



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES
CUAUTITLAN

SINTESIS DE 3β -(15-CLOROVALEROILOXI)- PREGNA-4,16-
DIEN-6,20-DIONA COMO UN ANTIANDROGENO

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:

QUIMICO FARMACEUTICO BIOLOGO

P R E S E N T A :

GUSTAVO AGUSTIN MORALES

ASESOR: DR. EUGENE ATHANAS BRATOEFF TITEFF



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.



**FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLAN
UNIDAD DE LA ADMINISTRACION ESCOLAR
DEPARTAMENTO DE EXAMENES PROFESIONALES**

ASUNTO: VOTOS APROBATORIOS

FACULTAD DE ESTUDIOS
SUPERIORES CUAUTITLAN



Departamento de
Exámenes Profesionales

DR. JUAN ANTONIO MONTARAZ CRESPO
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLAN
PRESENTE

ATN: Q. Ma. del Carmen García Mijares
Jefe del Departamento de Exámenes
Profesionales de la FES Cuautitlán

Con base en el art. 28 del Reglamento General de Exámenes, nos permitimos comunicar a usted que revisamos la TESIS:

Síntesis de 3-beta-(5-clorovaleroiloxi)-pregna-4,16-dien-6,20-diona
como un antiandrogéno.

que presenta el pasante: Gustavo Agustín Morales
con número de cuenta: 9852717-9 para obtener el título de :
Químico Farmacéutico Biólogo

Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 07 de Enero de 2004.

PRESIDENTE	Dr. Eugene Athanas Bratoeff Titeff	
VOCAL	Dr. Enrique Angeles Anguiano	
SECRETARIO	MC. Lidia Rangel Trujano	
PRIMER SUPLENTE	MC. Brigida Del Carmen Camacho Enriquez	
SEGUNDO SUPLENTE	QFB. Benjamín Velasco Bejarano	

La parte química del presente trabajo se realizó en el Laboratorio 125 del conjunto "E" de la Facultad de Química de la Universidad Nacional Autónoma de México, bajo la supervisión del Dr. Eugene Athanas Bratoeff Titeff

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 Doctora Marisa Cabeza Salinas

Dedicatorias

El presente trabajo está dedicado a:

A ti Señor Bendito, por tu infinito amor y misericordia y por este regalo tan maravilloso que es la vida

A ti Madre, por alentarme a seguir el camino que por circunstancias del Destino creí haber perdido

A ti Padre, por ser mi fuente de inspiración y el aliciente que me ha conducido hasta aquí

A ti Rosario y a ti Rafael, por ser un motivo más que me alentó a concluir este trabajo

A ti Tomás, que me tendiste tu mano amiga cuando más falta me hacía

A mis compañeros de la Facultad, por apoyarme académica y anímicamente y por soportar mis malos ratos

A mi Facultad, la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, y a todos mis profesores y personal de servicio que me brindaron los elementos suficientes para concluir el objetivo planteado

Y por último:

A ti Luis Antonio, porque de cierta manera supliste el lugar de un Padre, porque siempre me tendiste tu mano, porque siempre me motivaste y siempre tuviste una palabra alentadora que me inculcó la fuerza y el coraje suficiente en el momento oportuno y en los momentos que sentía desfallecer

Agradecimientos

Al Doctor Eugene Athanas Bratoeff Titeff, por su experiencia, apoyo ilimitado, comprensión y paciencia infinita

A la Doctora Elena Guadalupe Ramírez, por su amistad ilimitada, orientación y asesoría de un mar de dudas

A la Doctora Norma Valencia, por su valiosísima participación que hizo posible la culminación de este proyecto

A la Doctora Marisa Cabeza Salinas, que me brindó de todos los elementos necesarios y de su valiosísima experiencia en la evaluación biológica de los compuestos aquí presentados

A los integrantes del Jurado, por sus valiosos comentarios y sugerencias hechas en la realización de este trabajo

Al USAI por la Espectroscopía de Ultravioleta, Infrarrojo, Resonancia Magnética nuclear de ^1H y ^{13}C , además de la Espectrometría de Masas de Impacto Electrónico

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y a la Dirección General de Asuntos de Personal Académico (DGAPA) que a través del proyecto G-33450-N e IN-200301, respectivamente, otorgaron el soporte financiero para el desarrollo de este trabajo

Y a todos los integrantes del laboratorio 125 a los cuales tuve el honor de conocer y de ser merecedor de su inestimable aprecio

Muchas gracias a todos

Pedí a Dios la fuerza que me diera el triunfo
Y fui hecho débil para que supiera obedecer con humildad

Pedí la salud que me permitiera hacer las cosas más
grandes
Y fui hecho enfermo para que hiciera las cosas mejores

Pedí las riquezas que me dieran dicha
Y se me dio pobreza para que fuera sabio

Pedí la fuerza que me ganara el elogio de los hombres
Y fui hecho débil para que sintiera la falta de Dios

Pedí todas las cosas que me hicieran gozar de la vida
Y me fue dada la vida para que disfrutara de todas las
cosas

Nada recibí de lo que pidiera sino todo aquello que había
esperado

Casi en mi pesar mi oración callada recibió respuesta

Soy entre todos los hombres el más abundantemente
bendito

I.	INTRODUCCIÓN	1
II.	ANTECEDENTES	4
	A. ESTEROIDES	4
	1. CLASIFICACIÓN DE LOS ESTEROIDES	4
	2. EFECTOS FISIOLÓGICOS DE LOS ESTEROIDES	4
	B. ANDRÓGENOS	7
	1. FUNCIÓN DE LA TESTOSTERONA	7
	2. MECANISMO DE ACCIÓN DE LA TESTOSTERONA	8
	3. LA ENZIMA 5 ALFA-REDUCTASA	8
	4. CÁNCER DE PRÓSTATA	10
	C. ANTIANDRÓGENOS	10
	1. FUNCIÓN BIOLÓGICA DE LOS ANTIANDRÓGENOS	11
	2. SÍNTESIS DE ANTIANDRÓGENOS	
	3. CLASIFICACIÓN DE LOS ANTIANDRÓGENOS	12
	4. USO TERAPÉUTICO DE LOS ANTIANDRÓGENOS	13
III.	OBJETIVOS	15
IV.	PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS	16
	A. SÍNTESIS QUÍMICA	
	1. 3β -ACETOXI-PRENGNA-5,16-DIEN-20-ONA	18

2.	3 β -ACETOXI-5 α -6 α -EPOXI-PRENG-16-EN-20-ONA	19
3.	3 β -ACETOXI-5 α -HIDROXI-PRENG-16-EN-6,20-DIONA	20
4.	3 β -ACETOXI-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA	21
5.	3 β -HIDROXI-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA	22
6.	3 β -(5-CLOROVALEROILOXI)- PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA	24
7.	3 β -(CICLOPENTILCARBONILOXI)-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA	25
8.	3 β -(4-CLOROFENOXI)-ACETOXI-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA	27
B.	ENSAYO BIOLÓGICO DE LA ACTIVIDAD ANTIANDROGÉNICA	30
1.	PRUEBA DE ORGANOS DEL FLANCO	31
2.	DETERMINACIÓN DEL PESO DE LA PRÓSTATA	31
3.	INHIBICIÓN DE LA ENZIMA 5 ALFA-REDUCTASA EN HOMOGENADOS DE PRÓSTATA	32
4.	ANÁLISIS DE COMPETENCIA DE LOS ESTEROIDES SINTETIZADOS POR EL RECEPTOR ANDROGÉNICO	35
V.	DISCUSIÓN	37
A.	SÍNTESIS QUÍMICA	37
1.	3 β -ACETOXI-PRENGNA-5,16-DIEN-20-ONA	37
2.	3 β -ACETOXI-5 α -6 α -EPOXI-PRENG-16-EN-20-ONA	37
3.	3 β -ACETOXI-5 α -HIDROXI-PRENG-16-EN-6,20-DIONA	38
4.	3 β -ACETOXI-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA	38
5.	3 β -HIDROXI-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA	39
6.	3 β -(5-CLOROVALEROILOXI)- PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA	40
7.	3 β -(CICLOPENTILCARBONILOXI)-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA	41
8.	3 β -(4-CLOROFENOXI)-ACETOXI-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA	42
B.	ENSAYO BIOLÓGICO	43
1.	PRUEBA DE ORGANOS DEL FLANCO	43
2.	DETERMINACIÓN DEL PESO DE LA PRÓSTATA	43

3. INHIBICIÓN DE LA ENZIMA 5 ALFA-REDUCTASA EN HOMOGENADOS DE PRÓSTATA	43
4. ANÁLISIS DE COMPETENCIA DE LOS ESTEROIDES SINTETIZADOS POR EL RECEPTOR ANDROGÉNICO	44
VI. CONCLUSIONES	46
VII. BIBLIOGRAFÍA	47
APÉNDICE	
ANEXO 1	49

I. INTRODUCCIÓN

Una hormona es una sustancia química secretada en los líquidos corporales internos por una célula o un grupo de células que ejercen un efecto de control fisiológico sobre otras células del organismo que se encuentran alejadas.¹

El cuerpo tiene muchas hormonas que lo ayudan a desarrollarse y a realizar diferentes actividades. Una hormona que es muy importante en los hombres es la **Testosterona (T)**. Esta hormona esteroidea es un andrógeno responsable de muchas de las características sexuales secundarias propias de los hombres, pero también está relacionada con el cáncer de próstata.²

Los estudios bioquímicos han comprobado que la hormona masculina, testosterona, se convierte dentro de la próstata en el compuesto asociado denominado dihidrotestosterona (DHT). El DHT ayuda a regular el crecimiento de la próstata. La testosterona se convierte en DHT por una enzima especial llamada 5-alfa reductasa en presencia de NADPH. Ésta existe bajo dos formas, denominadas Tipo 1 y Tipo 2. La que más se presenta en la próstata es el Tipo 2.

Las células de la próstata poseen receptores sensibles a la testosterona y a los estrógenos, y cuando el hombre va envejeciendo se produce un desequilibrio entre las diferentes hormonas, que estimula la producción de factores de crecimiento celular originando el progresivo aumento de tamaño de la glándula. La testosterona libre plasmática es convertida en un 90% en dihidrotestosterona (DHT), que es el principal andrógeno prostático, en las células prostáticas por acción de la 5-alfa reductasa. Hay teorías que sugieren que la dehidrotestosterona tiene un papel importante; al caer los niveles de testosterona en la sangre, el hombre continúa produciendo dihidrotestosterona y ésta estimula el crecimiento celular.

La DHEA (o dehidroepiandrosterona) es una hormona natural producida por las glándulas suprarrenales a partir del colesterol. La DHEA es un importante precursor para los andrógenos y estrógenos, pudiendo ejercer acciones de acuerdo con las necesidades del organismo, bien sea como andrógenos o como estrógenos. Por ello no debe tomarse por pacientes que sufren de hiperplasia prostática benigna (HBP), ya que estimulará su crecimiento al incrementar la producción hormonal. La DHEA no provoca enfermedades de la próstata, pero si puede ser un factor agravante si ya existe.³

El mecanismo específico que permite el desarrollo del cáncer de próstata aun es desconocido, pero se han identificado ciertos factores de riesgo como son la edad, rara vez se desarrolla antes de los 40 años, pero es muy frecuente en hombres de 65 años en adelante. En el hombre de raza negra es 37% más frecuente. Otro factor es la alimentación; existe evidencia de la conexión de dietas ricas en grasa animal aumentan la incidencia. Por último los factores ambientales; como lo es trabajar en lugares expuestos a cadmio incrementa el riesgo de contraer este tipo de cáncer.^{4,5}

El tratamiento de la HBP se realiza con fármacos bloqueadores alfa adrenérgicos (bloquean receptores alfa de manera selectiva), se puede realizar con los siguientes compuestos: alfuzosina, doxazosina, tamsulosina y terazosina. Estos medicamentos actúan relajando los músculos de la salida de la vejiga, de la uretra y de la próstata, mejorando la dificultad para orinar en más de la mitad de los pacientes. No reducen el tamaño prostático. Actúan preferentemente frente a los síntomas irritativos.

Sus efectos secundarios son: hipotensión ortostática, mareos, palpitaciones, somnolencia, debilidad, náuseas, diarrea, congestión nasal, cefalea, impotencia.⁶

En la actualidad se dispone de compuestos sintéticos para inhibir la acción androgénica de la testosterona (T) y la dihidrotestosterona (DHT). Uno de ellos es el acetato de ciproterona, fármaco que se utiliza comercialmente para el tratamiento de cáncer de próstata en el ser humano, cuyo mecanismo de acción consiste el bloquear el receptor androgénico para inhibir la acción de la DHT. Otro esteroide que se utiliza para el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna y maligna es la finasterida. Este compuesto inhibe la actividad de la enzima 5-alfa-reductasa tipo 2 que está presente en la próstata, y también limita el efecto inhibitorio de la enzima tipo 1 que se encuentra en piel.⁷

Sobre la base del análisis de la relación estructura-actividad biológica de los antiandrógenos esteroidales, como el acetato de ciproterona y sus derivados, se ha concluido que la actividad se debe a la estructura casi plana de la molécula, a la presencia del grupo $1\alpha-2\alpha$ ciclotileno en C-1 y C-2 (el doble enlace entre éstos presenta casi el mismo efecto), dobles enlaces entre los carbonos C-4 y C-5, C-6 y C-7, un grupo electronegativo en C-6, la presencia de un grupo alquilo en C-16, el tamaño del sustituyente en C-17, así como los grupos cetónicos en C-3 y C-20.⁸

Tomando en consideración algunas de las características anteriores (como los dobles enlaces en C-4 y C-6 el tamaño del sustituyente en C-17 y los grupos ceto en C-3 y C-20) se propuso desarrollar la síntesis de los compuestos:

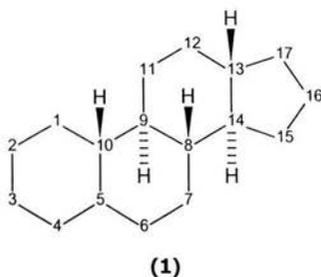
- **3 β -(5-CLOROVALEROILOXI)-PREGN-4,16-DIEN-6,20-DIONA**
- **3 β -(CICLOPENTILCARBONILOXI)-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA**
- **3 β -(4-CLOROFENOXI)-ACETOXI-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA**

Así mismo, este grupo de moléculas serán evaluadas como posibles antiandrógenos esteroidales.

II. ANTECEDENTES

A. ESTEROIDES

Los esteroides son sustancias que contienen en su estructura base el núcleo del ciclopentanoperhidrofenantreno **(1)**. Se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, tanto en el reino vegetal como en el animal.⁹



1. Clasificación de los esteroides

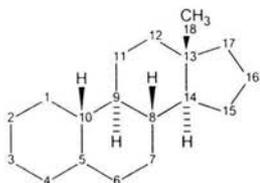
Los esteroides se clasifican considerando su estructura química. Por lo general, se encuentran sustituidos en C-10 y C-13 por grupos metilo y un grupo hidroxilo o carbonilo en C-3. Para nombrarlos se toma en cuenta la cadena presente en la posición C-17. (Esquema A)

2. Efectos fisiológicos de los esteroides.

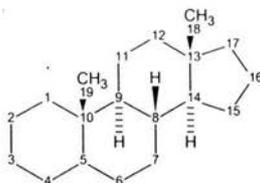
Los efectos fisiológicos varían de un compuesto a otro y van desde la actividad de las vitaminas hasta las hormonas sexuales. En el cuadro 1 se dan las estructuras, los nombres y las propiedades fisiológicas de algunos de ellos.¹⁰

ESQUEMA A

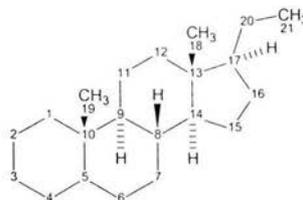
CLASIFICACIÓN DE LOS ESTEROIDES



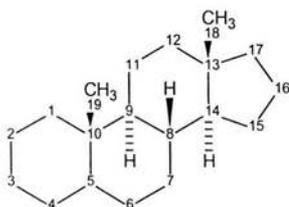
Estrano



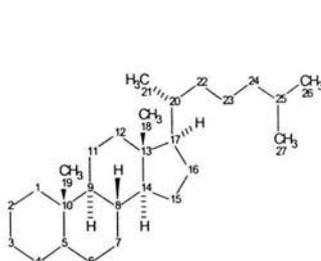
Androstano



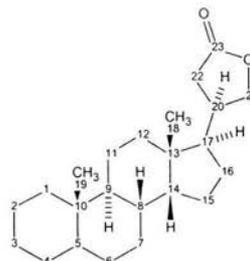
Pregnano



Colano

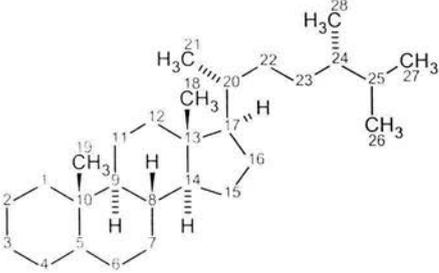


Colestano

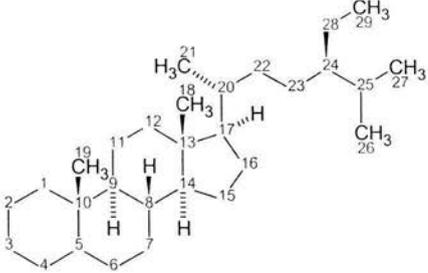


Cardanólido

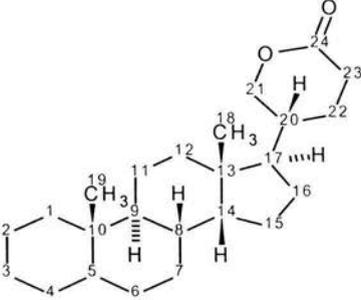
ESQUEMA A (CONTINUACIÓN)



Ergostano

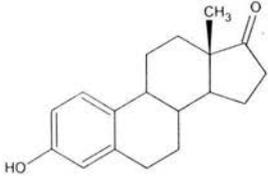
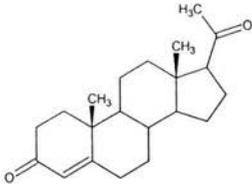
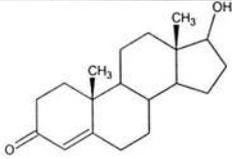
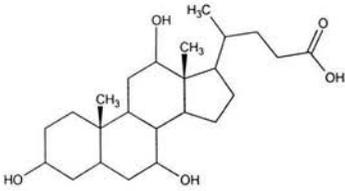


Estigmastano



Bufanólido

CUADRO 1. EFECTO FISIOLÓGICO DE LOS ESTEROIDES

ESTRUCTURA	NOMBRE	PROPIEDAD FISIOLÓGICA
 <p style="text-align: right;">(2)</p>	ESTRONA	Es la hormona estrogénica de la mujer.
 <p style="text-align: right;">(3)</p>	PROGESTERONA	Es la llamada hormona del embarazo femenino, la segrega el cuerpo amarillo (<i>corpus luteum</i>)
 <p style="text-align: right;">(4)</p>	TESTOSTERONA	Hormona sexual masculina, que regula el desarrollo de los órganos reproductores y las características sexuales secundarias
 <p style="text-align: right;">(5)</p>	ÁCIDO CÓLICO	Se encuentra en la bilis, en su forma de sal de sodio. Las sales biliares actúan en los procesos de digestión.

<p>(6)</p>	<p>CORTISONA</p>	<p>Es importante para el control del metabolismo de los carbohidratos, resulta eficiente para aliviar los síntomas de la artritis reumatoide.</p>
<p>(7)</p>	<p>COLESTEROL</p>	<p>Se encuentra en casi todos los tejidos de los vertebrados y es el principal constituyente de los cálculos biliares. El organismo lo necesita para producir otros esteroides.</p>

B. ANDRÓGENOS

Los andrógenos son esteroides que regulan las características más importantes de la fisiología y el comportamiento sexual en varones. Éstos tienen tres efectos principales: regulan la función de la próstata y las vesículas seminales, actúan como anabólicos y son responsables de la expresión de las características sexuales secundarias.¹¹ El principal andrógeno es la testosterona.

Los desórdenes patológicos relacionados con andrógenos se han clasificado en dos: Hipoandrogenismo (baja cantidad de andrógenos) e hiperandrogenismo (alta cantidad de andrógenos).^{12, 13}

1. Función de la testosterona

En el ámbito molecular, la acción primaria de la T consiste en aumentar la síntesis proteica en su tejido blanco, específicamente en la próstata y en las vesículas seminales. Su principal función es la de producir el desarrollo normal de los órganos reproductores masculinos y mantener las características masculinas secundarias como son: la voz grave, el crecimiento y el patrón del pelo facial y corporal, así como el desarrollo del músculo esquelético. También inhibe el desarrollo y la función de la glándula mamaria y estimula la libido.¹²

2. Mecanismo de acción de la testosterona

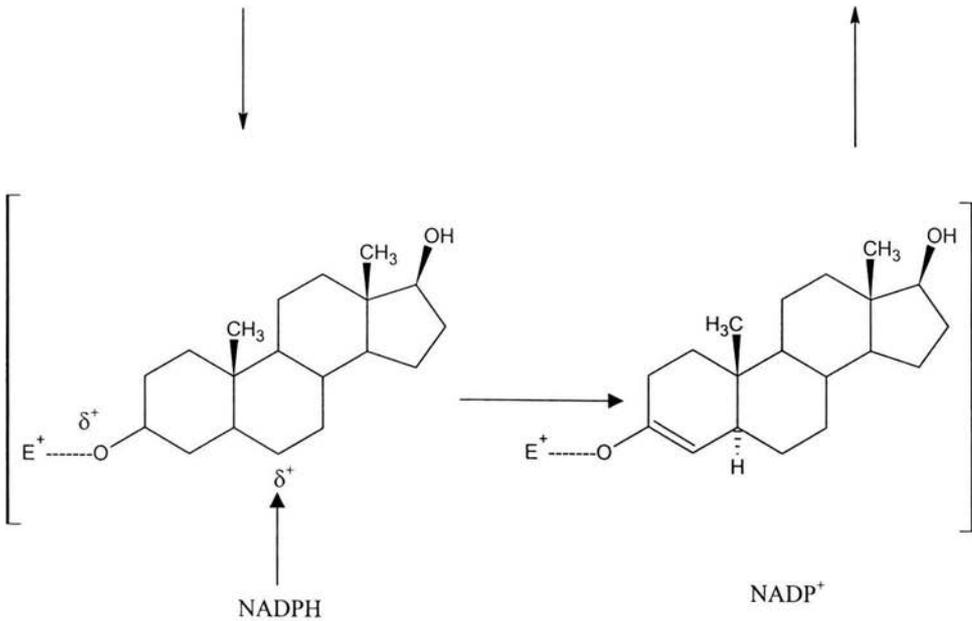
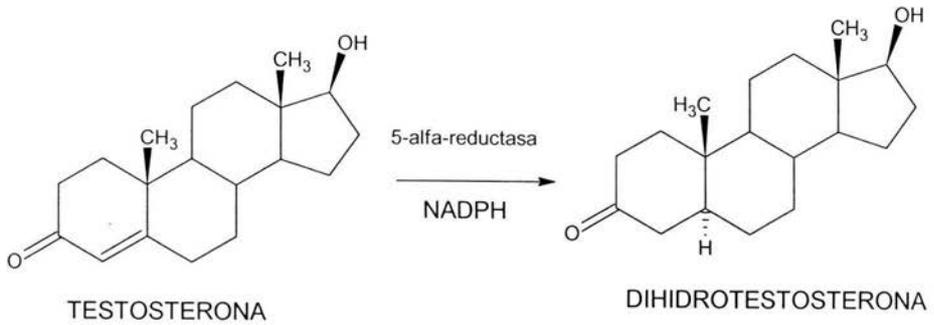
La T es convertida irreversiblemente a DHT a través de la acción de la enzima 5-alfa-reductasa, la que se localiza en la membrana nuclear dependiente de NADPH. El mecanismo de acción consiste en la formación de un complejo 5-alfa-reductasa-NADPH para posteriormente unirse la T a este complejo y realizar una transferencia estereoespecífica de un hidruro del NADPH a la posición 5 de la T. El enolato resultante en C-3 y C-4 se estabilizan por un residuo electrofílico (E^+) de la enzima. En el último paso el enolato regenera la enzima en C-3.^{13, 14} (Esquema B).

3. La enzima 5 α -reductasa

Existen dos formas de la enzima 5 α -reductasa: las isoenzimas tipo 1 y las tipo 2, las cuales difieren de sus propiedades bioquímicas, el tejido de localización y en su función.¹⁵ La isoenzima tipo 1 se encuentra predominantemente en piel no genital y en el hígado. La isoenzima tipo 2 se encuentra presente predominantemente en los tejidos blanco de andrógenos, incluyendo a la próstata y a los testículos. Ésta se relaciona directamente al cáncer de próstata e hiperplasia prostática benigna (HPB).

ESQUEMA B

MECANISMO POR EL CUAL LA T ES CONVERTIDA A DHT



4. **Cáncer de próstata e Hiperplasia prostática benigna (HPB)**

El cáncer de próstata se origina generalmente en el lóbulo posterior del órgano adyacente al recto, cuando provoca metástasis invade otros órganos alejados como los huesos y los ganglios linfáticos.¹⁶ Los tumores formados por esta clase de células malignas se tornan cada vez más agresivos, volviéndose letales cuando interfieren con la funcionalidad de órganos y tejidos necesarios para la supervivencia de un organismo.

La hiperplasia prostática benigna es otro de los padecimientos que afectan a los varones adultos, la cual se caracteriza por el agrandamiento anormal de la próstata y la formación de nódulos. Tanto la hiperplasia prostática benigna como el cáncer de próstata tienen características en común, como lo es su alta incidencia con la vejez, ambas se encuentran ligadas a concentraciones altas de andrógenos, respondiendo a terapias que remueven o disminuyen la concentración de estos últimos.

Dentro de la terapia para el tratamiento del cáncer de próstata e hiperplasia prostática benigna, se encuentra la cirugía, la radiación y las terapias hormonales. Los dos primeros métodos son los más comunes, sin embargo, involucran repercusiones en el paciente como son desequilibrio emocional, incontinencia urinaria, lesión intestinal e impotencia sexual, además de los riesgos propios de la radiación.

C. ANTIANDRÓGENOS

Son sustancias químicas (generalmente de origen sintético) que constituyen una amplia gama de fármacos asociados con el hipergonadismo.

Las características de un antiandrógeno ideal son:

- Una baja o nula toxicidad
- Presentar una elevada actividad antiandrogénica
- Presentar una baja actividad hormonal
- No debe disminuir la libido

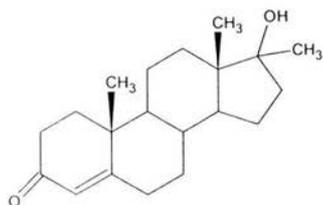
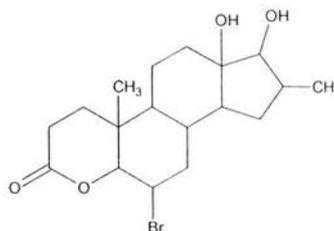
1. Función biológica de los antiandrógenos

Previene la formación de los andrógenos en su sitio de acción, al bloquear los receptores androgénicos en sus órganos blanco, esto debido al carácter antagónico competitivo de los antiandrógenos frente a los andrógenos por unirse a la misma proteína receptora. Esto puede también deberse a que inhiben o modifican la entrada de T a la célula, o bien, a la inhibición de su conversión a su forma activa: 5α -DHT.¹⁷ Es decir, los antiandrógenos en su función biológica podrían bloquear la síntesis o el efecto de la T endógena, mediante una acción sobre el receptor antiandrogénico, lo que impediría la formación del complejo andrógeno-receptor y así, inhibir la acción fisiológica del andrógeno endógeno en el cuerpo humano.

2. Síntesis de antiandrógenos

Se conocen dos métodos de acuerdo a su actividad biológica:

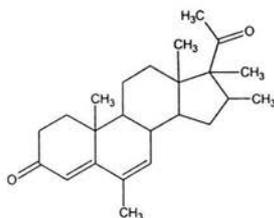
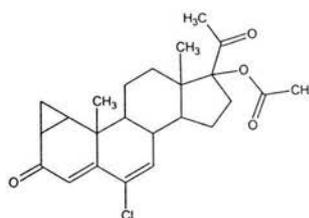
- a) Modificando la molécula de la T, de tal manera que el compuesto sintetizado interaccione con el receptor sin producir un efecto androgénico, bloqueando la formación del complejo andrógeno-receptor, de manera que tengan un efecto antagónico. (8 y 9 Figura 2, pág 9)
- b) La progesterona es un antiandrógeno natural, pero debido a su efecto hormonal no puede ser utilizada como tal. Modificando su molécula se esperaría aumentar el efecto antiandrogénico y eliminar el anabólico. (Ejemplos 10, 11, 13 y 14, pág 9 y 10)

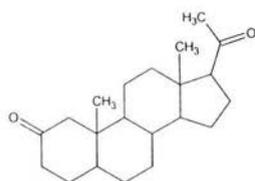
Metiltestosterona (**8**)Compuesto más activo (**9**)**Figura 2.** Antiandrógenos esteroidales derivados de la Testosterona

3. Clasificación química de los antiandrógenos

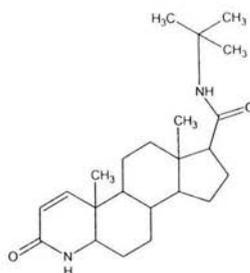
Los antiandrógenos se clasifican en dos grupos: esteroidales y no esteroidales.¹⁸

Los antiandrógenos de tipo esteroidal son compuestos que derivan de la progesterona (**12 y 13**, figura 3, pág 10). Estos compuestos son de mayor interés terapéutico debido a que actúan específicamente con el receptor androgénico. Como desventajas presentan: la disminución de la concentración de T y la reducción del tamaño de los órganos sexuales.

Medrogesterona (**10**)Acetato de ciproterona (**11**)



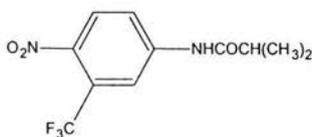
Anorprogesterona (12)



Finasterida (13)

Figura 3. Antiandrógenos esteroidales derivados de la progesterona

Los antiandrógenos no esteroidales tienen afinidad por el receptor debido a su estructura química con geometría semejante y reducen de un 25 a 30% el tamaño de la próstata. Como desventajas presentan la inhibición de la erección e insuficiencia hepática entre otras.



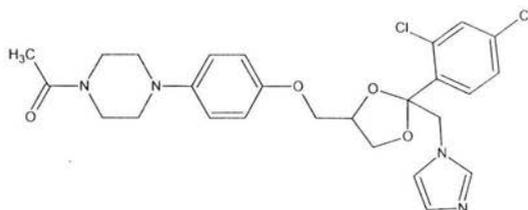
Flutamida (14)

4. Uso terapéutico de los antiandrógenos

Los antiandrógenos se utilizan en el tratamiento de la hiperplasia prostática benigna, del cáncer de próstata, de la hipersexualidad en el hombre, de la pubertad precoz en los niños, la virilización en la mujer, el acné y la calvicie prematura.¹⁹

Existe una amplia gama de compuestos antiandrogénicos, y gracias a su diversidad se puede utilizar alguno en particular para el tratamiento específico, el cual está determinado por el avance de la enfermedad, el sitio de acción, la vía de administración y los efectos colaterales que se presentan de cada uno de ellos. A continuación se mencionan algunos de ellos y sus características terapéuticas.

El ketoconazol (**15**, pag. 11) bloquea las enzimas que participan en la biosíntesis de hormonas esteroidales. Su utilidad queda limitada por presentar efectos adversos gastrointestinales y hepáticos, además de la duración de su acción breve.²⁰



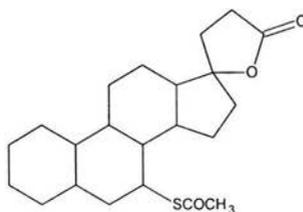
Ketoconazol (**15**)

La finasterida (**13**, figura 3, pág 10) bloquea de manera preferencial a la enzima 5-alfa-reductasa. En pacientes con hiperplasia prostática benigna, origina una disminución constante del tamaño de la próstata, el 33% de los varones tratados con este compuesto presentaron mejorías en el flujo urinario y una reducción de los síntomas, pero no causa un cambio en las cifras plasmáticas de la T.²²

El acetato de ciploterona (**11**, pág. 9) es un potente antagonista de andrógenos, es decir, compite con la DHT por la unión al receptor androgénico, sin embargo, presenta efectos nocivos como la impotencia sexual, disminución de la libido y regresión de las características sexuales femeninas.^{23,24}

La espironolactona (**16**, pág. 11) es un antagonista de la aldosterona, actúa como un inhibidor débil de la unión de los andrógenos a su receptor, bloquea de manera primaria la biosíntesis de andrógenos.²¹

La flutamida (**14**, pág. 10) es un antiandrógeno no esteroide, el cual actúa como un potente inhibidor de la unión DHT al receptor de andrógenos, sin embargo causa insuficiencia hepática progresiva y náuseas severas.²⁵



Espironolactona (**16**)

III. OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

En virtud de la limitada utilidad clínica de las opciones disponibles de compuestos que se pueden emplear como antiandrogénos, es necesario desarrollar la síntesis y estudiar nuevos compuestos, que tengan un mayor efecto antiandrogénico y que presenten los mínimos efectos adversos. Debido a esto, el objetivo general del presente trabajo es desarrollar un nuevo compuesto que cumpla con las características de un antiandrogénico ideal, para el uso de la terapia del cáncer de próstata e hiperplasia prostática benigna.²⁶

OBJETIVO PARTICULAR

Para lograr esto se desea sintetizar un sustituto del acetato de ciproterona a partir del **ACETATO DE 16-DEHIDROPREGNENOLONA** como materia prima, haciendo las siguientes modificaciones:

1. Introducción de una doble ligadura en C-4, introducción de un grupo cetona en C-6 y de un grupo 3 β -(5-clorovaleroiloxi) en C-3. de esta manera se pretende sintetizar el compuesto: **3 β -(5-CLOROVALEROILOXI)-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (22)**
2. Introducción de una doble ligadura en C-4, introducción de un grupo cetona en C-6 y de un grupo 3 β -ciclopentilcarboniloxi en C-3 para de esta manera sintetizar el compuesto: **3 β -(CICLOPENTILCARBONILOXI)-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (23)**
3. Introducción de una doble ligadura en C-4, introducción de un grupo cetona en C-6 y de un grupo 3 β -(4-cloro)fenoxiacetoxi en C-3 para de esta manera sintetizar el compuesto: **3 β -(4-CLOROFENOXI)-ACETOXI-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (24)**

Estos compuestos se evaluaron farmacológicamente (*in vivo e in vitro*) respecto al estándar finasterida que es uno de los fármacos antiandrogénicos de uso actual.

IV. PARTE EXPERIMENTAL Y RESULTADOS

A. SÍNTESIS QUÍMICA

Para obtener los compuestos finales se siguió la ruta de síntesis planteada en el esquema C.

El término de las reacciones así como la pureza de los compuestos, se comprobaron por medio de cromatografía en capa fina utilizando como soporte gel de sílice 60 F254 Merck. Como eluyente se utilizó una mezcla de hexano/acetato de etilo 6:4. Los compuestos se visualizaron con una solución de CoCl_2 al 5% en H_2SO_4 (2N) y/o luz ultravioleta (UV) $\lambda=254$ nm.

Los puntos de fusión de los intermediarios, así como de los productos finales, se determinaron en un aparato Fisher-Jones y no están corregidos.

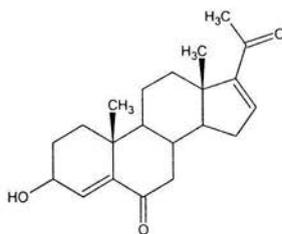
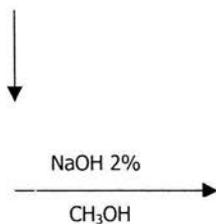
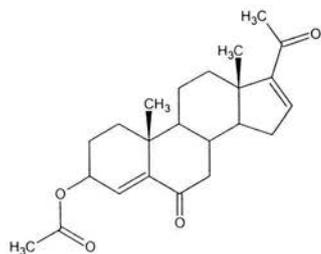
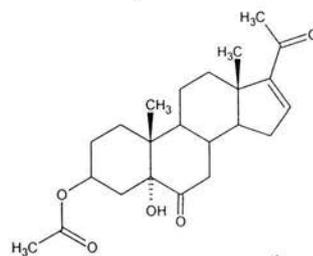
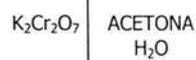
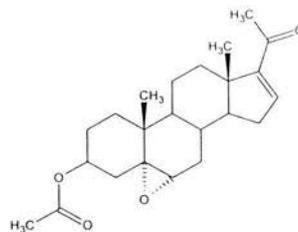
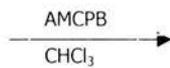
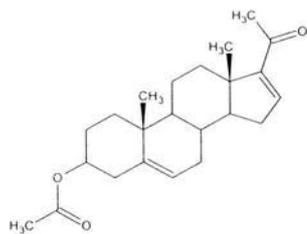
Para sintetizar el compuesto final se siguió una ruta de síntesis, la cual genera 4 intermediarios más el producto final. Todos ellos se aislaron, purificaron y caracterizaron mediante sus propiedades físicas (p.f) y espectroscópica (UV,IR,RMN- ^1H); además, para los compuestos finales se incluyeron las pruebas espectroscópicas de RMN- ^{13}C y EMIE.

Los equipos utilizados para la caracterización química fueron:

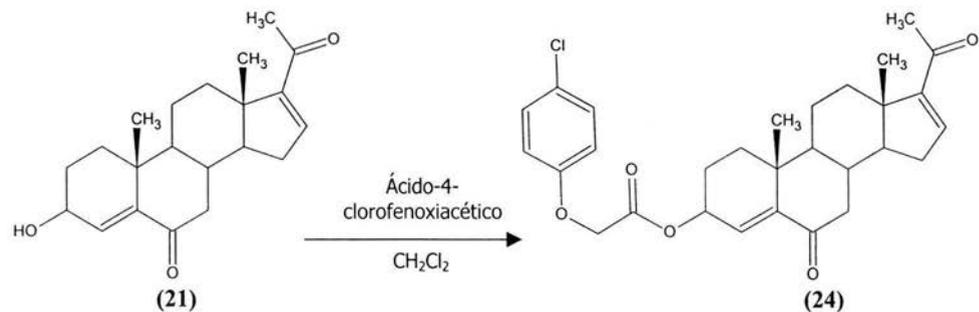
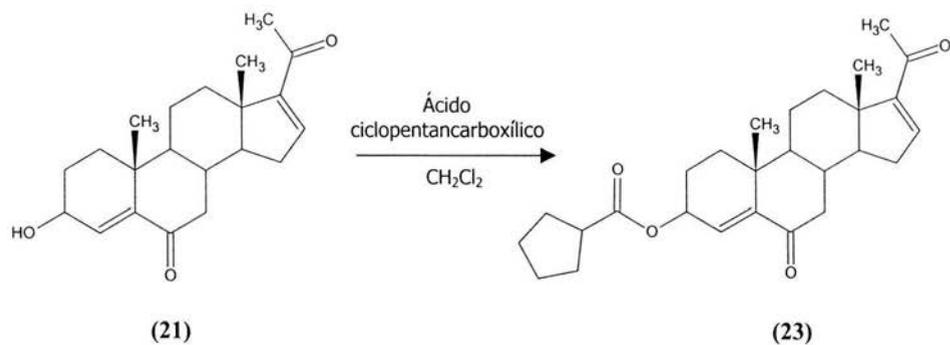
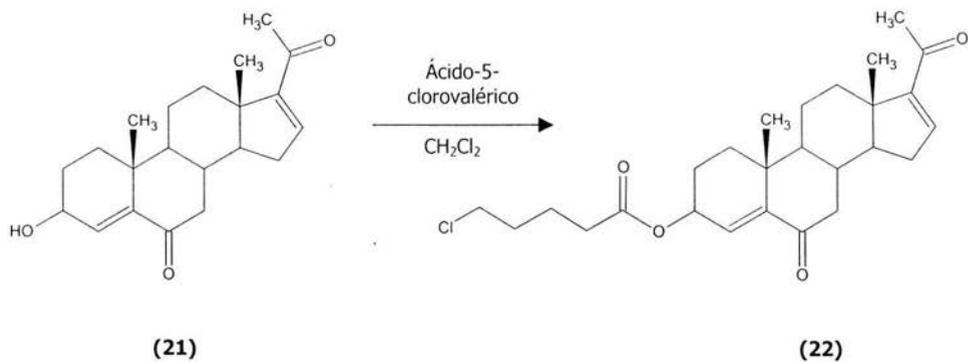
- Espectrofotometría de absorción ultravioleta (UV): Perkin Elmer 200s
- Espectrofotometría de absorción de infrarrojo (IR): Perkin Elmer 549B utilizando la técnica de película con KBr.
- Espectroscopia de Resonancia Magnética Nuclear de Hidrógeno (RMN- ^1H) y de Carbono 13 (RMN- ^{13}C): Varian, Gemini 200 y VRX-300s, utilizando CDCl_3 como disolvente, los desplazamientos están referidos a TMS o DMSO como referencia interna.
- Espectrometría de Masas (EMIE): HP5985-B CG/MS utilizando la técnica de impacto electrónico.

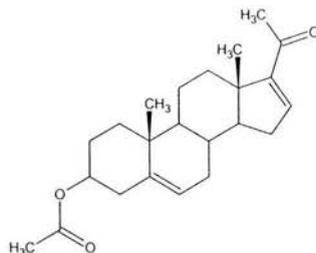
ESQUEMA C

RUTA GENERAL DE SÍNTESIS



ESQUEMA C (CONTINUACIÓN)

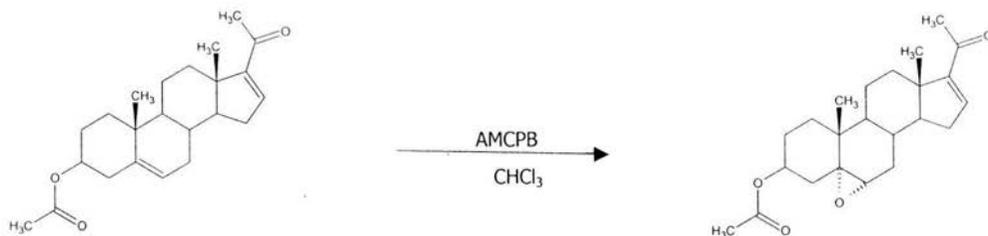


1. 3 β -ACETOXI-PRENGNA-5,16-DIEN-20-ONA (17)

En primer lugar se recristalizó la materia prima con metanol. Se obtuvo un polvo de color blanco, el cual se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas.

CUADRO 2. PROPIEDADES FÍSICAS Y ESPECTROSCÓPICAS DE (17)

Punto de fusión	181-183 °C
Peso molecular	356.44 uma
IR (cm⁻¹)	
2945.27	Metilos y metilenos
1729.76	Carbonilo del éster en C-3
1661.20	Carbonilo α,β insaturado; C-20
1583.90	Doble enlace conjugado; C-16
1372.77	Metilos
1247.26	C-O-C del éster en C-3
1037.03	C-O-C del éster en C-3
RMN ¹H (ppm)	
0.920	Metilo; C-18
1.059	Metilo; C-19
2.037	Metilo; C-21
2.265	Metilo del éster en C-3
4.600	Protón base del acetoxi en C-3
5.400	Protón vinílico en C-6
6.700	Protón vinílico en C-16

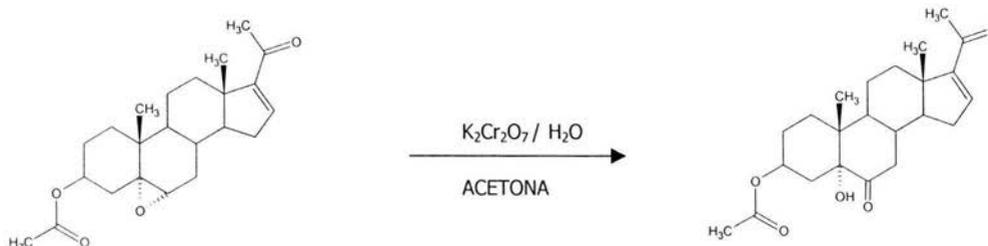
2. 3 β -ACETOXI-5 α -6 α -EPOXI-PRENG-16-EN-20-ONA (18)

i

En un matraz de fondo redondo de 100 mL con una boca, se disolvió 1g (2.8×10^{-3} mol) de materia prima en 50 mL de cloroformo, después se adicionaron 1.62 g de AMCPB. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente por 30 minutos en agitación constante. Terminado el tiempo de reacción se adicionaron 84 mL de $\text{NaHSO}_3/\text{NaHCO}_3$ al 5% para detener la reacción. Esta solución se pasó a un embudo de separación y se extrajo 3 veces con 50 mL de cloroformo cada una. Las fases orgánicas resultantes se juntaron y lavaron con agua destilada hasta pH neutro. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. El producto obtenido se recrystalizó en metanol con un rendimiento del 97% (1.01g , 2.7×10^{-3} mol).

CUADRO 3. PROPIEDADES FÍSICAS Y ESPECTROSCÓPICAS DE (18)

Punto de fusión	170-172°C
Peso molecular	372.48 uma
IR (cm⁻¹)	
2943.71	Metilos y metilenos
1734.40	Carbonilo del éster en C-3
1660.50	Carbonilo α,β insaturado; C-20
1588.52	Doble enlace conjugado en C-16
1372.41	Metilos
1252.80	C-O-C de éster; C-3
RMN ¹H (ppm)	
0.848	Metilo; C-19
1.114	Metilo; C-18
2.013	Metilo; C-21
2.249	Metilo del acetoxi en C-3
2.921	Protón base del epóxido en C-6
4.790	Protón base del acetoxi en C-3
6.685	Protón vinílico en C-16

3. 3 β -ACETOXI-5 α -HIDROXI-PRENG-16-EN-6,20-DIONA (19)

En un matraz de fondo redondo de 100 mL con una boca se disolvió 1g (2.7×10^{-3} mol) de materia prima en 50 mL de acetona. Se mantuvo en agitación magnética constante por 10 minutos en baño de hielo, terminado en tiempo se adicionó 1g de dicromato de potasio disuelto en 3.5 mL de agua destilada, gota a gota. La mezcla de reacción se tuvo a temperatura ambiente por 20 minutos con agitación constante. Terminado el tiempo de reacción se adicionó una carga idéntica de dicromato de potasio (1g en 3.5 mL de agua destilada). La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente por 40 minutos con agitación magnética constante. Terminado el tiempo de reacción la mezcla de reacción se vertió sobre 200g de hielo-agua y agitó por 10 minutos. Después se filtró, lavó con agua destilada hasta pH neutro y se dejó secar a vacío. El sólido resultante se recrystalizó en metanol. Se obtuvo un rendimiento del 66.66% (0.69g, 1.8×10^{-3} mol).

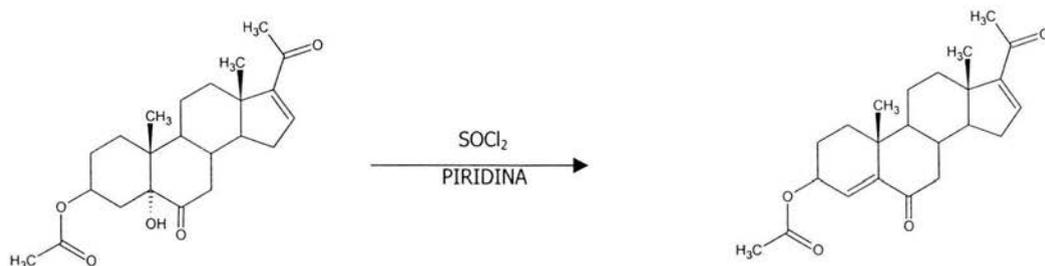
CUADRO 4. PROPIEDADES FÍSICAS Y ESPECTROSCÓPICAS DE (19)

Punto de fusión	200-202°C
Peso molecular	388.497 uma
IR (cm⁻¹)	
3409.82	Alcohol; C-5
2940.32	Metilos y metilenos
1712.26	Carbonilo; C-6
1664.74	Carbonilo; C-20
1236.75	C-O-C del éster; C-3

CUADRO 4 (CONTINUACIÓN)

RMN ¹ H (ppm)	
0.844	Metilo; C-18
0.864	Metilo; C-19
2.011	Metilo; C-21 y metilo del acetoxi en C-3
5.03	Protón base del acetoxi en C-3
6.691	Protón vinílico en C-16

4. 3 β -ACETOXI-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (20)

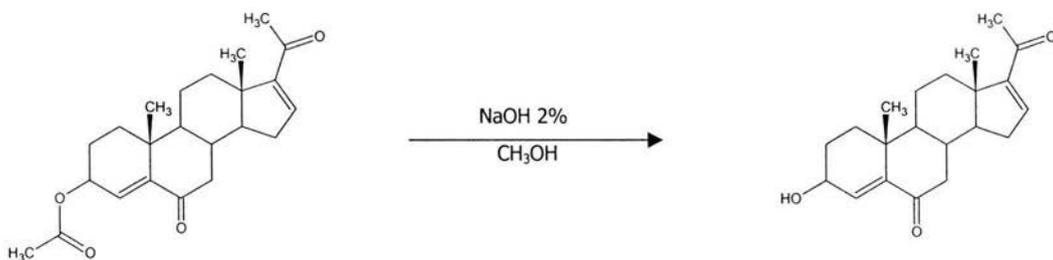


En un matraz redondo de 100 mL con una boca se disolvió 1g (2.6×10^{-3} mol) de materia prima en 32 mL de piridina. La mezcla de reacción se mantuvo en baño de hielo con agitación magnética constante. Terminado el tiempo de reacción se adicionó 1 mL de cloruro de tionilo, se mantuvo en baño de hielo por 10 minutos en agitación magnética constante, después de transcurrido el tiempo, se retiró del baño de hielo y se mantuvo a temperatura ambiente por 10 minutos en agitación constante. Terminado el tiempo de reacción, la mezcla de reacción se vertió sobre 700g de hielo-agua. Esta solución se pasó a un embudo de separación y se extrajo 3 veces con 500 mL de acetato de etilo, cada una. Las fases orgánicas resultantes se juntaron y lavaron con agua destilada hasta pH neutro. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. El producto obtenido se recrystalizó en metanol. Se obtuvo un rendimiento del 77.59% ($0.74g$, 1.99×10^{-3} mol).

CUADRO 5. PROPIEDADES FÍSICAS Y ESPECTROSCÓPICAS DE (20)

Punto de fusión	168-170°C
Peso molecular	328.445
IR (cm⁻¹)	
2945.70	Metilos y metilenos
1692.00	Carbonilo; C-6
1664.19	Carbonilo; C-20
1233.12	C-O del éster en C-3
RMN ¹H (ppm)	
0.930	Metilo; C-18
1.062	Metilo; C-19
2.070	Metilo del acetoxi en C-3
2.276	Metilo; C-21
5.370	Protón base del acetoxi en C-3
6.096	Protón vinílico en C-4
6.691	Protón vinílico en C-16

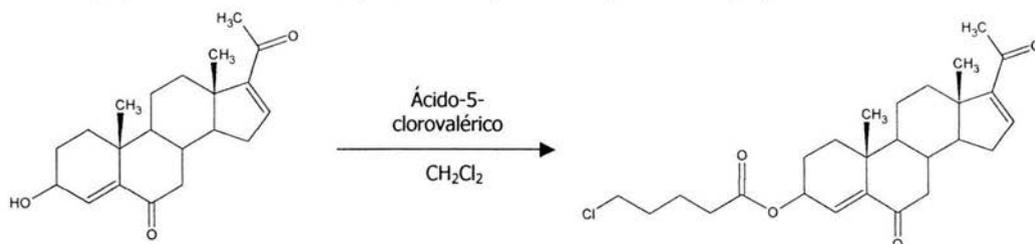
5. 3β-HIDROXI-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (21)



En un matraz de fondo redondo de 250 mL con una boca se disolvió 1g (2.7×10^{-3} mol) de materia prima en 132 mL de metanol, después se adicionaron 10 mL de NaOH al 2%. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente por 30 minutos con agitación constante. Terminado el tiempo de reacción la mezcla de reacción se vertió sobre 700g de hielo-agua y se agitó por 10 minutos. Después se filtró, lavó con agua destilada hasta pH neutro y se dejó secar a vacío. Se obtuvo un rendimiento del 60.70% ($0.54\text{g } 1.6 \times 10^{-3}\text{mol}$).

CUADRO 6. PROPIEDADES FÍSICAS Y ESPECTROSCÓPICAS DE (21)

Punto de fusión	168-170°C
Peso molecular	328.445 uma
IR (cm⁻¹)	
3430.87	Alcohol en C-3
2941.04	Metilos y metilenos
1688.51	Carbonilo; C-6
1665.74	Carbonilo en C-20
1233.93	Unión C-O en C-3
RMN ¹H (ppm)	
0.928	Metilo; C-18
1.043	Metilo; C-19
2.275	Metilo; C-21
4.251	Protón base del oxhidrilo en C-3
6.189	Protón vinílico en C-4
6.712	Protón vinílico en C-16

6. 3 β -(5-CLOROVALEROILOXI)-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (22)

En un matraz de fondo redondo de 10 mL con una boca se disolvieron 100 mg (3.04×10^{-4} mol) de materia prima en 5 mL de diclorometano. Se adicionaron 100 mg (7.35×10^{-4} mol) de ácido-5-clorovalérico, 104 mg (8.51×10^{-4} mol) de 4-N,N-dimetilaminopiridina y 60 mg (2.9×10^{-4} mol) de 1,3-diciclohexilcarbadiimida. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente por una hora con agitación constante. Terminado el tiempo de reacción, la mezcla de reacción se vertió sobre 50 g de hielo-agua. Esta solución se pasó a un embudo de separación y se extrajo 3 veces con 50 mL de cloroformo, cada una. Las fases orgánicas resultantes se juntaron y lavaron con agua destilada hasta pH neutro. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. El producto obtenido se recristalizó en metanol, obteniéndose un rendimiento del 43.23% (0.059g, 1.32×10^{-4} mol).

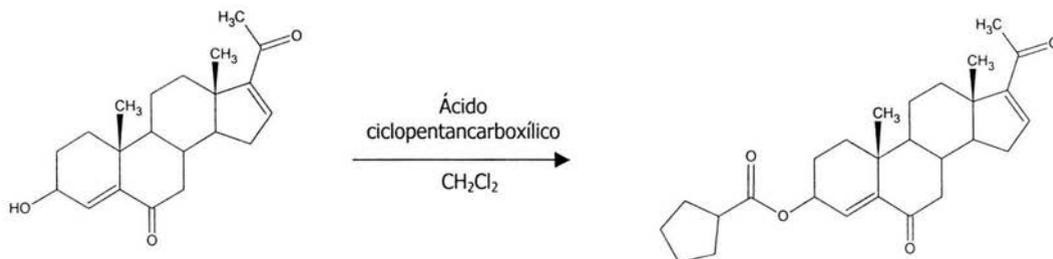
CUADRO 7. PROPIEDADES FÍSICAS Y ESPECTROSCÓPICAS DE (22)

Punto de fusión	121-123 °C
Peso molecular	446.996 uma
UV (nm)	236
IR (cm⁻¹)	
2939.04	Metilos y metilenos
1728.12	Carbonilo del éster en C-3
1687.31	Carbonilo; C-20
1662.28	Carbonilo; C-6
1232.01	C-O del éster en C-3

CUADRO 7 (CONTINUACIÓN)

RMN ¹H (ppm)	
0.931	Metilo; C-18
1.063	Metilo; C-19
2.175	Metilo; C-21
5.340	Protón base del éster en C-3
6.080	Protón vinílico en C-4
6.708	Protón vinílico en C-16
RMN ¹³C (ppm)	
201.72	C-O de C-20
196.54	C-O; C-6
172.72	Carbonilo del éster en C-3
154.85	C-17 vinílico
147.91	C-5 vinílico
143.75	C-4 vinílico
128.98	C-16 vinílico
46.18	CS' del éster
27.07	C-21
19.55	C-18
15.74	C-19
EMIE	
446	M ⁺
328	M ⁺ - (MeOH y C ₃ H ₅ Cl) Pico base

7. 3β-(CICLOPENTILCARBONILOXI)-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (23)



En un matraz de fondo redondo de 10 mL con una boca se disolvió 100 mg (2.35×10^{-4} mol) de materia prima en 5 mL de diclorometano. Después se adicionaron 100 mg (8.76×10^{-4} mol) de ácido ciclopentancarboxílico, 104 mg (8.51×10^{-4} mol) de 4-N,N-dimetilaminopiridina y 60 mg (2.9×10^{-4} mol) de 1,3-diciclohexilcarbadiimida. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente por una hora con agitación magnética constante. Terminado el tiempo de reacción, la mezcla de reacción se vertió sobre 50 g de hielo-agua. Esta solución se pasó a un embudo de separación y se extrajo 3 veces con 50 mL de cloroformo, cada una. Las fases orgánicas resultantes se juntaron y lavaron con agua destilada hasta pH neutro. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. El producto obtenido se recristalizó en metanol, obteniéndose un rendimiento del 46.4% (0.06g, 1.41×10^{-4} mol).

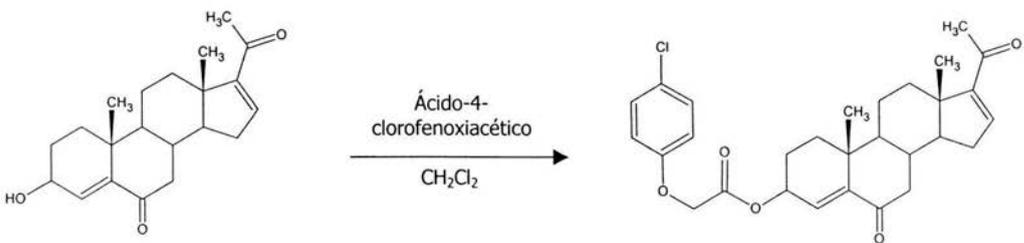
CUADRO 8. PROPIEDADES FÍSICAS Y ESPECTROSCÓPICAS DE (23)

Punto de fusión	170-172°C
Peso molecular	424.572 uma
UV (nm)	236.89
IR (cm⁻¹)	
2944.23	Metilos y metilenos
1720.86	Carbonilo del éster en C-3
1690.59	Carbonilo; C-20
1660.15	Carbonilo; C-6
1190.24	C-O del éster; C-3
RMN ¹H	
0.931	Metilo; C-18
1.064	Metilo; C-19
2.275	Metilo; C-21
2.720	Protón carbono C2'
5.328	Protón base en C-3
6.091	Protón vinílico en C-4
6.713	Protón vinílico en C-16

CUADRO 8 (CONTINUACIÓN)

RMN ¹³C	
201.76	Carbonilo; C-20
196.54	Carbonilo; C-6
176.39	Carbonilo del éster
154.86	C-17 vinílico
147.67	C-5 vinílico
143.77	C-4 vinílico
129.44	C-16 vinílico
43.49	C2' del ciclopentiléster
34.25	C3' del ciclopentiléster
25.80	C4' del ciclopentiléster
27.08	C-21
17.62	C-19
15.75	C-18
EMIE	
424	M ⁺
328	M ⁺ -(C ₆ H ₉ O) Pico base

8. 3β-(4-CLOROFENOXI)-ACETOXI-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (24)



En un matraz de fondo redondo de 10 mL con una boca se disolvió 100 mg (2.01×10^{-4} mol) de materia prima en 5 mL de diclorometano. Después se adicionaron 100 mg (5.35×10^{-4} mol) de ácido-4-clorofenoxiacético, 104 mg (8.51×10^{-4} mol) de 4-N,N-dimetilaminopiridina y 60 mg (2.9×10^{-4} mol) de 1,3-diciclohexilcarbadiimida. La mezcla de reacción se mantuvo a temperatura ambiente por una hora con agitación constante. Terminado el tiempo de reacción, la mezcla de reacción se vertió sobre 50 g de hielo-agua. Esta solución se pasó a un embudo de separación y se extrajo 3 veces con 50 mL de cloroformo, cada una. Las fases orgánicas resultantes se juntaron y lavaron con agua destilada hasta pH neutro. La fase orgánica se secó con sulfato de sodio anhidro y se concentró a presión reducida. El producto obtenido se recrystalizó en metanol, obteniéndose un rendimiento del 44.72% (0.0676g, 1.36×10^{-4} mol).

CUADRO 9. PROPIEDADES FÍSICAS Y ESPECTROSCÓPICAS DE (24)

Punto de fusión	205-207°C
Peso molecular	496.998 uma
UV (nm)	236
IR (cm⁻¹)	
2946.09	Metilos y metilenos
1756.61	Carbonilo del éster en C-3
1691.03	Carbonilo; C-20
1664.13	Carbonilo; C-6
1199.77	C-O del éster; C-3
RMN ¹H	
0.932	Metilo; C-18
1.064	Metilo; C-19
2.275	Metilo; C-21
5.472	Protón base en C-3
6.083	Protón vinílico en C-4
6.860	Protón vinílico en C-16

CUADRO 9 (CONTINUACIÓN)

RMN ¹³C	
206.88	Carbonilo; C-20
201.56	Carbonilo; C-6
196.51	Carbonilo éster en C-3
168.21	Carbono C1" del anillo aromático
156.32	C-5 vinílico
154.80	C-4" unido al halógeno del anillo aromático
127.87	C-2" del anillo aromático
126.75	C-3" del anillo aromático
148.45	C-17 vinílico
143.72	C-4 vinílico
129.43	C-16 vinílico
27.07	C-21
19.44	C-18
15.73	C-19
EMIE	
496	M ⁺
311	M ⁺ - (C ₈ H ₆ ClO ₃) Pico base

B. ENSAYO BIOLÓGICO DE LA ACTIVIDAD ANTIANDROGÉNICA

Los compuestos biológicos se evaluaron como antiandrógenos tanto *in vivo* como *in vitro*

La actividad biológica de los esteroides se determinó a través de 4 pruebas:

- 1) **Prueba de órganos del flanco**
- 2) **Determinación del peso de la próstata**
- 3) **Inhibición de la actividad de la enzima 5 α - reductasa presente en homogenados de próstata**
- 4) **La competencia por el receptor androgénico**

Las pruebas se realizaron en hámsters machos adultos de la cepa Syrian-Golden con un peso promedio de 150-200 g gonadectomizados 30 días antes de los experimentos. Los animales se mantuvieron a una temperatura controlada de 22°C, comida, agua *ad libitum* y periodos de luz-obscuridad de 12 horas.

Se utilizaron seis grupos de animales cada uno. A cada individuo se le administró por vía subcutánea una inyección diaria de 200 μ g de testosterona más 1 mg de cada uno de los esteroides a analizar disueltos en aceite de sésamo (ajonjolí) como vehículo, por 6 días. Se utilizaron tres grupos de animales como control, el primero se trató únicamente con vehículo el segundo con una solución oleosa de testosterona y el tercero con una solución oleosa de testosterona más una solución oleosa conteniendo finasterida. Después de seis días los animales fueron sacrificados bajo anestesia de éter y se obtuvieron las próstatas, las cuales fueron pesadas más tarde.

La finasterida que fue utilizada como estándar se encuentra como principio activo en el medicamento Proscar. Para obtener 150 mg de finasterida se colocaron 30 grageas de Proscar (5 mg cada uno), previamente pulverizadas, en un matraz erlenmeyer de 250 mL que contenía cloroformo. Esta mezcla se agitó por 2 horas a temperatura ambiente. Posteriormente la mezcla se filtró a vacío y el filtrado se concentró en el rotavapor. El producto crudo finasterida se purificó por CCF (cromatografía en capa fina) utilizando un sistema de elución hexano-acetato de etilo 8:2% v/v.

1. Prueba del órgano del flanco

Los órganos del flanco son estructuras pilosebáceas que forman nódulos pigmentados en la parte dorsal del hámster. En los machos, miden alrededor de 8 mm de diámetro, mientras que en las hembras miden solamente 2 mm. Estas glándulas son dependientes de andrógenos, es decir, la castración en los machos disminuye su tamaño, mientras que las inyecciones diarias de T lo regeneran. Estas estructuras han sido utilizadas para determinar el efecto de fármacos antiandrogénicos.

En este estudio se determinó el efecto de los esteroides sintetizados sobre el diámetro de la mancha pigmentada producida por inyecciones diarias de T en machos castrados. Después del tratamiento los animales fueron sacrificados bajo anestesia de éter, posteriormente se rasuraron para medir el diámetro de la mancha pigmentada de los órganos flanco. Los resultados se muestran en el cuadro 10.

Cuadro 10. Efecto de los esteroides sintetizados sobre el diámetro de la mancha pigmentada de los órganos del flanco

Grupo	Tratamiento	Diámetro del flanco (mm)
1	Vehículo	1.50 ± 0.53
2	Testosterona (T)	4.25 ± 0.85
3	T + Finasterida (F)	2.40 ± 1.30
4	T +22	2.90 ± 1.10
5	T + 23	3.00 ± 0.75
6	T + 24	3.30 ± 0.88

2. Determinación del peso de la próstata

La próstata es una glándula del aparato sexual masculino situada debajo de la vejiga urinaria y por delante del recto que envuelve la uretra y cuyo peso al llegar a la edad adulta es de unos 20 g aproximadamente. Esta glándula es dependiente de andrógenos, en los hámsters la castración disminuye el peso de esta estructura, mientras que las inyecciones diarias de T restablecen en peso.

En este experimento los animales fueron tratados con diferentes esteroides, como se indicó anteriormente, fueron sacrificados con anestesia de éter y las próstatas, fueron disectadas y pesadas. Los resultados se muestran en el cuadro 11.

Cuadro 11. Efecto de los esteroides sintetizados sobre el peso de la Próstata

Grupo	Tratamiento	Peso de la Próstata (mg)
1	Vehículo	36.6 ± 2.8
2	Testosterona (T)	75.3 ± 3.3
3	T + Finasterida (F)	59.3 ± 8.5
4	T +22	62.1 ± 6.9
5	T + 23	67.4 ± 7.1
6	T + 24	71.1 ± 9.9

3. Inhibición de la enzima 5 α - reductasa presente en homogenados de próstata

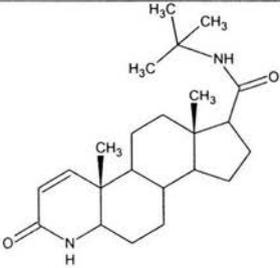
En este experimento se utilizaron las próstatas de 50 hámsters machos adultos gonadectomizados 72 horas antes del experimento. Después de estirpar y pesar las próstatas, éstas fueron homogeneizadas con una mezcla que contenía: HCl-Tris, EDTA, molibdato de sodio y glicerol, con relación al peso del tejido (3:1 v/p). Los homogenados se centrifugaron a 140,000xg durante una hora a 4°C. Posteriormente se separó la fracción microsomal (precipitado) para ser resuspendida en tres 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. Los homogenados (160 μ L de proteína equivalente a 250 μ g de proteína) fueron incubados a 37°C en baño de agua por 1 hora en presencia de testosterona tritiada (2.3 μ Ci [3 H]T equivalente a 2 nM de testosterona tritiada), 2 mM de NADPH 1 mM de ditiotreitól, una solución amortiguadora de fosfatos (40 mM, pH= 7.0), concentraciones crecientes (200 nM – 100 μ M) de los esteroides a probar (20-22) y aire.

El volumen final de la incubación fue de 1 mL. El control se incubó en las mismas condiciones pero sin tejido. La incubación terminó por la adición de diclorometano y los compuestos marcados se extrajeron con el mismo disolvente. El contenido de proteína se determinó utilizando el método de Bradford²⁸ se utilizó albúmina sérica bovina como estándar.

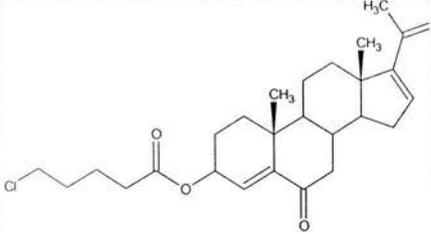
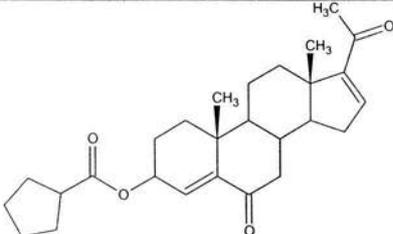
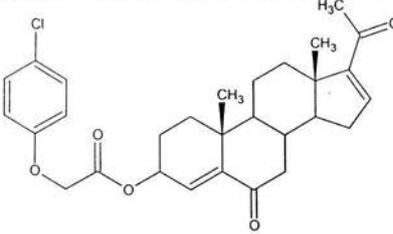
La purificación de la DHT extraída se realizó por CCF, utilizando T y DHT (5 alfa-dihidrotestosterona) como estándar de referencia. La cromatografía se desarrolló en un sistema cloroformo acetona 9:1 v/v. Los compuestos no radiactivos se identificaron en la placa de luz UV (254 nm) y con un revelador de ácido fosfomolibdico al 8% en metanol.

La zona correspondiente a la DHT ($R_f = 0.34$) se separó del cromatograma y el compuesto se extrajo con metanol. Posteriormente el disolvente se evaporó y el extracto fue resuspendido en 1 mL de metanol. Se tomaron alícuotas para determinar la radiactividad en un contador de centelleo líquido Packard modelo 3255, utilizando como solución de conteo Ultima Gold (Packard). La eficiencia del conteo fue de 64%, la pérdida de la radiactividad durante el proceso fue calculada de acuerdo a los resultados aportados por el experimento control. La concentración de finasterida y los compuesto **22** – **24** requerida para inhibirla actividad de la 5α -reductasa al 50% (IC_{50}) fue determinada de las curvas de inhibición usando diferentes concentraciones de los esteroides. Los resultados se muestran en el cuadro 13.

Cuadro 13. Inhibición de la enzima 5α -reductasa *in vitro*

Compuesto	IC_{50}^*
 <p>The image shows the chemical structure of Finasteride, a 5α-reductase inhibitor. It features a complex steroid nucleus with a dihydroquinoline ring system at the A-ring position. The B-ring has a methyl group at the 14-position. The D-ring has a methyl group at the 13-position and a propionamide side chain at the 17-position. The propionamide side chain is substituted with a trimethylamino group at the 2-position. The label 'FINASTERIDA' is centered below the structure.</p> <p style="text-align: center;">FINASTERIDA</p>	10 nM

CUADRO 13 (CONTINUACIÓN)

 <p style="text-align: center;">22</p>	10 μ M
 <p style="text-align: center;">23</p>	No presenta inhibición de la enzima 5 α -reductasa
 <p style="text-align: center;">24</p>	No presenta inhibición de la enzima 5 α -reductasa

IC₅₀* : cantidad de sustrato al cual se inhibe el 50% de la actividad enzimática

4. Análisis de competencia de los esteroides sintetizados por los receptores androgénicos

En esta prueba se analizó la competencia de los esteroides **20-22** por los receptores androgénicos localizados en las vesículas seminales (fracción citosólica) de 50 hámsters machos adultos gonadectomizados 72 horas antes del experimento.

Preparación del citosol de vesículas seminales

La homogenización del tejido se realizó con buffer de TEDAM 1:3 (20 nM Tris-HCl, pH 7.4 a 4°C, 1.5 mM de EDTA, 0.25 de ditioneitol y 10mM de molibdato de sodio) contenido en 10% v/v de glicerol. El homogeneizado se centrifugo a 140,000xg por una hora a 4°C en un rotor 60 SW Beckman Instruments. La cantidad de proteína del citosol fue determinada por el método de Bradford²⁸ utilizando como estándar albúmina sérica bovina.

Experimento de competencia por el receptor androgénico

Se incubaron por duplicado concentraciones crecientes (400 μ M – 10 mM) de los esteroides **20-22** y DHT no radiactiva con 1.365 nM de [³H] DHT (actividad específica de 110 Ci/mmol) y alícuotas de citosol (200 μ L equivalente a 264 μ g de proteína), por 18-20 horas a 4°C. Pasado el tiempo, en cada incubación se agregaron 800 μ L de una mezcla carbón-dextrán en buffer de TEDAM con la finalidad de separar la radiactividad unida de la no unida. Los tubos se incubaron en la mezcla por 45 minutos a 4°C. Cabe mencionar que el carbón-dextrán se agitó por 30 minutos previo a su adición a la mezcla. Después los tubos fueron centrifugados a 800xg por 10 minutos.

Se tomaron alícuotas de 200 μ L del sobrenadante para evaluar la radiactividad unida a los receptores. En el cuadro 14 se presenta la constante de inhibición (K_i) de la unión [3 H]DHT-receptor de cada compuesto estudiado, la cual se determinó por la siguiente fórmula de acuerdo a los procedimientos descritos por Cheng y Prusoff:²⁹

$$K_i = (IC_{50}/1) + (C/K_d)$$

A. C= concentración de la hormona marcada con radioisótopo

C= 1.365 nM

B. Kd= constante de disociación

Kd= 1.365 nM

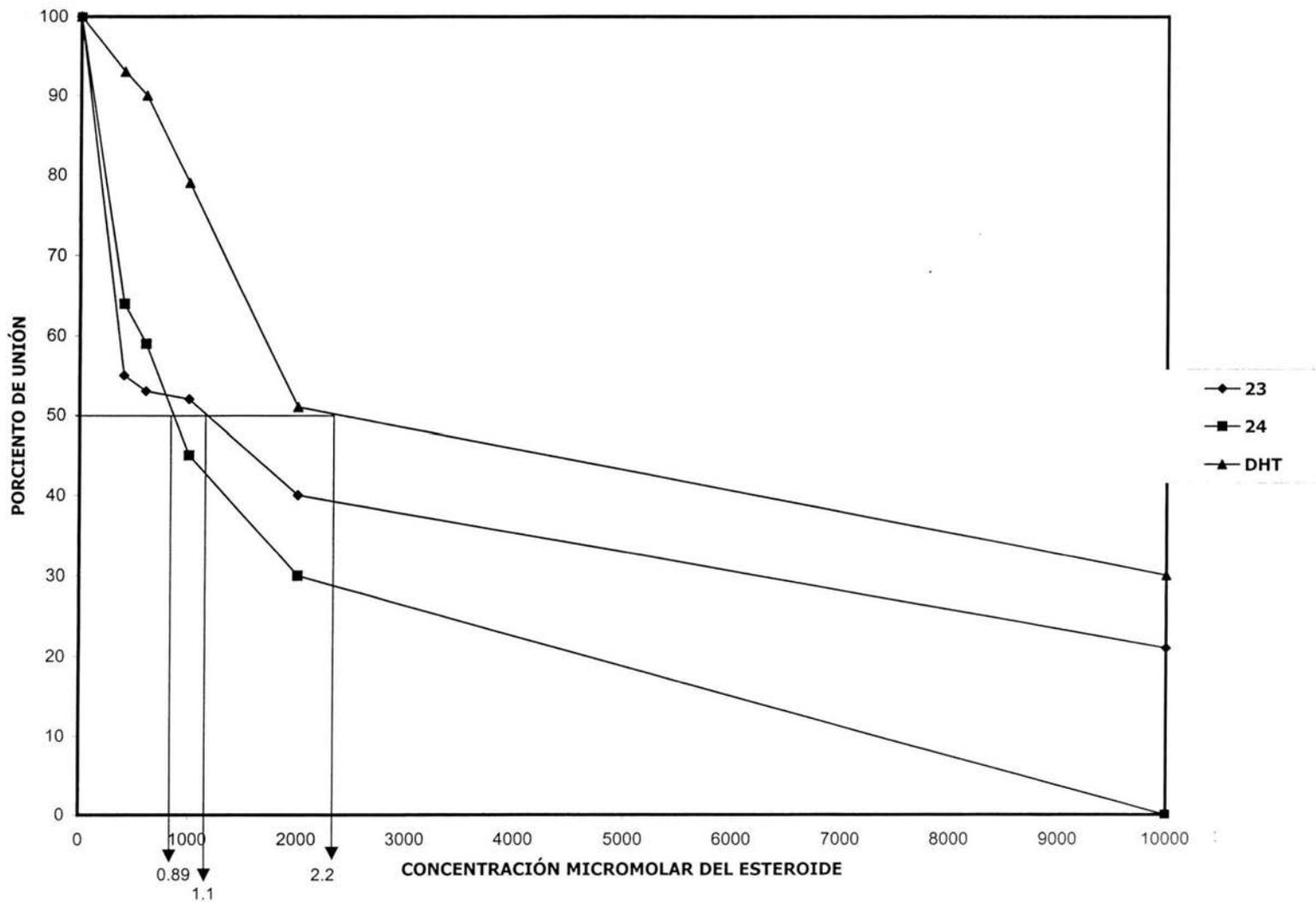
IC₅₀= concentración del esteroide necesaria para inhibir el 50% de la unión a receptores androgénicos en vesículas seminales.

Cuadro 14. Valores de la constante de inhibición (K_i) para la formación del complejo [3 H]DHT-receptor y los valores de la concentración del esteroide necesaria para inhibir el 50% (IC₅₀) de la unión a receptores androgénicos en vesículas seminales

Compuesto	K_i (mM)	IC ₅₀ (mM)
DHT	3.2	2.2
22	NA	NA
23	1.89	0.89
24	2.1	1.1

NA: no afinidad por los receptores androgénicos

GRÁFICA 1. ANÁLISIS DE COMPETENCIA DE LOS COMPUESTOS 23 Y 24 POR EL RECEPTOR ANDROGÉNICO



V. DISCUSIÓN

A. SÍNTESIS QUÍMICA

1. 3 β -ACETOXI-PRENGNA-5,16-DIEN-20-ONA (17)

Este compuesto puede ser también nombrado como acetato de 16-dehidropregnenolona (16-DPA) y constituye la materia prima. El primer paso consistió en caracterizar la materia prima, (17) mediante sus propiedades físicas y espectroscópicas, tal como se presenta en el cuadro 2. El espectro 1 de IR registró la presencia de dos señales fuertes en la zona de los carbonilos en 1729.76 cm^{-1} que corresponde carbonilo del éster en C-3 y 1661.20 cm^{-1} perteneciente al carbonilo C-20, las señales también fuertes en 1247.26 cm^{-1} y 1037.03 cm^{-1} representa la interacción C-O del éster en C-3.

El espectro 2 de RMN ^1H presentó dos singuletes intensos centrados en 0.920 ppm y 1.059 ppm que integraron para tres protones cada uno, y los cuales se asignaron a los metilos angulares C-18 y C-19 respectivamente. Los dos singuletes intensos en 2.037 ppm y 2.265 ppm corresponden a tres protones del metilo en C-21 y al metilo del grupo acetoxi en C-3. En 4.600 ppm se observó un multiplete pequeño el cual se asignó al protón base del acetoxi en C-3. En la zona de los protones vinílicos se observan dos señales, un doblete pequeño en 5.400 ppm que integra para un protón y que corresponde al protón vinílico en C-6 y un triplete en 6.700 ppm correspondiente al protón vinílico en C-16.

2. 3 β -ACETOXI-5 α -6 α -EPOXI-PRENG-16-EN-20-ONA (18)

El primer paso de la síntesis consistió en la epoxidación de la doble ligadura en C-5, dando lugar a la formación del epóxido (18) en C-5 y C-6. La reacción se realizó en cloroformo con ácido m-cloroperbenzoico. La reacción de epoxidación se efectúa mediante un ataque electrofílico del perácido sobre el doble enlace en C-5. Este producto se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas (Cuadro 3). En el espectro 3 de IR se observó una banda en 2943.71 cm^{-1} que indican metilos y metilenos. La banda fuerte en 1734.40 cm^{-1} corresponde al carbonilo del éster en C-3. La banda en 1660.50 cm^{-1} se asignó al carbonilo α,β -insaturado en C-20, las bandas en 1588.52 cm^{-1} y 1252.80 cm^{-1} corresponden al doble enlace conjugado en C-16 y al enlace C-O del grupo acetoxi en C-3 respectivamente.

En los espectros 4 y 5 de RMN ^1H se observaron tres singuletes intensos que integraron para tres protones cada uno en 0.848 ppm, 1.114 ppm y 2.013 ppm asignados a C-18, C-19 y C-21 respectivamente. El singulete intenso en 2.249 ppm correspondió al metilo del grupo acetoxi en C-3. En 2.921 ppm el singulete intenso que integró para un protón se asignó al protón base del epóxido en C-6. En 4.790 ppm se observó un singulete pequeño el cual se asignó al protón base del acetoxi en C-3, en la zona de 6.685 ppm se observó un multiplete pequeño que integró para un protón que corresponde al protón vinílico en C-16.

3. 3β -ACETOXI- 5α -HIDROXI-PRENG-16-EN-6,20-DIONA (19)

La siguiente reacción consistió en la apertura del epóxido con la formación de una cetona en C-6 y la formación simultánea del oxhidrilo en C-5. El compuesto (19) obtenido se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas (Cuadro 4). En el espectro 6 de IR se observó una banda en 3409.82 cm^{-1} indicando la presencia del alcohol que confirmó la presencia del oxhidrilo en C- 5α . Las dos señales en 1712.26 cm^{-1} y 1664.74 cm^{-1} indicaron la presencia del carbonilo del éster en C-3, el carbonilo en C-6 y el carbonilo en C-20 respectivamente. La señal en 2940.32 cm^{-1} correspondió a metilos y metilenos, la banda en 1190.24 cm^{-1} correspondió al enlace C-O del grupo acetoxi en C-3.

En el espectro 7 de RMN ^1H se observaron dos singuletes intensos en 0.844 ppm y 0.864 ppm que integraron para tres protones cada uno correspondieron a los metilos angulares C-18 y C-19 respectivamente. El doblete intenso en 2.011 ppm que integró para seis protones se asignó al metilo del grupo acetoxi en C-3 y al metilo C-21. El protón base del acetoxi en C-3 se asignó al multiplete en 5.03 ppm. Una señal doble de dobles en 6.691 ppm se asignó al protón vinílico en C-16.

4. 3β -ACETOXI-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (20)

La síntesis implicó la eliminación del oxhidrilo en C-5. Esta reacción se llevó a cabo empleando cloruro de tionilo y piridina como disolvente. El producto (20) obtenido se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas (Cuadro 5). En el espectro 8 de IR se observó una banda en 2942.70 cm^{-1} correspondiente a metilos y metilenos. La banda intensa en 1735.14 cm^{-1} indicó el carbonilo del éster C-3, la banda en 1691.47 cm^{-1} correspondió al carbonilo C-20. La señal fuerte de 1233.12 cm^{-1} se debió a la presencia del enlace C-O del éster en C-3.

En el espectro 9 de RMN ^1H se observaron dos singuletes medianos en 0.93 ppm y 1.062 ppm que integraron para tres protones cada uno los cuales corresponden a los metilos C-18 y C-19 respectivamente. Los dos singuletes intensos en 2.07 ppm y 2.276 ppm integraron para tres protones cada uno pertenecieron al metilo del acetoxi en C-3 y al metilo C-21 respectivamente. El protón base del acetoxi en C-3 se asignó al multiplete en 5.34 ppm, el doblete pequeño que integró para un protón en 6.096 ppm perteneció al protón vinílico en C-4. El doble de dobles pequeño en 6.691 ppm integró para un protón que correspondió al protón vinílico en C-16.

5. 3β -HIDROXI-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (21)

La siguiente reacción consistió en la hidrólisis básica del grupo acetoxi en C-3 con la subsecuente formación de un alcohol en C-3. La reacción se llevó a cabo en medio básico con hidróxido de sodio al 2% y metanol como disolvente. En esta hidrólisis básica de ésteres, llamada saponificación, el ion oxhidrilo ataca al grupo carbonilo del acetoxi para producir un intermediario tetrahédrico. El ácido se produce por expulsión del ion alcóxido, y una rápida transferencia de protones forma el ion carboxilato y el alcohol. Este producto (21) se caracterizó por sus propiedades físicas y espectroscópicas (Cuadro 6). En el espectro 10 de IR se observó una banda en 3430.87 cm^{-1} indicando la presencia del alcohol que confirmó el oxhidrilo en C-3, la señal en 2941.04 cm^{-1} es por la presencia de metilos y metilenos del esteroide. Las dos señales intensas en 1688.51 cm^{-1} y 1663.74 cm^{-1} correspondieron al carbonilo C-6 y al carbonilo C-20 respectivamente. La banda intensa en 1233.93 cm^{-1} correspondió a la unión C-O en C-3.

En el espectro 11 de RMN ^1H se observaron dos singuletes medianos en 0.928 ppm y 1.043 ppm que integraron para tres protones cada uno pertenecientes a los metilos C-18 y C-19 respectivamente. En 2.275 ppm se observó un singulete intenso que integró para tres protones y que corresponde al metilo C-21, el multiplete pequeño en 4.251 ppm que integró para un protón pertenece al protón base del alcohol en C-3. El doblete y doble de dobles pequeños en 6.189 ppm y 6.712 ppm que integraron para un protón cada uno, correspondió al protón vinílico C-4 y C-16 respectivamente.

6. 3β-(5-CLOROVALEROILOXI)-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (22)

El último paso consistió en la esterificación del grupo oxhidrilo del compuesto para la formación de tres ésteres. El primero de ellos es un éster 5-clorovalérico en C-3. La reacción se llevó a cabo utilizando ácido-5-clorovalérico, 4-N,N-dimetilaminopiridina, 1,3-diciclohexilcarbodiimida y diclorometano como disolvente. Para dar el compuesto (22) cuya estructura se caracterizó por sus propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas. (Cuadro 7) El espectro de UV mostró la existencia del cromóforo con λ max. 236 nm el cual corresponde a la cetona α,β -insaturada en C-16 y C-20 (dato teórico 237 nm). El espectro de IR mostró una banda en 2939.81 cm^{-1} correspondiente a metilos y metilenos. La banda fuerte en 1728.12 cm^{-1} correspondió al carbonilo del éster en C-3, las señales en 1687.31 cm^{-1} y 1662.28 cm^{-1} correspondieron al carbonilo C-20 y al carbonilo C-6 respectivamente. La señal en 1232.01 cm^{-1} correspondió al enlace C-O del éster en C-3.

En el espectro 14 de RMN ^1H se observaron dos singuletes medianos en 0.931 ppm y 1.063 ppm que integraron para tres protones cada uno pertenecientes a los metilos C-18 y C-19 respectivamente. En 2.175 ppm se observó un singulete intenso que integró para tres protones y que corresponde al metilo C-21, el multiplete pequeño en 5.340 ppm que integró para un protón pertenece al protón base del éster en C-3. El doblete y doble de dobles en 6.080 ppm y 6.708 ppm que integraron para un protón cada uno, corresponde al protón vinílico en C-4 y C-16 respectivamente.

Los espectros 15,16 y 17 de RMN ^{13}C se observaron tres señales en la zona de los carbonilos de 201.72 ppm y 196.54 ppm que pertenece a C-20 y C-6 respectivamente, en 172.72 ppm se tiene a C-1' correspondiente al carbonilo del éster en C-3. En la zona de vinílicos se observaron las señales en 154.85 ppm de C-17, en 147.91 ppm de C-5, en 143.75 ppm de C-4 y por último en 128.98 ppm de C-16. En 46.18 ppm se observó una señal correspondiente al carbono C5' halogenado del éster. En 27.09 ppm 19.55 ppm y 15.74 ppm se observaron tres señales correspondientes a los carbonos C-21, C-18 y C-19 respectivamente.

En el espectro 18 de EMIE se observó el ion molecular con una señal pequeña de 446 M^+ . También se observó una señal de 328 que corresponde a la pérdida de MeCO y $\text{C}_3\text{H}_5\text{Cl}$ que es un fragmento resultante de un rearreglo McLafferty.

7. 3β-(CICLOPENTILCARBONILOXI)-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (23)

El segundo éster es un éster ciclopentancarboxílico en C-3. La reacción se llevó a cabo utilizando ácido ciclopentilacético, 4-N,N-dimetilaminopiridina, 1,3-diciclohexilcarbodiimida y diclorometano como disolvente. Para dar el compuesto (23) cuya estructura se caracterizó por sus propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas. (Cuadro 8) El espectro 19 de UV mostró la existencia del cromóforo con λ max.236 nm el cual corresponde a la cetona α,β -insaturada en C-16 y C-20 (dato teórico 237 nm). El espectro 20 de IR mostró una banda en 2944.23 cm^{-1} correspondiente a metilos y metilenos. La banda fuerte en 1720.86 cm^{-1} correspondió al carbonilo del éster en C-3, las señales en 1690.59 cm^{-1} y 1660.15 cm^{-1} correspondieron al carbonilo C-20 y al carbonilo C-6 respectivamente. La señal de 1190.24 cm^{-1} correspondió al enlace C-O del éster en C-3.

En el espectro 21 de RMN ^1H se observaron dos singuletes medianos en 0.931 ppm y 1.064 ppm que integraron para tres protones cada uno pertenecientes a los metilos C-18 y C-19 respectivamente. En 2.275 ppm se observó un singulete intenso que integró para tres protones y que corresponde al metilo C-21, en 2.72 ppm se observó un quintuplete del protón del carbono C-2', el multiplete pequeño en 5.328 ppm que integró para un protón pertenece al protón base del éster en C-3. El doblete y doble de dobles en 6.091 ppm y 6.713 ppm que integró para un protón cada uno, corresponde al protón vinílico en C-4 y C-16 respectivamente.

En los espectros 22,23,24,25 y 26 de RMN ^{13}C se observaron dos señales en la zona de los carbonilos de 201.76 ppm y 196.54 ppm que pertenecen a C20 y C-6 respectivamente, en 176.39 ppm se observó a C-1' que corresponde al carbonilo del ciclopentiléster en C-3. En la zona de vinílicos se observaron las señales en 154.86 ppm de C-17, en 147.67 ppm de C-5, en 143.77 ppm de C-4 y por último en 129.44 ppm de C-16. En 43.49 ppm, 34.25 ppm y 25.80 ppm se observaron tres señales que correspondieron a los carbonos C2', C3' y C4' correspondientes al ciclopentiléster, respectivamente. La señal en 27.08 ppm se asignó a C-21, las señales en 19.62 ppm y 15.75 ppm correspondieron a los metilos angulares C-18 y C-19, respectivamente.

En el espectro 27 de EMIE se observó el ion molecular con una señal pequeña de 424 M⁺. En 328 se observó un pico mediano el cual se produjo por la eliminación de 96 unidades correspondientes al fragmento ciclopentilacetil del éster en C-3.

8. 3 β -(4-CLOROFENOXI)-ACETOXI-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (24)

El tercer éster es un éster 4-clorofenoxiacético en C-3. La reacción se llevó a cabo utilizando ácido 4-clorofenoxiacético, 4-N,N-dimetilaminopiridina, 1,3-diciclohexilcarbodiimida y diclorometano como disolvente. Para dar el compuesto (24) cuya estructura se caracterizó por sus propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas. (Cuadro 9) El espectro 28 de UV mostró la existencia del cromóforo con λ max.236 nm el cual corresponde a la cetona α,β -insaturada en C-16 y C-20 (dato teórico 237 nm). El espectro 29 de IR mostró una banda en 2946.09 cm^{-1} correspondiente a metilos y metilenos. La banda fuerte en 1756.61 cm^{-1} correspondió al carbonilo del éster en C-3, las señales en 1691.03 cm^{-1} y 1664.13 cm^{-1} correspondieron al carbonilo C-20 y al carbonilo en C-6 respectivamente. La señal de 1199.77 cm^{-1} correspondió al enlace C-O del éster en C-3.

En el espectro 30 de RMN ^1H se observaron dos singuletes medianos en 0.932 ppm y 1.064 ppm que integraron para tres protones cada uno pertenecientes a los metilos C-18 y C-19 respectivamente. En 2.275 ppm se observó un singulete intenso que integró para tres protones y que corresponde al metilo C-21, el multiplete pequeño en 5.472 ppm que integró para un protón pertenece al protón base del éster en C-3. El doblete y doble de dobles en 6.083 ppm y 6.860 ppm que integró para un protón cada uno, corresponde al protón vinílico en C-4 y C-16 respectivamente.

En los espectros 31,32 y 33 de RMN ^{13}C se observaron las señales en la zona de los carbonilos de 206.886 ppm y 201.564 ppm que pertenece a C-20 y C-6 respectivamente, en 196.516 ppm se tiene el carbonilo del éster en C-3. En 168.218 ppm,156.32 ppm,127.87 ppm y 126.75 ppm se observaron las señales de C-1", C-4" (unido al halógeno), C-2" y C-3" correspondientes a los carbonos del anillo aromático, respectivamente. En la zona de vinílicos se observaron las señales en 154.80 ppm de C-5, en 148.45 ppm de C-17, en 143.72 ppm de C-4 y por último en 129.43 ppm de C-16. En 27.07 ppm se observó el carbón C-21, los metilos de carbonos angulares de C-18 y C-19 se asignaron a las señales en 19.44 ppm y 15.73 ppm respectivamente.

En el espectro 34 de EMIE se observó el ion molecular con una señal pequeña de 496 M $^+$. En 311 se observó un pico que corresponde a la pérdida del 4-clorofenoxiacetiloxi unido a éster en C-3.

B. EVALUACIÓN BIOLÓGICA

1. Prueba de órganos del flanco

La prueba de los órganos del flanco de hámsters, permitió evaluar el efecto de los compuestos sobre la enzima 5α -reductasa, pues a mayor inhibición de la enzima es menor el diámetro de la mancha pigmentada de las glándulas. De acuerdo con los resultados mostrados el cuadro 11, la castración disminuye el diámetro de la mancha pigmentada de los órganos del flanco hasta un valor de 1.50 mm, mientras que la administración de testosterona regenera el diámetro de la mancha pigmentada hasta un valor de 4.25 mm. El efecto antiandrogénico de la finasterida se mostró al inhibir considerablemente el crecimiento del diámetro de la mancha pigmentada en 2.40 mm.¹⁷

Los compuestos **22** y **23** disminuyeron el diámetro de la mancha pigmentada de los órganos del flanco de manera similar que la finasterida con un diámetro de 2.90 mm y 3.0 mm respectivamente.

El compuesto **24** presentó menor inhibición del crecimiento del diámetro de la mancha pigmentada de los órganos del flanco con respecto a la finasterida.

2. Determinación del peso de la próstata

Después de la castración, el peso de la próstata decrece significativamente con respecto a las glándulas de los animales no castrados. Los resultados mostrados en el cuadro 12 demostraron que el tratamiento diario con inyecciones de testosterona a los animales gonadectomizados regeneró el peso de la próstata hasta 75.3 mg mientras que la finasterida disminuyó el peso de la próstata hasta 59.3 mg. Los compuestos **22** y **23** mostraron un efecto semejante al de la finasterida, mientras que el compuesto **24** no disminuyó el peso de la próstata.

3. Inhibición de la actividad de la enzima 5α - reductasa presente en homogenados de próstata

Se realizó el estudio metabólico *in vitro* con homogenados de próstata para conocer el efecto de transformación de T a DHT. En el cuadro 1 se muestran los resultados de esta prueba.

El compuesto **22** mostró una disminución de la transformación de la formación de T a DHT (10 mM), pero muy inferior respecto a la que presentó la finasterida (10nM). Los compuestos **23** y **24** no presentaron inhibición de la enzima 5α -reductasa.

4. Análisis de la competencia de los esteroides sintetizados por el receptor androgénico

El estudio se realizó en la fracción citosólica de las vesículas seminales de hámsters machos adultos como se describió en la parte experimental. Se analizaron los esteroides **22-24** con la finalidad de conocer si competían por los receptores de andrógenos.

Se observó que cantidades crecientes de los esteroides **22-24** [0.4 mM a 10 mM] inhibieron la formación del complejo [³H]DHT-receptor. Se determinó para cada compuesto estudiado el IC₅₀ (gráfica 1) la constante de inhibición (K_i [mM]) del complejo [³H] DHT-receptor. Los resultados se muestran el cuadro 14.

La K_i es una medida de la afinidad de los esteroides por los receptores androgénicos, pues un valor pequeño de la K_i significa menor concentración del esteroide necesaria para inhibir la formación del complejo [³H]DHT-receptor, es decir, el compuesto tendrá mayor afinidad por el receptor. A partir de los resultados mostrados en el cuadro 14 se logró establecer el siguiente orden de afinidad de los esteroides por los receptores androgénicos presentes en vesículas seminales:

Afinidad por el receptor androgénico **23>24>DHT**

Constante de inhibición (K_i) 1.89<2.1<3.2 mM

El compuesto **22** no presentó afinidad por los receptores de andrógenos, mientras que los compuestos **23** y **24** mostraron una gran afinidad, incluso superior a la que presentó la DHT.

Por otra parte, en esta prueba también se determinaron los valores de la concentración del esteroide necesaria para inhibir el 50% de la unión a los receptores androgénicos (IC₅₀). Los resultados del cuadro 14 muestran que los compuestos **23** y **24** presentaron un valor de IC₅₀ inferior al valor mostrado por la DHT, mientras que el compuesto **22** no mostró afinidad por los receptores androgénicos.

De estos estudios se puede concluir que el mecanismo de acción del compuesto **22** es a través de inhibir la actividad de la enzima 5 α -reductasa, enzima responsable de la conversión de T a su metabolito más activo que es la DHT y que es la responsable del crecimiento de la próstata.

Por otro lado los compuestos **23 y 24** se unen a receptor de andrógenos compitiendo por la T, dado que el compuesto **23** disminuye el peso de la próstata se puede decir que actúa como un antagonista del receptor de andrógenos, mientras que **24** no inhibe el peso de la próstata por lo que el resultado sugiere que es un agonista del receptor.

VI. CONCLUSIONES

Con base en los resultados obtenidos, se concluye que se logró sintetizar los compuestos finales **3 β -(5-CLOROVALEROILOXI)-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (22)**, **3 β -(CICLOPENTILCARBONILOXI)-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (23)** y **3 β -(4-CLOROFENOXI)-ACETOXI-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (24)**, a partir de la materia prima **ACETATO DE 16-DEHIDROPREGENOLONA (17)** junto con sus 4 intermediarios (18-21), los cuales se caracterizaron mediante sus propiedades físicas, espectroscópicas y espectrométricas (UV, IR, RMN ^1H , RMN ^{13}C , EMIE).

Se determinó la evaluación biológica de los nuevos esteroides (**22, 23 y 24**) a través de 4 pruebas: 1) Prueba de los órganos del flanco en hámsters machos gonadectomizados, 2) Determinación del peso de la próstata, 3) La inhibición de la actividad de la enzima 5 alfa-reductasa por los compuestos sintetizados y 4) Análisis del comportamiento de los esteroides como competidores por el receptor androgénico.

El compuesto **22** fue el único en presentar inhibición de la enzima 5 α -reductasa *in vitro*, inhibir el crecimiento del diámetro de la mancha pigmentada de las glándulas de los órganos del flanco y disminuir el peso de la próstata de manera similar a la finasterida. Sin embargo, no presentó afinidad por el receptor androgénico.

El efecto observado por los diferentes compuestos puede ser relacionado con su actividad estructura química-actividad biológica, ya que el compuesto **22** presenta una cadena lateral lineal, lo cual le confiere una mayor libertad de rotación al momento de interactuar con el sitio activo de la enzima, desafortunadamente, esta estructura no es la más indicada al momento de interactuar con el receptor androgénico, por lo cual no hay afinidad. Por el contrario, los compuestos **23** y **24** presentan cadenas laterales voluminosas y rígidas, con lo cual se puede inferir que estas modificaciones estructurales en el esteroide no son compatibles con el sitio activo de la enzima, no presentando inhibición de ésta al contacto con el esteroide, pero al interactuar con el receptor androgénico, se ve que estos compuestos muestran una gran afinidad, sugiriendo que esta estructura es muy afín a la conformación molecular del receptor, aun más que el propio metabolito natural del receptor androgénico, la DHT.

Basándonos en los resultados de la evaluación biológica, se concluye que el compuesto **22** es un inhibidor moderado de la enzima 5 α -reductasa, mientras que el compuesto **23** muestra una gran afinidad como antagonista y el compuesto **24** como agonista del receptor androgénico, y por lo tanto, estos compuestos pueden ser una opción disponible para la obtención de diversos productos con elevada actividad antiandrogénica que sirvan como fármacos para el tratamiento de padecimientos como lo son el cáncer de próstata y la hiperplasia prostática benigna.

VII. BIBLIOGRAFÍA

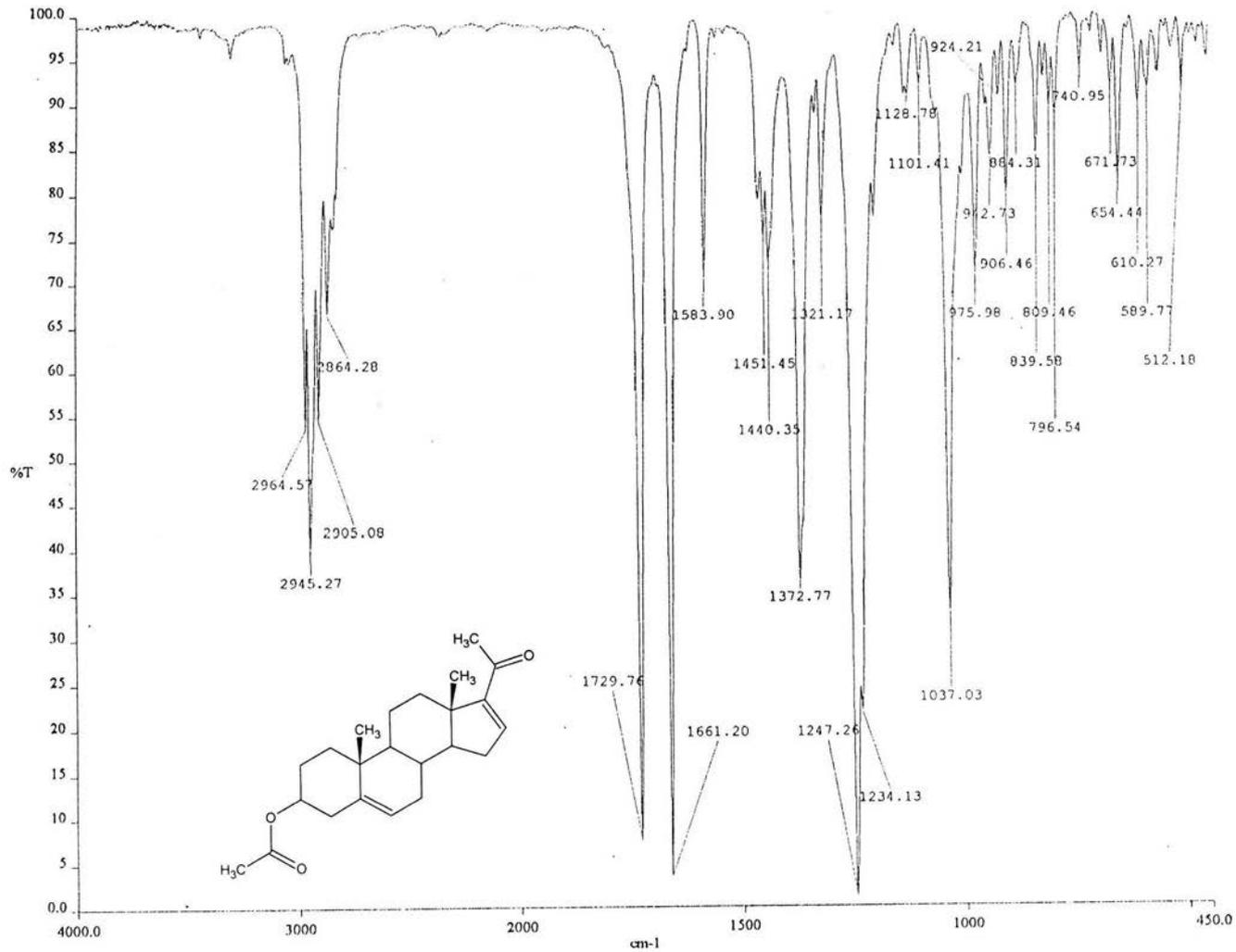
1. GUYTON C.A. HALL E. J. **Tratado de Fisiología Médica**. McGraw-Hill- Interamericana. 9ª Edición . México D.F. 1999,.pag. 1009
2. USTOO International, Inc. **Prostate Cancer Support Groups**. New York, 1999. <http://www.ustoo.com/cht.html>
3. <http://www.tuotromedico.com/preguntas/pefsah.htm>
4. Microsoft Encarta. The Completa multimedia Encyclopedia. **Prostate Cancer**. 1993-1998 Edition. pp 1-4
5. Catalona, W.J. and Scott, W.W. **Carcinoma of the Prostate in Walsh**, P.C., et al.(eds) Cambell's Urology. 5ª Ed. Saunders Co. Philadelphia 1983. pp 1463
6. <http://www.medicinaestetica.tv/textos/dermoc cosmetica/2000-alopecia.htm>
7. Anderson S. and Rusell D.W. **Proc Natl. Acad. Sci. USA** (1990), 3640-3644, pp 87
8. Martínez A. **17- α -hidroxi-16- β -metil-4,6-pregnadien-3,20 diona como un intermediario en la síntesis de andrógenos**. Tesis de licenciatura. Facultad de Química. UNAM.1997
9. Holum J.R. **Principios de Fisicoquímica, Química Orgánica y Bioquímica**. Ed. Limusa. México D.F. 1986. pp 511-515
10. Orten, J.M. – Neuhaus, O.W. **Bioquímica Humana**. Editorial Panamericana. Argentina 1984. pp. 644-648
11. Grover, C. **The role of the cytochrome P-450 in steroidogenesis and propieties of zone of the steroids tranforming enzymes in biochemistry of steroids hormones**. Mankin H. Balckwell Sci. Pub. 2ª Ed. pp. 230-292
12. Brooks, R. **Androgens: Physiology and Pathology in Biochemistry of steroidal hormones**. Ed. Mankin H. Balckwell Sci. Pub. 2ª edición. pp 565-594.
13. Raynoul, J. Fiet. Et al. **Desing of antiandrogens ahd their mechanism of action: A case study (Anandron)**, Hormone Res. (1987). 230-241
14. Wilson , J. D. **Recent studies on the mechanism of the action of the testosterone**. New Eanglad J. Med. (1972). 287, 1284
15. Kochakian, C.D. Arimasa, N. **The metabolism in vitro of Anabolic Androgenic Steroids by Mammalian Tissues**. Handb. Exp. Phamakol. 1997, 287, 359
16. Keeke, C.A. and Neil. E. Samson. **Wrightt´s Applied Physiology**. Ed. Oxford University press. 11 ed. London 1965
17. Litter M. **Farmacología experimental y clínica**. Ed. El Ateneo. 7ª edición.Argentina 1988

18. Calderon D., Labra N., Hernández J.L., Barragán G., Bratoeff, E., Ramírez E. **Antiandrógenos más usuales. Reflexiones sobre la síntesis orgánica.** Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. Vol. 28. No. 1 México 1997. 24-29.
19. Calderón D. Labra N. Hernández J.L. Barragán G. Bratoeff E. Ramírez. **Antiandrógenos más usuales. Reflexiones sobre síntesis orgánica.** Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas. Vol 28. No. 1 México 1997. 24-29
20. Ellil C. **Ketoconazole binds to the human androgen receptor.** Horm. Metab. Res. (1992). 367, 370, pp 38
21. Biffignandi, P. et. al. **Antiandrogens and hirsustim.** *Hormone Res* (1987). 242-249, pp 28
22. Bull H. García M. Anderson S. **Mechanism based inhibition of human steroid 5 α -reductase by finasteride.** J. Am. Chem. Soc. (1996). 2359-2365.
23. Migally N. **Effect of LHRH on cyproterone acetate injected adenohipophysis of castrated mice.** Archives of andrology. (1982). 247-250
24. Doon, F Becker. H. **Effect of Flutamide of cyproterone in comprisión to flutamide on the ventral prostate of adulte male castrated.** Copenhagen-Fisher rats on Dunning B-3327H tumors. *Andrologia.* (1989). 462-467
25. Mukherjee M. et al. **Effect of Flutamide on the physiological status epididimys and epididymal sperms.** *Andrología.* (1992).24,113-116.
26. Bratoeff. E. Trejo A. Hernández. J. Sánchez P. **Síntesis de derivados del pregnano con un grupo metilo en posición-16.** Revista Mexicana de Ciencias Farmacéuticas (1992).6-22, 14-18
27. Cabeza M. Quiroz A. Bratoeff E. Murillo Ma. E. Ramírez E. Flores G. **Síntesis and Pharmacological Evaluation of 6-Halo Progesterone derivatives as Antiandrogen.** *Chem. Bull.* (1999). 9-47, 1232-1236.
28. Bradford M. **A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantites of protein-dye binding.** *Biochem.*(1986), 72, 248-250.
29. Cheng Y. C. Prusoff W. H., *Biochem. Pharmacol.* **22**, 3099-3108 (1973)

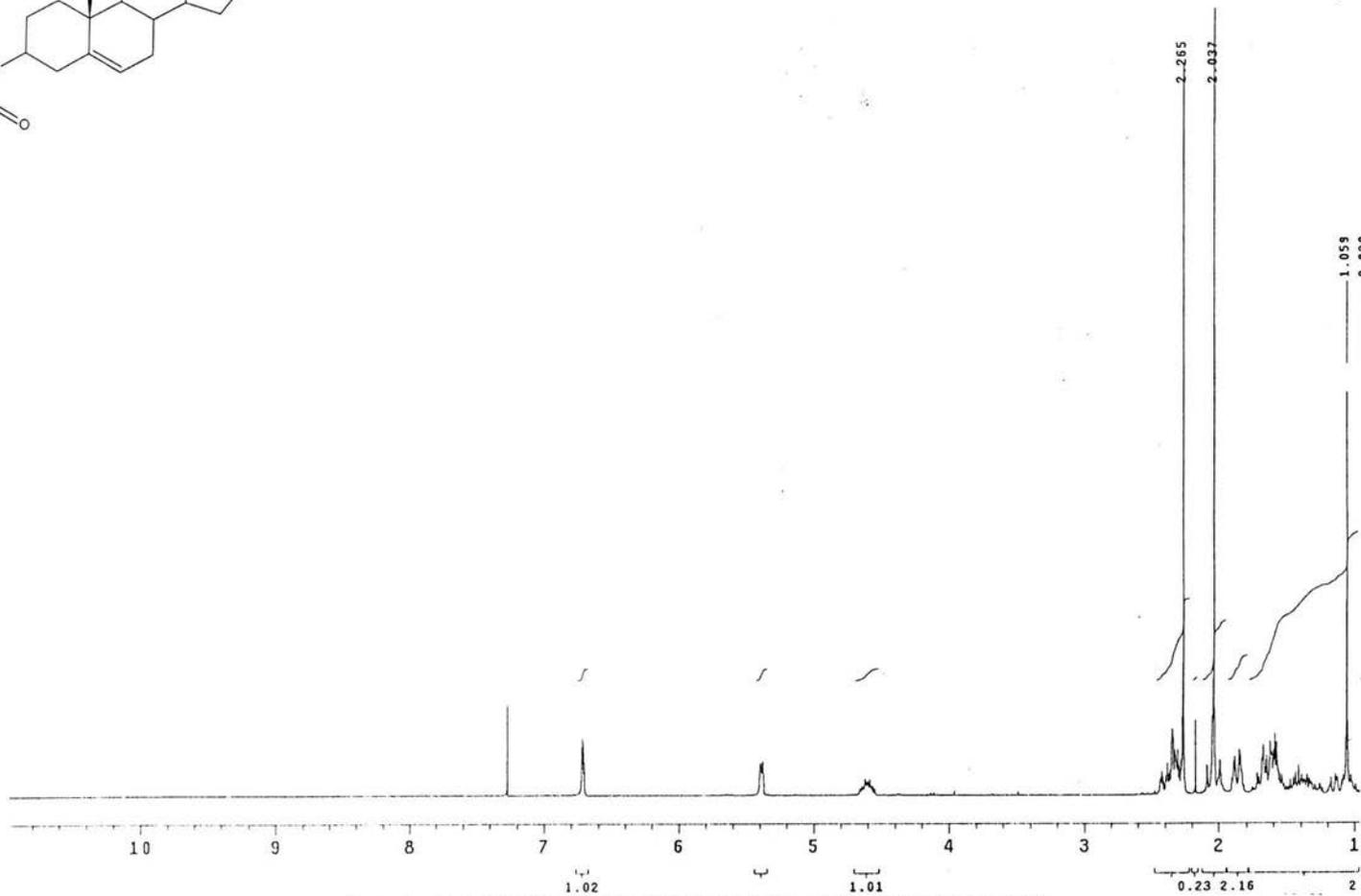
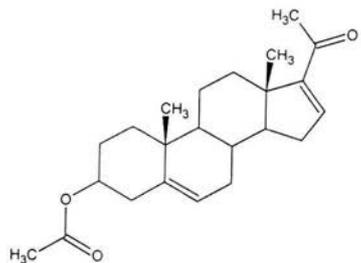
**ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA**

ANEXO 1

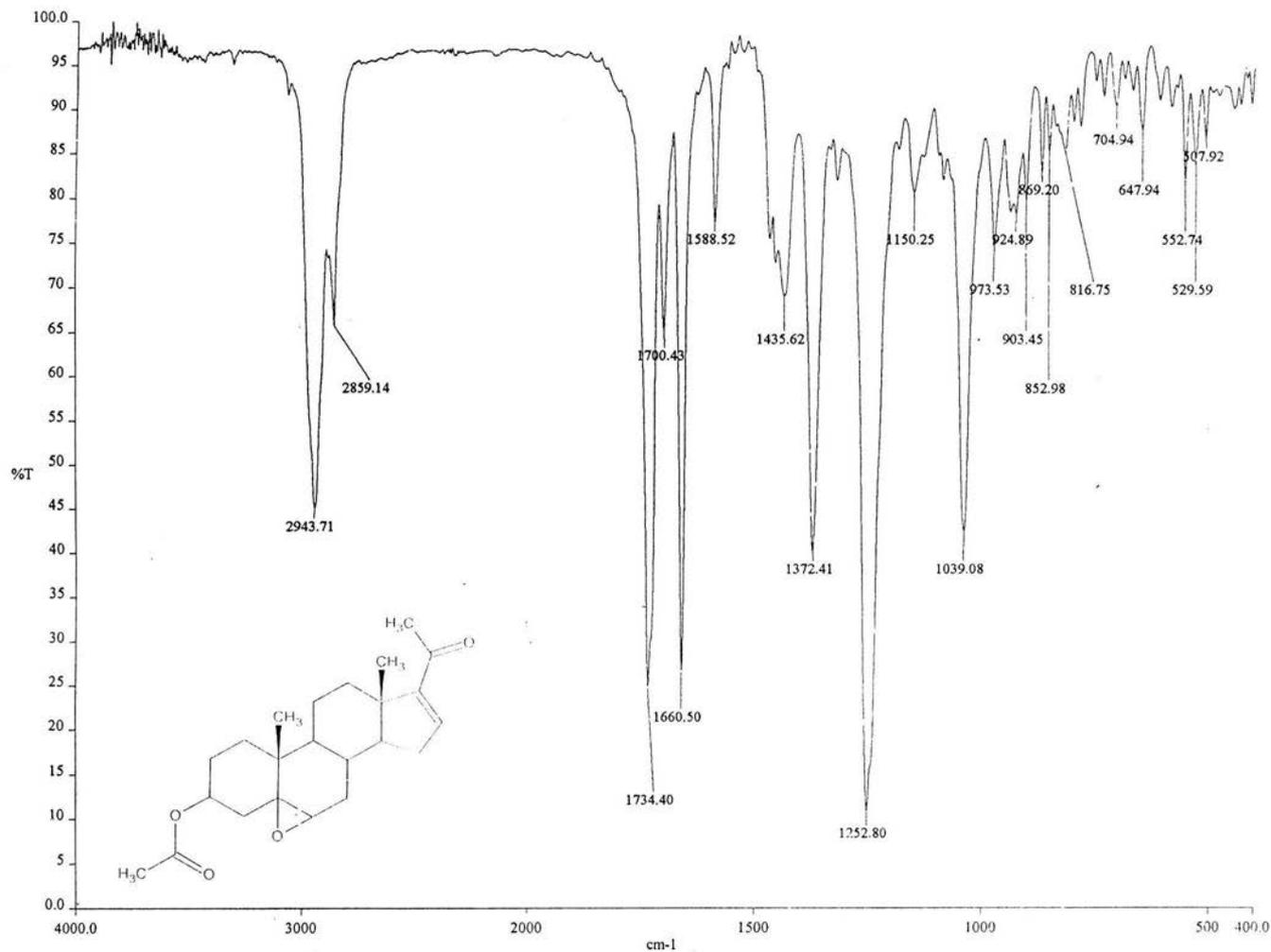
ESPECTROSCOPIA



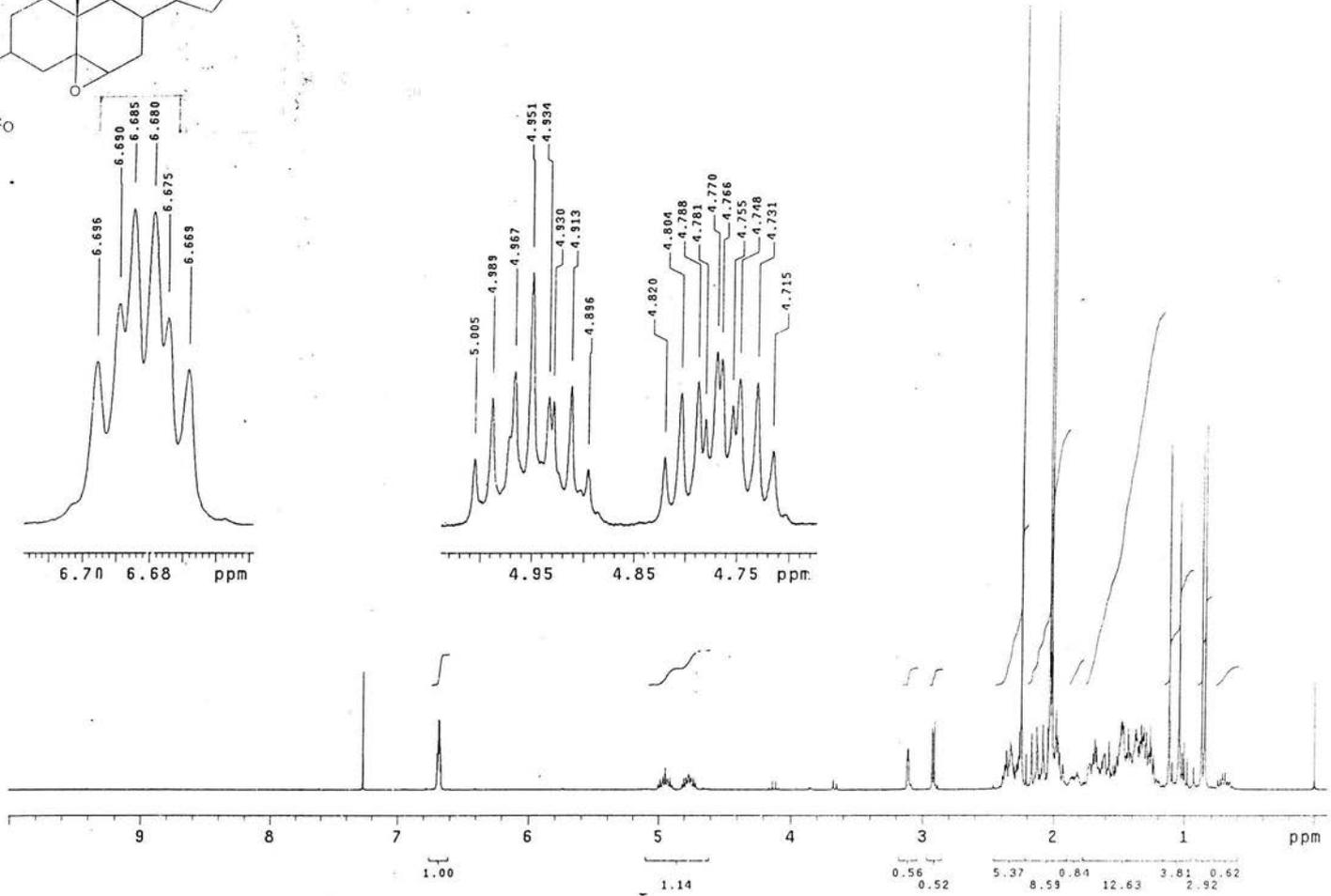
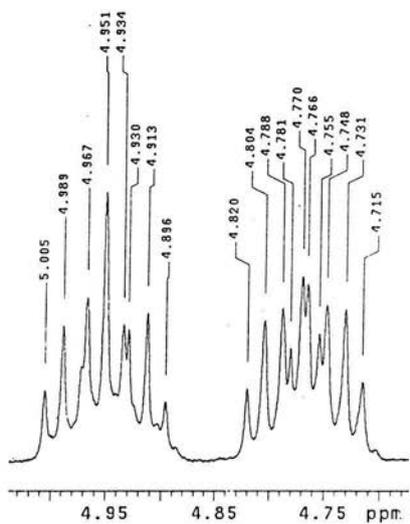
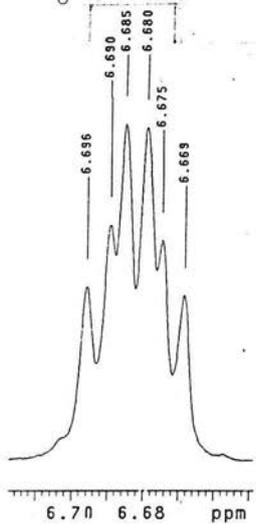
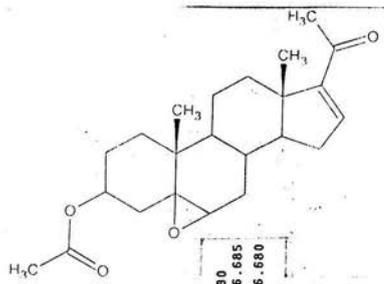
Espectro 1 de IR. 3β-ACETOXI-PRENGNA-5,16-DIEN-20-ONA (17)



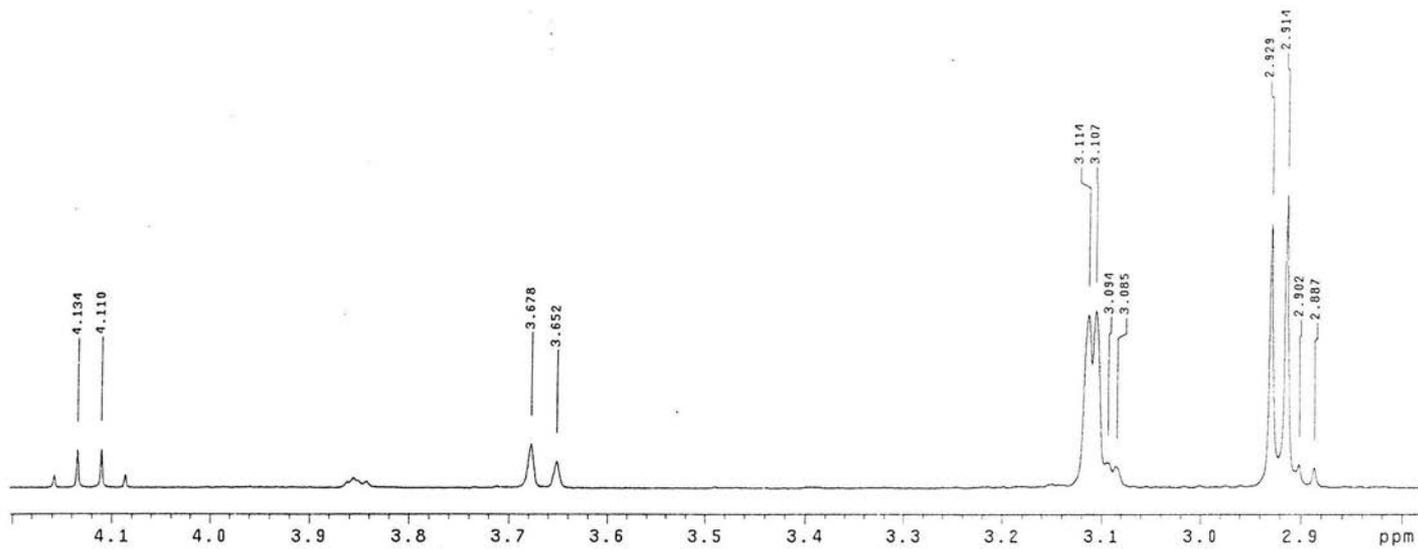
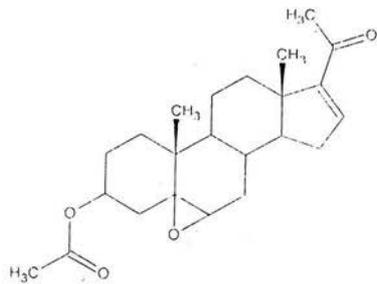
Espectro 2 de RMN¹H. 3β-ACETOXI-PRENGNA-5,16-DIEN-20-ONA (17)



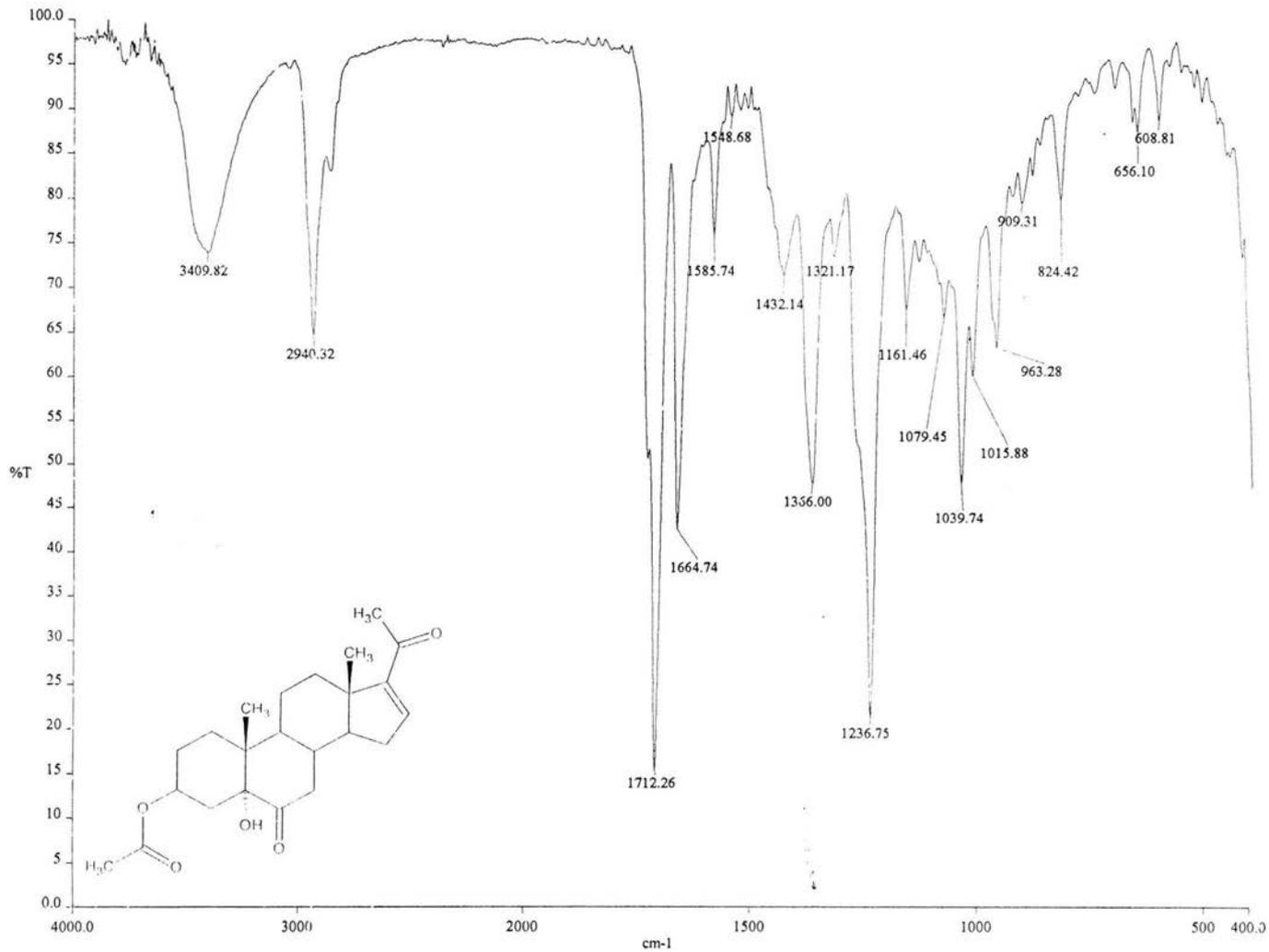
Espectro 3 de IR. 3β-ACETOXI-5α-6α-EPOXI-PRENG-16-EN-20-ONA (18)



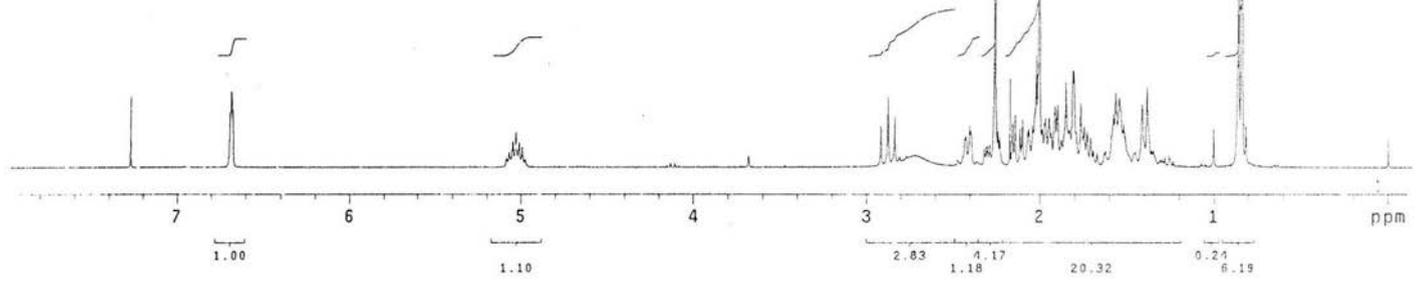
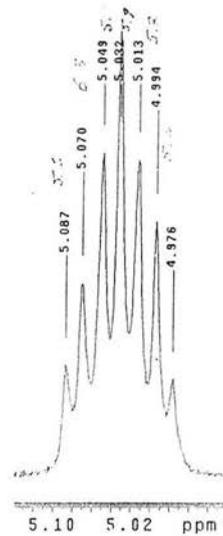
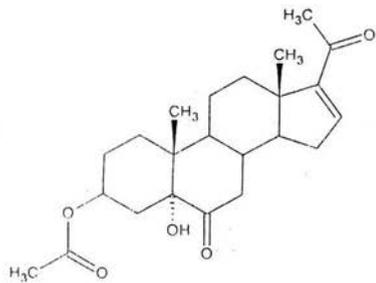
Espectro 4 de RMN¹H. 3β-ACETOXI-5α-6α-EPOXI-PRENG-16-EN-20-ONA (18)



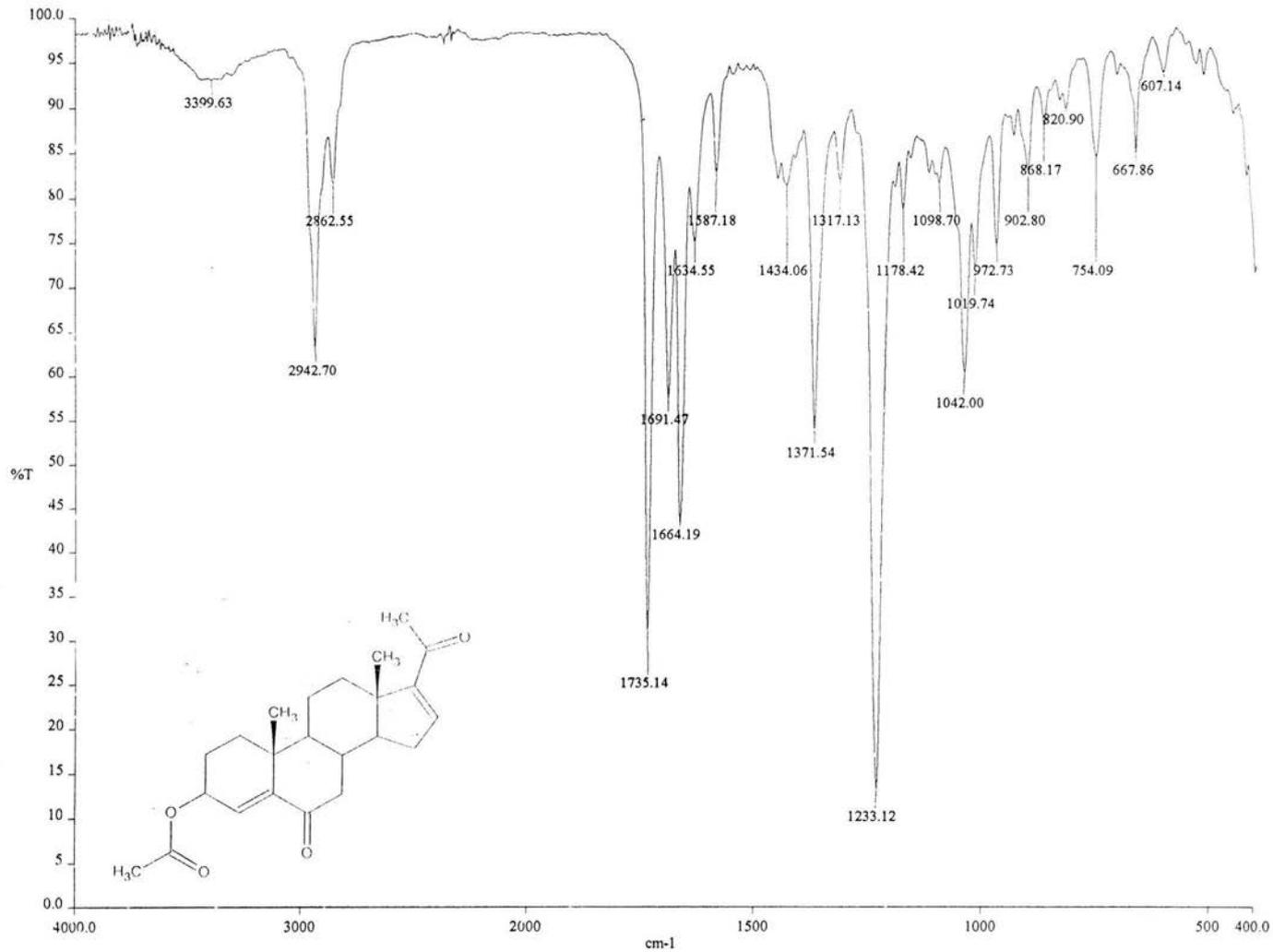
Espectro 5 de RMN¹H. 3β-ACETOXI-5α-6α-EPOXI-PRENG-16-EN-20-ONA (18)



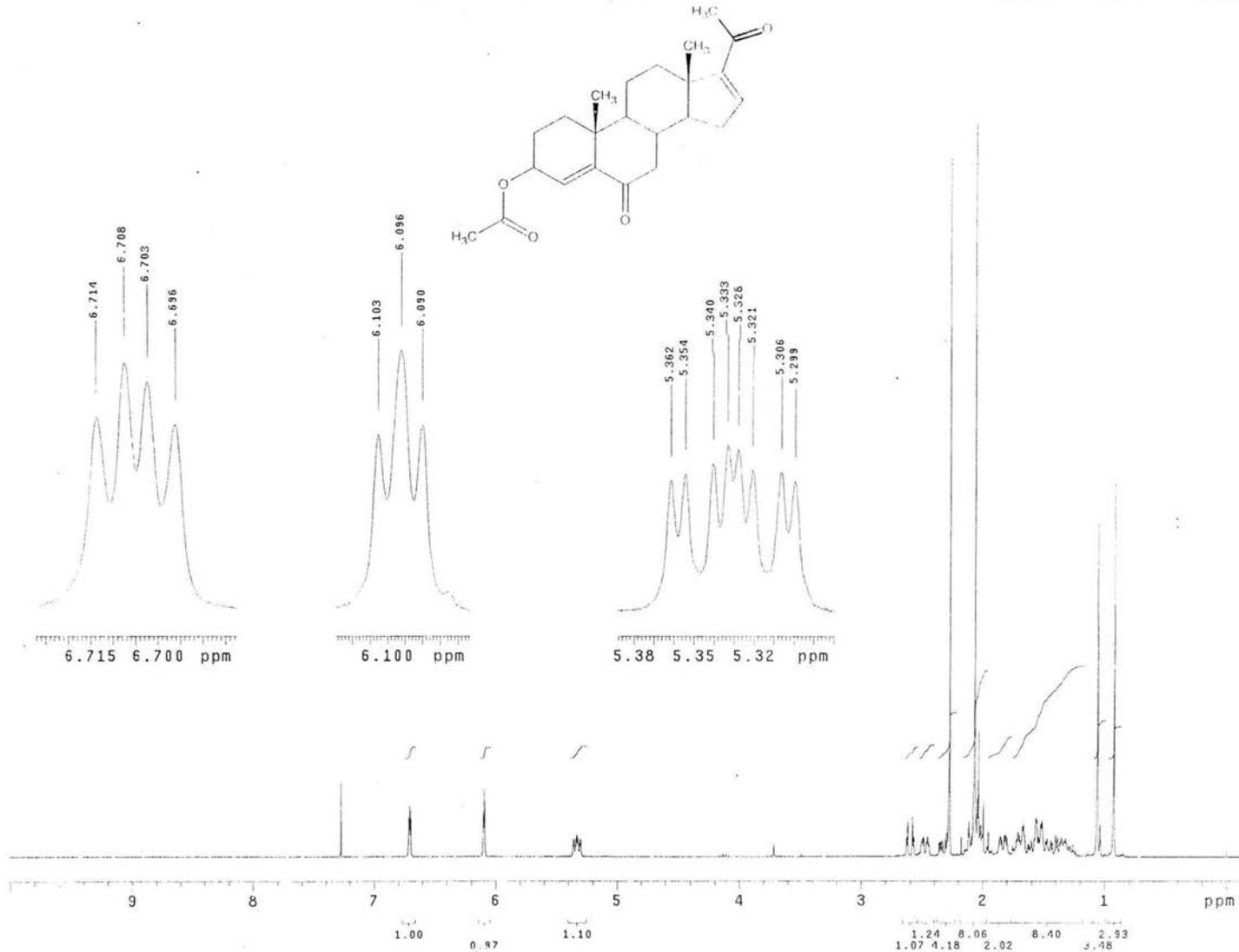
Espectro 6 de IR. 3β-ACETOXI-5α-HIDROXI-PRENG-16-EN-6,20-DIONA (19)



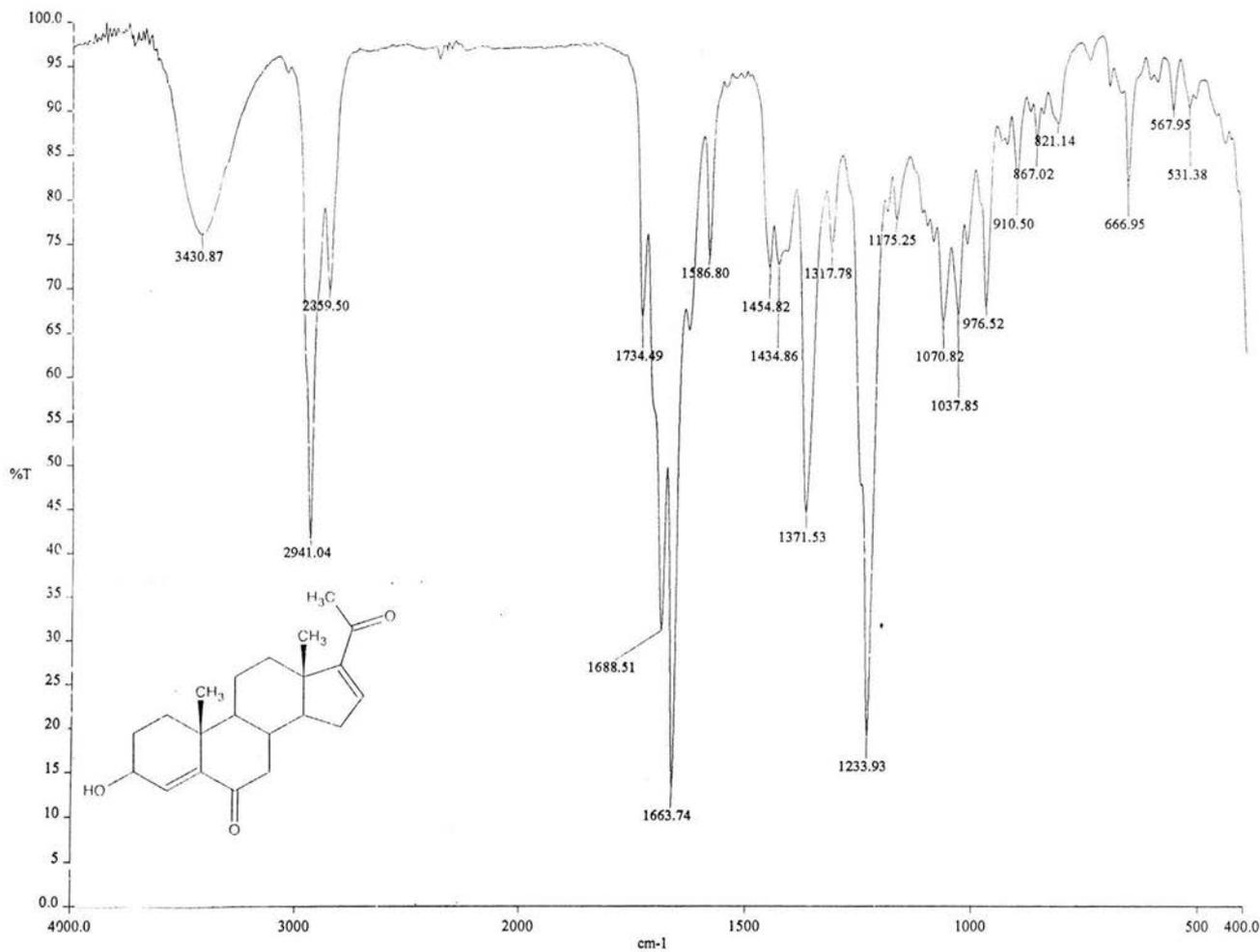
Espectro 7 de RMN¹H. 3β-ACETOXI-5α-HIDROXI-PREG-16-EN-6,20-DIONA (19)



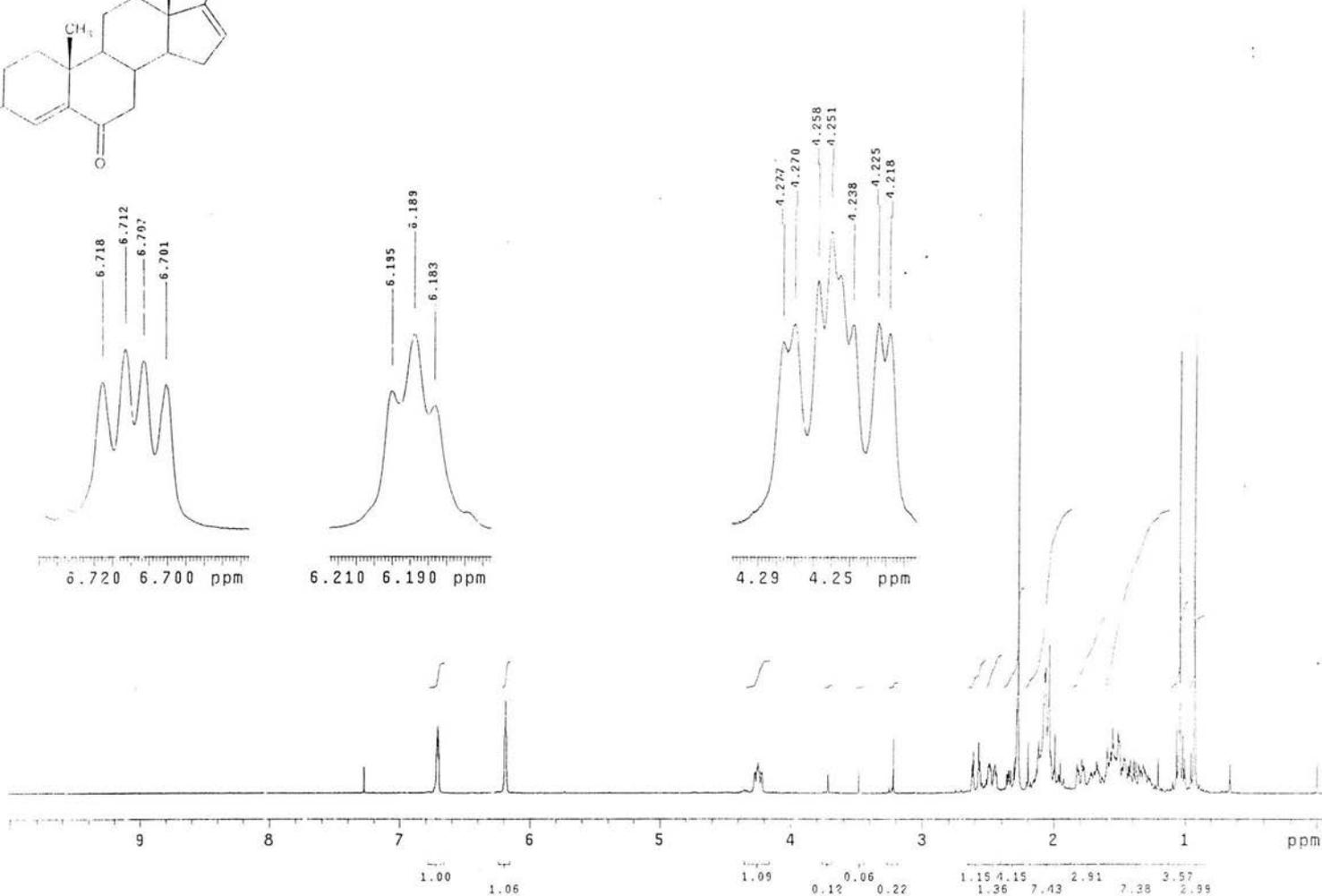
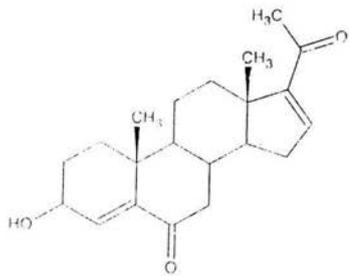
Espectro 8 de IR. 3β-ACETOXI-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (20)



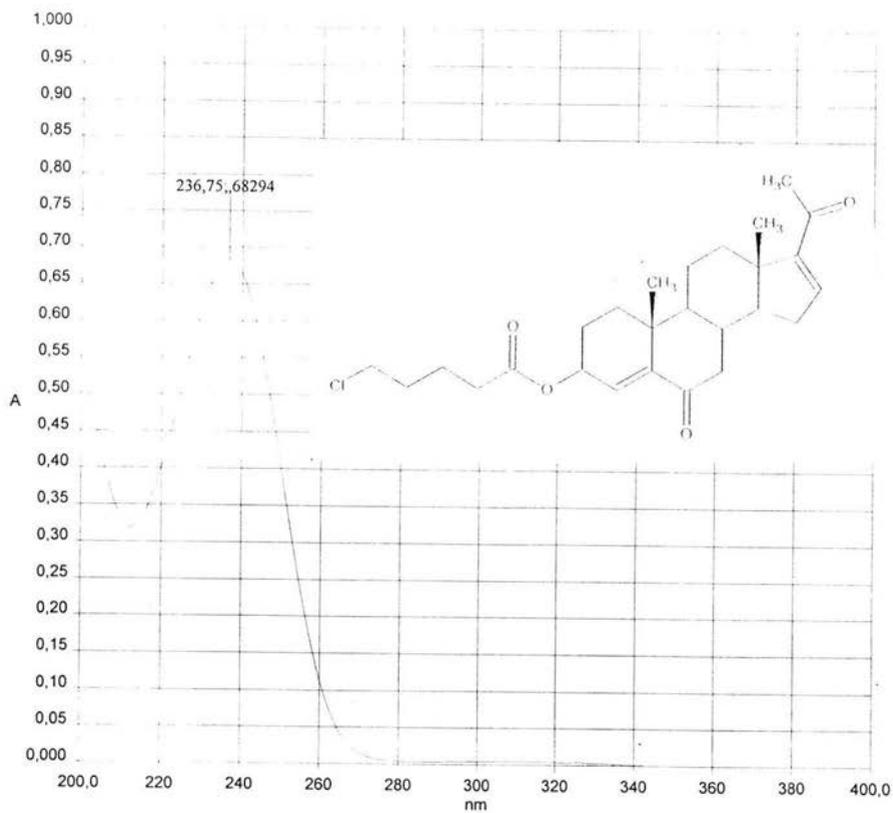
Espectro 9 de RMN¹H. 3β-ACETOXI-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (20)



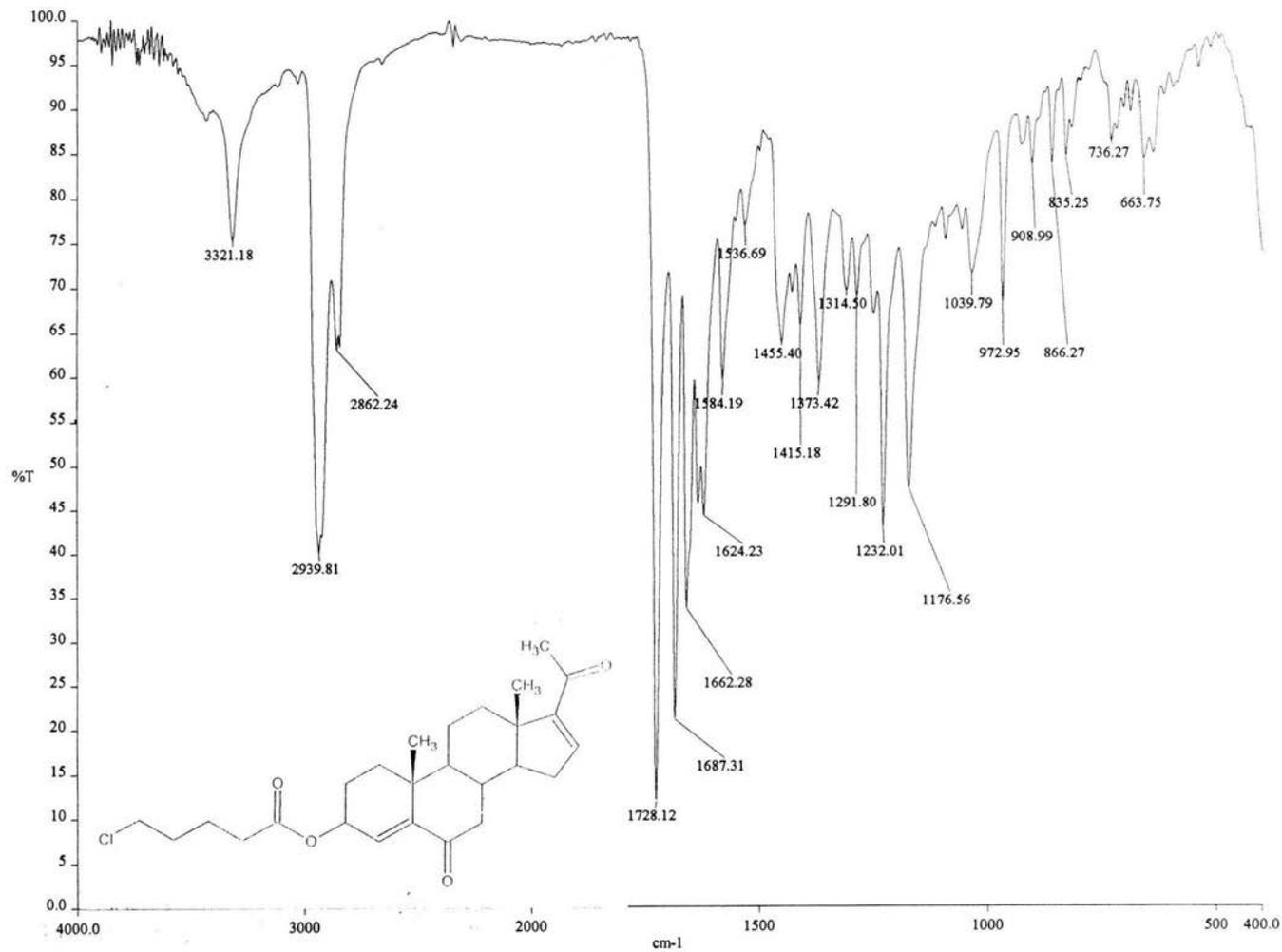
Espectro 10 de IR. 3β-HIDROXI-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (21)



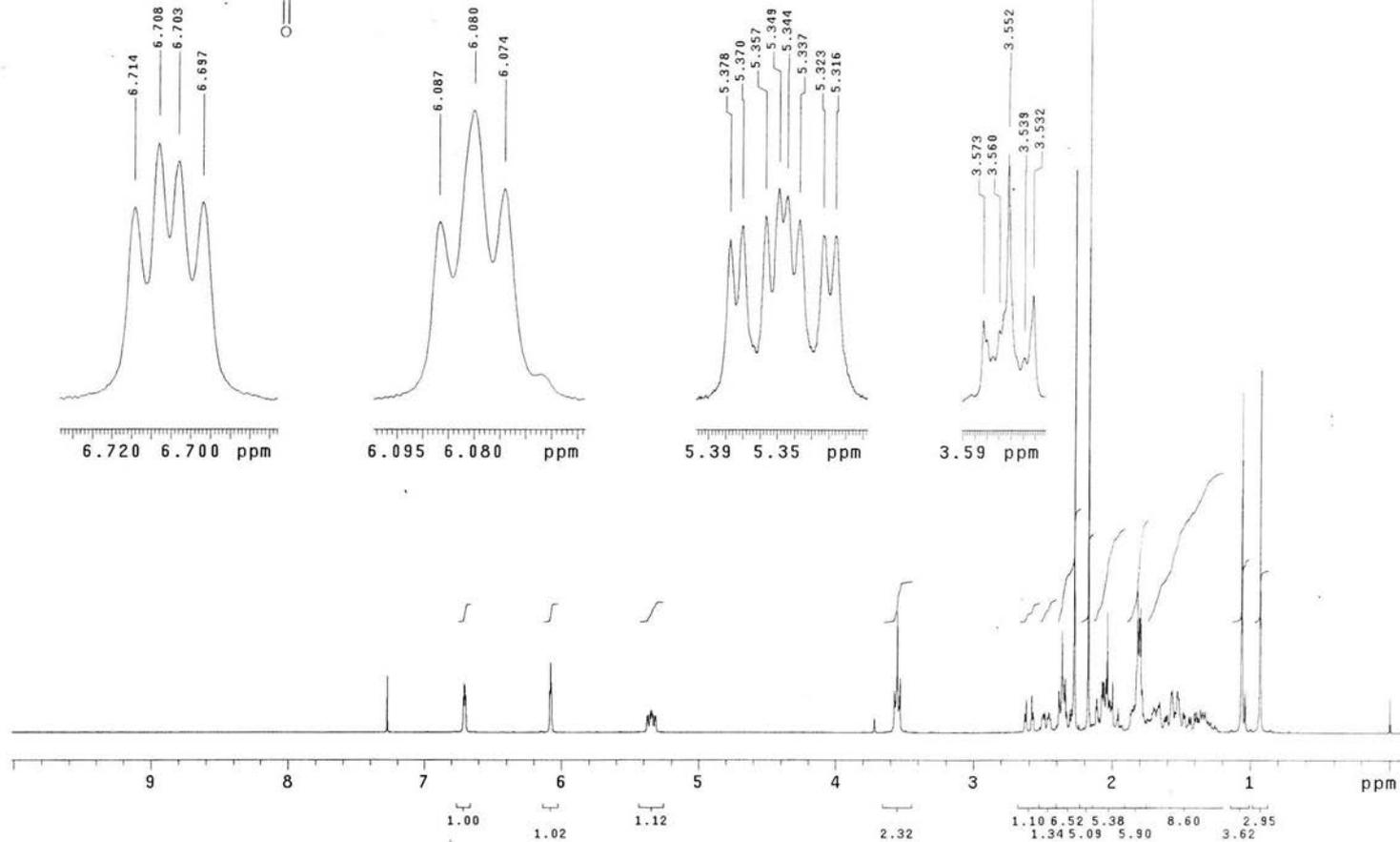
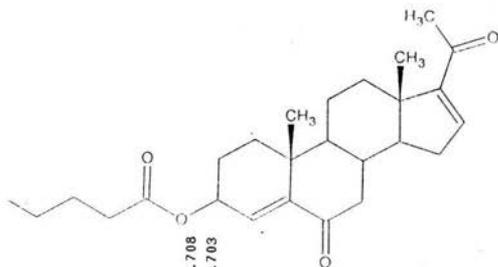
Espectro 11 de RMN¹H. 3β-HIDROXI-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (21)



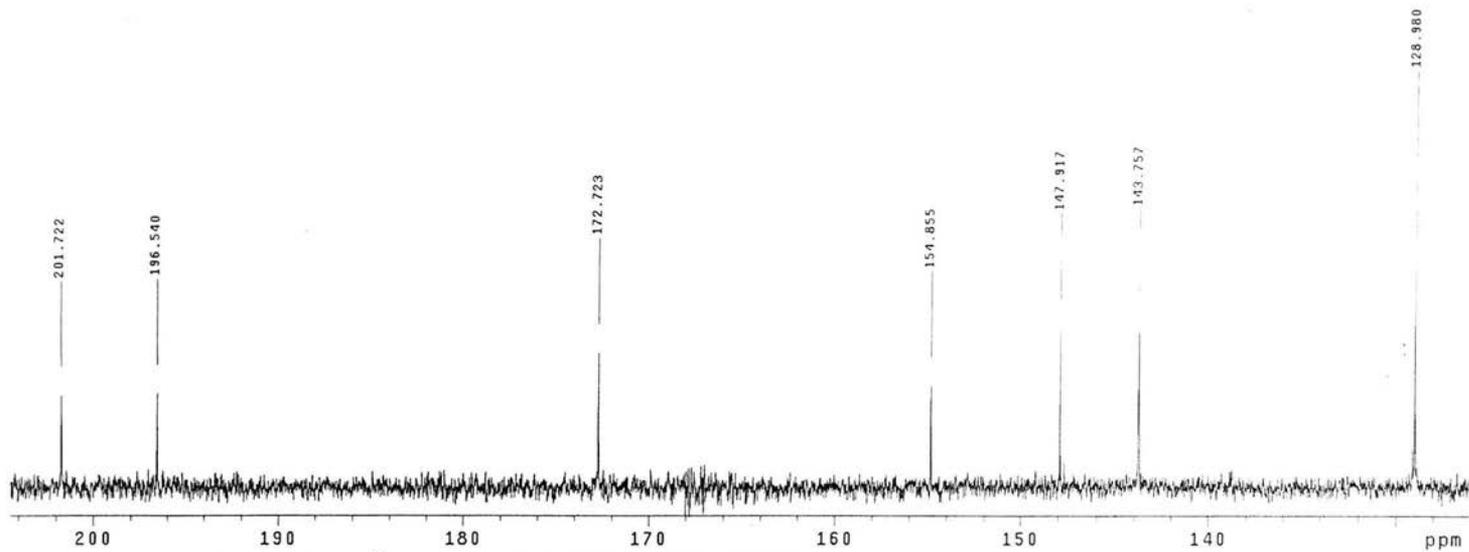
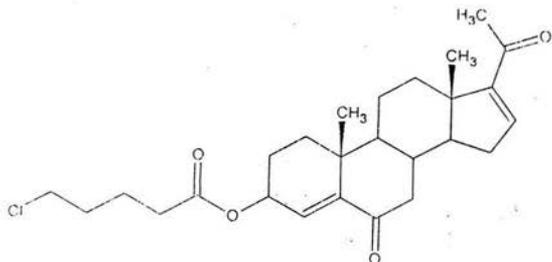
Espectro 12 de UV. 3β-(5-CLOROVALEROILOXI)- PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (22)



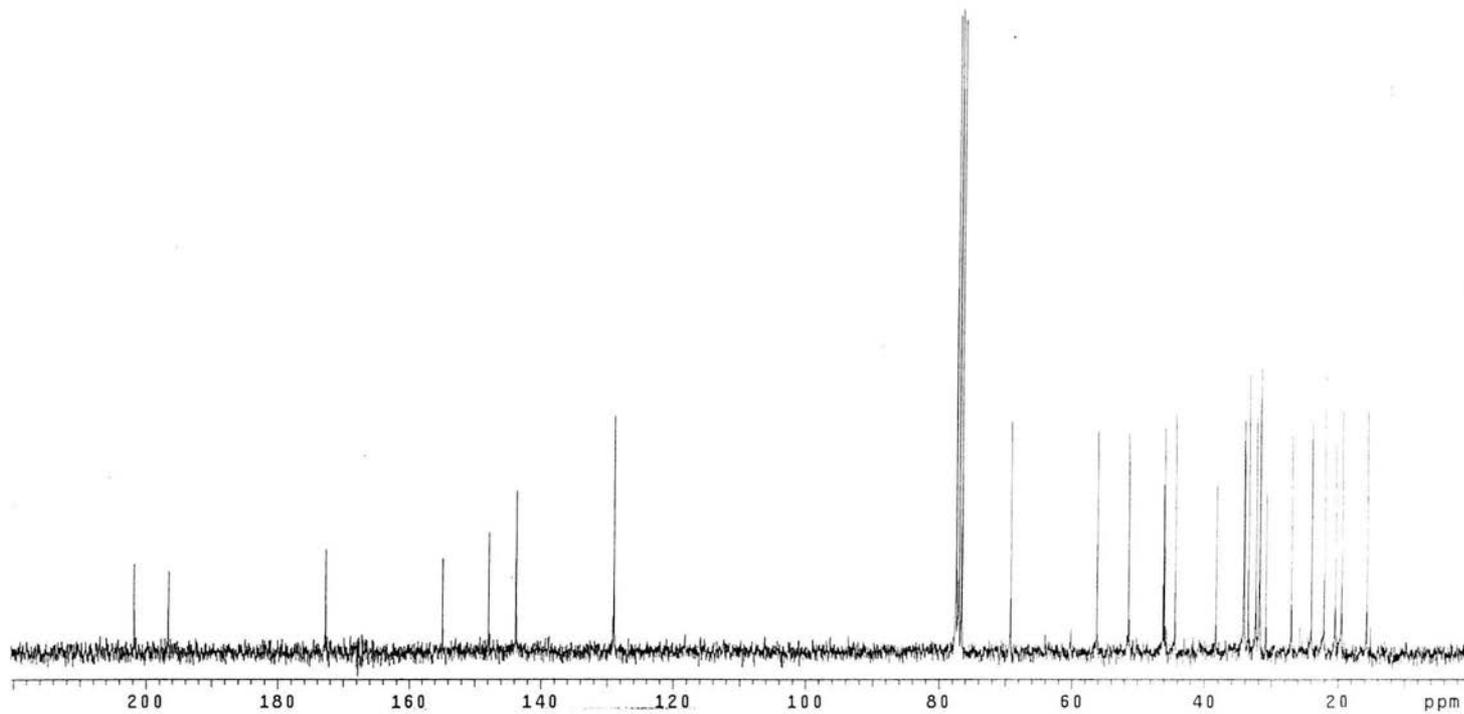
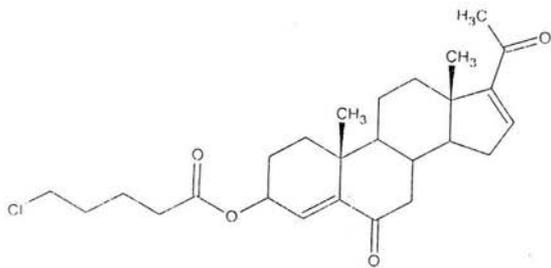
Espectro 13 de IR. 3β-(5-CLOROVALEROILOXI)- PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (22)



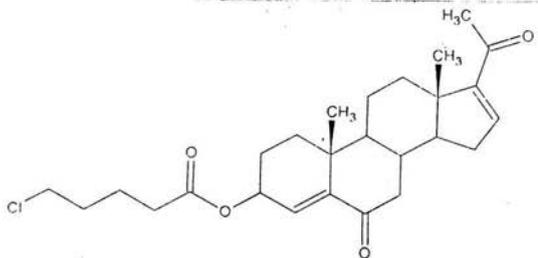
Espetro 14 de RMN¹H. 3β-(5-CLOROVALEROILOXI)- PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (22)



Espectro 15 de RMN ¹³C. 3β-(5-CLOROVALEROILOXI)- PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (22)



Espectro 16 de RMN ^{13}C . 3β-(5-CLOROVALEROILOXI)- PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (22)



CH3 carbons



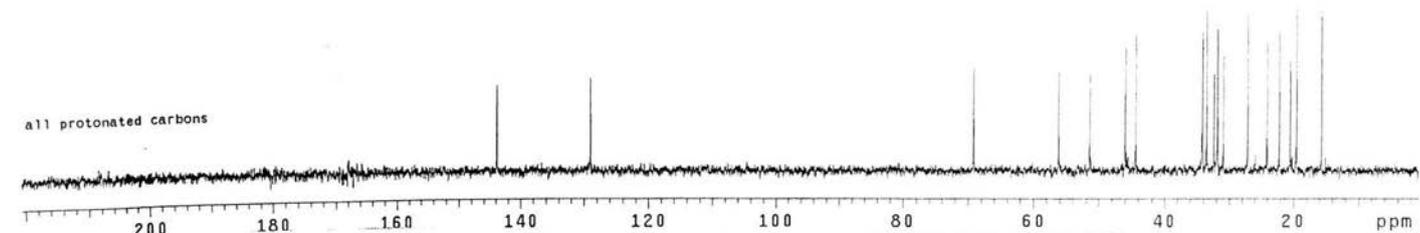
CH2 carbons



CH carbons

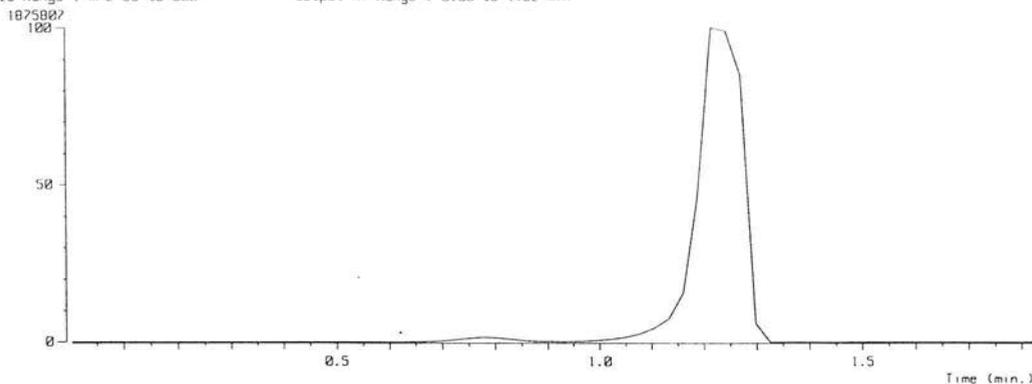


all protonated carbons

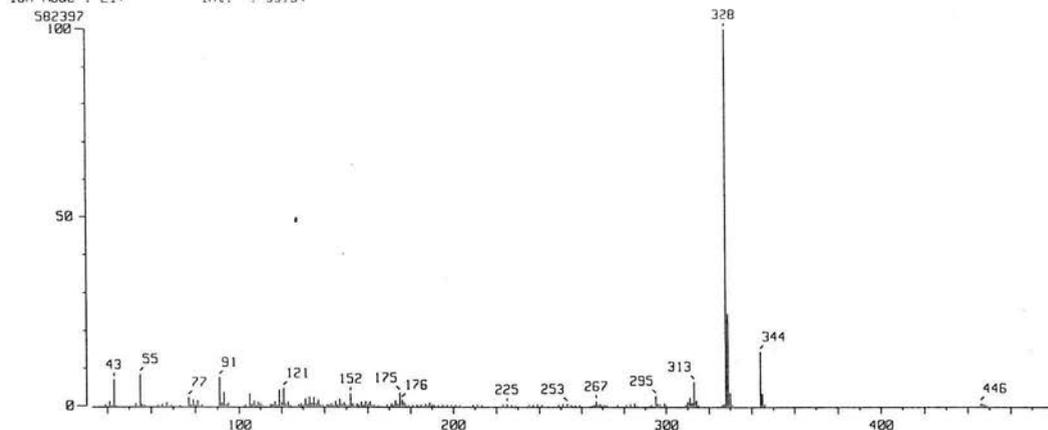


Espectro 17 de RMN ¹³C. 3β-(5-CLOROVALEROILOXI)- PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (22)

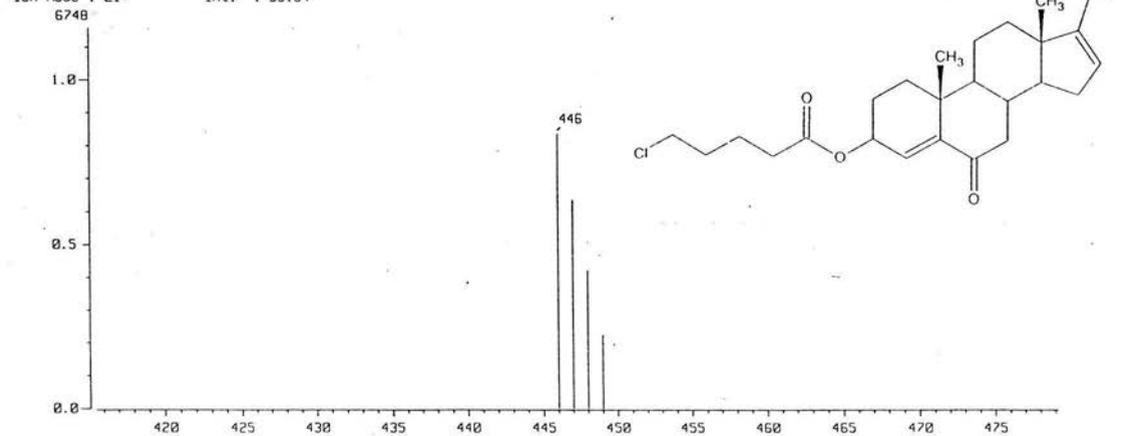
[TIC]
 Data : OT5943_ES-5-CL_001 Date : 18-Feb-103 12:33
 Sample:
 Note : USRI, Fac. de Química, UNFM.
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+
 Ion Species : Normal Ion [MF-Linear]
 TIC Range : m/z 33 to 800 Output RT Range : 0.00 to 1.82 min



[Mass Spectrum]
 RT : 1.24 min Scan# : (45,47) Temp : 6.4 deg.C
 Ion Mode : EI+ Int. : 55.54



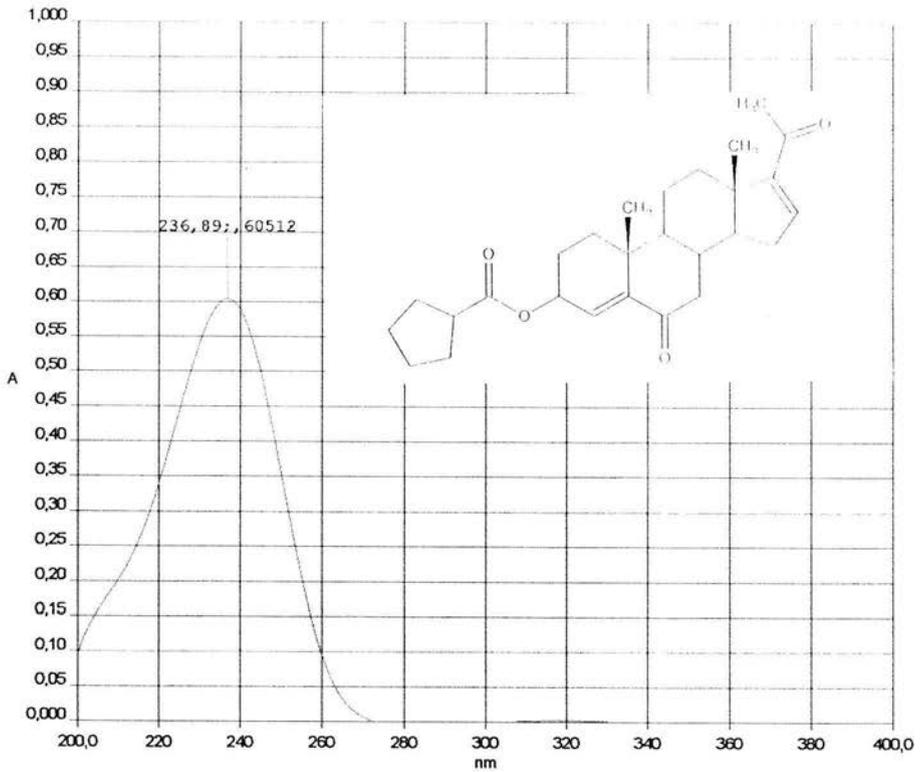
[Mass Spectrum]
 RT : 1.24 min Scan# : (45,47) Temp : 26.5 deg.C
 Ion Mode : EI+ Int. : 55.54



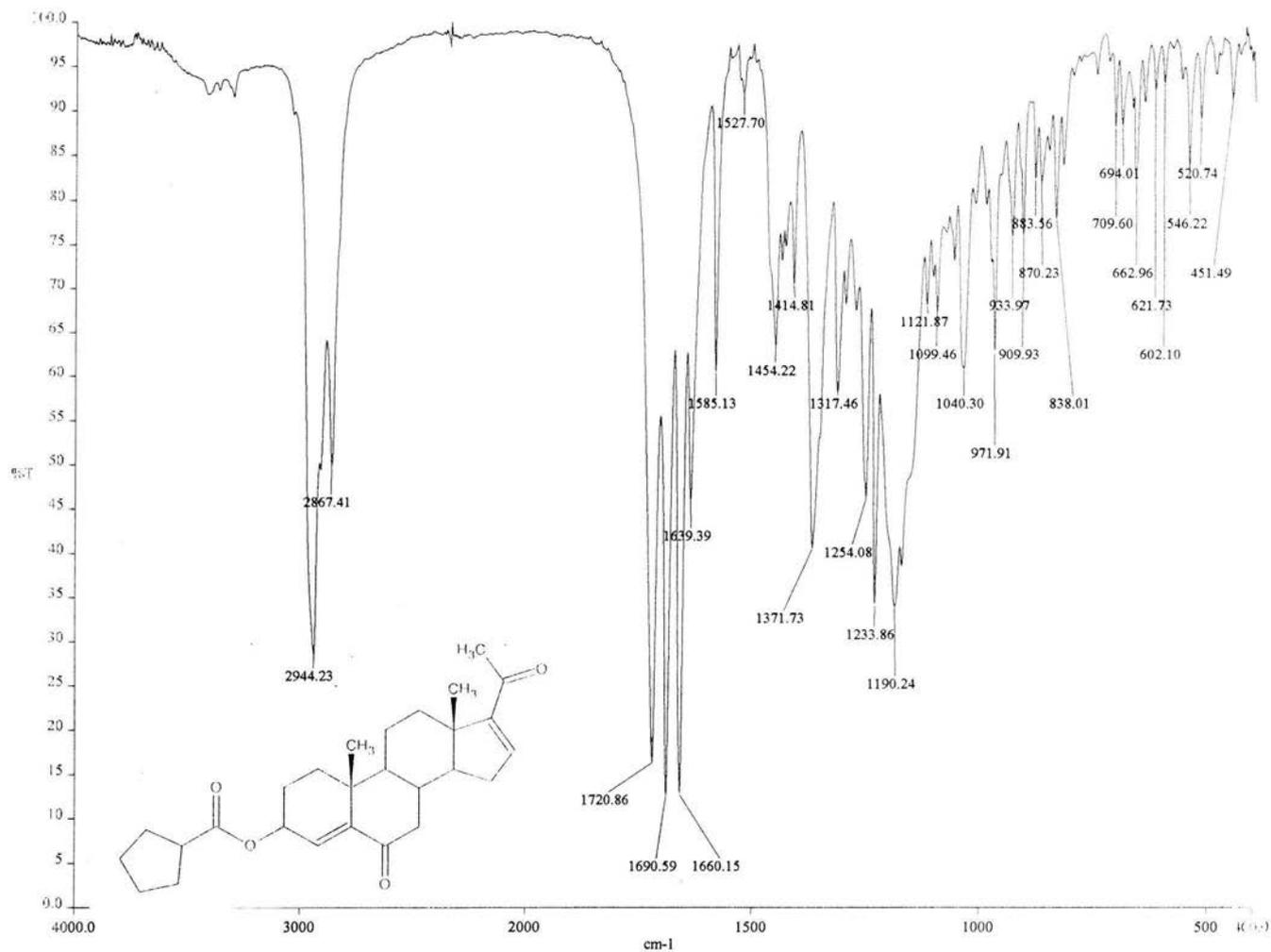
Espectro 18 de EMIE. 3β-(5-CLOROVALEROILOXI)- PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (22)

Date: 12/11/02

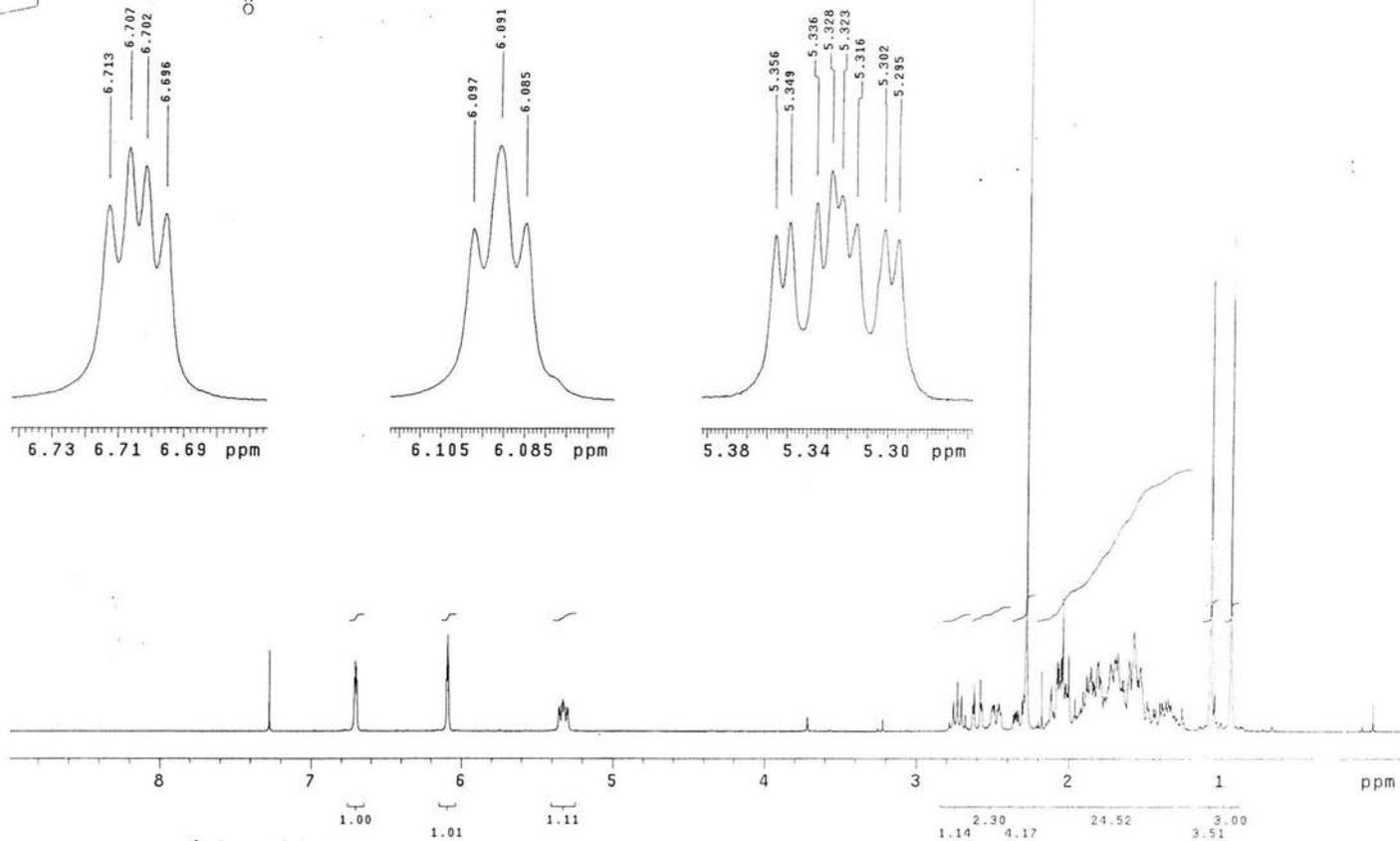
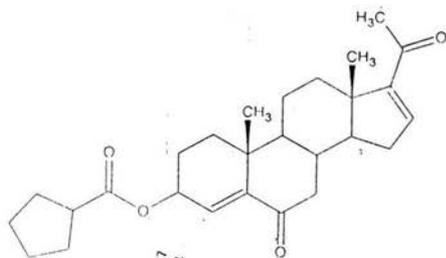
Time: 15:07:39



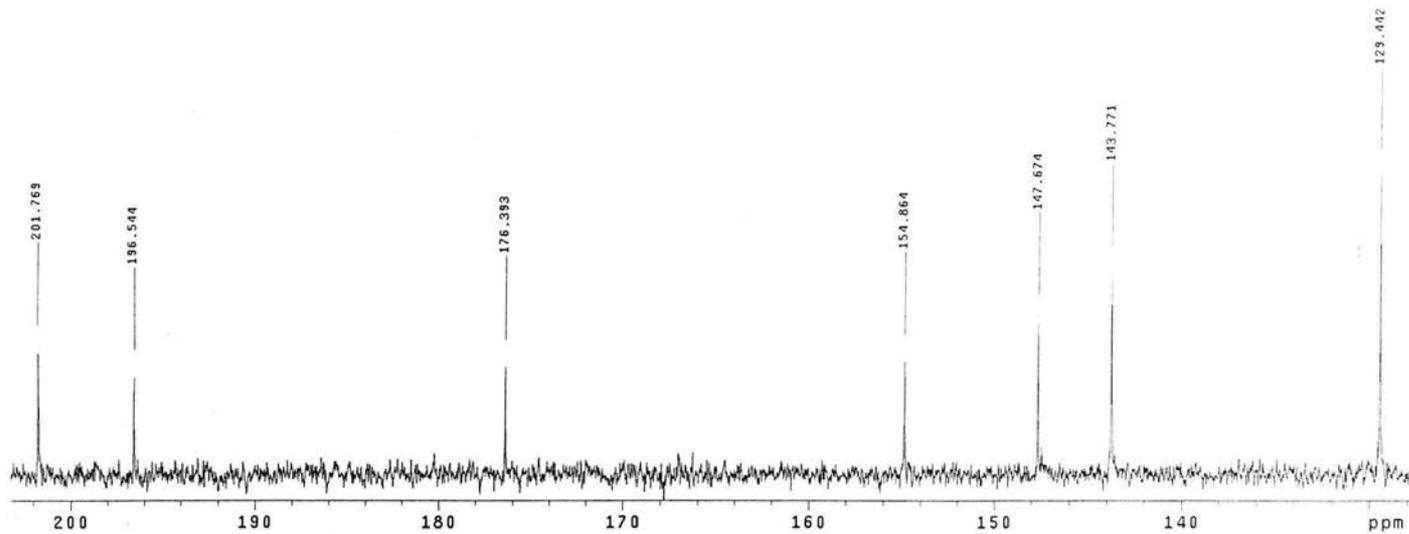
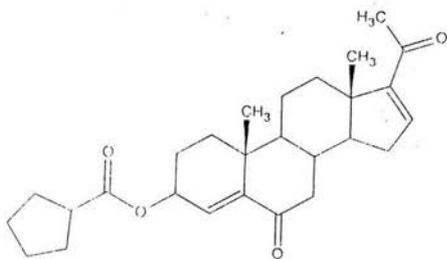
Espectro 19 de UV. 3β-(CICLOPENTILCARBONILOXI)-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (23)



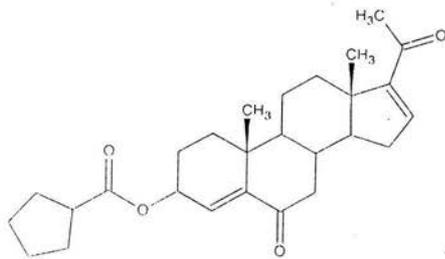
Espectro 20 de IR. 3β-(CICLOPENTILCARBONILOXI)-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (23)



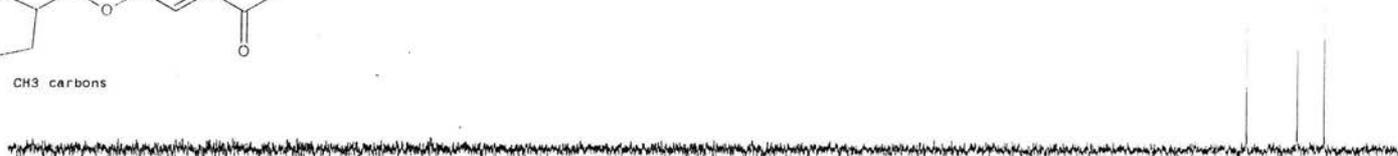
Espectro 21 de RMN¹H. 3β-(CICLOPENTILCARBONILOXI)-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (23)



Espectro 22 de RMN ¹³C. 3β-(CICLOPENTILCARBONILOXI)-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (23)



CH3 carbons



CH2 carbons



CH carbons

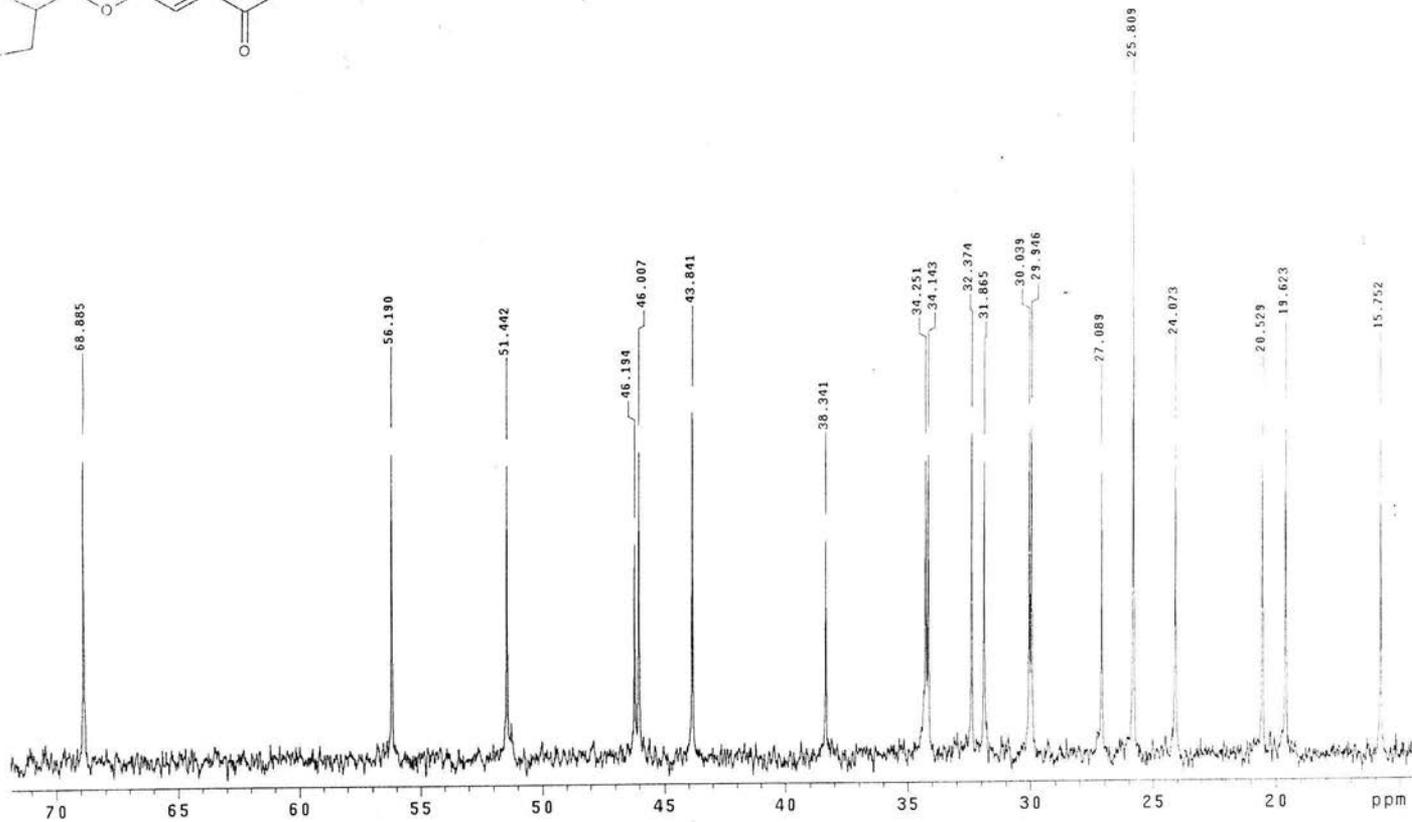
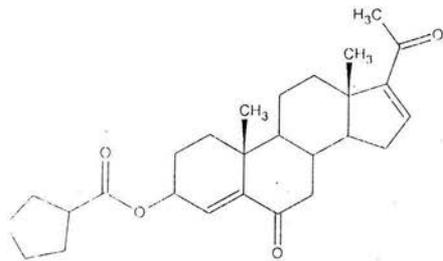


all protonated carbons

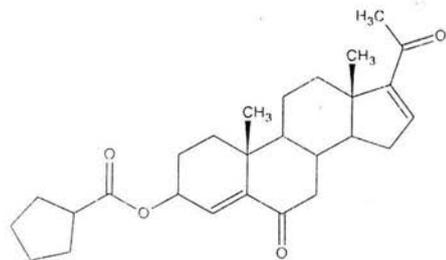


200 180 160 140 120 100 80 60 40 20 ppm

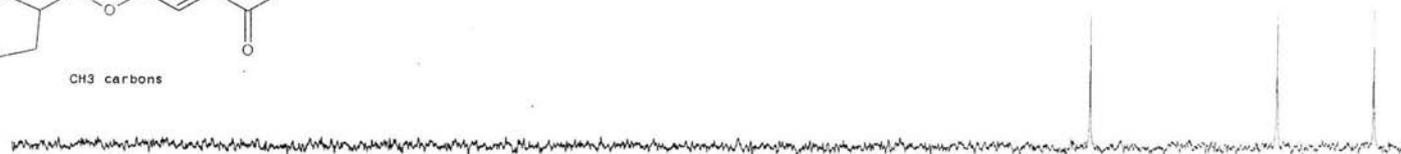
Espectro 23 de RMN¹³C. 3β-(CICLOPENTILCARBONILOXI)-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (23)



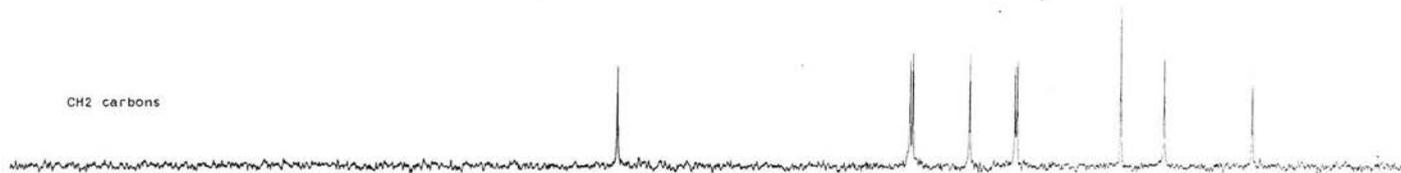
Espectro 24 de RMN¹³C. 3β-(CICLOPENTILCARBONILOXI)-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (23)



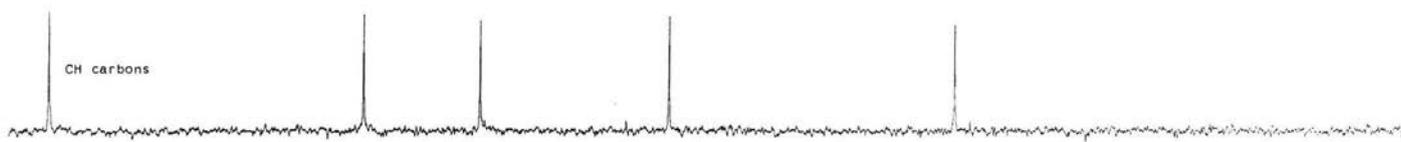
CH₃ carbons



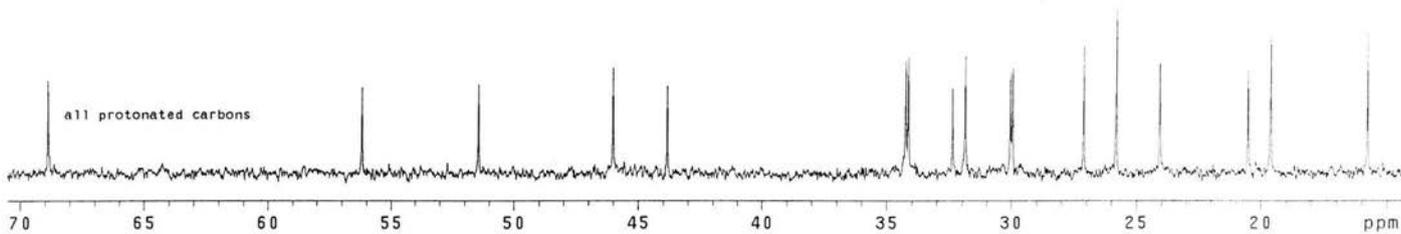
CH₂ carbons



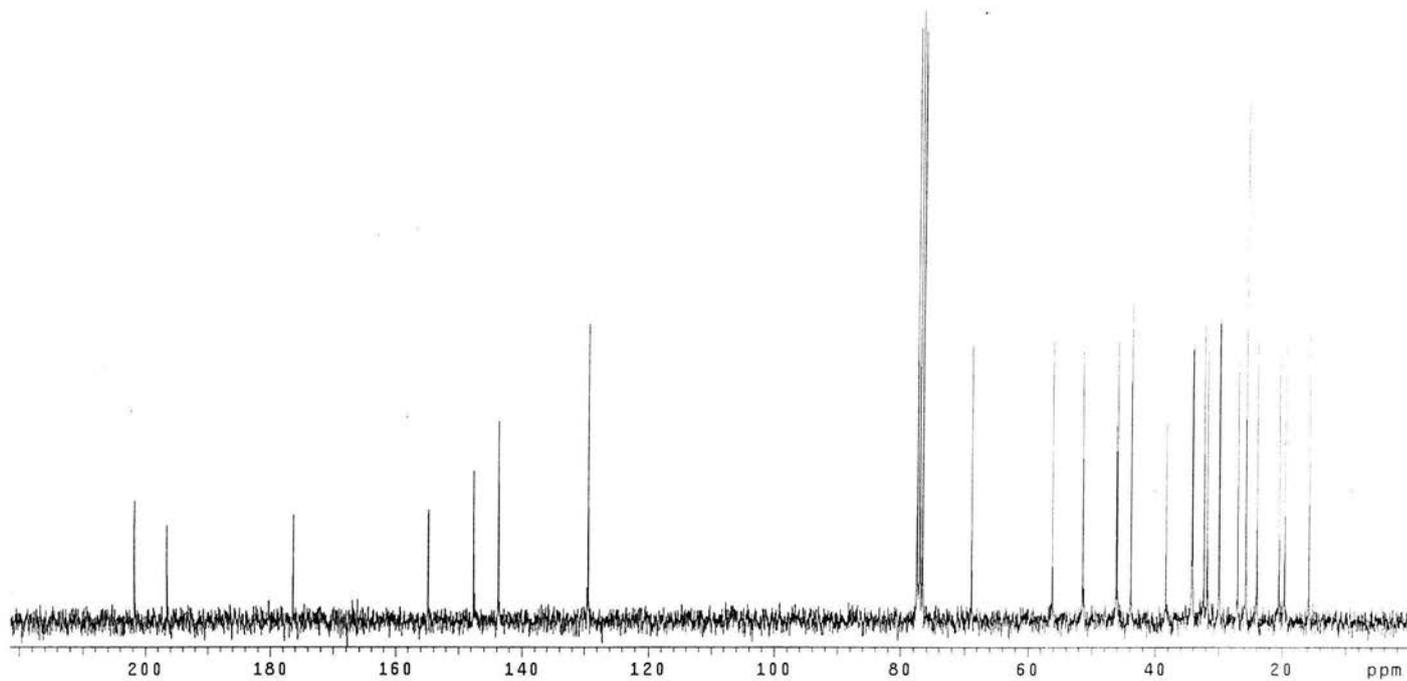
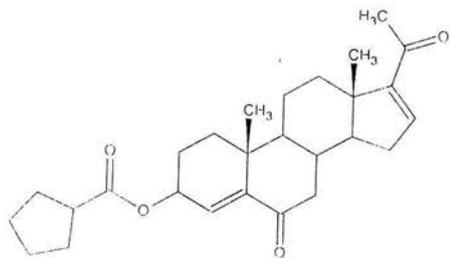
CH carbons



all protonated carbons

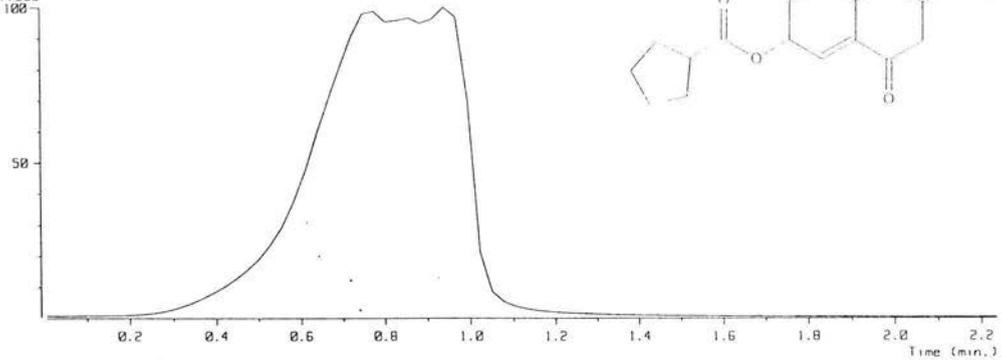
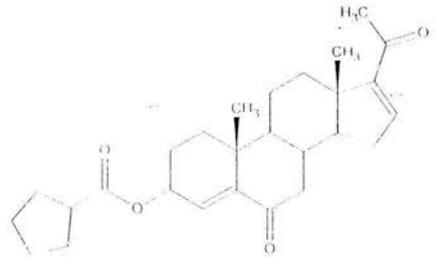


Espectro 25 de RMN¹³C. 3β-(CICLOPENTILCARBONILOXI)-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (23)

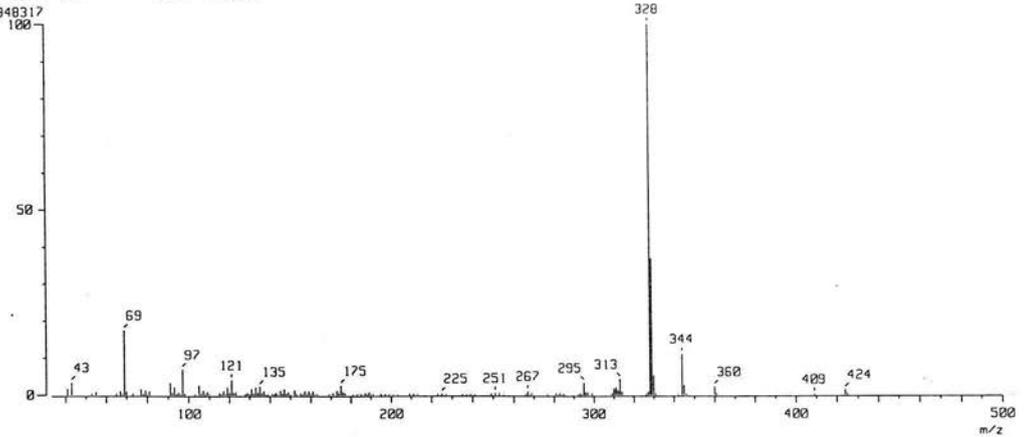


Espectro 26 de RMN¹³C. 3β-(CICLOPENTILCARBONILOXI)-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (23)

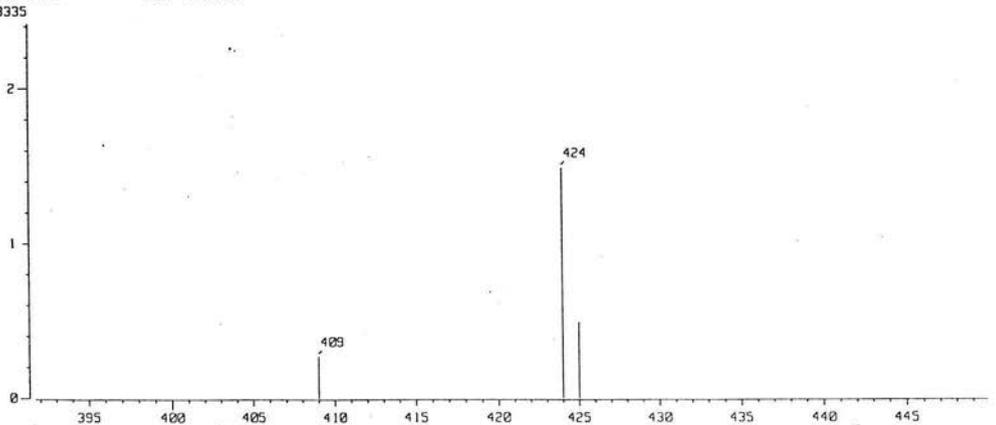
[TIC]
 Data : 0T6135_ECPENTIL_001 Date : 13-Mar-103 15:59
 Sample :
 Note : USRI, Fac. de Quimica, UNFM. Ion Mode : EI+
 Inlet : Direct
 Ion Species : Normal Ion [MF-Linear] Output RT Range : 0.00 to 2.23 min
 TIC Range : m/z 33 to 800
 2972295



[Mass Spectrum]
 RT : 0.85 min Scan# : (29,35)-(53,71) Temp : 27.7 deg.C
 Ion Mode : EI+ Int. : 90.44



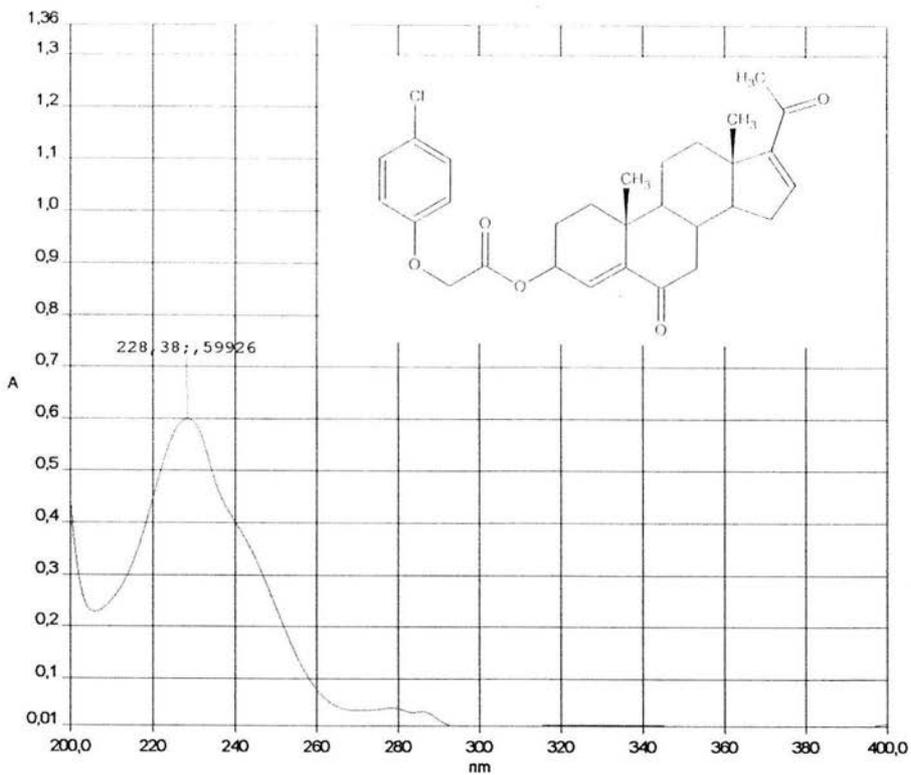
[Mass Spectrum]
 RT : 0.94 min Scan# : 35 Temp : 29.1 deg.C
 Ion Mode : EI+ Int. : 91.97



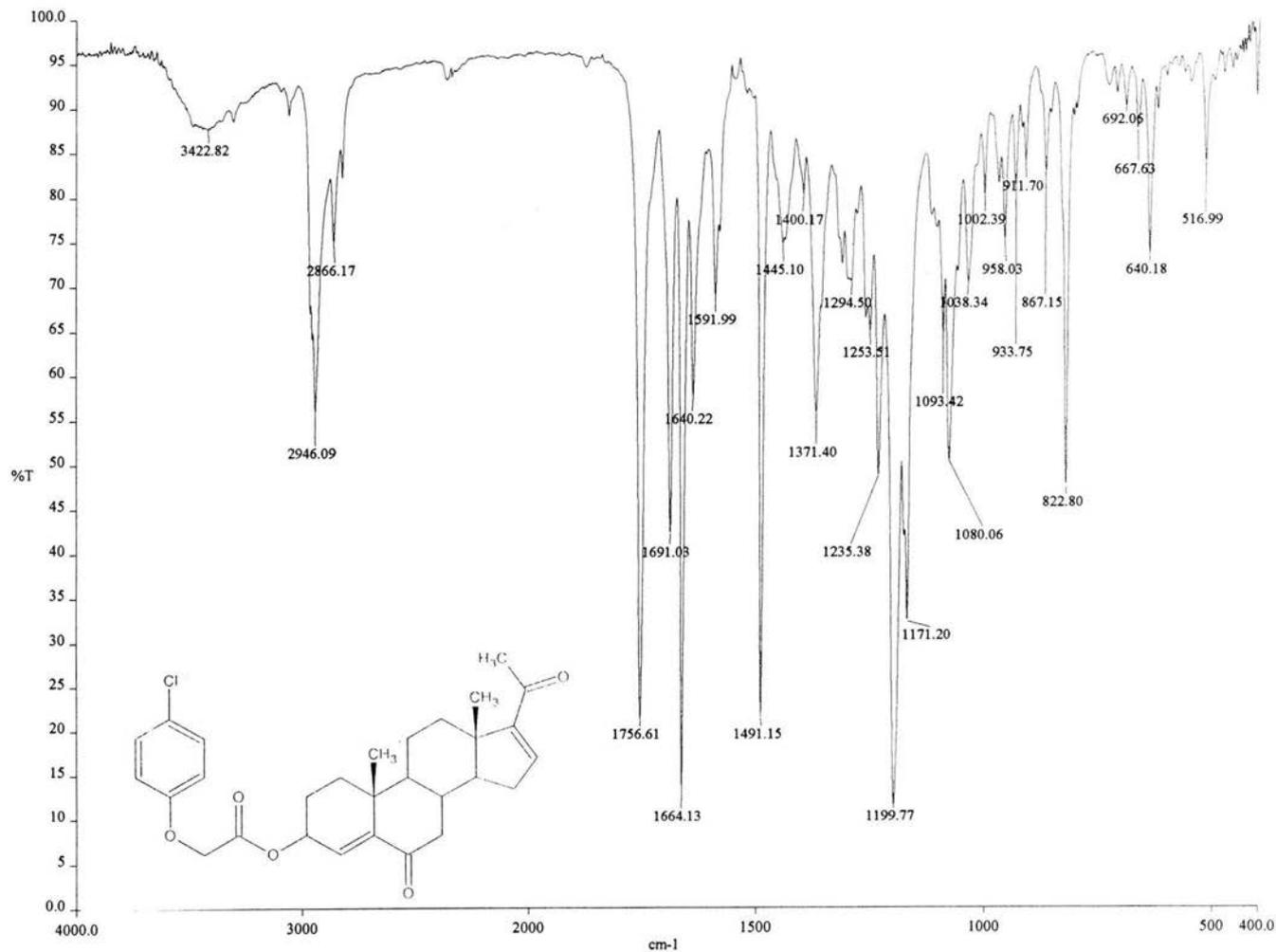
Espectro 27 de EMIE. 3-(CICLOPENTILCARBONIOXI)-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (23)

Date: 13/11/102

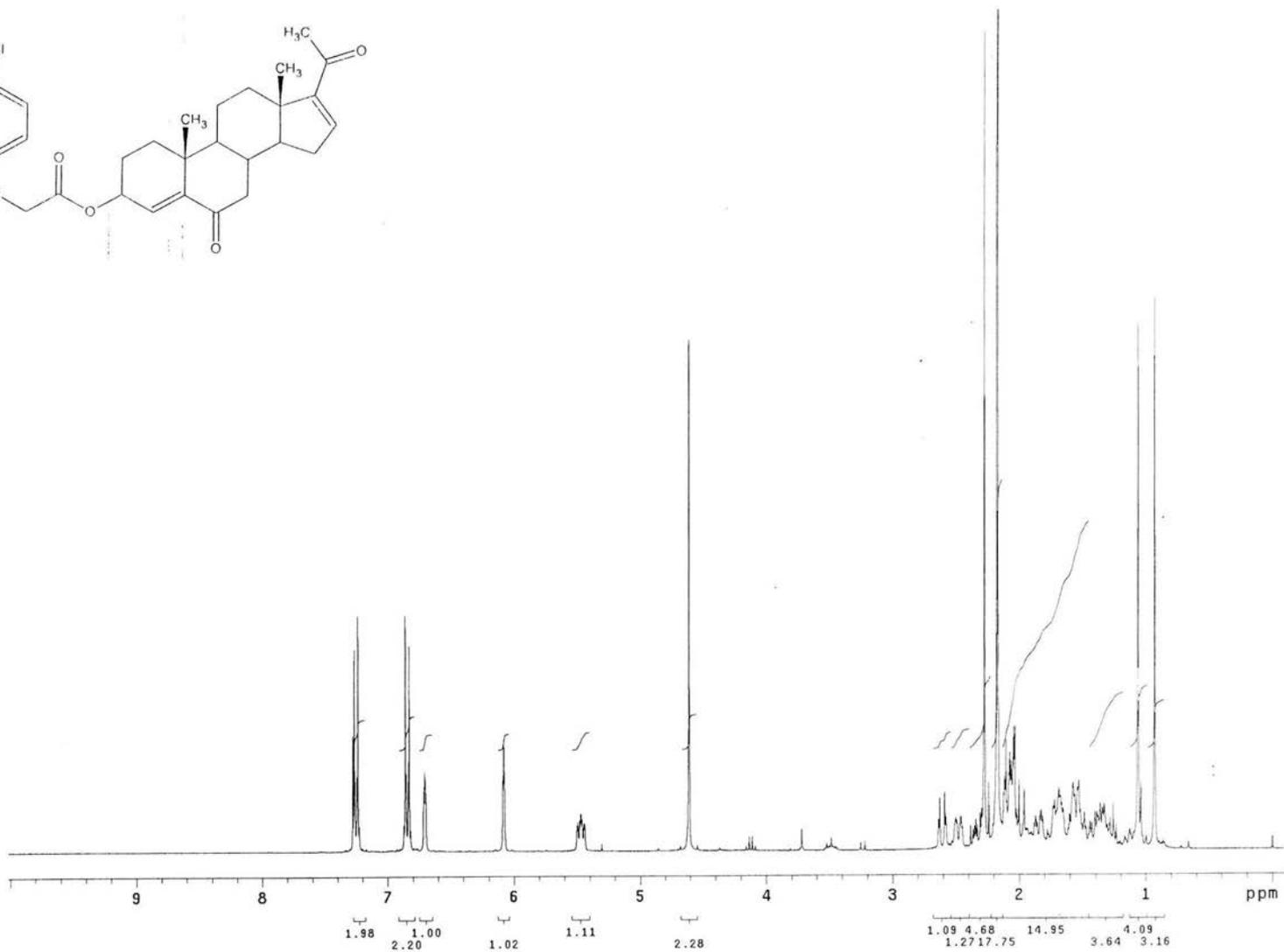
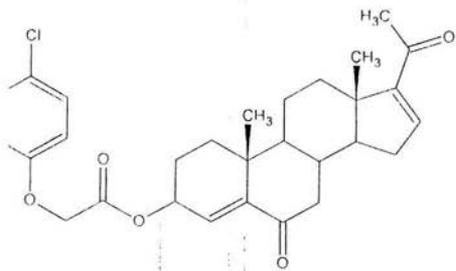
Time: 2:10:21



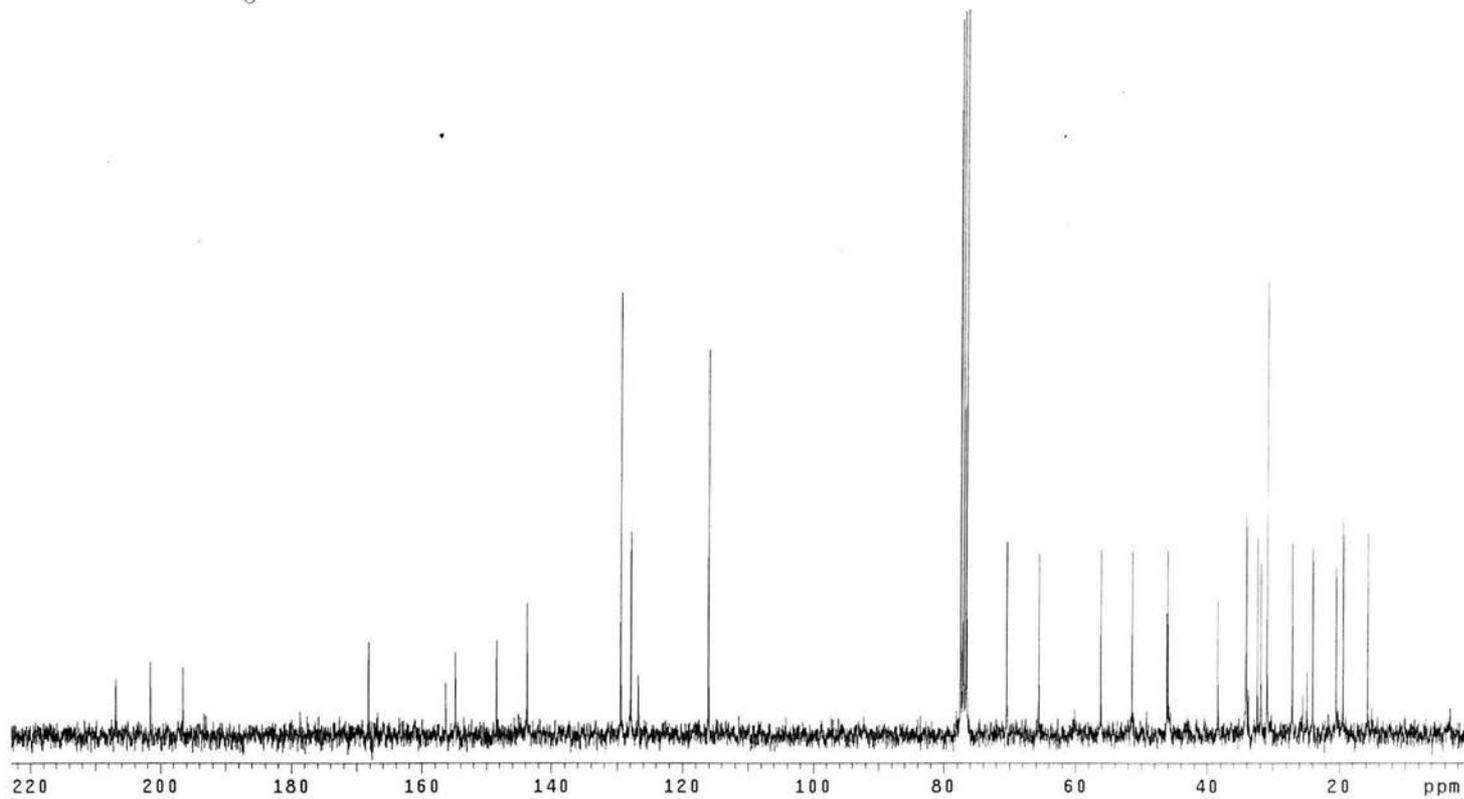
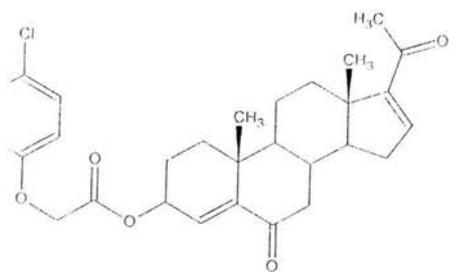
Espectro 28 de UV. 3β-(4-CLOROFENOXI)-ACETOXI-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (24)



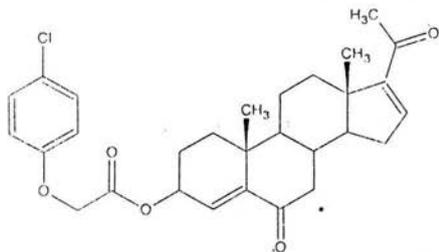
Espectro 29 de IR. 3β-(4-CLOROFENOXI)-ACETOXI-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (24)



Espectro 30 de RMN¹H. 3β-(4-CLOROFENOXI)-ACETOXI-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (24)



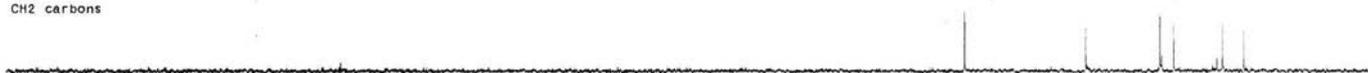
Espectro 31 de RMN¹³C. 3β-(4-CLOROFENOXI)-ACETOXI-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (24)



CH3 carbons



CH2 carbons



CH carbons

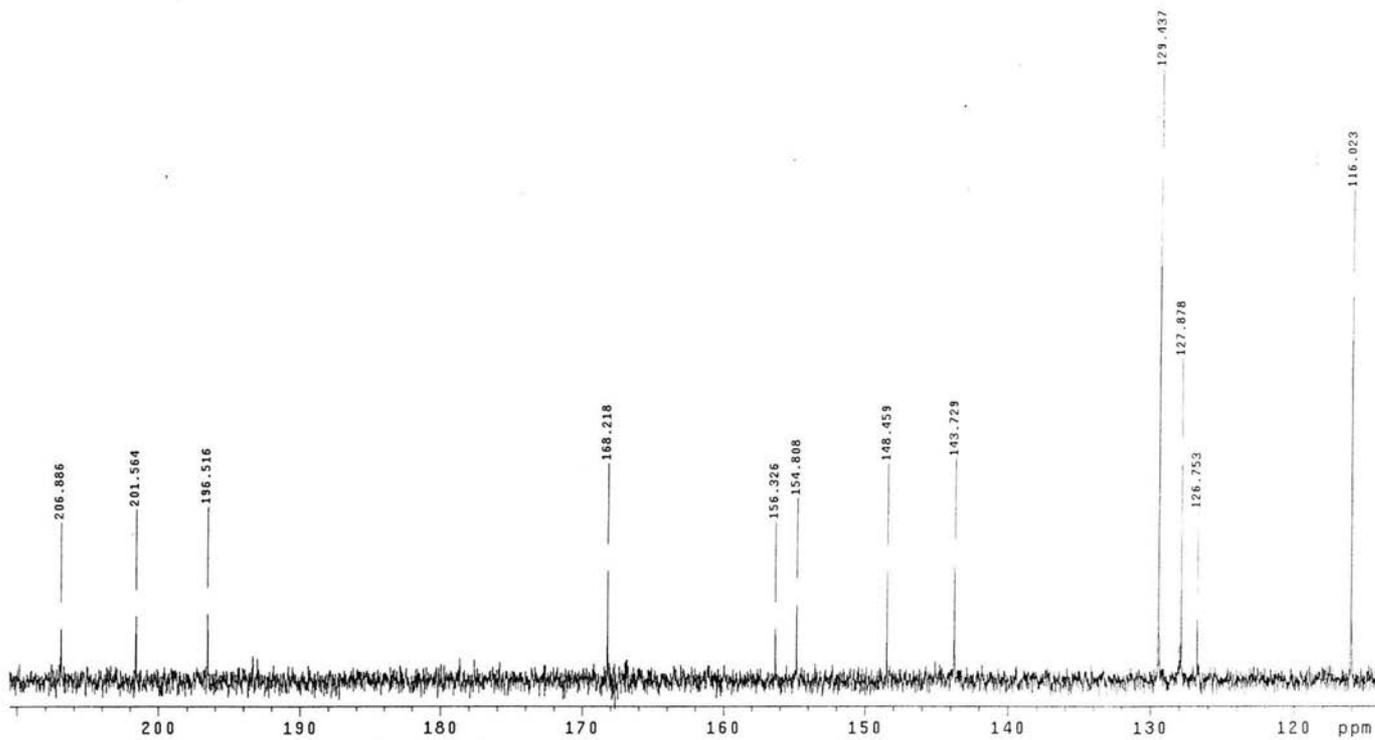
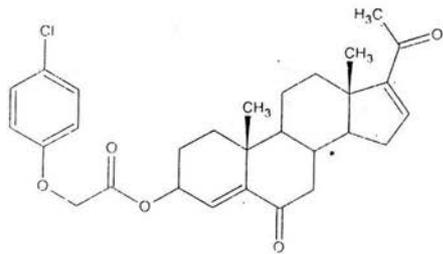


all protonated carbons



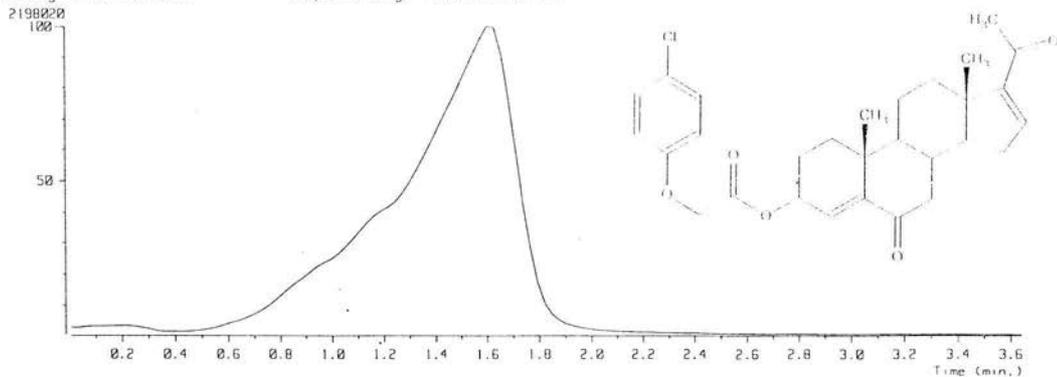
200 180 160 140 120 100 80 60 40 20 ppm

Espectro 32 de RMN¹³C. 3β-(4-CLOROFENOXI)-ACETOXI-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (24)

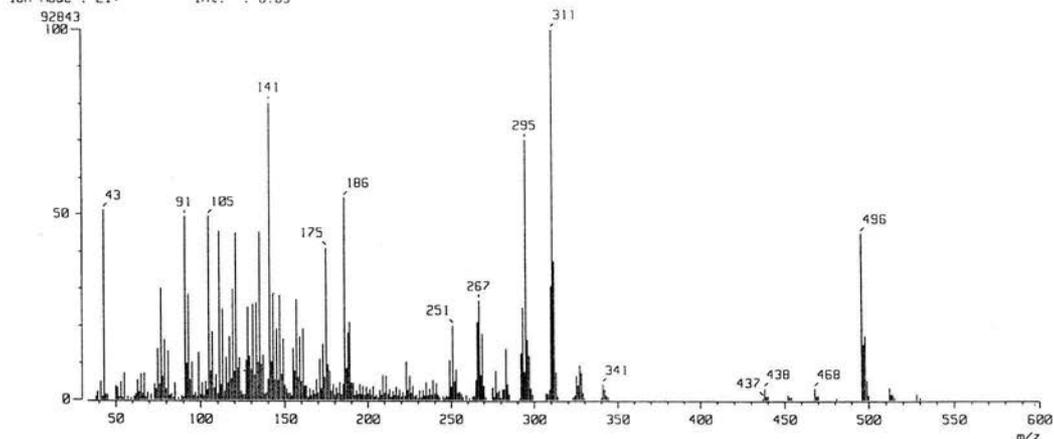


Espectro 33 de RMN¹³C. 3β-(4-CLOROFENOXI)-ACETOXI-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (24)

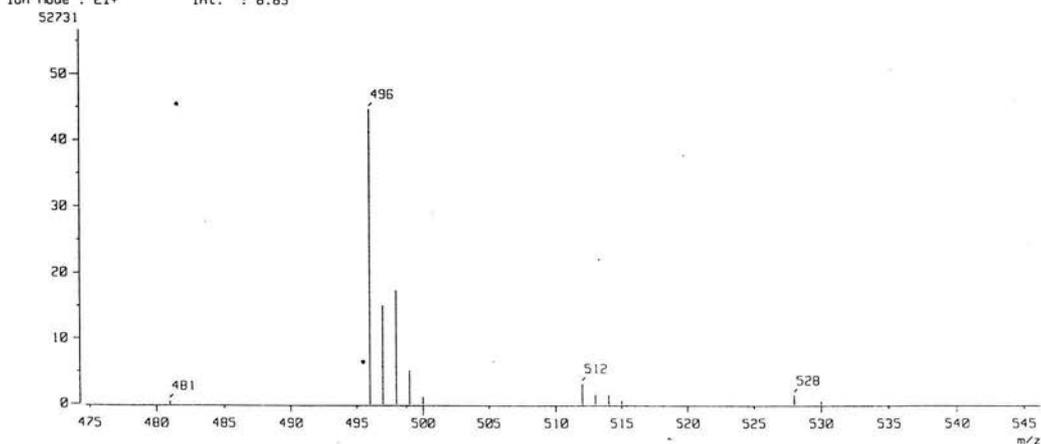
[TIC]
 Data : OT6153_ES-5-CLF_002 Date : 21-Mar-103 06:01
 Sample:
 Note : USRI, Fac. de Quimica, UNFM.
 Inlet : Direct Ion Mode : EI+
 Ion Species : Normal Ion [MF-Linear]
 TIC Range : m/z 33 to 800 Output RT Range : 0.00 to 3.64 min



[Mass Spectrum]
 RT : 1.60 min Scan# : (57,61) Temp : 6.4 deg.C
 Ion Mode : EI+ Int. : 8.85



[Mass Spectrum]
 RT : 1.60 min Scan# : (57,61) Temp : 6.4 deg.C
 Ion Mode : EI+ Int. : 8.85



Espectro 34 de EMIE. 3β-(4-CLOROFENOXI)-ACETOXI-PREGNA-4,16-DIEN-6,20-DIONA (24)