⁻¹)	
2941.90	C-H de -CH ₃ y -CH ₂
2851.70	C-H de -CH ₃ y -CH ₂
1706.80	C=O del éster en C-3
1688.75	C=O en C-20
1661.13	C=O en C-6
1629.36	insaturaciones
1526.74	NO ₂ -C
1459.94	-CH ₂
1373.90	-CH ₃
1350.65	NO ₂ -C
1276.36	O=C-O-C del éster
1038.60	Estiramiento C-C-O
722.23	Monosustitución en el anillo aromático
RMN ¹H (ppm)	
0.949 (s, 3H)	-H en C-18
1.122 (s, 3H)	-H en C-19
2.285 (s, 3H)	-H en C-21
5.622 (m, 1H)	H en C-3
6.211 (d, 1H)	Protón vinílico en C-4
6.714 (t, 1H)	Protón vinílico en C-16
8.282 (m, 4H)	Protones del anillo aromático
RMN ¹³C (ppm)	
15.767 (1°)	C-18
19.538 (1°)	C-19
27.091 (1°)	C-21
70.967 (3°)	C-3
123.495 (3°)	Carbonos del anillo aromático
128.064 (3°)	Carbonos del anillo aromático
130.831 (3°)	C-4 vinílico
143.727 (3°)	C-16 vinílico
148.584 (4°)	C-5 vinílico
154.843 (4°)	C-17 vinílico

164.260 (4°)	Carbonilo del éster en C-3
196.538 (4°)	C-20
201.742 (4°)	C-6
EMIE (m/z)	
477	M+ (pico base)

Tabla 7 Propiedades físicas y espectroscópicas del compuesto 3β-(p-nitrobenzoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (AM-13)

4.1.7 Síntesis del compuesto 3β-(p-toluoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (AM-14)

En un matraz bola de 50 mL se adicionaron 50 mg (1.5×10^{-4} mol) del compuesto V, 51.6 mg de diciclohexilcarbodiimida (DCC), 30 mg de dimetilaminopiridina (DMAP) y 50 mg de ácido 4-toluico (3.3×10^{-4} mol), el matraz se tapó con un tapón de hule y con una jeringa de 10 mL se adicionó 5 mL de diclorometano (CH_2Cl_2) anhidro. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación por una hora a temperatura ambiente en una atmósfera de nitrógeno. Al término, esta mezcla se adicionó a un vaso de precipitados el cual contenía 20 mL de agua fría. Se realizaron 3 extracciones sucesivas con 3 volúmenes de CHCl_3 de 20 ml cada uno, las fases orgánicas se reunieron y el disolvente se evaporó en un rotaevaporador, al producto seco se le adicionaron 10 mL de acetato de etilo y se filtro. El producto AM-14 se lavo con acetato de etilo, el filtrado se llevó a sequedad en una cámara de vacío.

Se obtiene un producto amarillo-café no cristalino (50 mg, 73% de rendimiento). El producto se purificó mediante una recristalización de metanol, los cristales se lavaron con hexano frío.

Se obtuvieron cristales blancos (35 mg, 51% de rendimiento) con un punto de fusión de 229-233 °C

Propiedad	Valor
Punto de fusión (°C)	233-235
Formula molecular	$\text{C}_{29}\text{H}_{34}\text{O}_4$
Peso molecular (g/mol)	446

Valor espectroscópico	Asignación
UV (nm)	
λ_{\max} 240.30	CO α,β insaturado en C-20
IR (cm⁻¹)	
3043.95	=C-H
2941.55	C-H de -CH ₃ y -CH ₂
2850.83	C-H de -CH ₃ y -CH ₂
1724.73	C=O del éster en C-3
1685.49	C=O en C-20
1665.63	C=O en C-6
1451.14	-CH ₂
1367.26	-CH ₃
1271.90	C-O-C del éster
748.25	Monosustitución del anillo aromático
RMN ¹H (ppm)	
0.942 (s, 3H)	-H en C-18
1.105 (s, 3H)	-H en C-19
2.173 (s, 3H)	-H en C-21
2.280 (s, 3H)	Metilo del anillo aromático
5.56 (m, 1H)	H en C-3
6.231 (d, 1H)	Protón vinílico en C-4
6.712 (t, 1H)	Protón vinílico en C-16
RMN ¹³C (ppm)	
15.763 (1°)	C-18
19.632 (1°)	C-19
21.632 (1°)	Metilo del anillo aromático en C-3
27.079 (1°)	C-21
69.603 (3°)	C-3
129.011 (3°)	Carbonos del anillo aromático
129.311 (3°)	Carbonos del anillo aromático
129.722 (3°)	C-4 vinílico
143.730 (3°)	C-16 vinílico
147.919 (4°)	C-5 vinílico
154.886 (4°)	C-17 vinílico
166.197 (4°)	Carbonilo del éster en C-3
196.197 (4°)	C-20
201.839 (4°)	C-6
EMIE (m/z)	
446	M+
119	Pico base

Tabla 8 Propiedades físicas y espectroscópicas del compuesto 3 β -(p-toluloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (AM-14)

4.1.8 Síntesis del compuesto 3β-(2-ciclohexilacetoxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (AM-15)

En un matraz bola de 50 mL se adicionó 50 mg (1.5×10^{-4} mol) del compuesto V, 51.6 mg de diciclohexilcarbodiimida (DCC), 30 mg de dimetilaminopiridina (DMAP) y 50 mg de ácido ciclohexilacético (3.5×10^{-4} mol), el matraz se tapó con un tapón de hule y con una jeringa de 10 mL se adicionó 5 mL de diclorometano (CH_2Cl_2) anhidro. La mezcla de reacción se mantuvo en agitación 1 hora a temperatura ambiente con un ambiente de nitrógeno.

Al término, esta mezcla se adicionó a un vaso de precipitados el cual contenía 20 mL de agua fría. Se realizaron 3 extracciones sucesivas con 3 volúmenes de CHCl_3 de 20 ml cada uno, las fases orgánicas se reunieron y el disolvente se evaporó a sequedad en un rotaevaporador, al producto seco se le adicionaron 10 mL de acetato de etilo y se filtro. El producto AM-15 se lavo con acetato de etilo, el filtrado se llevó a sequedad en una cámara de vacío.

Se obtuvo un producto blanco no cristalino (60 mg, 89% de rendimiento).

El producto se recrystalizó en metanol y se purificó mediante una columna de alumina teniendo como fase móvil una mezcla de hexano/acetato de etilo (9:1).

Se obtuvieron cristales blancos (43 mg, 64% de rendimiento) con un punto de fusión de: 153-156 °C

Propiedad	Valor
Punto de fusión (°C)	153-156
Formula molecular	$\text{C}_{29}\text{H}_{40}\text{O}_4$
Peso molecular (g/mol)	452
Valor espectroscópico	Asignación
UV (nm)	
λ_{max} 240,30	CO α,β insaturado en C-20
IR (cm⁻¹)	
2930.49	C-H de $-\text{CH}_3$ y $-\text{CH}_2$
2843.77	C-H de $-\text{CH}_3$ y $-\text{CH}_2$
1729.60	C=O del éster en C-3

1689.51	C=O en C-20
1665.54	C=O en C-6
1587.29	C=C conjugado en C-16
1453.98	-CH ₂
1368.72	-CH ₃
1037.41	Estiramiento C-C-O
RMN ¹H (ppm)	
0.930 (s, 3H)	-H en C-18
1.062 (s, 3H)	-H en C-19
2.176 (s, 3H)	-H en C-21
5.340 (m, 1H)	H en C-3
6.087 (t, 1H)	Protón vinílico en C-4
6.708 (t, 1H)	Protón vinílico en C-16
RMN ¹³C (ppm)	
15.760 (1 ^o)	C-18
19.614 (1 ^o)	C-19
24.156 (1 ^o)	C-21
68.904 (3 ^o)	C-3
129.367 (3 ^o)	C-4 vinílico
143.769 (3 ^o)	C-16 vinílico
147.754 (4 ^o)	C-5 vinílico
154.882 (4 ^o)	C-17 vinílico
172.726 (4 ^o)	Carbonilo de éster en C-3
196.557 (4 ^o)	C-20
201.739 (4 ^o)	C-6
EMIE (m/z)	
452	M+
328	Pico base

Tabla 9 Propiedades físicas y espectroscópicas del compuesto 3β-(2-ciclohexilacetoxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (AM-15)

4.2 Evaluación biológica

El equipo empleado para estos ensayos fue: un contador de centelleo (para medir la radioactividad) Liquid Scintillation Analyzer, modelo Tri-cards 2100 TR-Packard con impresora Panasonic Quiet KX-P3123; una incubadora modelo BMR-18/25; una centrifuga modelo Allegra 6R centrifuge Beckman; micropipetas electrónicas, Advanced Electronic Pipette Rainin modelo Edp 3, con capacidades para 10 μ L, 100 μ L y 1000 μ L y una lámpara UV $\lambda=245$ nm.

Se determinó la actividad de la enzima 5 α -reductasa, en la fracción microsomal obtenida al centrifugar a 140000xg homogenados de próstata de hámsters. Se evaluó el efecto de los compuestos AM-13, AM-14 y AM-15 sobre la actividad de 5 α -reductasa. También se determinó la capacidad de competencia de los compuestos AM-13, AM-14 YAM-15 por la unión al receptor de andrógenos presente en la fracción citosólica de la próstata del hámster.

Para el desarrollo de los experimentos se emplearon hámsters machos de la cepa Syriam Golden con un peso promedio de 150-200 g y gonadectomizados 72 horas antes del estudio. Los animales se mantuvieron en condiciones de bioterio, a una temperatura controlada de 22°C con periodos de luz y oscuridad de 12 h y comida y agua *ad libitum* (*sin control*).

4.2.1 Obtención de la fracción microsomal y citosólica de próstata de hámster.

Se sacrificaron 50 hámsters 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 buffer TEDM (Tris-HCl 20 mM, EDTA 1.5 mM, molibdato de sodio 20 mM y glicerol al 10%) con relación al peso de tejido (v/p 3:1). Los homogenados se centrifugaron a 140000xg, durante una hora a 2°C. Posteriormente se separó el pellet (fracción microsomal) para ser resuspendido en 3 volúmenes de medio A (sacarosa 0.32 M, ditiotreitól 0.1 mM y

solución amortiguadora de fosfatos 20 mM a pH=6.5) en relación con el peso del tejido obtenido inicialmente. El tejido se separó en alícuotas de 1 mL, las cuales se conservaron a -70°C . El sobrenadante (fracción citosólica) se separó en alícuotas de 1 mL, las cuales se conservaron a -70°C .

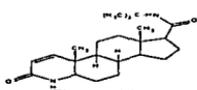
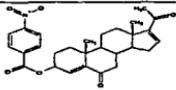
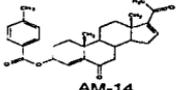
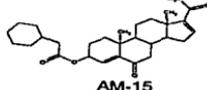
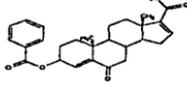
4.2.2 Experimentos *in vitro*: Inhibición de la actividad de la enzima 5α -reductasa presente en fracción microsomal de próstata de hámster a pH= 7.0

Con la fracción microsomal de próstata previamente obtenida, se realizó un estudio metabólico *in vitro* para conocer el posible efecto inhibitorio de los esteroides sintetizados sobre la enzima 5α -reductasa. Para realizar este bioensayo los esteroides a evaluar (compuestos AM-13, AM-14 y AM-15) en concentraciones de 200 nM, 1 μM , 2 μM y 10 μM para cada compuesto se incubaron en presencia de 250 μg de proteína de microsomas de próstata en una mezcla de incubación que contenía: 80 μL de testosterona tritlada $^3\text{[H]T}$ 2 nM, con una actividad específica de 85-104 Ci/mmol ($A_e=85-104$ Ci/mmol), 100 μL de NADPH $^+$ (2 mM), 100 μL de ditioneol (1 mM) y 720 μL de una solución amortiguadora de fosfatos (40 mM 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 libre de compuestos nuevos, el cual corresponde al 100% de conversión (este control se toma como referencia y está en una concentración de testosterona marcada de 2 nM). La incubación terminó con la adición de 1 mL de CH_2Cl_2 , para después realizar 4 extracciones sucesivas a la mezcla de reacción con el mismo disolvente. La separación de los productos tritlados $^3\text{[H]T}$ y $^3\text{[H]DHT}$ se realizó por CCF, en un sistema de elución cloroformo / acetona (9:1), corriendo las placas tres veces, separando los compuestos en base a su polaridad (R.f. de T=0.55, R.f. de DHT=0.67) y determinando el contenido de radiactividad en la fracción al estándar de DHT (producto obtenido por la transformación de $^3\text{[H]T}$ en presencia de la enzima 5α -reductasa). Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 10 y 11.

Concentración	AM-13 (% de actividad)	AM-14 (% de actividad)	AM-15 (% de actividad)
Control 2nM	100	100	100
0.2 μ M	100	49	100
1 μ M	100	55	100
2 μ M	100	49	100
10 μ M	93	46	76

Tabla 10 Porcentaje de actividad de la enzima 5 α -reductasa por los compuestos AM-13, AM-14 y AM-15, de acuerdo al estándar.

Compuesto	* IC ₅₀
 Finasterida Usado como compuesto de referencia	10 nM
 AM-13	No presenta inhibición de la actividad de la enzima 5 α -reductasa
 AM-14	1.8 μ M Presentó baja inhibición de la actividad de la enzima 5 α -reductasa
 AM-15	No presenta inhibición de la actividad de la enzima 5 α -reductasa
 **N4	60 μ M

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

** Compuesto que se tomó como modelo, para la síntesis de los compuestos AM-13 y AM-14, debido a que presenta un IC₅₀ menor que la Finasterida.

Tabla 11 Inhibición de la enzima 5 α -reductasa

4.2.3. Determinación de la competencia de los compuestos sintetizados por receptores de andrógenos presentes en el citosol de las vesículas seminales.

Este bioensayo se realiza con el fin de conocer si existe algún tipo de competencia producida por los esteroides evaluados hacia la unión a receptores andrógenos los cuales se encuentran presentes en el citosol de los tejidos dependientes de andrógenos como las vesículas seminales de hamster. Los compuestos se incubaron en presencia de 200 μ L (10.20 mg) de citosol y dihidrotestosterona tritiada 3 [H]DHT 1.36 nM (Ae=110-150 Ci/mmol) durante 18 h a 4°C y diferentes concentraciones (0.2 μ M, 0.6 μ M, 1 μ M y 2 μ M) de DHT (es usada como referencia) y de los compuestos AM-13, AM-14 y AM-15. Terminado el tiempo de incubación se agregó 800 μ L de una suspensión de carbón activado-dextrán para eliminar la radiactividad libre o no unida al receptor, incubando nuevamente durante 45 minutos en hielo. Finalmente se centrifugó a 4000 rpm durante 10 min. a 14°C y se separó el sobrenadante, al cual se midió la radiactividad presente provocada por la 3 [H]DHT unida al receptor. El análisis por competencia al receptor se lleva a cabo en presencia del sustrato natural (DHT) o de los inhibidores. Los resultados obtenidos se presentan en la Tabla 11 y gráfica 1.

Cálculo de la constante de inhibición (Ki) se obtuvo con la siguiente fórmula:

$$Ki = \frac{IC_{50}}{1 + \frac{C}{Kd}}$$

Donde:

C= Concentración de la hormona marcada (1.36 nM)

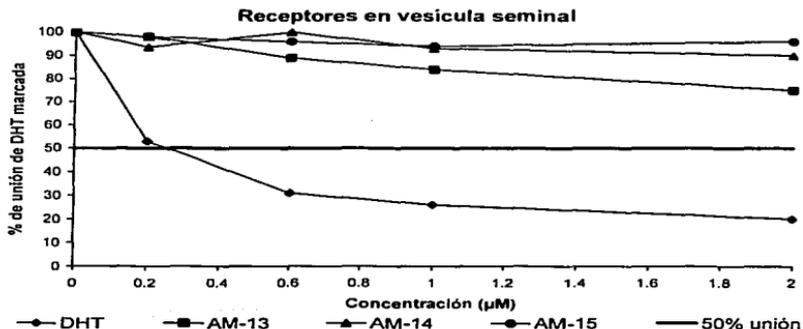
Kd= Constante de disociación (1.36 nM)

IC₅₀= Cantidad de sustrato a la cual se inhibe el 50% de la unión a los receptores de la DHT marcada

Compuesto	***K _i (mM)
Dihidrotestosterona (DHT)	1.25
AM-13	No hay unión a receptores
AM-14	No hay unión a receptores
AM-15	No hay unión a receptores

***K_i: Constante de inhibición

Tabla 12 Determinación del valor de K_i en vesículas seminales de los compuestos AM-13, AM-14 y AM-15, tomando como referencia a la DHT (sustrato natural de los receptores androgénicos)



Grafica 1 Se muestra que la unión a los receptores androgénicos de los compuestos AM-13, AM-14 y AM-15 presentan una menor afinidad que la DHT.



ANÁLISIS DE RESULTADOS

5.1 *Discusión de la parte química*

5.1.1 *Materia prima 3β-acetoxi-pregna-5,16-dien-20-ona (I)*

La ruta de síntesis que se planteó en este trabajo (Fig. 3.1, Pág. 21), utilizó como materia prima 3β-acetoxi-pregna-5,16-dien-20-ona (I) (también llamado: Acetato de 16-dehidropregnenolona (16-DPA)) dado que es un compuesto disponible comercialmente, con un costo accesible y es considerado como el punto de partida en diversos fármacos esteroidales, debido a que presenta los grupos funcionales necesarios para ser transformados a compuestos de interés^{42,43}. Como paso previo a la síntesis, se caracterizó a la materia prima por sus propiedades físicas y espectroscópicas (Tabla 2, Pág. 23 y 24).

La espectrofotometría de ultravioleta (UV) (Espectro 1, Pág. 58) nos proporciona información acerca de los cromóforos debido al doble enlace conjugado presente en la molécula; este espectro presentó una λ máxima de absorción a 237.92 nm correspondiente a la cetona α,β -insaturada en C-16-en-20-ona, este valor es muy cercano al teórico (242 nm) que se obtuvo al aplicar las reglas de Woodward-Fieser⁴⁴ para la estimación de las transiciones $\pi \rightarrow \pi^*$.

En la espectroscopia IR (infrarrojo) (Espectro 2, Pág. 58), se observaron los diferentes grupos funcionales presentes en la molécula. Se presentaron las bandas de alargamiento C-H de metilos y metilenos en 2940.80 y 2860.78 cm^{-1} mismas que comprueban las bandas de 1435.28 y 1371.75 cm^{-1} . La banda en 1586.24 indicó la presencia de un doble enlace conjugado. Las bandas

correspondientes a carbonilos en 1731.28 cm^{-1} y 1664.68 cm^{-1} son indicativas del grupo acetoxi en C-3 y la cetona α, β insaturada en C-20 respectivamente. Las señales 1244.72 y 1032.79 cm^{-1} corresponden a la interacción C-O-C del éster en C-3.

En la Resonancia Magnética nuclear de protones (RMN^1H) (Espectro 3, Pág. 59) se observaron 4 señales simples en 0.92, 1.059, 2.036 y 2.265 ppm, integrando para tres protones cada una, que fueron asignados a los metilos C-18, C-19, el metilo del grupo acetoxi en C-3 y en C-21 respectivamente. Cabe mencionar que el metilo C-18 se encuentra a campos ligeramente más altos (desplazamientos más bajos) debido a su posición dentro del cono de protección que genera el carbonilo en C-20, mientras que C-21 y el metilo del grupo acetoxi, se encuentran en la zona de desprotección de sus carbonilos correspondientes, desplazándolos a campos menores (desplazamientos mayores). También se observó una señal múltiple que integra para un protón en 4.610 ppm, correspondiente al protón base del acetoxi en C-3. Un triplete que integra para un protón en 5.386 ppm corresponde al protón en C-6, la cual se encuentra acoplada a dos protones vecinos en C-7 y también muestra un acoplamiento alílico con los protones en C-4. Por último, la señal triple que integra para un protón en 6.712 ppm se asignó al protón vinílico en C-16 que encuentra acoplado a dos protones vecinos en C-15.

La resonancia magnética nuclear de carbono 13 (RMN^{13}C) del compuesto 1 (Espectro 4 y 5, pág 59 y 60) mostró las siguientes señales en 15.685, 19.193 y 21.401 ppm asignadas a los metilos C-18, C-19 y C-21 respectivamente. El grupo metilo del éster acetoxi en C-3 mostró una señal en 27.121 ppm. La señal en 73.833 ppm se asignó a C-3, la base del éster. La señales en 155.308 y 144.386 ppm son características para los dos átomos de carbonos vinílicos C-17 y C-16 respectivamente y las señales en 121.958 y 140.223 ppm son características para los átomos de carbono C-6 y C-5 respectivamente. Las señales en 170.504 y 196.8 ppm se asignan a los dos carbonilos del éster y C-20 respectivamente.

El espectro de masas (Espectro 6, Pág. 61), presentó un pico en 357 que corresponde al M^+ , el cual solo varía por una unidad al PM según la fórmula condensada del 16-DPA (356 g/mol), la señal en 296 corresponde al pico base por pérdida de 61 unidades de masa (M^+ menos $-CH_3COOH$ la cual corresponde a la fracción de mayor estabilidad).

5.1.2 Compuesto 3 β -acetoxi-5,6-epoxi-pregn-16-en-20-ona (II)

La primera reacción que se planteó en la ruta de síntesis es la epoxidación de la doble ligadura que se encuentra en la posición C-5 por medio del ácido 3-cloroperoxibenzoico, utilizando como disolvente cloroformo; esta reacción se obtuvo con un buen rendimiento (89% producto crudo y 63% del producto recristalizado).

En el espectro de UV (Espectro 7, Pág. 61) presentó una λ máxima de absorción a 238.11 nm correspondiente a la cetona α , β insaturada en C-16-en-20-ona.

En la espectroscopia IR (Espectro 8, Pág. 62) se presentaron las bandas de alargamiento C-H de metilos y metilenos en 2940.52 y 2860.11 cm^{-1} mismas que comprueba la banda de 1370.85 cm^{-1} . Las bandas correspondientes a carbonilos en 1732.28 cm^{-1} y 1664.69 cm^{-1} son indicativos del grupo éster en C-3 y la cetona α , β -insaturada en C-20 respectivamente. Las señales 1244.72 y 1032.79 cm^{-1} corresponden a la vibración del éster en C-3.

La RMN¹H (Espectro 9, Pág. 62) se observaron 4 señales simples en 0.848, 1.114, 2.034 y 2.251 ppm, integrando para tres protones cada una, que fueron asignados a los hidrógenos de los metilos C-18, C-19, el metilo del grupo acetoxi en C-3 y C-21 respectivamente. Se observó un multiplete en 4.610 ppm que integra para un protón asignada el hidrogeno en C-3, y un triplete en 6.685 ppm que integró para un protón asignada al protón vinílico en C-16.

La RMN¹³C del compuesto II (Espectro 10 y 11, pág 63) mostró las siguientes señales en 15.822, 16.962 y 21.388 ppm asignadas a C-18, C-19 y C-21

La RMN¹³C del compuesto II (Espectro 10 y 11, pág 63) mostró las siguientes señales en 15.822, 16.962 y 21.388 ppm asignadas a C-18, C-19 y C-21 respectivamente. El grupo metilo del éster acetoxi, mostró una señal en 27.149 ppm. La señal en 71.210 ppm se asignó al carbono C-3, la base del éster acetoxi. Las dos señales en 63.269 y 65.351 ppm son características para la base del epóxido en C-6 y C-5 respectivamente. Las señales en 144.126 y 155.243 ppm son características para los dos átomos de carbonos vinílicos C-16 y C-17 respectivamente. Las dos señales en 170.524 y 196.703 ppm se asignaron a los carbonilos del éster y C-20 respectivamente.

El espectro de masas (Espectro 12, Pág. 64), presentó un pico en 373 que corresponde al M+1 según la fórmula condensada del compuesto corresponde a su peso PM (372 g/mol), la señal en 312 corresponde al pico base por pérdida de 61 unidades de masa (M+ menos -CH₃COOH la cual corresponde a la fracción de mayor estabilidad).

5.1.3 Compuesto 3β-acetoxi-5-αhidroxi-pregn-16-en-6,20-diona (III)

La segunda reacción corresponde a la oxidación del epóxido en la posición C-5 y C-6 formando un grupo carbonilo; esta se llevó a cabo con una solución oxidante de CrO₃ en agua, utilizando como disolvente para esta reacción acetona. Esta reacción se obtiene con un buen rendimiento (81% producto crudo) y con un nivel de impurezas relativamente bajo. Solo fue necesario lavar el producto perfectamente con agua para que se elimine todo el cromo y este una vez seco se utilizó en la siguiente reacción.

El espectro de UV (Espectro 13, Pág. 64) presentó una λ máxima de absorción a 237.8 correspondiente a la cetona α,β-insaturada en C-16-en-20-ona, este valor es muy cercano al teórico (242 nm).

En la espectroscopia IR (Espectro 14, Pág. 65) se presentó la banda en 3409.82 debida al -OH en C-3, las bandas de alargamiento C-H de metilos y metilenos en

2940.32 cm^{-1} la cual se comprobó con las bandas de 1432.14 y 1366.00 cm^{-1} . Las bandas correspondientes a carbonilos en 1712.26 cm^{-1} y 1664.74 cm^{-1} son indicativos del grupo acetoxi en C-6 y la cetona α, β insaturada en C-20 respectivamente. Las señales en 1236.75 y 1039.74 cm^{-1} representan la vibración del éster en C-3.

En la RMN¹H (Espectro 15, Pág. 65) se observaron 4 señales simples en 0.844, 0.864, 2.011 y 2.264 ppm, integrando para tres protones cada una, que fueron asignados a los hidrógenos de los metilos C-18, C-19, el metilo del grupo acetoxi en C-3 y C-21 respectivamente. También se observó un multiplete que integra para un protón en 5.032 ppm la cual fue asignada al H en C-3 y una señal doble de dobles en 6.688 ppm que integra para un protón asignada al protón vinílico en C-16.

En la RMN¹³C del compuesto III (Espectros 16 y 17, pág 66) mostró las siguientes señales en: 13.875, 15.793 y 21.335 ppm asignadas a C-18, C-19 y C-21 respectivamente. El grupo metilo del éster acetoxi mostró una señal en 27.084 ppm. La señal en 70.573 ppm se asignó a C-3, la base del éster. La base del alcohol en C-5, mostró una señal en 80.33 ppm. La señal en 143.89 y 155.092 ppm son características para los dos átomos de carbonos vinílicos C-16 y C-17 respectivamente. El éster en C-3 mostró una señal en 171.009 ppm; las señales en 196.636 y 211.739 ppm se asignaron a C-20 y C-6 respectivamente.

El espectro de masas (Espectro 18, pág. 68), presentó un pico en 388 que corresponde al M+, el cual corresponde al PM según la fórmula condensada del compuesto (388 g/mol), la señal en 328 corresponde al pico base por pérdida de 60 unidades de masa (M+ menos -CH₃COOH la cual corresponde a la fracción de mayor estabilidad).

5.1.4 Compuesto 3 β -acetoxi-pregna-4,16-dien-6,20-diona (IV)

La tercera reacción llevada a cabo corresponde a la eliminación del grupo oxhidrilo que se encuentra en la posición C-5. Esta reacción se llevó a cabo con piridina y SOCl_2 , en esta reacción fue necesario mantener una atmósfera de nitrógeno ya que en presencia de humedad de la atmósfera el SOCl_2 es hidrolizado rápidamente. El baño de hielo es necesario bajar la temperatura ya que es una reacción exotérmica. El producto IV se extrajo con acetato de etilo.

Se utilizó HCl al 10% para lavar la fase orgánica para eliminar la piridina en su forma protonada, el NaHCO_3 se usó para neutralizar el exceso de HCl, y el agua para eliminar sales formadas de esta neutralización.

Este producto (IV) se purificó con una columna empacada con sílica gel utilizando como fase móvil una mezcla acetato de etilo/ hexano (85:15); se obtuvieron cristales blancos, aunque con un rendimiento del 40%.

El espectro de UV (Espectro 19, Pág. 68) presentó una λ máxima de absorción a 236.68 nm correspondiente a la cetona α,β -insaturada en C-16-en-20-ona.

En la espectroscopia IR (Espectro 20, Pág. 69) se observaron las bandas de alargamiento C-H de metilos y metilenos en 2942.70 y 2862.55 cm^{-1} mismas que comprueba la banda de 1371.54 cm^{-1} . La banda correspondientes al carbonilo del éster se encuentra en 1735.14 cm^{-1} y las bandas en 1691.47 y 1664.19 cm^{-1} se asignaron a los carbonilos α,β -insaturados en C-20 y C-6 respectivamente. Las señales en 1233.12 y 1042.00 cm^{-1} corresponden a la interacción C-O-C características del éster en C-3.

En la RMN¹H (Espectro 21, pág. 69) se observaron 4 señales simples en 0.930, 1.062, 2.070 y 2.275 ppm, integrando para tres protones cada una, que fueron asignados a los metilos C-18, C-19, el metilo del grupo acetoxi en C-3 y C-21 respectivamente. Se observó un doblete que integra para un protón en 6.096 ppm

asignada al protón vinílico en C-4 y un doblete que integra para un protón en 6.705 ppm asignada al protón vinílico en C-16.

En la RMN¹³C del compuesto IV (Espectro 22 y 23, pág 70) mostró las siguientes señales en: 15.752, 19.553 y 21.145 ppm asignadas a C-18, C-19 y C-21 respectivamente. El grupo metilo del grupo acetoxi, mostró una señal en 27.089 ppm. La señal en 69.193 ppm se asignó a C-3 la base del éster acetoxi. Las señales en 143.762 y 147.875 ppm se asignaron a los átomos de carbono vinílico C-16 y C-5 respectivamente. Las señales en 154.869 y 129.045 ppm son características para los dos átomos de carbono vinílico C-17 y C-4 respectivamente. Las tres señales en 170.678, 196.554 y 201.746 ppm se asignaron a los carbonilos del éster, C-20 y C-6 respectivamente.

El espectro de masas (Espectro 24, Pág. 72), presentó un pico en 370 que corresponde al M⁺, el cual corresponde al PM según la fórmula condensada del compuesto IV (370 g/mol), la señal en 328 correspondió al pico base por pérdida de 42 unidades de masa (M⁺ menos -CH₃CO la cual corresponde a la fracción de mayor estabilidad).

5.1.5 Compuesto 3β-hidroxi-pregna-4,16-dien-6,20-diona (V)

La cuarta reacción llevada a cabo fue la hidrólisis del éster que se encuentra en la posición C-3, esta fue una hidrólisis básica con NaOH al 2%, utilizando como disolvente metanol. El producto de la reacción una vez lavado bien con agua hasta un pH neutro se obtiene con pocas impurezas, por lo que se utiliza sin recrystallizar para la siguiente reacción.

El espectro de UV (Espectro 25, Pág. 72) presentó una λ máxima de absorción a 238.41 nm correspondiente a la cetona α,β -insaturada en C-16-en-20-ona.

En la espectroscopia IR (Espectro 26, Pág. 73) se presentó la banda en 3430.87 cm⁻¹ asignada al -OH en C-3, esta es una banda adicional que no se ve en el espectro del compuesto anterior (IV) misma que se presenta en el espectro de IR

del compuesto III. También se observaron las bandas de alargamiento C-H de metilos y metilenos en 2941.04 y 2859.50 cm^{-1} mismas que comprueba la banda de 1371.53 cm^{-1} . Las bandas en 1688.517 y 1634.74 cm^{-1} correspondientes al carbonilo en C-6 y a la cetona α , β insaturada C-20 respectivamente.

En la RMN¹H (Espectro 27, Pág. 73) se observaron tres señales simples en 0.930, 1.062, y 2.275 ppm, integrando para tres protones cada una, que fueron asignados a los metilos C-18, C-19 y C-21 respectivamente. Se observó un triplete en 4.251 ppm que integró para un protón asignado al protón en C-3. El doblete que integró para un protón en 6.096 ppm se asignó al protón vinílico en C-4 y la señal que integra para un protón vinílico en 6.705 ppm es característica para el protón en C-16.

En la RMN¹³C del compuesto V (Espectros 28 y 29, pág. 74) mostró las siguientes señales en: 15.757, 19.763 y 27.089 ppm asignadas a C-18, C-19 y C-21 respectivamente. La señal en 67.172 ppm es característica para C-3 la base del alcohol. Las señales en 133.219, 143.92, 146.498 y 154.85 ppm se asignaron a los átomos de carbono vinílicos C-4, C-16, C-5 y C-17 respectivamente. Las dos señales en 196.656 y 202.376 ppm son características para los carbonilos en C-20 y C-6 respectivamente.

El espectro de masas (Espectro 30, Pág. 76), presentó un pico en 328 que corresponde al M⁺, el cual corresponde al PM según la fórmula condensada del compuesto V (328 g/mol), este mismo es el pico base lo que significa que es la fracción de mayor estabilidad.

5.1.6 Compuesto 3 β -(p-nitrobenzoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (AM-13)

Con la reacción cinco se obtuvo el primer compuesto final de este trabajo (AM-13), esta reacción es la esterificación del oxhidrilo de la posición C-3 con DCC, DMAP y el ácido 4-nitrobenzoico utilizando como disolvente diclorometano anhidro. La reacción se llevó a cabo en una atmósfera de nitrógeno para mantener condiciones anhidras necesarias para que se lleve a cabo con un buen rendimiento.

Para la obtención de este producto, una vez terminada la reacción y haber realizado extracciones sucesivas con CHCl_3 , fue necesario redissolver el producto varias veces con acetato de etilo (lo más seco posible) para eliminar por medio de filtración la mayor cantidad de DCU (diciclohexilurea). El DCU es soluble en agua y es uno de los principales productos secundarios de esta reacción; el DCU puede ser confundido con el producto de interés porque se obtuvo en forma de cristales blancos, pero al momento de monitorearlo con una cromatografía de capa fina este no se observó ni con luz UV ni con revelador químico (solución de CoCl_2 en H_2SO_4) ya que se trata de una sal.

El producto obtenido se purificó con una columna empacada con alumina, ya que con sílica gel el éster es degradado y nunca se obtiene puro, incluso después de pasar el producto por la columna se observó mayor cantidad de impurezas que después son difícilmente eliminadas.

El espectro de UV (Espectro 31, Pág. 76) presentó una λ máxima de absorción a 242.93 nm correspondiente a la cetona α, β insaturada en C-16-en-20-ona.

En el espectro de IR (Espectro 32, Pág. 77) se presentaron, las bandas de alargamiento C-H de metilos y metilenos en 2941.90 y 2851.70 cm^{-1} mismas que comprueba la banda de 1373.90 y 1459.94 cm^{-1} . Las bandas correspondientes a carbonilos en 1706.80 cm^{-1} , 1688.75 y 1661.13 cm^{-1} son indicativas del éster en C-3, el carbonilo C-20 α, β -insaturado y la cetona α, β -insaturada en C-6 respectivamente. Las señales 1276.36 y 1038.60 cm^{-1} perteneciente al éster en C-3. Una de las bandas características para este compuesto es la banda que aparece en 1526.74 y 1350.65 cm^{-1} ya que son las que indican la presencia del grupo $-\text{NO}_2$ en la molécula. Otra señal de esta molécula es la que apareció en 722.23 cm^{-1} que indica la presencia del benceno.

En la RMN¹H (Espectro 33, Pág. 77) se observaron 3 señales simples en 0.949, 1.122 y 2.285 ppm, integrando para tres protones cada una, que fueron asignados a los metilos C-18, C-19 y C-21 respectivamente. Se ve un multiplete en 5.622

ppm que integra para un protón asignado al H de C-3, se observa un doblete que integra para un protón en 6.211 ppm asignado al protón vinílico en C-4 y un triplete que integra para un protón vinílico en 6.714 ppm asignado a C-16. El multiplete en 8.282 que integra para 4 protones fue asignada a los protones del anillo aromático.

En la RMN¹³C del compuesto AM-13 (Espectros 34 y 35, pág. 78) mostró las siguientes señales en: 15.767, 19.538, 27.091 ppm asignadas a C-18, C-19 y C-21 respectivamente. La señal en 70.967 ppm es característica para C-3 la base del éster. Las señales en 123.495 y 128.064 ppm son características para los carbonos del anillo aromático. Las señales en 130.821 y 143.727 ppm se asignaron a los carbonos vinílicos en C-4 y C-16 respectivamente. Los átomos de carbono cuaternario C-5 y C-17 mostraron una señal en 148.584 y 154.843 ppm respectivamente. Las señales en 164.26, 196.538 y 201.742 ppm se asignaron al carbonilo del éster, C-20 y C-6 respectivamente.

El espectro de masas (Espectro 36, Pág. 79), presentó un pico en 477 que corresponde al M⁺, el cual corresponde al PM según la fórmula condensada del compuesto IV (477 g/mol), este pico también corresponde al pico base, lo cual indica que es su forma más estable de esta molécula.

5.1.7 Compuesto 3β-(p-toluiloixi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (AM-14)

Con la reacción seis se obtuvo el segundo compuesto final de este trabajo (AM-14), es la esterificación del grupo oxhidrilo que se encuentra en la posición C-3. Para esta reacción se tomaron en cuenta las consideraciones hechas en la esterificación anterior (como son las condiciones anhidras durante la reacción y el método de obtención de producto). La purificación de este producto se realizó por medio de una recristalización de metanol, lavando con hexano frío.

El espectro de UV (Espectro 37, Pág. 79) presentó una λ máxima de absorción a 240.30 nm correspondiente a la cetona α,β -insaturada en C-16-en-20-ona.

En la espectroscopia IR (Espectro 38, Pág. 80) se presentó la banda en 3043.95 cm^{-1} indicativa del grupo =C-H, también las bandas de alargamiento C-H de metilos y metilenos en 2941.55 y 2850.83 cm^{-1} mismas que comprobaron las bandas de 1367.26 y 1451.14 cm^{-1} . Las bandas correspondientes a carbonilos en 1724.73 cm^{-1} , 1685.49 y 1665.63 cm^{-1} son indicativos de los carbonilos del éster en C-3, de la cetona en C-20 y de la cetona α,β -insaturada en C-6 respectivamente. La señal en 1271.90 cm^{-1} se asignó al éster en C-3 (alargamiento C=O). La banda en 748.25 se asignó a la monosustitución del anillo aromático.

En la RMN¹H (Espectro 39, Pág. 80) se observaron 4 señales simples en 0.942, 1.05, 2.173 y 2.280 ppm, integrando para tres protones cada una, que fueron asignadas a los metilos C-18, C-19, C-20 y al metilo del anillo aromático respectivamente. Se ve un multiplete en 5.56 ppm que integra para un protón asignado al de C-3, se observa un doblete que integra para un protón en 6.231 ppm asignado al protón vinílico en C-4 y un triplete que integra para un protón vinílico en 6.712 ppm asignada a C-16.

En la RMN¹³C del compuesto AM-14 (Espectros 40 y 41, pág 81) mostró las siguientes señales en: 15.763, 19.632 y 27.079 ppm que se asignaron a C-18, C-19 y C-21 respectivamente. La señal en 69.603 ppm es característica para la base del éster en C-3. Las señales en 129.011 y 129.311 ppm fueron asignadas a los átomos de carbono del anillo aromático. Las señales en 129.722 y 143.730 ppm son asignadas a los carbonos vinílicos C-4 y C-16 respectivamente. Los átomos de carbono cuaternarios C-5 y C-17 mostraron una señal en 147.919 y 154.886 ppm respectivamente. Las señales en 166.197, 196.197 y 201.839 ppm se asignaron al carbonilo del éster, C-20 y C-6 respectivamente.

El espectro de masas (Espectro 42, pág. 82), presentó un pico en 446 que corresponde al M+, el cual corresponde al PM según la fórmula condensada del compuesto V (446 g/mol), la señal en 119 correspondió al pico base por pérdida de 327 unidades de masa, la cual corresponde a la fracción de mayor estabilidad

(esta fracción perdida correspondió a los 4 ciclos del esteroide, por lo que la fracción más estable es la que corresponde al anillo aromático de éster).

5.1.8 Compuesto 3 β -(2-ciclohexilacetoxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (AM-15)

En la reacción siete se obtiene al tercer producto final de este trabajo (AM-15), la cual es otra esterificación que lleva acabo tomando las consideraciones de la reacción cinco (las condiciones de la reacción, el método de obtención del producto y la purificación por medio de una columna de alumina). Cabe mencionar que el compuesto AM-15 fue previamente recrystalizado en metanol.

El espectro de UV (Espectro 43, Pág. 82) presentó una λ máxima de absorción a 240.30 nm correspondiente a la cetona α,β -insaturada en C-16-en-20-ona.

En la espectroscopia IR (Espectro 44, Pág. 83) se presentaron las bandas de alargamiento C-H de metilos y metilenos en 2930.49 y 2843.77 cm^{-1} mismas que comprobaron las bandas de 1368.72 y 1453.98 cm^{-1} . Las bandas correspondientes a carbonilos en 1729.60 cm^{-1} , 1689.51 y 1665.54 cm^{-1} son indicativas del éster en C-3, del carbonilo en C-20 y la cetona α,β -insaturada en C-6 respectivamente. La señal en 1037.41 cm^{-1} se asignó al éster en C-3.

En la RMN¹H (Espectro 45, Pág. 83) se observaron 3 señales simples en 0.93, 1.062 y 2.176 ppm, integrando para tres protones cada una, que fueron asignadas a los metilos C-18, C-19 y C-21. Se ve un multiplete en 5.34 ppm que integra para un protón asignado al de C-3, se observó un triplete que integra para un protón en 6.087 ppm asignado al protón vinílico en C-4 y un quartete que integró para un protón vinílico en 6.708 ppm asignado a C-16.

La RMN¹³C del compuesto AM-15 (Espectros 46 y 47, pág. 84) mostró las siguientes señales en: 15.760, 19.614 y 24.156 ppm asignadas a C-18, C-19 y C-21 respectivamente. La señal en 68.904 ppm es característica para la base del éster en C-3. Las señales en 129.367 y 143.769 ppm se asignaron a los carbonos

vinílicos en C-4 y C-16 respectivamente. Los átomos de carbono cuaternarios C-5 y C-16 mostraron una señal en 147.754 y 154.882 ppm respectivamente. Las señales en 172.726, 196.557 y 201.739 ppm se asignaron al carbonilo del éster, C-20 y C-6 respectivamente.

El espectro de masas (Espectro 48, Pág. 85), presentó un pico en 452 que corresponde al M⁺, el cual corresponde al PM según la fórmula condensada del compuesto VI (452 g/mol), la señal en 328 corresponde al pico base por pérdida de 124 unidades de masa, la cual corresponde a la fracción de mayor estabilidad (M+ menos ciclohexano-CH₂-CO-).

5.2. Discusión de resultados del Ensayo Biológico.

Los dos mecanismos principales por los cuales un compuesto puede ser considerado como un posible candidato para el tratamiento del cáncer de la próstata son:

1. Que inhiba a la enzima responsable de la conversión de la testosterona a DHT, ya que el DHT es metabolito que ocasiona el crecimiento de la próstata.
2. Que los compuestos tengan una mayor afinidad por el receptor andrógeno que es el sitio donde la DHT se une formando un complejo el cual es el que ocasiona esta enfermedad.

5.2.1 Inhibición de la actividad de la enzima 5 α -reductasa en fracción microsomal

Los resultados obtenidos del ensayo *in vitro* para la inhibición de la actividad de la enzima 5 α -reductasa (tabla 10 y 11) demuestran que los tres compuestos finales sintetizados (AM-13, AM-14 y AM-15) tienen menor actividad de inhibición de esta enzima ya que no se obtuvieron valores de IC₅₀ menores o iguales a la de la

Finasterida (10 nM), la cual es nuestra referencia por ser el fármaco de uso actual en la terapéutica para el tratamiento de estos padecimientos dependientes de andrógenos. Esto lo demuestra la tabla 10, la cual indica que los porcentajes de inhibición de la actividad de la enzima 5 α -reductasa de los compuestos evaluados son mayores del 50% en la mayoría de los casos de acuerdo con el estándar.

Los compuestos: AM-13, AM-14 y AM-15, no inhiben a la enzima que transforma a la testosterona producida por el organismo a DHT, la cual es la causante de enfermedades dependientes de andrógenos como el cáncer de próstata.

5.2.2 Determinación de la competencia de los compuestos sintetizados por receptores de andrógenos presentes en el citosol de vesículas seminales.

En los resultados de unión a receptores (tabla 12), se puede observar que de los tres compuestos evaluados AM-13, AM-14 y AM-15 ninguno presentó una Ki menor de 2.14 (valor correspondiente a la DHT, es el compuesto de referencia), esto indica que estos compuestos no van a competir por el sitio de unión en el receptor androgénico con la DHT.

Esto se observa mejor en la gráfica 1, la cual muestra que los tres compuestos evaluados (AM-13, AM-14 y AM-15) no presentan una unión parecida a la DHT, la cual es el sustrato natural de los receptores androgénicos.

La DHT se une con mayor afinidad al receptor androgénico que los compuestos sintetizados y por lo tanto la actividad androgénica de estos compuestos sintetizados no es debida a este mecanismo (afinidad por los receptores androgénicos) por lo que estos compuestos no son considerados posibles candidatos para el tratamiento de padecimientos dependientes de andrógenos, como el cáncer de próstata o la hiperplasia prostática benigna.

Ya que estos compuestos no inhibieron a la enzima 5 α -reductasa y no se unen a los receptores androgénicos con mayor afinidad que la DHT, no se realizaron pruebas *in vivo*.

5.2.3 Relación estructura actividad

En la tabla 11 (Pág. 39) se observaron los valores de IC_{50} (concentración del sustrato con la cual se inhibe el 50% de la actividad de la enzima) de los compuestos AM-13, AM-14, AM-15 Finasterida y N4 (compuesto nuevo sintetizado en el laboratorio). El compuesto N4 presentó un $IC_{50}=60$ pM y resultó más potente en la inhibición de la actividad de la enzima 5α -reductasa que la Finasterida ($IC_{50}=10$ nM).

Por esta razón el compuesto N4 fue tomado como modelo para proponer la síntesis de los nuevos inhibidores de la enzima 5α -reductasa (compuestos AM-13 y AM-14). Los compuestos sintetizados (AM-13 y AM-14) solo difieren en su estructura del compuesto N4 en los sustituyentes en posición para en el anillo aromático, un grupo nitro (AM-13), y un grupo metilo (AM-14). Se observó que la introducción de estos sustituyentes en la molécula modificó la actividad de inhibición de la enzima 5α -reductasa de estos compuestos.

Los 3β -acidoiloxiderivados (AM-13 y AM-14) a diferencia del compuesto N4 tienen sustituyentes más voluminosos, por lo que el efecto estérico afecta la inhibición de la actividad de la enzima 5α -reductasa. El compuesto AM-15 también es más voluminoso que el compuesto N4 por lo que no presentó actividad de inhibición de la enzima 5α -reductasa.

El efecto electrónico afecta a la actividad de inhibición de la enzima 5α -reductasa, se observó que al introducir a la molécula del compuesto N4 un sustituyente desactivante ($-NO_2$, jala electrones del anillo aromático) en el anillo aromático en posición para no se observó actividad de la inhibición de la enzima 5α -reductasa. Al introducir un sustituyente activante ($-CH_3$, mete densidad electrónica al anillo aromático) la actividad de inhibición de la enzima 5α -reductasa se ve disminuida en menor proporción que la del compuesto AM-13.

El compuesto N4 no presentó afinidad por los receptores andrógenicos, por lo que los compuestos AM-13, AM-14 y AM-15 se comportaron de manera similar.

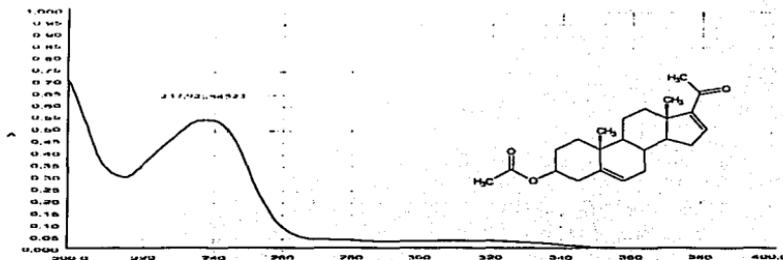
6

CONCLUSIONES

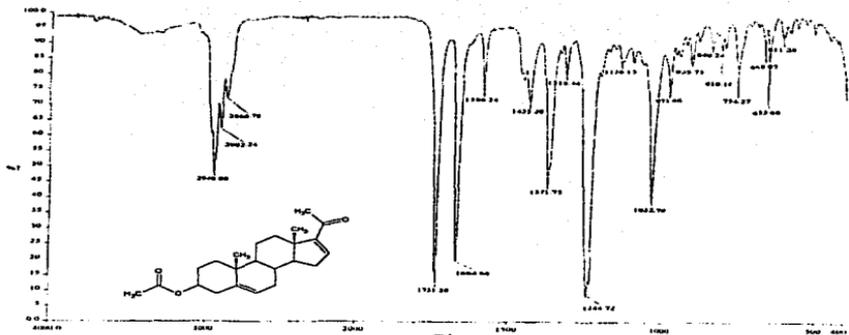
1. Se logró sintetizar, purificar, caracterizar (física y espectroscópicamente) y evaluar biológicamente *in vitro* los intermediarios (II-V) y los compuestos finales derivados de la progesterona: el compuesto final 3 β -(*p*-nitrobenzoiloxi)-pregna-4,16-dien-20-diona (AM-13), el compuesto final 3 β -(*p*-toluoliloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (AM-14) y el compuesto final 3 β -(2-ciclohexilacetoxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (AM-15).
2. Los compuestos AM.13 y AM-15 no inhibieron la actividad de la enzima 5 α -reductasa (Tabla 10 y 11, Pág. 39). Tampoco presentaron afinidad por los receptores androgénicos (Gráfica 1, Pág. 41). Por lo que estos compuestos no tienen carácter antiandrogénico a través de estos dos mecanismos.
3. El efecto estérico provocado por los sustituyentes en C3 no proporciona carácter antiandrogénico a las moléculas.
4. El derivado AM-14 mostró actividad como inhibidor de la enzima 5 α -reductasa; al parecer la presencia de un grupo activante (metilo) en posición *para* del anillo aromático proporcionó el carácter antiandrogénico de la molécula.

7

APÉNDICE

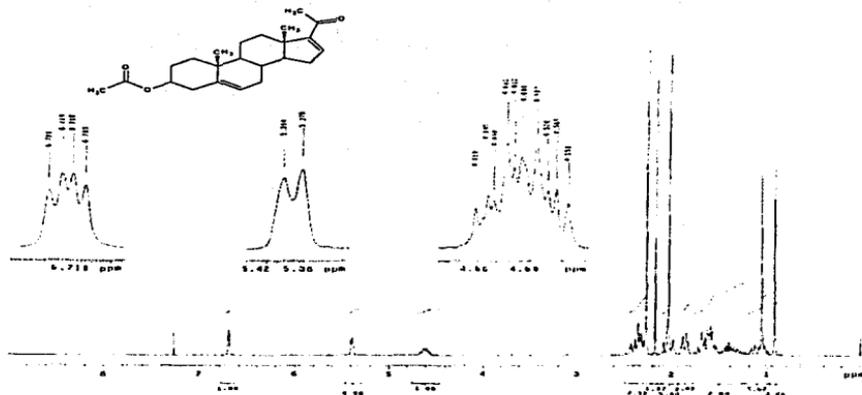


Espectro 1. UV de 3β-Acetoxi-pregna-5,16-dien-20-ona (I).

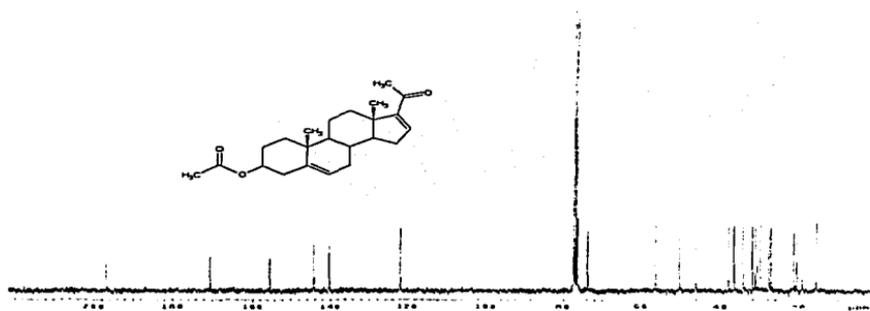


Espectro 2. IR de 3β-Acetoxi-pregna-5,16-dien-20-ona (I).

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

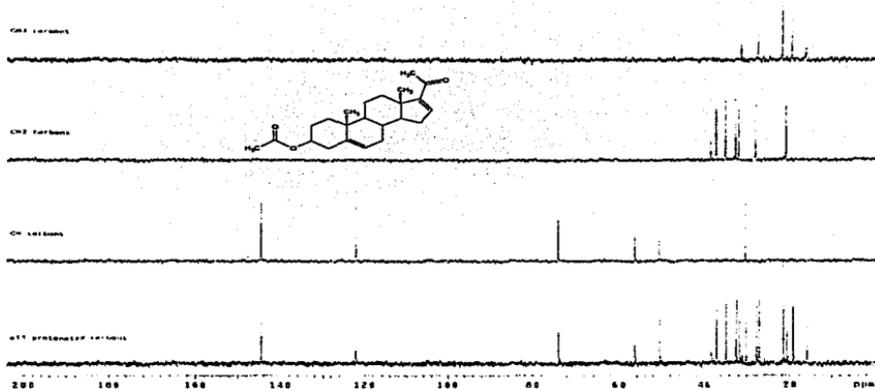


Espectro 3. RMN¹H de 3β-Acetoxy-pregna-5,16-dien-20-ona (I).

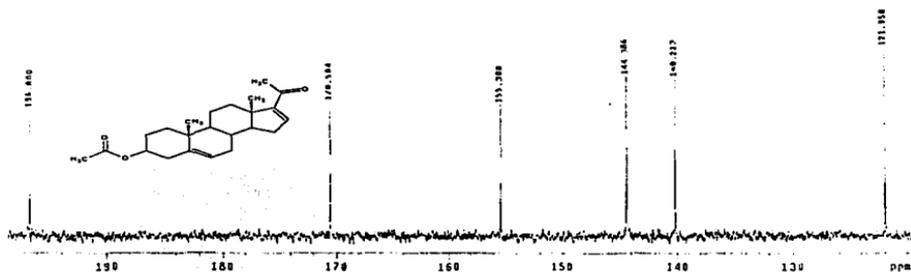


Espectro 4. RMN¹³C de 3β-Acetoxy-pregna-5,16-dien-20-ona (I).

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

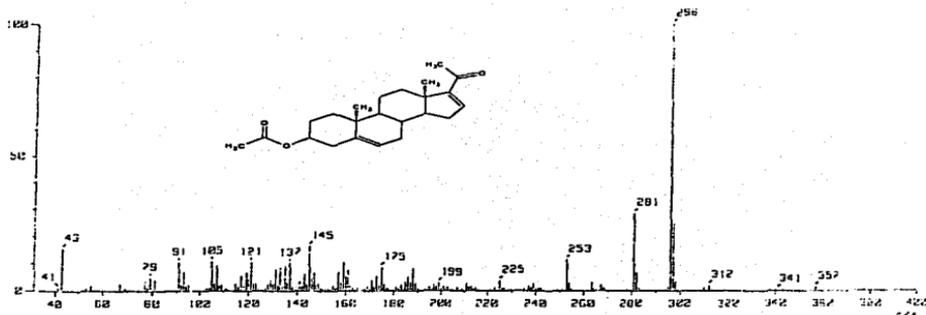


Espectro 5. RMN¹³C en versión DEPT de 3β-Acetoxi-pregna-5,16-dien-20-ona (I).

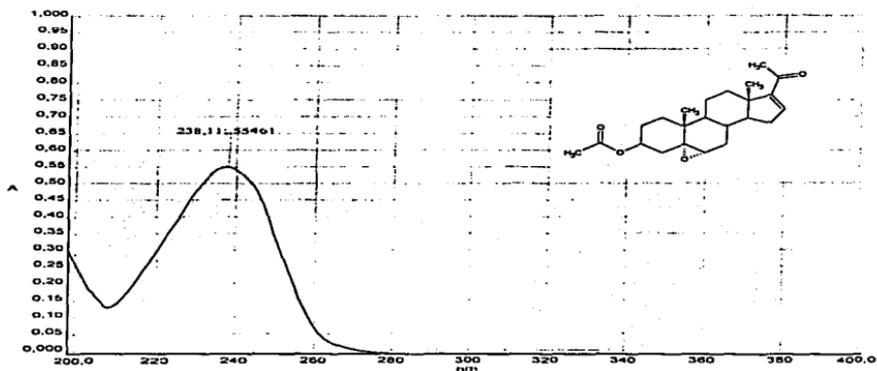


Continuación del DEPT de 3β-Acetoxi-pregna-5,16-dien-20-ona (I).

TESIS CON FALLA DE ORIGEN

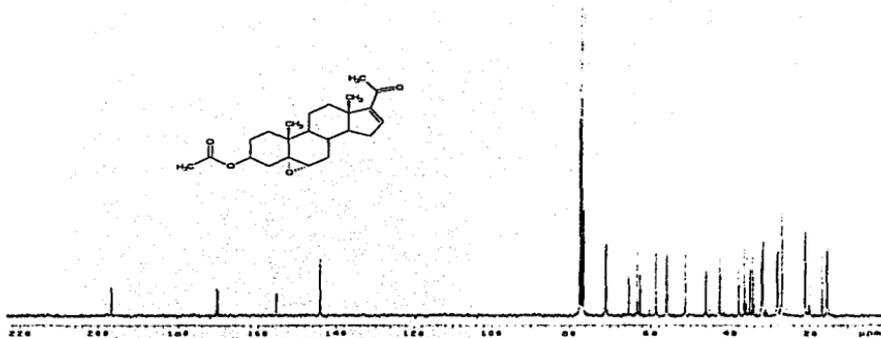
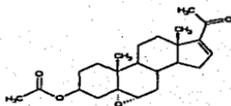


Espectro 6. EMIE de 3β-Acetoxy-pregna-5,16-dien-20-ona (I).



Espectro 7. UV de 3-Acetoxy-5,6-epoxy-pregn-16-en-20-ona (II).

TESIS CON FALLA DE ORIGEN



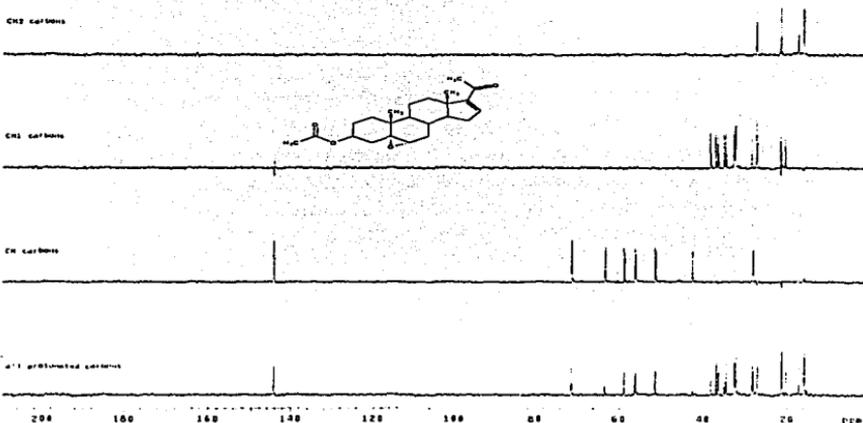
Espectro 10. RMN ^{13}C de 3-Acetoxy-5,6-epoxy-pregn-16-en-20-ona (II).

CH₂ carbonis

CH carbonis

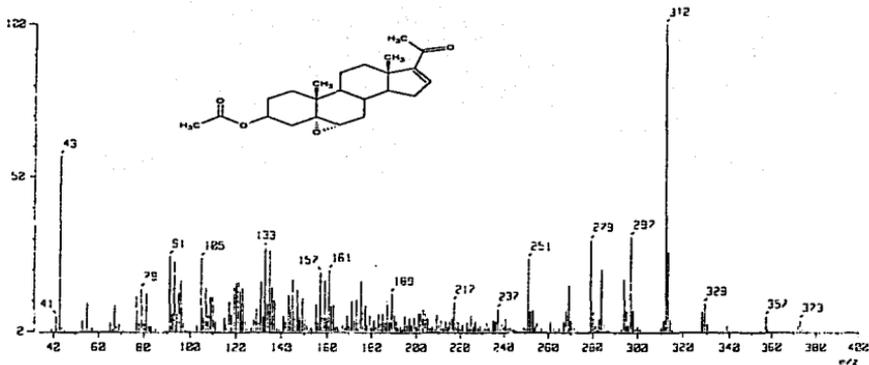
CH carbonis

all' arborizats carbonis

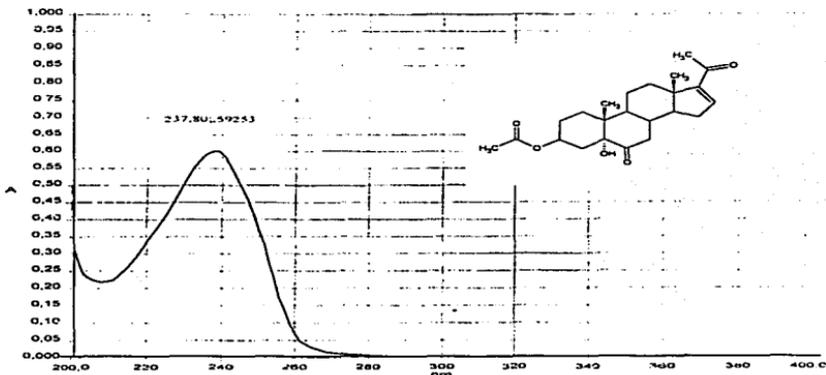


Espectro 11. RMN ^{13}C en versió DEPT de 3-Acetoxy-5,6-epoxy-pregn-16-en-20-ona (II).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

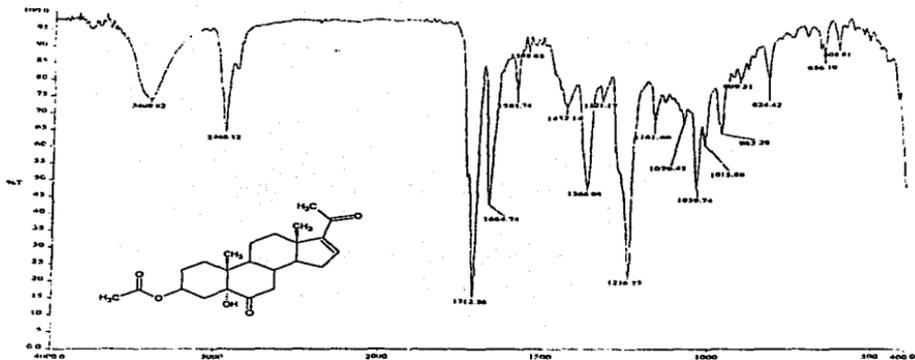


Espectro 12. EMIE de 3-Acetoxy-5,6-epoxy-pregn-16-en-20-ona (II).

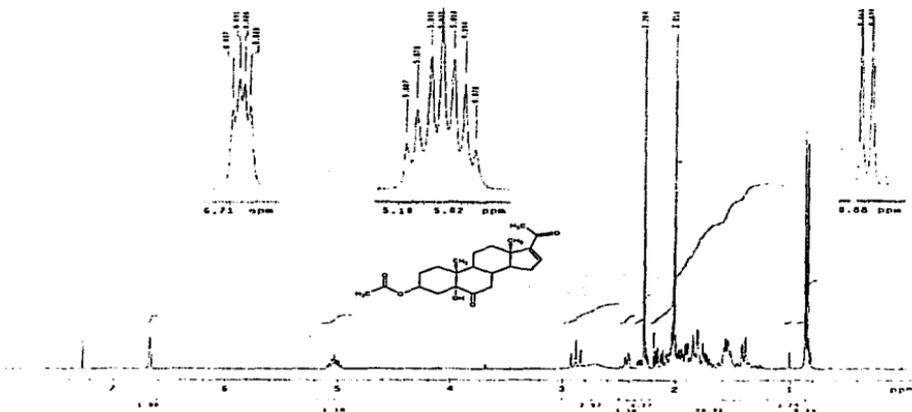


Espectro 13. UV de 3-Acetoxy-5-hidroxi-pregn-16-en-6,20-diona (III).

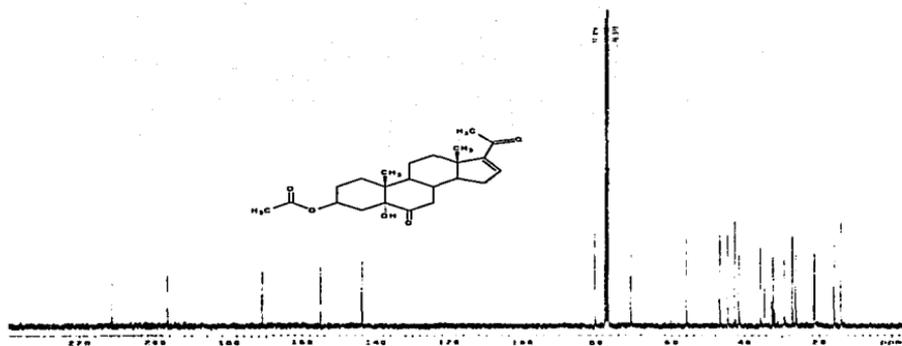
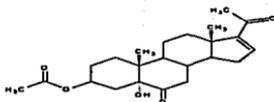
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Espectro 14. IR de 3-Acetoxi-5-hidroxi-pregn-16-en-6,20-diona (III).



Espectro 15. RMN ¹H de 3-Acetoxi-5-hidroxi-pregn-16-en-6,20-diona (III).



Espectro 16. RMN ^{13}C de 3-Acetoxy-5-hidroxi-pregn-16-en-6,20-diona (III).

CH3 carbons

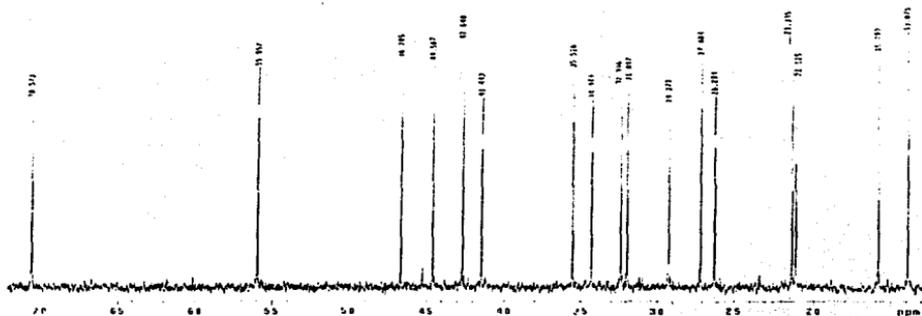
CH carbons

CH2 carbons

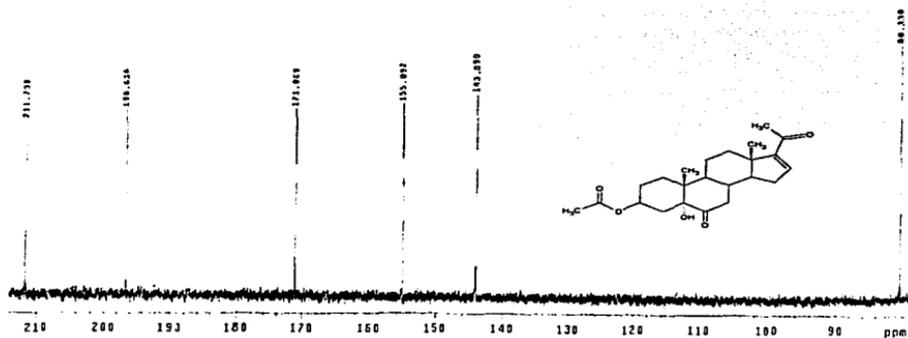
all quaternary carbons

77.5 200 180 160 140 120 100 80 60 40 20 ppm

Espectro 17. RMN ^{13}C en versión DEPT de 3-Acetoxy-5-hidroxi-pregn-16-en-6,20-diona (III).

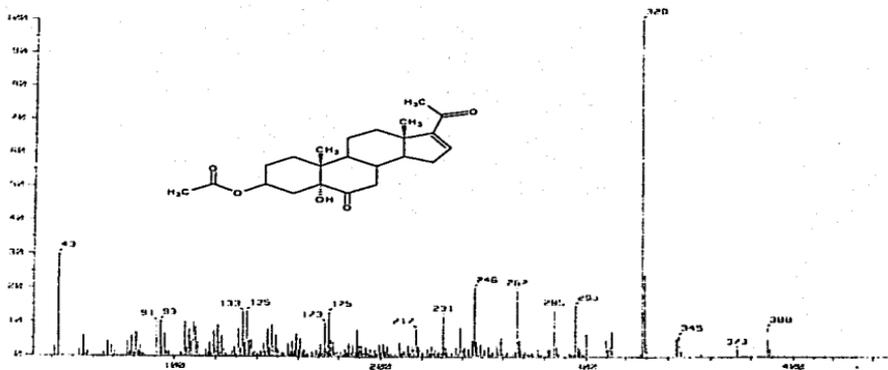


Continuación del espectro de RMN ^{13}C en versión DEPT de III

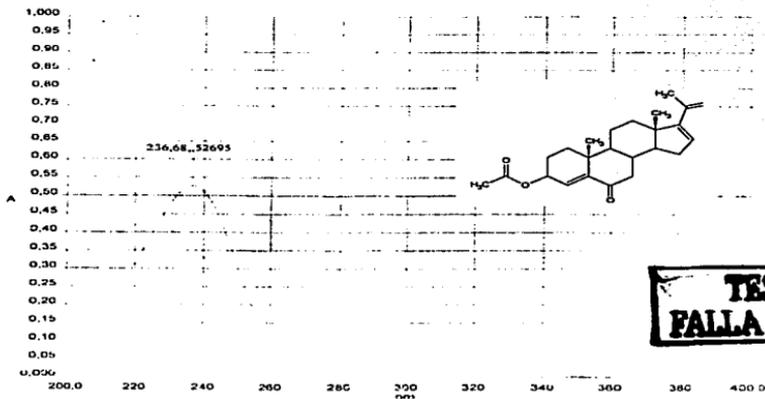


Continuación del espectro de RMN ^{13}C en versión DEPT de III

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

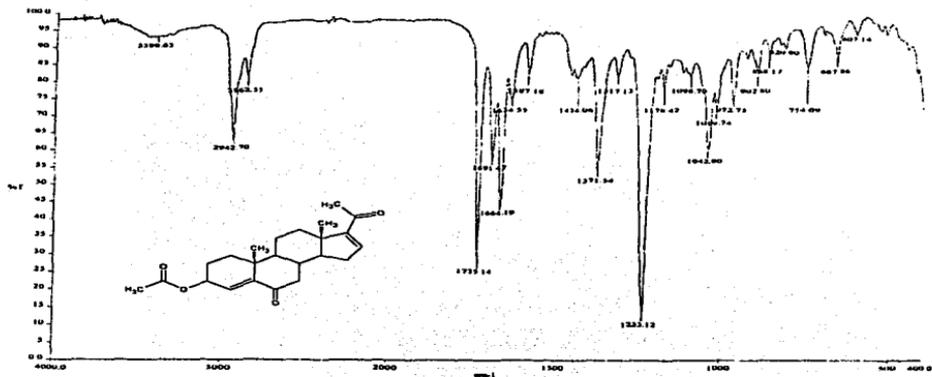


Espectro 18. EMIE de 3-Acetoxy-5-hidroxi-pregn-16-en-6,20-diona (III).

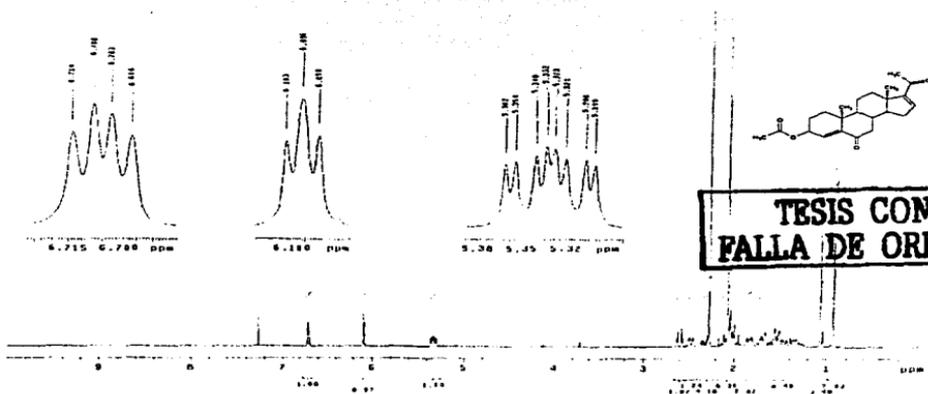


Espectro 19. UV de 3-Acetoxy-pregna-4,16-dien-6,20-diona (IV).

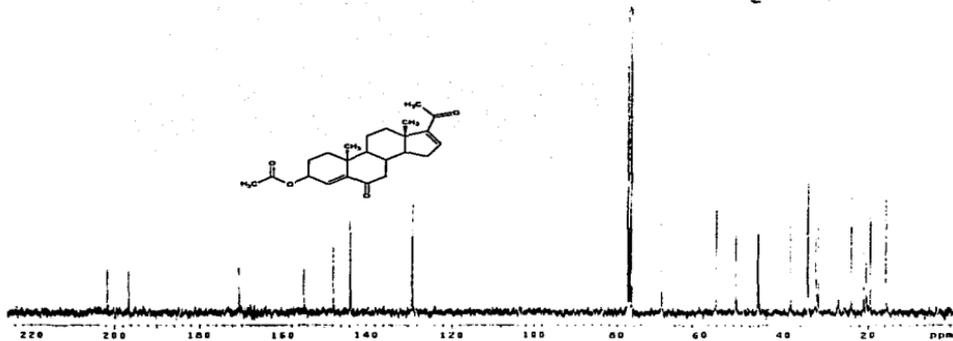
TESIS CON FALLA DE ORIGEN



Espectro 20. IR de 3-Acetoxi-pregna-4,16-dien-6,20-diona (IV).



Espectro 21. RMN ^1H de 3-Acetoxi-pregna-4,16-dien-6,20-diona (IV).



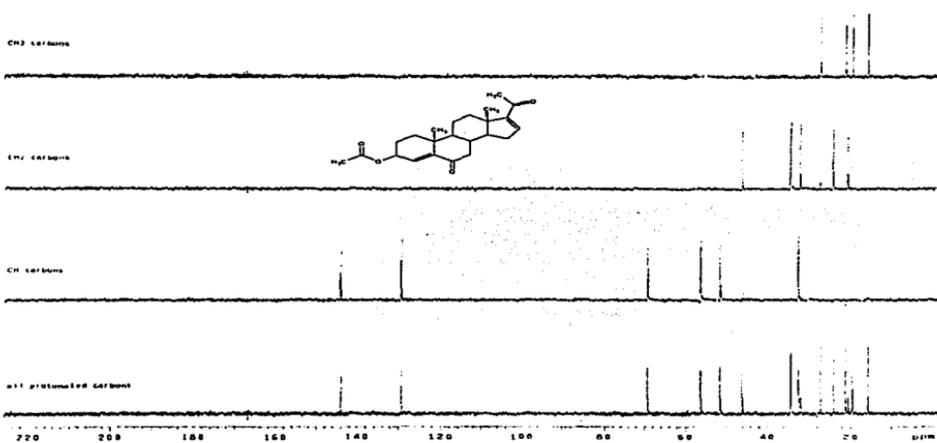
Espectro 22. RMN ^{13}C de 3-Acetoxy-pregna-4,16-dien-6,20-diona (IV).

CH₃ carbons

CH₂ carbons

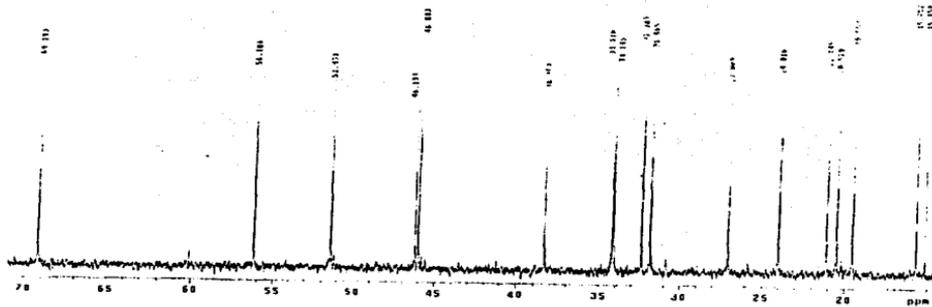
CH carbons

all protonated carbons

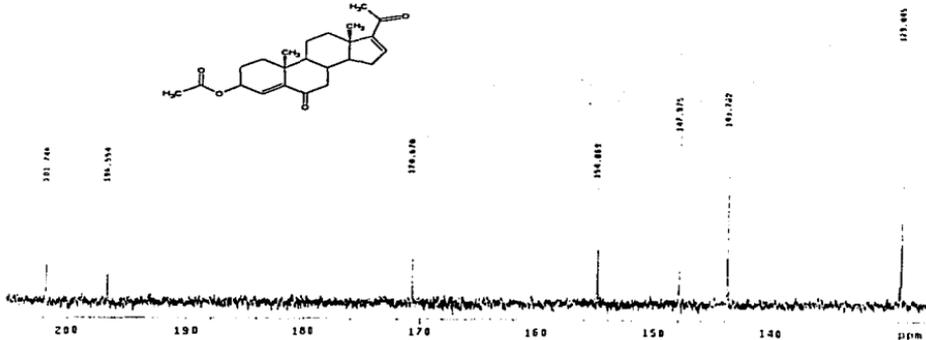
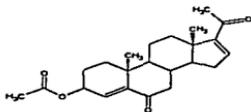


Espectro 23. RMN ^{13}C en versión DEPT de 3-Acetoxy-pregna-4,16-dien-6,20-diona (IV)

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

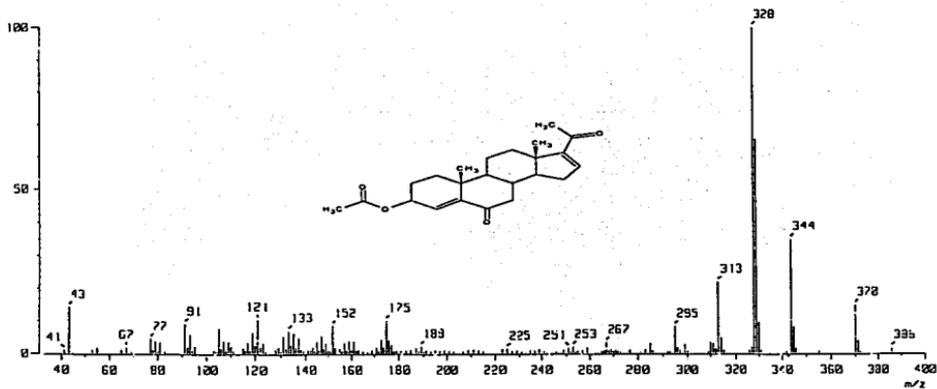


Continuación del espectro de RMN ^{13}C en versión DEPT de IV.

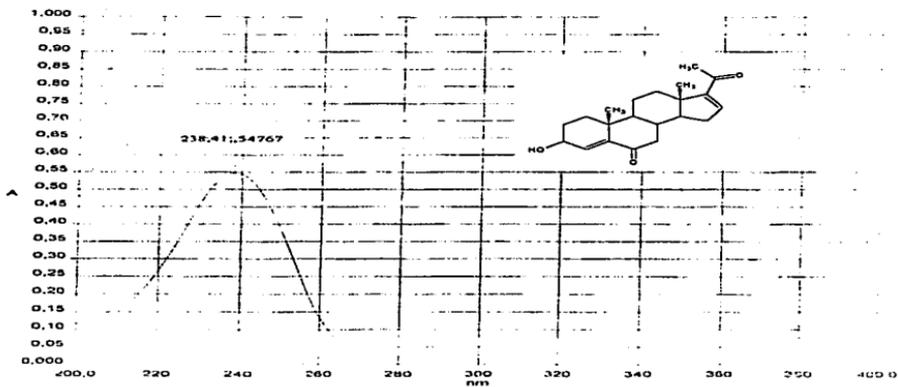


Continuación del espectro de RMN ^{13}C en versión DEPT de IV.

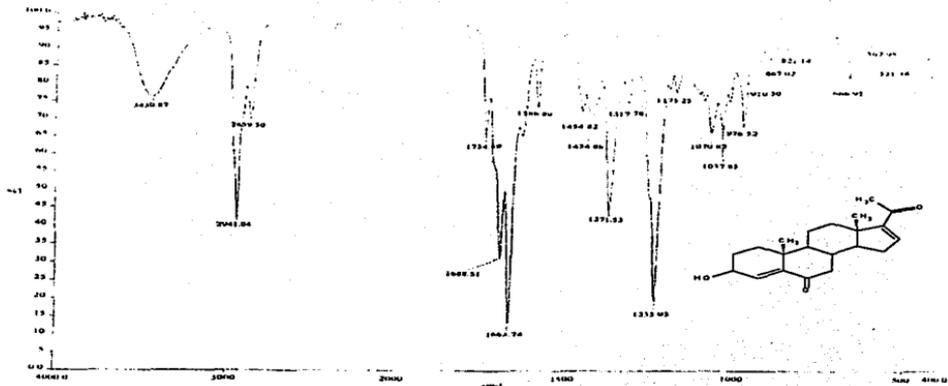
**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



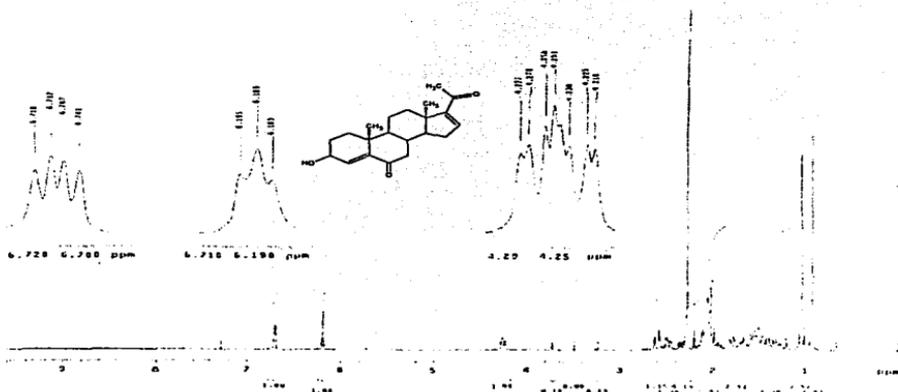
Espectro 24. EMIE de 3-Acetoxi-pregna-4,16-dien-6,20-diona (IV).



Espectro 25. UV de 3-Hidroxi-pregna-4,16-dien-6,20-diona (V).

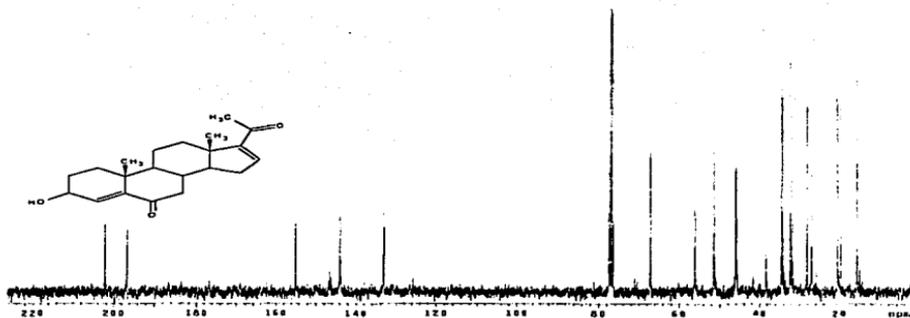


Espectro 26. IR de 3-Hidroxi-pregna-4,16-dien-6,20-diona (V).



Espectro 27. RMN ¹H de 3-Hidroxi-pregna-4,16-dien-6,20-diona (V)

**TESS CON
FALLA DE ORIGEN**



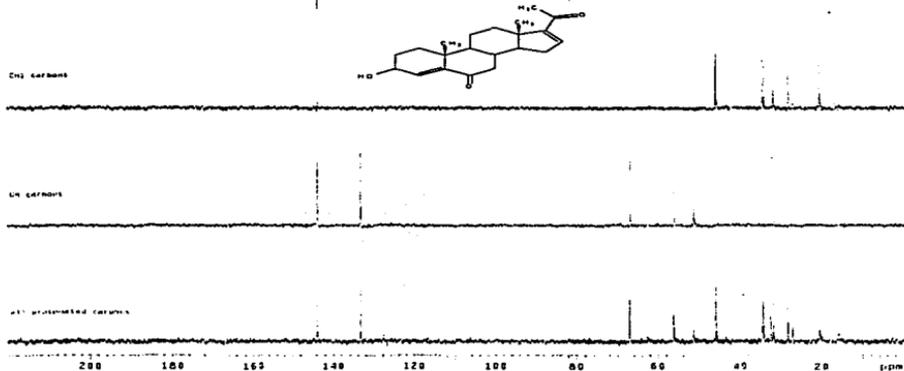
Espectro 28. RMN ^{13}C de 3-Hidroxi-pregna-4,16-dien-6,20-diona (V).

CP2 carbons

CH carbons

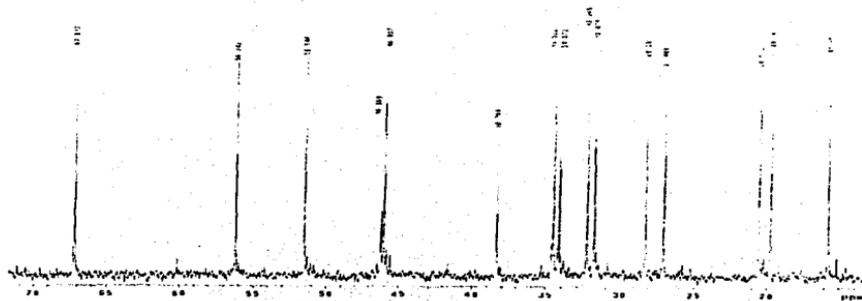
CH carbons

quaternary carbons

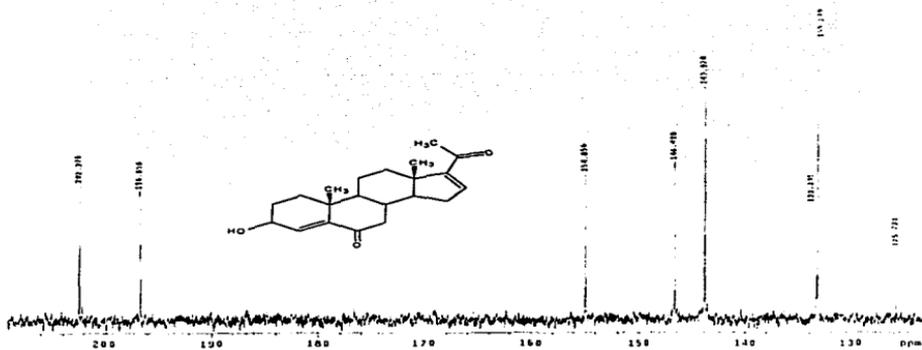


Espectro 29. RMN ^{13}C en versión DEPT de 3-Hidroxi-pregna-4,16-dien-6,20-diona (V).

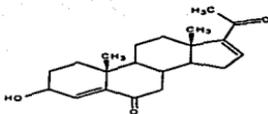
**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



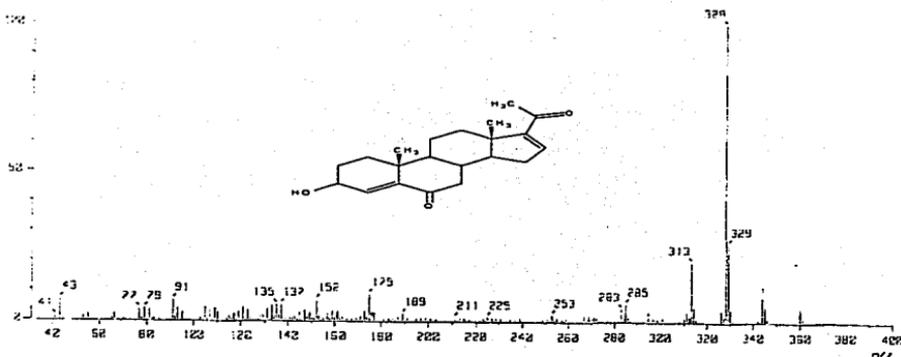
Continuación del espectro de RMN ^{13}C en versión DEPT de V.



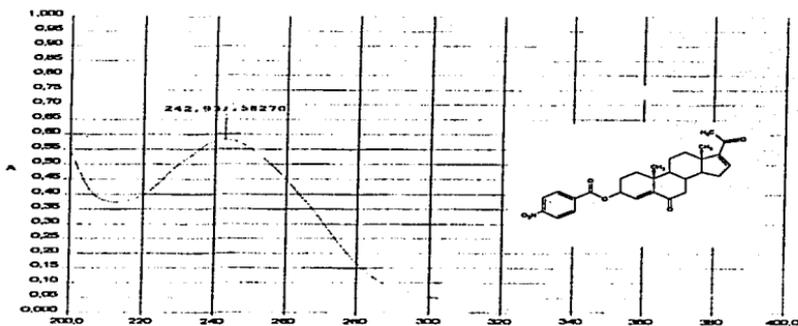
Continuación del espectro de RMN ^{13}C en versión DEPT de V.



TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

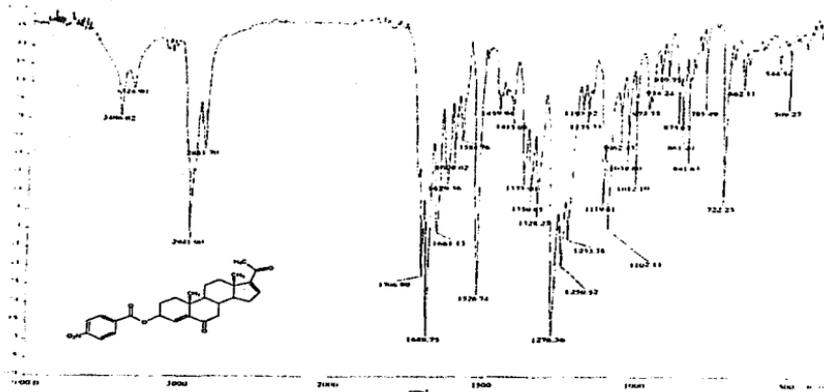


Espectro 30. EMIE de 3-Hidroxi-pregna-4,16-dien-6,20-diona (V).



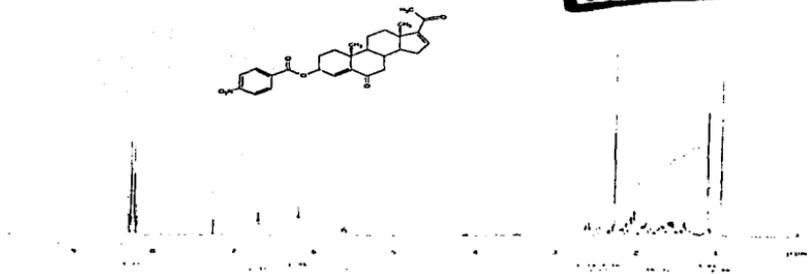
Espectro 31. UV de 3β-(p-nitrobenzoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (AM-13).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

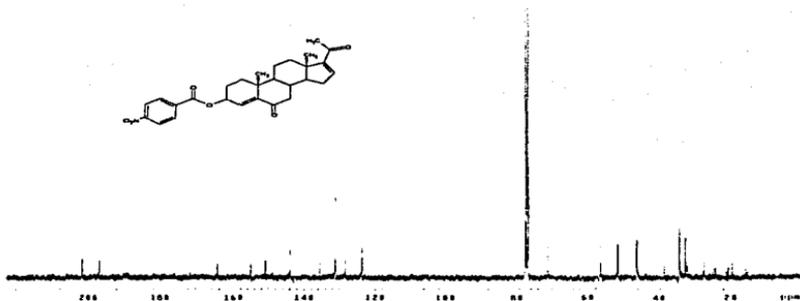


Espectro 32. IR de 3β-(p-nitrobenzoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (AM-13).

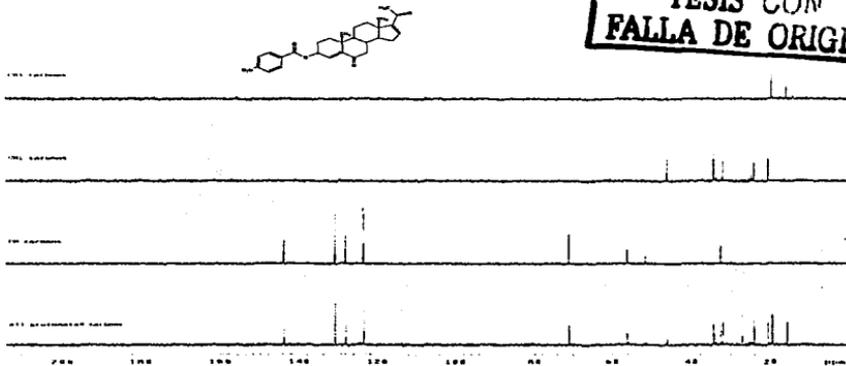
**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Espectro 33. RMN¹H de 3β-(p-nitrobenzoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (AM-13).

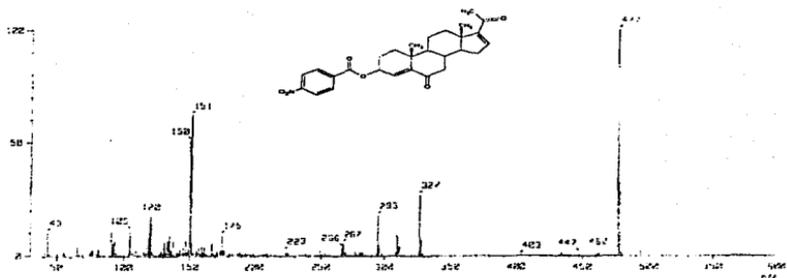


Espectro 34. RMN¹³C de 3β-(p-nitrobenzoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (AM-13).

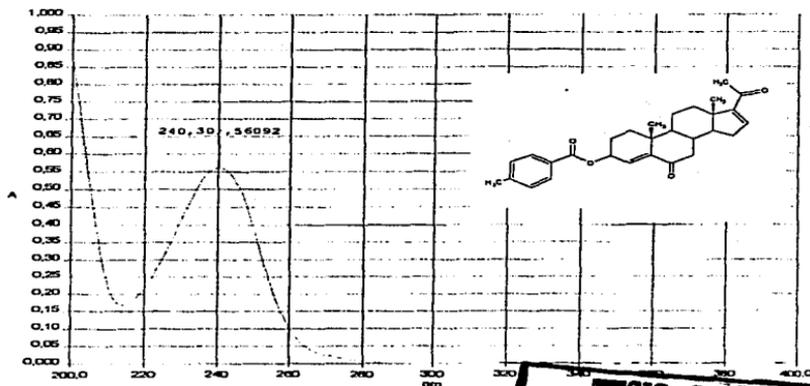


**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Espectro 35. RMN¹³C versión DEPT de 3β-(p-nitrobenzoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (AM-13).

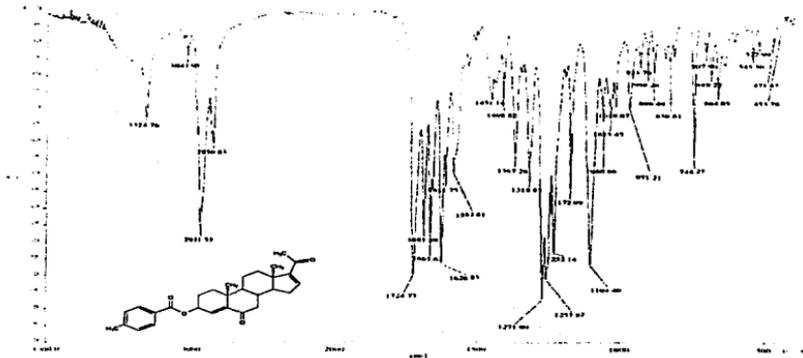


Espectro 36. EMIE de 3β-(p-nitrobenzoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (AM-13).

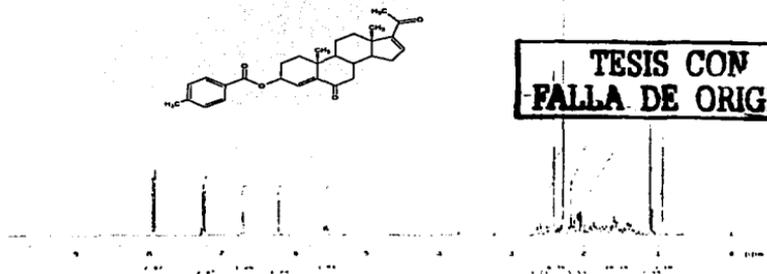


Espectro 37. UV de 3β-(p-toluoiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona

**TESIS CONL.
FALLA DE ORIGEN**

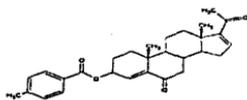


Espectro 38. IR de 3β-(p-toluoyloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (AM-14).



Espectro 39. RMN¹H de 3β-(p-toluoyloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (AM-14).

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

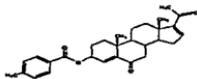


Espectro 40. RMN¹³C de 3β-(p-toluoyloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (AM-14).

170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 ppm



170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 ppm

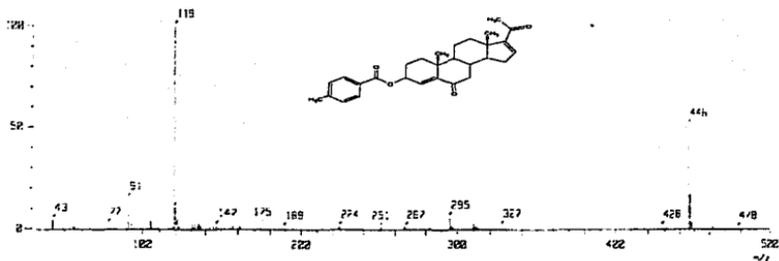


170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 ppm

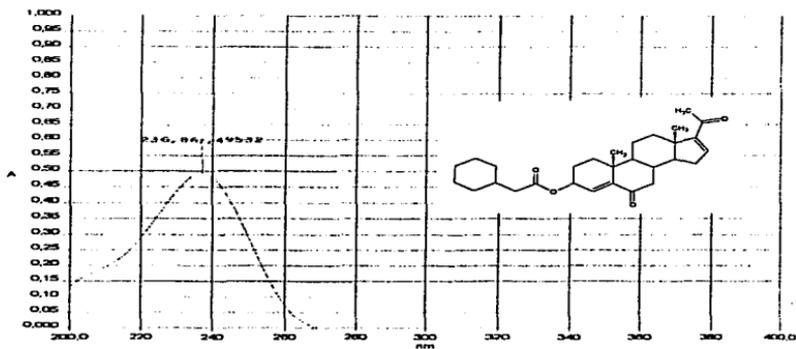
170 160 150 140 130 120 110 100 90 80 70 60 50 40 30 20 ppm

Espectro 41. RMN¹³C versión DEPT de 3β-(p-toluoyloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (AM-14).

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

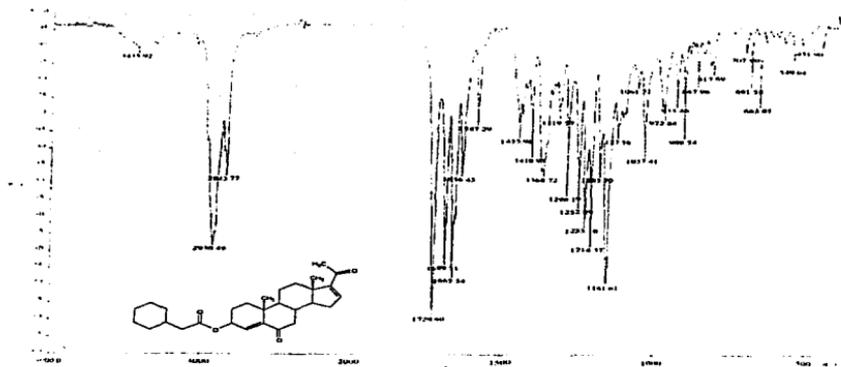


Espectro 42. EMIE de 3β-(p-toluiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (AM-14).

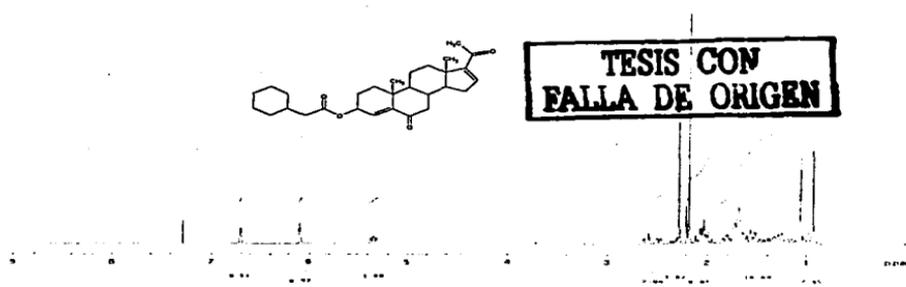


Espectro 43. UV de 3β-(2-ciclohexilacetoxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (AM-15).

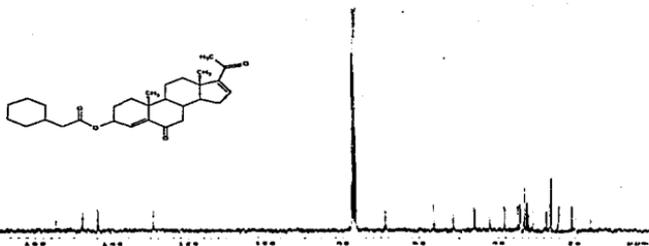
TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



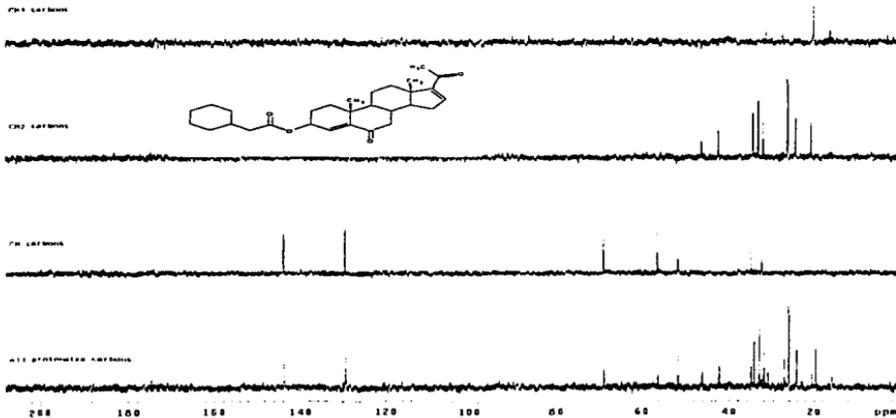
Espectro 44. IR de β -(2-ciclohexilacetoxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (AM-15).



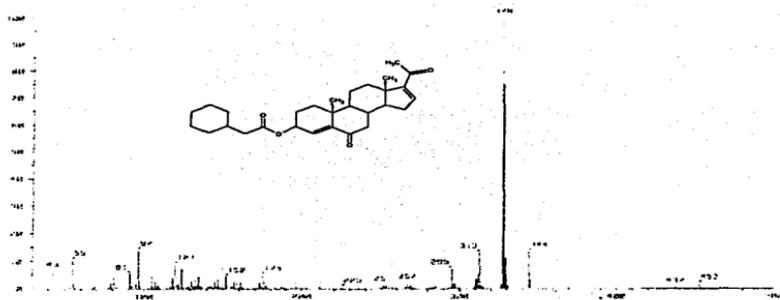
Espectro 45. RMN¹H de β -(2-ciclohexilacetoxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (AM-15).



Espectro 46. RMN¹³C de 3β-(2-ciclohexilacetoxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (AM-15).

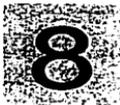


Espectro 47. RMN¹³C en versión DEPT de 3β-(2-ciclohexilacetoxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (AM-15).



Espectro 48. EMIE de 3β-(2-ciclohexilacetoxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona (AM-15).

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



BIBLIOGRAFÍA

1. Catalona W.J., and Scott, W.: Carcinoma of the prostate In Walsh, P.C. et al. (eds): Campbell's Urology. Fifth edition Philadelphia, W.B. Saunders y Co., (1986): 1463.
2. Wilson, J.D.: The Pathogenesis of benign prostatic hyperplasia. *Am. J. Med.* (1980), 68: 745
3. Brian W. Metcalf, Mark A. Levy and Dennis A. Holt. Inhibitors of steroid 5 α -reductase in benign prostatic hyperplasia, male pattern baldness and acne. *Science* (1997): 492-495.
4. Deive N., Rodríguez C., Síntesis of Cytotoxic 6 E-hidroxiimino-4-ene, Steroids: Structure activity Studies, *J. Med. Chem.* (2001), 44: 2612-2618.
5. Mc Murry John, Química Orgánica, 3ª edición, Grupo Editorial Iberoamericana USA (1992): 1071-1078.
6. Guyton C. Arthur, Hall E. John, Tratado de Fisiología Médica, 9ª edición, Editorial Iberoamericana Mc. Graw-Hill, México 1997 pág. 1009-1017.
7. Raymond J., Fiet et al., Design of antiandrogens and their mechanisms of action: a cause study (Anandron), *Hormone Res.* (1987), 28: 230-241.
8. The CoMed communications Internet Forum. www.ustoo.com/cht.html
9. Lozano Teruel J. A., Galindo Cháscales J. A., Solano Muñoz F., Bioquímica para Ciencias de la Salud, Editorial Interamericana Mc. Graw-Hill, España (1995): 174-177.
10. Goodman y Gilman. Las bases farmacológicas de la terapéutica. 9ª edición, Vol. II. Edit. MacGraw-Hill-Interamericana. México. (1997): 1531-1546.
11. Clark J. H., Shrader W. T., O'Malley B. W., Mechanisms of steroid hormone action, in Wilson J. D., Foster D. W., Williams Textbook of Endocrinology, 7ª ed. Philadelphia: W. B. Saunders, (1985): pp 33-75.

12. Schulster D., Burstein S., Cooke B., Molecular Endocrinology of steroid Hormones, Wiley, London (1976).
13. Miller W. L., Endocrine Rev. (1988), 9: 295.
14. Wilson J. D. Recent Studies on the mechanism of action of testosterone. New England J. Med. (1972), 131: 1284-1290.
15. O'Malley B.W. Mechanism of action of steroid hormones. New England J. Med. (1971): 284-370.
16. Biffignandin P., Molinatti, G., et al. Antiandrogens and hirsutism. Hormone Res. (1987), 28: 242-249.
17. Metcalf B. W., Levy M. A. and Holt D. A. Inhibitors of steroid 5 α -reductase in benign prostatic hyperplasia, male pattern baldness and acne. Trends. Pharmacol. Science (1989), 10: 491-495.
18. Estevéz Carrizo F. Hormonoterapia del cáncer de próstata. Farmacología clínica, Rev. Med. Uruguay (2001) 17: 10-16.
19. Valencia N., 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. 1997.
20. Calderón D., Labra N., Bratoeff G., Ramírez E., et al. Antiandrógenos más usuales. Reflexiones sobre la síntesis orgánica. Rev. Mex. Cienc. Farm. México (1997) 28 No 1: 24-29.
21. Eil C., Ketoconazol binds to the human androgen receptor. Hormone Metab. Res. (1992) 24: 367-370.
22. Donn F., Becker H. Effect of cyproterone acetate in comparison to Flutamide on the ventral prostate of adult male castrated Copenhagen-Fisher rats on Dunning B-3327H tumors. Andrologia. (1992), 24: 113-116.
23. Mukherjee M. Chattophadyay S., et al. Effect of Flutamide on the physiological status epididymis and epididymal sperms. Andrologia (1992) 24: 113-116.
24. Migally N. Effect of LHRH on cyproterone acetate injected adenohipophyses of castrated mice. Archives of Andrology. (1982) 8 247-250.
25. Bratoeff E., Ramírez E., Murillo E., Flores G., and Cabeza M. Steroidal Antiandrogens and 5 α -reductase Inhibitors Current. Medicinal Chemistry (1999): 501-517.

26. <http://images.google.com.mx/imgres?imgurl=www.laboratoriosacuna.com.mx/imagenes/prostata.gif&imgrefurl=http://www.laboratoriosacuna.com.mx/susalud.htm&h=199&w=250&prev=/images%3Fq%3Dprostata%26svnum%3D10%26hl%3Des%26lr%3D%26ie%3DUTF-8%26sa%3DN>
27. Barry K., Stephen B., Julian B., Fox D., Pharmacological Options in the Treatment of Benign Prostatic Hyperplasia. *J. Med. Chem.* (1997) 40: (9), 1293-1294.
28. Scott J., Engle L. Ville C. Mechanism of Actino of Steroid Hormones. Pregnamon Press Nueva York. (1961): 20.
29. Ramzi S., Vinay K., Stanley L. Patología Estructural y Funcional. 4ª edición. Vol II. Edit. Interamericana. McGraw-Hill. Madrid. Pág. 1173-1176.
30. Rusell D. W. and Wilson J. D. Steroid 5 α -reductase: Two genes/two enzymes, *Annu. Rev. Biochem.* (1994) 63:25-61.
31. Traish A., Muller R., Wotiz H., Interaction of cyproterone acetate with rats prostatic androgen receptors, *Steroids* (1985) 45: 247-252.
32. Neumann F. and Tôper M., Pharmacology of antiandrogens. *J. Steroid Biochem* (1986), 25, 5B: 885-895.
33. Neuman F., The antiandrogen cyproterone acetate: Discovery, Chemistry, basic pharmacology, clinical use and tool in basic research. *Clin. Exp. Endocrinol.* (1994) 102: 1-32.
34. Harris G., Azzolina B., Baginsky W., et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1992) 89: 10787.
35. Frairias R., Bradlow H. and Gaidano G., Steroid-protein interactions: basic aspects. *Ann. NY Acad. Sci.* (1988) XX: 538.
36. http://www.tuotromedico.com/temas/cancer_de_prostata.htm
37. Bratoeff E., Flores G., Ramírez E., Flores C., Calderón D., Hernández E., Valencia N., Martínez A., Cabeza M. y Miranda R., Síntesis de nuevos andrógenos inhibidores de 5 α -reductasa. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* (1997), 28 (6); 13-19.
38. Bratoeff E., Flores G., Ramírez E., Valencia N., The pharmacology of the antiandrogens. *Chemica OGGI* (1997), 8: 67-69.

39. Bratoeff E., Trejo A., Hernández J. y Sánchez P., Síntesis de derivados del pregnano con un grupo metilo en posición C-16. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* (1992) 22: 14.
40. Calderón D., Bratoeff E. y Ramírez E., Antiandrógenos más usuales, reflexiones sobre la síntesis orgánica. *Rev. Mex. Cienc. Farm.* (1997) 28 (1): 24-29.
41. Ramírez E., Síntesis de 6-halo-16 β -metil-17 α -valeriloxi-4,6-pregnadien-3,20-diona como antiandrógenos. Tesis de Maestría en la Facultad de Química UNAM. (1998).
42. Marker R., Tsukamoto T. and Turner L., Sterols C. Diosgenin. *J. Am. Chem. Soc.* (1940), 62: 2525-2530.
43. Raviña E., Obtención de fármacos por semisíntesis. Síntesis de esteroides en: Avendaño C., Introducción a la química farmacéutica, Interamericana McGraw-Hill Madrid, España (1996), cap. 25. pp: 769-805.
44. Mendoza A., Silvia, Manual de practicas de Química Analítica Instrumental II (1656), Facultad de Química UNAM (2000).